

UNIVERSITE DE NANTES

FACULTE DE MEDECINE

**CONTRIBUTION A L'ETUDE
DES MECANISMES DE L'ALLOREACTIVITE
DES CELLULES NATURAL KILLER HUMAINES**

THESE DE DOCTORAT

Ecole Doctorale Biologie – Santé Nantes – Angers

Discipline : Aspects moléculaires et cellulaires de la biologie

Spécialité : Immunologie

Présentée et soutenue publiquement par

MORVAN Maelig

A Nantes, le 4 février 2010, devant le jury ci-dessous :

Rapporteurs : **Dr. Armand BENSUSSAN** – Hôpital Saint-Louis, Paris
 Prof. Gilles THIBAUT – Université François Rabelais, Tours

Présidente : **Prof. Francine JOTEREAU** – Université de Nantes

Directrice de thèse : **Dr. Christelle RETIERE** – Etablissement Français du Sang, Nantes

« Celui qui renonce à être meilleur cesse déjà d'être bon. »

SOMMAIRE

<u>ABREVIATIONS</u>	1
<u>INTRODUCTION</u>	4
<u>I. Les cellules Natural Killer</u>	5
I.1. Historique	5
I.2. Caractéristiques	5
I.3. La « résistance hybride »	6
I.4. Le « soi manquant » (« missing self »)	7
I.5. La lyse spontanée	8
I.6. La cytotoxicité cellulaire dépendante de l'anticorps	9
<u>II. Le phénotype des cellules NK</u>	10
II.1. Les Killer cell Immunoglobulin-like Receptors (KIRs)	10
<u>II.1.a. Organisation des gènes KIR</u>	10
<u>II.1.b. Nomenclature et structure</u>	11
<u>II.1.c. Variabilité</u>	13
<u>II.1.d. Régulation de la transcription des gènes KIR</u>	14
<u>II.1.e. Ligands des récepteurs KIR</u>	16
II.2. Les hétérodimères CD94/NKG2	18
II.3. ILT-2	21
II.4. CD161	22
II.5. Les récepteurs activateurs	23
<u>II.5.a. NKG2D</u>	23
<u>II.5.b. 2B4</u>	25
<u>II.5.c. DNAM1</u>	25

<u>II.5.d. Les récepteurs de cytotoxicité naturelle (NCR)</u>	26
<u>II.5.e. Autres récepteurs reconnaissant des ligands du « non soi »</u>	27
<u>II.5.f. Les récepteurs de co-stimulation</u>	28
<u>III. Fonctions des cellules NK</u>	28
III.a. Cytotoxicité cellulaire et dégranulation des cellules NK	30
III.b. Production de cytokines et régulation de la réponse immunitaire	32
III.d. Prolifération des cellules NK	33
<u>IV. Développement des cellules NK</u>	34
IV.1. Etapes du développement	34
IV.2. Sous-types NK	37
IV.3. Education des cellules NK	39
<u>IV.3.a. Acquisition des fonctions NK</u>	39
<u>IV.3.b. Modèles proposés : <i>licensing</i>, <i>disarming</i> et <i>tuning</i></u>	40
<u>IV.3.c. Réversibilité de l'éducation des cellules NK</u>	41
<u>V. Les cellules NK en greffes de cellules souches hématopoïétiques</u>	42
V.1. Sources de CSH	43
V.2. Conditionnements pré-greffe	44
V.3. Choix des donneurs de CSH	44
V.4. Résultats cliniques de la greffe de CSH	45
V.5. Rôle des cellules NK en greffe de CSH	46
V.6. Le « soi manquant » en greffe de CSH	46
V.7. Impact des gènes KIR activateurs sur la greffe de CSH	50
<u>VI. Rôle des cellules NK dans le contrôle des infections</u>	51
VI.1. Récepteurs KIR et infections virales	52
<u>VI.1.a. Virus de l'hépatite C (VHC)</u>	52

VI.1.b. Virus de la grippe.....	53
VI.1.c. Herpèsvirus.....	53
VI.1.d. VIH.....	56
VI.2. Récepteurs KIR et infections bactériennes ou parasitaires.....	57
<u>VII. Cellules NK et autoimmunité.....</u>	58
<u>VIII. Cellules NK et cancers.....</u>	61
<u>OBJECTIFS DU TRAVAIL DE THESE.....</u>	64
<u>PROJET N°1 : Caractérisation des anticorps anti-KIR.....</u>	68
<u>PROJET N°2 : Fonctions des cellules NK KIR2DS1⁺.....</u>	87
<u>PROJET N°3 : Extinction de l'expression du KIR2DS1 par ARN interférence.....</u>	109
<u>PROJET N°4 : Fonctions des cellules NK KIR3DS1⁺.....</u>	119
<u>DISCUSSION – PERSPECTIVES.....</u>	134
<u>BIBLIOGRAPHIE.....</u>	146

ABREVIATIONS

ADCC : Antibody Dependent Cellular Cytotoxicity

AICL : Activation Induced C-type Lectine

AML : Acute Myeloid Leukemia

BAT-3 : HLA-B Associated Transcript 3

CMH : Complexe Majeur d'Histocompatibilité

CMV : CytoMegalovirus

CpG : Cytosine-Phosphate-Guanine

CSH : Cellules Souches Hématopoïétiques

CSP : Cellules Souches Périphériques

DAP12 : DNAX Activation Protein 12

DC : Dendritic Cell

DNAM-1 : DNAX Accessory Molecule 1

EBV : Epstein-Barr Virus

EFS : Etablissement Français du Sang

eGFP : enhanced Green Fluorescent Protein

GvHD : Graft versus Host Disease

GvL : Graft versus Leukemia

HLA : Human Leukocyte Antigen

HSP : Heat Shock Protein

ICAM : InterCellular Adhesion Molecule

IFN- γ : InterFeroN gamma

Ig : Immunoglobuline

IL : InterLeukine

ILT : Immunoglobulin-Like Transcript

ITAM : Immunoreceptor Tyrosine-based Activation Motif

ITIM : Immunoreceptor Tyrosine-based Inhibition Motif

ITSM : Immunoreceptor Tyrosine-based Switch Motif

KIR : Killer cell Immunoglobulin-like Receptor

LAMP : Lysosomal-Associated Membrane Protein

LFA : Lymphocyte Function-associated Antigen

LGL : Large Granular Lymphocyte

LIR : Leukocyte Immunoglobulin-like Receptor

LLT-1 : Lectin-Like Transcript 1

LRC : Leukocyte Receptor Complex

MIC-A, -B : MHC class I polypeptide-related sequence A, B

MOI : Multiplicity Of Infection

MTOC : MicroTubule Organizing Center

MULT-1 : Murine ULBP-Like Transcript 1

NCR : Natural Cytotoxicity Receptor

NK : Natural Killer

PAMP : Pathogen-Associated Molecular Pattern

PBMC : Peripheral Blood Mononuclear Cell

RAET-1 : Retinoic Acid Early Transcript 1

RISC : RNA-Induced Silencing Complex

SAP : SLAM Associated Protein

SCID : Severe Combined Immuno-Deficient

SH2 : Src Homology 2

SHP : SH2 domain containing Phosphatase

shRNA : short hairpin RNA

siRNA : small interfering RNA

SLAM : Signaling Lymphocytic Activation Molecule

TcR : T cell Receptor

TGF- β : Transforming Growth Factor beta

TLR : Toll-Like Receptor

ULBP-1 : UL16 Binding Protein 1

VIH : Virus de l'Immunodéficience Humaine

INTRODUCTION

I. Les cellules Natural Killer

I.1. Historique

Les cellules Natural Killer (NK) ont d'abord été découvertes chez la souris il y a près de 35 ans par Kiessling (Kiessling *et al.* 1975a; Kiessling *et al.* 1975b), et en parallèle par Herberman (Herberman *et al.* 1975a; Herberman *et al.* 1975b). Elles ont été initialement considérées comme un artefact expérimental dans l'étude de la cytotoxicité des lymphocytes T. En effet, ces expériences avaient pour but d'étudier la capacité bien caractérisée de lymphocytes T à lyser des cellules tumorales contre lesquelles des souris avaient été préalablement immunisées. Les résultats obtenus montraient de manière répétée qu'une certaine population de cellules semblait capable de lyser les cellules tumorales sans y avoir été préalablement sensibilisée, ce qui était en contradiction avec le seul modèle connu qui était celui des lymphocytes T. Ce n'est qu'après que ces cellules capables de « réactivité naturelle » aient été observées dans de nombreuses espèces que l'hypothèse d'un lignage cellulaire distinct a été émise. Les cellules NK humaines ont donc été nommées ainsi par Kiessling et al. car elles ne semblaient pas requérir d'activation pour lyser des cellules cibles (Kiessling *et al.* 1975a; Kiessling *et al.* 1975b).

I.2. Caractéristiques

Elles ont été décrites comme de grands lymphocytes granuleux (LGL) non adhérents et non phagocytaires (Trinchieri 1989), malgré que certaines cellules NK puissent aussi présenter une morphologie normale de petits lymphocytes en fonction de leur état d'activation (Dvorak *et al.* 1983). Les cellules NK sont donc difficiles à détecter simplement par leur taille et leur morphologie. Chez la souris, l'identification de la protéine de surface NK1.1 (Ryan *et al.* 1992) a permis de définir grossièrement les cellules NK murines comme NK1.1⁺, TcR⁻ (T cell Receptor), sIg⁻ (immunoglobuline de surface) et

CD16⁺. Les cellules NK humaines sont quant à elles définies comme des lymphocytes CD19⁻ CD3⁻ CD56⁺ CD16⁺ NKp46⁺ (Cooper *et al.* 2001; Walzer *et al.* 2007b). Elles constituent entre 2 et 20% des lymphocytes circulant dans le sang périphérique et elles sont aussi retrouvées dans des tissus périphériques, dont le foie, la cavité péritonéale et le placenta. Les cellules NK au repos circulent donc principalement dans le sang mais elles sont également capables, après activation par des cytokines, d'extravasation et d'infiltration dans la plupart des tissus qui contiennent des cellules malignes ou infectées par des pathogènes (Fogler *et al.* 1996; Biron 1997; Glas *et al.* 2000).

I.3. La « résistance hybride »

Il a été montré que les cellules NK étaient les effecteurs de la « résistance hybride » observée dans le contexte de greffes de moelle osseuse chez la souris (Klein *et al.* 1986). Cette « résistance hybride » avait été décrite chez des souris hétérozygotes (AB) irradiées qui rejetaient des greffes de cellules souches hématopoïétiques (CSH) provenant de l'un ou l'autre des deux parents homozygotes (AA ou BB). Pourtant, le greffon n'exprimait dans ce cas aucune molécule du Complexe Majeur d'Histocompatibilité (CMH) différente de celle du receveur. De plus, les greffons syngéniques étaient tolérés. Ces observations n'étaient pas en accord avec le modèle établi selon lequel le rejet était opéré par les lymphocytes T et se produisait uniquement lorsque le greffon exprimait des molécules du CMH différentes de celles du receveur, ce qui pouvait se manifester aussi bien par une réaction du greffon contre l'hôte que de l'hôte contre le greffon. Ce type de rejet pouvait également être observé chez des souris SCID (severe combined immunodeficient) qui n'ont pas de lymphocytes B et T mais possèdent des cellules NK fonctionnelles (Murphy *et al.* 1987), ce qui confirmait leur implication dans ce mécanisme.

I.4. Le « soi manquant » (« *missing self* »)

Malgré qu'il ait été montré que les cellules NK reconnaissent les cellules allogéniques, la façon dont les cellules NK distinguent les cellules cibles qu'elles doivent tuer de celles qu'elles doivent épargner n'était pas encore claire. Quand Klas Kärre a résumé ses travaux et ceux d'autres chercheurs travaillant sur le sujet, il a trouvé à ces cellules cibles un dénominateur commun. Ce qui est important, ce n'est pas ce qui est exprimé par les cellules cibles mais ce qui leur manque. Ceci a conduit Klas Kärre à formuler l'hypothèse du « soi manquant » selon laquelle les cellules NK tuent uniquement les cellules cibles qui n'expriment pas les molécules du CMH de classe I du soi (Ljunggren and Karre 1990; Karre 2002). Pour confirmer cette hypothèse du « soi manquant », une lignée cellulaire tumorale déficiente en molécules du CMH de classe I nommée RMA-S a été générée au laboratoire de Klas Kärre à partir de la lignée cellulaire tumorale RMA. Les souris inoculées étaient en mesure de rejeter les cellules tumorales RMA-S alors que la tumeur issue de la lignée RMA, non déficiente en molécules du CMH de classe I, pouvait se développer. En déplaçant les cellules NK de ces souris, les tumeurs issues des lignées RMA et RMA-S pouvaient se développer de la même façon chez les souris inoculées (Karre *et al.* 1986). Ces expériences confirmaient que le rejet sélectif des cellules cibles déficientes en molécules du CMH de classe I, ici RMA-S, est bien opéré par les cellules NK.

Ce modèle a été confirmé plus tard par la découverte de récepteurs inhibiteurs exprimés à la surface des cellules NK et qui reconnaissent les molécules du CMH de classe I (*Figure 1*). Le « soi manquant » pouvait ainsi expliquer le phénomène de résistance hybride : les cellules NK du receveur tuent les cellules du greffon provenant des parents

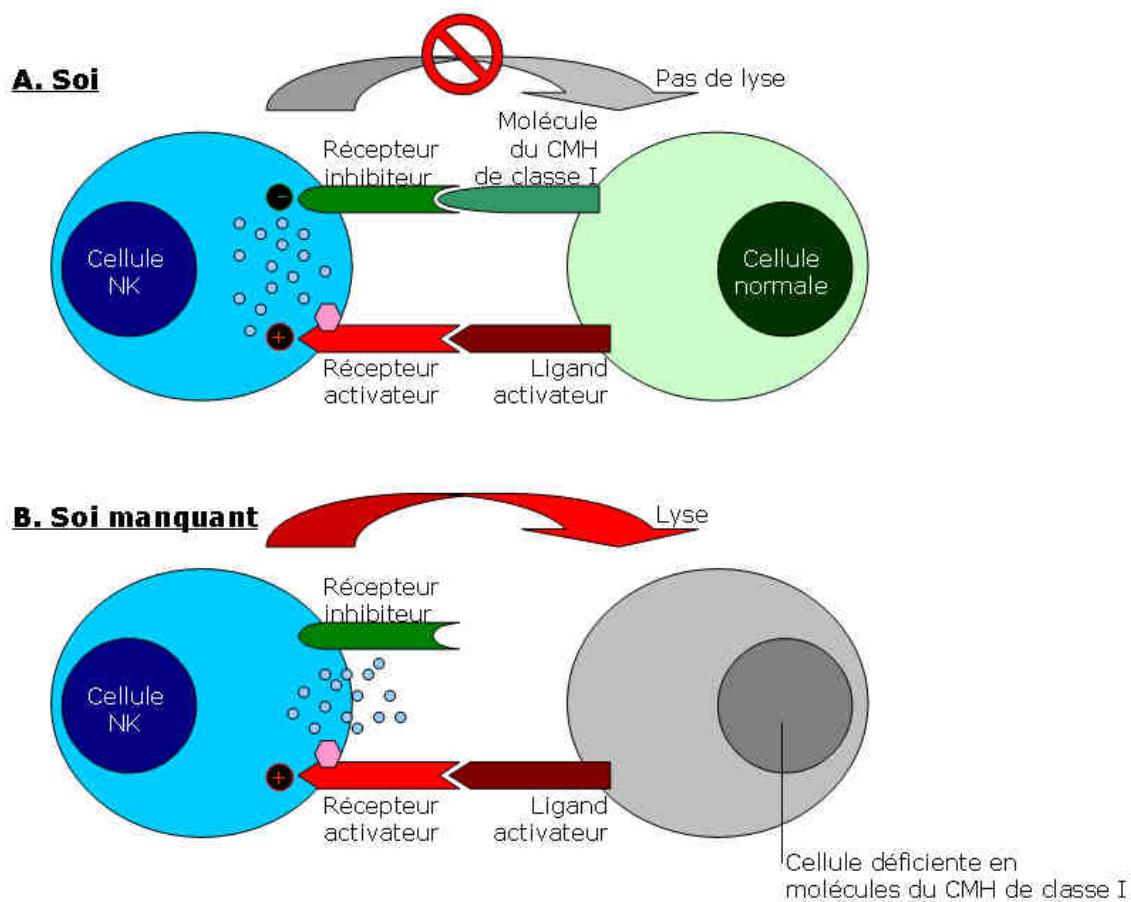


Figure 1. Reconnaissance du soi et du soi manquant

A. Lorsqu'elle interagit avec une cellule cible autologue normale, la cellule NK peut recevoir des signaux activateurs, mais ces signaux sont compensés par les signaux reçus via les récepteurs inhibiteurs qui reconnaissent leurs ligands du CMH de classe I du soi.

B. Si la cellule cible perd l'expression des molécules du CMH de classe I, par exemple dans le cas d'une infection virale ou d'un processus tumoral, les récepteurs inhibiteurs des cellules NK ne sont plus engagés. La cellule NK ne reçoit plus de signaux inhibiteurs et la cellule cible est lysée. C'est de cette façon que les cellules NK perçoivent le soi manquant.

parce que ces cellules n'expriment pas toutes les molécules du CMH de classe I du receveur au complet.

I.5. La lyse spontanée

La lyse spontanée est le mécanisme selon lequel les cellules NK deviennent cytotoxiques vis-à-vis de cellules cibles anormales sans sensibilisation préalable. Cette cytotoxicité « naturelle » est le résultat de l'absence d'inhibition des cellules NK. Ce processus est en effet fermement contrôlé par plusieurs récepteurs inhibiteurs qui régulent négativement la cytotoxicité des cellules NK, en particulier vis à vis des cellules cibles du « soi » (*Figure 1A*). La plupart de ces récepteurs inhibiteurs ont pour ligands les molécules du CMH de classe I. Quand une cellule cible est reconnue par ces récepteurs inhibiteurs, ce qui signifie qu'elle présente suffisamment de molécules du CMH de classe I du soi à sa surface, la lyse NK est inhibée. Dans le cas de cellules tumorales ou infectées par certains virus, il est fréquent d'observer une diminution du niveau d'expression des molécules du CMH de classe I. Les cellules cibles ne présentent plus à leur surface ces ligands des récepteurs inhibiteurs exprimés par les cellules NK (« soi manquant », *Figure 1B*) qui ne sont plus inhibées et tuent ainsi les cellules cibles potentiellement dangereuses avec lesquels elles interagissent.

Percevoir l'absence de molécules du CMH de classe I du soi n'est toutefois pas suffisant pour induire l'activation des cellules NK. C'est le cas des globules rouges, des cellules qui n'expriment aucune molécule du CMH de classe I à leur surface mais qui sont tout de même protégées de la lyse NK. En effet, pour être cytotoxiques, les cellules NK requièrent également une stimulation par des récepteurs activateurs dont les ligands sont exprimés par les cellules cibles. L'activation de la cytotoxicité résulte donc d'une balance

complexe où les signaux délivrés par les récepteurs activateurs dominent les signaux inhibiteurs. Lorsque les récepteurs activateurs des cellules NK sont engagés avec leurs ligands présents à la surface de la cellule cible, de nombreuses cascades de signalisation intracellulaires rendent les cellules NK cytotoxiques. Si la cellule cible présente un niveau normal d'expression des molécules du CMH de classe I à sa surface, les cascades de signalisation inhibitrices vont prendre le dessus sur les signaux délivrés par les récepteurs activateurs, ce qui va inhiber la cytotoxicité NK. La reconnaissance de ces cellules cibles et leur lyse par les cellules NK est ainsi régulée par un processus résultant de l'intégration de multiples signaux délivrés aussi bien par des récepteurs inhibiteurs qu'activateurs.

I.6. La cytotoxicité cellulaire dépendante de l'anticorps

En plus de la lyse spontanée, les cellules NK CD16⁺ sont également capables de cytotoxicité cellulaire dépendante de l'anticorps (ADCC), une composante de la réponse immunitaire de l'organisme envers les pathogènes. Le CD16 est en effet la forme transmembranaire du récepteur de faible affinité pour le fragment Fc-gamma des IgG (FcγRIIIa) et est appelé le « récepteur de l'ADCC ». Dans ce processus, les anticorps d'isotype IgG se fixent sur les antigènes du pathogène exprimés à la surface des cellules cibles. Les cellules effectrices entrent alors en contact avec les cellules cibles présentant ces anticorps via le CD16 présent sur les cellules NK (*Figure 2*). Les résidus tyrosine de la chaîne ζ du CD16 sont alors phosphorylés (Vivier *et al.* 1991), ce qui enclenche la lyse. Ainsi, les anticorps établissent un lien entre les cellules cibles et les cellules effectrices, rendant donc la réaction immunitaire spécifique d'un antigène, bien qu'elle soit opérée par des cellules effectrices non spécifiques de cet antigène. Avec les lymphocytes T cytotoxiques, l'ADCC est donc une composante de la réponse immunitaire spécifique, utilisée par l'organisme pour éliminer les cellules infectées par les virus et les cellules

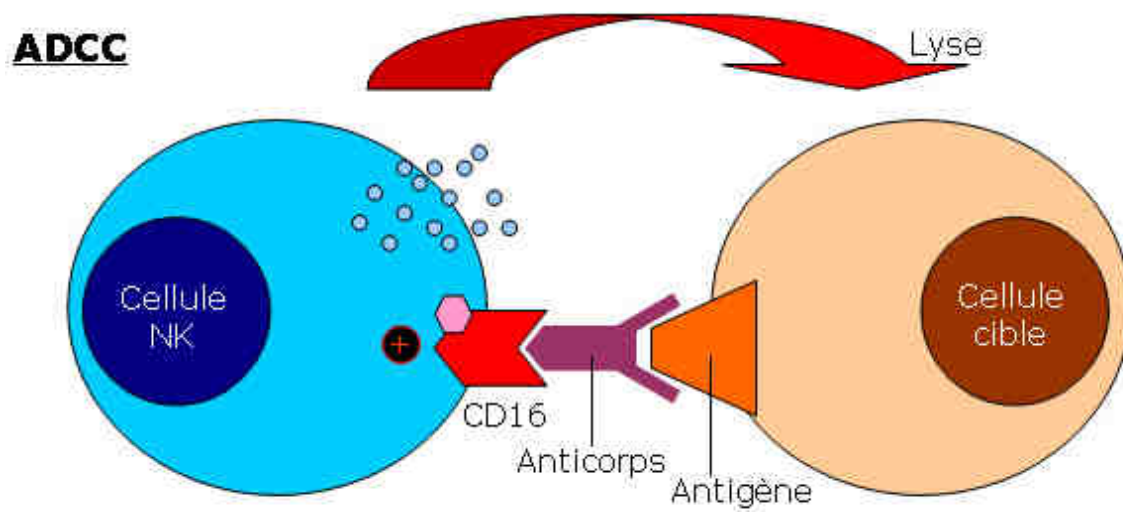


Figure 2. Mécanisme de l'ADCC

L'ADCC consiste en la lyse des cellules cibles qui expriment des antigènes reconnus par des anticorps qui se lient via leur fragment Fc au récepteur activateur CD16.

tumorales primaires. Enfin, le niveau d'expression du CD16 à la surface des cellules NK est directement corrélé avec leur activité d'ADCC, et les fonctions de lyse spontanée et d'ADCC opérées par les mêmes cellules NK sont également corrélées.

II. Le phénotype des cellules NK

II.1. Les Killer cell Immunoglobulin-like Receptors (KIRs)

Découverts il y a 20 ans (Moretta *et al.* 1990b) et exprimés par les cellules NK (Moretta *et al.* 1990a; Litwin *et al.* 1994) et les lymphocytes T $\gamma\delta$ et $\alpha\beta$ CD8⁺ et CD4⁺ (Ferrini *et al.* 1994; Phillips *et al.* 1995), les KIRs sont des protéines appartenant à la superfamille des immunoglobulines qui reconnaissent les molécules du CMH de classe I humain, les molécules HLA. Il a été montré grâce à un modèle de souris transgénique que la reconnaissance du « soi manquant » décrite précédemment était médiée *in vivo* via les récepteurs KIR (van Bergen *et al.* 2009).

II.1.a. Organisation des gènes KIR

Les gènes *KIR* codant pour ces protéines sont localisés sur le chromosome 19 (région 19q13.4) (Trowsdale 2001), au niveau du LRC (Leukocyte Receptor Complex) qui regroupe également d'autres gènes codant pour des récepteurs exprimés par les cellules NK (Wilson *et al.* 2000; Trowsdale *et al.* 2001). Ces gènes comprennent 9 exons qui codent pour des régions différentes (*Figure 3*) : les exons 1 et 2 correspondent au peptide signal et aux deux premiers acides aminés de la protéine mature, les exons 3, 4 et 5 correspondent respectivement aux domaines de type immunoglobuline D0, D1 et D2, l'exon 6 code pour la partie (« stem ») reliant le domaine D2 proximal à la région transmembranaire, elle-même codée par l'exon 7, et les exons 8 et 9 correspondent à la partie intracytoplasmique (Colonna and Samaridis 1995).

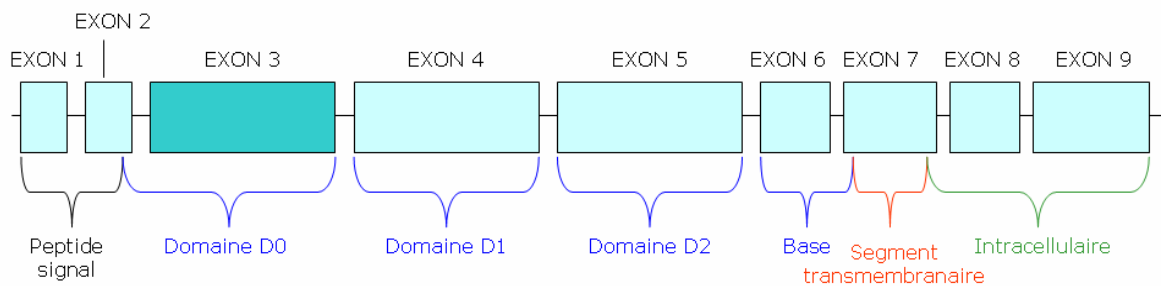


Figure 3. Organisation d'un gène KIR

Les gènes KIR comprennent 9 exons. L'exon 1 et le début de l'exon 2 codent pour le peptide signal. La fin de l'exon 2 et l'exon 3 codent pour le domaine D0, l'exon 4 code pour le domaine D1, l'exon 5 pour le domaine D2 et l'exon 6 ainsi que le début de l'exon 7 codent pour la base de la région extracellulaire représentée en bleu. Une partie de l'exon 7 code pour le segment transmembranaire (en rouge). La fin de l'exon 7 et les exons 8 et 9 codent pour le domaine intracellulaire (en vert).

II.1.b. Nomenclature et structure

Il existe 16 gènes (et 2 pseudogènes) *KIR* dont les noms sont les suivants : KIR2DL1, 2, 3, 4 et 5 (A et B), KIR2DS1, 2, 3, 4 et 5, KIR3DL1, 2 et 3, KIR3DS1, KIR2DP1 et KIR3DP1. Cette nomenclature dépend de la structure des récepteurs pour lesquels ils codent et a été établie par un comité, créé en 2002, chargé de coordonner l'appellation des gènes codant pour les récepteurs KIR (Marsh *et al.* 2003). Ce comité est chargé de la gestion d'un site internet (<http://www.ebi.ac.uk/ipd/kir/>) qui est une base de données contenant les séquences de tous les allèles KIR recensés (Robinson *et al.* 2005). De plus, tous les deux ans a lieu le KIR Polymorphism Workshop au cours duquel la nomenclature peut être actualisée sur proposition du comité et suite à un vote de tous les participants.

Les récepteurs KIR sont des protéines de 306 à 456 acides aminés qui possèdent 2 ou 3 domaines extracellulaires de type immunoglobuline (KIR2D ou KIR3D, respectivement) (*Figure 4*). Ces domaines extracellulaires sont impliqués dans la reconnaissance spécifique des molécules HLA de classe I. Au niveau intracellulaire, les récepteurs KIR inhibiteurs possèdent une partie intracytoplasmique longue (KIR2DL et KIR3DL, pour « Long ») qui contient un ou deux ITIM (Immunoreceptor Tyrosine-based Inhibition Motif). Lorsque ces KIR inhibiteurs sont engagés avec leur ligand, les tyrosines présentes sur les ITIM sont phosphorylées, recrutant ainsi des tyrosine-phosphatases qui vont inhiber les signaux délivrés par les récepteurs activateurs. Au contraire, les récepteurs KIR activateurs possèdent une partie intracytoplasmique courte (KIR2DS et KIR3DS, pour « Short ») et sont capables de s'associer à la protéine transmembranaire adaptatrice DAP12 qui possède des motifs ITAM (Immunoreceptor Tyrosine-based Activation Motif) grâce à un résidu chargé dans leur domaine transmembranaire. Lorsque ces KIR activateurs sont

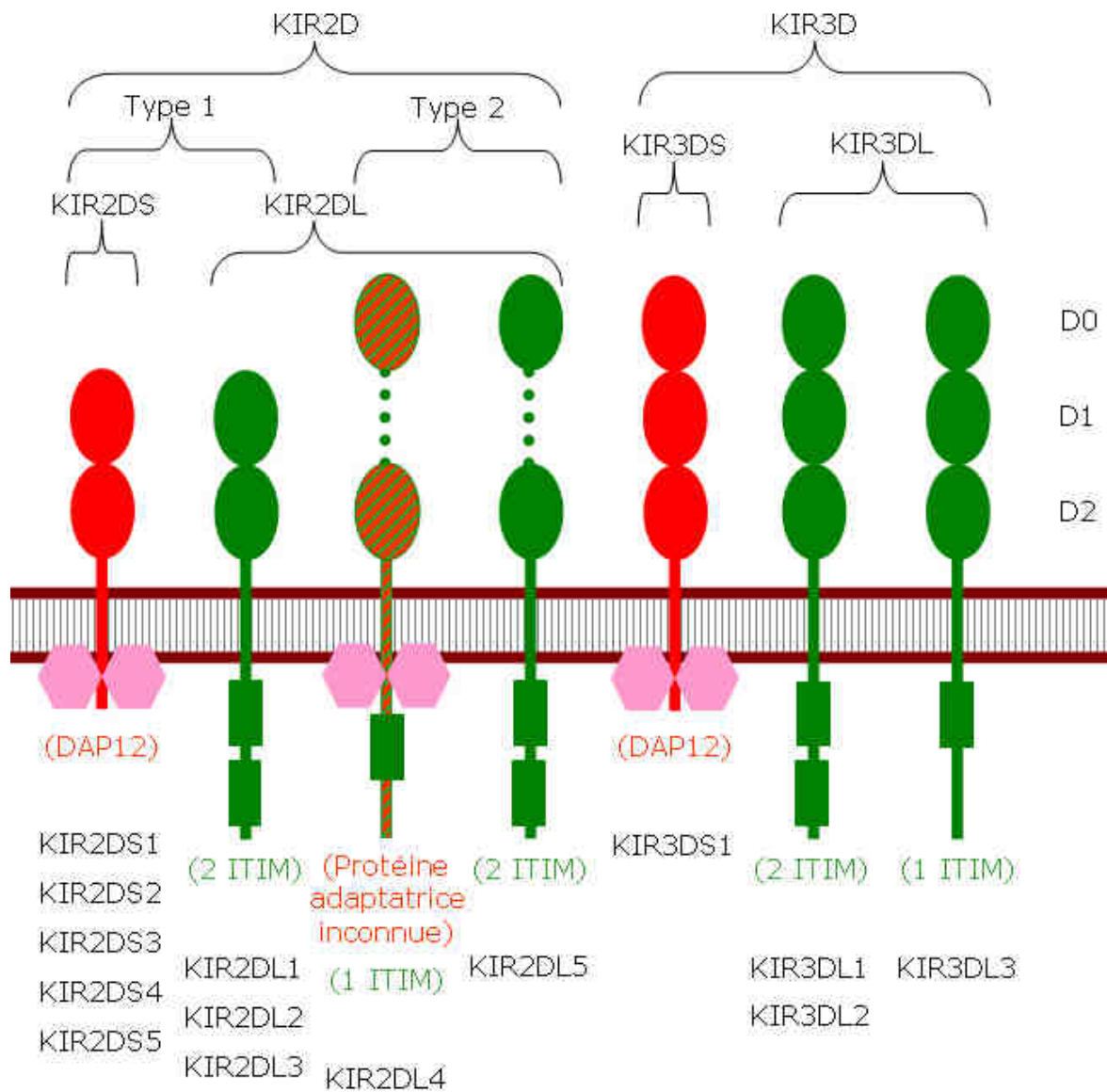


Figure 4. Structure des récepteurs KIR

Les récepteurs KIR possèdent deux ou trois domaines Ig-like extracellulaires (KIR2D ou KIR3D) ainsi qu'une extrémité intracytoplasmique longue (KIR2DL ou KIR3DL) ou courte (KIR2DS ou KIR3DS). Les KIR2D de type 1 possèdent les domaines D1 et D2 alors que les KIR2D de type 2 possèdent les domaines D0 et D2. Les KIR3D ont eux les domaines D0, D1 et D2. Les KIR avec une partie intracellulaire courte, ainsi que KIR2DL4, sont capables de s'associer avec une protéine adaptatrice capable de délivrer un signal d'activation. Les KIR inhibiteurs possèdent une partie intracellulaire longue qui contient un ou deux motifs ITIM.

engagés avec leur ligand, les tyrosines présentes sur les ITAM sont phosphorylées, recrutant ainsi des tyrosine-kinases qui vont initier la cascade de transduction du signal activateur (Vilches and Parham 2002).

De plus, les récepteurs KIR peuvent être classés en trois groupes selon les domaines Immunoglobulin-like qu'ils présentent (*Figure 4*). Les gènes KIR2D de type I codent pour des récepteurs avec deux domaines extracellulaires Immunoglobulin-like D1 et D2 et ils possèdent tous huit exons et un pseudoexon 3. Ils comprennent les inhibiteurs KIR2DL1, KIR2DL2, KIR2DL3, les activateurs KIR2DS1, KIR2DS2, KIR2DS3, KIR2DS4, KIR2DS5 et le pseudogène KIR2DP1 (Wagtmann *et al.* 1995a). Les gènes KIR2D de type II possèdent une structure différente et codent pour des récepteurs avec deux domaines extracellulaires Immunoglobulin-like D0 et D2. Il s'agit de KIR2DL4 et KIR2DL5, qui ne possèdent pas l'exon 4 présent chez tous les autres KIR (Selvakumar *et al.* 1996; Vilches *et al.* 2000b). De plus, la partie intracytoplasmique du KIR2DL4 ne contient qu'un seul motif ITIM et dispose d'un résidu chargé (arginine) dans son domaine transmembranaire. Cette particularité lui confère la possibilité de délivrer à la fois des signaux inhibiteurs et activateurs (Rajagopalan *et al.* 2001). Enfin, les gènes KIR3D possèdent la totalité des neuf exons et codent pour des récepteurs avec trois domaines extracellulaires Immunoglobulin-like D0, D1 et D2. Les récepteurs de ce groupe sont les inhibiteurs KIR3DL1, KIR3DL2, KIR3DL3 et l'activateur KIR3DS1. Le pseudogène KIR3DP1 n'a pas les exons 6 à 9, ni parfois l'exon 2. Toutefois, il partage une homologie de séquence importante avec les KIR3D, en particulier KIR3DL3 (Martin *et al.* 2000). De plus, si KIR3DL1 et KIR3DL2 possèdent bien deux motifs ITIM dans leur partie intracytoplasmique, ce n'est pas le cas de KIR3DL3 qui n'en a qu'un seul.

Les récepteurs KIR activateurs sont plus récents dans l'évolution et dérivent probablement de leurs homologues inhibiteurs (Abi-Rached and Parham 2005). La fréquence des gènes *KIR* activateurs est très variable d'une population à l'autre (Single *et al.* 2007), alors que leur diversité allélique est très limitée comparée à celle des inhibiteurs (Hou *et al.* 2008).

II.1.c. Variabilité

Chaque individu diffère dans le nombre et le type de gènes KIR dont il a hérité de ses parents. En effet, les gènes KIR sont organisés sur le LRC en haplotypes qui montrent une variabilité extrêmement importante dans le nombre et le type de gènes KIR présents. Les gènes *KIR* « cadres » sont des gènes très conservés qui délimitent deux régions très variables où sont localisés les autres gènes *KIR* restants. Ces gènes « cadres » sont KIR3DL3 à l'extrémité centromérique et KIR3DL2 à l'extrémité télomérique, ainsi que KIR2DL4 et KIR3DP1 au centre, (Martin *et al.* 2000; Wilson *et al.* 2000; Vilches and Parham 2002). C'est ainsi que deux groupes d'haplotypes, A et B, ont été décrits (Uhrberg *et al.* 1997) (*Figure 5*). Ces deux groupes se distinguent selon le nombre de gènes KIR inhibiteurs et activateurs présents. Alors que les haplotypes du groupe A ne possèdent qu'un seul gène KIR activateur, KIR2DS4, et quatre gènes KIR inhibiteurs (KIR2DL1, KIR2DL3, KIR3DL1 et KIR3DL2) les haplotypes du groupe B se caractérisent par la présence de différentes combinaisons des gènes KIR2DS1, KIR2DS2, KIR2DS3, KIR2DS5 et KIR3DS1. Les haplotypes du groupe B possèdent donc une plus grande variabilité dans le nombre de gènes KIR présents, puisqu'ils possèdent de un à cinq KIR activateurs, ainsi que des KIR inhibiteurs absents dans les haplotypes du groupe A comme KIR2DL2 et KIR2DL5.

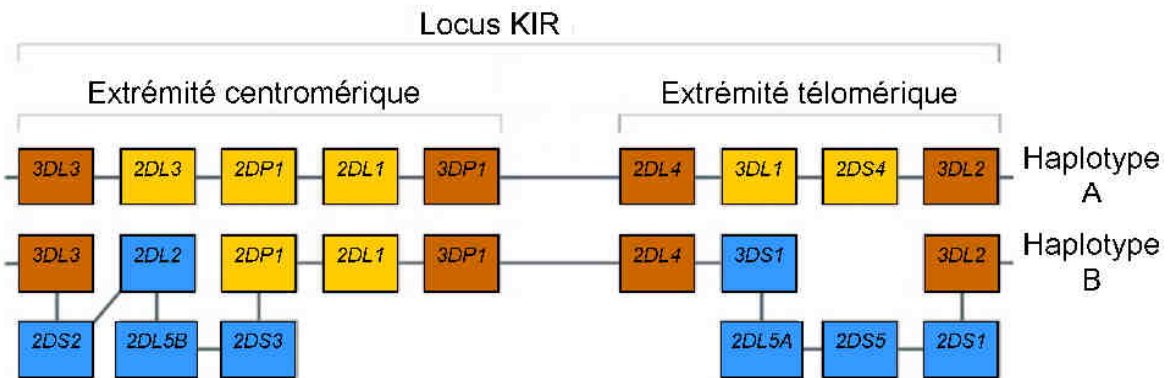


Figure 5. Exemples d'haplotypes *KIR* A et B (d'après Parham, 2005)

Les gènes cadres *KIR3DL3*, *KIR3DP1*, *KIR2DL4* et *KIR3DL2*, très conservés, sont représentés en brun. Les haplotypes A contiennent un seul gène codant pour un *KIR* activateur, le *KIR2DS4*, les autres gènes codent pour des *KIR* inhibiteurs. Les gènes contenus dans les haplotypes A sont représentés en jaune. Les haplotypes B peuvent contenir de nombreux autres gènes *KIR*, en particulier activateurs, qui sont représentés en bleu.

Si l'absence d'expression de certains gènes et allèles KIR est due à une absence de transcription, comme c'est le cas pour les pseudogènes KIR2DP1 et KIR3DP1 et certains allèles KIR2DL5 (Vilches *et al.* 2000a), d'autres gènes KIR intacts comme KIR3DL3 sont transcrits mais leurs produits sont exprimés faiblement à la surface des cellules NK (Trundley *et al.* 2006). Certains polymorphismes alléliques affectant la séquence protéique des récepteurs KIR conduisent à une rétention de la protéine dans le cytoplasme (KIR3DL1*004) (Pando *et al.* 2003) ou à la sécrétion de formes tronquées solubles (KIR2DS4*003) (Maxwell *et al.* 2002).

Les produits des gènes KIR sont distribués de façon clonale et aléatoire (expression stochastique) au sein du répertoire de cellules NK (Valiante *et al.* 1997). Ainsi, les cellules NK d'un individu expriment seulement un ou quelques uns des récepteurs KIR, alors que certaines cellules NK n'expriment pas de récepteurs KIR. Ces différentes populations peuvent être mises en évidence par cytométrie en flux grâce à des combinaisons d'anticorps spécifiques des KIR (*Figure 6*).

II.1.d. Régulation de la transcription des gènes KIR

L'expression sélective et stochastique des récepteurs KIR génère un répertoire de populations NK variées capables de détecter sensiblement des changements dans l'expression des molécules HLA de classe I à la surface des cellules cibles potentielles. Les mécanismes qui contrôlent l'expression sélective des gènes codant pour ces récepteurs sont très complexes et ne dépendent pas d'un promoteur unique comme c'est le cas pour d'autres gènes. Les études sur la régulation de la transcription des gènes *KIR* révèlent la présence de transcrits sens et antisens (Pascal *et al.* 2006). Il existe en effet un promoteur antisens qui chevauche le promoteur sens, ce qui produit des transcrits bidirectionnels

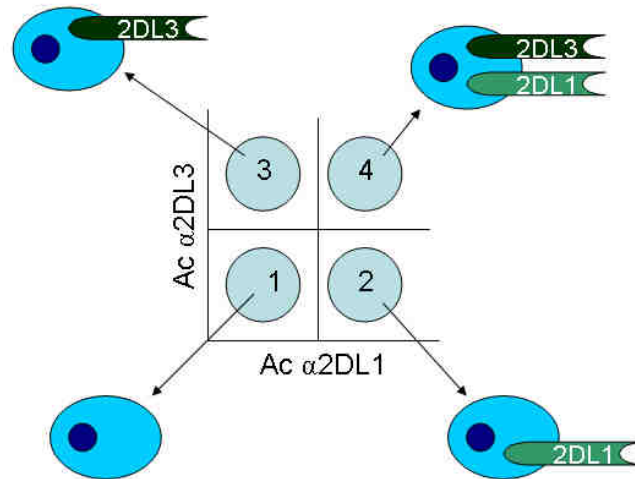


Figure 6. Expression clonale et stochastique des KIR

Le répertoire NK KIR est formé de différentes sous-populations qui peuvent exprimer aucun, un ou plusieurs KIR. Ces différentes populations peuvent être détectées par cytométrie en flux grâce à des anticorps spécifiques des KIR. Le diagramme représente ici schématiquement l'allure d'un density plot obtenu en utilisant une combinaison d'un anticorps spécifique du KIR2DL1 et d'un anticorps spécifique du KIR2DL3. La population 1, ou double négative, n'exprime aucun de ces deux KIR. La population 2 n'exprime que le KIR2DL1 alors que la population 3 n'exprime que le KIR2DL3. Enfin, la population 4 est double positive et exprime les deux KIR. Ce type de profil peut être appliqué pour chaque KIR.

(Figure 7). Ces deux promoteurs, qui sont très polymorphes, sont en compétition, ce qui résulte en un contrôle probabiliste de l'expression des gènes *KIR* et des fréquences variées de cellules NK exprimant ces récepteurs. Au contraire des autres gènes *KIR* dont l'expression est régulée par des promoteurs bidirectionnels, *KIR2DL4*, qui est le seul *KIR* exprimé par toutes les cellules NK, possède un promoteur distinct avec une forte activité transcriptionnelle (Stewart *et al.* 2003; Trompeter *et al.* 2005).

Les récepteurs *KIR* sont exprimés principalement par les cellules NK où ils sont distribués de façon clonale (Valiante *et al.* 1997). Cette distribution clonale est rendue possible par un mécanisme de méthylation des sites CpG (une cytosine séparée d'une guanine par un phosphate) de l'ADN. En effet, l'inhibition de l'ADN méthyltransférase conduit à une expression de tous les récepteurs *KIR* par toutes les cellules NK (Santourlidis *et al.* 2002; Chan *et al.* 2003). L'activité transcriptionnelle des gènes *KIR* est donc régulée par le degré de méthylation de l'ADN d'une séquence contenant des motifs CpG et chevauchant la région du promoteur (Chan *et al.* 2005). Ainsi, alors que dans les gènes *KIR* actifs ces motifs CpG ne sont pas méthylés, les gènes *KIR* dont l'expression est éteinte présentent une méthylation importante. Les différents clones NK possèdent donc des profils de méthylation du locus *KIR* bien différents selon les récepteurs *KIR* qu'ils expriment (Figure 8).

Un autre mécanisme important de régulation épigénétique de l'activité transcriptionnelle des gènes est la modification de la structure de la chromatine via l'acétylation, la méthylation ou la phosphorylation des histones. L'analyse des modifications des histones au sein des cellules NK a montré une acétylation importante des histones aussi bien pour les gènes *KIR* exprimés que pour les non-exprimés (Uhrberg

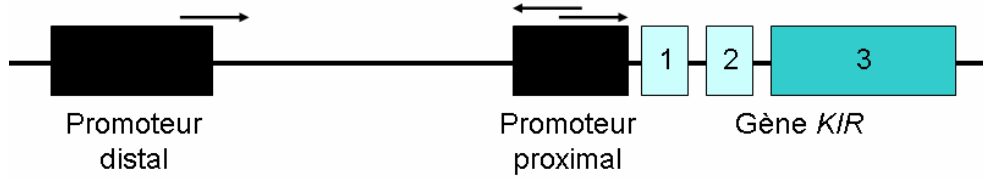


Figure 7. Localisation des promoteurs bidirectionnels des gènes *KIR*.

La région en 5' du gène *KIR3DL1* est représentée schématiquement. Les flèches identifient le sens de la transcription à partir des promoteurs. Le promoteur proximal est bidirectionnel et le promoteur antisens est actif dans les cellules NK qui n'expriment pas le gène *KIR* correspondant où il entre en compétition avec le promoteur sens.

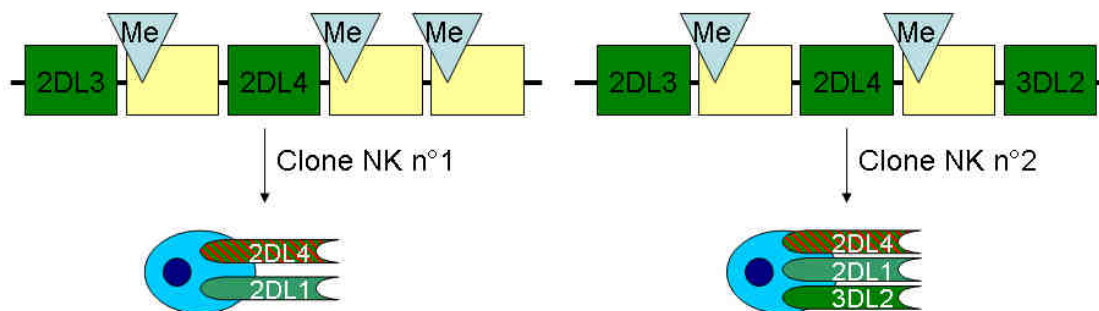


Figure 8. Génération de clones NK par déméthylation

Un répertoire NK *KIR* varié est généré par déméthylation de l'ADN des promoteurs des gènes *KIR*. Ce mécanisme épigénétique est stochastique, ce qui conduit à une distribution clonale des gènes *KIR* et à un profil d'expression stable. Dans l'exemple ici, les gènes *KIR2DL3* et *KIR2DL4* sont déméthylés, ce qui conduit à leur expression par le clone NK n°1, alors que les autres gènes *KIR* sont méthylés (*Me*) et ne sont pas exprimés. Le clone NK n°2 présente en plus le gène *KIR3DL2* déméthylé, ce qui conduit à son expression en plus du *KIR2DL3* et *KIR2DL4*.

2005). Ceci indique une structure ouverte de la chromatine de tous les gènes KIR dans les cellules NK, ce qui explique pourquoi l'inhibition des déacétylases d'histones ne permet pas d'induire l'expression des gènes KIR (Santourlidis *et al.* 2002), au contraire de l'inhibition des méthyltransférases. L'expression des gènes KIR est donc dépendante des promoteurs et de leur méthylation, mais pas de la structure de la chromatine, ce qui permet d'établir un modèle de l'acquisition du répertoire KIR (Uhrberg 2005). Initialement, les promoteurs des gènes KIR sont bloqués par la méthylation de l'ADN et la condensation de la chromatine. Durant le développement, les gènes KIR sont progressivement acétylés et la chromatine adopte une structure ouverte au niveau de l'intégralité du locus KIR (*Figure 9*), qui reste néanmoins méthylé. La déméthylation des gènes KIR se déroule ensuite de façon séquentielle en commençant par le KIR2DL4, puis les promoteurs des autres gènes KIR sont déméthylés de façon clonale, générant un répertoire NK KIR varié avec de nombreuses possibilités de combinaisons de récepteurs.

II.1.e. Ligands des récepteurs KIR

Les ligands connus des récepteurs KIR inhibiteurs sont tous des molécules du CMH, ou HLA, de classe I (*Figure 10*). Ainsi, les molécules HLA-C sont reconnues par les KIR2DL1, KIR2DL2 et KIR2DL3, les molécules HLA-A et HLA-B par KIR3DL1 et HLA-A par KIR3DL2, alors que HLA-G est reconnu par KIR2DL4 (Moretta and Moretta 2004). Les déterminants HLA qui se lient aux récepteurs KIR inhibiteurs sont appelés épitopes KIR. Les allotypes HLA-C ont soit l'épitope C1 (présent sur les molécules encodées par les allèles HLA-Cw caractérisés par une Sérine en position 77 et une Asparagine en position 80, qui comprennent les allèles -Cw1, -Cw3, -Cw7, -Cw8, -Cw12, -Cw13, -Cw14 et -Cw16) qui est reconnu par KIR2DL2 et KIR2DL3, soit l'épitope C2 (présent sur les molécules encodées par les allèles HLA-Cw2, -Cw4, -Cw5, -Cw6, -Cw15,

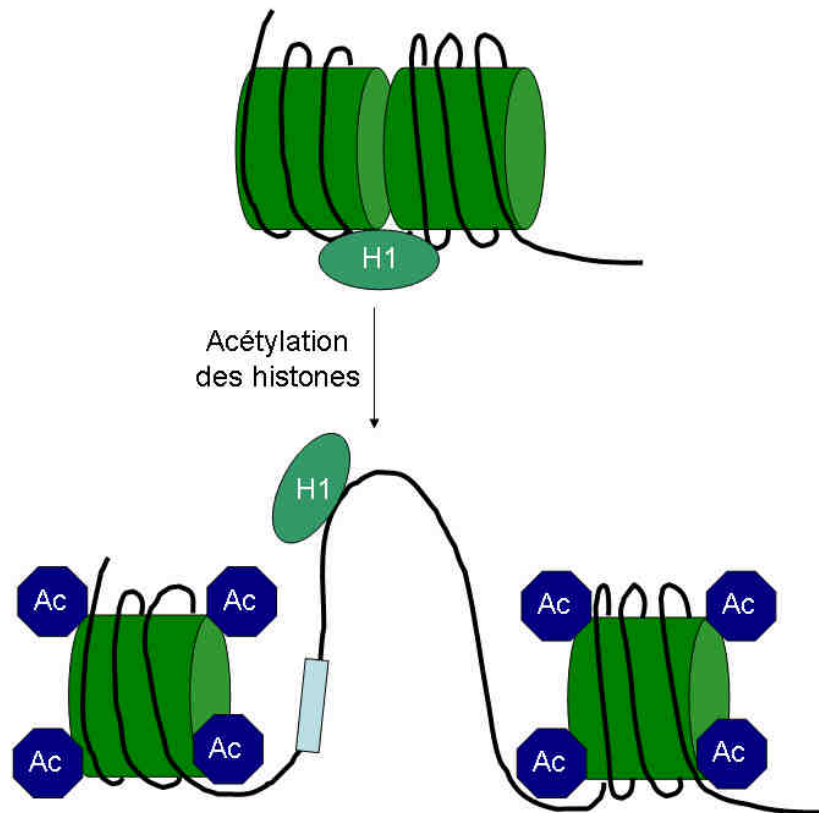


Figure 9. Structure condensée et ouverte de la chromatine

L'acétylation des histones permet l'ouverture de la chromatine. Pour le locus KIR, cette acétylation se fait au cours du développement puisque la chromatine présente une structure ouverte au niveau de tous les gènes KIR, qu'ils soient exprimés ou non.

-Cw*1602, -Cw17 et -Cw18 possédant une Asparagine en position 77 et une Lysine en position 80) qui est le ligand du KIR2DL1 (Biassoni *et al.* 1995; Winter and Long 1997). Toutefois, cette règle simple a été ajustée récemment puisque certaines molécules HLA présentant un épitope C2 peuvent également être reconnues par KIR2DL2 et KIR2DL3, le premier étant un récepteur de plus forte affinité (Moesta *et al.* 2008). De la même façon, tous les allotypes HLA-B ont soit l'épitope Bw4, soit l'épitope Bw6, mais seulement l'épitope Bw4 est un ligand du KIR3DL1 (Litwin *et al.* 1994; Gumperz *et al.* 1995; Wagtmann *et al.* 1995b). Les séquences de certains récepteurs KIR activateurs et inhibiteurs sont hautement homologues au niveau de leur domaine extracellulaire, où se situe le site d'interaction avec le ligand. C'est le cas de KIR2DL1 et KIR2DS1, de KIR2DL2/3 et KIR2DS2, mais aussi de KIR3DL1 et KIR3DS1. Ainsi, les ligands du KIR2DS1 sont comme pour le KIR2DL1 les molécules HLA-C présentant un épitope C2 (Stewart *et al.* 2005). De plus, les résultats d'études génétiques et la forte homologie de leurs domaines extracellulaires suggèrent que les isoformes KIR2DS2 et KIR2DL2/3 ont toutes deux pour ligands les molécules HLA-C avec un épitope C1. C'est également le cas du KIR3DS1 qui pourrait partager comme ligands avec KIR3DL1 les molécules HLA-Bw4 avec une isoleucine en position 80 (Bw4*80I). Enfin, une étude récente montre que le KIR2DS4, qui reconnaît certaines molécules HLA-C (Campbell *et al.* 1998; Katz *et al.* 2001), est le résultat d'une conversion génique avec le domaine D1 du KIR3DL2, ce qui le rend également capable de se lier aux molécules HLA-A*11 (Graef *et al.* 2009). Malgré cela, au contraire des récepteurs KIR inhibiteurs, la plupart des ligands des récepteurs KIR activateurs restent moins bien définis au niveau fonctionnel.

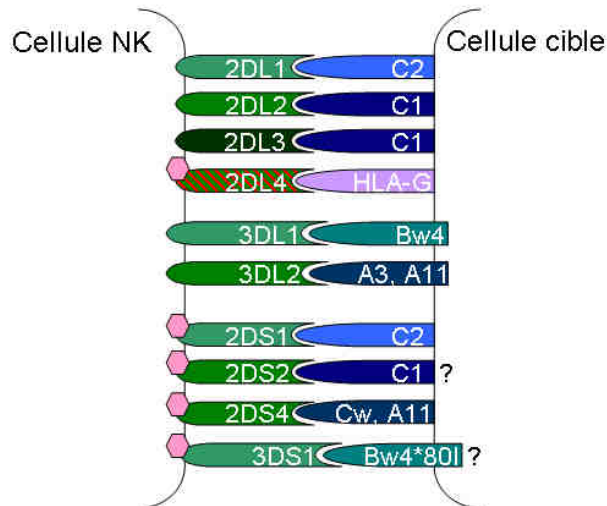


Figure 10. Ligands connus des KIR

Les ligands des KIR sont les molécules HLA de classe I. KIR2DL1 et KIR2DS1 reconnaissent les molécules HLA-Cw qui présentent une Lysine en position 80 (C2). KIR2DL2, KIR2DL3 et peut-être KIR2DS2 reconnaissent les molécules HLA-Cw avec une Asparagine en position 80 (C1). Les molécules HLA-A et HLA-B avec un épitope sont les ligands du KIR3DL1, et potentiellement ceux de son homologue activateur KIR3DS1. KIR3DL2 et KIR2DS4 reconnaissent les molécules HLA-A11. KIR3DL2 reconnaît également les molécules HLA-A3 et KIR2DS4 reconnaît également certaines molécules HLA-Cw. Enfin, KIR2DL4 reconnaît la molécule HLA-G.

II.2. Les hétérodimères CD94/NKG2

En plus des récepteurs KIR, les cellules NK expriment aussi les hétérodimères CD94/NKG2 (Valiante *et al.* 1997) codés par les gènes *CD94* et *NKG2*, qui sont localisés dans le complexe NK du chromosome 12p12.3-p13.2 (Houchins *et al.* 1991; Chang *et al.* 1995). Un seul gène *CD94* est ainsi lié de façon étroite à quatre gènes de la famille *NKG2* (*NKG2A/B*, *C*, *E* et *F*). *NKG2A* et *NKG2B* correspondent à deux formes générées par épissage alternatif à partir du même gène. *NKG2B* ne possède pas l'exon 4 correspondant à la jonction entre le domaine transmembranaire et le domaine de reconnaissance extracellulaire (Plougastel *et al.* 1996). Contrairement aux gènes KIR, les gènes *CD94* et *NKG2* présentent un polymorphisme limité qui n'affecte pas la fonction de ces récepteurs (Shum *et al.* 2002). *CD94* et *NKG2* codent pour des protéines transmembranaires de type II appartenant à la famille des lectines de type C. *CD94* peut être exprimé à la surface cellulaire sous forme homodimérique ou sous forme hétérodimérique avec *NKG2A/B* ou *NKG2C*, les deux sous-unités étant liées dans les deux cas par des ponts disulfures (Lazetic *et al.* 1996; Brooks *et al.* 1997). *NKG2A* possède un motif ITIM au niveau cytoplasmique, ce qui fait de l'hétérodimère *CD94/NKG2A* un récepteur inhibiteur (Carretero *et al.* 1997; Houchins *et al.* 1997; Le Drian *et al.* 1998; Palmieri *et al.* 1999). A l'opposé, l'hétérodimère *CD94/NKG2C* est un récepteur activateur qui nécessite une association avec la protéine adaptatrice DAP12 pour former un complexe stable à la surface cellulaire (Lanier *et al.* 1998). Le résidu lysine de la région transmembranaire du *NKG2C* s'associe en effet au résidu aspartate de DAP12 afin de générer un récepteur capable de délivrer un signal activateur. Même s'il a été moins étudié, le *CD94/NKG2E* semble aussi être un récepteur activateur. En effet, le domaine extracellulaire du *NKG2E* est similaire à celui du *NKG2C*. De plus, le *NKG2E* possède un résidu lysine dans sa région transmembranaire et le *CD94/NKG2E* murin s'associe à DAP12 (Vance *et al.* 1999). Enfin, le *NKG2F* a un

domaine cytoplasmique et un segment transmembranaire contenant un résidu chargé mais ne possède pas de région extracellulaire puisqu'un codon stop est placé avant le domaine lectine-like (Plougastel and Trowsdale 1997).

Les homodimères CD94 peuvent être exprimés à la surface cellulaire mais ils ne transmettent pas de signal car CD94 ne possède pas de domaine cytoplasmique. Les récepteurs CD94/NKG2 sont exprimés par la plupart des cellules NK et des lymphocytes T $\gamma\delta$, mais également par certains lymphocytes T $\alpha\beta$ CD8⁺ (Aramburu *et al.* 1990; Toyama-Sorimachi *et al.* 2001). Dans le sang périphérique, les cellules NK expriment les récepteurs CD94/NKG2A et CD94/NKG2C de façon stochastique, certaines populations NK exprimant les deux récepteurs. Au cours du développement des cellules NK, l'expression des récepteurs CD94/NKG2 a lieu avant celle des KIR (Mingari *et al.* 1997; Miller and McCullar 2001). Mais au contraire des récepteurs KIR dont l'expression est maintenue de façon stable une fois acquise, l'expression des récepteurs CD94/NKG2 est modulée par les cytokines telles que l'IL-12 (Derre *et al.* 2002), l'IL-15 (Mingari *et al.* 1998) ou le TGF- β (Bertone *et al.* 1999) qui induisent leur expression *in vitro*. L'expression du récepteur inhibiteur CD94/NKG2A peut également être induite par l'engagement du TcR, le CD94/NKG2A régulant ainsi négativement le signal délivré par le TcR (Jabri *et al.* 2002). Il a de plus été montré que la fréquence des cellules exprimant du CD94/NKG2A était augmentée lorsque les cellules étaient activées (Saez-Borderias *et al.* 2009).

Les récepteurs CD94/NKG2A et CD94/NKG2C ont pour ligand la molécule HLA de classe I non classique HLA-E (Braud *et al.* 1998; Lee *et al.* 1998b) exprimée de façon ubiquitaire sur les cellules nucléées. Tout comme ses récepteurs, le HLA-E présente un polymorphisme allélique très limité. Les principaux peptides chargés dans le sillon de la

molécule HLA-E et qui stabilisent son expression à la surface cellulaire proviennent des séquences signal d'une partie des autres molécules HLA de classe I (Aldrich *et al.* 1994; Braud *et al.* 1997; Borrego *et al.* 1998; Lee *et al.* 1998a). Ces peptides comprennent 9 acides aminés (résidus 3 à 11) mais ne sont pas retrouvés chez toutes les molécules HLA classiques. En effet, le principal peptide chargé par HLA-E a pour séquence VMAPRTLVL et l'acide aminé en position 2 (résidu 4) semble être important pour la liaison à HLA-E. Toutes les molécules HLA ne permettent donc pas l'expression en surface du HLA-E. D'autres peptides sont également capables de se lier à HLA-E (Miller *et al.* 2003). Le propre peptide signal de HLA-E ne pouvant pas être lui-même chargé dans le sillon de la molécule HLA-E, l'expression du HLA-E à la surface cellulaire est dépendante des peptides issus des molécules HLA-A, -B, -C ou -G qui possèdent la séquence signal nécessaire. La diminution de l'expression des molécules HLA classiques est associée à une diminution de l'expression du HLA-E à la surface des cellules. L'interaction entre le CD94/NKG2A et la molécule HLA-E est donc un mécanisme important de l'immunité innée par lequel les cellules NK peuvent contrôler de façon indirecte l'expression des molécules HLA classiques.

Même si CD94/NKG2A et CD94/NKG2C possèdent le même ligand, le récepteur inhibiteur a une affinité plus forte pour la molécule HLA-E que l'activateur (Vales-Gomez *et al.* 1999). De plus, les peptides chargés par HLA-E affectent la reconnaissance par ces récepteurs (Llano *et al.* 1998; Vales-Gomez *et al.* 1999). Il a ainsi été montré que des peptides dérivés de la protéine de choc thermique Hsp60 se liaient à HLA-E et que le complexe ainsi formé ne permettait plus d'interaction avec le récepteur CD94/NKG2A (Michaelsson *et al.* 2002). Ainsi, les cellules en état de stress n'expriment plus de ligands pour ce récepteur inhibiteur, ce qui permet aux cellules NK d'éliminer ces cellules

anormales. Certains peptides issus de pathogènes sont chargés par HLA-E et favorisent l'engagement du CD94/NKG2A. C'est le cas par exemple d'UL40, une protéine codée par le CMV dont est issu un peptide chargé par HLA-E (Tomasec *et al.* 2000; Ulbrecht *et al.* 2000; Cerboni *et al.* 2001; Wang *et al.* 2002). Le peptide issu d'UL40 se substitue ainsi à ceux des molécules HLA de classe I dont l'expression est diminuée lors de l'infection à CMV, ce qui permet de maintenir l'expression du HLA-E à la surface des cellules infectées et qui constitue un mécanisme d'échappement du virus à la reconnaissance par les cellules NK. Sur ce modèle, il est également possible que certains peptides issus de protéines virales favorisent l'interaction entre le CD94/NKG2C et HLA-E, cette hypothèse pouvant expliquer le rôle de ce récepteur activateur et l'augmentation de la fréquence des cellules NK CD94/NKG2C⁺ chez des patients co-infectés par le VIH et le CMV (Brunetta *et al.*).

II.3. ILT-2

La famille des gènes *LILR* (Leukocyte Immunoglobulin-Like Receptors), aussi appelée LIR (Leukocyte Immunoglobulin-like Receptor), ILT (Immunoglobulin-Like Transcript) ou CD85, est localisée sur le chromosome 19q13.4, à côté des gènes *KIR*. Sur les 13 gènes *LILR*, deux codent pour des récepteurs inhibiteurs qui reconnaissent les molécules HLA de classe I : *LILRB1* (ILT-2 ou LIR1) et *LILRB2* (ILT-4/LIR2) (Colonna *et al.* 1997; Cosman *et al.* 1997). Ce dernier n'est pas exprimé par les cellules NK mais sur les monocytes, au contraire de l'ILT-2 qui est exprimé de façon variable à la surface des cellules NK (de 0 à 75% des cellules NK du sang périphérique), mais aussi de certains lymphocytes T. Le récepteur ILT-2 est surtout exprimé fortement et de façon uniforme sur les lymphocytes B et les monocytes (Colonna *et al.* 1997; Cosman *et al.* 1997). ILT-2 est une glycoprotéine possédant quatre domaines Ig-like dans sa région extracellulaire et

quatre motifs ITIM au niveau cytoplasmique. Au contraire d'autres récepteurs NK, ILT-2 se lie avec une faible affinité à une région conservée du domaine $\alpha 3$ de quasiment toutes les molécules HLA de classe I comprenant HLA-A, -B, -C, -E, -F, et -G (Chapman *et al.* 1999; Lepin *et al.* 2000). De plus, UL18, une glycoprotéine codée par le CMV et qui présente une homologie de structure avec les molécules HLA de classe I (Beck and Barrell 1988), se lie à l'ILT-2 avec une affinité 1000 fois plus forte que les ligands HLA de classe I (Cosman *et al.* 1997; Chapman *et al.* 1999). Dans le contexte de l'infection à CMV, UL18 sert donc de ligand « leurre » afin d'engager le récepteur inhibiteur ILT-2 et de supprimer ainsi les réponses antivirales. Bien que les récepteurs ILT-2 peuvent inhiber les fonctions des cellules NK lorsque les cellules cibles expriment des molécules HLA de classe I à leur surface (Navarro *et al.* 1999), il semble que l'inhibition via les récepteurs KIR et CD94/NKG2A soit dominante. Le rôle de ce récepteur est plus significatif dans la régulation de la fonction des lymphocytes B et des monocytes sur lesquels il est fortement exprimé et qui ne possèdent pas les systèmes KIR et CD94/NKG2A.

II.4. CD161

Le récepteur CD161 (ou NKR-P1A) est une protéine transmembranaire de type II codée par le gène *KLRB1* situé sur le chromosome 12 (Yokoyama and Plougastel 2003). C'est un membre de la superfamille des lectines de type C qui s'assemble en homodimères grâce à des ponts disulfure (Lanier *et al.* 1994). Le CD161 est exprimé sur les cellules NK immatures avant l'acquisition du CD16 ou du CD56 (Bennett *et al.* 1996), et son expression peut être augmentée sur les cellules NK matures par l'IL-12 (Azzoni *et al.* 1998; Poggi *et al.* 1998). Le CD161 est également exprimé par les lymphocytes T CD4⁺, CD8⁺ et $\gamma\delta$, par les cellules NKT mais aussi par certains thymocytes CD3⁺ (Lanier *et al.* 1994; Takahashi *et al.* 2000; Takahashi *et al.* 2006). Sur les lymphocytes T, le CD161 est

un récepteur activateur puisque son engagement avec un anticorps anti-CD161 augmente leur prolifération (Poggi *et al.* 1996; Exley *et al.* 1998). Au contraire, sur les cellules NK, le CD161 est un récepteur inhibiteur puisque la liaison avec l'anticorps anti-CD161 va inhiber la cytotoxicité NK (Lanier *et al.* 1994). Le LLT1 (lectin-like transcript 1), codé par le gène *CLEC2D* adjacent au gène *KLRB1* (Yokoyama and Plougastel 2003), a été identifié comme le ligand physiologique du CD161 (Aldemir *et al.* 2005; Rosen *et al.* 2005). Des études fonctionnelles ont montré que l'interaction entre le LLT-1 des cellules cibles et le CD161 des cellules NK inhibait la lyse NK (Aldemir *et al.* 2005; Rosen *et al.* 2005). Le LLT-1 est exprimé principalement sur les ostéoclastes et par la plupart des lymphocytes B mais aussi sur les lymphocytes B activés ainsi que les cellules dendritiques activées plasmacytoïdes et dérivées de monocytes (Rosen *et al.* 2008).

II.5. Les récepteurs activateurs

Les cellules NK expriment également à leur surface des récepteurs activateurs dont les ligands sont codés soit par des pathogènes, soit par le génome de l'individu et faiblement exprimés par les cellules normales, mais surexprimés par les cellules stressées ou malades. Ces récepteurs participent ainsi à la reconnaissance du « non soi » et du « soi induit » et sont décrits ci-dessous.

II.5.a. NKG2D

Le NKG2D (membre D du groupe 2 des récepteurs des cellules NK) est un homodimère transmembranaire de la famille des lectines de type C qui a été très étudié en raison de son rôle dans les réponses immunitaires dans le contexte du cancer, des infections et de l'auto-immunité. NKG2D est exprimé par les cellules NK et les lymphocytes T CD8⁺ activés, et par certains lymphocytes T $\gamma\delta$ et NKT (Bauer *et al.* 1999;

Wu *et al.* 1999). Dans certaines conditions, NKG2D est aussi exprimé par les T CD4⁺ humains (Groh *et al.* 2006). Les ligands identifiés de NKG2D sont des molécules du CMH de classe I non classiques qui ne sont pas chargées par un peptide et qui ne se lient pas à la β 2-microglobuline (Raulet 2003). Ces ligands comprennent chez l'Homme les molécules MICA et MICB (MHC class I polypeptide-related sequence A et B) qui présentent un polymorphisme très important (Bauer *et al.* 1999) et qui n'ont pas d'homologues chez la souris, ainsi que les protéines de la famille de ULBP-1/RAET-1 (UL16 Binding Protein 1 ou Retinoic Acid Early Transcript 1), qui existent chez l'Homme et la souris (Cerwenka *et al.* 2000; Diefenbach *et al.* 2000; Carayannopoulos *et al.* 2002; Diefenbach *et al.* 2003). Les cellules normales n'expriment pas ces molécules à des niveaux suffisants, alors que leur expression est induite dans les tissus stressés ou cancéreux. La plupart des cellules tumorales surexpriment ainsi un ou plusieurs ligands de NKG2D à leur surface (Pende *et al.* 2001). C'est le cas des tumeurs humaines primaires par exemple qui expriment des ligands de NKG2D (Friese *et al.* 2003; Wu *et al.* 2004). Et, de la même manière, l'expression des ligands de NKG2D tels que RAET-1 ou MULT-1 (murine ULBP-like transcript 1) a été observée sur des lymphomes et des adénocarcinomes générés chez des souris (Guerra *et al.* 2008). L'expression de ligands de NKG2D est également induite dans des cellules infectées par certains pathogènes (Lanier 2008). De nombreuses données montrant le rôle important de NKG2D dans la surveillance des tumeurs se sont accumulées. L'élimination des tumeurs grâce à NKG2D est bien documentée *in vitro* (Jamieson *et al.* 2002), mais aussi *in vivo* grâce à des expériences de transplantation de tumeurs (Cerwenka *et al.* 2001; Diefenbach *et al.* 2001). Chez l'Homme, même s'il reste limité, le polymorphisme du gène codant pour NKG2D a été associé avec une susceptibilité au cancer (Hayashi *et al.* 2006), les allèles de haute activité (*HNKI*) étant protecteurs comparés aux allèles de basse activité (*LNKI*).

II.5.b. 2B4

La protéine 2B4 (CD244) est un membre de la famille des récepteurs proches des molécules signalisatrices d'activation des lymphocytes (SLAM). Elle est exprimée par toutes les cellules NK et les lymphocytes T $\gamma\delta$, certains lymphocytes T CD8⁺ et tous les monocytes CD14⁺ humains (Boles *et al.* 2001). L'unique ligand connu pour 2B4 est CD48 (qui est aussi un récepteur proche des SLAM), qui est exprimé par toutes les cellules hématopoïétiques et dont l'expression augmente lors de l'infection par l'EBV. Comme elle possède quatre motifs ITSM (immunoreceptor tyrosine-based switch motif), 2B4 peut fonctionner comme un récepteur activateur ou inhibiteur selon la molécule adaptatrice de signalisation avec laquelle elle s'associe (Schatzle *et al.* 1999; Lee *et al.* 2004; Chlewicki *et al.* 2008). Les motifs ITSM sont en effet capables de s'associer avec de nombreuses protéines contenant des domaines SH2, qui peuvent être inhibitrices ou activatrices (*Figure 11*). L'une de ces protéines est SAP (SLAM associated protein) qui va recruter d'autres molécules de signalisation afin de transmettre un signal activateur. En absence d'expression de SAP, 2B4 peut se lier aux phosphatases SHP-1 et -2 qui contiennent des motifs inhibiteurs SH2. 2B4 est ainsi un récepteur inhibiteur au cours des premières étapes du développement des cellules NK, puis un récepteur activateur sur les cellules NK matures (Sivori *et al.* 2002), ce qui pourrait indiquer un rôle dans la maturation des cellules NK.

II.5.c. DNAM1

DNAM1 est une molécule d'adhésion qui est exprimée de façon constitutive par la plupart des cellules NK, des lymphocytes T, des macrophages et des cellules dendritiques (Shibuya *et al.* 1996). Les ligands de DNAM1 sont le CD112 (connu sous le nom de nectine 2 ou PVRL2) et le CD155 (connu sous le nom de PVR) (Bottino *et al.* 2003). Ces

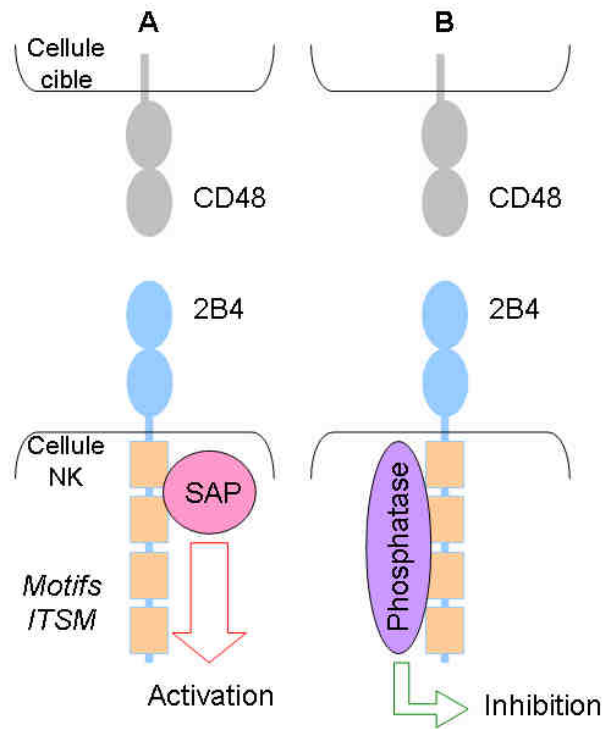


Figure 11. Signalisation via 2B4

Le récepteur 2B4 possède des domaines de signalisation ITSM qui peuvent recruter à la fois des kinases ou des phosphatases. A. L'interaction du 2B4 avec son ligand entraîne l'activation des cellules NK matures via l'interaction de la protéine adaptatrice SAP avec les domaines ITSM. SAP va ensuite recruter d'autres protéines dont la kinase FYN. B. Dans les cellules NK immatures, en absence de SAP fonctionnelle, 2B4 va délivrer un signal inhibiteur. Lorsque 2B4 est engagé, ses domaines ITSM sont phosphorylés, ce qui conduit au recrutement de phosphatases comme SHP-1 ou -2. Ces phosphatases vont entraîner une inhibition en déphosphorylant les molécules adaptatrices des récepteurs activateurs.

ligands sont souvent exprimés par les cellules tumorales et peuvent activer ou augmenter la lyse de ces cellules *in vitro* (Carlsten *et al.* 2007). Des études récentes montrent que des souris déficientes en DNAM1 présentent une capacité réduite de rejeter des cellules tumorales et de limiter la formation de tumeurs induites *in vivo* (Gilfillan *et al.* 2008; Iguchi-Manaka *et al.* 2008).

II.5.d. Les récepteurs de cytotoxicité naturelle (NCR)

Les NCRs (Natural Cytotoxicity Receptors) comprennent quatre récepteurs activateurs : NKp30, NKp44, NKp46 et NKp80. Si NKp30, NKp44 et NKp46 sont des membres de la superfamille des Immunoglobulines (Sivori *et al.* 1997; Pessino *et al.* 1998; Vitale *et al.* 1998; Pende *et al.* 1999; Sivori *et al.* 1999; Pende *et al.* 2001), NKp80 fait quant à lui partie de la famille des lectines de type C (Vitale *et al.* 2001). Ils ont été très bien étudiés pour les cellules NK humaines et seulement l'un d'entre eux, le NKp46, est retrouvé chez la souris. Chez l'Homme, NKp30, NKp46 et NKp80 sont exprimés par toutes les cellules NK, alors que NKp44 est exprimé uniquement par les cellules NK activées. La stratégie qui a permis leur identification repose sur trois principes : les NCRs ne doivent être exprimés que par les cellules NK, la ligation d'un NCR par un anticorps doit déclencher la cytotoxicité NK et le blocage de ces récepteurs doit inhiber la cytotoxicité NK (Moretta *et al.* 2000). Le blocage d'un ou plusieurs de ces récepteurs avec des anticorps empêche donc souvent la lyse de lignées cellulaires tumorales par les cellules NK humaines *in vitro*. De plus, les souris présentant une mutation ciblée du gène codant pour NKp46 perdent leur capacité à rejeter une lignée cellulaire de lymphome qui exprime des ligands pour ce récepteur (Halfteck *et al.* 2009).

Le NKp46 est exprimé par toutes les cellules NK humaines et murines, mais également chez plusieurs espèces de singes (babouin, macaques rhésus et crabier) (Walzer *et al.* 2007a) et d'autres mammifères (rat et bovins) (Storset *et al.* 2004; Westgaard *et al.* 2004). De plus, le NKp46 est exprimé uniquement par les cellules NK puisque les autres types cellulaires tels que les lymphocytes T et B, les granulocytes et les cellules dendritiques n'en expriment pas, même après activation (Walzer *et al.* 2007a). Il a donc été proposé d'utiliser le NKp46 comme marqueur unique d'identification des cellules NK au sein des différentes espèces de mammifères (Walzer *et al.* 2007b).

La diversité des ligands décrits pour ces récepteurs est surprenante tant ils sont différents : les hémagglutinines virales (pour NKp44 et NKp46) (Mandelboim *et al.* 2001; Arnon *et al.* 2006), les protéoglycanes héparan-sulfate (pour NKp30 et NKp46) (Bloushtain *et al.* 2004), le facteur nucléaire BAT3 (transcrit associé au HLA-B) et la molécule B7-H6 (pour NKp30) (Pogge von Strandmann *et al.* 2007; Brandt *et al.* 2009) et les lectines de type C induites par l'activation (AICL) exprimées par les monocytes (pour NKp80) (Welte *et al.* 2006). Il reste toutefois nécessaire de déterminer l'importance fonctionnelle de ces ligands variés pour les récepteurs de cytotoxicité naturelle.

II.5.e. Autres récepteurs reconnaissant des ligands du « non soi »

Si les récepteurs activateurs des cellules NK peuvent détecter la présence de ligands du soi induits par le stress, comme ceux reconnus par NKG2D, d'autres molécules existent, comme des ligands infectieux du « non soi » (par exemple, certains ligands des NCR ou la protéine m157 codée par le cytomégalovirus et reconnue par le récepteur activateur Ly49H chez la souris) ou les ligands des TLRs (toll-like receptors). En effet, les cellules NK expriment aussi des TLRs qui sont des récepteurs de l'immunité innée qui reconnaissent

Nom du récepteur	CD	Ligand(s)
LFA-1	CD2	LFA-3
FcγRIIIa	CD11a	ICAM-1, -2 et -3
	CD16	IgG
	CD28	CD80, CD86
ILT-2	CD85j	HLA-A, -B, -C, -E, -F et -G
KIR2DL1	CD158a	HLA-C2
KIR2DL2	CD158b1	HLA-C1
KIR2DL3	CD158b2	HLA-C1
KIR2DL4	CD158d	HLA-G
KIR3DL1	CD158e1	HLA-Bw4
KIR3DS1	CD158e2	HLA-Bw4*80I ?
KIR2DL5	CD158f	?
KIR2DS5	CD158g	?
KIR2DS1	CD158h	HLA-C2
KIR2DS4	CD158i	HLA-C et HLA-A11
KIR2DS2	CD158j	HLA-C1 ?
KIR3DL2	CD158k	HLA-A3 et -A11
KIR2DS3	-	?
KIR3DL3	CD158z	?
NKG2A	CD159a	HLA-E
NKG2C	CD159c	HLA-E
NKR-P1A	CD161	LLT-1
DNAM-1	CD226	CD112 et CD155
2B4	CD244	CD48
NKG2D	CD314	MIC-A, -B et ULBP
NKp46	CD335	hémagglutinines virales
NKp44	CD336	hémagglutinines virales
NKp30	CD337	BAT-3, pp65
NKp80		AICL

Tableau I. Ligands des principaux récepteurs exprimés par les cellules NK

les PAMPs (pathogen-associated molecular patterns) (Akira and Takeda 2004), des motifs moléculaires conservés chez de nombreux pathogènes d'origines très diverses (bactéries, virus et parasites) et de nature variée (protéines, acides nucléiques, etc.). L'exposition, *in vitro*, des cellules NK à des ligands des TLRs induit une production d'IFN- γ et augmente la cytotoxicité, même si ce processus est plus efficace en présence de cellules auxiliaires, ce qui suggère que l'impact des TLRs sur les cellules NK peut être indirect *in vivo*.

II.5.f. Les récepteurs de co-stimulation

Des études ont également montré l'implication dans l'activation des cellules NK de récepteurs définis comme des molécules de co-stimulation des lymphocytes T. Il s'agit du CD2 (dont le ligand est la molécule d'adhésion LFA-3), CD28 (dont le ligand est l'antigène B7), et LFA-1 (dont les ligands sont les molécules d'adhésion ICAM-1, -2 et -3) (Wilson *et al.* 1999a; Tangye *et al.* 2000; Watzl *et al.* 2000). Quand les molécules HLA de classe I sont exprimées à un niveau normal sur les cellules cibles, les signaux négatifs reçus via les récepteurs inhibiteurs spécifiques des molécules HLA de classe I dominent les signaux activateurs de ces récepteurs de co-stimulation qui ne suffisent pas à activer les cellules NK. Lorsque le niveau d'expression des molécules HLA de classe I diminue, les signaux inhibiteurs ne sont plus suffisants et les signaux délivrés par ces récepteurs de co-stimulation vont prendre le dessus et participer à l'activation des fonctions des cellules NK.

III. Fonctions des cellules NK

Les cellules NK sont des lymphocytes de l'immunité innée qui constituent la première ligne de défense de l'organisme contre les virus et les tumeurs. En réponse à une stimulation, les trois fonctions des cellules NK peuvent être activées : (1) la cytotoxicité vis-à-vis de cellules cibles via la libération de perforine et de granzymes ou l'expression de

ligands des récepteurs de mort cellulaire, suite aux deux voies d'activation décrites précédemment (lyse spontanée et ADCC) ; (2) l'activation d'autres cellules de l'immunité via la sécrétion d'interféron (IFN)- γ et d'autres cytokines et (3) la capacité à proliférer.

L'immunosurveillance assurée par les cellules NK dépend d'une balance entre les signaux activateurs et inhibiteurs délivrés par les récepteurs qu'elles expriment simultanément et qui ont été décrits précédemment. Certains de ces récepteurs activateurs reconnaissent des molécules similaires à celles du HLA de classe I qui sont soit codées par des pathogènes et exprimées par les cellules infectées, soit endogènes et exprimées seulement dans un contexte d'infection, d'ADN endommagé ou de stress (Gasser and Raulet 2006). Les récepteurs inhibiteurs reconnaissent quant à eux principalement les molécules du HLA de classe I présentes à la surface des cellules. Si des cellules infectées ou tumorales perdent l'expression de ces ligands inhibiteurs ou sur-expriment des ligands activateurs, les cellules NK ne sont plus inhibées et deviennent par conséquent capables de tuer la cellule cible. Ainsi, l'activation des fonctions effectrices des cellules NK est le résultat de l'intégration de ces multiples signaux inhibiteurs et activateurs (Bryceson and Long 2008). L'amplitude de la réponse cellulaire NK contre les cellules infectées ou tumorales est aussi dépendante de signaux d'alarmes délivrés par des sentinelles immunitaires comme les cellules dendritiques, les macrophages ou les tissus infectés. Ces signaux incluent les interférons de type 1 (IFN- α et IFN- β) ou les interleukines IL-12, IL-15 et IL-18 qui augmentent le potentiel cytotoxique des cellules NK et leur capacité à produire des cytokines.

III.a. Cytotoxicité cellulaire et dégranulation des cellules NK

La fonction de cytotoxicité des cellules NK (et des autres cellules de l'immunité capables de cytotoxicité comme les lymphocytes T) vis-à-vis des cellules cibles anormales met en jeu des granules contenant un stock de protéines cytotoxiques. Ces granules lytiques sont des lysosomes sécrétoires préformés correspondant à des organelles exocytiques spécialisées qui combinent la fonction de dégradation des lysosomes conventionnels avec la capacité de subir une exocytose contrôlée (Lettau *et al.* 2007). La reconnaissance d'une cellule anormale active l'exocytose polarisée de ces granules qui relarguent des molécules cytotoxiques. Ce processus de dégranulation peut être divisé en quatre étapes (Topham and Hewitt 2009). Dans un premier temps, une synapse immunologique activatrice et lytique se forme au point de contact avec la cellule cible. Il y a alors un réarrangement du cytosquelette d'actine. Dans un deuxième temps, le centre d'organisation des microtubules (MTOC) de la cellule NK et les lysosomes sécrétoires sont polarisés vers la synapse lytique. La troisième étape est l'accrochage des lysosomes sécrétoires à la membrane plasmique au niveau de la synapse lytique, avant de fusionner finalement avec la membrane plasmique et de relarguer leur contenu cytotoxique au cours de la dernière étape.

Les principales protéines cytotoxiques contenues dans les granules des cellules cytotoxiques (lymphocytes T et NK) sont les granzymes et la perforine (Pipkin and Lieberman 2007; Chowdhury and Lieberman 2008). Après leur relargage, la perforine facilite l'entrée des granzymes dans le cytoplasme de la cellule cible, où celles-ci clivent un grand nombre de protéines comme les caspases, provoquant la mort cellulaire par apoptose (Lieberman 2003; Trapani and Bird 2008). L'exocytose des granules lytiques doit donc rester un processus hautement contrôlé et coordonné. Les cellules NK sont capables

de tuer en moyenne quatre cellules cibles chacune avant de voir leurs niveaux de perforine et de granzymes suffisamment diminués (Bhat and Watzl 2007). Les cellules NK redeviennent cytotoxiques après 48 heures de culture en présence d'IL-2, correspondant probablement au temps nécessaire pour reconstituer leur stock de perforine et de granzymes. En effet, à la différence des lymphocytes T, les cellules NK ont un stock de perforine et de granzymes contenu dans les granules (Burkhardt *et al.* 1989) alors que pour les lymphocytes T ces protéines cytotoxiques doivent être synthétisées après stimulation via le TcR (Tschopp and Nabholz 1990; Peters *et al.* 1991).

Les membres de la famille des protéines associées à la membrane lysosomale (LAMP) sont des protéines membranaires qui représentent environ 50% des protéines de la membrane lysosomale (Fukuda 1991; Kannan *et al.* 1996). Leur partie hautement glycosylée à l'intérieur des granules semble protéger la membrane de la cellule effectrice contre les attaques par les enzymes lytiques contenues dans les granules, avant la dégranulation au niveau intracellulaire et après la dégranulation au niveau de la synapse lytique.

L'une des ces protéines, LAMP-1 ou CD107a, a ainsi été décrite comme un marqueur de dégranulation des lymphocytes T CD8⁺ et des cellules NK cytotoxiques (Betts *et al.* 2003; Alter *et al.* 2004). En effet, l'expression du CD107a est fortement augmentée à la surface cellulaire après stimulation. Cette augmentation correspond à une diminution du niveau de perforine intracellulaire (Betts *et al.* 2003) et est corrélée également à la lyse cellulaire des cellules cibles par les cellules NK (Alter *et al.* 2004). Le CD107a est donc un marqueur de dégranulation qui permet d'éviter l'utilisation d'éléments radioactifs et d'étudier l'activité cytotoxique des cellules NK de façon plus sensible que les

tests de relargage de Chrome 51. En effet, la disponibilité d'anticorps spécifiques du CD107a permet d'utiliser ce marqueur en cytométrie de flux multiparamétrique afin de détecter simultanément la dégranulation et la production de cytokines ou de discriminer des sous-populations de cellules NK grâce à des combinaisons d'anticorps. Ainsi, il est possible d'étudier la capacité à répondre à une même stimulation de plusieurs populations de cellules NK.

III.b. Production de cytokines et régulation de la réponse immunitaire

Comme leur nom l'indique, les cellules NK peuvent tuer certaines cellules cibles sans sensibilisation préalable, mais elles sont aussi capables de produire de nombreuses cytokines comme l'interféron gamma (IFN- γ), le facteur de nécrose tumorale alpha (TNF- α), le facteur de croissance des granulocytes et macrophages (GM-CSF) et des interleukines (IL). De plus, les cellules NK fonctionnent également comme des cellules régulatrices du système immunitaire, influençant les autres réponses cellulaires et agissant comme un lien entre les réponses de l'immunité innée et adaptative. Des études montrent en effet un impact des cellules NK sur les réponses des lymphocytes B ou encore une interaction entre les cellules NK et les cellules dendritiques (DC). En plus de leur rôle d'initiatrices des réponses spécifiques d'antigènes, les cellules dendritiques soutiennent l'activité des cellules NK alors que réciproquement (Ferlazzo and Munz 2004), les cellules NK pré-activées par des cytokines activent les cellules dendritiques, induisent leur maturation et leur production de cytokines (Zitvogel 2002). L'activation *in vivo* des cellules NK par un vaccin à base de cellules dendritiques (DC) autologues chargées avec un antigène tumoral a également été montrée (Kim *et al.* 2001; Osada *et al.* 2006), ainsi que la régulation de la réponse immunitaire via la lyse de cellules dendritiques immatures par les cellules NK (Wilson *et al.* 1999b). *In vitro*, le rapport NK:DC a un impact sur le

sens de cette réponse (Piccioli *et al.* 2002). En effet, lorsqu'il y a plus de cellules dendritiques que de cellules NK, l'interaction NK/DC favorise la production de cytokines et la maturation des cellules dendritiques. A l'inverse, lorsque les cellules NK sont en surnombre par rapport aux cellules dendritiques, les cellules dendritiques sont lysées par les cellules NK.

III.c. Prolifération des cellules NK

La dernière fonction des cellules NK est la moins bien étudiée. Il s'agit de la fonction de prolifération cellulaire, qui consiste en la multiplication rapide et abondante de ces cellules par des divisions mitotiques successives. La prolifération des cellules NK est induite *in vitro* et *in vivo* par l'interleukine-2 (IL-2) (London *et al.* 1986; Biron *et al.* 1990). Les cellules NK peuvent ainsi être maintenues en culture pendant environ deux semaines (Rabinowich *et al.* 1991). D'autres méthodes d'expansion des cellules NK en culture existent et conduisent à des résultats variables. La plupart utilisent des lignées cellulaires comme cellules nourricières, telles que des lignées tumorales ou des lignées lymphocytaires immortalisées (Perussia *et al.* 1987; Luhm *et al.* 2002) alors que d'autres approches utilisent des anticorps (Carlens *et al.* 2001). Dans tous les cas, la proportion de cellules NK augmente fortement pendant les deux premières semaines de culture et elles peuvent être maintenues en culture pendant un mois avant de devoir être restimulées. Pendant ce temps, elles conservent leurs capacités cytotoxiques et de production de cytokines.

IV. Développement des cellules NK

IV.1. Etapes du développement

Le développement des cellules NK se déroule principalement dans la moelle osseuse (Colucci *et al.* 2003; Yokoyama *et al.* 2004). En effet, le rôle important de la moelle osseuse dans la maturation *in vivo* des cellules NK a pu être mis en évidence grâce à des expériences d'ablation sélective de la moelle osseuse chez la souris (Williams *et al.* 1998). De plus, des cellules NK à des niveaux intermédiaires de développement ont été identifiées dans ce tissu chez la souris où le développement des cellules NK a été très bien décrit (Colucci *et al.* 1999; Rosmaraki *et al.* 2001). Chez l'Homme adulte, la moelle osseuse est riche en cellules souches hématopoïétiques CD34⁺ et en progéniteurs hématopoïétiques, dont une fraction de précurseurs des cellules NK (pré-NK). De plus, la culture *in vitro* de cellules CD34⁺ dérivées de la moelle osseuse permet leur différenciation en cellules NK fonctionnelles. De plus, le récepteur CD161 présenté précédemment (partie II.4) est exprimé très tôt au cours du développement des cellules NK (Bennett *et al.* 1996; Spits *et al.* 1998) et son ligand LLT-1 (Aldemir *et al.* 2005; Rosen *et al.* 2005) est exprimé aussi sur les ostéoclastes (Zhou *et al.* 2002), ce qui semble indiquer qu'au moins une partie du développement des cellules NK se déroule au niveau de la moelle osseuse. Malgré cela, la possibilité que les cellules pré-NK ou à d'autres niveaux intermédiaires de développement puissent transiter par d'autres tissus, comme le thymus, pour subir leur maturation terminale n'a pas encore été exclue. De plus, aucune voie complète de différenciation des cellules NK qui pourrait démontrer que ce processus se déroule uniquement dans la moelle osseuse n'a encore été décrite. La principale raison de cette absence réside dans le fait que les étapes du développement des cellules NK *in vivo* n'ont été définies que récemment. La plupart des informations concernant cette voie de développement proviennent d'analyses *ex vivo* réalisées à partir de progéniteurs CD34⁺ et

des intermédiaires CD34⁻ qui en dérivent *in vitro*. En effet, les cellules NK matures n'expriment pas de CD34 et sont identifiées par le phénotype CD3⁻ C56⁺ (Trinchieri 1989). Le CD34 est exprimé quant à lui par des cellules souches hématopoïétiques, des progéniteurs hématopoïétiques et des précurseurs présents dans différents compartiments tissulaires de l'organisme. Les cellules NK cytotoxiques peuvent être obtenues *in vitro* à partir de ces cellules CD34⁺ dérivées de foie fœtal, de moelle osseuse, du thymus, de sang de cordon, de sang adulte ou de tissus lymphoïdes secondaires (Lotzova *et al.* 1993; Miller *et al.* 1994; Sanchez *et al.* 1994; Mrozek *et al.* 1996; Jaleco *et al.* 1997) et cultivées avec de l'IL-2 ou de l'IL-15 (Waldmann *et al.* 1998). Quatre étapes de développement des cellules NK ont pu ainsi être décrites (*Tableau II*) : pro-NK, pré-NK, iNK et NK matures (Freud and Caligiuri 2006).

Les progéniteurs des cellules NK (pro-NK) correspondent à une population CD34⁺ CD45RA⁺ CD117⁻ CD94⁻ qui n'exprime pas de CD122 (chaîne β du récepteur à l'IL-2, IL-2R β) et donc ne répond pas à l'IL-2 ou à l'IL-15. Si ces cellules peuvent se différencier en cellules NK, elles peuvent encore donner des lymphocytes T et des cellules dendritiques myéloïdes, mais pas de lymphocytes B. Les pro-NK correspondent donc au stade le moins mature de la lignée NK. Cette population donne directement naissance aux précurseurs des cellules NK (pré-NK) qui sont CD122⁺. La principale caractéristique des cellules pré-NK est donc qu'elles sont capables de répondre à l'IL-15 (ou à l'IL-2) afin de se différencier. Elles sont CD34⁺ CD45RA⁺ CD117⁺ CD94⁻ et elles ont toutes la capacité de devenir des cellules NK. Néanmoins, il existe encore une certaine plasticité de ces cellules qui peuvent encore se différencier en lymphocytes T et en cellules dendritiques myéloïdes dans certaines conditions de culture *in vitro* (Freud *et al.* 2006). Elles ne présentent pas en effet d'antigènes spécifiques des cellules NK (Blom and Spits 2006; Di Santo 2006), et vu qu'il

	pro-NK	pré-NK	iNK	NK CD56 ^{bright}	NK CD56 ^{dim}
CD34	+	+	-	-	-
CD45RA	+	+	-	-	-
CD10	+	-	-	-	-
CD117	-	+	+	+/-	-
CD161	-	-/+	+	+	+
NKp46	-	-	-	+	+
CD94/NKG2A	-	-	-	+	+/-
KIR	-	-	-	+/-	+
CD16	-	-	-	-	+

Tableau II. Expression de différents marqueurs selon les étapes du développement des cellules NK humaines

existe des précurseurs T/NK dans le thymus humain (Sanchez *et al.* 1994), ceci suggère que la capacité des pré-NK à répondre à l'IL-2 et à l'IL-15 n'implique pas forcément qu'elles deviendront ensuite des cellules NK. Le troisième stade correspond aux cellules NK immatures (iNK) qui sont quant à elles incapables de se différencier en lymphocytes T ou en cellules dendritiques *in vitro*, et donnent uniquement des cellules NK CD56^{bright} en culture. Les iNK sont CD34⁻ et expriment également à des degrés différents des antigènes et des récepteurs fonctionnels associés aux cellules NK comme CD2, CD7, CD56, CD161, 2B4 (isoforme inhibitrice) et NKp44. Bien que les iNK se différencient en cellules NK, elles ne présentent pas encore les deux caractéristiques principales des cellules NK matures : la capacité de produire de l'IFN- γ et d'être cytotoxiques vis à vis de cellules déficientes en molécules du CMH de classe I. Elles n'expriment pas non plus la plupart des récepteurs présents à la surface des cellules NK matures comme CD94/NKG2A, NKG2D, NKp46, CD16 ou encore les récepteurs KIR. Une partie des iNK exprime néanmoins le NKp44, un récepteur activateur des cellules NK. Les iNK sont localisées principalement dans les organes lymphoïdes secondaires, qui sont des tissus dont le rôle est d'activer la réponse immunitaire, ce qui laisse penser qu'elles contribuent peut être à l'immunité, par exemple en produisant du GM-CSF *in vivo* (Freud *et al.* 2006).

La progression vers le stade mature (cellules NK CD56^{bright}) est marquée principalement par l'acquisition de l'expression de l'hétérodimère CD94/NKG2A, qui va inhiber les cellules NK matures via la molécule HLA-E présente à la surface des cellules exprimant des molécules du CMH de classe I. Cette transition est également accompagnée de nombreux autres changements dans le phénotype de ces cellules, incluant une diminution de l'expression du CD117 et une acquisition dans le même temps de récepteurs des cellules NK comme NKG2D et NKp46, d'une expression détectable de l'IL-2R β et de

perforine intracellulaire. Ces cellules ont enfin la capacité d'être cytotoxiques via le système Fas/Fas-ligand ou perforine et de produire de l'IFN- γ . Néanmoins, ce n'est pas le cas de toutes les cellules NK CD56^{bright}, ce qui suggère qu'il existe d'autres étapes de maturation après ce stade.

L'expression du CD56 ne suffit pas à distinguer des stades de développement intermédiaires car son expression augmente tout au long de la maturation des cellules NK. Malgré cela, alors que les iNK CD56^{dim} sont majoritairement CD16⁻ KIR⁻, les cellules NK CD56^{dim} du sang périphérique sont elles principalement CD16⁺ KIR⁺, ce qui semble indiquer au moins une étape entre ces deux populations. L'acquisition du CD16 et le passage d'un phénotype CD56^{bright} CD94⁺ CD16⁻ vers un phénotype CD56^{dim} CD94^{+/-} CD16⁺ pourrait ainsi marquer la cinquième et dernière étape du développement des cellules NK *in vivo*. Une autre étape intermédiaire, où les cellules NK sont CD56^{dim} CD94⁺, a été caractérisée récemment (Yu *et al.* 2009a). De plus, les récepteurs KIR sont principalement présents sur les cellules NK CD56^{dim} CD94^{+/-} CD16⁺, ce qui est cohérent avec les données selon lesquelles l'acquisition de ces récepteurs est un évènement tardif de la maturation des cellules NK *in vitro* et *in vivo* (Sivori *et al.* 2003). Cette acquisition des KIR est séquentielle puisque les cellules NK dérivées de progéniteurs hématopoïétiques acquièrent d'abord le KIR2DL2/3, puis le KIR2DL1 (Fischer *et al.* 2007). Les deux sous-types NK décrits seraient donc en fait deux étapes successives d'une voie linéaire de différenciation et de maturation.

IV.2. Sous-types NK

En effet, les cellules NK ont été rapidement classées en deux sous-types selon le degré d'expression de la molécule d'adhésion CD56 (Lanier *et al.* 1986). Cette séparation

n'est pas seulement phénotypique puisqu'elle a également des conséquences fonctionnelles. Les cellules NK CD56^{dim} représentent la grande majorité des cellules NK du sang ($\approx 90\%$) mais sont rares dans les tissus lymphoïdes secondaires alors que les cellules NK CD56^{bright} sont prédominantes dans les organes lymphoïdes secondaires comme les ganglions lymphatiques et les amygdales, ce qui est cohérent avec le modèle de développement décrit ci-dessus. Les cellules NK CD56^{dim} et CD56^{bright} expriment des molécules d'adhésion et des récepteurs activateurs et inhibiteurs différents, répondent différemment aux cytokines et ont surtout des fonctions effectrices uniques. Alors que les cellules NK CD56^{bright} sécrètent préférentiellement des cytokines immunorégulatrices comme l'IFN- γ , les cellules NK CD56^{dim} sont cytotoxiques et capables de sécréter des cytokines. De plus, les cellules NK CD56^{bright} expriment exclusivement la chaîne α du récepteur à l'IL-2 (CD25) alors qu'elles expriment très faiblement le FC γ RIII (CD16) au contraire des cellules NK CD56^{dim} qui expriment fortement le CD16 et qui n'expriment pas le CD25. Ces propriétés démontrent des rôles très différents de chacun de ces deux sous-types au regard de l'ADCC et de la réponse à la stimulation par l'IL-2. Comme expliqué auparavant, des études récentes ont proposé que ces sous-types représentent en fait deux étapes du développement des cellules NK, les cellules CD56^{bright} étant des précurseurs des cellules CD56^{dim}, qui représentent le type cellulaire NK le plus différencié et le plus mature (Freud and Caligiuri 2006). En plus de ces profils différents d'expression de molécules d'adhésion et de récepteurs aux cytokines, les cellules NK CD56^{dim} expriment fortement les KIRs alors que les cellules NK CD56^{bright} en expriment très peu. Cette différence d'expression a un impact sur la reconnaissance via les interactions KIR/HLA du « soi manquant » qui serait donc assurée principalement par les cellules NK CD56^{dim} capables de cytotoxicité.

IV.3. Education des cellules NK

IV.3.a. Acquisition des fonctions NK

Les cellules NK ne lysent pas les cellules du soi avant tout car elles expriment des KIR inhibiteurs qui reconnaissent des molécules HLA de classe I et qui compensent les signaux activateurs. Les gènes de ces récepteurs inhibiteurs sont localisés sur un chromosome différent de celui de leurs ligands HLA. Aucun mécanisme de transmission génétique ne peut donc assurer chez un individu la présence pour chaque récepteur inhibiteur de son ligand HLA de classe I. Les cellules NK expriment donc des KIR inhibiteurs dont les ligands ne sont pas forcément présents chez l'individu. Ces cellules NK pourraient donc théoriquement lyser les cellules saines qui n'expriment pas les molécules HLA de classe I reconnues par les KIR inhibiteurs présents sur les cellules NK. Ceci suggère une potentielle autoréactivité de ces cellules NK qui doivent être éduquées afin de ne pas éliminer ces cellules saines. Ainsi, seules les cellules NK qui expriment des récepteurs inhibiteurs spécifiques des molécules HLA du soi sont fonctionnelles (*Figure 12*).

Il a en effet été montré chez l'Homme que les cellules NK KIR2DL1⁺, KIR2DL2/3⁺ ou KIR3DL1⁺ issues d'individus exprimant le ligand HLA de classe I correspondant (allèles du groupe C2, allèles du groupe C1 ou allèles présentant le motif Bw4) répondaient plus que les autres populations NK à l'engagement du CD16 ou à la stimulation par des cellules cibles déficientes en molécules HLA de classe I (Anfossi *et al.* 2006; Yu *et al.* 2007). D'autres interactions, n'impliquant pas les molécules HLA, telles que celle du récepteur 2B4 avec son ligand CD48, semblent aussi impliquées dans l'éducation et la tolérance des cellules NK (Sivori *et al.* 2002). Ces données indiquent que l'acquisition de l'expression des récepteurs inhibiteurs spécifiques du soi est un événement

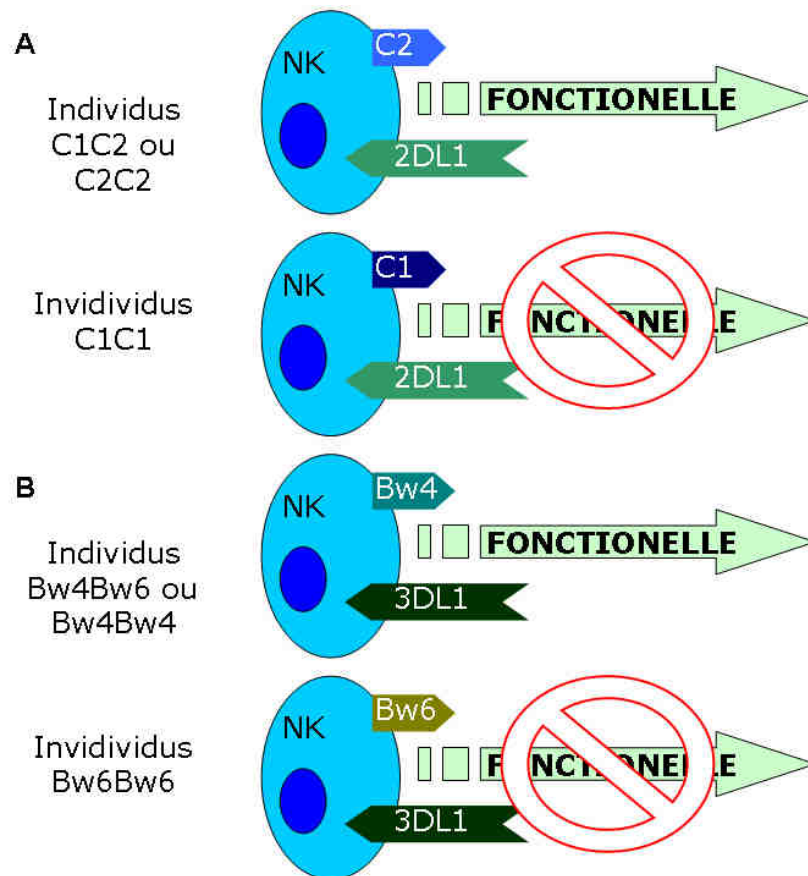


Figure 12. Fonctionnalité des cellules NK KIR⁺ en fonction du HLA autologue

Seules les cellules NK qui expriment des KIR inhibiteurs spécifiques des molécules HLA de classe I du soi sont fonctionnelles. A. Les cellules NK KIR2DL1⁺ ne sont fonctionnelles que chez un individu possédant le ligand C2 (C1C2 ou C2C2). Chez un individu C2⁻ (C1C1), les cellules NK KIR2DL1⁺ ne sont pas fonctionnelles. B. Le mécanisme est le même pour cellules NK KIR3DL1⁺ qui sont fonctionnelles uniquement chez les individus Bw4⁺, mais pas chez les individus Bw4⁻.

crucial durant le développement des cellules NK puisqu'elle détermine si une cellule va être acquérir ou non les fonctions de dégranulation, de production de cytokines et de prolifération en réponse à une stimulation.

Toutefois, certaines cellules NK n'expriment aucun récepteur inhibiteur spécifique des molécules HLA de classe I (Fernandez *et al.* 2005). De telles cellules ne vont pas lyser les cellules du soi puisqu'elles deviennent moins capables de répondre suite à l'engagement chronique de leurs récepteurs activateurs. En effet, si les ligands de certains récepteurs activateurs sont des protéines encodées par des pathogènes ou induites à la surface des cellules infectées ou tumorales, d'autres récepteurs activateurs sont capables de reconnaître des molécules du soi. C'est le cas par exemple de certains KIR activateurs dont les ligands HLA sont exprimés par l'individu. Les cellules NK qui expriment ces récepteurs activateurs sont théoriquement autoréactives et une régulation de leurs fonctions est donc nécessaire pour qu'elles deviennent tolérantes au soi. Les mécanismes qui gouvernent cette « éducation » des cellules NK via leurs récepteurs font l'objet de modèles qui sont encore discutés.

IV.3.b. Modèles proposés : *licensing*, *disarming* et *tuning*

Deux modèles complémentaires ont donc été proposés. D'un côté, l'équipe de Wayne Yokoyama propose un modèle basé sur des expérimentations chez la souris selon lequel c'est l'engagement des récepteurs inhibiteurs spécifiques des molécules du CMH du soi qui rend directement les cellules NK capables de répondre selon un processus appelé « *licensing* » (permis de tuer) (Kim *et al.* 2005; Yokoyama and Kim 2006). De l'autre, les chercheurs de l'équipe de David Raulet suggèrent que la moindre capacité fonctionnelle des cellules NK exprimant des récepteurs dont les ligands ne sont pas présents est la

conséquence de stimulations persistantes qui ne sont pas compensées par des signaux inhibiteurs. Dans ce modèle appelé « disarming » (désarmement) (Raulet and Vance 2006), les cellules NK potentiellement autoréactives deviendraient moins fonctionnelles.

Ces deux modèles ne sont pas exclusifs mais se complètent. Des études récentes montrent en effet que la capacité fonctionnelle des cellules NK varie selon le nombre, variable, des différents récepteurs inhibiteurs et activateurs qu'elles expriment. Ainsi, la capacité fonctionnelle des cellules NK augmente avec le nombre de récepteurs inhibiteurs spécifiques du CMH du soi qu'elles expriment (Brodin *et al.* 2009b; Joncker *et al.* 2009). Il semble donc qu'il n'y ai pas que deux états (fonctionnelles ou non) dans lesquels les cellules NK existent selon qu'elles expriment ou non des récepteurs inhibiteurs spécifiques des molécules du CMH du soi, mais que leur fonctionnalité soit déterminée en fonction des signaux inhibiteurs et activateurs reçus pendant l'éducation et dans l'environnement normal. Ce modèle plus consensuel, dit de « tuning » (rhéostat) (Brodin and Hoglund 2008; Joncker and Raulet 2008; Brodin *et al.* 2009a), permet d'assurer la tolérance au soi et d'optimiser la perception des changements des cellules normales par les cellules NK (*Figure 13*).

IV.3.c. Réversibilité de l'éducation des cellules NK

Toutefois, le fait de savoir si cette moindre capacité à répondre est stable ou peut être inversée dans certains contextes reste peu évident. Dès la mise en évidence du mécanisme de *licensing* chez la souris, il a été montré que l'addition d'IL-2 ou de poly I:C pouvait activer suffisamment les cellules NK non éduquées pour les rendre fonctionnelles (Kim *et al.* 2005). Chez l'Homme, l'utilisation *ex vivo* d'une protéine de fusion GM-CSF/IL-2 provoque une forte activation des cellules NK et augmente l'expression de

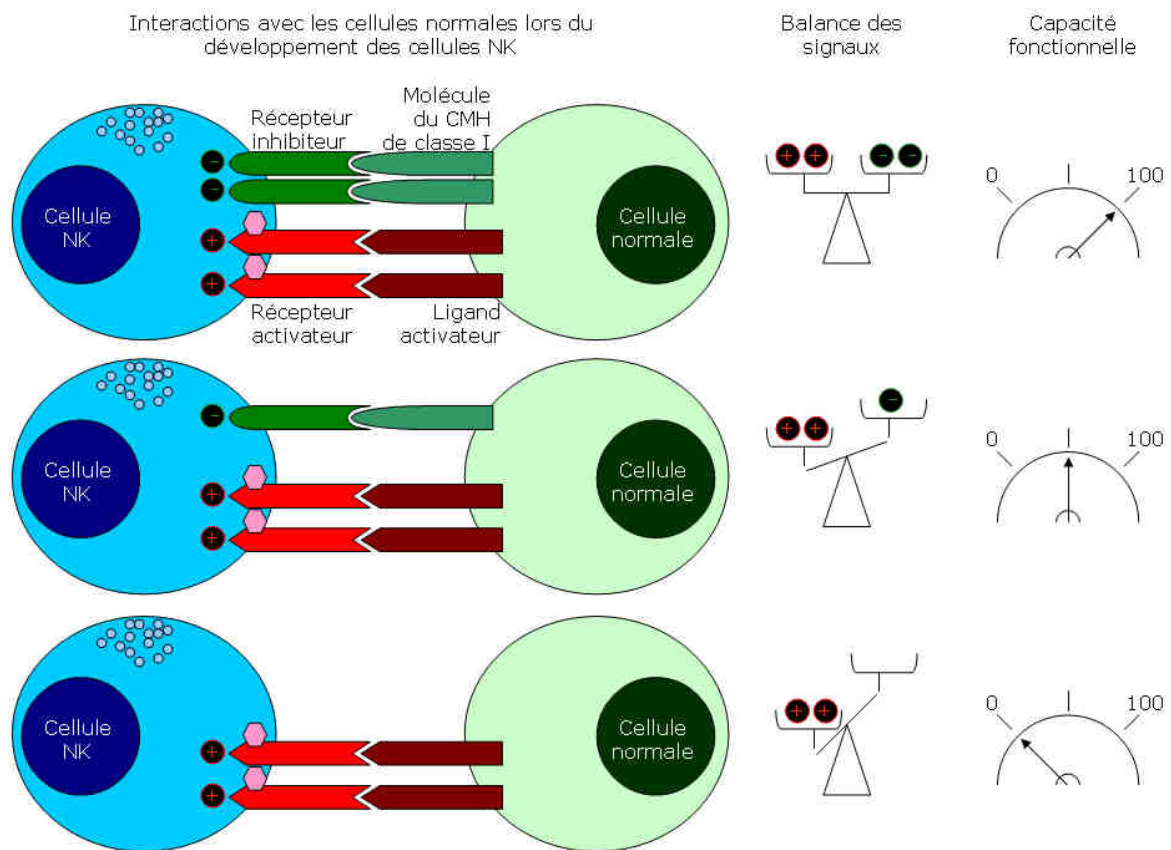


Figure 13. Education des cellules NK selon le modèle du « rhéostat »

Au cours du développement, les cellules NK interagissent avec les cellules normales. Plus une cellule NK a de récepteurs inhibiteurs spécifiques des molécules HLA du soi à sa surface, plus sa capacité fonctionnelle est importante. L'acquisition des fonctions des cellules NK via ce mécanisme d'éducation est donc également un processus résultant d'une balance entre signaux inhibiteurs et activateurs.

récepteurs activateurs tels que NKp44, NKp46 et DNAM-1 (Penafuerte *et al.* 2009). Il semble donc que dans certaines circonstances les cellules NK non éduquées puissent être activées par des cytokines pro-inflammatoires. C'est le cas par exemple de certaines infections bactériennes où les cellules NK qui n'expriment pas de récepteurs inhibiteurs spécifiques des molécules du CMH du soi peuvent produire autant d'IFN- γ que les cellules NK éduquées (Fernandez *et al.* 2005). De plus, chez des souris déficientes en β 2-microglobuline, une molécule qui permet l'expression stable des molécules du CMH de classe I à la surface cellulaire, les cellules NK semblent fonctionnelles dans certains contextes puisqu'elles sont quand même capables de contrôler l'infection à CMV *in vivo* (Tay *et al.* 1995). *In vitro*, les cellules NK hyporéactives peuvent être réactivées après plusieurs jours de culture en présence d'IL-2 (Johansson *et al.* 1997; Tripathy *et al.* 2008). D'autres résultats récents montrent également que la stimulation par des cytokines comme l'IL-2 et l'IL-15 permet d'éduquer les cellules NK moins capables de répondre pour qu'elles deviennent fonctionnelles, sans pour autant casser leur tolérance au soi (Juelke *et al.* 2009). L'éducation des cellules NK semble donc être un processus dynamique et réversible qui leur permet de ne pas lyser les cellules saines du soi sans pour autant devoir passer par une délétion des populations NK potentiellement autoréactives. Les molécules du CMH de classe I du soi sont donc capables d'influencer l'éducation et la tolérance des cellules NK par d'autres moyens que la formation du répertoire des différentes populations NK, ce qui constitue une différence importante avec le processus d'éducation impliqué dans le développement des lymphocytes T et B.

V. Les cellules NK en greffes de cellules souches hématopoïétiques

La greffe de cellules souches hématopoïétiques (CSH) est une thérapie utilisée depuis le début des années 1970 qui permet de remplacer une moelle osseuse pathologique

ou aplasique par la greffe de CSH à un receveur malade. Elle permet le traitement de plusieurs pathologies malignes telles que les leucémies aigües, les myélomes, les lymphomes, certaines tumeurs solides (cancer du sein, neuroblastome) ou non malignes comme les déficits immunitaires constitutionnels ou acquis. Si les greffes autologues, qui consistent à injecter au patient malade ses propres cellules souches débarrassées des cellules anormales, sont utilisées principalement dans le traitement des lymphomes et des tumeurs solides, les greffes allogéniques de CSH, qui consistent à injecter à un receveur malade les CSH d'un donneur sain apparenté ou non, constituent un traitement de choix de nombreuses hémopathies malignes comme les leucémies.

V.1. Sources de CSH

Il existe trois sources différentes de CSH permettant d'obtenir des greffons allogéniques. Tout d'abord, les CSH de la moelle osseuse peuvent être prélevées au niveau du bassin du donneur, ce qui nécessite une intervention chirurgicale sous anesthésie. Il est également possible de recueillir des CSH périphériques (CSP) après mobilisation de ces cellules grâce à des facteurs de croissance (GM-CSF) administrés au donneur. Le prélèvement des CSP représente un avantage puisqu'il est effectué par cytophérèse et que le greffon est plus riche en progéniteurs hématopoïétiques. Enfin, depuis 20 ans, les greffons utilisant le sang de cordons (ou sang placentaire) sont également utilisés car ils sont particulièrement riches en cellules primitives capables de se différencier et de proliférer. Ils semblent constituer également des greffons immatures et tolérants, produisant moins de cytokines et permettant donc d'utiliser des greffons qui ne sont pas totalement compatibles en terme de HLA. Toutefois, le faible nombre de cellules souches recueillies rend nécessaire l'utilisation de deux unités de sang placentaire pour greffer les patients adultes.

V.2. Conditionnements pré-greffe

Le conditionnement du receveur utilisé avant la greffe est variable d'un donneur à l'autre et d'un centre de transplantation à l'autre. Toutefois, l'objectif du traitement administré reste le même, à savoir détruire les cellules leucémiques et la moelle osseuse du receveur de façon à permettre la reconstitution hématopoïétique à partir du greffon. Pour cela, le receveur reçoit un traitement de conditionnement myéloablatif qui comprend une puissante chimiothérapie et une irradiation corporelle totale. Afin de diminuer la toxicité de ces traitements très lourds, des conditionnements atténués appelés « non myéloablatifs » sont également utilisés. Ils consistent en l'administration de traitements immunosuppresseurs dont la résultante après greffe est un chimérisme hématologique entre le donneur et le receveur qui peut subsister plusieurs mois. Ces conditionnements atténués ont été d'abord conçus pour les patients âgés ou dont l'état général était préoccupant, et ils sont à présent de plus en plus utilisés.

V.3. Choix des donneurs de CSH

Au sein d'une fratrie, il existe une chance sur 4 de trouver un donneur qui soit compatible à 100% avec le receveur. Cette probabilité passe à une chance sur un million lorsqu'un donneur non apparenté est recherché dans les fichiers des volontaires. Dans la plupart des cas, lorsque la recherche d'un donneur compatible est un échec, il est possible d'envisager une greffe haploidentique (compatibilité de 50%) à partir d'un donneur de la famille. En effet, la majorité des patients, en particulier les enfants, partage au moins un haplotype HLA identique avec l'un des membres de sa famille (parents, frères et sœurs). Mais, dans ce cas, il y a souvent des incompatibilités pour tous les types de molécules HLA de classe I, ce qui peut conduire à un mauvais résultat clinique. Afin de réduire le rejet, rare en greffe de CSH, et d'éliminer les cellules leucémiques, ces greffes

haploidentiques sont menées selon une approche particulière. Les patients sont greffés avec des doses très importantes de cellules souches hématopoïétiques CD34⁺ mobilisées dans le sang périphérique. L'administration de cinq à vingt fois plus de cellules souches hématopoïétiques est en effet très importante car cela facilite la prise de greffe et permet de générer un grand nombre de cellules NK présentant un répertoire KIR conservé et donc une alloréactivité efficace, ainsi qu'un bon effet anti-leucémique (Martelli and Reisner 2002).

V.4. Résultats cliniques de la greffe de CSH

Malgré la recherche de donneurs le plus HLA-compatibles possible avec le receveur, la greffe de CSH est une situation allogénique qui a des conséquences pouvant être opposées. Dans un cas, les disparités HLA entre le donneur et le receveur semblent prédire une réaction dans le sens HvG (*host-versus-graft*) où les cellules du receveur reconnaissent et détruisent les cellules du donneur. Ceci qui provoque une réaction de rejet du greffon, qui n'a lieu que très rarement, et correspond au modèle de résistance hybride décrit précédemment (partie I.3). Dans l'autre cas, les cellules du receveur sont reconnues par les cellules immunitaires du donneur. Deux réactions sont alors possibles. La première est délétère puisque les cellules du greffon prennent pour cibles les cellules de l'hôte, en particulier certains tissus comme la peau, le tube digestif ou les poumons. Il s'agit de la réaction du greffon contre l'hôte (*graft-versus-host*, GvH) qui est provoquée par l'activation des lymphocytes T du donneur. La GvH conduit à la maladie du greffon contre l'hôte (*graft-versus-host disease*, GvHD) qui peut être aigüe si elle se manifeste avant les 100 premiers jours suivant la greffe ou chronique au-delà. La deuxième réaction impliquant les cellules du greffon est bénéfique puisque les cellules leucémiques du receveur encore présentes vont être éradiquées. C'est l'effet GvL (*graft-versus-leukemia*),

qui est évidemment très recherché en greffe de CSH dans lequel les cellules NK semblent jouer un rôle important.

V.5. Rôle des cellules NK en greffe de CSH

Chez des souris à qui des cellules leucémiques humaines ont été préalablement injectées, le transfert de clones NK alloréactifs résulte en une guérison et une meilleure survie, ce qui confirme le rôle des cellules NK dans l'effet anti-leucémique. De plus, dans un modèle murin de greffe de moelle osseuse incompatible, l'injection de cellules NK alloréactives se déroule sans rejet du greffon ni GvHD. Ces résultats indiquent la possibilité que les cellules NK alloréactives provenant du donneur peuvent prévenir la GvHD en éliminant des cellules présentatrices de l'antigène qui initient la GvHD (Ruggeri *et al.* 2002). Chez l'Homme, l'intérêt porté au rôle des cellules NK dans la greffe de cellules souches hématopoïétiques a commencé avec l'émergence des données significatives de l'immunogénétique NK sur le résultat des greffes de CSH déplétées en lymphocytes T. Les cellules NK sont les premières à réapparaître dans le sang périphérique lors de la reconstitution hématopoïétique qui suit la greffe (Chklovskaja *et al.* 2004) et des études ont montré leur implication dans la suppression de la GvHD, la réussite de la prise de greffe et l'effet GvL (Ruggeri *et al.* 2006).

V.6. Le « soi manquant » en greffe de CSH

Dans les paramètres de la greffe de cellules souches hématopoïétiques, l'appellation « incompatibilité HLA en terme de ligand KIR » est souvent utilisée pour décrire une potentielle reconnaissance du « soi manquant ». En effet, dans ce cas, certaines cellules NK du donneur, appelées alloréactives, pourraient être capables de tuer les cellules cibles du receveur. La présence de ces cellules NK alloréactives a d'ailleurs été associée avec une

amélioration importante de la survie après la greffe de cellules souches hématopoïétiques dans le cadre des leucémies myélogéniques aiguës. En effet, ces cellules NK alloréactives semblent favoriser la prise de greffe, réduire la réaction du greffon contre l'hôte (Graft versus Host Disease, GvHD) et surtout diminuer les rechutes (Ruggeri *et al.* 2006). L'alloréactivité des cellules NK intervient lorsqu'une population NK exprime des récepteurs KIR spécifiques de certaines molécules HLA de classe I qui sont absentes à la surface des cellules allogéniques du receveur (*Figure 14*). Ces cellules NK tueraient alors les cellules allogéniques, du moins celles qui expriment des ligands reconnus par les récepteurs NK activateurs. L'existence des cellules NK alloréactives a été décrite il y a presque vingt ans par le groupe des frères Moretta (Ciccone *et al.* 1992).

L'étude des effets cliniques du « soi manquant » sur les cellules NK éduquées est donc permise principalement par les greffes de CSH présentant des incompatibilités HLA, ou plus spécifiquement des incompatibilités KIR-ligand. Dans ce contexte, les cellules NK provenant du donneur, théoriquement éduquées, sont injectées à un patient qui ne possède pas les ligands HLA de classe I présents chez le donneur et vont « reconnaître » l'absence de ces ligands sur les cellules cibles potentielles. Ceci va conduire à une levée de l'inhibition via les récepteurs KIR inhibiteurs et donc à une augmentation de la lyse des cellules tumorales, ce qui améliore le diagnostic pour les patients. Ce modèle a été décrit par Ruggeri *et al.* (Ruggeri *et al.* 2002) qui ont étudié 60 patients leucémiques à haut risque ayant subi une greffe de CSH provenant de donneurs n'ayant pas le même haplotype HLA. Ils ont alors identifié un rapport entre les génotypes HLA du donneur et du receveur qui permettait de prédire une alloréactivité NK du donneur potentiellement responsable d'un effet GvL (Ruggeri *et al.* 1999). Parmi les 60 paires donneur-receveur étudiées, 20 remplissaient les conditions du « soi manquant », lorsque les receveurs ne possédaient pas

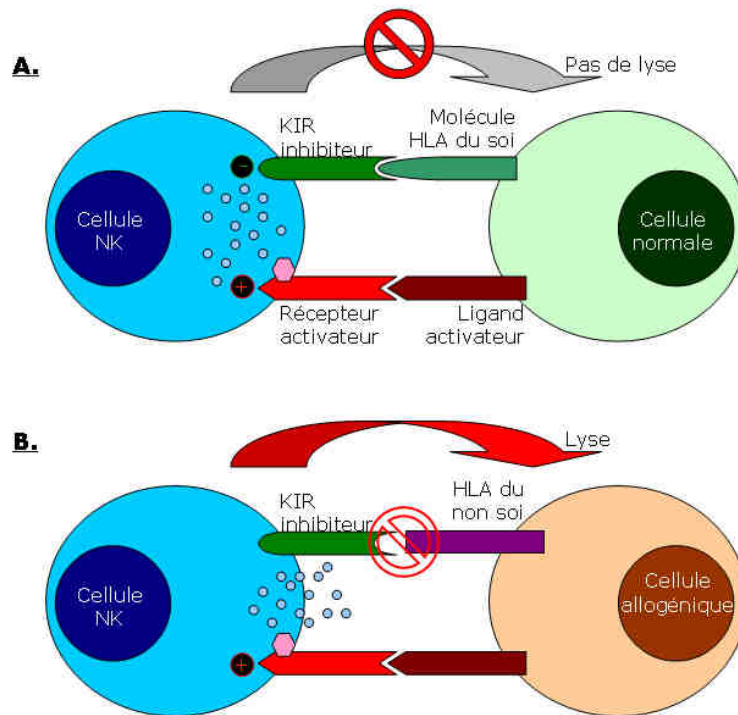


Figure 14. Soi manquant en greffe de CSH et cellules NK alloréactives

A. Les signaux activateurs reçus par la cellule NK lorsqu'elle interagit avec une cellule cible autologue normale sont compensés par les signaux des KIR inhibiteurs qui reconnaissent les molécules HLA de classe I du soi. B. Dans le contexte d'une greffe de CSH, les cellules NK du donneur interagissent avec les cellules cibles du receveur qui expriment des molécules HLA de classe I différentes en terme de ligand KIR. Ces molécules HLA étrangères ne sont pas reconnues par les KIR inhibiteurs, ce qui conduit à la lyse des cellules allogéniques par les cellules NK alloréactives.

les ligands KIR présents chez les donneurs. La levée de l'inhibition de ces cellules NK du donneur suite à l'absence d'engagement de leurs KIR inhibiteurs a été confirmée par la possibilité d'isoler des clones NK alloréactifs vis-à-vis de cellules cibles provenant du receveur (lignées leucémiques ou B-EBV), et ce uniquement chez des patients qui ne possédaient pas les ligands KIR présents chez le donneur (incompatibilité KIR ligand). De plus, ces clones NK alloréactifs pouvaient uniquement lyser des cellules cibles provenant de leucémies myéloïdes (aigües ou chroniques) mais pas lymphoïdes, ce qui suggère que les cellules NK sont plus sensibles aux cellules tumorales d'origine myéloïde.

Une incompatibilité HLA entre le donneur et le receveur ne signifie pas toujours une incompatibilité en terme de ligand KIR et ne provoquera donc pas forcément une lyse des cellules cibles allogéniques par les cellules NK. Les KIR inhibiteurs reconnaissent dans ce cas des motifs partagés par des groupes de molécules HLA de classe I et un typage HLA différent peut être le même en terme de ligands KIR. De plus, pour être alloréactives, les cellules NK ne doivent pas non plus exprimer l'hétérodimère inhibiteur CD94/NKG2A, étant donné que son ligand HLA-E est présent à la surface de quasiment toutes les cellules exprimant des molécules HLA de classe I. C'est le cas de certaines cellules leucémiques dont l'expression du HLA-E augmente suite à la production d'IFN- γ par les cellules NK (Nguyen *et al.* 2009), alors qu'après la greffe les cellules NK semblent majoritairement exprimer le CD94/NKG2A (Nguyen *et al.* 2005), ce qui diminue leur cytotoxicité et donc potentiellement leur impact dans l'effet GvL.

L'incompatibilité HLA entre le donneur et le receveur n'est pas forcément nécessaire pour obtenir une alloréactivité NK en greffe de CSH. Plusieurs études montrent en effet qu'un effet bénéfique est possible même dans le cadre de greffes de CSH HLA-

compatibles où les donneurs possèdent des KIR inhibiteurs pour lesquels aussi bien le donneur que le receveur ne possèdent pas les ligands (Hsu *et al.* 2005; Clausen *et al.* 2007; Miller *et al.* 2007; Sobecks *et al.* 2007). Par exemple, pour une étude de 178 patients qui ont reçu des greffons HLA-identiques et déplétés en lymphocytes T, près de deux tiers des receveurs n'avaient pas un ou plus des ligands HLA de classe I correspondant aux KIR inhibiteurs du donneur. La comparaison de la survie et de la rechute entre les receveurs avec ou sans les ligands pour les KIR inhibiteurs du donneur a révélé que les receveurs ne possédant pas les ligands KIR présentaient un taux de rechute plus faible et donc une survie plus importante. De plus, les receveurs à qui il manquait plus d'un ligand pour les KIR inhibiteurs du donneur présentaient une meilleure survie que ceux à qui il n'en manque qu'un seul, ce qui souligne un effet-dose (Hsu *et al.* 2005). Il semble donc dans ce cas que l'alloréactivité observée ne passe pas par les cellules NK KIR⁺ éduquées puisque donneurs et receveurs sont HLA-identiques. Les donneurs ne possèdent pas non plus les ligands HLA des KIR inhibiteurs et les cellules NK KIR⁺ correspondantes ne peuvent donc pas être éduquées.

Enfin, d'autres études de l'effet du « soi manquant » ont donné des résultats variables, ce qui semble indiquer que l'impact du « soi manquant » sur le résultat des greffes de CSH est significatif seulement pour certaines catégories de maladies et après certains traitements, en particulier la déplétion des lymphocytes T. Mieux comprendre l'impact des interactions des récepteurs NK avec leurs ligands sur la fonction des cellules NK devrait donc permettre de déterminer les mécanismes moléculaires à l'origine de ces observations cliniques. En parallèle, les études permettant de corréler l'immunogénétique NK avec le résultat des greffes permettent d'établir des modèles sur la fonction des récepteurs NK, y compris les activateurs dont la fonction et les ligands restent peu connus.

V.7. Impact des gènes KIR activateurs sur la greffe de CSH

Des études ont montré une corrélation entre le génotype KIR du donneur et le résultat des greffes de CSH. Par exemple, sur une cohorte de 65 greffes de CSH compatibles au niveau du HLA, les patients dont les donneurs possèdent les gènes des récepteurs activateurs KIR2DS1 et KIR2DS2 présentent une diminution de la rechute (Verheyden *et al.* 2005). De plus, différents groupes ont décrit une diminution de la réactivation à CMV en présence de gènes KIR activateurs chez le donneur (Cook *et al.* 2006). Une autre étude a au contraire montré un impact délétère de la présence du KIR2DS2 chez le donneur lors de greffes HLA identiques apparentées (Cook *et al.* 2004). Il a été observé également qu'un nombre important de KIR activateurs chez le donneur augmentait la prévalence de la GvHD aigue (Bishara *et al.* 2004). D'autres études ont également identifié des combinaisons particulières de récepteurs KIR activateurs avec des KIR inhibiteurs ayant un impact sur la GvHD, la rechute et la survie.

Si des études supplémentaires, multicentriques et à grande échelle, sont toujours nécessaires pour confirmer les conditions idéales pour exploiter l'alloréactivité potentielle des cellules NK, ces résultats donnent d'ores et déjà des informations très importantes pour l'étude, en laboratoire, du rôle de l'immunité innée dans la greffe de CSH. L'identification des ligands des KIR activateurs et l'étude de l'impact de ces récepteurs sur les fonctions des cellules NK devraient permettre dans un premier temps de clarifier les mécanismes expliquant ces études génétiques. En effet, ces études génétiques KIR et HLA montrent de nombreuses contradictions (Bignon and Gagne 2005). L'alloréactivité NK KIR ne peut donc pas être étudiée seulement via des approches immunogénétiques, mais doit aussi l'être sous un angle cellulaire et fonctionnel. Il sera ainsi nécessaire de prendre en compte les mécanismes d'éducation et de tolérance, mais également les notions de soi manquant

pour les KIR inhibiteurs du donneur et de HLA allogénique du receveur pour les KIR activateurs du donneur.

VI. Rôle des cellules NK dans le contrôle des infections

Le rôle important des cellules NK dans le contrôle des infections virales a été largement étudié chez la souris. Plusieurs études, dont certaines chez l'Homme, ont montré que les cellules NK sont activées et prolifèrent de façon significative après une infection virale (Biron 1997; Biron *et al.* 1999), et ce avant le développement d'une réponse immunitaire adaptative spécifique d'un antigène qui permettra le contrôle du virus. Les cellules NK utilisent plusieurs types de récepteurs parmi ceux décrits précédemment (partie II) pour détecter les cellules infectées par des virus. De plus, le récepteur CD16 permet aux cellules NK de reconnaître et d'éliminer les cellules opsonisées via l'ADCC (partie I.6). Les mécanismes antiviraux utilisés par les cellules NK sont la sécrétion de cytokines antivirales, l'exocytose de granules cytolytiques contenant des perforines et des granzymes, l'induction de l'apoptose par le ligand de Fas, l'ADCC et l'interaction avec les cellules dendritiques.

Le rôle déterminant des cellules NK dans la réponse immunitaire contre les virus chez l'Homme a été montré initialement lors de l'étude du cas d'un patient présentant un déficit total de cellules NK et qui a subi de nombreuses infections virales successives, dont la varicelle, une pneumonie due au cytomégalovirus et une infection cutanée due à l'HSV (Biron *et al.* 1989). Le patient avait des lymphocytes T et B normaux, ainsi que des neutrophiles, ce qui démontrait le rôle des cellules NK dans le contrôle des infections virales dues aux herpèsvirus chez l'Homme. Des études additionnelles ont par la suite établi des liens entre la maladie génétique de Wiskott-Aldrich, à l'origine de fonctions NK

déficientes, et la susceptibilité aux infections virales (Orange *et al.* 2004). Enfin, le rôle des cellules NK dans le contrôle des infections virales est confirmé par le fait que certains virus ont développé des mécanismes élaborés pour échapper à la réponse NK, comme la suppression des molécules de stress qui servent de ligands aux récepteurs activateurs des cellules NK à la surface des cellules infectées, ou l'expression de molécules qui servent de ligands pour les récepteurs inhibiteurs des cellules NK.

VI.1. Récepteurs KIR et infections virales

L'impact de certains génotypes KIR et HLA sur la progression des maladies virales ainsi que sur la résistance aux infections virales, a été mis en évidence dans certaines études génétiques. De façon générale, les génotypes qui conduisent théoriquement à une inhibition plus faible et une activation plus forte semblent jouer un rôle bénéfique dans certaines infections virales comme le VIH ou l'hépatite C, alors que des génotypes activateurs semblent constituer un risque de susceptibilité aux maladies autoimmunes et à certains cancers.

VI.1.a. Virus de l'hépatite C (VHC)

L'interaction KIR2DL1/C2 semble être plus forte et provoque une inhibition plus importante que l'interaction KIR2DL3/C1. Pourtant, c'est la présence du KIR2DL3 qui semble protectrice dans le contexte de l'infection par le virus de l'hépatite C (Romero *et al.* 2008). De plus, chez les individus infectés par une faible quantité de virus, la combinaison KIR2DL3/HLA-C1, qui résulte pourtant en un faible signal d'inhibition (et donc un potentiel cytotoxique plus bas), est favorable à une élimination spontanée du virus (Khakoo *et al.* 2004). D'autre part, la combinaison *KIR3DS1/Bw4*80I* est protectrice contre le développement de carcinomes hépatocellulaires chez les patients infectés par

l'hépatite C (Lopez-Vazquez *et al.* 2005). Ces résultats ont été obtenus à partir d'études génétiques et leurs répercussions phénotypiques et fonctionnelles ne sont pas connues car le VHC est difficile à étudier *in vitro*.

VI.1.b. Virus de la grippe

En utilisant un modèle *in vitro* d'infection par le virus de la grippe, il a également été montré que l'interaction KIR2DL3/HLA-C1 conférait un seuil d'activation plus bas que l'interaction KIR2DL1/HLA-C2 (Ahlenstiel *et al.* 2008). Les cellules NK d'individus *KIR2DL3/HLA-C1* sécrètent plus d'IFN- γ et présentent une plus forte dégranulation aussitôt après l'infection que les cellules NK d'individus *KIR2DL1/HLA-C2*. Ces résultats démontrent un niveau d'inhibition différent entre ces deux combinaisons KIR/HLA et confirment l'importance de cette différence lors de la réponse immunitaire à une infection virale. De plus, certains NCRs reconnaissent les hémagglutinines virales exprimées à la surface des cellules infectées par différents virus de la grippe, comme NKp44 (Arnon *et al.* 2001; Ho *et al.* 2008) et NKp46 (Mandelboim *et al.* 2001; Arnon *et al.* 2004; Draghi *et al.* 2007).

VI.1.c. Herpèsvirus

Comme cela a été évoqué précédemment, les cellules NK sont importantes dans les infections par les herpèsvirus puisque les individus déficients en cellules NK y sont particulièrement sensibles (Biron *et al.* 1989). L'un de ces virus, le cytomegalovirus (CMV) a développé des mécanismes d'échappement au système immunitaire. Le génome du CMV code par exemple pour plusieurs protéines qui interfèrent avec l'expression des molécules HLA de classe I (Lin *et al.* 2007), ce qui empêche la présentation antigénique et protège les cellules infectées des lymphocytes T, mais qui les rend par contre plus

sensibles à la lyse NK. Des mécanismes d'échappement à la lyse NK ont donc été mis en place par le CMV comme la protéine virale UL40 dont est issu un peptide identique au peptide signal des molécules HLA de classe I et qui peut ainsi se lier à HLA-E (*Ulbrecht et al.* 2000). L'expression du HLA-E est donc stabilisée à la surface des cellules infectées, ce qui permet de réguler négativement la cytotoxicité des cellules NK via le récepteur inhibiteur CD94/NKG2A (*Wang et al.* 2002). La protéine virale UL18 interagit quant à elle avec directement avec le récepteur inhibiteur ILT-2 (*Cosman et al.* 1997) et protège ainsi les cellules infectées. Il a également été montré que le CMV empêchait l'expression des ligands du récepteur activateur NKG2D à la surface des cellules infectées (*Lodoen et al.* 2003). Enfin, pp65, la principale protéine du tégument du CMV, est capable d'interagir directement avec le NKp30, ce qui provoque la dissociation du complexe formé par ce NCR et la protéine adaptatrice CD3 ζ , réduisant ainsi la capacité cytotoxique des cellules NK (*Arnon et al.* 2005).

Chez la souris, les ligands de certains récepteurs activateurs exprimés par les cellules NK ne sont pas non plus des protéines du soi. C'est le cas d'un membre de la famille des Ly49, les homologues murins des KIR, le Ly49H. Ce récepteur activateur est responsable de la résistance au CMV murin (*Brown et al.* 2001; *Daniels et al.* 2001; *Sjolin et al.* 2002; *Lee et al.* 2003). Le Ly49H ne se lie à aucune molécule H-2 mais qui a une affinité très forte pour la protéine virale m157 codée par le mCMV et exprimée à la surface des cellules infectées par le virus (*Arase et al.* 2002; *Smith et al.* 2002). Il semble que le Ly49H dérive par conversion génétique d'un récepteur inhibiteur comme Ly49I, auquel le mCMV s'était adapté grâce à la protéine m157. Tout comme les Ly49, les KIR ont évolué rapidement et ces mécanismes de conversion d'un récepteur inhibiteur vers un activateur sont envisageables également pour des récepteurs qui présentent des séquences

homologues au niveau de leurs domaines extracellulaires comme KIR2DL1 et KIR2DS1, KIR2DL2 et KIR2DS2 ou KIR3DL1 et KIR3DS1.

Ces données ont donc conduit à étudier le rôle des KIR dans le contrôle de l'infection à CMV. L'étude du cas d'un enfant immunodéficient infecté de façon récurrente par le CMV a montré que toutes ses cellules NK exprimaient du KIR2DL1 et que cet enfant possédait le ligand du KIR2DL1, HLA-C2 (Gazit *et al.* 2004). Il est donc possible que la très forte interaction entre KIR2DL1 et HLA-C2 empêche l'activation des cellules NK et donc l'initiation d'une réponse protectrice contre le CMV. De plus, le rôle des récepteurs KIR dans la protection contre l'infection à CMV a été confirmé dans une étude génétique qui montre que la présence des gènes *KIR* activateurs protège de la réactivation à CMV en greffe (Chen *et al.* 2006; Cook *et al.* 2006). Dans le contexte de la greffe, un fort potentiel d'activation des cellules NK via les KIR activateurs semble donc être protecteur contre l'infection à CMV, alors qu'il peut être au contraire problématique chez les patients immunodéprimés. La présence des KIR activateurs est en effet délétère chez ces patients puisqu'elle semble prédisposer à la réactivation d'infections opportunistes quiescentes associées aux herpèsvirus (Price *et al.* 2007).

Un nombre important de gènes *KIR* activateurs a également été associé avec les carcinomes nasopharyngés, un cancer associé à l'infection par l'EBV (Butsch Kovacic *et al.* 2005). De plus, l'interaction entre certains KIR et les molécules HLA est stabilisée par la présentation de certains peptides viraux issus des protéines codées par le virus de l'EBV. C'est le cas de KIR3DL2 dont l'interaction avec ses ligands HLA-A3 et HLA-A11 est dépendante d'un peptide EBV (Hansasuta *et al.* 2004). Le rôle de cette interaction n'est toujours pas connu mais pourrait être impliqué dans l'échappement de l'EBV à la réponse

immunitaire puisqu'il s'agit d'un KIR inhibiteur. Comme il a récemment été montré que le KIR2DS4 partageait les molécules HLA-A11 comme ligand avec KIR3DL2 (Graef *et al.* 2009), il est envisageable qu'un peptide viral stabilise aussi l'interaction avec ce KIR activateur qui pourrait ainsi jouer un rôle dans le contrôle de cette infection.

VI.1.d. VIH

Pour l'infection par le VIH, la possibilité d'un rôle des cellules NK a été envisagée suite aux études de population qui ont mis en évidence un impact du polymorphisme des récepteurs KIR et de leurs ligands HLA sur la progression de la maladie (Martin *et al.* 2002; Alter *et al.* 2007; Boulet *et al.* 2008; Long *et al.* 2008), en particulier les combinaisons entre *KIR3DL1* ou *KIR3DS1* et *HLA-Bw4* (Carrington *et al.* 2008). Cette infection est un bon exemple d'une adaptation du virus pour échapper à la réponse immunitaire, ce qui tend à démontrer une action antivirale des cellules NK. En effet, afin d'échapper à la réponse immunitaire adaptative via les lymphocytes T, le VIH diminue l'expression des molécules HLA-A et HLA-B à la surface des cellules infectées (Collins *et al.* 1998). Cette diminution de l'expression des molécules HLA de classe I pourrait rendre ces cellules infectées plus vulnérables à la lyse NK à cause de l'absence d'engagement des récepteurs inhibiteurs. Ce n'est pas le cas puisque le VIH a évolué afin de maintenir ou d'augmenter l'expression des molécules HLA-C (Cohen *et al.* 1999), principaux ligands des KIR inhibiteurs, ainsi que du HLA-E (Nattermann *et al.* 2005), ligand de l'inhibiteur CD94/NKG2A. Le VIH est donc capable d'échapper à la reconnaissance aussi bien par les lymphocytes T CD8⁺ que par les cellules NK, même si certains allèles HLA-C hautement exprimés semblent au contraire favoriser une progression plus lente du virus et une charge virale plus basse (Thomas *et al.* 2009).

De plus, il est possible que certains peptides issus des protéines du VIH soient chargés par les molécules HLA de classe I exprimées à la surface des cellules infectées. Ces peptides pourraient moduler l'interaction entre les molécules HLA de classe I et les KIR inhibiteurs ou activateurs. En effet, plusieurs études ont montré que l'interaction entre les récepteurs KIR et certaines molécules HLA de classe I pouvait être plus ou moins forte selon les peptides présentés (Malnati *et al.* 1995; Peruzzi *et al.* 1996; Mandelboim *et al.* 1997; Rajagopalan and Long 1997; Hansasuta *et al.* 2004), en particulier pour le KIR3DL1 (Peruzzi *et al.* 1996; Thananchai *et al.* 2007). Le peptide chargé par les molécules HLA de classe I peut donc avoir un impact sur leur interaction avec les récepteurs KIR inhibiteurs, et aussi potentiellement activateurs, ce qui peut favoriser ou non la lyse des cellules cibles. Tout ceci résulte en une pression de sélection sur le virus au niveau de résidus bien spécifiques afin d'échapper à la réponse NK, mais aussi en une évolution des récepteurs KIR dépendante du virus. L'étude des mécanismes de cette coévolution fournit ainsi des informations sur le rôle important que semblent jouer les cellules NK dans le contrôle de l'infection par le VIH.

VI.2. Récepteurs KIR et infections bactériennes ou parasitaires

Dans une cohorte mexicaine de patients atteints de la tuberculose, des fréquences plus importantes des gènes *KIR2DL1* (100% vs. 92%) et *KIR2DL3* (100% vs. 88%), et moins importante pour le *KIR2DS2* associé au *C1* (30% vs. 49%), ont été observées lorsqu'elle était comparée à une population contrôle (Mendez *et al.* 2006). Malgré cela, après une analyse multivariée, seule la fréquence du *KIR2DL3* reste significativement différente. Il est nécessaire d'approfondir ces études, en particulier au niveau phénotypique, pour comprendre les implications de tels résultats *in vivo*.

Dans le contexte de la malaria, le rôle des cellules NK et de leurs récepteurs est encore très peu connu, même s'il est établi qu'elles sont une des principales sources de l'IFN- γ sécrété aussitôt après l'infection par le parasite à l'origine de cette maladie (Roetynck *et al.* 2006). Une protéine codée par ce parasite diminue ensuite la production d'IFN- γ et la cytotoxicité des cellules NK, même si les études sur la réponse NK à la malaria restent contradictoires (Hansen *et al.* 2007). Malgré cela, la présence de l'allèle *KIR3DL2*002* semble être corrélée avec une plus forte production d'IFN- γ suite à la stimulation par des globules rouges infectés par le parasite (Artavanis-Tsakonas *et al.* 2003), ce qui est curieux puisque les globules rouges n'expriment pas de molécules HLA ni de molécules de stress à leur surface. Puisque le rôle des cellules NK dans le contrôle de cette infection est acquis, il est possible que les récepteurs des cellules NK reconnaissent de nouveaux ligands. Ces ligands pourraient être codés par le génome du parasite et exprimés au niveau de la membrane érythrocytaire (Hansen *et al.* 2007), régulant ainsi les différentes réponses NK.

VII. Cellules NK et autoimmunité

Les associations génétiques entre les récepteurs KIR et la prédisposition aux maladies auto-immunes suggèrent une implication majeure des récepteurs KIR activateurs (Flodstrom-Tullberg *et al.* 2009). En effet, la fréquence des *KIR* activateurs dans une population est corrélée négativement à la présence de leurs ligands potentiels (Abi-Rached and Parham 2005). Ces données suggèrent une forte pression de sélection pouvant être exercée par les maladies auto-immunes afin de maintenir une faible fréquence d'individus possédant à la fois des récepteurs KIR activateurs et les ligands correspondants. Ces mécanismes génétiques sont en accord au niveau fonctionnel avec le mécanisme

d'éducation permettant aux cellules NK d'être tolérantes via certains récepteurs activateurs dont les ligands sont exprimés par des cellules saines.

Certaines maladies auto-immunes qui impliquent des dommages vasculaires et une inflammation des vaisseaux sanguins (vascularite) ont été associées au niveau génétique avec le *KIR2DS2*. C'est le cas des patients atteints d'arthrite rhumatoïde et présentant une vascularite chez lesquels a été observée une fréquence plus importante du *KIR2DS2* que chez les patients sains ou atteints d'arthrite rhumatoïde mais sans vascularite (Yen *et al.* 2001). Ceci peut s'expliquer au niveau cellulaire par la présence de lymphocytes T CD4⁺ qui expriment du *KIR2DS2*, mais pas de *KIR2DL2*, et qui sont autoréactifs vis-à-vis des cellules endothéliales des vaisseaux sanguins (Namekawa *et al.* 2000). De plus, la fréquence du *HLA-Cw3* (un allèle du groupe C1, potentiel ligand du *KIR2DS2*) est également augmentée chez les sujets atteints de vascularite (Yen *et al.* 2001). Il est donc possible que le *KIR2DS2* reconnaisse un complexe HLA-Cw3-peptide généré dans le contexte de l'arthrite rhumatoïde. Des lymphocytes T CD4⁺ exprimant du *KIR2DS2* sont également retrouvés dans les plaques d'athérosclérose lors des syndromes coronaires aigus (Nakajima *et al.* 2003). Des associations génétiques entre les gènes *KIR* et d'autres manifestations cliniques de l'arthrite rhumatoïde ont également été mises en évidence. Celles-ci concernent *KIR2DL3* qui est présent principalement chez les patients qui ont pu être dépistés tôt, *KIR2DS1* et *KIR3DS1* dont la fréquence est plus élevée chez les patients atteints d'érosion osseuse, et *KIR2DL2/S2* dont la fréquence est augmentée chez les patients atteints d'affections ne touchant pas les articulations (Majorczyk *et al.* 2007). Enfin, malgré un très fort déséquilibre de liaison entre ces deux gènes, la fréquence du *KIR2DS2* observée en absence de *KIR2DL2* est augmentée chez les patients atteints de sclérodermie (Momot *et al.* 2004).

La maladie de Crohn, caractérisée par une inflammation chronique de l'ensemble du tube digestif, est une autre maladie auto-immune qui a été associée aux gènes *KIR*. Il a en effet été montré que la présence des gènes *KIR2DL2* et *KIR2DS2* en absence du ligand C1 était protectrice pour cette maladie, alors que les individus possédant les gènes *KIR2DL2* et *KIR2DS2* en présence du ligand C1 présentait une prédisposition à la maladie de Crohn (Hollenbach *et al.* 2009). Ceci suggère que l'activation causée l'interaction entre *KIR2DS2* et son ligand potentiel C1 pourrait entraîner ce type de maladie auto-immune via certains effecteurs cellulaires n'exprimant pas l'inhibiteur *KIR2DL2*.

Le psoriasis a quant à lui été associé avec les haplotypes *KIR B* (Suzuki *et al.* 2004) et avec le *KIR2DS1* seul (Luszczek *et al.* 2004) ou en combinaison avec *HLA-Cw6*, un allèle du groupe C2 et ligand du *KIR2DS1* (Holm *et al.* 2005). De plus, la combinaison entre les génotypes *KIR2D* et *HLA-C* semble avoir une influence sur la prédisposition au psoriasis. Ainsi, les patients avec des génotypes qui confèrent la plus forte activation (*KIR2DS1* ou *KIR2DS2*, homozygotes pour *HLA-C2* ou *-C1*) risquent plus d'être atteints d'un psoriasis alors que les génotypes qui confèrent une inhibition maximum (absence de *KIR2DS1* et du *KIR2DS2* et présence des deux ligands inhibiteurs *HLA-C1* et *-C2*) sont protecteurs (Nelson *et al.* 2004).

Les gènes *KIR* activateurs ont également été associés avec d'autres maladies inflammatoires comme l'endométriose (Kitawaki *et al.* 2007), la chorioretinopathie (Levinson *et al.* 2008), la bronchectasie idiopathique (Boyton *et al.* 2006), la cholangite sclérosante primitive (Karlsen *et al.* 2007) et les diabètes sucrés de type I (van der Slik *et al.* 2003; Middleton *et al.* 2006). Cette liste devrait continuer d'augmenter au fur et à

mesure des études cliniques à venir. Malgré cela, comme pour toutes les études génétiques, il est nécessaire de mettre en évidence au niveau fonctionnel une interaction entre les récepteurs KIR activateurs et leurs ligands potentiels afin de comprendre comment ces associations peuvent être à l'origine de prédispositions aux maladies auto-immunes.

VIII. Cellules NK et cancers

La perte de l'expression des molécules HLA de classe I à la surface de la plupart des cellules tumorales suggère un rôle des cellules NK dans l'élimination de ces cellules anormales. En effet, cette diminution d'expression des ligands des KIR va conduire à une absence d'inhibition via les KIR qui résulte en une lyse des cellules tumorales selon le mécanisme du soi manquant. Un haut niveau d'inhibition par les récepteurs KIR peut toutefois faciliter l'échappement tumoral, comme cela a été montré pour les patients atteints de mélanome chez qui la combinaison des gènes *KIR2DL2/3* et *HLA-C1* est retrouvée plus fréquemment que dans une population contrôle (Naumova *et al.* 2005). De même, la combinaison *KIR3DL1/Bw4*80I* est retrouvée de façon plus importante chez des patients présentant un mélanome métastatique (Naumova *et al.* 2007). La fréquence des individus possédant les 3 gènes inhibiteurs *KIR2DL1*, *KIR2DL2* et *KIR2DL3* est plus importante chez les patients atteints de leucémies que dans une population contrôle (51% vs. 31%, Verheyden *et al.* 2004), et il a été suggéré que ces récepteurs contribuaient à l'absence de réponse antitumorale dans le cadre du carcinome rénal (Gati *et al.* 2004). Les gènes *KIR2DL5A* et *KIR2DL5B* sont quant à eux plus fréquents chez les patients atteints de syndrome lymphoprolifératif à lymphocytes granuleux de type NK (Scquizzato *et al.* 2007).

Les KIR activateurs semblent également avoir un impact sur l'élimination des cellules tumorales. En effet, les récepteurs activateurs *KIR2DS1* et *KIR3DS1* sont associés à une protection contre le lymphome de Hodgkins (Besson *et al.* 2007). Un rôle du *KIR2DS4* a été envisagé également pour le mélanome puisque ce récepteur activateur se lie à des ligands non-HLA exprimés à la surface de lignées cellulaires de mélanomes (Katz *et al.* 2004), mais il n'y a pas de différence significative de fréquence du gène *KIR2DS4* entre les populations de patients et contrôle (Naumova *et al.* 2005).

Les KIR peuvent avoir des effets opposés sur les tumeurs selon le rôle joué par l'inflammation dans l'origine de la maladie. En effet, si les génotypes *KIR/HLA* inhibiteurs décrits précédemment prédisposent à certains cancers pour lesquels l'inflammation n'a pas d'influence, ce n'est pas le cas des néoplasies cervicales (cancer du col de l'utérus) contre lesquelles des génotypes *KIR/HLA* fortement inhibiteurs (présence du KIR inhibiteur et de son ligand) sont protecteurs (Carrington *et al.* 2005). En effet, une trop forte activation des cellules NK dans ce contexte peut contribuer à un état d'inflammation chronique favorable à la carcinogénèse. D'autres cancers sont également consécutifs à un état d'inflammation, comme les cancers de l'estomac et du colon ou bien encore les hépatocarcinomes. Certaines tumeurs, comme les mélanomes, parviennent à échapper à la réponse NK en diminuant l'expression de récepteurs activateurs comme NKp30, NKp44 ou DNAM-1 et en inhibant la formation des granules cytotoxiques (Balsamo *et al.* 2009).

Enfin, une expression anormale des récepteurs KIR a été retrouvée dans certaines maladies malignes. C'est le cas par exemple du *KIR3DL2*, dont l'expression a été observée sur des lymphocytes T phénotypiquement anormaux de patients atteints par le syndrome de Sézary (Poszepczynska-Guigne *et al.* 2004; Ortonne *et al.* 2006). Le syndrome de Sézary

est un lymphome malin affectant des lymphocytes T qui prolifèrent au niveau de l'épiderme et provoquent des lésions cutanées. Le KIR3DL2 est ainsi considéré comme un marqueur de diagnostic de cette maladie (Bahler *et al.* 2008). Dans les échantillons de peau lésée, les transcrits KIR3DL2 sont surexprimés uniquement chez des patients atteints du syndrome de Sézary (Ortonne *et al.* 2008).

Des récepteurs KIR inhibiteurs sont également exprimés dans certaines populations de lymphocytes T leucémiques (Morice *et al.* 2003). Dans ce contexte, la sévérité de la maladie est d'ailleurs corrélée à l'absence des ligands HLA correspondant aux KIR exprimés (Nowakowski *et al.* 2005). Les récepteurs KIR sont aussi exprimés sur les cellules NK leucémiques (Morice *et al.* 2003), les récepteurs KIR activateurs étant prédominants (Zambello *et al.* 2003).

OBJECTIFS DU TRAVAIL DE THESE

La plupart des modèles d'étude du rôle des récepteurs KIR en greffe de CSH ont été générés à partir de données génétiques dont certaines sont parfois contradictoires. Les données citées précédemment montrent l'importance des cellules NK en greffe de CSH et l'impact probable des cellules NK KIR sur la réussite de la greffe, en particulier dans un contexte d'incompatibilités KIR ou HLA en termes de ligands KIR. Il est donc nécessaire à présent d'obtenir des données fonctionnelles afin de clarifier l'impact des récepteurs KIR sur la greffe de CSH et les maladies évoquées précédemment. Les informations contradictoires apportées sur le rôle des gènes *KIR* activateurs dans la greffe de CSG, les maladies auto-immunes ou la protection contre certaines infections soulignent la nécessité de mieux comprendre leur fonctionnement. La spécificité et l'affinité des récepteurs KIR activateurs pour leurs ligands doivent être caractérisés, ainsi que leur impact sur les fonctions des cellules NK qui les expriment. Ces données augmenteront notre compréhension du rôle de ces récepteurs dans les maladies humaines et rendront possible d'éventuelles applications cliniques.

Au laboratoire, les récepteurs KIR ont été étudiés à partir de 2002, tout d'abord au niveau génétique dans le contexte de la greffe de CSH grâce à une collaboration entre le service d'hématologie du CHU de Nantes et le laboratoire d'histocompatibilité de l'EFS. A Nantes, les greffes non apparentées sont réalisées en recherchant un donneur HLA-compatible afin de limiter la réponse T allogénique. Une incompatibilité KIR reste donc néanmoins possible, pouvant entraîner une potentielle alloréactivité NK. C'est dans ce contexte qu'un impact sur le résultat de la greffe (risque de GvHD) des incompatibilités KIR, en particulier des KIR activateurs, a pu être démontré (Gagne *et al.* 2002). Toutefois, le caractère multiparamétrique des greffes de CSH rend nécessaire la mise en place de modèles *in vitro* afin de comprendre le rôle de ces incompatibilités KIR. C'est pourquoi

l'étape suivante au sein du laboratoire a été le développement d'approches cellulaires permettant l'étude phénotypique et fonctionnelle des récepteurs KIR, en particulier les activateurs, exprimés par les cellules NK.

La situation du laboratoire au sein de l'Etablissement Français du Sang permet d'avoir accès à de nombreux prélèvements sanguins issus d'individus présentant des génotypes KIR et HLA variés. Malgré cela, les outils commerciaux à disposition à l'époque ne permettaient pas de distinguer les homologues inhibiteurs et activateurs des KIR. Le premier projet auquel j'ai participé a donc consisté à générer des anticorps spécifiques des récepteurs KIR permettant de cibler les cellules NK exprimant des KIR activateurs, puis à caractériser ces anticorps de façon fine. Une fois ces outils obtenus, le deuxième projet consistait à étudier les fonctions des cellules NK KIR2DS1⁺ issus du panel de donneurs génotypés KIR et HLA de notre panel, au regard de l'environnement HLA allogénique et autologue. Des expériences de dégranulation et de production de cytokines, mais aussi de prolifération grâce à un modèle *in vitro* d'amplification des cellules NK, ont donc été menées en ciblant directement ces cellules grâce aux anticorps produits et caractérisés au laboratoire, afin de constater l'impact de la présence ou non du ligand HLA aussi bien chez l'individu que sur les cellules cibles. Les résultats découlant de cette deuxième étude démontrant un impact à la fois de l'environnement HLA autologue et allogénique sur les fonctions de ces cellules NK KIR2DS1⁺, un troisième projet a été mis en place afin d'éteindre l'expression du KIR2DS1 par ARN interférence, de manière à disposer d'un outil supplémentaire pour en étudier la fonction.

Au cours du quatrième projet, nous avons étudié un autre récepteur activateur, le KIR3DS1, dont le rôle important dans les infections virales et la greffe de CSH a été

démontré au niveau génétique. Le ligand de ce récepteur n'étant pas encore connu, les fonctions de cytotoxicité et de prolifération des cellules NK KIR3DS1⁺ au regard de l'environnement HLA allogénique ont été étudiées en utilisant les cellules NK KIR3DL1⁺, dont la fonctionnalité est bien caractérisée, comme contrôle.

Les résultats obtenus permettent de mieux comprendre comment fonctionnent ces deux KIR activateurs et de participer à l'établissement des règles de l'alloréactivité NK impliquant ces récepteurs. En corrélant ces données fonctionnelles avec les données issues des études d'immunogénétique, il est envisageable à terme de définir des critères permettant de sélectionner un donneur de CSH idéal en s'appuyant également sur le génotype KIR. Les études fonctionnelles doivent en effet permettre de confirmer les incompatibilités KIR ou HLA en terme de ligand KIR qui semblent être bénéfiques pour le devenir de la greffe.

RESULTATS

PROJET N°1 : CARACTERISATION DES ANTICORPS ANTI-KIR

Caractérisation de nouveaux anticorps monoclonaux permettant de discriminer les populations de cellules NK exprimant les principaux récepteurs KIR inhibiteurs et activateurs

« Discrimination between the main activating and inhibitory killer cell immunoglobulin-like receptor positive natural killer cell subsets using newly characterized monoclonal antibodies »

Gaëlle David, Maelig Morvan, Katia Gagne, Nolwenn Kerdudou, Catherine Willem, Anne Devys, Marc Bonneville, Gilles Folléa, Jean-Denis Bignon et Christelle Retière

Immunology (2009), 128 : 172-184

La principale difficulté dans l'étude phénotypique et fonctionnelle des populations NK exprimant à leur surface des récepteurs KIR spécifiques des molécules HLA de classe I du groupe Cw réside dans l'absence d'anticorps capables de discriminer les récepteurs KIR activateurs des inhibiteurs. En effet, les anticorps commerciaux spécifiques des récepteurs KIR disponibles sur le marché reconnaissent aussi bien la forme activatrice que la forme inhibitrice. C'est le cas de l'anticorps issu du clone EB6, qui reconnaît le récepteur inhibiteur KIR2DL1 (CD158a) et le récepteur activateur KIR2DS1 (CD158h). L'anticorps issu du clone GL183 est quant à lui spécifique des récepteurs inhibiteurs KIR2DL2 (CD158b1) et KIR2DL3 (CD158b2) et du récepteur activateur KIR2DS2 (CD158j). Dans un cas comme dans l'autre, l'homologie du domaine extracellulaire est tellement importante entre la forme inhibitrice et la forme activatrice qu'il est difficile d'obtenir un anticorps qui soit spécifique de l'une des deux uniquement.

C'est pourquoi, avant mon arrivée au laboratoire, plusieurs anticorps monoclonaux spécifiques des récepteurs KIR ont été produits en immunisant des souris avec une protéine soluble KIR2DS2 (fournie par le laboratoire d'Eric Vivier, Marseille). Parmi les nombreux clones ainsi obtenus, trois anticorps d'intérêt ont été caractérisés grâce à des lignées cellulaires BW (obtenues à partir d'un lymphome du thymus chez la souris) transfectées afin d'exprimer un seul KIR (KIR2DS1, KIR2DS2, KIR2DS3, KIR2DS4, KIR2DL1, KIR2DL2 ou KIR2DL3) puis grâce à des PBMC (cellules nucléées du sang périphérique) issues de donneurs dont le génotype KIR est connu. L'anticorps monoclonal issu du clone 8C11, d'isotype IgG1, reconnaît ainsi les récepteurs KIR2DL1, KIR2DL2, KIR2DL3 et KIR2DS2 ; l'anticorps monoclonal issu du clone 1F12, d'isotype IgG2, reconnaît les récepteurs KIR2DL3 et KIR2DS2 ; et l'anticorps monoclonal issu du clone 1A6, d'isotype IgG1, reconnaît les récepteurs KIR2DL1, KIR2DS1, KIR2DL2, KIR2DL3 et KIR2DS2.

Ces anticorps se révèlent très intéressants car couplés à des fluorochromes et utilisés en association avec les anticorps commerciaux décrits précédemment, ils permettent de discriminer certaines populations NK KIR par cytométrie en flux (*Tableau I*). C'est le cas en particulier des cellules NK KIR2DS1⁺ qui peuvent être ciblées en utilisant la combinaison 8C11/EB6. Cette population 8C11⁻, EB6⁺ exprime donc le récepteur activateur KIR2DS1 à sa surface, et de plus, aucun des autres récepteurs KIR reconnaissant les molécules HLA de classe I du groupe Cw (KIR2DL1, KIR2DL2, KIR2DL3 et KIR2DS2). Dans le même ordre d'idée, l'utilisation combinée des anticorps 8C11 et GL183 permet d'identifier la population NK KIR2DL1⁺ qui est 8C11⁺, GL183⁻. Enfin, l'association des anticorps 1F12 et GL183 est également intéressante puisqu'elle met en évidence les cellules NK KIR2DL2⁺ qui sont 1F12⁻, GL183⁺. De plus, chez les donneurs qui possèdent les gènes KIR2DL2 et KIR2DS2 mais pas le gène KIR2DL3, la population 1F12⁺, GL183⁺ correspond donc aux cellules NK qui expriment le récepteur activateur KIR2DS2.

Ces combinaisons d'anticorps ont ensuite été largement utilisées afin d'établir le phénotype KIR des cellules NK présentes dans les PBMC issues du panel de donneurs de sang volontaires disponible au laboratoire. Les fréquences des différentes populations ciblées grâce aux combinaisons d'anticorps ont été comparées selon les génotypes KIR et HLA. Chez les donneurs possédant le gène KIR2DL2, la présence du ligand C1 n'a pas d'influence sur la fréquence des cellules NK KIR2DL2⁺ KIR2DL3⁻/S2⁻ (1F12⁺ GL183⁻), qui est similaire chez les individus C1C1, C1C2 et C2C2. Au contraire, la fréquence des cellules NK KIR2DL2⁺ KIR2DL3⁻/S2⁻ (1F12⁺ GL183⁻) est significativement plus importante chez les individus KIR2DL3⁻ que chez les individus KIR2DL3⁺. Cette différence peut s'expliquer par le fait que les individus KIR2DL3⁻ possèdent deux copies

	8C11	1A6	1F12	GL183	EB6
KIR2DL1					
KIR2DS1					
KIR2DL2					
KIR2DL3					
KIR2DS2					

Tableau I. Spécificités des anticorps anti-KIR produits et caractérisés au laboratoire (8C11, 1A6 et 1F12) et des anticorps commerciaux (GL183 et EB6)

du gène KIR2DL2 alors que les individus KIR2DL3⁺ n'en possèdent qu'une. En effet, KIR2DL2 et KIR2DL3 sont des allèles du même gène.

Aucune différence significative de fréquence de cellules NK KIR2DS1⁺ KIR2DL1/2/3/S2⁻ (8C11⁻ EB6⁺) n'a été observée en comparant les individus C1C1, C1C2 et C2C2, même si cette fréquence semble plus élevée dans le dernier groupe. En parallèle, la fréquence des cellules KIR2DL1⁺ KIR2DL2/3/S2⁻ (8C11⁺ GL183⁻) a été comparée entre les individus KIR2DS1⁺ et KIR2DS1⁻ et aucune différence significative n'a été observée. En prenant en compte le typage HLA, une fréquence plus importante de cellules NK KIR2DL1⁺ KIR2DL2/3/S2⁻ (8C11⁺ GL183⁻) a été observée chez les individus C2C2 par rapport aux individus C1C2, même si cette différence est difficile à expliquer. Il est intéressant de noter que la fréquence des cellules NK KIR2DL1⁺ KIR2DL2/3/S2⁻ (8C11⁺ GL183⁻) est plus importante chez les individus KIR2DS1⁻ que chez les individus KIR2DS1⁺, mais uniquement pour les individus C1C2.

Ces anticorps nous ont également permis de détecter ces sous-populations NK KIR sur d'autres populations lymphocytaires. Ainsi, le KIR2DL2, le KIR2DL1 et le KIR2DS1 sont bien exprimés sur les cellules NK (CD3⁻ CD56⁺), mais aussi sur les lymphocytes T (CD3⁺ CD56⁻) et NKT (CD3⁺ CD56⁺). Toutefois, les fréquences de ces populations sont plus faibles sur les cellules NKT que sur les cellules NK, et nettement inférieures (<1%) sur les lymphocytes T, ce qui confirme que les KIR sont principalement exprimés par les cellules NK. Enfin, ces combinaisons d'anticorps permettent également de distinguer les différentes populations NK KIR CD56^{dim} et CD56^{bright}, même si ces dernières expriment moins de KIR.

Les résultats phénotypiques obtenus ont ensuite été confrontés aux génotypes KIR réalisés également au laboratoire pour chacun de ces individus. Dans certains cas, les données phénotypiques et génétiques ne semblaient pas cohérentes. C'était le cas en particulier d'individus négatifs pour le gène *KIR2DS1* qui présentaient malgré cela une population NK 8C11⁻ EB6⁺. L'alignement des séquences protéiques des récepteurs KIR2DL1, KIR2DS1, KIR2DL2, KIR2DL3 et KIR2DS2 a permis d'établir les sites potentiels de reconnaissance de chacun de ces anticorps au niveau du domaine extracellulaire. L'absence de ces sites sur les produits de certains allèles *KIR2DL1* a conduit à émettre l'hypothèse que les anticorps issus des clones 8C11 et 1A6 n'étaient spécifiques que de certains variants alléliques du récepteur KIR2DL1. Mon travail dans le cadre de ce projet de caractérisation fine de ces anticorps a donc consisté ici à séquencer les transcrits KIR2DL1 chez les individus présentant ces contradictions entre le génotype (absence de KIR2DS1) et le phénotype (présence d'une population 8C11⁻ EB6⁺), ainsi que chez des individus témoins, afin de confirmer cette hypothèse d'une reconnaissance allèle-spécifique du KIR2DL1 par ces anticorps produits au laboratoire.

Il a ainsi été confirmé que l'anticorps 8C11 reconnaissait tous les variants alléliques du KIR2DL1 à l'exception de KIR2DL1*004, *007 et *010. De plus, l'anticorps 1A6 reconnaît quant à lui tous les variants alléliques du KIR2DL1 à l'exception de KIR2DL1*005, *006 et *009. Le site de reconnaissance de l'anticorps 8C11 semble donc se situer autour du résidu 154, cet anticorps ne reconnaissant que les récepteurs présentant une proline à cette position et non ceux possédant une thréonine. De même, le site de reconnaissance du 1A6 étant situé autour du résidu 114, seuls les récepteurs présentant une proline sont reconnus par l'anticorps au contraire des récepteurs possédant une leucine à cette position.

Discrimination between the main activating and inhibitory killer cell immunoglobulin-like receptor positive natural killer cell subsets using newly characterized monoclonal antibodies

Gaëlle David,¹ Maelig Morvan,¹
Katia Gagne,¹ Nolwenn Kerdudou,¹
Catherine Willem,¹ Anne Devys,¹
Marc Bonneville,² Gilles Folléa,¹
Jean-Denis Bignon¹ and Christelle
Retière¹

¹Etablissement Français du Sang, Université de Nantes, Immunovirologie et polymorphisme génétique, EA4271 Nantes, and ²Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM) U892, Nantes, France

doi:10.1111/j.1365-2567.2009.03085.x

Received 17 December 2008; revised 6 February 2009; accepted 6 February 2009.

Correspondence: C. Retière, Etablissement Français du Sang, Université de Nantes, Nantes Atlantique Universités, Immunovirologie et polymorphisme génétique, EA4271, 34, boulevard Jean Monnet, Nantes, F-44000 France.
Email: christelle.retiere@efs.sante.fr
Senior author: C. Retière

Introduction

Natural killer (NK) cells constitute a first line of cellular defence against virus-infected or transformed cells, while maintaining tolerance to healthy cells. The function of NK cells is specifically regulated by a balance between numerous inhibitory and activating cellular receptors. Killer

Summary

Natural killer (NK) cells are key components of the innate anti-viral and anti-tumour immune responses. NK cell function is regulated by the interaction of killer cell immunoglobulin-like receptors (KIR) with human leucocyte antigen (HLA) class I molecules. In this study, we report on the generation of KIR-specific antibodies allowing for discrimination between activating and inhibitory KIR. For this purpose, BALB/c mice were immunized with human KIR2DS2 recombinant protein. The precise specificity of KIR2DS2-specific clones was determined on KIR-transfected BW cells and KIR-genotyped NK cells. When used in combination with EB6 (KIR2DL1/2DS1) or GL183 (KIR2DL2/2DL3/2DS2), two KIR-specific monoclonal antibodies (mAbs), 8C11 (specific for KIR2DL1/2DL2/2DL3/2DS2) and 1F12 (specific for KIR2DL3/2DS2), discriminated activating KIR2DS1 (8C11⁻ EB6⁺) from inhibitory KIR2DL1 (8C11⁺ GL183⁻) and KIR2DL2 (1F12⁻ GL183⁺), while excluding the main HLA-Cw-specific KIR. Using these mAbs, KIR2DS1 was shown to be expressed on the surface of NK cells from all individuals genotyped as KIR2DS1⁺ ($n = 23$). Moreover, KIR2DS1 and KIR2DL1 were independently expressed on NK cells. We also determined the amino acid position recognized by the 8C11 and 1F12 mAbs, which revealed that some KIR2DL1 allele-encoded proteins are not recognized by 8C11. Because most available anti-KIR mAbs recognize both inhibitory and activating forms of KIR, these newly characterized antibodies should help assess the expression of activating and inhibitory KIR and their functional relevance to NK biology.

Keywords: killer cell immunoglobulin-like receptor (KIR) genotype; KIR; KIR2DL1; KIR2DL2; KIR2DS1; monoclonal antibody; natural killer cells

immunoglobulin-like receptors (KIR) are the main family of human leucocyte antigen (HLA) class I specific receptors present on NK cells. The interaction between inhibitory KIR on NK cells and their HLA ligands leads to the generation of a negative signal, which inhibits their cytolytic activity and so prevents target cell lysis. Down-regulation of surface HLA class I molecules resulting from cell

Abbreviations: ELISA, enzyme-linked immunosorbent assay; FACS, fluorescence-activated cell sorting; FITC, fluorescein isothiocyanate; HLA, human leucocyte antigen; ITAM, immunoreceptor tyrosine-based activation motif; ITIM, immunoreceptor tyrosine-based inhibition motif; KIR, killer cell immunoglobulin-like receptor; mAb, monoclonal antibody; NK, natural killer; OD, optical density; PBMC, peripheral blood mononuclear cells; PCR-SSP, polymerase chain reaction–sequence-specific primer; PE, phycoerythrin.

transformation or viral infection prevents inhibitory KIR engagement by their specific HLA ligands, which then enables NK cell activation. The NK cells can be further triggered upon engagement of activating KIR by tumour or viral-induced ligands. Even though KIR are mainly expressed on NK cells, they are also expressed on a small proportion of memory T lymphocytes where they are thought to regulate cell function.^{1–4}

As the HLA complex is highly polymorphic, the KIR gene family presents both haplotypic polymorphism (up to 16 genes and pseudogenes) and allelic polymorphism (up to 63 alleles for KIR3DL1) (IPD-KIR sequence database, release 2.0.1; <http://www.ebi.ac.uk/ipd/kir>). The KIR are characterized by the presence of two or three extracytoplasmic immunoglobulin-like domains (KIR2D or KIR3D). Inhibitory KIR transduce the inhibitory signal through the phosphorylation of immunoreceptor tyrosine-based inhibition motifs (ITIM) inserted in their long cytoplasmic tail (KIR2DL or KIR3DL). KIR2DL1 and KIR2DL2/2DL3 recognize HLA-Cw molecules carrying respectively a lysine (called C2 group) or asparagine (called C1 group) at amino acid position 80.⁵ KIR2DL2 and KIR2DL3 segregate as alleles of one locus that is referred to as KIR2DL2/3.⁶ KIR3DL1 recognizes the Bw4 serological epitope (IALT, TALR or TLLR in amino acid positions 77–80) present in one-third of HLA-B molecules⁷ and a small number of HLA-A molecules (A23, A24 and A32).⁸ KIR3DL2 on the other hand binds HLA-A3 and HLA-A11 allotypes⁷ and HLA-B27 homodimers.^{9,10}

Besides the inhibitory KIR, NK cells can also express activating KIR which are characterized by a short cytoplasmic tail (KIR2DS or KIR3DS) with a lysine residue that is necessary for pairing with KARAP/DAP12 polypeptide. The cytoplasmic tail contains immunoreceptor tyrosine activation motifs (ITAM) that are involved in the transduction of triggering signals. While inhibitory KIR allelic polymorphism is extensive, the number of activating KIR alleles is limited. For example, only seven KIR2DS3, 10 KIR2DS2 and 12 KIR2DS1 alleles have been identified (IPD-KIR sequence database, release 2.0.1; <http://www.ebi.ac.uk/ipd/kir>), with only one predominant allele.¹¹ Some of these triggering KIR molecules display a high degree of homology with the corresponding inhibitory KIR and accordingly, have been shown to recognize the same HLA class I ligands in some instances.^{12,13} However, the expression modalities and specificity of activating KIR are still unclear.

Genetic KIR polymorphism and clonal expression of KIR lead to considerable heterogeneity within the NK cell population. Nevertheless, not all theoretically distinct NK cell subsets are represented and the presence of a KIR gene is not systematically associated with the cell surface expression of the corresponding protein. Moreover, given the high degree of amino acid sequence homology between different KIR, most KIR-specific monoclonal antibodies (mAbs) recognize epitopes shared not only by

two or more inhibitory KIR but also by their activating counterpart. As a result of the limited polymorphism in the extracellular part of membrane KIR2DS2 and KIR2DL2/2DL3 molecules, no antibody was generated specifically against the extracellular part of KIR2DS2. In the same way, available mAbs do not discriminate between inhibitory KIR2DL1 and activating KIR2DS1, both of which are recognized by the EB6 mAb. Consequently, the expression and function of activating KIR have not been investigated in detail at the protein level.

Here, we describe the specificity of two new KIR-specific mAbs (8C11 and 1F12) generated by immunizing mice with soluble KIR2DS2 protein. The combination of these mAbs with commercially available mAbs enabled us to discriminate KIR2DS1, KIR2DL1 and KIR2DL2, while excluding the main HLA-Cw-specific KIR. These reagents allowed us to assess the expression of KIR2DS1, KIR2DL1 and KIR2DL2 in a large cohort of KIR and HLA genotyped individuals ($n = 52$). These new KIR-specific mAbs constitute useful tools to study the phenotype of KIR-expressing NK cells and to better understand the functional implication of these individual KIR.

Materials and methods

Cells

Peripheral blood mononuclear cells (PBMC) were isolated from the blood of healthy adult volunteers by gradient centrifugation on Ficoll-Hypaque (Lymphoprep, Axis-Shield, PoC AS, Oslo, Norway). All blood donors were recruited at the Blood Transfusion Centre (Nantes, France) after obtaining informed consent from all donors.

The BW5147 mouse thymoma (BW) cell line was transduced to express one KIR (KIR2DS1, -2DS2, -2DS3, -2DS4, -2DL1, -2DL3 or -3DS1) and the green fluorescent protein (GFP) reporter gene (provided by E. Vivier, Centre d'Immunologie de Marseille-Luminy, France). The RBL-DAP12⁺ 2DS2⁺ and untransfected rat basophil leukaemia (RBL) cells were obtained from E. Vivier.

Immunization of mice

BALB/c mice were immunized by intra-peritoneal injection of 50 μ g of soluble KIR2DS2 protein as described previously.¹⁴ A first immunization was performed with complete Freund's adjuvant and four additional immunizations were performed with incomplete Freund's adjuvant. Blood samples were collected from mice before the first injection and 3–5 days after subsequent injection. The immune response was monitored by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and antibody titres were determined as the inverse of the dilution that gave optical density (OD) values just above 0.2 (corresponding to three times the background signal).

Screening for KIR2DS2-reactive wells and cloning

The stimulated spleen cells were harvested and mixed at a 5 : 1 ratio with the Sp2/O-AG14 murine myeloma cell line. Fusion was performed by the polyethylene glycol method, as previously described.¹⁵ Hybridomas that secreted antibodies which significantly bound the coated soluble KIR2DS2 protein (OD > 0.5 by ELISA) were amplified to produce 1 ml of culture supernatants in 24-well culture plates. Hybridomas of interest were subcloned threefold by limiting dilution.

Production, purification, immunoglobulin subclass determination and labelling of mAbs

The antibodies were purified from culture supernatants by affinity chromatography on immobilized protein A. Isotypes were determined by ELISA using mouse mAb isotyping reagent (ISO2, Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany), according to the manufacturer's recommendations. Purified mAbs (~1 mg/ml in phosphate-buffered saline) were labelled with fluorescein isothiocyanate (FITC) for 2 hr at room temperature using FITC (Sigma, dissolved to 5 mg/ml with dimethyl sulphoxide just before use) with a FITC : mAb concentration ratio of 100 : 1. Excess dye was removed by dialysis against phosphate-buffered saline through a 10 000 molecular weight cut-off membrane (Pierce, Rockford, IL).

KIR genotyping

Genomic DNA was extracted from PBMC using a classical salting-out method.¹⁶ The KIR genes were typed using the polymerase chain reaction-sequence-specific primer (PCR-SSP) method using a KIR genotyping SSP kit (Dyna Biotech, Invitrogen, Compiègne, France). Primer sets amplified the alleles described by the international nomenclature committee of the World Health Organization¹⁷ corresponding to the KIR2DL1, KIR2DL2, KIR2DL3, KIR2DL4, KIR2DL5, KIR2DS1, KIR2DS2, KIR2DS3, KIR2DS4 and KIR1D allele, KIR2DS5, KIR3DL1, KIR3DL2, KIR3DL3, KIR3DS1, KIR2DP1, KIR3DP1 and KIR3DP1 variant (3DP1v). Genomic PCR was performed as recommended by the manufacturer and as previously described.¹⁸

Flow cytometry analysis

Cell surface phenotypes were determined by three- or four-colour flow cytometry using the following mouse anti-human mAbs: phycoerythrin-conjugated (-PE) anti-KIR2DL1/2DS1 (EB6), anti-KIR2DL2/2DL3/2DS2-PE (GL183), anti-KIR3DL1/3DS1 (Z27) (Beckman Coulter, Immunotech, Marseille, France), anti-KIR2DS4 (FES172), peridinin chlorophyll protein-conjugated anti-CD3 (SK7)

and allophycocyanin-conjugated anti-CD56 (B159) (BD Biosciences). Cells were also stained with a corresponding isotype-matched control mAb (BD Biosciences, San Jose, CA). Data were collected using a FACSCalibur (BD Biosciences) and analysed using FLOWJO 5.7 software (TreeStar, Ashland, OR).

Amplification and sequencing of KIR2DL1 transcripts

Total cellular RNA was prepared from 5×10^6 PBMC using TRIzol (Invitrogen, Paisley, UK). First-strand complementary DNA was synthesized from 1 µg RNA, using Moloney murine leukaemia virus reverse transcriptase (Invitrogen, Carlsbad, CA) at 37° for 50 min. One PCR primer pair was used, including KIR2DL1.331G(F) (5'-ACTCACTCCCCCTATCAGG-3'), described by Shilling *et al.*¹⁹ as the forward primer and KIR2DL1.724C(R) (5'-CAGAATGTGCAGGTGTCG-3') as reverse primer, amplifying a 0.4-kilobase fragment. Amplifications were performed as previously described²⁰ in a GeneAmp PCR System 9700 thermal cycler (Applied Biosystems, Foster City, CA). The PCR products were purified using the QIAquick PCR purification kit (Qiagen, Hilden, Germany) and then sequenced using the BigDye Terminator v1.1 Cycle Sequencing kit (Applied Biosystems, Foster City, CA) with the primers described above. Sequencing products were detected using an ABI Prism 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Courtaboeuf, France). Sequence data files were analysed using ASSIGN-SBT software (Conexio Genomics, Applecross, Australia) with IPD-KIR DATABASE version 2.0.0 (January 2008).

Results

Generation of KIR2DS2-specific mAb-secreting hybridoma clones

To generate KIR2DS2-specific mAbs, BALB/c mice were immunized with soluble KIR2DS2 protein. Supernatants from 895 hybridoma colonies were screened by flow cytometry using RBL-DAP12⁺ KIR2DS2⁺ and untransfected RBL. Fifty-nine colonies, which produced antibody that bound to RBL-DAP12⁺ KIR2DS2⁺ transfectants but not untransfected RBL cells were subcloned two or three times, and seven KIR2DS2-specific hybridomas (1A6, 1F12, 4A8, 5F4, 6F1, 8C11 and 9H7) were selected for further characterization.

Characterization of the KIR specificity of the generated mAbs using BW-KIR cell lines

To define the other KIR specificities of the selected mAbs, we used a panel of BW-KIR transduced cells expressing KIR2DS1, KIR2DS2, KIR2DS3, KIR2DS4, KIR2DL1,

Discrimination between the main activating and inhibitory KIR

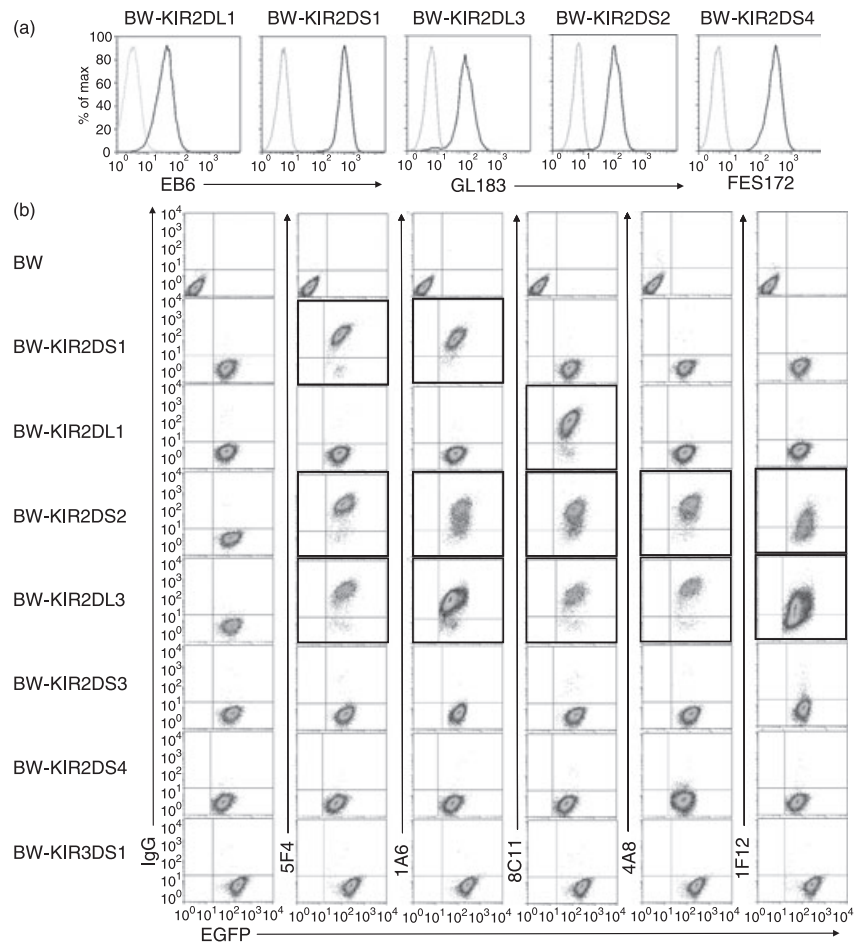


Figure 1. Definition of three groups of KIR2DS2-specific monoclonal antibodies (mAbs) following killer immunoglobulin-like receptor (KIR) recognition profile (a) Expression of KIR by BW-KIR2DL1, BW-KIR2DS1, BW-KIR2DL3, BW-KIR2DS2 and BW-KIR2DS4 was evaluated by flow cytometry using commercialized mAbs (EB6 specific for KIR2DL1/2DS1, GL183 specific for KIR2DL2/2DL3/2DS2 and FSE175 specific for KIR2DS4). An isotype-matched control staining is shown in grey in each histogram. (b) Staining of the KIR-transfected BW cell lines with generated mAbs (5F4, 1A6, 8C11, 4A8, 1F12) in parallel with immunoglobulin G control mAb.

KIR2DL3 or KIR3DS1. The KIR expression by the transduced BW was checked by flow cytometry using the KIR-specific EB6 (anti-KIR2DL1/2DS1), GL183 (anti-KIR2DL2/2DL3/2DS2) and FSE175 (anti-KIR2DS4) mAbs (Fig. 1a). Consequently, the BW-KIR2DL1 and BW-KIR2DS1 cell lines stained positive with the EB6 mAb, the BW-KIR2DL3 and BW-KIR2DS2 cell lines stained positive with the GL183 mAb and the BW-KIR2DS4 cell line stained positive with the FSE175 mAb. We failed to detect surface expression of KIR3DS1 on BW-KIR3DS1 transduced cells, using the available KIR3DL1/3DS1-specific Z27 mAb (data not shown). However, as for all of the BW-KIR cell lines, the BW-KIR3DS1 cells expressed GFP, the reporter gene associated with the KIR gene indicating that the BW cell line was well transduced (Fig. 1b). The negative control BW cell line did not stain positive with any of the studied mAbs. All seven selected KIR2DS2-specific mAbs also bound to BW-KIR2DL3 cell lines, as illustrated for the five mAbs assessed (1F12, 5F4, 1A6, 8C11 and 4A8) (Fig. 1b). The 1F12 and 4A8 mAbs did not recognize any of the BW-KIR cell lines studied, except the BW-KIR2DS2 and BW-KIR2DL3 cell lines (Fig. 1b). Interestingly, the 8C11 mAb recognized the

BW-KIR2DS2, BW-KIR2DL3 and BW-KIR2DL1 but not the BW-KIR2DS1 cell lines. In contrast, the 5F4 and 1A6 mAbs recognized the BW-KIR2DS2, BW-KIR2DL3 and BW-KIR2DS1 but not the BW-KIR2DL1 cell lines. Finally 6F1 and 9H7 mAbs recognized all the BW-KIR cell lines, except for the BW-KIR3DS1 and BW-KIR2DS3 cell lines (data not shown). Five KIR-specific mAbs (1A6, 1F12, 4A8, 5F4 and 8C11) were selected for further studies.

Characterization of the KIR specificity of the generated mAbs in KIR genotyped individuals

The fine specificity of 1A6, 1F12, 4A8, 5F4 and 8C11 mAbs was studied by four-colour flow cytometry. We checked that the studied mAbs did not recognize other molecules besides the KIR2DL1/2DL2/2DL3, 2DS1/2DS2/2DS4. To this end, we assessed binding of FITC-labelled mAbs to NK cells from KIR genotyped individuals. The KIR genotypes of 13 individuals herein are summarized in Table 1. Figure 2(a) illustrates the staining of NK cells defined as CD3⁻ CD56⁺ cells with each tested mAb in combination with commercial EB6-PE (KIR2DL1/2DS1)

Table 1. The killer immunoglobulin-like receptor (KIR) genotypes of individuals presented in the study

	KIR typing													
	2DL1	2DL2	2DL3	2DL4	2DL5	3DL1	3DL2	3DL3	2DS1	2DS2	2DS3	2DS4	2DS5	3DS1
D1	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+
D2	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+	-	+	-	-
D3	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+	-	+	-	-
D4	+	-	+	+	-	+	+	+	-	-	-	+	-	-
D5	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+
D6	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+
D7	-	+	-	+	-	+	+	+	-	+	-	+	-	-
D8	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+
D9	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+
D10	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+	-	+	-	-
D11	+	-	+	+	-	+	+	+	-	-	-	+	-	-
D12	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+
D13	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-

Hereditary haemochromatosis-positive blood donors are indicated in bold.

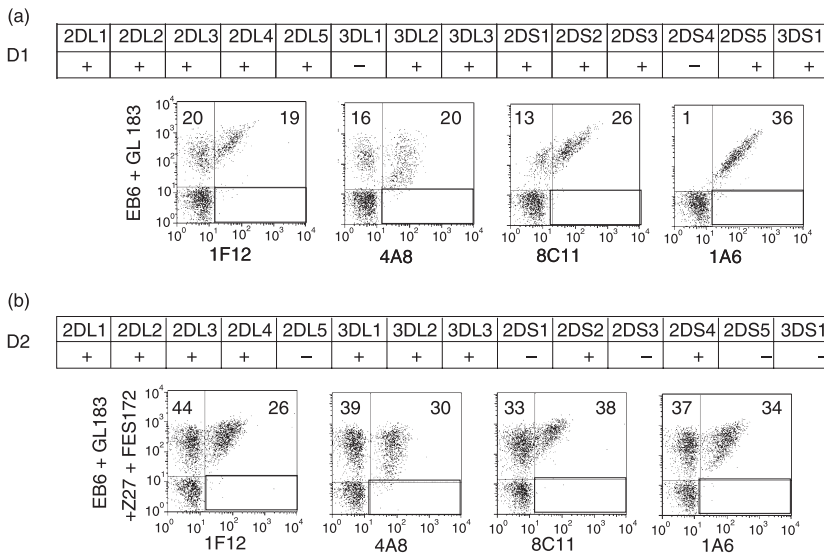


Figure 2. Characterization of the killer immunoglobulin-like receptor (KIR) specificity of the generated monoclonal antibodies (mAbs) in KIR genotyped individuals. Peripheral blood mononuclear cells (PBMC) were stained with CD3- and CD56-specific mAbs to discriminate natural killer (NK) cells (CD3⁻ CD56⁺) by four-colour flow cytometry. (a) Combined use of the generated mAbs with a mix of EB6 and GL183 mAbs from KIR genotyped D1 individual and (b) combined use of the generated mAbs with a mix of EB6, GL183, Z27 and FSE175 mAbs from KIR genotyped D2 individual.

and GL183-PE (KIR2DL2/2DL3, 2DS2) from the individual D1 who did not have the KIR3DL1 and KIR2DS4 genes. The 1F12, 4A8, 8C11 and 1A6 mAbs did not recognize any NK cell population that was not recognized by the EB6 and GL183 mAbs. However, the 5F4 mAb stained the EB6⁻ GL183⁻ NK cell population, showing that this mAb recognized another cell surface molecule (data not shown). Figure 2(b) illustrates the staining patterns obtained with individual D2 who possesses the KIR3DL1 and KIR2DS4 genes. In this case, the mAb staining was performed in combination with a mix of PE-coupled EB6, GL183, Z27 and FSE175 commercial mAbs. The flow cytometry results confirmed that 1F12, 4A8, 8C11 and 1A6 did not recognize any molecule

other than the KIR2DL1/2DL2/2DL3/2DS2/2DS4/3DL1/3DS1.

Assessment of KIR2DL2 recognition by the generated mAbs

The previous results (Fig. 1b) did not allow us to determine whether 1F12, 4A8, 8C11 and 1A6 mAbs recognized the inhibitory KIR2DL2. To test this, we assessed the specificity of these FITC-labelled mAbs in combination with only KIR2DL2/2DL3/2DS2-specific GL183-PE mAb by four-colour flow cytometry on NK (CD3⁻ CD56⁺) cells from KIR genotyped individuals who possessed or lacked the KIR2DL2 gene (Fig. 3a).

Discrimination between the main activating and inhibitory KIR

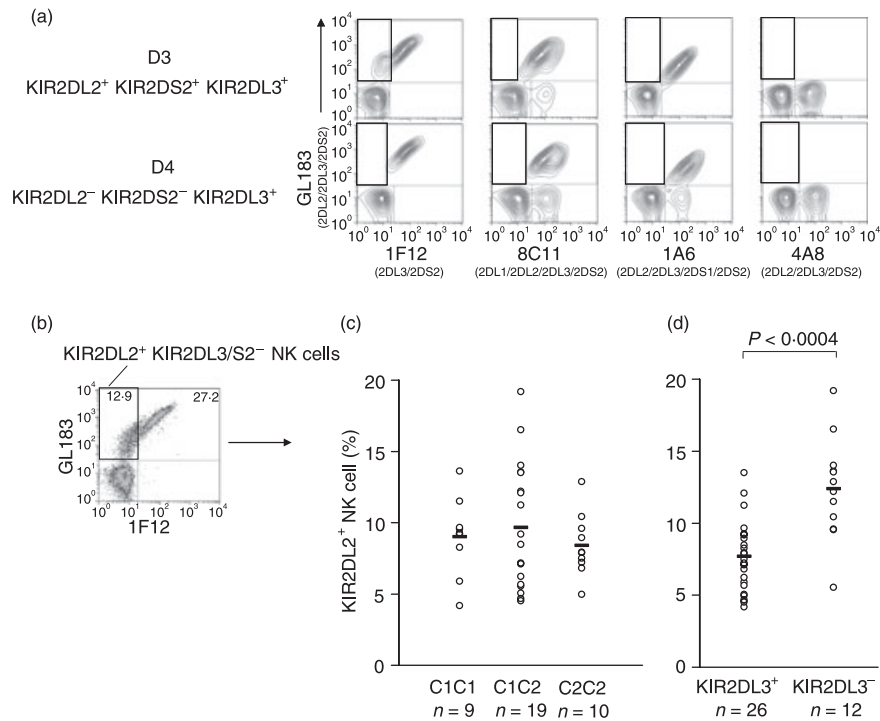


Figure 3. All the studied monoclonal antibodies (mAbs) recognize KIR2DL2 except the 1F12 mAb. Peripheral blood mononuclear cells were stained with CD3- and CD56-specific mAbs to discriminate natural killer (NK) cells ($CD3^- CD56^+$) by four-colour flow cytometry. (a) Combined use of the generated mAbs with the KIR2DL2/2DL3/2DS2-specific GL183 mAb from the KIR2DL2/2DL3/2DS2⁺ genotyped D3 individual and from the KIR2DL2/2DS2⁻ KIR2DL3⁺ genotyped D4 individual. The boxes define the NK cell population only stained by GL183 determining the studied mAbs which do not recognize KIR2DL2. Results are representative of 26 KIR2DL2/2DL3/2DS2⁺ individuals and 12 KIR2DL2/2DS2⁻ KIR2DL3⁺ individuals (b) Density plot illustrating the KIR2DL2⁺ KIR2DL3/2DS2⁻ NK cell subset. (c) Frequency of KIR2DL2⁺ KIR2DL3/2DS2⁻ NK cell subset in C1C1 ($n = 9$), C1C2 ($n = 19$) and C2C2 ($n = 10$) groups. (d) Frequency of KIR2DL2⁺ KIR2DL3/2DS2⁻ NK cell subset in KIR2DL3⁺ group ($n = 26$) and KIR2DL3⁻ group ($n = 12$), $P < 0.0004$ (Student's *t*-test).

Because all GL183⁺ cells were stained by the 8C11 and 1A6 mAbs in KIR2DL2⁺ individuals, these antibodies recognized the KIR2DL2. However, the 1F12 mAb recognized only a fraction of GL183⁺ NK cells from a KIR2DS2/2DL2/2DL3⁺ individual (D3), whereas it stained all GL183⁺ cells from a KIR2DL2/2DS2⁻ KIR2DL3⁺ individual (D4). Hence, the 1F12 mAb was specific for KIR2DS2 and KIR2DL3 but not for KIR2DL2. The 4A8 mAb showed a staining pattern different from that of 1F12 in combination with GL183, even though both mAbs recognized the KIR2DS2 and KIR2DL3 (Fig. 3a). The 4A8 mAb presumably recognized an epitope close to the GL183 epitope because it blocked GL183 binding (Fig. 3a). These results were extended to a larger panel of different KIR2DL2-positive ($n = 38$) or negative ($n = 23$) genotyped individuals (data not shown). Expression of the KIR2DL2/2DL3 ligands (i.e. group 1 HLA-Cw alleles: C1) did not affect the frequency of the KIR2DL2⁺ KIR2DL3/2DS2⁻ NK cell population (Fig. 3b), which was very similar in C1C1 ($n = 9$), C1C2 ($n = 19$) and C2C2 ($n = 10$) individuals (Fig. 3c). However, the frequency of KIR2DL2⁺ KIR2DL3/2DS2⁻ NK cells was significantly

higher in KIR2DL3⁻ individuals ($n = 12$) in comparison with KIR2DL3⁺ individuals ($n = 26$) ($P < 0.0004$) (Fig. 3c).

Discrimination of KIR2DS1⁺ and KIR2DL1⁺ NK cell subsets

Because 8C11 did not recognize the BW-KIR2DS1 cell line, we tested this mAb in combination with EB6 (KIR2DS1, KIR2DL1) to target KIR2DS1 expression, and with GL183 (KIR2DL2, KIR2DL3 and KIR2DS2) to target KIR2DL1 expression, from four different KIR2DL1/2DS1-genotyped individuals (D4, D5, D6 and D7). As illustrated in Fig. 4(a), while all EB6⁺ NK cells from KIR2DS1⁻ individuals were stained by 8C11 mAb, only a fraction of EB6⁺ cells from KIR2DS1⁺ donors was stained by this mAb, indicating recognition of KIR2DL1 but not KIR2DS1. The frequency of KIR2DS1⁺ KIR2DL1/2DL2/2DL3/2DS2⁻ NK cells (EB6⁺ 8C11⁻) was then assessed in a large panel of KIR2DS1-genotyped individuals ($n = 23$). The frequency of (EB6⁺ 8C11⁻) NK cells ranged from 1% to 14.65% of NK cells, with a mean of 6.25% (data not shown). No significant difference in KIR2DS1⁺ KIR2DL1/

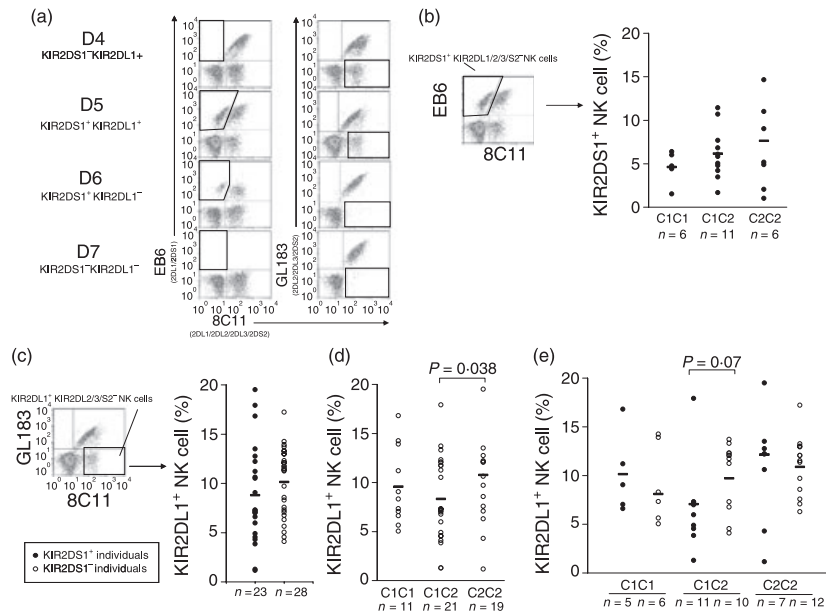


Figure 4. Discrimination of KIR2DS1⁺ and KIR2DL1⁺ natural killer (NK) cell subsets. Peripheral blood mononuclear cells were stained with CD3- and CD56-specific monoclonal antibodies (mAbs) to discriminate NK cells (CD3⁺ CD56⁺) by four-colour flow cytometry. (a) Combined use of 8C11 with EB6 or GL183 mAb to target KIR2DS1⁺ KIR2DL1/2DL2/2DL3/2DS2⁻ NK cells and KIR2DL1⁺ KIR2DL2/2DL3/2DS1/2DS2⁻ NK cell subsets respectively from four KIR2DL1/2DS1 genotyped individuals (D4, D5, D6 and D7). The EB6⁺8C11⁺ boxes define the KIR2DS1⁺ KIR2DL2/DL3/2DS2⁻ NK cells and the GL183⁻ 8C11⁺ define the KIR2DL1⁺ KIR2DL2/2DL3⁻ NK cells (b) Frequency of KIR2DS1⁺ KIR2DL1/2DL2/2DL3/2DS2⁻ NK cell subsets in C1C1 ($n = 6$), C1C2 ($n = 11$) and C2C2 ($n = 6$) groups. (c) Frequency of KIR2DL1⁺ KIR2DL2/2DL3/2DS1/2DS2⁻ NK cell subsets in KIR2DS1⁺ individuals (●) ($n = 23$) and KIR2DS1⁻ individuals (○) ($n = 28$), (d) in C1C1 ($n = 11$), C1C2 ($n = 20$) and C2C2 ($n = 19$) groups. (e) Frequency of KIR2DL1⁺ KIR2DL2/2DL3/2DS1/2DS2⁻ NK cells in C1C1 ($n = 11$), C1C2 ($n = 21$) and C2C2 ($n = 19$) individual groups harbouring (●) or not (○) the KIR2DS1 gene.

2DL2/2DL3/2DS2⁻ NK cell frequencies was observed when comparing C1C1 ($n = 6$), C1C2 ($n = 11$) or C2C2 ($n = 6$) individuals, with even a trend towards an increased frequency in the C2C2 group (Fig. 4b). In parallel, we assessed KIR2DL1⁺ KIR2DL2/2DL3/2DS2⁻ (GL183⁻ 8C11⁺) NK cell frequencies in a large panel of KIR-genotyped individuals (23 KIR2DS1⁺ and 28 KIR2DS1⁻ individuals). The mean frequency of KIR2DL1⁺ KIR2DL2/2DL3/2DS2⁻ (GL183⁻ 8C11⁺) was not significantly lower in KIR2DS1⁺ individuals than in KIR2DS1⁻ individuals (Fig. 4c). However, the mean frequency of KIR2DL1⁺ KIR2DL2/2DL3/2DS2⁻ cells was significantly higher in the C2C2 group than in the C1C2 group ($P = 0.038$) (Fig. 4d). Because this cell frequency in C1C1 individuals was not significantly lower than in the C2C2 group, it is difficult to explain the significant difference of frequencies observed between C1C2 and C2C2 groups only by the expression of the C2 ligand. Interestingly, when taking into account the KIR2DS1 gene, a trend towards a lower frequency of KIR2DL1⁺ KIR2DL2/2DL3/2DS2⁻ cells was observed in the KIR2DS1⁺ C1C2 group compared with the KIR2DS1⁻ C1C2 group ($P = 0.07$) (Fig. 4e).

The combined use of 1A6 (KIR2DL2/2DL3, 2DS1/2DS2) with EB6 (KIR2DS1, KIR2DL1) enabled specific

assessment of KIR2DL1 expression, whereas its combined use with GL183 (KIR2DL2, KIR2DL3 and KIR2DS2) targeted KIR2DS1 expression (data not shown).

Expression of KIR2DL1, KIR2DL2 and KIR2DS1 on different lymphocyte populations

The NK KIR-phenotyping analysis was initially performed by flow cytometry on gated CD3⁺ CD56⁺ cells. We next analysed the KIR phenotype on CD56⁻ CD3⁺ and CD56⁺ CD3⁺ T lymphocytes. In this way, we identified a KIR2DL2⁺ KIR2DL3/2DS2⁻ subset (1F12⁻ GL183⁺) not only within the NK cell population but also within the CD56⁻ and CD56⁺ T lymphocyte compartment, as illustrated for the KIR2DL2⁺ D8 individual (Fig. 5a). As demonstrated previously in Fig. 3(d) for NK cells, the frequency of the KIR2DL2⁺ KIR2DL3/2DS2⁻ subset in CD56⁻ T lymphocytes was higher in KIR2DL3⁻ compared with KIR2DL3⁺ individuals (data not shown). A control staining is also indicated for the KIR2DL2⁻ D9 individual (Fig. 5a). The KIR2DL1⁺ KIR2DL2/2DL3/2DS2⁻ (8C11⁺ GL183⁻) subset was observed not only in the NK cell compartment, but also in both CD56⁻ and CD56⁺ T lymphocyte populations (8C11⁺ GL183⁻), as illustrated for the KIR2DL1⁺ D11 individual (Fig. 5b). A control

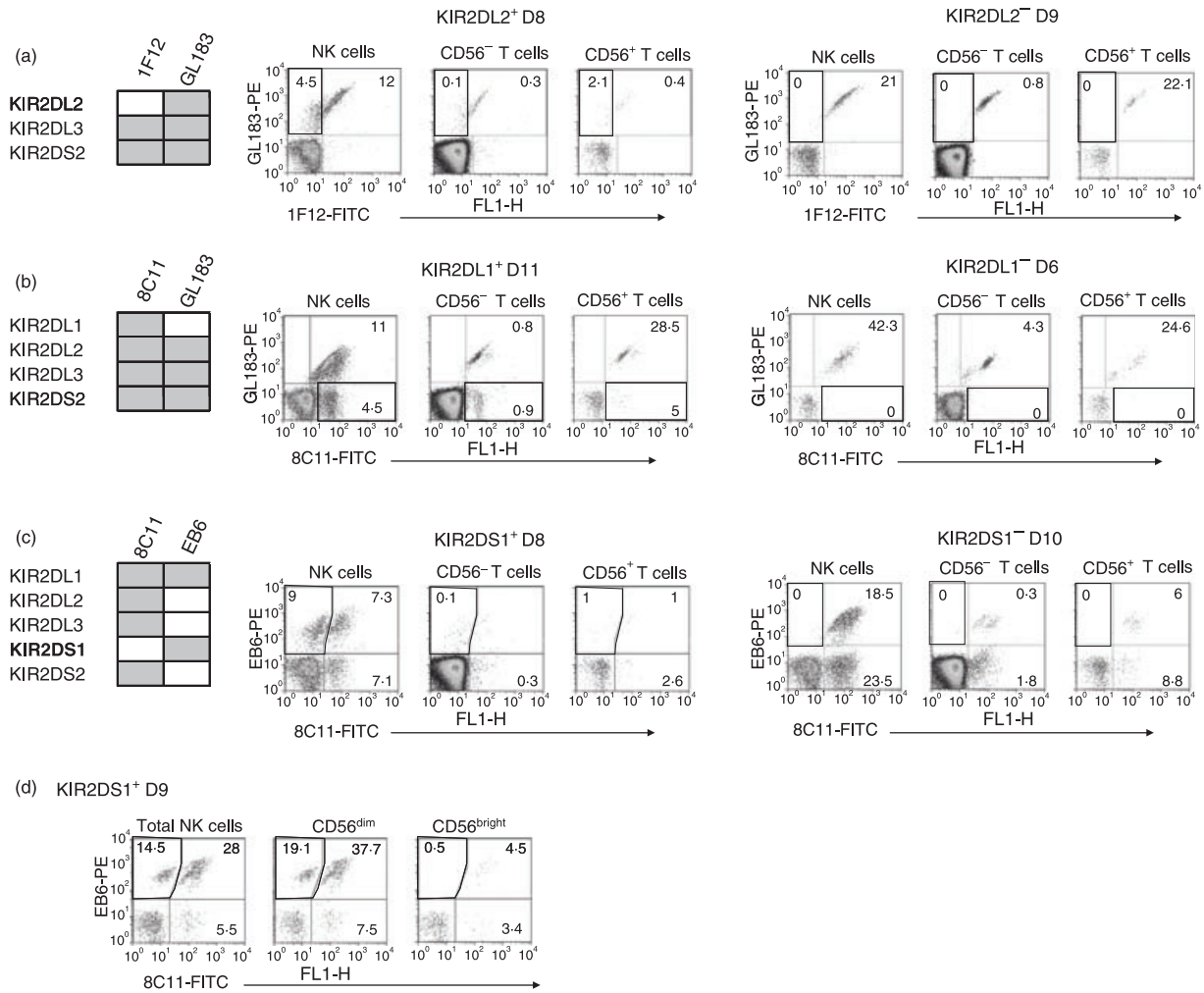


Figure 5. Analysis of the distribution of KIR2DL1, KIR2DL2 and KIR2DS1 on natural killer (NK) cells, CD56⁻ and CD56⁺ T lymphocytes. Peripheral blood mononuclear cells were stained with CD3- and CD56-specific monoclonal antibodies (mAbs) to discriminate NK cells (CD3⁻ CD56⁺), CD56⁻ T lymphocytes (CD3⁺ CD56⁻) and CD56⁺ CD3⁺ T lymphocytes (CD3⁺ CD56⁺) by four-colour flow cytometry. (a) Combined use of 1F12 with GL183 to target KIR2DL2⁺ KIR2DL3/2DS2⁻ NK cells from KIR2DL2⁺ D8 and KIR2DL2⁻ D9 individuals. (b) Combined use of 8C11 with GL183 to target KIR2DL1⁺ KIR2DL2/2DL3/2DS1/2DS2⁻ NK cells from KIR2DL1⁺ D11 and KIR2DL1⁻ D6 individuals. (c) Combined use of 8C11 with EB6 to target KIR2DS1⁺ KIR2DL1/2DL2/2DL3/2DS2⁻ NK cells from KIR2DS1⁺ D8 and KIR2DS1⁻ D10 individuals. (d) Staining of NK cells (CD3⁻ CD56⁺) with the combination of 8C11 with EB6 on total cells, CD56^{dim} and CD56^{bright} NK cells.

staining is also indicated for the KIR2DL1⁻ D6 individual. Even though we were able to detect a KIR2DS1⁺ KIR2DL1/2DL2/2DL3/2DS2⁻ NK cell population (8C11⁻ EB6⁺), the frequency of KIR2DS1⁺ expression on T lymphocytes (CD56⁻ or CD56⁺) was low or absent, as illustrated in Fig. 5(c) for the KIR2DS1⁺ D8 individual. Again, a control staining is also provided for the KIR2DS1⁻ D10 individual. In general, the frequency of KIR⁺ CD56⁺ T cells was more constant than the frequency of KIR⁺ cells in the CD56⁻ T-cell population. For the KIR2DS1⁺ D9 individual who displayed 14.5% of KIR2DS1⁺ KIR2DL1/2DL2/2DL3/2DS2⁻ NK cells (EB6⁺8C11⁻), activating KIR2DS1 was mainly expressed on the CD56^{dim} NK cell population (19.1% versus 0.5% for the CD56^{bright} NK cells) (Fig. 5d).

Allelic KIR2DL1 variant recognition by the 8C11 and 1A6 mAbs

Figure 6(a) shows a typical 8C11/EB6 staining for the KIR2DS1⁻ D11 individual lacking EB6⁺ 8C11⁻ cells. However, for some individuals (D12 and D13 in Fig. 6a), despite lacking the KIR2DS1 gene, an EB6⁺ 8C11⁻ cell population was detected, suggesting that 8C11 does not recognize all the allelic KIR2DL1 molecules recognized by EB6. In fact, for the KIR2DL1 genotyped D12 individual, an 8C11⁺ GL183⁻ cell population (corresponding to KIR2DL1 expression) was detected (Fig. 6a). Taking into account the KIR specificity of 8C11 and the alignment of KIR sequences published in the IPD-KIR sequence database (release 2.0.0; <http://www.ebi.ac.uk/>

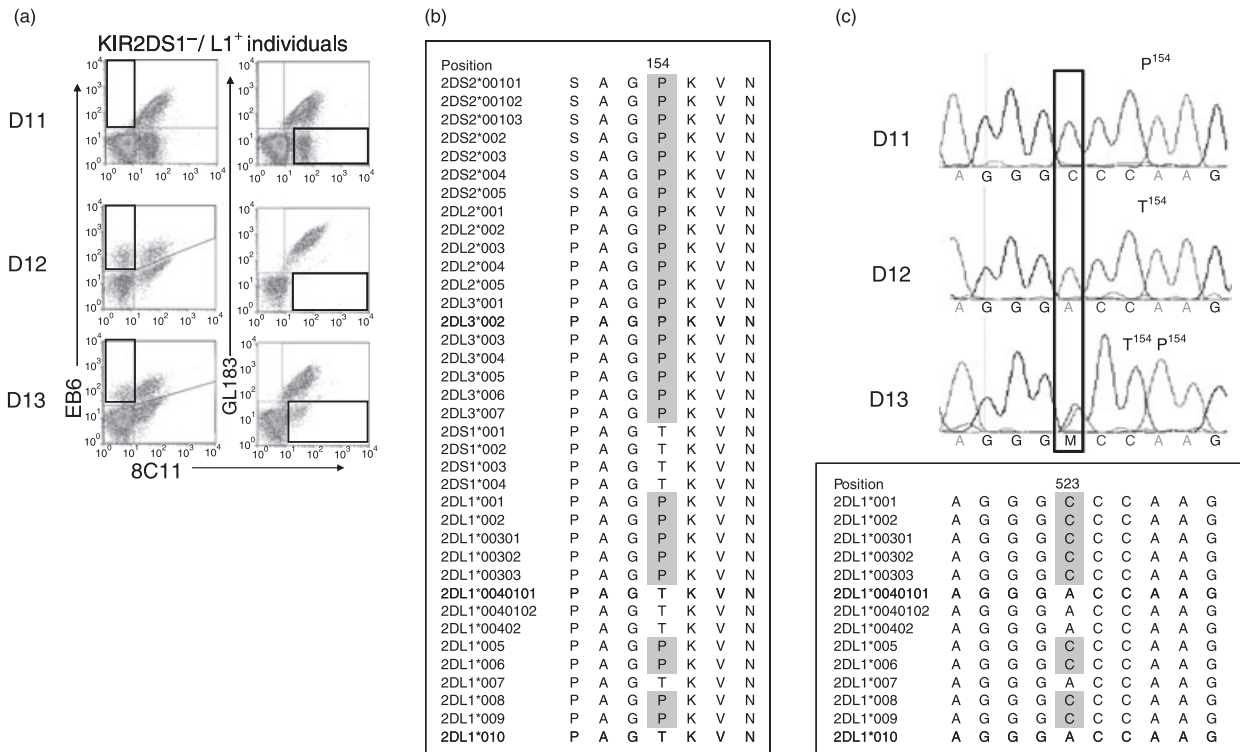


Figure 6. 8C11 does not recognize all KIR2DL1 allele-encoded molecules. (a) Peripheral blood mononuclear cells were stained with CD3- and CD56-specific monoclonal antibodies (mAbs) to target natural killer (NK) cells (CD3⁺ CD56⁺) and the combined use of 8C11 with EB6 or GL183 to target KIR2DS1⁻ KIR2DL1/2DL2/2DL3/2DS2⁻ NK cells and KIR2DL1⁺ KIR2DL2/2DL3/2DS1/2DS2⁻ NK cell subsets respectively from three different KIR2DS1⁻ KIR2DL1⁺ genotyped individuals (D11, D12 and D13). (b) Codon at position 154 for all referenced KIR2DS2, KIR2DL2, KIR2DL3, KIR2DS1 and KIR2DL1 alleles. P¹⁵⁴ is indicated in bold on grey background. (c) Electrophoretograms are presented above the aligned nucleotide sequences of KIR2DL1 alleles around the position 523. Polymorphic position is boxed on the electrophoretograms and indicated in bold on grey background in all KIR2DL1 allele sequences. M = A + C. D11, D12 and D13 are representative of seven, two and two respectively of 11 studied individuals.

ipd/kir), it was possible, by deduction, to identify the recognition site of 8C11 (Fig. 6b). Position 154 (in amino acids) was the unique site potentially recognized by 8C11, with a proline (P¹⁵⁴) for all KIR2DS2, KIR2DL1/2DL2 and 2DL3 but with a threonine (T¹⁵⁴) for the KIR2DS1. However, in this way, it was also possible to postulate that 8C11 does not recognize KIR2DL1*004, *007 or *010 allele-encoded molecules, as mentioned in Fig. 6(b). To check this hypothesis, we sequenced KIR2DL1 alleles from different KIR2DL1⁺ genotyped individuals (n = 11) corresponding to three groups of D11, D12 and D13 individuals (Fig. 6c). Individual D12 had two KIR2DL1 alleles coding for a molecule with a threonine (T) in position 154 (T¹⁵⁴). Based on our hypothesis, 8C11 does not recognize the KIR2DL1 molecule with a T¹⁵⁴, which explains the staining of D12 NK cells with 8C11, characterized by the absence of an 8C11⁺ GL183⁻ cell population (KIR2DL1⁺) and the presence of an EB6⁺ 8C11⁻ cell population in individuals lacking the KIR2DS1 gene (Fig. 6a). Similarly, the D13 individual had one KIR2DL1 allele coding for a

molecule with a threonine (T) in position 154 (T¹⁵⁴) and a KIR2DL1 allele coding for a molecule with a proline (P) at position 154 (P¹⁵⁴) (Fig. 6c). For this individual, therefore, 8C11 recognized the KIR2DL1 molecule with a P¹⁵⁴, which was consistent with the presence of an 8C11⁺ GL183⁻ cell population. However, in this individual, 8C11 did not recognize the KIR2DL1 molecule with a T¹⁵⁴, which explained the EB6⁺ 8C11⁻ cell population in the absence of the KIR2DS1 gene (Fig. 6a). On the other hand, individual D11, who presented a widespread phenotypic profile without an EB6⁺ 8C11⁻ cell population and with an 8C11⁺ GL183⁻ cell population, had two KIR2DL1 alleles coding for a KIR2DL1 with P¹⁵⁴, which was recognized by the 8C11 mAb.

For some individuals (D10, D12 and D13), despite lacking the KIR2DS1 gene (Fig. S1a), an 1A6⁺ GL183⁻ cell population was detected, suggesting that 1A6 recognize some allelic KIR2DL1 molecules. The alignment of KIR sequences enabled us to identify the recognition site for 1A6. The unique site, which is common for KIR2DL2/2DL3/2DS2 and KIR2DS1 and some KIR2DL1

alleles, is a proline at position 114 (P¹¹⁴). In this case, KIR2DL1*001, *002, *004, *007, *008 and *010 molecules can be recognized by 1A6 in accordance with the alignment of KIR sequences published in the IPD-KIR database (release 2.0.0; <http://www.ebi.ac.uk/ipd/kir>) (Fig. S1b). To check this hypothesis, we analysed the sequence of KIR2DL1 alleles determined from different KIR2DL1⁺-genotyped individuals (*n* = 11) in position 404 (Fig. S1c). Hence, individual D11 had two KIR2DL1 alleles coding for a molecule with a leucine (L) in position 114 (L¹¹⁴). D10 and D12 individuals had two KIR2DL1 alleles coding for a molecule with a proline (P) in position 114 (P¹¹⁴) and individual D13 had one KIR2DL1 allele coding for a molecule with a proline (P) in position 114 (P¹¹⁴) and one KIR2DL1 allele coding for a molecule with a leucine (L) at position 114 (L¹¹⁴). To conclude, KIR2DL1 encoded by KIR2DL1*001, *002 and *008 alleles are recognized by 8C11 and 1A6, KIR2DL1 encoded by KIR2DL1*003, *005, *006 and *009 alleles are recognized only by 8C11 and KIR2DL1 encoded by KIR2DL1*004, *007 and *010 are recognized only by 1A6.

1F12 mAb recognizes only the KIR2DS2 and KIR2DL3

The alignment of KIR sequences enabled us to identify the recognition site for 1F12. The unique site, which is common for KIR2DS2 and KIR2DL3 but different for KIR2DL2, is a proline at position 16 (P¹⁶) (Fig. 7a). In this case, molecules KIR2DL1*001, *002, *008 and the molecule KIR2DL2*004 can be recognized by 1F12 in accordance with the KIR sequence alignment performed using the IPD-KIR sequence database (release 2.0.0; <http://www.ebi.ac.uk/ipd/kir>). However, as could be expected, 1F12 could not recognize the KIR2DL2*004-encoded molecule because this molecule has been described as a non-functional KIR that is not expressed on the cell surface. Moreover, the flow cytometry study performed on 51 studied individuals (28 KIR2DL2⁺ and 23 KIR2DL2⁻ donors) did not reveal an 1F12⁺ GL183⁻ cell population. We sequenced KIR2DL1 alleles for different KIR2DL1⁺ individuals (*n* = 11) in the region of three nucleotides (404, 523 and 549) leading to the discrimination of the KIR2DL1*001, *002 and *008 alleles (Fig. 7b).

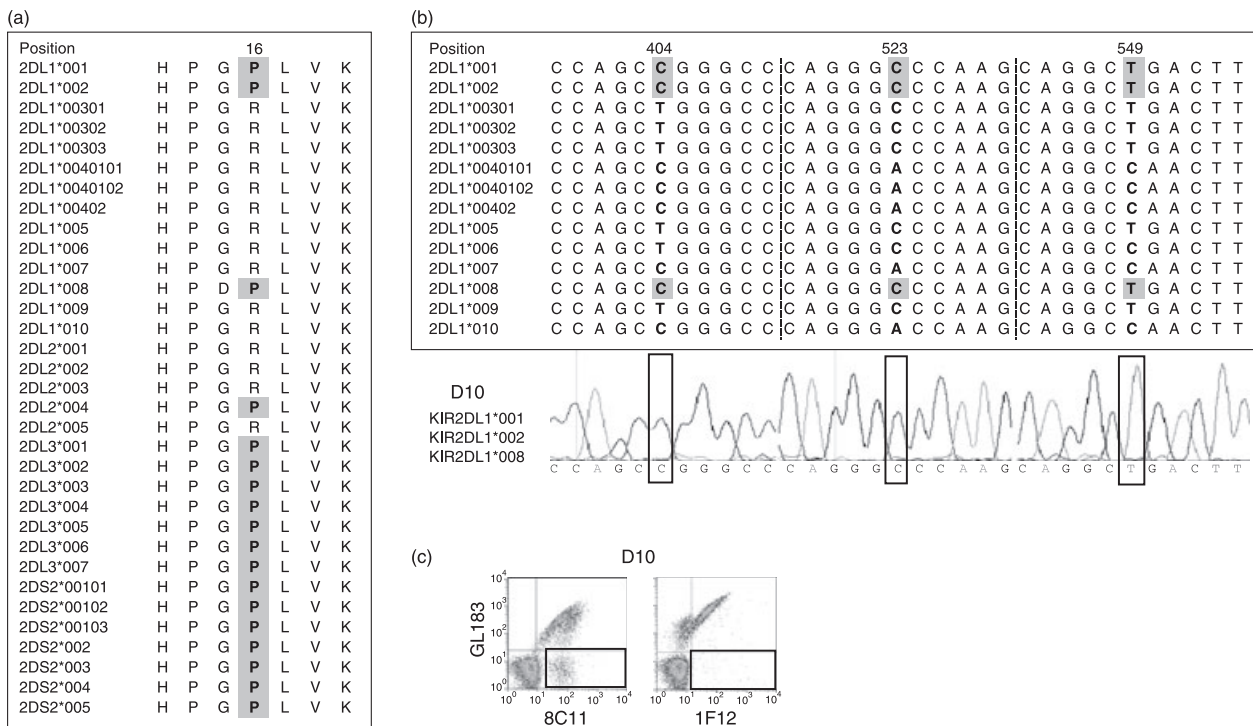


Figure 7. 1F12 monoclonal antibody (mAb) recognizes only the KIR2DS2 and KIR2DL3. (a) Codon at position 16 for all referenced KIR2DL1, KIR2DL2, KIR2DL3 and KIR2DS2 alleles. P¹⁶ is indicated in bold on grey background. (b) Alignment of nucleotide sequences for all KIR2DL1 alleles around the polymorphic positions 404, 523 and 549. The corresponding electrophoretogram obtained for donor D10 is presented below the nucleotide KIR2DL1 sequences and polymorphic positions are boxed. (c) Peripheral blood mononuclear cells were stained with CD3- and CD56-specific mAbs to target natural killer (NK) cells (CD3⁻ CD56⁺) and the combined use of GL183 with 8C11 or 1F12 mAb to target KIR2DL1⁺ KIR2DL2/2DL3/2DS1/2DS2⁻ and KIR2DL2⁺ KIR2DL3/2DS2⁻ NK cell subsets, respectively, for the D10 individual. D10 is representative of three individuals of 11 studied individuals.

Three of the 11 individuals studied carried KIR2DL1*001, *002 or *008 alleles (C⁴⁰⁴ C⁵²³ T⁵⁴⁹), such as individual D10 in whom a gene coding for the KIR2DL1 with a P¹⁶ was detected. While 8C11 recognized KIR2DL1 molecules encoded by the KIR2DL1*001, *002 or *008 alleles, as illustrated in Fig. 7(c) for individual D10, 1F12 did not recognize the KIR2DL1 molecule with P¹⁶. None of the studied KIR2DL1*001, *002 or *008 positive individuals ($n = 3$) expressed a KIR2DL1 recognized by 1F12 upon flow cytometry analysis. Consequently, in contrast to the 8C11 mAb whose recognition is dependent on P¹⁵⁴, the P¹⁶ binding site is important, but not sufficient for 1F12 recognition. We can therefore hypothesize that the three-dimensional structure of the KIR2DL1 molecule around the P¹⁶ site observed for the KIR2DL1*001, *002 and *008 allele-encoded proteins prevents 1F12 recognition.

Discussion

In this paper, we describe the precise characterization of several newly generated KIR-specific mAbs. Our results show that some of these mAbs allow for the specific assessment of KIR2DS1, KIR2DL1 and KIR2DL2 expression. Using KIR2DL1/2DL2/2DL3/2DS2-specific 8C11 in combination with KIR2DL1/2DS1-specific EB6, we targeted KIR2DS1 (8C11⁻ EB6⁺) by excluding the expression of the major HLA-Cw-specific KIR2DL1/2DL2/2DL3/2DS2. We demonstrated the cell surface expression of KIR2DS1 from all of the studied KIR2DS1 genotyped individuals and found that the frequency of KIR2DS1⁺ 2DL1⁻ NK cells is relatively constant (mean of approximately 6.25%). KIR2DS1 is barely expressed on CD56⁻ CD3⁺ and CD56⁺ CD3⁺ T lymphocytes and is mainly detected on the surface of NK cells and especially on CD56^{dim} NK cells. Conversely, using the KIR2DL1/2DL2/2DL3/2DS2-specific 8C11 with KIR2DL2/2DL3/2DS2-specific GL183, we targeted the KIR2DL1 (8C11⁺ GL183⁻) by excluding KIR2DL2/2DL3/2DS1/2DS2 expression. We found the KIR2DS1 and KIR2DL1 to be independently expressed on NK cells. Interestingly, we showed that the frequency of this KIR2DL1⁺ NK cell population is lower in C1C2 versus C2C2 individuals, and that the frequency of this KIR2DL1⁺ NK cell subset is lower in C1C2 individuals who express the corresponding activating KIR2DS1 gene than in KIR2DS1⁻ C1C2 individuals. Among all of the KIR2DS2-specific mAbs evaluated, only one mAb, 1F12, did not recognize the corresponding inhibitory KIR2DL2. The combined use of KIR2DL3/2DS2-specific 1F12 with KIR2DL2/2DL3/2DS2-specific GL183 led us to target KIR2DL2 (1F12⁻ GL183⁺) by excluding expression of the KIR2DL3 and KIR2DS2. We found the frequency of KIR2DL2⁺ KIR2DL3/2DS2⁻ NK cells to be significantly higher in KIR2DL3⁻ than in KIR2DL3⁺ genotyped individuals. This observation may

be explained by a gene-dose effect because KIR2DL2 and KIR2DL3 segregate as alleles of one locus.⁶

In most studies to date, inhibitory KIR2DL and activating KIR2DS have been studied simultaneously using first developed antibodies EB6 or GL183. Studies using these antibodies provided new insight into the mechanisms regulating NK cell function via KIR.¹² While no activating KIR2DS1-specific mAbs have helped to identify their functional surface expression, several studies using KIR2DS1 transcript⁺ NK clones have shown that KIR2DS1 is an activating receptor that recognizes the C2 ligand.^{12,21,22} Recently, using the combined association of 8C11/EB6 mAb to exclude KIR2DL1/2DL2/2DL3/2DS2 expression, we have shown that only KIR2DS1⁺ NK cells from C2⁻ individuals are C2 alloreactive.²³

The presence of cognate HLA class I ligand for a given KIR has been reported to increase the frequency of NK cells expressing that particular KIR, and to decrease the frequency of NK cells expressing other inhibitory KIR.²⁴ Yawata *et al.* studied KIR2DL1⁺ KIR2DS1⁻ genotyped Japanese individuals and showed that the presence of cognate C2 almost doubled the frequency of KIR2DL1⁺ NK cells. We observed a significant difference in KIR2DL1⁺ NK cell frequency only between C1C2 and C2C2 individuals. Interestingly, by distinguishing KIR2DS1⁻ and KIR2DS1⁺ genotyped individuals, we observed a significant increase in KIR2DL1⁺ NK cells in C1C2 individuals who do not carry the KIR2DS1 gene. Our results suggest that not only does the HLA KIR ligand have an impact on specific KIR NK cell frequency but so does activating homologous KIR. However, we did not note any significant differences in KIR2DL2⁺ NK cell frequency when comparing C1C1, C1C2 and C2C2 individuals. This may be explained by the fact that KIR2DL2 recognizes a large spectrum of HLA-Cw molecules including not only C1 molecules (Asp⁸⁰) but also C2 molecules (Lys⁸⁰) and HLA-B molecules, as shown recently.²⁵

Allelic KIR polymorphism can have an impact on KIR expression and function, as described for KIR3DL1.²⁴ The allelic KIR recognition of 8C11, revealed by the precise characterization of its specificity, underlines the caution required when studying KIR expression, because of the high allelic KIR polymorphism. It will be necessary to characterize the KIR specificity of mAbs at the KIR allele level to avoid misleading interpretation of KIR NK cell phenotype. The impact of allelic KIR polymorphism on NK function has not been investigated widely except in the case of KIR3DL1. Using these new mAbs, it will be conceivable to study the functional impact of KIR2DL1 and KIR2DL2 polymorphisms. The use of combined 1F12 and GL183 would make it possible to determine the impact of different C2 ligands, such as Cw*0501-encoded or Cw*0202-encoded molecules, on KIR2DL2⁺ NK cell education, even though this has not yet been deter-

mined.²⁵ We showed that 8C11 recognizes KIR2DL1*003 allele-encoded molecules, which are the KIR most frequently detected in different populations.^{11,26}

From a clinical point of view, these newly characterized mAbs should represent new and interesting tools in numerous applications. NK cells present a phenotypic and functional diversity in distinct tissues, notably uterine NK cells versus blood NK cells. An investigation of KIR2DS1 expression on uterine NK cells using a combination of 8C11 and EB6 should be interesting because this activating KIR gene has been implicated in miscarriage and pre-eclampsia.^{27,28} KIR2DS2 expression has also been reported on CD4⁺ T cells in healthy individuals,²⁹ as well as in patients affected by rheumatoid arthritis³⁰ or acute coronary syndrome.³¹ In agreement with reports on the frequency of KIR⁺ T cells in healthy individuals,²⁹ we observed that the majority of T cells expressed KIR2DL2/2DL3 but that KIR2DL1⁺ and KIR2DS1⁺ T-cell frequencies were low. The combined use of 1F12 with GL183 would be useful to study the impact of KIR2DL2 and KIR2DS2 on T lymphocytes expressing only KIR2DL2 or KIR2DS2. Indeed, it has been recently shown that even though CD4⁺ T lymphocytes carry KIR2DL2, -2DL3 and -2DS2 transcripts, they selectively express inhibitory KIR2DL2/2DL3 or KIR2DS2 receptors.³² A number of associations have been identified between the risk of autoimmune diseases and the expression of activating KIR2DS1 and KIR2DS2.³³ This risk seems to be increased in the absence of ligands for the inhibitory counterparts, KIR2DL1 and KIR2DL2/2DL3, respectively. Studies of KIR genotypes in viral infections suggest a beneficial role of activating KIR genes but a deleterious impact of activating KIR genes in autoimmune diseases.^{33,34} A better knowledge of activating KIR expression and interactions would be essential to understand their contribution to regulating NK cell function. 8C11 and 1F12 constitute useful tools to investigate the functional contribution not only of activating KIR2DS1 and KIR2DS2 but also of inhibitory KIR2DL1 and KIR2DL2. The combined use of these new mAbs with commercial EB6 or GL183 mAbs should help to improve our knowledge of individual KIR contributions to NK cell biology.

Acknowledgements

We thank Damian Goodridge, Conexio Genomics, Western Australia for his help in building and optimizing KIR libraries for the use in ASSIGN software. We are grateful to Prof. Eric Vivier for the soluble KIR2DS2 protein, the RBL-DAP12⁺ KIR2DS2⁺ and untransfected RBL cell lines and the BW-KIR transduced cells expressing KIR2DS1, KIR2DS2, KIR2DS3, KIR2DS4, KIR2DL1, KIR2DL3 or KIR3DS1. This work was financially supported by the Etablissement Français du Sang (project

number 2004.03), Agence de la Biomédecine and the NAGMO association. M.M. is a PhD student supported by a grant from the Comité départemental de Loire-Atlantique de la Ligue contre le Cancer.

Disclosures

The authors declare no financial or commercial conflict of interest.

References

- 1 Vivier E, Anfossi N. Inhibitory NK-cell receptors on T cells: witness of the past, actors of the future. *Nat Rev Immunol* 2004; **4**:190–8.
- 2 Parham P. MHC class I molecules and KIRs in human history, health and survival. *Nat Rev Immunol* 2005; **5**:201–14.
- 3 Fourmentraux-Neves E, Jalil A, Da Rocha S, Pichon C, Chouaib S, Bismuth G, Caignard A. Two opposite signaling outputs are driven by the KIR2DL1 receptor in human CD4⁺ T cells. *Blood* 2008; **112**:2381–9.
- 4 Alter G, Rihn S, Streeck H *et al.* Ligand-independent exhaustion of killer immunoglobulin-like receptor-positive CD8⁺ T cells in human immunodeficiency virus type 1 infection. *J Virol* 2008; **82**:9668–77.
- 5 Wagtman N, Biassoni R, Cantoni C *et al.* Molecular clones of the p58 NK cell receptor reveal immunoglobulin-related molecules with diversity in both the extra- and intracellular domains. *Immunity* 1995; **2**:439–49.
- 6 Uhrberg M, Parham P, Wernet P. Definition of gene content for nine common group B haplotypes of the Caucasoïd population: KIR haplotypes contain between seven and eleven KIR genes. *Immunogenetics* 2002; **54**:221–9.
- 7 Moretta L, Moretta A. Killer immunoglobulin-like receptors. *Curr Opin Immunol* 2004; **16**:626–33.
- 8 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**:708–10.
- 9 Kollnberger S, Bird L, Sun MY, Retiere C, Braud VM, McMichael A, Bowness P. Cell-surface expression and immune receptor recognition of HLA-B27 homodimers. *Arthritis Rheum* 2002; **46**:2972–82.
- 10 Kollnberger S, Chan A, Sun MY, Chen LY, Wright C, di Gleria K, McMichael A, Bowness P. Interaction of HLA-B27 homodimers with KIR3DL1 and KIR3DL2, unlike HLA-B27 heterotrimers, is independent of the sequence of bound peptide. *Eur J Immunol* 2007; **37**:1313–22.
- 11 Hou LH, Steiner NK, Chen M, Belle I, Ng J, Hurley CK. KIR2DL1 allelic diversity: four new alleles characterized in a bone marrow transplant population and three families. *Tissue Antigens* 2007; **69**:250–4.
- 12 Moretta A, Sivori S, Vitale M, Pende D, Morelli L, Augugliaro R, Bottino C, Moretta L. Existence of both inhibitory (p58) and activating (p50) receptors for HLA-C molecules in human natural killer cells. *J Exp Med* 1995; **182**:875–84.
- 13 Stewart CA, Laugier-Anfossi F, Vely F *et al.* Recognition of peptide–MHC class I complexes by activating killer immunoglobulin-like receptors. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005; **102**:13224–9.

- 14 Saulquin X, Gastinel LN, Vivier E. Crystal structure of the human natural killer cell activating receptor KIR2DS2 (CD158). *J Exp Med* 2003; **197**:933–8.
- 15 Loirat MJ, Gourbil A, Frioux Y, Muller JY, Blanchard D. A murine monoclonal antibody directed against the Gerbich 3 blood group antigen. *Vox Sang* 1992; **62**:45–8.
- 16 Miller SA, Dykes DD, Polesky HF. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res* 1988; **16**:1215.
- 17 Marsh SG, Parham P, Dupont B *et al.* Killer-cell immunoglobulin-like receptor (KIR) nomenclature report, 2002. *Tissue Antigens* 2003; **62**:79–86.
- 18 Denis L, Sivula J, Gourraud PA *et al.* Genetic diversity of KIR natural killer cell markers in populations from France, Guadeloupe, Finland, Senegal and Reunion. *Tissue Antigens* 2005; **66**:267–76.
- 19 Shilling HG, Guethlein LA, Cheng NW, Gardiner CM, Rodriguez R, Tyan D, Parham P. Allelic polymorphism synergizes with variable gene content to individualize human KIR genotype. *J Immunol* 2002; **168**:2307–15.
- 20 Gagne K, Brizard G, Gueglio B *et al.* Relevance of KIR gene polymorphisms in bone marrow transplantation outcome. *Hum Immunol* 2002; **63**:271–80.
- 21 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* 2007; **179**:854–68.
- 22 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; **4**: 555–63.
- 23 Morvan M, David G, Sebille V *et al.* Autologous and allogeneic HLA KIR ligand environments and activating KIR control KIR NK-cell functions. *Eur J Immunol* 2008; **38**:3474–86.
- 24 Yawata M, Yawata N, Draghi M, Little AM, 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**:633–45.
- 25 Moesta AK, Norman PJ, 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**:3969–79.
- 26 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; **4**:383–91.
- 27 Sharkey AM, Gardner L, Hiby S *et al.* Killer Ig-like receptor expression in uterine NK cells is biased toward recognition of HLA-C and alters with gestational age. *J Immunol* 2008; **181**:39–46.
- 28 Trowsdale J, Moffett A. NK receptor interactions with MHC class I molecules in pregnancy. *Semin Immunol* 2008; **6**:317–20.
- 29 van Bergen J, Thompson A, van der Slik A, Ottenhoff TH, Gusselkloo J, Koning F. Phenotypic and functional characterization of CD4 T cells expressing killer Ig-like receptors. *J Immunol* 2004; **173**:6719–26.
- 30 Yen JH, Moore BE, Nakajima T, Scholl D, Schaid DJ, Weyand CM, Goronzy JJ. Major histocompatibility complex class I-recognizing receptors are disease risk genes in rheumatoid arthritis. *J Exp Med* 2001; **193**:1159–67.
- 31 Nakajima T, Goek O, Zhang X, Kopecky SL, Frye RL, Goronzy JJ, Weyand CM. *De novo* expression of killer immunoglobulin-like receptors and signaling proteins regulates the cytotoxic function of CD4 T cells in acute coronary syndromes. *Circ Res* 2003; **93**:106–13.
- 32 Remtoula N, Bensussan A, Marie-Cardine A. Cutting edge: selective expression of inhibitory or activating killer cell Ig-like receptors in circulating CD4⁺ T lymphocytes. *J Immunol* 2008; **180**:2767–71.
- 33 Boyton RJ, Altmann DM. Natural killer cells, killer immunoglobulin-like receptors and human leucocyte antigen class I in disease. *Clin Exp Immunol* 2007; **149**:1–8.
- 34 Vivier E, Romagne F. Good news, bad news for missing-self recognition by NK cells: autoimmune control but viral evasion. *Immunity* 2007; **26**:549–51.

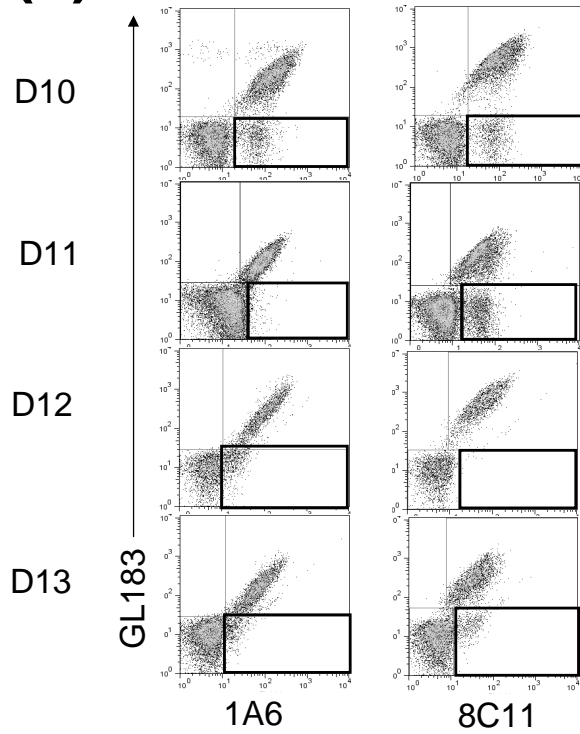
Supporting Information

Additional Supporting Information may be found in the online version of this article:

Fig. S1: 1A6 recognize some KIR2DL1 alleles encoded molecules. (a) PBMC were stained with CD3 and CD56 specific mAbs to target NK cells (CD3- CD56 +) and the combined use of 1A6 with GL183 and 8C11 with GL183 to target KIR2DL1 + KIR2DL2/2DL3/2DS1/2DS2- NK cells and KIR2DL1 + KIR2DL2/2DL3/2DS2- NK cell subsets respectively from 4 different KIR2DS1- KIR2DL1 + genotyped individuals (D10, 11, D12 and D13). (b) Codon at position 114 for all referenced KIR2DS2, KIR2DL2, KIR2DL3, KIR2DS1 and KIR2DL1 alleles. P114 is indicated in bold on grey background. (c) Electrophoretograms obtained for D10, D11, D12 and D13 individuals are presented above the aligned nucleotide sequences of KIR2DL1 alleles around the position 404. Polymorphic position is boxed on the electrophoretograms and indicated in bold on grey background in all KIR2DL1 allele sequences. D10, D11, D12 and D13 are representative of 3, 4, 2 and 2 respectively of 11 studied individuals.

Please note: Wiley-Blackwell is not responsible for the content or functionality of any supporting information supplied by the authors. Any queries (other than about missing material) should be directed to the corresponding author for the article.

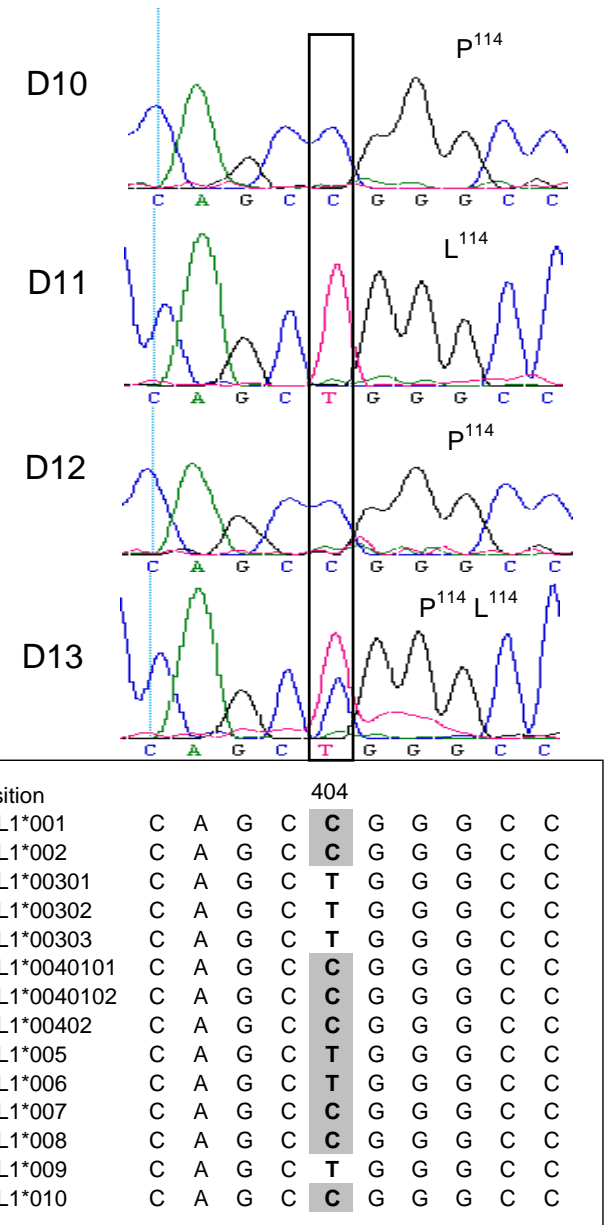
(a) KIR2DS1⁻ / 2DL1⁺ individuals



(b)

position	114						
2DS2*00101	S	A	Q	P	G	P	T
2DS2*00102	S	A	Q	P	G	P	T
2DS2*00103	S	A	Q	P	G	P	T
2DS2*002	S	A	Q	P	G	P	T
2DS2*003	S	A	Q	P	G	P	T
2DS2*004	S	A	Q	P	G	P	T
2DS2*005	S	A	Q	P	G	P	T
2DL2*001	S	A	Q	P	G	P	T
2DL2*002	S	A	Q	P	G	P	T
2DL2*003	S	A	Q	P	G	P	T
2DL2*004	S	A	Q	P	G	P	T
2DL2*005	S	A	Q	P	G	P	T
2DL3*001	S	A	Q	P	G	P	T
2DL3*002	S	A	Q	P	G	P	T
2DL3*003	S	A	Q	P	G	P	T
2DL3*004	S	A	Q	P	G	P	T
2DL3*005	S	A	Q	P	G	P	T
2DL3*006	S	A	Q	P	G	P	T
2DL3*007	S	A	Q	P	G	P	T
2DS1*001	S	A	Q	P	G	P	T
2DS1*002	S	A	Q	P	G	P	T
2DS1*003	S	A	Q	P	G	P	T
2DS1*004	S	A	Q	P	G	P	T
2DL1*001	S	A	Q	P	G	P	T
2DL1*002	S	A	Q	P	G	P	T
2DL1*00301	S	A	Q	L	G	P	T
2DL1*00302	S	A	Q	L	G	P	T
2DL1*00303	S	A	Q	L	G	P	T
2DL1*0040101	S	A	Q	P	G	P	T
2DL1*0040102	S	A	Q	P	G	P	T
2DL1*00402	S	A	Q	P	G	P	T
2DL1*005	S	A	Q	L	G	P	T
2DL1*006	S	A	Q	L	G	P	T
2DL1*007	S	A	Q	P	G	P	T
2DL1*008	S	A	Q	P	G	P	T
2DL1*009	S	A	Q	L	G	P	T
2DL1*010	S	A	Q	P	G	P	T

(c)



Supplementary Figure 1: 1A6 recognize some KIR2DL1 alleles encoded molecules. (a) PBMC were stained with CD3 and CD56 specific mAbs to target NK cells (CD3- CD56⁺) and the combined use of 1A6 with GL183 and 8C11 with GL183 to target KIR2DL1⁺ KIR2DL2/2DL3/2DS1/2DS2- NK cells and KIR2DL1⁺ KIR2DL2/2DL3/2DS2- NK cell subsets respectively from 4 different KIR2DS1⁻ KIR2DL1⁺ genotyped individuals (D10, 11, D12 and D13). (b) Codon at position 114 for all referenced KIR2DS2, KIR2DL2, KIR2DL3, KIR2DS1 and KIR2DL1 alleles. P114 is indicated in bold on grey background. (c) Electropherograms obtained for D10, D11, D12 and D13 individuals are presented above the aligned nucleotide sequences of KIR2DL1 alleles around the position 404. Polymorphic position is boxed on grey background in all KIR2DL1 allele sequences. D10, D11, D12 and D13 are representative of 3, 4, 2 and 2 respectively of 11 studied individuals.

RESULTATS

PROJET N°2 : FONCTION DES CELLULES NK KIR2DS1⁺

Etude de l'alloréactivité des cellules NK KIR2DS1⁺ en fonction du ligand C2 allogénique et autologue

« Autologous and allogeneic HLA KIR ligand environments and activating KIR control KIR NK-cell functions »

Maelig Morvan*, Gaëlle David*, Véronique Sébille, Aurore Perrin, Katia Gagne, Catherine Willem, Nolwenn Kerdudou, Laure Denis, Béatrice Clémenceau, Gilles Folléa, Jean-Denis Bignon et Christelle Retière

European Journal of Immunology (2008), 38(12) : 3474-3486

La régulation des fonctions des cellules NK par les récepteurs KIR activateurs est encore peu connue. Malgré une forte homologie entre les domaines extracellulaires du récepteur inhibiteur KIR2DL1 et de l'activateur KIR2DS1, le ligand du KIR2DS1 n'a été mis en évidence que récemment. Différentes études menées à partir de clones NK KIR2DS1⁺ semblaient montrer en effet que le KIR2DS1 est un récepteur activateur qui reconnaît les molécules HLA du groupe C2 (Chewning *et al.* 2007; Foley *et al.* 2008), comme pour le KIR2DL1. Alors que les cellules cibles C2⁺ sont protégées de la lyse par les cellules NK KIR2DL1⁺, ces études récentes montraient que les clones NK KIR2DS1⁺ étaient alloréactifs vis-à-vis de cellules cibles C2⁺. Toutefois, en l'absence d'anticorps capables de détecter l'expression du KIR2DS1 à la surface de ces clones, ce sont des clones présentant des transcrits KIR2DS1 qui ont été sélectionnés sans l'assurance que ce récepteur soit bien présent à la surface cellulaire. De plus, l'interaction directe entre le KIR2DS1 et les molécules HLA du groupe C2 n'avait été mise en évidence jusque là que sur des lignées B-EBV grâce à des tétramères (Stewart *et al.* 2005).

Aucun anticorps ne permettait donc jusqu'à présent d'identifier les cellules NK exprimant le KIR2DS1 à leur surface, mais l'utilisation de la combinaison des anticorps 8C11 et EB6 décrite précédemment nous a donné la possibilité de cibler les cellules NK KIR2DS1⁺ et d'étudier la fonctionnalité de ce récepteur activateur chez de nombreux individus selon l'environnement HLA autologue et allogénique. En effet, puisque les cellules NK KIR2DL1⁺ ne sont fonctionnelles que chez les individus qui possèdent le ligand du KIR2DL1 (Anfossi *et al.* 2006), il semblait intéressant de savoir dans un premier temps si les cellules NK KIR2DS1⁺ étaient bien fonctionnelles, et ensuite si cette fonctionnalité était dépendante ou non de l'environnement HLA autologue. L'utilisation de ces outils a permis d'étudier l'impact du KIR2DS1 sur les fonctions des cellules NK qui

l'expriment, à savoir la cytotoxicité grâce à la dégranulation (expression du CD107a), la production de cytokines (expression de l'IFN- γ) et la prolifération, et ce en fonction de la présence ou non de son ligand dans l'environnement HLA autologue et allogénique (C2⁺ ou C2⁻).

L'étude de la dégranulation et de la production d'IFN- γ a été menée par Gaëlle David. Les cellules NK KIR2DS1⁺ ont tout d'abord été triées grâce à un module de tri de cytomètre, puis stimulées pour les amplifier avant de les étudier. Le pourcentage de cellules NK KIR2DS1⁺ observé pour les PBMC de plusieurs individus était en effet trop faible. De plus, il était difficile de mettre en évidence leurs fonctions sur des cellules au repos. Comme la fonction inhibitrice de l'hétérodimère CD94/NKG2A pouvait interférer avec le rôle activateur du KIR2DS1, un anticorps spécifique du NKG2A a été ajouté afin de cibler uniquement les cellules KIR2DS1⁺, NKG2A⁻. La dégranulation et la production d'IFN- γ par ces cellules a été étudié vis-à-vis de cibles B-EBV déficientes en molécules HLA de classe I (lignée 221), ou exprimant uniquement des molécules HLA du groupe C1 (221-C1) ou du groupe C2 (221-C2) à leur surface. Nous avons ainsi pu observer que la dégranulation des cellules NK KIR2DS1⁺ NKG2A⁻ était nettement plus importante vis-à-vis d'une cible C2⁺ que C2⁻. Afin de vérifier que cette augmentation de la cytotoxicité était bien causée par l'interaction entre KIR2DS1 et son ligand C2, des expériences de blocage ont été réalisées grâce à l'anticorps EB6. L'ajout de l'anticorps EB6 inhibe la cytotoxicité vis-à-vis des cibles 221-C2 tout en augmentant celle vis-à-vis de la lignée 221, ce qui confirme la capacité de ces cellules NK KIR2DS1⁺ à dégranuler en présence de cibles C2⁺.

Ces expériences de cytotoxicité ont ensuite été répétées sur des PMBC issues d'autres individus qui ont été classés en deux catégories selon l'expression ou non du

ligand C2 dans leur environnement HLA autologue afin de savoir si, comme pour le KIR2DL1, celui-ci avait un impact sur la fonction des cellules NK KIR2DS1⁺. Les résultats obtenus sont particulièrement intéressants puisqu'ils montrent que les cellules NK KIR2DS1⁺ sont fonctionnelles et alloréactives vis-à-vis de cibles cellulaires C2⁺, et ce uniquement chez des individus C2⁻. Ces résultats ont été établis pour la dégranulation, mais également pour la production d'IFN- γ .

Peu d'études ont été menées sur la fonction de prolifération des cellules NK exprimant des récepteurs KIR. Lors des greffes de cellules souches hématopoïétiques les cellules NK sont les premières à réapparaître et elles prolifèrent de manière importante. Il paraissait donc judicieux de s'intéresser à cette fonction de prolifération des cellules NK. Pour cela, nous avons utilisé un modèle *in vitro* afin de limiter les nombreux paramètres associés à la greffe et de tester l'impact de différents environnements HLA allogéniques sur la prolifération des différentes sous-populations NK KIR. Ce modèle *in vitro* d'amplification des cellules NK avait été décrit précédemment (Clemenceau *et al.* 2006) et il semblait adapté pour déterminer si la prolifération des cellules NK EB6⁺ (KIR2DL1/S1) était modulée ou non par la présence ou l'absence dans l'environnement allogénique du ligand C2. Les PBMC d'individus dont le génotype KIR et HLA était connu ont donc été stimulées par deux lignées B-EBV, l'une C2⁻ et l'autre C2⁺. Nous nous sommes d'abord assurés que l'amplification des cellules NK totales était bien similaire dans les deux contextes en terme de nombre absolu et de fréquence. L'évolution des fréquences des cellules NK EB6⁺ de différentes catégories d'individus a ensuite été étudiée au cours du temps selon la présence ou non du gène KIR2DS1. Les études statistiques ont été réalisées par Véronique Sébille, une biostatisticienne, afin de déterminer si les différences observées étaient significatives à un point donné mais aussi dans le temps. En prenant en compte tous

les individus, nous avons observé que la fréquence des cellules NK EB6⁺ était significativement plus importante dans un environnement allogénique C2⁻ que C2⁺ après deux semaines d'amplification. Cette observation se confirme chez les individus KIR2DL1⁺ KIR2DS1⁻ où la fréquence des cellules NK EB6⁺ est toujours plus importante dans un environnement allogénique C2⁻ que C2⁺, et ce quelque soit le typage HLA autologue. Ce dernier paramètre est important puisque chez un individu C2⁻, les cellules NK KIR2DL1⁺ ne sont pas éduquées et donc non fonctionnelles. Ici, les cellules NK KIR2DL1⁺ semblent pourtant fonctionnelles puisqu'elles répondent à l'absence du ligand C2 en proliférant. Cette levée de l'absence d'éducation peut être expliquée par le contexte viral (EBV) ou cytokinique (IL-2).

Chez les individus KIR2DL1⁺ KIR2DS1⁺, il n'y a pas de différence de fréquence des cellules NK EB6⁺ entre les deux conditions, C2⁺ ou C2⁻. Ceci suggère un impact du KIR2DS1 sur la prolifération des cellules NK. C'est pourquoi nous avons ensuite étudié la prolifération de chacune des populations EB6⁺ dans ces différents contextes. Pour cibler la population KIR2DS1⁺, nous avons utilisé l'anticorps 8C11 disponible au laboratoire et qui a été décrit précédemment. Grâce à la combinaison des anticorps 8C11 et EB6, nous avons pu étudier l'évolution des fréquences des cellules NK KIR2DS1⁺ dans ces deux environnements allogéniques, C2⁺ et C2⁻. De plus, comme l'interaction KIR2DS1-C2 n'avait pu jusque là être mise en évidence qu'avec des lignées B-EBV, l'impact de l'EBV a été étudié en stimulant les PBMC à la fois par des lignées B-EBV et par les lymphocytes B correspondants. Les individus ont également été classés selon la présence ou non du ligand HLA-C2 au niveau autologue afin d'étudier son impact sur la fonction de prolifération. Les résultats obtenus confirment les données obtenues pour les fonctions de dégranulation et de production de cytokines. En effet, alors qu'aucune différence de

fréquence des cellules NK KIR2DS1⁺ n'est observée chez les donneurs C2⁺ après deux semaines d'amplification, cette fréquence est plus importante dans un environnement C2⁺ que C2⁻ chez les donneurs C2⁻, et ce quel que soit le type de cellules cibles utilisées (B-EBV ou lymphocytes B non transformés).

Ce travail a donc permis de mettre en évidence l'impact du récepteur activateur KIR2DS1 sur les fonctions des cellules NK. Ainsi, les cellules NK KIR2DS1⁺ sont alloréactives vis-à-vis de cellules cibles qui présentent un ligand C2. Stimulées par des lignées cellulaires C2⁺, les cellules NK KIR2DS1⁺ sont cytotoxiques et produisent des cytokines. En termes de prolifération, cela se traduit par une fréquence plus importante de cellules NK KIR2DS1⁺ après amplification par des lignées C2⁺ que par des lignées C2⁻. Toutefois, ces cellules NK KIR2DS1⁺ ne sont alloréactives vis-à-vis de cellules cibles C2⁺ que chez des individus C2⁻. Les individus C2⁺ semblent ainsi protégés d'une potentielle autoréactivité de leurs cellules NK KIR2DS1⁺. Nos données montrent donc pour la première fois que chez les individus qui possèdent le KIR2DL1 et le KIR2DS1, seule la population NK KIR2DL1⁺ est fonctionnelle chez les individus C2⁺ alors que seule la population NK KIR2DS1⁺ est fonctionnelle chez les individus C2⁻.

Autologous and allogeneic HLA KIR ligand environments and activating KIR control KIR NK-cell functions

Maelig Morvan^{*1}, Gaëlle David^{*1}, Véronique Sébille², Aurore Perrin¹, Katia Gagne¹, Catherine Willem¹, Nolwenn Kerdudou¹, Laure Denis¹, Béatrice Clémenceau³, Gilles Folléa³, Jean-Denis Bignon¹ and Christelle Retière¹

¹ Etablissement Français du Sang, Université de Nantes, Nantes Atlantique Universités, Immunovirologie et polymorphisme génétique, EA4271, Nantes, France

² Université de Nantes, Nantes Atlantique Universités, Biostatistique, recherche clinique et mesures subjectives en santé, EA4275, UFR Sciences Pharmaceutiques, Nantes, France

³ INSERM, Université de Nantes, Nantes Atlantique Universités, Centre de recherche en cancérologie, UMR892, UFR Médecine et Techniques médicales, Nantes, France

NK-cell function is regulated by a balance between inhibitory and activating killer cell immunoglobulin-like receptors (KIR) that specifically recognize HLA class I molecules. Using KIR-specific mAb to discriminate between KIR2DS1 and KIR2DL1 receptors, we show that KIR2DS1⁺ NK cells are C2-alloreactive only from C2⁻ individuals. Moreover, using an *in vitro* model of NK-cell expansion, we show here that the frequency of KIR2DL1⁺ NK cells is significantly higher in the absence of C2 ligand on stimulator EBV-B cells than in its presence. This observation was made regardless of the presence or absence of the autologous C2 ligand, suggesting that the C2⁻ EBV-B stimulator cells used in this *in vitro* model could activate unlicensed KIR2DL1⁺ NK cells. In the case of KIR2DL1⁺/S1⁺ genotyped individuals, KIR2DS1⁺ NK-cell frequency was increased after stimulation with C2⁺ compared with C2⁻ stimulator B cells, but only from C2⁻ individuals. Altogether, these data highlight the C2 alloreactivity of KIR2DS1⁺ NK cells that is only observed in C2⁻ individuals. These results provide new insights into the way in which NK KIR cell expansion might be regulated in an allogeneic environment.

Key words: HLA class I molecules · Killer cell immunoglobulin-like receptors · NK cells · NK repertoire



Supporting Information available online

Introduction

The discovery of NK-cell alloreactivity has provided new insight into hematopoietic stem cell transplantation (HSCT) [1–3]. This

is due to the potential cytotoxic activity of these cells and their ability to eliminate recipient leukemia cells, thereby limiting graft rejection while protecting against GVH disease. NK cells express inhibitory receptors specific for self-HLA class I molecules and can therefore detect the difference and/or loss of HLA class I molecules that characterize allogeneic and tumoral cells,

Correspondence: Dr. Christelle Retière
e-mail: christelle.retiere@efs.sante.fr

* These authors contributed equally to this work.

respectively [4]. This “missing self” recognition is ensured by three types of NK-cell receptors: immunoglobulin-like transcripts, C-type lectin-like molecules (CD94/NKG2) and killer cell immunoglobulin-like receptors (KIR). Immunoglobulin-like transcript 2 interacts with the mostly conserved β_2 -microglobulin and $\alpha 3$ domains of HLA class I molecules and consequently recognizes all HLA class I molecules (HLA-A, -B, -C and -G) [5]. The CD94/NKG2A receptor displays broad HLA class I specificity, by recognizing leader peptides of most HLA-A, -B, -C and -G molecules presented by the ubiquitous HLA-E molecule [6]. In addition, four different inhibitory KIR seem to play a major role in alloreactivity due to a more specific recognition of different HLA class I-encoded ligands. HLA-C allotypes with asparagine at position 80 (C1 ligands) are recognized by KIR2DL2/3, HLA-C allotypes with lysine at position 80 (C2 ligands) are recognized by KIR2DL1, HLA-A and -B allotypes with a polymorphic sequence motif at positions 77–83 (Bw4 motif) are targeted by KIR3DL1, and HLA-A3 and -A11 are recognized by KIR3DL2 [7]. Importantly, this NK-cell cytotoxic activity is governed by a balance between inhibitory and activating KIR. However, although the ligands and functions of inhibitory KIR are well documented, this is not the case for activating KIR. Thus, regulation of KIR NK-cell functions by activating signals remains unclear. Although no activating KIR2DS1-specific mAb lead to identify its functional surface expression, different studies from KIR2DS1 transcript⁺ NK clones led to show up that KIR2DS1 is an activating receptor recognizing C2 ligand [8–11]. Inhibitory KIR differ from activating KIR mainly in their intracytoplasmic domain. Inhibitory KIR bear immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif responsible for transducing the inhibitory signal. Activating KIR on the other hand are associated with the signal transduction protein DAP12, which contains the immunoreceptor tyrosine-based activation motif [12, 13]. NK-cell subsets recognizing self-HLA class I molecules can be distinguished based on differences in expression of all of these KIR [14].

The independent segregation of HLA and KIR genes raises the possibility that any given individual can express only the receptor or the corresponding ligand, or both the receptor and the ligand [15]. However, in mice, NK-cell education seems to be dependent on the MHC environment, given that NK cells acquire functional competence through “licensing” by self-MHC molecules [16]. The mechanism of “licensing” could involve a positive role for MHC-specific inhibitory receptors and could require the cytoplasmic inhibitory motif. Thus, only NK cells expressing inhibitory receptors specific for a self-MHC molecule undergo full functional maturation. In humans, a similar process of “NK licensing” by self-HLA molecules has been recently demonstrated and KIR/self-HLA class I molecule interactions play a key role in this process [17]. However, in the context of HSCT, there is limited information on the impact of donor allogeneic HLA class I molecules on KIR expression by the recipient NK-cell repertoire. Moreover, although numerous studies have underlined the emerging implication of different activating KIR genes in HSCT [18–23],

the question concerning the role played by activating KIR has yet to be answered.

In the present paper, we defined the conditions whereby KIR2DS1⁺ NK cells could be functional using a combination of KIR-specific mAb targeting KIR2DS1 expression on NK cells. Functional assays of degranulation and IFN- γ production showed that KIR2DS1⁺ NK cells are C2 alloreactive only from C2⁻ individuals. Because both KIR2DL1 and KIR2DS1 receptors recognize C2 ligand but they have opposing signaling requirements, we sought to determine how allogeneic C2 ligands can modulate the expansion of the KIR2DL1/S1 NK-cell pool. For this, we used an *in vitro* culture where NK cells were amplified over a period of 2 wk. In this system, PBMC from different KIR and HLA-genotyped individuals were stimulated with C2⁻ or C2⁺ allogeneic B-cell lines. As determined using EBV-transformed B-cell lines, the frequency of KIR2DL1⁺ NK cells from KIR2DL1⁺/S1⁻ genotyped individuals was significantly higher in the absence of C2 ligand on stimulator EBV-B cells in comparison to the C2⁺ counterparts. This observation was made regardless of the presence or absence of C2 ligand expression by the individual, suggesting that in this *in vitro* model, C2⁻ EBV-B stimulator cells can activate unlicensed KIR2DL1⁺ NK cells from C2⁻ individuals. In the case of KIR2DL1⁺/S1⁺ genotyped individuals, no difference in KIR2DL1/S1 NK-cell pool frequency was observed between C2⁻ or C2⁺ EBV-B stimulator cell environments. However, when EBV⁻ B cells were used as stimulators, we found that the KIR2DL1⁻/S1⁺ NK-cell subset expanded after stimulation with C2⁺ B cells, but only from C2⁻ individuals. All these data contribute to a better understanding of factors regulating KIR NK-cell alloreactivity, which bring into play the allogeneic HLA environment, the education process *via* inhibitory KIR–HLA interactions and the activating KIR.

Results

KIR2DS1⁺ NK cells are C2 alloreactive

In an attempt to determine whether KIR2DS1⁺ NK cells were cytotoxic, we performed degranulation experiments (CD107a) using four-color flow cytometry. To this end and to precisely characterize KIR2DS1⁺ NK cells, we used a KIR2DL1/2/3 and KIR2DS2-specific mAb (8C11) recently generated in our laboratory, in combination with the KIR2DL1/S1-specific EB6 mAb to target KIR2DS1 expression (8C11⁻ B6⁺) by a specific pattern of binding (Supporting Information Fig. 1). Using this mAb combination, KIR2DS1⁺ (8C11⁻ B6⁺) NK cells were characterized by the absence of KIR2DL1, 2DL2, 2DL3 and 2DS2 expression, ruling out a possible modulation of NK-cell function by these HLA-Cw-specific KIR. The frequency of the KIR2DL1/2/3/2DS2⁻KIR2DS1⁺ NK-cell subset is generally low, as illustrated in Fig. 1A for the individual D1 (2.7%). Thus, for the subsequent functional studies, we sorted this KIR2DS1⁺ NK-cell population from CD3 depleted PBMC and amplified it *in vitro* using a mix of

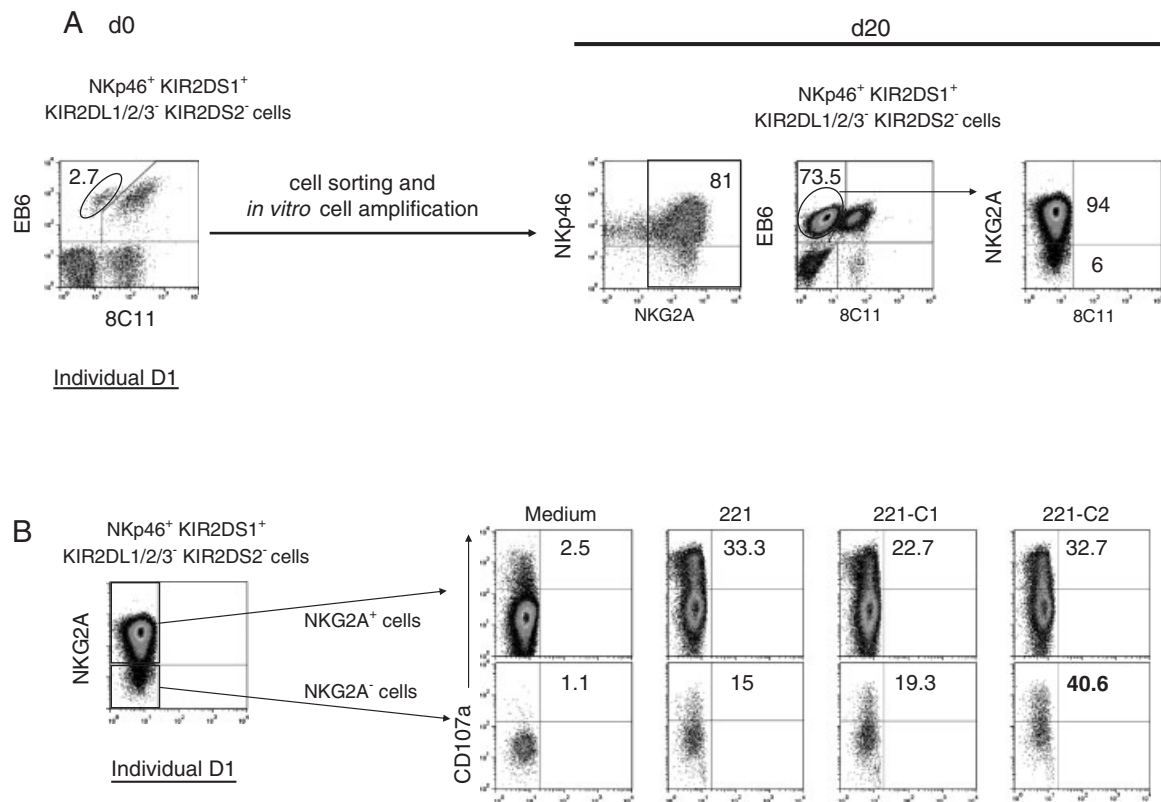


Figure 1. KIR2DS1⁺ NK cells are C2 alloreactive. (A) After depletion of CD3⁺ cells from PBMC, KIR2DS1⁺KIR2DL1/2/3⁻2DS2⁻ NK cells (NKp46⁺8C11⁻EB6⁺) were cell sorted (2.7% of the population; d0) and amplified *in vitro* with irradiated allogeneic PBMC and EBV-B cells as feeders. After 3 wk of stimulation (d20), the phenotype of these sorted and stimulated cells was assessed by flow cytometry and is illustrated for 1 representative KIR2DS1⁺ genotyped individual (D1) out of 12 studied individuals. Eighty-one percent of these amplified cells are NKp46⁺NKG2A⁺ (first dot plot) and 73.5% of the NK cells (i.e. NKp46⁺ cells) are KIR2DS1⁺KIR2DL1/2/3⁻2DS2⁻ (8C11⁻EB6⁺, second dot plot). The last dot plot shows that the majority of these amplified KIR2DS1⁺KIR2DL1/2/3⁻2DS2⁻ NK cells expressed the inhibitory NKG2A marker (8C11⁻NKG2A⁺), with only 6% not expressing the NKG2A molecule (8C11⁻NKG2A⁻). (B) Functional assays were performed on NKG2A⁻ and NKG2A⁺ gated cell populations. Results of CD107a mobilization obtained for a representative KIR2DS1⁺ genotyped individual (D1) were presented after stimulation of the NKG2A⁻/NKG2A⁺ gated KIR2DL1/2/3⁻2DS2⁻ KIR2DS1⁺ NK cells with 221, 221-C1 and 221-C2 cell lines in parallel to the control (medium). Percentages of CD107a⁺ NK cells observed by flow cytometry are indicated on the density plots for all conditions of stimulation. A representative experiment of 12 performed with 11 other individuals is shown.

irradiated allogeneic feeders. Following stimulation, a majority of NK cells characterized as expressing the specific NK-cell marker, NKp46⁺ [24], expressed the inhibitory NKG2A marker (81%) at day 20 (Fig. 1A). However, within KIR2DS1⁺ NK cells (73.5%), some of them (6%) did not express NKG2A, as illustrated in the last density plot (Fig. 1A). The CD94/NKG2A heterodimer expressed on NK cells is an inhibitory receptor specific for the non-classical HLA-E molecule expressed by almost all cells that display classical HLA class I molecules. Its expression on KIR2DS1⁺ NK cells may inhibit the triggering signal of KIR2DS1 engagement. We thus assessed the function of KIR2DL1/2/3⁻2DS2⁻KIR2DS1⁺ NK cells expressing or lacking this inhibitory NKG2A marker. As illustrated for the KIR2DS1⁺ individual D1 (Fig. 1B), the frequency of CD107a⁺NKG2A⁺KIR2DS1⁺ NK cells (33.3%) is higher than the frequency of CD107a⁺NKG2A⁻KIR2DS1⁺ NK cells (15%) after stimulation with HLA class I-deficient 771.221 (221) cells. This higher frequency of CD107a⁺NKG2A⁺KIR2DS1⁺ NK cells after 221 cell stimulation

can be explained by the absence of CD94/NKG2A engagement with its ligand HLA-E, which is absent from the membrane of 221 target cells. When using C1-transfected 221 (221-C1) cells that express HLA-E, the engagement of CD94/NKG2A expressed on NKG2A⁺KIR2DS1⁺ NK cells contributed to the protection of HLA-E⁺ 221-C1 target cells (22.7%). On the contrary, after stimulation with C2-transfected 221 (221-C2) cells that expresses HLA-E, the percentage of CD107a⁺KIR2DS1⁺NKG2A⁺ NK cells was similar to those observed with 221 cells (32.7 and 33.3%, respectively) (Fig. 1B). In parallel, the percentage of the NKG2A⁻KIR2DS1⁺ NK-cell populations expressing CD107a was considerably greater (40.6%) after stimulation with 221-C2 cells in comparison to 221 (15%) or 221-C1 cells (19.3%), suggesting that a triggering of KIR2DS1 by C2 happened. We analyzed the functional response of NKG2A⁻KIR2DL1/2/3⁻2DS2⁻ KIR2DS1⁺ NK cells, phenotypically characterized (Fig. 2A), in presence and absence of KIR2DL1/S1-specific EB6 mAb (Fig. 2B). EB6 mAb inhibited CD107a mobilization on KIR2DS1⁺ NK cells against

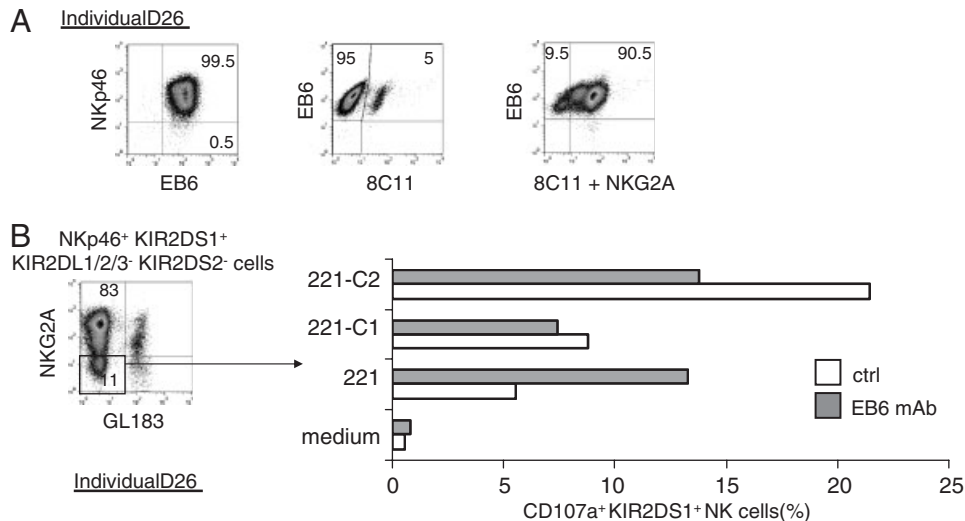


Figure 2. KIR2DL1/S1-specific EB6 mAb inhibited the cytolytic activity of KIR2DS1⁺ NK cells against C2 target cells but triggered their cytolytic activity against 221 cells. (A) After depletion of CD3⁺ cells from PBMC, KIR2DS1⁺KIR2DL1/2/3⁻2DS2⁻ NK cells (NKp46⁺8C11⁻EB6⁺) were cell sorted and amplified *in vitro* with irradiated allogeneic PBMC and EBV-B cells as feeders. The phenotype of the sorted, stimulated cells after 3 wk of coculture is illustrated for a representative KIR2DS1⁺ genotyped individual (D26) out of three studied individuals. Almost all of stimulated cells were NKp46⁺EB6⁺ (first dot plot) and 95% of the NK cells (i.e. NKp46⁺ cells) were 8C11⁺EB6⁺ (second dot plot) showing that KIR2DS1⁺KIR2DL1/2/3⁻2DS2⁻ NK cells (NKp46⁺8C11⁺EB6⁺) were specifically amplified. The low proportion of KIR2DS1⁺ NK cells stained by the 8C11 mAb (around 5% of EB6⁺ NK cells) were GL183⁺ (data not shown). Although the majority of amplified KIR2DS1⁺KIR2DL1/2/3⁻2DS2⁻ NK cells expressed the inhibitory NKG2A marker (third dot plot), 9.5% did not express NKG2A. (B) The functional assays were performed on the NKp46⁺GL183⁻NKG2A⁻ gated cell population. Results of CD107a mobilization obtained for a representative KIR2DS1⁺ genotyped individual (D26) were presented after stimulation with 221, 221-C1 and 221-C2 cell lines in parallel to the control (medium). The bars indicate the percentages of CD107a⁺NKG2A⁻KIR2DL1/2/3⁻2DS2⁻KIR2DS1⁺ NK cells observed by flow cytometry. KIR2DS1 receptor was blocked with EB6 mAb (grey bar) and isotype control (open bar). A representative experiment of three performed with two other C1C1 individuals (D2 and D26) is shown.

221-C2 target cells. However, EB6 mAb triggered cytolytic activity of KIR2DS1⁺ NK cells against 221 cells. These results demonstrate the functional ability of KIR2DS1⁺ NK cells (either NKG2A⁺ or NKG2A⁻) to degranulate when challenged with C2⁺ target cells. However, it is in the absence of NKG2A expression that we highlighted the C2 alloreactivity of KIR2DS1⁺ NK cells.

C2 alloreactive KIR2DS1⁺ NK cells are functional only from C2⁻ individuals

In order to determine whether the functional capacities of the KIR2DS1⁺ NK cells are dependent or not on autologous HLA ligand (C2) and the autologous KIR2DL1 gene, we assessed CD107a expression and IFN- γ production (Fig. 3A) by the sorted and amplified KIR2DS1⁺KIR2DL1/2/3/2DS2⁻ NK cells that did not express NKG2A from four C2⁻KIR2DL1⁺ individuals (D1–D4), one C2⁻KIR2DL1⁻ individual (D5) and seven C2⁺KIR2DL1⁺ individuals (five C2C2 and two C1C2 individuals) (D7–D10 and D29–D31). The HLA and KIR genotypes of these 12 individuals are presented in Table 1. The results of CD107a expression and IFN- γ production are presented for the C2⁻KIR2DL1⁺ individual D3 (Fig. 3A), for the C2⁻KIR2DL1⁻ individual D5 (Fig. 3B) and for the C2⁺KIR2DL1⁺ individual D10 (Fig. 3C). Interestingly, only C2⁻ individuals harboring the KIR2DL1 gene (D1–D4) expressed CD107a marker (Fig. 3A

and D) and produced IFN- γ (Fig. 3A and E) when challenged with 221-C2 cell line as previously observed for both individuals D1 and D26 who were C2⁻KIR2DL1⁺ (Figs. 1B and 2). Indeed, the functional experiments performed in the case of a unique C2⁻KIR2DL1⁻ individual (D5) (Fig. 3B) or from seven C2⁺ individuals (D7–D10 and D29–D31) illustrated by D10 (Fig. 3C) revealed a low percentage of cells expressing CD107a (Fig. 3D) or producing IFN- γ (Fig. 3E) after stimulation with 221-C2 in comparison to 221 or 221-C1 cell lines. Freshly isolated C2⁻NKG2A⁻KIR2DL1/2/3/2DS2⁻KIR2DS1⁺ NK cells did not respond to 221-C2 cells (data not shown), suggesting that these cells have to be previously activated to lyse C2⁺ target cells. NKG2A⁻KIR2DL1/2/3/2DS2⁻KIR2DS1⁺ NK cells from C2⁻ and C2⁺ individuals expressed similarly CD107a molecule in response to PMA and ionomycin stimulation (data not shown). To conclude, C2 alloreactive KIR2DS1⁺ NK cells are functional in terms of degranulation and IFN- γ production, but only when they are derived from C2⁻ individuals.

Impact of allogeneic C2 ligand expression on the evolution of the KIR2DL1/S1 NK-cell expansion

Both inhibitory KIR2DL1 and activating KIR2DS1 receptors recognize HLA-Cw molecules of the C2 (C2) group [7]. It has

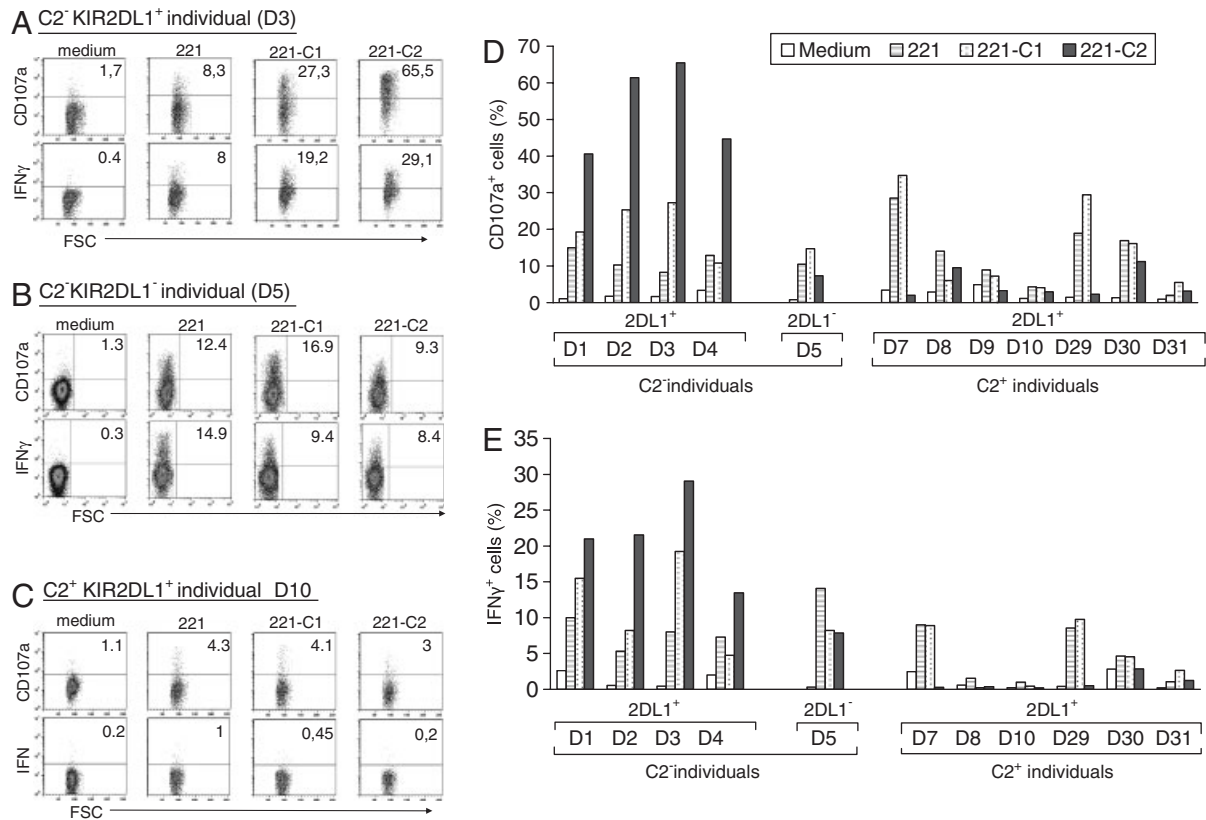


Figure 3. C2 alloreactive KIR2DS1⁺ NK cells are functional only from C2⁻ individuals. The function of the NKG2A⁻ KIR2DL1/2/3⁻ 2DS2⁻ KIR2DS1⁺ NK-cell population obtained after cell sorting and cell amplification (as described in Fig. 1A and Materials and methods) was assessed in terms of IFN- γ production and degranulation capacity from five C2⁻ (C1C1) (D1–D5) and seven C2⁺ individuals (five C2C2 and two C1C2) (D7–D10 and D29–D31) individuals. CD107a expression and IFN- γ production were defined by flow cytometry on gated NKG2A⁻ KIR2DL1/2/3⁻ 2DS2⁻ KIR2DS1⁺ NK-cell population after stimulation with 221, 221-C1 and 221-C2 in parallel to the control (medium). (A) Density plots obtained for a representative C2⁻ KIR2DL1⁺ individual (D3), (B) C2⁻ KIR2DL1⁺ individual (D5) and (C) C2⁺ KIR2DL1⁺ individual (D10) illustrating CD107a expression and IFN- γ production for which percentages were indicated on top of the density plots. (D) CD107a expression or (E) IFN- γ production observed for four C2⁻ KIR2DL1⁺ individuals (D1–D4), one C2⁻ KIR2DL1⁻ individual (D5) and seven C2⁺ KIR2DL1⁺ individuals (D7–D10 and D29–D31) are presented.

been shown that KIR2DL1 binds the C2 ligand, inhibiting freshly isolated KIR2DL1⁺ NK-cell cytotoxicity and cytokine production only from C2⁺ individuals [17]. In contrast, we demonstrated in this study that KIR2DS1 binds C2, triggering the same cellular functions of KIR2DS1⁺ NK cells, but only from C2⁻ individuals. Given that C2 is the ligand of KIR2DL1 and KIR2DS1 receptors and that they have opposing signaling requirements, we next investigated the impact of allogeneic C2 ligand on the evolution of the KIR2DL1/S1 NK-cell pool frequency using an *in vitro* allogeneic model of NK-cell expansion. We studied NK-cell amplification by stimulating PBMC from selected individuals with two different irradiated allogeneic C2⁻ or C2⁺ EBV-B-cell lines: FEB (C2⁻) and DAX (C2⁺). The frequency of CD3⁻CD56⁺ NK cells and of EB6⁺ (KIR2DL1/S1) CD3⁻CD56⁺ NK cells was determined by flow cytometry at days 0, 6, 9 and 16 following stimulation by either C2⁻ (FEB) or C2⁺ (DAX) EBV-B-cell lines. The study was carried out using PBMC from 16 healthy individuals (D14–D29), the HLA and KIR genotypes of whom are presented in Table 1.

The absolute cell numbers ($\times 10^6$ cells), determined at days 0, 6, 9 and 16 after PBMC stimulation by either FEB (C2⁻) or DAX (C2⁺) EBV-B-cell lines, demonstrate a cellular amplification in this model of around 8-fold for total cells and around 80-fold for NK cells, as illustrated for a representative individual D23 (Fig. 4A). The absolute number and the percentages of EB6⁺ NK cells observed in FEB (C2⁻) and DAX (C2⁺) stimulating environments (Fig. 4B) for D23 show that although the frequency of EB6⁺ NK cells did not increase at day 6 with FEB and DAX EBV-B-cell lines, the absolute number of EB6⁺ NK cells increased in both stimulating conditions. No contraction of the EB6⁺ NK-cell subset was observed. All KIR NK-cell subsets amplified in this model but with different magnitude and no contraction of any KIR NK-cell subset was observed. After 2 wk of culture, the majority (>60%) of the amplified cells were NK (CD3⁻ CD56⁺) cells independently of C2⁻ or C2⁺ EBV-B-cell stimulation. Figure 4C illustrates the evolution of NK-cell frequency (8% at day 0 and 84.7% at day 16) from PBMC of the individual D23 stimulated with the C2⁻ EBV-B-cell line. Even though absolute number of NK cells can be a little bit different after FEB and DAX stimulations

Table 1. The HLA and KIR genotypes of individuals included in the study

	HLA typing						HLA-Cw KIR ligands	KIR typing													
	A*	A*	B*	B*	Cw*	Cw*		2DL1	2DL2	2DL3	2DL4	2DL5	3DL1	3DL2	3DL3	2DS1	2DS2	2DS3	2DS4	2DS5	3DS1
D1	01		08		07		C1C1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	
D2	31	68	18	39	07	12	C1C1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	
D3	24	68	18	27	01	12	C1C1	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	
D4	25	30	39	18	07	12	C1C1	+	-	+	+	+	+	Null ^{a)}	+	+	-	-	-	+	+
D5	02	33	14	15	03	08	C1C1	-	+	-	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	
D6	01	29	08	44	07	16	C1C1	-	+	+	+	-	+	+	+	-	+	-	+	-	-
D7	02	02	40	51	02	04	C2C2	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+	
D8	02	02	18	35	04	05	C2C2	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+	
D9	24	34	14	35	04	15	C2C2	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	
D10	01	32	07	37	06	15	C2C2	+	-	+	+	+	-	+	+	+	-	-	-	+	+
D11	24		07	15	02		C2C2	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+	
D12	11	68	35	44	04	05	C2C2	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	
D13	03	24	18	35	04	05	C2C2	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+	-	-	-	-
D14	03	24	07	14	07	08	C1C1	+	-	+	+	-	+	+	+	-	-	+	-	-	-
D15	02	33	52	57	07	12	C1C1	+	-	+	+	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-
D16	02	24	15		03		C1C1	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+	-	-	-	-
D17	01	02	07	08	07		C1C1	+	-	+	+	-	+	+	+	-	-	-	+	-	-
D18	01	02	40	15	03		C1C1	+	-	+	+	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-
D19	03	68	35	15	03	06	C1C2	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	-
D20	02	24	07	40	02	07	C2C1	+	-	+	+	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-
D21	02	03	15	49	04	07	C2C1	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+	-	+	-	-
D22	11	23	35	44	04		C2C2	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+	-	+	-	-
D23	32	23	45	41	06	17	C2C2	+	-	+	+	-	Null ^{a)}	+	+	-	-	-	-	-	-
D24	02	33	49	58	03	07	C1C1	+	+	-	+	+	Null ^{a)}	+	+	+	+	+	-	+	+
D25	03		08	18	07		C1C1	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	
D26	01	24	08	39	07		C1C1	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+
D27	24		18	44	07	16	C1C1	-	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+
D28	02		39	44	05	07	C2C1	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+
D29	02	11	40	44	02	05	C2C2	+	+	-	+	+	Null ^{a)}	+	+	+	+	+	-	+	+
D30	01	33	14	37	08	06	C1C2	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	
D31	29	68	14	45	06	08	C2C1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	

^{a)} The KIR3DL1 gene was detected by PCR but the cell surface expression of KIR3DL1 receptor was not detected by flow cytometry.

(Fig. 4A), the percentage of NK cells was always similar for all studied individuals as illustrated for individual D23 in Fig. 4C after stimulation with FEB (C2⁻) and DAX (C2⁺) EBV-B-cell lines. Consequently, by comparing the evolution of EB6⁺ NK-cell frequency after FEB (C2⁻) and DAX (C2⁺) EBV-B-cell line stimulations, a bias induced by the different amplifications of total cells is not possible. Next, we then checked if EB6⁺ NK-cell frequency was increased to the same extent with both FEB (C2⁻) and (C2⁺) EBV-B stimulator cells.

We found that EB6⁺ (KIR2DL1/S1) cell frequency was significantly higher ($p = 0.038$) after stimulation of PBMC with the C2⁻ EBV-B-cell line compared with stimulation with the C2⁺ EBV-B-cell line (Fig. 4D). To further confirm the impact of C2 expression by stimulator cells, the frequency of the EB6⁺ NK cells was monitored after stimulation by the autologous EBV-B-cell line and by the HLA class I-deficient 221 cell line for five and nine

individuals respectively, in parallel to stimulation with the FEB (C2⁻) and DAX (C2⁺) EBV-B-cell lines. As illustrated for the individual D17 (Fig. 4E), the KIR2DL1⁺ NK-cell frequency was higher when PBMC were stimulated with C2⁻ EBV-B-cell lines (C2⁻ FEB, C2⁻ autologous EBV-B-cell line and 221 EBV-B-cell line) in comparison with the C2⁺ DAX EBV-B-cell line. We observed that the frequency of the KIR2DL1/S1 NK-cell pool was higher after 16 days of culture with C2⁻ than with C2⁺ EBV-B-cell stimulation.

Unlicensed KIR2DL1⁺ NK cells respond to the absence of C2 ligand on EBV-B stimulator cells

In order to evaluate the impact of the KIR2DS1 gene on the expansion of the EB6⁺ NK cells observed in C2⁻ and C2⁺

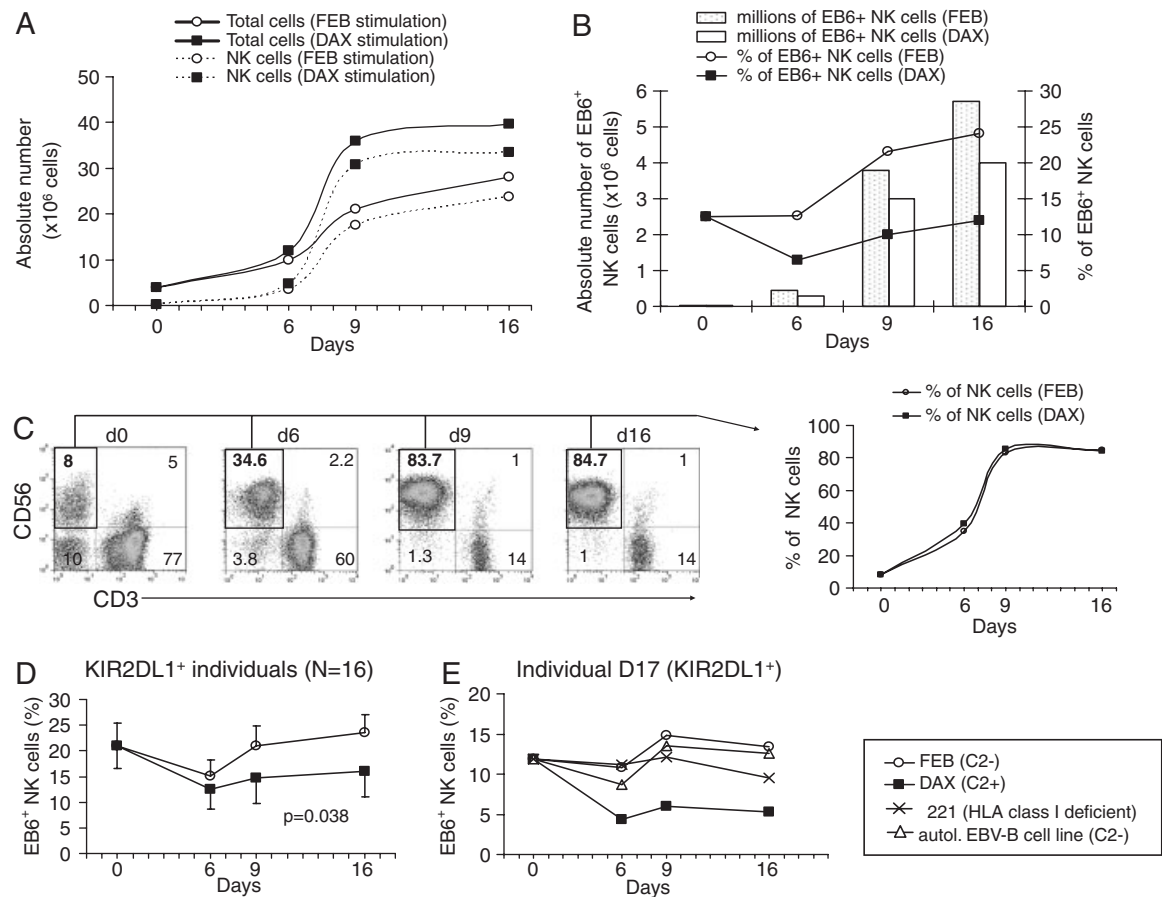


Figure 4. Impact of allogeneic C2 ligand expression on the evolution of the KIR2DL1/S1 NK-cell expansion. Frequencies of CD3⁺CD56⁺ cells, described as NK cells, and EB6⁺ NK cells were determined for 16 individuals (D14–D29) by flow cytometry at days 0, 6, 9 and 16 following stimulation with the irradiated C2⁻ FEB or C2⁺ DAX EBV-B-cell line as described in “the Materials and methods”. (A) Shown are absolute numbers of total cells and NK cells ($\times 10^6$ cells), (B) absolute numbers ($\times 10^6$ cells) and percentages of EB6⁺ NK cells, (C) density plots presenting percentages of CD3⁺CD56⁺ NK cells obtained with C2⁻ FEB EBV-B-cell lines and graph representing percentages of NK cells obtained in C2⁻ FEB and C2⁺ DAX EBV-B-cell cocultures. (D) EB6⁺ NK-cell frequency at different time points after PBMC culture with the C2⁺ DAX EBV-B-cell line (■) or the C2⁻ FEB EBV-B-cell line (○) from all individuals ($n = 16$; D14–D29). Means and SD for 16 experiments. $p = 0.038$. Repeated measures ANOVA using linear mixed models were used. (E) PBMC from a C2⁻ KIR2DL1⁺ individual (D17) were stimulated with the C2⁻ autologous EBV-B-cell line (Δ), the HLA class I-deficient 221 cell line (\times), the C2⁻ FEB (○) and C2⁺ DAX EBV-B (■) cell lines. Results are representative of five experiments performed for five individuals with autologous EBV-B-cell line and nine experiments performed for nine individuals with the 221 cell line in parallel to the stimulation with the C2⁻ FEB and C2⁺ DAX EBV-B-cell lines.

stimulatory environments, KIR2DS1⁻ ($n = 10$; D14–D23) and KIR2DS1⁺ individuals ($n = 6$; D24–D29) were analyzed comparatively. In the KIR2DS1⁻ individual group in which only the KIR2DL1 receptor was expressed, the frequency of KIR2DL1⁺ NK cells was significantly higher after stimulation with C2⁻ EBV-B-cell stimulators than the C2⁺ counterparts ($p < 0.001$) (Fig. 5A). Regardless of whether the KIR2DL1⁺/S1⁻ individuals expressed ($n = 5$; D19–D23) (Fig. 5B) or not ($n = 5$; D14–D18) (Fig. 5C) the C2 ligand, the KIR2DL1⁺ NK-cell frequency was higher after coculture with C2⁻ than with C2⁺ EBV-B cells ($p = 0.015$ and 0.033 , respectively) suggesting that even when the individuals do not express C2 ligand, unlicensed KIR2DL1⁺ NK cells respond to the absence of C2 ligand on stimulator cells in this *in vitro* model.

Evolution of KIR2DL1/S1 NK-cell expansion in C2⁻ KIR2DL1⁺/S1⁺ genotyped individuals

In contrast to KIR2DL1⁺/S1⁻ individuals, KIR2DS1⁺ individuals (D24–D29) ($n = 6$) express both KIR2DL1 and KIR2DS1 receptors. For these KIR2DS1⁺ individuals, the same EB6⁺ NK-cell frequency was observed ($p = 0.233$) following either C2⁻ or C2⁺ EBV-B-cell stimulation (Fig. 6A). The majority of studied KIR2DS1⁺ individuals ($n = 6$) did not express autologous C2 ligand ($n = 4$; D24–D27). For these C2⁻ KIR2DL1⁺/S1⁺ individuals, the EB6⁺ NK-cell frequencies observed with C2⁻ and C2⁺ EBV-B stimulator cells was similar ($p = 0.580$) (data not shown). For the C2⁻ individual D27 who was genotyped as KIR2DL1⁻ and expressed only the KIR2DS1 receptor, the difference in EB6⁺ NK-cell frequency

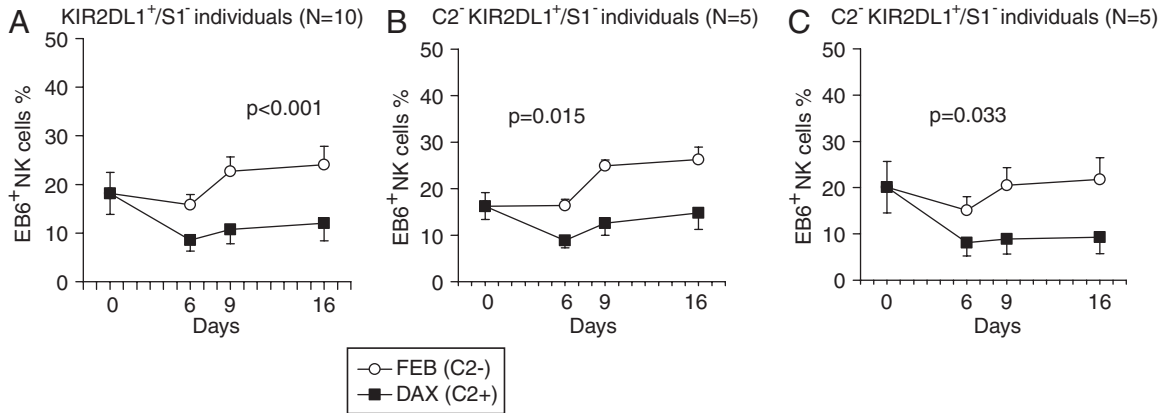


Figure 5. Differential evolution of KIR2DL1⁺ NK-cell expansion in C2⁻ versus C2⁺ EBV-B-cell stimulating environments in both C2⁻KIR2DL1⁺/S1⁻ and C2⁺KIR2DL1⁺/S1⁻ genotyped individual groups. PBMC from KIR2DL1⁺/S1⁻ genotyped individuals were cultured with irradiated C2⁻ FEB or C2⁺ DAX EBV-B-cell lines at a ratio (PBMC:EBV-B cells) of 10:1. NK cells were defined as the CD3⁻CD56⁺ population and KIR2DL1⁺ cells as the EB6⁺ subset. Phenotype of amplified cells was performed by flow cytometry for all conditions of stimulation at days 0, 6, 9 and 16 and shows significant differences in EB6⁺ NK-cell frequencies at different time points between C2⁻ FEB and C2⁺ DAX EBV-B-cell lines. (A) Means and SD for the group of KIR2DL1⁺/S1⁻ individuals ($n = 10$; D14–D23), $p < 0.001$; (B) means and SD for the group of C2⁺KIR2DL1⁺/S1⁻ individuals ($n = 5$; D19–D23), $p = 0.015$; (C) means and SD for the group of C2⁻KIR2DL1⁺/S1⁻ individuals ($n = 5$; D14–D18), $p = 0.033$. Repeated measures ANOVA using linear mixed models were used.

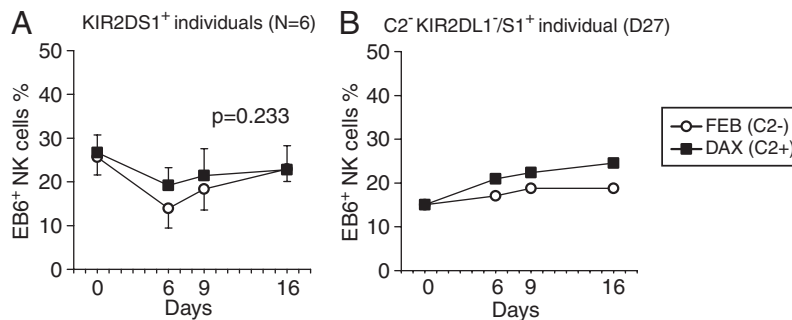


Figure 6. Absence of a difference in KIR2DL1/S1 NK-cell frequency after C2⁻ and C2⁺ EBV-B-cell cocultures in C2⁻ KIR2DL1⁺/S1⁺ genotyped individuals. PBMC from KIR2DS1⁺ genotyped individuals were cultured with irradiated C2⁻ FEB or C2⁺ DAX EBV-B-cell lines at a ratio (PBMC:EBV-B cells) of 10:1. NK cells were defined as the CD3⁻CD56⁺ population and KIR2DL1⁺/S1⁺ cells as the EB6⁺ subset. Phenotype of amplified cells was performed by flow cytometry for all conditions of stimulation at days 0, 6, 9 and 16. (A) No significant differences in EB6⁺ NK-cell frequencies were observed in the group of KIR2DS1⁺ individuals ($n = 6$; D24–D29). Means and SD for six experiments; $p = 0.233$. Repeated measures ANOVA using linear mixed models were used. (B) Evolution of EB6⁺ NK-cell frequency after stimulation with C2⁺ and C2⁻ EBV-B cells for one C2⁻ KIR2DL1⁺/S1⁺ individual (D27).

was low after stimulation with C2⁻ EBV-B stimulator cells in comparison with its C2⁺ counterparts (Fig. 6B), which is in agreement with the responsiveness of KIR2DS1⁺ NK cells assessed from C2⁻ individual D5 who did not harbor the KIR2DL1 gene (Fig. 3B, D and E). These results support the conclusion that C2⁻ KIR2DL1⁺/S1⁺ genotyped individuals may have KIR2DS1⁺ NK cells that expand better when challenged with C2⁺ than with C2⁻ EBV-B stimulator cells. Conversely, KIR2DL1⁺ NK cells seem to expand better with C2⁻ than C2⁺ EBV-B stimulator cells, even if they are not licensed, as observed above (Fig. 5C). Thus, the combination of functional KIR2DS1⁺ and KIR2DL1⁺ NK cells in this *in vitro* model of NK-cell expansion may explain the similar EB6⁺ NK-cell

frequency observed in the C2⁻ and C2⁺ EBV-B stimulating environments.

KIR2DS1⁺ NK-cell frequency is higher after C2⁺ than C2⁻ cell stimulation in C2⁻ individuals

It is possible that EBV-B stimulator cells may overcome the absence of licensing of KIR2DL1⁺ NK cells from C2⁻ individuals (Fig. 5C), limiting the observation of KIR2DS1⁺ NK-cell reactivity in C2⁺ versus C2⁻ stimulator environments. In order to follow only KIR2DL1⁻/S1⁺ NK-cell evolution in C2⁻ and C2⁺ stimulator environments, we used the combination of 8C11

with EB6 mAb (Supporting Information Fig. 1) to target the KIR2DL1/2/3/2DS2⁻KIR2DS1⁺ (8C11⁻EB6⁺) NK-cell population from C2⁻KIR2DL1⁺/S1⁺ individuals using B stimulator cells versus EBV-B stimulator cells. For this purpose, we sorted B cells from C2⁻ (C1C1) and C2⁺ (C2C2) PBMC individuals by magnetic positive selection. As expected, selected B cells expressed lower levels of HLA class I molecules when compared with the EBV-transformed B cells derived from the same individual (Supporting Information Fig. 2A). Expansions of NK cells from eight individuals (D1, D2, D3, D5, D9, D11, D12 and D20; Table 1) were lower with allogeneic B cells than the entire NK-cell expansion observed with EBV-transformed B cells (Supporting Information Fig. 2B).

We evaluated KIR2DL1/2/3/2DS2⁻KIR2DS1⁺ (8C11⁻EB6⁺) NK-cell frequency at days 0, 6, 9 and 16, from three groups of individuals: three C2⁺KIR2DL1⁺/S1⁺ individuals (D9, D11 and D12) (Fig. 7A and B), three C2⁻KIR2DL1⁺/S1⁺ (D1, D2 and D3) individuals (Fig. 7C and D) and one C2⁻KIR2DL1⁻/S1⁺ (D5) individual (Fig. 7E and F) for whom the HLA and KIR genotypes are presented in Table 1. We did not observe any differences in KIR2DL1/2/3/2DS2⁻KIR2DS1⁺ NK-cell frequencies after stimulation by C2⁻ or C2⁺ EBV-B cells (Fig. 7A) or B cells (Fig. 7B) for C2⁺KIR2DL1⁺/S1⁺ individuals. This result is in agreement with functional results showing that KIR2DS1⁺ NK cells are not functional in terms of cytokine production and degranulation from C2⁺ individuals (Fig. 3). For C2⁻KIR2DL1⁺/S1⁺ individuals, KIR2DL1/2/3/2DS2⁻KIR2DS1⁺ NK-cell frequency was higher with C2⁺ than with C2⁻ EBV-B cells (Fig. 7C), and clearly increased with C2⁺ as opposed to C2⁻ B cells (Fig. 7D), confirming the C2 alloreactivity of this KIR2DS1⁺ NK-cell population from C2⁻ individuals. For the C2⁻KIR2DL1⁻/S1⁺ individual (D5), no difference in KIR2DL1/2/3/2DS2⁻KIR2DS1⁺ NK-cell frequencies was observed after stimulation by C2⁻ or C2⁺ EBV-B cells (Fig. 7E) or B cells (Fig. 7F). Using B cells as stimulators in this model of NK-cell expansion, we showed that KIR2DS1⁺ NK cells expanded better after C2⁺ than C2⁻ B-cell stimulation, but only when from C2⁻ individuals harboring the KIR2DL1 gene. Our data demonstrate that KIR2DS1 and KIR2DL1 receptors regulate not only cytotoxicity and cytokine production of KIR2DS1⁺ and KIR2DL1⁺ NK cells, respectively, but also their proliferation.

Discussion

Recently, NK cells harboring KIR2DS1 transcripts have been reported to mediate alloresponses against the C2 ligand *in vitro* [10, 11]. However in these two studies, expression of KIR2DS1 receptor has been shown only at the transcriptional level from NK-cell clones. Here, we demonstrated for the first time that NK cells expressing the KIR2DS1 receptor at the cell surface are functional in terms of degranulation and IFN- γ production after stimulation by C2⁺ target cells, but only from C2⁻ individuals. We demonstrated the C2 alloreactivity

of KIR2DS1⁺ NK cells from a selected NK population that does not express the main HLA-Cw-specific inhibitory KIR2DL1/2/3 and NKG2A marker. Thus, the KIR2DS1⁺ NK-cell subset was probably educated by another inhibitory receptor, since the process of NK “licensing” has been shown to depend on inhibitory but not activating KIR [17]. Foley *et al.* [11] suggested that KIR2DS1-dependent alloreactive NK cells are licensed by NKG2A interaction with self. It is important to underline that NKG2A expression is modulated by activation and cytokine environment [25, 26]. Indeed, we observed that the KIR2DS1⁺ subset expressed NKG2A marker at the cell surface rapidly after *in vitro* stimulation, but after 2–3 wk of culture some of them recovered an NKG2A⁻ phenotype. The hyporesponsiveness of the KIR2DL1/2/3⁻KIR2DS1⁺ NK cells from two KIR2DL1⁻ C1C1 individuals underlines the question of the impact of a lack of expression of KIR2DL1 on the studied KIR2DS1⁺ NK-cell subset. Thus, the functional NKG2A⁻KIR2DL1/2/3⁻KIR2DS1⁺ NK cells from C2⁻ and KIR2DL1⁺ genotyped individuals might express the KIR2DL1 receptor at early stages of cell differentiation. So, the absence of education by the KIR2DL1 receptor with its C2 ligand might allow for the education of the KIR2DS1⁺ NK cells *via* the interaction of another inhibitory receptor with a self-ligand. The chronology of activating and inhibitory receptor expression on NK cells is still unclear. According to our data, we could hypothesize that the absence of engagement of the inhibitory KIR2DL1 receptor with its C2 ligand from C1C1 individuals might be the first step toward the education of KIR2DS1⁺ NK cells *via* other inhibitory signals.

Using an *in vitro* cellular model to amplify NK cells, we show that the absence of the cognate C2 ligand in an EBV culture environment leads to a significant increase in KIR2DL1/S1 NK-cell frequency. A significantly higher percentage of KIR2DL2/3⁺ cells expanded from C1C1 individual cells have been previously reported in the context of KIR ligand expression by stimulator EBV-B cells [27]. Similar results have been observed in IL-2-supplemented allogeneic mixed lymphocyte culture upon the assessment of Ki67 (a proliferation marker) expression on different KIR NK cells [28]. In this latter study, the authors assessed KIR NK-cell expansion from the PBMC of a single donor only, stimulated with 16 allogeneic PBMC. Nevertheless, neither KIR genotyping nor activating KIR receptor expression was taken into account in both studies. Interestingly, our data showed that NK cells were better amplified with EBV-transformed B-cell lines than with B cells, suggesting that EBV infection induces the expression of cell surface receptors or soluble factors that enhance NK-cell proliferation. It is well documented that EBV modulates B-cell biology and particularly B-cell phenotype [29]. Igarashi *et al.* [27] reported that NK-cell cultures containing EBV-B-cell lines expanded more than NK-cell populations cultured alone. In our model, EBV-B-cell stimulation appeared to activate NK cells non-specifically, leading to unlicensed KIR2DL1⁺ NK cells able to respond to C2⁻ cells. In contrast, stimulation with sorted B cells uncovered

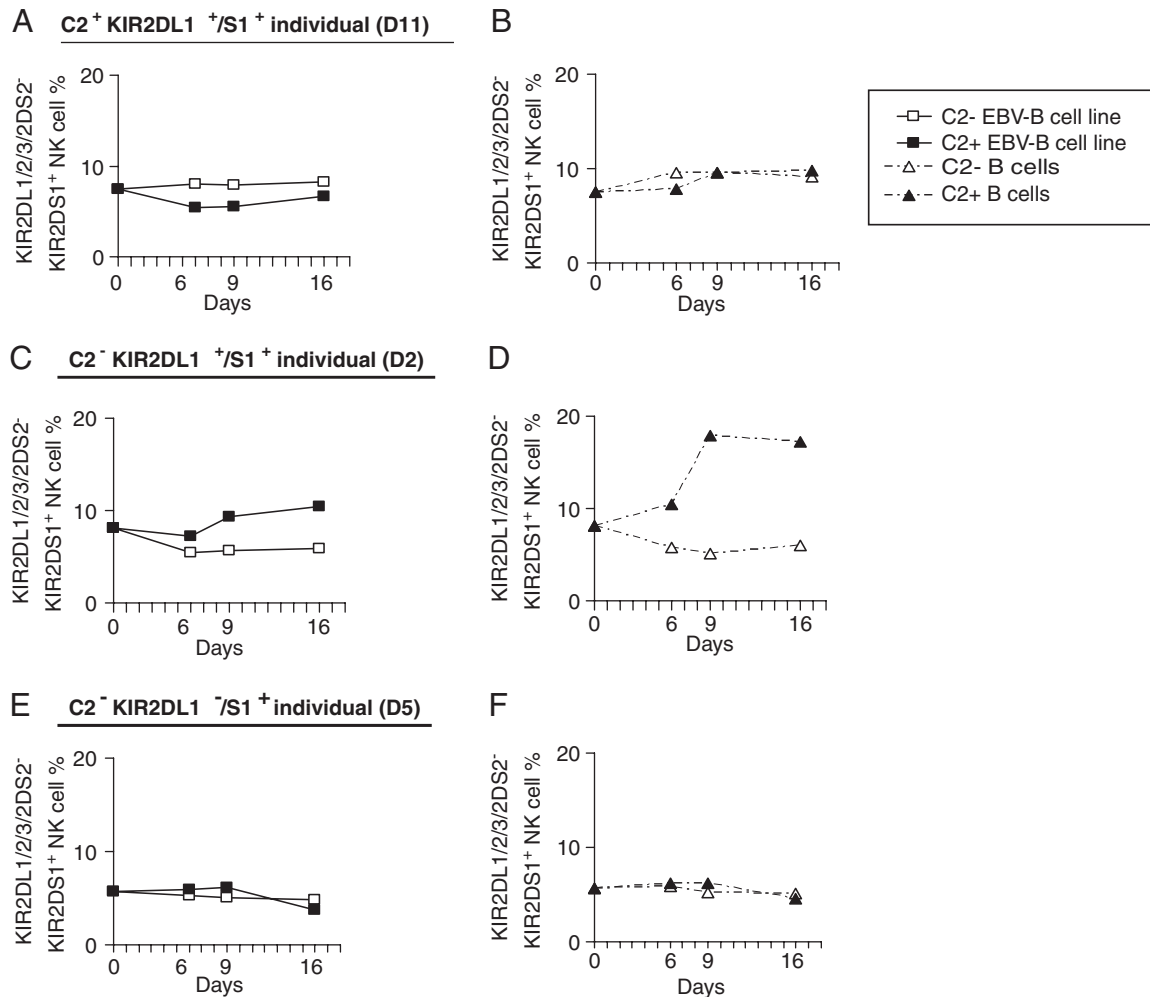


Figure 7. KIR2DS1⁺ NK-cell frequency is higher after C2⁺ than C2⁻ cell stimulation in KIR2DL1⁺ genotyped individuals who do not express C2 ligand. (A–F) Percentages of KIR2DL1/2/3/S2⁻ KIR2DS1⁺ NK cells were defined by flow cytometry as 8C11⁻ EB6⁺ CD3⁻ CD56⁺ cells at day 0, 6, 9 and 16 after PBMC stimulation for three C2⁺ KIR2DL1⁺/S1⁺ individuals (D9, D11 and D12), three C2⁻ KIR2DL1⁺/S1⁺ individuals (D1, D2 and D3) and one C2⁻ KIR2DL1⁻/S1⁺ individual (D5) with C2⁻ and C2⁺ EBV-B cells and B cells. (A and B) Percentages of KIR2DL1/2/3/S2⁻ KIR2DS1⁺ NK cells obtained from a representative C2⁺ KIR2DL1⁺/S1⁺ individual (D11) out of three studied individuals, after PBMC stimulation with (A) C2⁻ and C2⁺ EBV-B cells and (B) C2⁻ and C2⁺ B cells. (C and D) Percentages of KIR2DL1/2/3/S2⁻ KIR2DS1⁺ NK cells obtained from a representative C2⁻ KIR2DL1⁺/S1⁺ individual (D2) out of three studied individuals, after PBMC stimulation with (C) C2⁻ and C2⁺ EBV-B cells and (D) C2⁻ and C2⁺ B cells. (E and F) Percentages of KIR2DL1/2/3/S2⁻ KIR2DS1⁺ NK cells obtained from one C2⁻ KIR2DL1⁻/S1⁺ individual (D5) after PBMC stimulation with (E) C2⁻ and C2⁺ EBV-B cells and (F) C2⁻ and C2⁺ B cells.

a prerequisite for licensing of inhibitory KIR2DL1⁺ NK cells to respond to C2⁻ cell targets. According to these results, viruses or tumors could induce non-specific activation and proliferation of unlicensed self-tolerant KIR NK clones. This could explain how unlicensed KIR NK cells might proliferate non-specifically in autoimmune diseases following viral activation [30].

Using KIR2DS1 tetramers, Stewart *et al.* [9] observed an interaction of KIR2DS1 with the KIR2DL1 ligand (C2) only in conditions of up-regulated HLA class I molecule expression, after infecting B cells with EBV. In our model, the KIR2DS1 receptor seemed to be engaged with its HLA C2 ligand even when using B cells as stimulators. Indeed, it is in the absence of EBV infection that we highlight KIR2DS1⁺ NK-cell expansion after stimulation by C2⁺ B cells from only C2⁻ individuals harboring KIR2DL1

gene. Thus, KIR2DS1–C2 interaction appears to govern the proliferation, cytotoxicity and cytokine production of alloreactive KIR2DS1⁺ NK cells. In agreement with our results, C2⁺ individuals are logically protected against potential autoreactive KIR2DS1⁺ NK cells. However, C2⁻ individuals present potential alloreactive KIR2DS1⁺ NK cells against C2⁺ allogeneic cells, which can be useful in HLA-Cw-mismatched HSCT to eliminate C2⁺ malignant cells.

Based on our observations, from an individual harboring both inhibitory KIR2DL1 and activating KIR2DS1 genes, just one of both KIR is functional depending on the presence or absence of autologous C2 ligand. Thus, from KIR2DL1⁺/S1⁺ genotyped individuals, only KIR2DL1⁺ NK cells are functional from C2⁻ individuals, and only KIR2DS1⁺ NK cells are functional from C2⁻

individuals. However, although unlicensed inhibitory KIR2DL1 NK cells cannot respond in the absence of C2 ligand, they may proliferate in a situation of EBV infection or reactivation during hematopoietic reconstitution. Finally, we show that activating KIR2DS1⁺ NK cells may proliferate, produce IFN- γ and express CD107a after stimulation by C2⁺ cell target when homologous inhibitory KIR2DL1⁺ NK cells are unlicensed. All these data provide new insights into the regulation of NK KIR cell all-or-activity. Our observations may help to select HSCT donors taking into account their activating KIR genes, education of inhibitory KIR NK cells and HLA KIR ligands expressed by the recipient to ensure a good allogeneic response. Further studies are required to assess whether these rules are operative *in vivo* and whether they are adhered to despite different graft parameters.

Materials and methods

Cells (PBMC and EBV-B-cell lines)

PBMC were isolated from heparinized blood from healthy adult volunteers by gradient centrifugation on Ficoll-Hypaque (Lymphoprep, Axis-Shield, PoC AS, Oslo, Norway). All blood donors were recruited at the Blood Transfusion Center (EFS, Nantes, France) and informed consent was obtained from all individuals. HLA class I-deficient 721.221 lymphoblastoid cells, referred to as 221 cells, were used as controls to stimulate NK-cell expansion. The 221 cell line and C1- and C2-transfected 221 cells (respectively named 221-C1 and 221-C2) were used to assess natural NK-cell cytotoxicity and IFN- γ production in functional assays. Allogeneic and autologous B-cell lines were established by EBV transformation of peripheral B cells using EBV supernatant harvested from the cell line B95-8 (American Type Culture Collection). FEB and DAX, both principal EBV-B-cell lines used in the model, were obtained from two different HLA-typed donors: FEB (HLA-A*01-*01; -B*08-*08; -Cw*07-*07) and DAX (HLA-A*02-*03; -B*44-*44; -Cw*05-*05). Cells 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).

B-cell isolation

B cells were isolated from PBMC obtained from healthy C1C1 or C2C2 individuals using a CD19-specific antibody (BD Biosciences, San Jose, CA, USA) and murine IgG-coupled magnetic Dynabeads according to the manufacturer's instructions (Dyna, Oslo, Norway). Beads and CD19-specific antibody were removed using goat anti-mouse IgG antiserum (EFS) as described previously [31]. After detachment of the Dynabeads from the positively selected B lymphocytes, purity was systematically greater than 99% (as determined by flow cytometry).

HLA and KIR genotyping

Genomic DNA was extracted from PBMC using a classical salting-out method [32]. HLA-A, -B and -Cw genes were typed *via* molecular techniques using the PCR-SSP (sequence specific primer) kit from GenoVision (Olerup SSP™ HLA-A, -B and -Cw, Bionobis, Montfort l'Amaury, France) under the conditions recommended by the manufacturer.

KIR genes were typed using the PCR-SSP method using a KIR genotyping SSP kit (Dyna Biotech, Invitrogen, Compiègne, France). Primer sets amplified the alleles described by the WHO International Nomenclature Committee [33] corresponding to the KIR2DL1, KIR2DL2, KIR2DL3, KIR2DL4, KIR2DL5, KIR3DL1, KIR3DL2, KIR3DL3, KIR2DS1, KIR2DS2, KIR2DS3, KIR2DS4 (and KIR1D allele), KIR2DS5 and KIR3DS1. Genomic PCR was performed as recommended by the manufacturer and as previously described [34].

In vitro model of NK-cell expansion

Amplification of NK cells was evaluated using an *in vitro* model based on a protocol described by Clémenceau *et al.* [35]. Four millions of PBMC were cultured in 6-well flat-bottomed plates with irradiated allogeneic EBV-B-cell lines at a ratio (PBMC:EBV-B cells) of 10:1. Cells were grown in Cellgro SCGM serum-free medium containing 10% human AB serum, 50 U/mL penicillin, 50 μ g/mL streptomycin and 100 IU/mL IL-2 (Chiron, Suresnes, France). The culture medium was replaced weekly with new Cellgro medium containing fresh IL-2. Cell phenotyping was performed for all conditions of stimulation at days 0, 6, 9 and 16. For some experiments, irradiated EBV-B-cell stimulators were replaced by irradiated B cells to stimulate PBMC at the same PBMC:B-cell ratio (10:1).

Phenotypic analysis by flow cytometry

Cell surface phenotype was determined by three- or four-color flow cytometry using the following mouse anti-human mAb: anti-KIR2DL1/S1-PE (EB6) (Beckman Coulter, Immunotech, Marseille, France), anti-CD3-PerCP (SK7) and anti-CD56-APC (B159) (BD Biosciences). Cells were also stained with a corresponding isotype-matched control mAb (BD Pharmingen, Franklin Lakes, NJ, USA). 8C11 mAb (recently generated in our laboratory) specific for KIR2DL2, 2DL3, 2DS2 and 2DL1 but not 2DS1, was used in combination with EB6 to target KIR2DS1⁺2DL1/2/3/S2⁻ NK cells identified as 8C11⁻EB6⁺ (manuscript in preparation). HLA class I expression by B cells and EBV-B-cell lines was evaluated using the anti-HLA-A, -B, -C-FITC (IE3) mAb (EFS) and purity of sorted B cells was checked using the anti-CD19 (HIB19) (BD Biosciences) mAb. Data were collected using a FACSCalibur (BD Biosciences) and analyzed using FlowJo 6.2 software (TreeStar).

CD107a mobilization assay and IFN- γ production detected by flow cytometry

PBMC were stained with anti-CD3 mAb (OKT3) and CD3⁺ cells were depleted using murine IgG-coupled magnetic Dynabeads according to the manufacturer's instructions (Dyna). Then, cells were labeled with 8C11-FITC, EB6-PE and NKp46-APC (BD Biosciences) mAb and KIR2DS1⁺KIR2DL1/2/3⁻2DS2⁻ NK cells (NKp46⁺8C11⁻EB6⁺) were cell sorted using a FACSCalibur equipped with a fluidic sort module (BD Biosciences). Sorted cells were amplified after *in vitro* stimulation with irradiated C1⁺ and C2⁺ allogeneic PBMC and EBV-B cells used as feeders following the PBMC:EBV-B-cell ratio at 10:1. KIR2DS1⁺ NK-cell secretion of IFN- γ was assessed after stimulation of NK cells for 5 h with 221, 221-C1 and 221-C2 cell lines or without target cells (control) at effector–target (*E–T*) ratio of 1:1. For the last 4 h of incubation, the cells were treated with brefeldin A (Sigma) at 10 μ g/mL to block *trans*-Golgi transport and allow the intracellular accumulation of IFN- γ . The cells were surface stained with 8C11-FITC, EB6-PE, NKG2A-PE (Beckman Coulter) and CD3-PerCP (BD Biosciences) and then permeabilized before the intracellular IFN- γ staining with AF647-conjugated anti-human IFN- γ (B27, BD Biosciences). In parallel, NK cells were tested for their cytolytic potential with the CD107a mobilization assay after stimulation with 221, 221-C1 and 221-C2 cell lines. Pre-incubated NK cells with CD107-PE-Cy5 (H4A3, BD Biosciences) were incubated with the different target cells (221, 221-C1 and 221-C2) for 5 h at *E–T* ratio of 1:1 without brefeldin A for the first hour. Anti-CD107 mAb was added at the beginning of the experiment to capture any CD107 expressed on the surface of the NK cells as it is degranulating. The cells were surface stained with 8C11-FITC, EB6-PE, NKG2A-PE (Z199, Beckman Coulter) and NKp46-APC (9E2, BD Biosciences). For blocking experiments, NK cells were pre-incubated with EB6 and IgG1 isotype control (Beckman Coulter) at 10 μ g/mL for 30 min. Data were collected using a FACSCalibur (BD Biosciences) and analyzed using FlowJo 6.2 software (TreeStar).

Statistical analyses

To account for the correlation between measurements from the same individual, repeated measures ANOVA using linear mixed models with restricted maximum-likelihood estimation were used to examine changes in NK-cell frequency over time and across EBV-B-cell lines (FEB and DAX). “EBV-B-cell lines” and “time” effects as well as “EBV-B-cell lines” \times “time” interaction effects were included in the model along with baseline measurements of NK cells (at day 0). Several covariance structures among the repeated measurements (autoregressive, unstructured, etc.) were compared using Akaike's Information Criterion and Schwarz Bayesian Criterion [36, 37], and autoregressive covariance structures provided the best fit to the data. Statistical analyses were performed with SAS 9.1 statistical software (SAS Institute, Cary, NC, USA). $p < 0.05$ were considered to be statistically significant.

Acknowledgements: We are grateful to the blood donors. We thank Dr. Marc Bonneville and Prof. Jean-François Moreau for critically reading the manuscript and for suggestions and Dr. Johanna Ashton-Chess for editing the manuscript. This work was financially supported in part by the Ligue Nationale contre le Cancer, the Etablissement Français du Sang (project number 21/2006), Agence de la Biomédecine and the NAGMO association. M.M. is a PhD student supported by a grant from the Comité départemental de Loire-Atlantique de la Ligue contre le Cancer.

Conflict of interest: The authors declare no financial or commercial conflict of interest.

References

- Ruggeri, L., Capanni, M., Urbani, E., Perruccio, K., Shlomchik, W. D., Tosti, A., Posati, S. et al., Effectiveness of donor natural killer cell alloreactivity in mismatched hematopoietic transplants. *Science* 2002. 295: 2097–2100.
- Gagne, K., Busson, M., Balere-Appert, M. L., Absi, L., Jollet, I., Bignon, J. D., Bois, M. et al., Relevance of KIR gene matching in unrelated hematopoietic stem cell transplantations. *Tissue Antigens* 2007. 69: 118–122.
- Bignon, J. D. and Gagne, K., KIR matching in hematopoietic stem cell transplantation. *Curr. Opin. Immunol.* 2005. 17: 553–559.
- Ljunggren, H. G. and Karre, K., In search of the ‘missing self’: MHC molecules and NK cell recognition. *Immunol. Today* 1990. 11: 237–244.
- Willcox, B. E., Thomas, L. M. and Bjorkman, P. J., Crystal structure of HLA-A2 bound to LIR-1, a host and viral major histocompatibility complex receptor. *Nat. Immunol.* 2003. 4: 913–919.
- Braud, V. M., Allan, D. S., O’Callaghan, C. A., Soderstrom, K., D’Andrea, A., Ogg, G. S., Lazetic, S. et al., HLA-E binds to natural killer cell receptors CD94/NKG2A, B and C. *Nature* 1998. 391: 795–799.
- Moretta, L. and Moretta, A., Killer immunoglobulin-like receptors. *Curr. Opin. Immunol.* 2004. 16: 626–633.
- Moretta, A., Sivori, S., Vitale, M., Pende, D., Morelli, L., Augugliaro, R., Bottino, C. and Moretta, L., Existence of both inhibitory (p58) and activating (p50) receptors for HLA-C molecules in human natural killer cells. *J. Exp. Med.* 1995. 182: 875–884.
- Stewart, C. A., Laugier-Anfossi, F., Vely, F., Saulquin, X., Riedmuller, J., Tisserant, A., Gauthier, L. et al., Recognition of peptide-MHC class I complexes by activating killer immunoglobulin-like receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2005. 102: 13224–13229.
- Chewning, J. H., Gudme, C. N., Hsu, K. C., Selvakumar, A. and Dupont, B., KIR2DS1-positive NK cells mediate alloresponse against the C2 HLA-KIR ligand group *in vitro*. *J. Immunol.* 2007. 179: 854–868.
- Foley, B., De Santis, D., Lathbury, L., Christiansen, F. and Witt, C., KIR2DS1-mediated activation overrides NKG2A-mediated inhibition in HLA-C C2-negative individuals. *Int. Immunol.* 2008. 4: 555–563.
- Vivier, E. and Daeron, M., Immunoreceptor tyrosine-based inhibition motifs. *Immunol. Today* 1997. 18: 286–291.

- 13 Vely, F. and Vivier, E., Conservation of structural features reveals the existence of a large family of inhibitory cell surface receptors and noninhibitory/activatory counterparts. *J. Immunol.* 1997. **159**: 2075–2077.
- 14 Valiante, N. M., Uhrberg, M., Shilling, H. G., Lienert-Weidenbach, K., Arnett, K. L., D'Andrea, A., Phillips, J. H. et al., Functionally and structurally distinct NK cell receptor repertoires in the peripheral blood of two human donors. *Immunity* 1997. **7**: 739–751.
- 15 Uhrberg, M., Valiante, N. M., Shum, B. P., Shilling, H. G., Lienert-Weidenbach, K., Corliss, B., Tyman, D. et al., Human diversity in killer cell inhibitory receptor genes. *Immunity* 1997. **7**: 753–763.
- 16 Kim, S., Poursine-Laurent, J., Truscott, S. M., Lybarger, L., Song, Y. J., Yang, L., French, A. R. et al., Licensing of natural killer cells by host major histocompatibility complex class I molecules. *Nature* 2005. **436**: 709–713.
- 17 Anfossi, N., Andre, P., Guia, S., Falk, C. S., Roetync, S., Stewart, C. A., Breso, V. et al., Human NK cell education by inhibitory receptors for MHC class I. *Immunity* 2006. **25**: 331–342.
- 18 Chen, C., Busson, M., Rocha, V., Appert, M. L., Lepage, V., Dulphy, N., Haas, P. et al., 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.* 2006. **38**: 437–444.
- 19 Cook, M. A., Milligan, D. W., Fegan, C. D., Darbyshire, P. J., Mahendra, P., Craddock, C. F., Moss, P. A. and Briggs, D. C., The impact of donor KIR and patient HLA-C genotypes on outcome following HLA-identical sibling hematopoietic stem cell transplantation for myeloid leukemia. *Blood* 2004. **103**: 1521–1526.
- 20 McQueen, K. L., Dorighi, K. M., Guethlein, L. A., Wong, R., Sanjanwala, B. and Parham, P., Donor-recipient combinations of group A and B KIR haplotypes and HLA class I ligand affect the outcome of HLA-matched, sibling donor hematopoietic cell transplantation. *Hum. Immunol.* 2007. **68**: 309–323.
- 21 Giebel, S., Nowak, I., Wojnar, J., Markiewicz, M., Dziaczkowska, J., Wylezol, I., Krawczyk-Kulis, M. et al., Impact of activating killer immunoglobulin-like receptor genotype on outcome of unrelated donor-hematopoietic cell transplantation. *Transplant. Proc.* 2006. **38**: 287–291.
- 22 Kroger, N., Binder, T., Zabelina, T., Wolschke, C., Schieder, H., Renges, H., Ayuk, F. et al., Low number of donor activating killer immunoglobulin-like receptors (KIR) genes but not KIR-ligand mismatch prevents relapse and improves disease-free survival in leukemia patients after in vivo T-cell depleted unrelated stem cell transplantation. *Transplantation* 2006. **82**: 1024–1030.
- 23 Verheyden, S., Schots, R., Duquet, W. and Demanet, C., A defined donor activating natural killer cell receptor genotype protects against leukemic relapse after related HLA-identical hematopoietic stem cell transplantation. *Leukemia* 2005. **19**: 1446–1451.
- 24 Walzer, T., Jaeger, S., Chaix, J. and Vivier, E., Natural killer cells: from CD3(-)NKp46(+) to post-genomics meta-analyses. *Curr. Opin. Immunol.* 2007. **19**: 365–372.
- 25 Parham, P., Taking license with natural killer cell maturation and repertoire development. *Immunol. Rev.* 2006. **214**: 155–160.
- 26 Cooley, S., Xiao, F., Pitt, M., Gleason, M., McCullar, V., Bergemann, T. L., McQueen, K. L. et al., A subpopulation of human peripheral blood NK cells that lacks inhibitory receptors for self-MHC is developmentally immature. *Blood* 2007. **110**: 578–586.
- 27 Igarashi, T., Wynberg, J., Srinivasan, R., Becknell, B., McCoy, J. P., Jr., Takahashi, Y., Suffredini, D. A. et al., Enhanced cytotoxicity of allogeneic NK cells with killer immunoglobulin-like receptor ligand incompatibility against melanoma and renal cell carcinoma cells. *Blood* 2004. **104**: 170–177.
- 28 Grzywacz, B., Dlubek, D. and Lange, A., NK cells become Ki-67+ in MLC and expand depending on the lack of ligand for KIR on stimulator cells in IL-2 supplemented MLC. *Hum. Immunol.* 2002. **63**: 638–646.
- 29 Pappworth, I. Y., Wang, E. C. and Rowe, M., The switch from latent to productive infection in Epstein-Barr virus-infected B cells is associated with sensitization to NK cell killing. *J. Virol.* 2007. **81**: 474–482.
- 30 Boyton, R. J. and Altmann, D. M., Natural killer cells, killer immunoglobulin-like receptors and human leucocyte antigen class I in disease. *Clin. Exp. Immunol.* 2007. **149**: 1–8.
- 31 Rasmussen, A. M., Smeland, E. B., Erikstein, B. K., Caignault, L. and Funderud, S., A new method for detachment of Dynabeads from positively selected B lymphocytes. *J. Immunol. Methods* 1992. **146**: 195–202.
- 32 Miller, S. A., Dykes, D. D. and Polesky, H. F., A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res.* 1988. **16**: 1215.
- 33 Marsh, S. G., Parham, P., Dupont, B., Geraghty, D. E., Trowsdale, J., Middleton, D., Vilches, C. et al., Killer-cell immunoglobulin-like receptor (KIR) nomenclature report, 2002. *Tissue Antigens* 2003. **62**: 79–86.
- 34 Denis, L., Sivula, J., Gourraud, P. A., Kerdudou, N., Chout, R., Ricard, C., Moisan, J. P. et al., Genetic diversity of KIR natural killer cell markers in populations from France, Guadeloupe, Finland, Senegal and Reunion. *Tissue Antigens* 2005. **66**: 267–276.
- 35 Clémenceau, B., Gallot, G., Vivien, R., Gaschet, J., Campone, M. and Vie, H., Long-term preservation of antibody-dependent cellular cytotoxicity (ADCC) of natural killer cells amplified in vitro from the peripheral blood of breast cancer patients after chemotherapy. *J. Immunother.* 2006. **29**: 53–60.
- 36 Akaike, H., A new look at the statistical model identification. *IEEE Trans. Automat. Control* 1974. **AC-19**: 716–723.
- 37 Schwarz, G., Estimating the dimension of a model. *Ann. Stat.* 1978. **6**: 461–464.

Abbreviations: HSCT: hematopoietic stem cell transplantation · KIR: killer cell immunoglobulin-like receptor · SSP: sequence specific primer

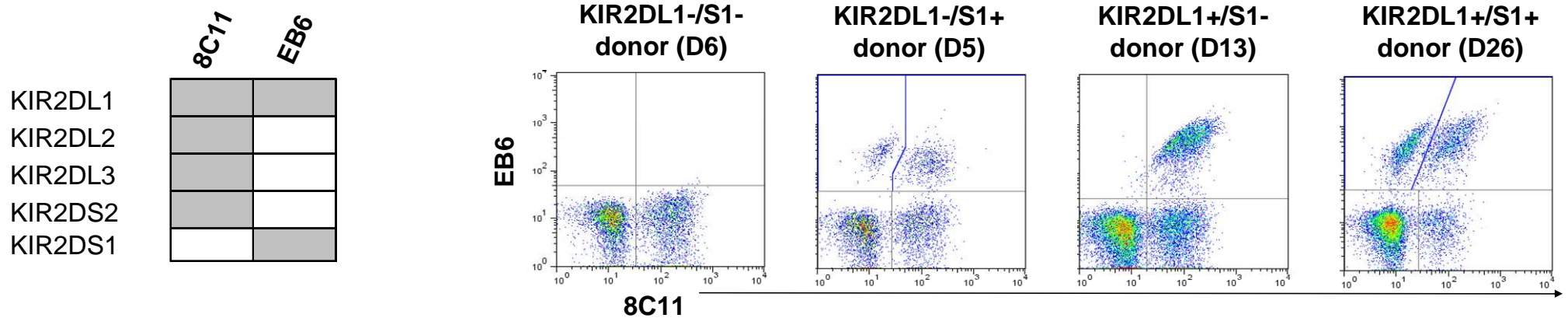
Full correspondence: Dr. Christelle Retière, Etablissement Français du Sang Pays de la Loire, EA4271, Immunovirologie et polymorphisme génétique, 34, Boulevard Jean Monnet, 44011 Nantes cedex, France
 Fax: +33-2-40-12-33-33
 e-mail: christelle.retiere@efs.sante.fr

Supporting Information for this article is available at
www.wiley.vch.de/contents/jc_2040/2008/38407_s.pdf

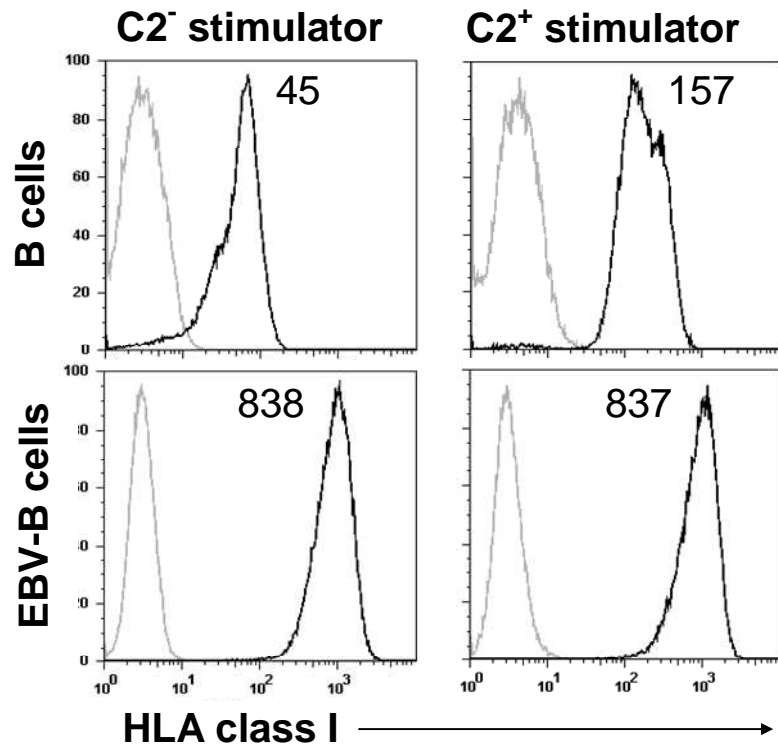
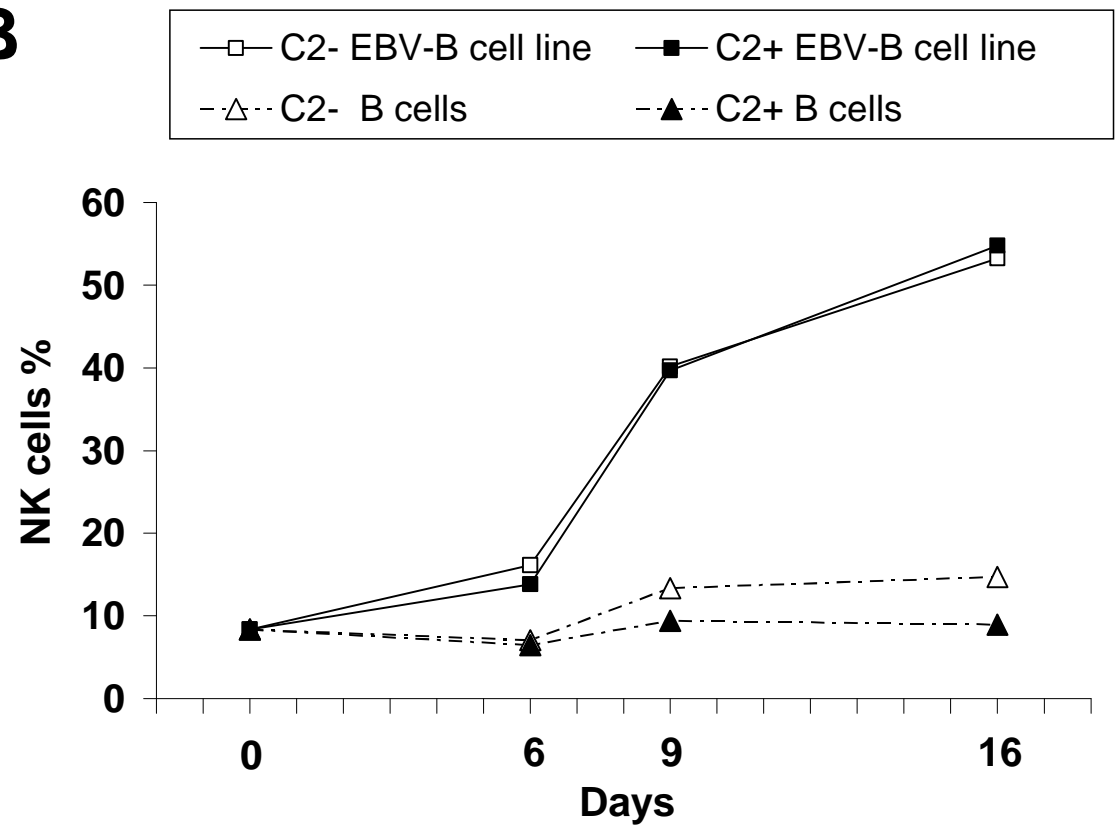
Received: 11/4/2008

Revised: 29/8/2008

Accepted: 7/10/2008



Supplementary Figure 1. Discrimination between KIR2DS1 and KIR2DL1 receptor expression. Combined use of commercial KIR2DL1/S1 specific EB6 mAb with a new KIR2DL1/2/3/S2 specific 8C11 mAb generated and characterized in the laboratory. Using this combination, KIR2DL1 receptor is recognized by both EB6 and 8C11 mAbs (8C11⁺EB6⁺); KIR2DL2/3/S2 receptors are recognized only by 8C11 mAb (8C11⁺EB6⁻); and KIR2DS1 receptor is recognized only by EB6 mAb (8C11⁻EB6⁺). Density plots obtained using flow cytometry are illustrated from 4 different KIR2DL1/2DS1 genotyped individuals (D6, D5, D13 and D26). 8C11⁻EB6⁺ NK cells are observed only for KIR2DS1⁺ donors (D5, D26). This 8C11⁻EB6⁺ NK cell population does not express KIR2DL1/2/3/S2 receptors recognized by 8C11 mAb.

A**B**

Supplementary Figure 2. *In vitro* model of NK cell expansion using B cells as stimulator cells. (A) HLA class I phenotype of C1C1 (C2⁻) and C2C2 (C2⁺) EBV cell lines and B cells was checked by flow cytometry. Mean fluorescent intensity is indicated on all histograms. (B) PBMC from 8 individuals (D1, D2, D3, D5, D9, D11, D12 and D20) were stimulated with irradiated allogeneic EBV-B cells or B cells derived from the same C1C1 (C2⁻) or C2C2 (C2⁺) individuals. NK cells were identified by flow cytometry at different time points as CD3⁻ CD56⁺ cells in both C2⁻ and C2⁺ environments. NK cell proliferation until day 16 observed in all conditions is presented for a representative individual (D2).

Vol 34 (7) 2004, DOI 10.1002/eji.200425029

Frontline: Control of *Anaplasma phagocytophilum*, an obligate intracellular pathogen, in the absence of inducible nitric oxide synthase, phagocyte NADPH oxidase, tumor necrosis factor, Toll-like receptor (TLR)2 and TLR4, or the TLR adaptor molecule MyD88

Friederike D. von Loewenich, Diana G. Scorpio, Udo Reischl, J. Stephen Dumler and Christian Bogdan

It has just come to the authors' attention that the strain of *Anaplasma phagocytophilum* reported in this article was the Webster strain and not the MRK strain. The first sentence in the *Materials and methods*, section *Bacterial strain* should therefore read

The *A. phagocytophilum* Webster strain (formerly HGE agent Webster strain) was cultured in HL60 cells grown in RPMI 1640 medium supplemented with 1% fetal calf serum with 5% CO₂.

In accordance, the original reference 43 needs to be replaced with:

Asanovich, K. M., Bakken, J. S., Madigan, J. E., Agüero-Rosenfeld, M., Wormser, G. P. and Dumler, J. S.,
Antigenic diversity of granulocytic Ehrlichia species isolates from humans in Wisconsin, New York, and a Californian horse. *J. Infect. Dis.* 1997. **176**: 1029-1034.

While this does not affect the scientific conclusion of the study, the authors would like to apologize for this mistake and any inconvenience this may have caused.

Vol 38 (12) 2008, DOI 10.1002/eji.200838407

Autologous and allogeneic HLA KIR ligand environments and activating KIR receptors control KIR NK-cell functions

Maelig Morvan, Gaëlle David, Véronique Sébille, Aurore Perrin, Katia Gagne, Catherine Willem, Nolwenn Kerdudou, Laure Denis, Béatrice Clémenceau, Gilles Folléa, Jean-Denis Bignon and Christelle Retière

Unfortunately an error was introduced during typesetting of the manuscript. As a result the affiliation of one author was incorrect.

The correct affiliation for Gilles Folléa is:

Etablissement Français du Sang, Université de Nantes, Nantes Atlantique Universités, Immunovirologie et polymorphisme génétique, EA4271, Nantes, France

RESULTATS

PROJET N°3 : EXTINCTION DE L'EXPRESSION DU KIR2DS1 PAR ARN INTERFERENCE

Utilisation de lentivirus shRNA dirigés contre KIR2DS1

Maelig Morvan, Marine Cornec, Sylvain Sachot, Caroline Le Guiner et Christelle Retière

I. Introduction

En parallèle à l'étude fonctionnelle des cellules NK KIR2DS1⁺, nous avons mis en place un protocole d'ARN interférence afin d'éteindre l'expression du KIR2DS1 et de mieux comprendre l'impact de ce récepteur activateur sur l'alloréactivité NK. L'extinction de l'expression du KIR2DS1 présente d'autant plus d'intérêt que son rôle sur les cellules NK n'exprimant aucun autre KIR est connu (*Projet n°2*). Il est donc intéressant à présent de déterminer l'impact fonctionnel du KIR2DS1 sur les cellules exprimant d'autres KIR, éduquées ou non.

La technique d'ARN interférence (RNAi, Reynolds *et al.* 2004) a été choisie pour cibler les ARN messagers KIR2DS1. Puisque nous utilisons principalement un modèle *in vitro* d'amplification des cellules NK qui nécessite de garder les cellules en culture pendant plusieurs semaines et donc d'obtenir une extinction non transitoire de l'expression du KIR2DS1, c'est l'approche via des shRNA (ARN short hairpin) qui a été retenue dans le cadre de ce projet et développée au laboratoire comme une nouvelle technique. L'ARN interférence est un processus naturel qui a été découvert en 1998 (Fire *et al.* 1998) et qui consiste en l'extinction spécifique de l'expression d'un gène par des ARN dont l'hybridation avec l'ARN message ciblé va provoquer sa dégradation ou l'inhibition de sa traduction. Deux types d'ARN double brin non codant sont impliqués dans ce processus d'ARN interférence : les siRNA (small interfering) et les miRNA (micro).

La transduction des shRNA utilisés pour éteindre l'expression du KIR2DS1 dans les cellules NK est effectuée grâce à des lentivirus. Ceux-ci vont permettre l'intégration dans le génome de la séquence shRNA et donc son expression non transitoire (*Figure 1*). La transcription de cette séquence dans le noyau donne un shRNA en forme d'épingle à

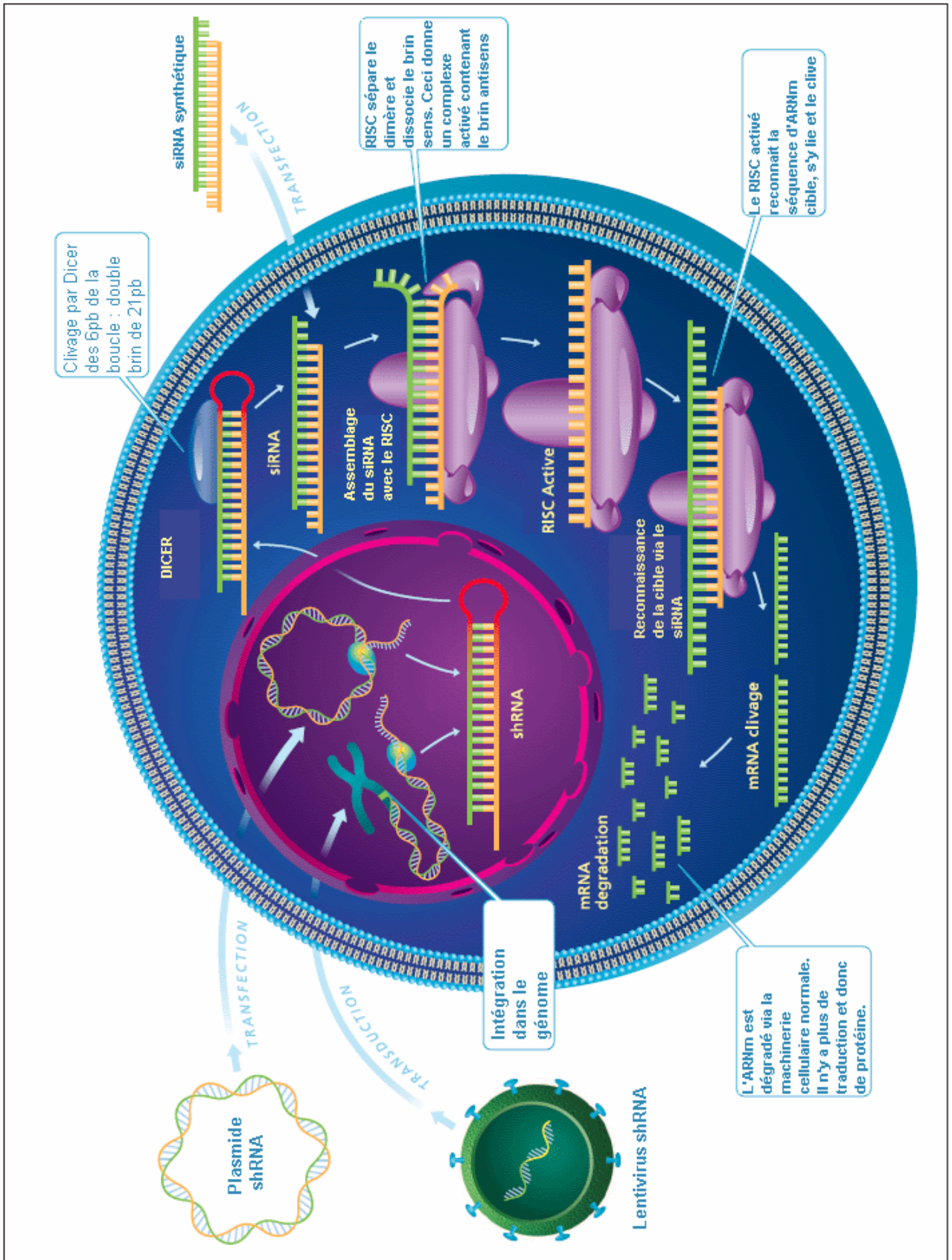


Figure 1. Principe de l'ARN interférence (d'après <http://www.sigmaaldrich.com/>)

cheveux constituée d'une boucle de 6 bases. Une fois dans le cytoplasme, le shRNA est pris en charge par l'enzyme Dicer, une ribonucléase qui clive la boucle, ce qui donne un ARN double brin de 21 paires de bases, le siRNA. L'assemblage de ce siRNA avec le complexe RISC (RNA-induced silencing complex) va provoquer la séparation des deux brins d'ARN et la dissociation du brin sens. Le complexe RISC est alors activé et ne contient plus que le brin antisens qui reconnaît la séquence de l'ARN messager ciblé, s'y lie et le clive. L'ARN messager est ensuite dégradé via la machinerie cellulaire normale, entraînant l'absence de traduction et donc d'expression de la protéine. Il existe deux autres moyens d'apporter ces siRNA aux cellules d'intérêt, qui ne vont toutefois provoquer qu'une extinction transitoire de l'expression du gène ciblé. Il s'agit de la transfection de siRNA synthétiques dans le cytoplasme ou de plasmides contenant une séquence shRNA dans le noyau.

Cinq shRNA ont été définis à partir de la séquence consensus du KIR2DS1, puis les cinq lentivirus recombinants correspondants ainsi qu'un lentivirus contrôle contenant uniquement le gène rapporteur ont été produits par la plateforme de production de vecteurs viraux (Inserm U649, Philippe Moullier). Dans un premier temps, les conditions optimales permettant d'infecter correctement les cellules NK avec ces lentivirus ont été définies. Dans un second temps les lentivirus ont été testés afin de déterminer si le shRNA qu'ils contiennent permet d'éteindre l'expression du KIR2DS1 à la surface des cellules NK infectées et d'étudier ainsi l'impact du KIR2DS1 sur l'alloréactivité des cellules NK.

II. Matériels et méthodes

II.a. Définition des shRNA

Cinq siRNA de 21 bases ont été conçus à partir de la séquence nucléotidique consensus du gène *KIR2DS1* (*Tableau I.A*), selon plusieurs critères (Reynolds et al. 2004). Tout d'abord, la première base du siRNA doit être une adénine (A) ou une guanine (G). De plus, la séquence du siRNA ne doit contenir ni trois thymines (T) successives, ni trois adénines successives. Il ne peut pas y avoir non plus quatre guanines ou quatre cytosines (C) au total dans cette séquence. Afin que ce soit bien le brin anti-sens du siRNA qui soit pris en charge par le complexe RISC, il faut qu'il y ait au moins trois ou quatre adénines ou thymines entre la 15^{ème} et la 19^{ème} base. Il y a ainsi un déséquilibre entre les extrémités 5' et 3', avec plus de guanines et de cytosines en 5', ce qui favorise l'accrochage du siRNA sur l'ARNm puisque ces bases s'associent par trois liaisons hydrogènes. Enfin, la séquence ne doit pas contenir la séquence GCCA car la séquence d'ARN UGGC est toxique dans le complexe RISC (Rao and Wilkinson 2006). Des logiciels de bio-informatique en ligne ont été utilisés pour déterminer 5 siRNA répondant à ces critères (*Tableau I.B*). La séquence sens du siRNA est ensuite complétée en 5' par un site de restriction Mlu1 et en 3' par une boucle de 9 bases, la séquence anti-sens du siRNA, une queue polyT de 5 bases et un site de restriction Cla1. Afin d'obtenir un shRNA double brin à insérer dans le plasmide pLVTHM, la séquence anti-sens de la séquence complète décrite précédemment est également générée. Les deux oligonucléotides sens et anti-sens ainsi obtenus pour chacune des cinq séquences siRNA ont ensuite été synthétisés par l'entreprise Sigma-Aldrich (*Tableau I.C*).

A. Séquence consensus du KIR2DS1

ATGTCGCTCACGGTCGTCAGCATGGCGTGTGTTGGGTTCTTCTTGCTGCAGGGGGCCTGGCCACATGAGGGAG
TCCACAGAAAACCTTCCCTCCTGGCCACCCAGGTGCCTGGTGAAATCAGAAGAGACAGTCATCCTGCAATG
TTGGTCAGATGTCATGTTTGAACACTTCTTCTGCACAGAGAGGGGATGTTTAAACGACACTTTGCGCCTCAT
GGAGAACACCATGATGGGGTCTCCAAGGCCAACTTCTCCATCAGTCGCATGAAGCAAGACCTGGCAGGGACCT
ACAGATGCTACGGTTCTGTTACTCACTCCCCCTATCAGTTGTGACGCTCCCAGTGACCTCTGGACATCGTGAT
CATAGGTCTATATGAGAAAACCTTCTCTCAGCCCAGCCGGGCCCCACGGTTCTGGCAGGAGAGAATGTGACC
TTGTCTGCAGCTCCCGGAGCTCCTATGACATGTACCATCTATCCAGGGAAGGGGAGGCCATGAACGTAGGC
TCCCTGCAGGGACCAAGGTCAACGGAACATTCCAGGCCAACTTTCTCTGGGCCCTGCCACCCATGGAGGGAC
CTACAGATGCTTCGGCTCTTTCCGTGACTCTCCATACGAGTGGTCAAAGTCAAGTGACCCACTGCTTGTCT
GTCACAGGAAACCTTCAAATAGTTGGCCTTCAACCCACTGAACCAAGCTCCGAAACCGGTAACCCAGACACC
TACATGTTCTGATTGGGACCTCAGTGGTCAAATCCCTTTACCATCCTCCTCTTCTTCTCCTTCATCGCTG
GTGCTCCGACAAAAAATGCTGCTGTAATGGACCAAGAGCCTGCAGGGAACAGAACAGTGAACAGCGAGGAT
TCTGATGAACAAGACCATCAGGAGGTGTCATACGCATAA

B. Lentivirus obtenus et séquences des shRNA correspondants

Lentivirus n°	shRNA n°	Séquence	Localisation	Concentration
0	témoin GFP	-	-	$8,5 \cdot 10^7$ Pi/mL
1	1.1	AGCGAGGATTCTGATGAAC	868-886	$7 \cdot 10^6$ Pi/mL
2	3.1	AGACACCTACATGTTCTGA	724-742	$1,5 \cdot 10^9$ Pi/mL
3	3.3	GTGAACAGCGAGGATTCTG	862-880	$3,36 \cdot 10^9$ Pi/mL
4	3.4	GGAGGTGTCATACGCATAA	897-915	$1,6 \cdot 10^9$ Pi/mL
5	3.5	ATCGCTGGTGTCCGACAA	797-815	$4,1 \cdot 10^8$ Pi/mL

C. Exemple de séquence shRNA double brin à insérer dans le plasmide pLVTHM

CGCGTCCCCAGCGAGGATTCTGATGAACTTCAAGAGAGTTTCATCAGAATCCTCGCTTTTTGGAAACCCGGGTT
AGGGTTCGCTCCTAAGACTACTTGAAGTCTCTCAAGTAGTCTTAGGAGCGAAAAACCTTGGGCCAAGC

Légende des couleurs : Demi-sites MluI (en 5') et ClaI (en 3') pour l'insertion dans le plasmide pLVTHM digéré, séquences shRNA sens et antisens, boucle, séquence de terminaison et site de restriction SmaI pour le contrôle des inserts.

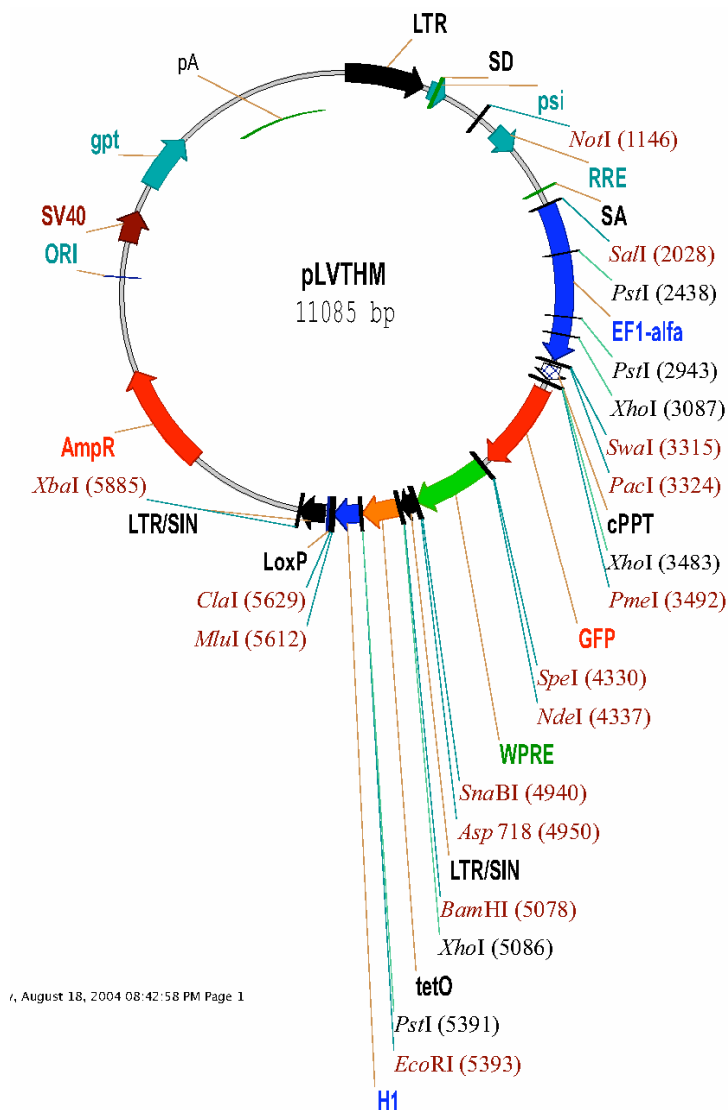
Tableau I. Séquence consensus du KIR2DS1, séquences des shRNA définis et séquence des inserts

II.b. Construction plasmidique (pLVTHM)

Le plasmide pLVTHM permet le clonage direct des shRNA double brin dans un vecteur lentiviral et contient le gène rapporteur de l'eGFP (enhanced Green Fluorescent Protein, *Figure 2*). Les deux brins (sens et anti-sens) du shRNA sont donc hybridés selon un programme de dénaturation à haute température puis d'hybridation à des températures décroissantes successives. Le plasmide pLVTHM a été obtenu via un accord de transfert de matériel (MTA) auprès de TronoLabs (Lausanne, Suisse) puis amplifié par grâce à un clone bactérien transformé avec le plasmide. La purification plasmidique a ensuite été réalisée avec le kit NucleoBond Maxi de Qiagen (Courtaboeuf, France) et le plasmide ainsi obtenu est digéré par les enzymes de restriction MluI et ClaI de New England Biolabs (Ozyme, St Quentin en Yvelines, France). Les cinq inserts contenant le shRNA ont été introduits chacun dans un plasmide pLVTHM au niveau de ce site d'insertion par ligation grâce à la ligase T4 (New England Biolabs) afin de produire des plasmides recombinants. Ces plasmides recombinants sont à leur tour amplifiés grâce à des clones bactériens transformés, puis purifiés avant d'être contrôlés en réalisant une carte de restriction avec les enzymes SmaI, HpaI et ClaI. Ils pourront ainsi être utilisés par la suite pour la production des lentivirus recombinants contenant les différents shRNA.

II.c. Production des lentivirus

Les lentivirus ont été produits par la plate-forme de production des vecteurs viraux de l'Unité 649 de l'Inserm (Christophe Darmon et Françoise Balter) à partir des cinq plasmides recombinants et d'un plasmide vide qui servira de contrôle. Ces vecteurs viraux sont issus de plasmides codants pour des protéines du VIH qui vont générer des particules virales ne possédant pas de capacités répliquatives. Suite à l'infection des cellules par les



August 18, 2004 08:42:58 PM Page 1

Figure 2. Carte de restriction du plasmide pLVTHM (in <http://tronolab.epfl.ch/>)

Le pLVTHM est un plasmide de 11kb qui contient le gène rapporteur de la GFP ainsi qu'un gène de résistance à l'ampicilline (AmpR). Le site d'insertion d'un gène d'intérêt est disponible au niveau des sites de restriction des enzymes MluI et ClaI, et il est précédé par le promoteur ubiquitaire H1 et entouré de séquences LTR permettant son insertion dans le génome cellulaire grâce à un lentivirus.

lentivirus, la séquence du shRNA est insérée dans le génome de celles-ci, ce qui va permettre son expression de façon stable et non transitoire.

II.d. Infection de PBMC par les lentivirus

L'infection des PBMC est réalisée sur un million de cellules au repos par puits d'une plaque 48 puits en milieu CellGro contenant des antibiotiques (pénicilline et streptomycine) et de l'IL-2 à 150UI/mL, mais sans sérum humain. Le polybrène, un agent cationique favorisant l'interaction entre les lentivirus et les cellules, est utilisé à une concentration de 8µg/mL (Micucci *et al.* 2006). Les différents lentivirus sont ensuite ajoutés dans le milieu à différentes MOI (multiplicity of infection) et le tout est incubé à 37°C, 6% CO₂ pendant la nuit. Le lendemain, une partie du surnageant est enlevée puis remplacée par du milieu CellGro avec des antibiotiques, de l'IL-2 et 10% de sérum humain. Les cellules sont incubées pendant cinq jours à 37°C, 6% CO₂ avant que leur phénotype soit étudié par cytométrie en flux afin de contrôler l'infection grâce à la eGFP et l'expression du KIR2DS1 grâce à la combinaison des anticorps 8C11 et EB6.

II.e. Infection par les lentivirus de cellules NK KIR2DS1⁺ triées et amplifiées

Après déplétion des lymphocytes T CD3⁺ avec les billes magnétiques Dynabeads (Invitrogen, Cergy-Pontoise, France) puis tri des cellules NKp46⁺ 8C11⁻ EB6⁺ grâce au module de tri du cytomètre FACScalibur (Becton Dickinson, Le Pont de Claix, France), les cellules NK KIR2DS1⁺ sont amplifiées en présence de cellules nourricières allogéniques irradiées à 35 Grays (PBMC et cellules B-EBV à un rapport de 10:1) dans une plaque 96 puits à fond rond en milieu CellGro avec des antibiotiques, de l'IL-2 et 10% de sérum humain. Après cinq jours, les cellules NK KIR2DS1⁺ amplifiées sont infectées selon le protocole décrit précédemment.

III. Résultats

III.a. Sur les PBMC

Plusieurs MOI du lentivirus le plus concentré (n°3) ont été testées sur des PBMC suivant le protocole d'infection. Cinq jours après l'infection, le phénotype des cellules a été réalisé. Les cellules ayant été infectées par le lentivirus sont celles qui expriment la eGFP dont le gène est présent dans les plasmides recombinants ayant servi à la production des lentivirus. Si les différentes MOI utilisées n'affectent pas la viabilité de la population lymphocytaire, une diminution de la fréquence des cellules NK est observée lorsque la MOI est augmentée (*Figure 3A*). Ceci peut éventuellement s'expliquer par la toxicité de certaines protéines virales auxquelles les cellules NK seraient peut être plus sensibles que d'autres sous-types lymphocytaires. De plus, des cellules NK exprimant la eGFP sont observée dès une MOI de 5 lors de l'infection par le lentivirus n°3 et le pourcentage de cellules infectées augmente avec la MOI (*Figure 3B*). Ces résultats montrent que sur cellules non activées, une MOI de 20 semble être un bon compromis entre une bonne infection (22% de cellules NK GFP⁺) et une toxicité du virus encore négligeable, même si cette MOI reste forte au regard de la faible concentration de certains lentivirus. Néanmoins, l'utilisation de ce lentivirus dans ces conditions ne permet pas d'établir avec certitude une diminution de l'expression du KIR2DS1 d'une part car la fréquence des cellules NK KIR2DS1⁺ est faible, et d'autre part car même si la fréquence des cellules 8C11⁻ EB6⁺ semble diminuer, c'est le cas des autres populations également, y compris la population 8C11⁺ EB6⁻.

III.b. Sur les cellules triées et amplifiées

La faible fréquence des cellules NK KIR2DS1⁺ et la présence des autres populations NK KIR posent donc problème. C'est pour ces raisons que le protocole

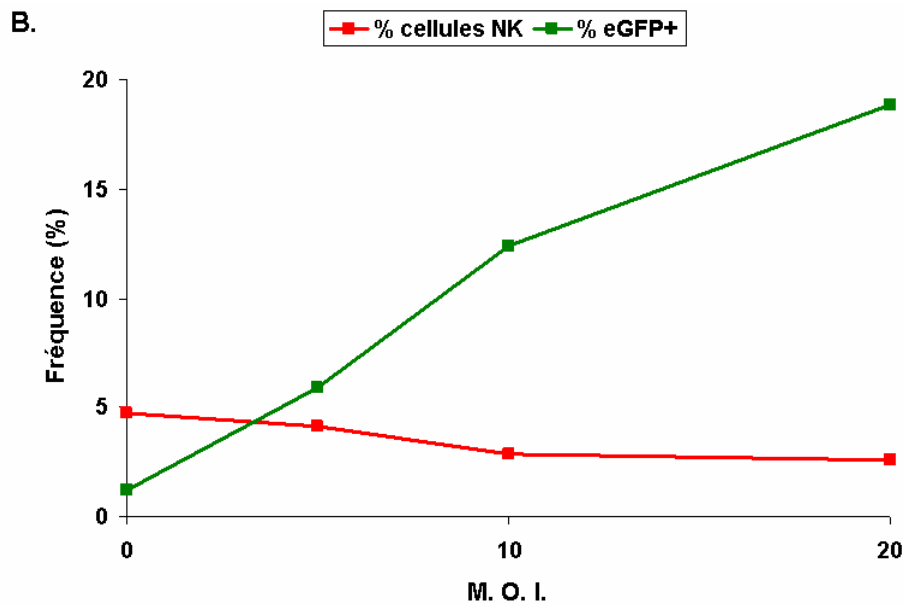
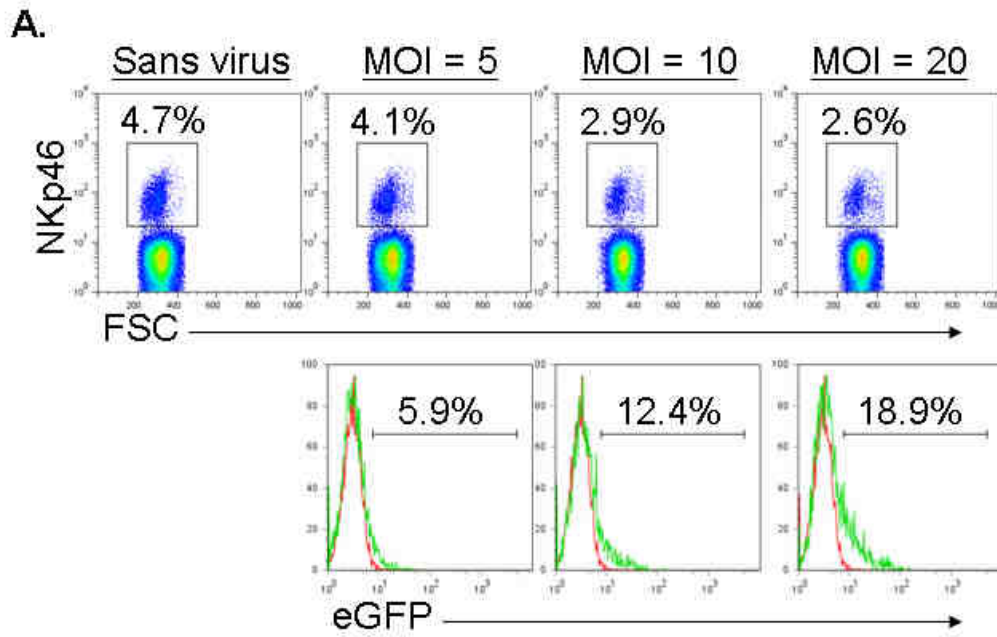


Figure 3. Infection de PBMC au repos par le lentivirus n°3

Les PBMC d'un individu $KIR2DS1^+$ ont été infectées par le lentivirus n°3 à différentes MOI (0, 5, 10 et 20). A. Sur les density plots, le pourcentage de cellules NK ($NKp46^+$) est indiqué. Sur les histogrammes comparant la fluorescence GFP des cellules NK infectées (en vert) à celle des cellules NK cultivées sans virus (en rouge), le pourcentage de cellules NK $eGFP^+$ est indiqué. B. Le graphique représente la fréquence de cellules NK ($NKp46^+$, en rouge) et de cellules NK infectées ($eGFP^+$, en vert) en fonction de la MOI.

d'infection par les lentivirus a ensuite été testé sur la population NK KIR2DS1⁺ triée et amplifiée. Ces cellules n'expriment en effet qu'un seul récepteur KIR, le KIR2DS1 qui est la cible des shRNA, et sont en pleine division, ce qui en favorise l'infection par les lentivirus. Trois d'entre eux (lentivirus 2, 3 et 4) ont ainsi été testés sur les cellules NK KIR2DS1⁺ triées et amplifiées pendant 5 jours à partir de deux donneurs, le premier KIR2DL1⁻ KIR2DS1⁺ et le second KIR2DL1⁺ KIR2DS1⁺. Cinq jours après l'infection, le phénotype de ces cellules est contrôlé par cytométrie en flux. Le tri est réussi puisque les cellules NK représentent près de 98% de la population lymphocytaire (*Figure 4A*) et contiennent plus de 90% de cellules 8C11⁻ EB6⁺. La présence des lentivirus ne diminue pas la viabilité des lymphocytes et l'infection a fonctionné pour chacun des trois lentivirus puisque des cellules NK GFP⁺ sont observées (16% à 23% selon les lentivirus, *Figure 4B*). Malheureusement, la fréquence des cellules NK KIR2DS1⁺ ne diminue pas et les cellules GFP⁺ sont toutes EB6⁺ et ce quel que soit le lentivirus utilisé (*Figure 4B*). L'extinction de l'expression du KIR2DS1 par le mécanisme d'ARN interférence ne semble donc pas fonctionner avec les trois premiers lentivirus shRNA testés.

IV. Conclusion

Afin de mieux comprendre le rôle du KIR2DS1, la technique d'ARN interférence a été utilisée afin d'éteindre son expression. Ce choix repose sur une étude publiée décrivant l'utilisation de cette approche pour éteindre l'expression du NKG2D (Karimi *et al.* 2005). Aucune étude similaire basée sur l'ARN interférence n'a été reportée jusque là pour l'étude des KIR. Nous avons donc du mettre intégralement en place un tel protocole. Cinq lentivirus contenant une séquence shRNA spécifique des ARN messagers KIR2DS1 ont ainsi été produits et un protocole d'infection utilisant des cellules NK KIR2DS1⁺ triées et amplifiées a été mis en place. Les lentivirus infectent en effet beaucoup mieux les cellules

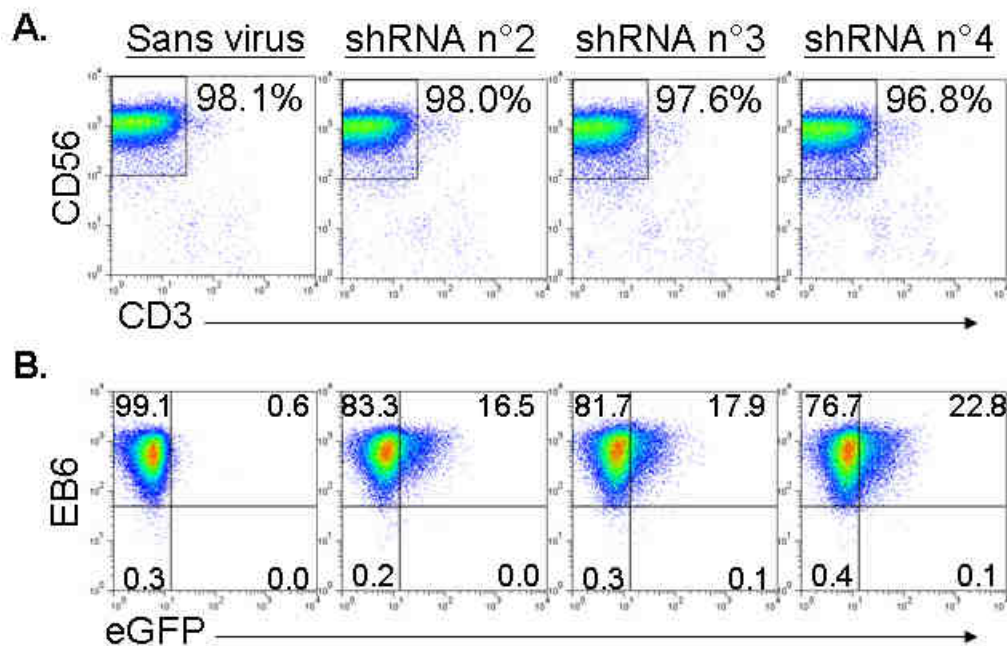


Figure 4. Infection des cellules NK KIR2DS1⁺ triées et amplifiées par différents lentivirus

Les cellules NK KIR2DS1⁺ (NKp46⁺ 8C11⁻ EB6⁺) d'un donneur KIR2DL1⁻ KIR2DS1⁺ sont triées puis amplifiées grâce à des cellules nourricières irradiées. Après 5 jours d'amplification, les cellules triées ont été infectées à 20 MOI par différents lentivirus (sans virus, lentivirus 2, 3 et 4) puis phénotypées 5 jours après l'infection. A. Les density plots correspondent au marquage CD3, CD56 obtenu à partir de la population lymphocytaire totale. Les pourcentages de cellules NK (CD3⁻ CD56⁺) sont similaires quelque soit la condition. B. Les density plots correspondent au marquage EB6 associé à la fluorescence de la GFP. Le donneur ne possède pas le gène KIR2DL1 donc les cellules NK EB6⁺ sont toutes KIR2DS1⁺. Le pourcentage de cellules infectées (eGFP⁺) est similaire pour les trois lentivirus testés, mais aucune diminution de l'expression du KIR2DS1 n'est observée.

en pleine division, et c'est le cas des cellules triées puis stimulées, que les cellules au repos (Micucci *et al.* 2006). Si de bonnes conditions d'infection ont pu être définies, nous n'avons observé aucune diminution de l'expression du KIR2DS1 via les shRNA testés, aussi bien sur PBMC au repos que sur cellules triées puis stimulées.

Plusieurs hypothèses peuvent être émises pour expliquer cette absence de diminution de l'expression du KIR2DS1 avec les lentivirus utilisés. Tout d'abord, nous n'avons peut être pas choisi les bons shRNA et il faudra donc en définir de nouveaux. Il est également possible que la quantité de siRNA reste trop faible pour permettre le phénomène d'ARN interférence. Si c'est le cas, deux infections successives permettraient peut être d'apporter un nombre suffisant de copies des séquences shRNA pour éteindre l'expression du KIR2DS1. Une autre hypothèse est que la protéine adaptatrice DAP12 transduisant le signal lorsque le récepteur est engagé pourrait stabiliser l'expression du KIR2DS1 à la surface. En effet, l'expression du NKG2D a été éteinte avec succès mais l'extinction de la protéine adaptatrice du NKG2D, DAP10, a permis une meilleure extinction de l'expression du NKG2D à la surface des cellules (Karimi *et al.* 2005). Il est donc envisageable que l'extinction de l'expression du KIR2DS1 ne soit possible qu'en absence d'expression de DAP12. Cependant, la protéine adaptatrice DAP12 s'associe à d'autres récepteurs activateurs et joue un rôle dans de nombreuses voies moléculaires. L'extinction de DAP12 en parallèle à KIR2DS1 pourrait biaiser l'interprétation fonctionnelle de l'extinction de l'expression du KIR2DS1.

Seulement trois lentivirus (sur les cinq produits) contenant une séquence shRNA ont pu être testés jusqu'ici suite aux problèmes techniques rencontrés lors de la mise en place de cette technique. Si après avoir essayé les deux derniers lentivirus, aucune

extinction de l'expression du KIR2DS1 n'était observée malgré une infection correcte des cellules NK KIR2DS1⁺, de nouveaux shRNA pourraient être définis. Mais, vu la lourdeur du protocole d'infection, ils pourraient tout d'abord être testés cette fois-ci via un protocole d'extinction transitoire utilisant des siRNA de synthèse incubés avec les cellules d'intérêt avant de lancer une production coûteuse de nouveaux lentivirus. L'obtention d'un lentivirus permettant l'extinction non transitoire de l'expression du KIR2DS1 devrait ainsi permettre d'utiliser les cellules infectées pour des études fonctionnelles (dégranulation et production d'IFN- γ) et dans le modèle *in vitro* d'amplification des cellules NK afin de mieux comprendre l'impact de ce récepteur activateur sur l'alloréactivité des cellules NK. En effet, les cellules NK qui expriment à la fois le KIR2DL1 et le KIR2DS1 sont difficiles à étudier pour le moment faute d'outils. Or, chez un individu C2⁺, les cellules NK KIR2DL1⁺ sont fonctionnelles alors que les cellules NK KIR2DS1⁺ ne le sont pas. Il est donc logique de se demander comment les cellules NK qui co-expriment ces deux récepteurs chez un individu C2⁺ vont se comporter vis-à-vis d'une cellule cible exprimant leur ligand. En éteignant l'expression du KIR2DS1, il sera ainsi possible de déterminer son impact fonctionnel sur ces cellules NK. Il pourrait également être intéressant de déterminer, chez un donneur C1C2, l'impact d'un KIR2DS1 sur la tolérance des cellules NK potentiellement éduquées par un KIR inhibiteur tel que KIR2DL3 (*Figure 5*) puisqu'une étude récente montre un rôle du KIR2DS1 dans l'éducation des cellules NK (Fauriat *et al.* 2009). Il est envisageable que l'extinction de l'expression du KIR2DS1 augmente la cytotoxicité de ces cellules, ce qui confirmerait la réversibilité de la tolérance au soi médiée par les KIR activateurs.

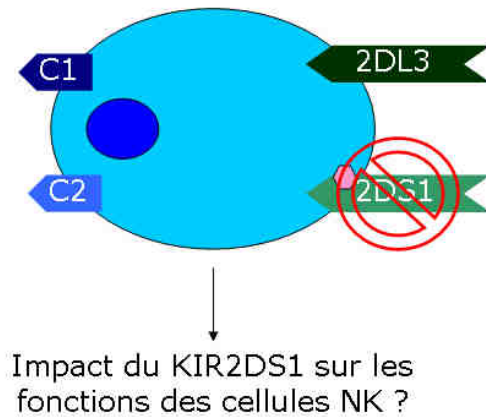


Figure 5. Etude du rôle du KIR2DS1 par l'approche d'ARN interférence

L'objectif des études à venir est d'éteindre l'expression du KIR2DS1 afin de déterminer son impact sur les cellules NK exprimant d'autres KIR, comme le KIR2DL3. Chez un donneur C1C2, une cellule NK KIR2DS1⁺ KIR2DL3⁺ est éduquée grâce à l'interaction entre son KIR inhibiteur et le ligand C1 et rendue tolérante via l'engagement de son KIR activateur avec le ligand C2. Cette tolérance est-elle réversible si le KIR2DS1 n'est plus exprimée ?

RESULTATS

PROJET N°4 : FONCTIONS DES CELLULES NK KIR3DS1⁺

Les fonctions des cellules NK KIR3DL1⁺ et KIR3DS1⁺ sont régulées différemment par les molécules HLA-Bw4 et l'expression du KIR3DS1 est induite sur les cellules activées

« 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 »

Maelig Morvan, Catherine Willem, Katia Gagne, Nolwenn Kerdudou, Gaelle David, Véronique Sébille, Gilles Folléa, Jean-Denis Bignon et Christelle Retière

The Journal of Immunology (2009), 182 : 6727-6735

Le locus *KIR3DL1/S1* est le plus étudié des loci *KIR* et il est très polymorphique puisque 52 allèles *KIR3DL1* (codant pour 46 protéines différentes et un allèle nul) et 14 allèles *KIR3DS1* (codant pour 12 protéines différentes et un allèle nul) ont été décrits pour le moment (<http://www.ebi.ac.uk/ipd/kir/>). La forme inhibitrice (*KIR3DL1*) et la forme activatrice (*KIR3DS1*) sont en effet des allèles du même gène. L'expression du *KIR3DL1* à la surface des cellules NK peut être détectée par cytométrie de flux grâce aux anticorps DX9 et Z27. Récemment, il a été montré que le Z27, mais pas le DX9, reconnaissait également le *KIR3DS1* à une faible intensité de fluorescence (Pascal *et al.* 2007). Les populations NK *KIR3DS1*⁺ sont donc DX9⁻, Z27⁺ alors que les cellules NK *KIR3DL1*⁺ sont DX9⁺, Z27⁺. De plus, l'intensité de fluorescence du marquage avec l'anticorps Z27 permet de distinguer 3 groupes d'allèles *KIR3DL1* : Z27^{high} (forte intensité de fluorescence), Z27^{low} (intensité de fluorescence plus basse) et Z27^{null} (pas d'expression de *KIR3DL1* à la surface des cellules). La population Z27^{dim} (très faible intensité de fluorescence) correspond aux cellules *KIR3DS1*⁺.

Les ligands du récepteur *KIR3DL1* sont connus : il s'agit des molécules HLA de classe I du groupe A et B qui présentent un motif Bw4 des résidus 77 à 83, avec une isoleucine ou une thréonine en position 80 (Gumperz *et al.* 1997). Ce n'est pas le cas du *KIR3DS1* dont le ligand est toujours inconnu, même si la très forte homologie de son domaine extracellulaire avec celui du *KIR3DL1* (>97%) ainsi que certaines associations reportées au niveau génétique suggèrent fortement qu'il s'agit des molécules HLA de classe I présentant un motif Bw4 avec une isoleucine en position 80 (Bw4*80I).

En effet, tout comme l'association d'un allèle *KIR3DL1*^{high} avec son ligand Bw4*80I est protectrice contre la protection du VIH (Martin *et al.* 2007), le rôle protecteur

de la présence du KIR3DS1 a été souligné au niveau génétique dans certaines infections. C'est le cas du virus de l'hépatite C mais aussi et surtout du VIH où des associations protectrices entre le KIR3DS1 et son ligand potentiel Bw4*80I ont été reportées (Martin et al. 2002; Qi *et al.* 2006), même s'il existe d'autres études contradictoires (Gaudieri *et al.* 2005). De plus, au laboratoire, une association génétique a pu être mise en évidence dans le contexte de la greffe, qui suggère un rôle délétère du KIR3DS1 du donneur en absence de Bw4 chez le receveur (Gagne *et al.* 2009).

Des expériences *in vitro* ont également permis de mettre en évidence que cette association KIR3DS1/Bw4*80I avait des répercussions fonctionnelles puisque les cellules NK de ces individus présentaient un potentiel cytotoxique et une production de cytokines plus importants (Long *et al.* 2008) et qu'elles étaient capables d'inhiber la réplication du VIH (Alter *et al.* 2007). Néanmoins, la majorité des précédentes études n'a pas permis de mettre en évidence d'interaction avec ce ligand potentiel du KIR3DS1, sans doute à cause de l'utilisation de modèles trop éloignés de la réalité *in vivo*, comme des tétramères Bw4 (Gillespie *et al.* 2007), des protéines de fusion Ig ou CD3 ζ (Carr *et al.* 2007; Trundley *et al.* 2007) ou bien encore des NKL transfectées par KIR3DS1 (Alter *et al.* 2007).

L'approche qui a été utilisée dans ce projet est donc originale puisqu'elle consiste pour la première fois à cibler directement les cellules NK KIR3DS1⁺ (DX9⁻, Z27^{dim}) à partir d'individus dont le génotype KIR et HLA est connu. L'interaction du KIR3DL1 avec son ligand Bw4 est connue et conduit à une inhibition des cellules NK. L'objectif de cette étude est donc de comparer les fonctions des cellules NK KIR3DL1⁺ bien caractérisées à celles des cellules NK KIR3DS1⁺ mal définies.

Tout d'abord, les résultats phénotypiques de cette étude nous ont permis de montrer que le KIR3DS1 pouvait être exprimé selon trois profils bien différents. Si l'un de ces profils permet d'observer une population NK KIR3DS1⁺ bien distincte de la population négative, ce n'est pas le cas des deux autres où la population KIR3DS1⁺ est soit d'une intensité si faible qu'elle ne se détache pas de la population positive, soit complètement absente. Additionnés aux données supplémentaires de cet article qui montrent des variations importantes de fréquence et d'intensité d'expression selon les conditions expérimentales (congélation et décongélation ou fixation des cellules en paraformaldéhyde), ceci explique très certainement pourquoi, malgré la disponibilité d'un anticorps spécifique du KIR3DS1 (Z27), très peu d'études s'étaient focalisées jusqu'ici sur ce récepteur activateur.

Chez des donneurs pour lesquels l'expression du KIR3DS1 n'est pas détectable par cytométrie de flux sur des cellules au repos, une forte proportion de cellules NK KIR3DS1⁺ est observée après stimulation. Cette induction est observée après utilisation de différents stimuli comme des lignées cellulaires B immortalisées par le virus d'Epstein-Barr (B-EBV) déficientes ou non en molécules HLA de classe I, des lymphocytes B triés, la lignée leucémique myéloïde K562, le poly I:C et des interleukines (IL-2, IL-15). Nous avons également confirmé que les fonctions de prolifération et de cytotoxicité des cellules NK KIR3DL1⁺ étaient régulées négativement par un environnement allogénique Bw4⁺. En effet, dans un environnement allogénique où le ligand HLA-Bw4 est présent, les fonctions de prolifération et de cytotoxicité sont inhibées : la fréquence de cellules NK KIR3DL1⁺ et la dégranulation sont moins importantes après stimulation par des cellules cibles Bw4⁺ que par des cellules cibles qui sont Bw4⁻. Ce n'est pas le cas de cellules NK KIR3DS1⁺ dont l'amplification est de même importance (fréquences comparables) et la cytotoxicité n'est

pas plus augmentée lorsque les cellules cibles sont Bw4⁺ que lorsqu'elles sont Bw4⁻. Ainsi, dans les contextes étudiés, l'environnement HLA allogénique ne semble pas avoir d'impact sur les fonctions des cellules NK KIR3DS1⁺, au contraire de celles qui expriment le KIR3DL1 dont les fonctions sont inhibées en présence du ligand HLA-Bw4.

Pour finir cette étude, la présence du ligand autologue ayant une influence sur la fréquence des populations NK KIR⁺ correspondantes (Yawata *et al.* 2006), l'impact des molécules HLA autologues présentant un motif Bw4 sur la fréquence des cellules NK KIR3DS1⁺ a été testé statistiquement sur le panel des donneurs de sang volontaires du laboratoire. Nous avons observé que la fréquence des cellules NK KIR3DS1⁺ déterminée *ex vivo* à partir des PBMC de notre panel était plus importante lorsque ces donneurs possédaient des molécules HLA-B avec un motif Bw4, ces résultats étant confirmés également avec l'intensité d'expression du KIR3DS1.

Toutes ces données suggèrent que le KIR3DS1 n'est pas impliqué dans la reconnaissance du non soi par les cellules NK et n'interagit pas avec les molécules HLA-Bw4 dans un contexte physiologique. Nous avons ainsi amélioré notre compréhension du rôle des cellules NK KIR3DS1⁺ dans l'alloréactivité NK et le contrôle des infections virales.

Phenotypic and Functional Analyses of KIR3DL1⁺ and KIR3DS1⁺ NK Cell Subsets Demonstrate Differential Regulation by Bw4 Molecules and Induced KIR3DS1 Expression on Stimulated NK Cells¹

Maelig Morvan,* Catherine Willem,* Katia Gagne,*[†] Nolwenn Kerdudou,* Gaëlle David,* Véronique Sébille,[‡] Gilles Folléa,* Jean-Denis Bignon,*[†] and Christelle Retière^{2*}

Recently, the Z27 mAb was shown to recognize the NK cell-activating receptor KIR3DS1, and several genetic studies suggest that the most probable ligands of KIR3DS1 are HLA class I molecules with the Bw4 motif. Despite these findings, the attempts to establish a functional interaction between KIR3DS1 and its potential ligand have been unsuccessful. Here, we study the proliferation and cytotoxicity of KIR3DS1⁺ NK cells, compared with KIR3DL1⁺ NK cells, according to the Bw4⁺ or Bw4⁻ allogeneic environment. Our results show for the first time that KIR3DS1 expression on NK cells can be induced after exposure to stimulator cells (221, K562, EBV-B cell lines, and B cells), polyinosinic-polycytidylic acid, IL-15, or IL-2. Furthermore, whereas KIR3DL1⁺ NK cell proliferation and cytotoxicity were inhibited in a Bw4⁺ but not a Bw4⁻ context, KIR3DS1⁺ NK cell functions were not influenced by the presence of Bw4 on target cells. Nevertheless, despite the absence of demonstrated regulation of KIR3DS1⁺ NK cell functions by HLA-Bw4 molecules, we found a higher KIR3DS1⁺ NK cell frequency and higher levels of KIR3DS1 expression in Bw4⁺ compared with Bw4⁻ individuals. Altogether, these results suggest that KIR3DS1 does not recognize HLA-Bw4 molecules in a physiological context, and they highlight the induced expression of KIR3DS1 observed on stimulated NK cells and the higher frequency of KIR3DS1⁺ NK cells in Bw4⁺ individuals. Because a protective *KIR3DS1-Bw4* association has been reported in viral infections, our results further the understanding of the role of KIR3DS1⁺ NK cells in controlling viral infections. *The Journal of Immunology*, 2009, 182: 6727–6735.

Essential components of the innate immune system, NK cells recognize and kill target cells with absent or altered expression of HLA class I molecules. This missing self recognition makes NK cells able to eliminate tumoral and virus-infected cells that lack self HLA class I molecules (1). Furthermore, in the allogeneic context of hematopoietic stem cell transplantation, NK cells from the donor can be alloreactive against recipient cells (2–4). This NK cell alloreactivity is mediated by a balance between activating and inhibitory signals (5) and leads to cytotoxicity and production of proinflammatory cytokines, such as IFN- γ (6). Receptors of HLA class I molecules involved in recognition of target cells partly belong to the killer cell Ig-like receptor (KIR)³ family (7), which consists of 14 genes and 2 pseudogenes located on chromosome 19q13.4 (8).

Within this cluster, some *KIR* genes display an allelic variability with phenotypic and functional consequences.

The *KIR3DL1/S1* locus presents a high degree of polymorphism (66 alleles) and is the most studied of the *KIR* loci (<http://www.ebi.ac.uk/ipd/kir/>). The receptors encoded by this gene have three extracellular Ig-like domains. KIR3DL1-inhibitory receptor has a long intracytoplasmic tail, containing an ITIM (9). On the contrary, KIR3DS1-activating receptor possesses a short intracytoplasmic tail and present a charged residue within its transmembrane domain that is responsible for its interaction with the activating adaptor protein DAP12 (10).

The expression of KIR3DL1, can be revealed by the binding of two mAbs, DX9 and Z27, with three levels of fluorescence intensity reflecting the receptor density at the cell surface: high (*KIR3DL1**001, *002, *008, and *015 alleles); low (*KIR3DL1**005, *006, and *007 alleles); and null (*KIR3DL1**004 allele) (11–13). KIR3DL1 binds HLA class I molecules, from the HLA-A and HLA-B groups, having the serological motif Bw4 between positions 77 and 83: IALR (Bw4*80I), or TALR and TLLR (Bw4*80T; see Refs. 14 and 15). *KIR3DL1* allelic diversity, HLA-Bw4 motif variability, and the loaded peptide sequence may be responsible for differential binding in this KIR-HLA interaction (15, 16). For example, highly expressed *KIR3DL1* allotypes are stronger inhibitory receptors (17), and the Bw4*80I motif has a better affinity for KIR3DL1 than other Bw4 motifs (18). In addition, KIR3DL1⁺ NK cells are only functional in Bw4⁺ individuals (19–21).

Contrary to KIR3DL1, which recognizes HLA-Bw4 molecules, the ligand of KIR3DS1 is not determined, whereas a strong homology in their extracellular domain (>97%). Indeed, HLA-Bw4 tetramers loaded with various peptides did not succeed in binding

*Etablissement Français du Sang, Université de Nantes, ImmunoVirologie et Polymorphisme Génétique, EA4271, Nantes, France; [†]Laboratoire d'Histocompatibilité, Etablissement Français du Sang, Nantes, France; and [‡]Université de Nantes, Biostatistique, Recherche Clinique et Mesures Subjectives en Santé, EA4275, Faculté de Pharmacie, Nantes, France

Received for publication January 21, 2009. Accepted for publication March 23, 2009.

The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. This article must therefore be hereby marked *advertisement* in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

¹ This work was supported by Etablissement Français du Sang, Université de Nantes, Ligue contre le Cancer, and Nantes Atlantique Greffe de Moelle Osseuse association. M.M. is a Ph.D. candidate supported by Comité Départemental de Loire-Atlantique de la Ligue contre le Cancer.

² Address correspondence and reprint requests to Dr. Christelle Retière, EA4271 ImmunoVirologie et Polymorphisme Génétique, Etablissement Français du Sang, 34 Boulevard Jean Monnet, Nantes, F-44011 Cedex, France. E-mail address: christelle.retiere@efs.sante.fr

³ Abbreviations used in this paper: KIR, killer-Ig like receptor; MFI, mean channel fluorescence intensity; poly(IC), polyinosinic-polycytidylic acid.

Copyright © 2009 by The American Association of Immunologists, Inc. 0022-1767/09/\$2.00

to KIR3DS1 (22). This absence of interaction in vitro does not exclude protection by the *KIR3DS1-Bw4* association as suggested by genetic studies for the acute hepatitis C virus (23, 24), the human papillomavirus (25, 26), and HIV-1 infections (27–29). The recent findings showing that KIR3DS1 is actually expressed on the cell surface and is detectable by flow cytometry with the KIR3DL1/S1-specific mAb, Z27, at a very low intensity of fluorescence (30–33), led to study KIR3DS1 expression and to investigate a potential interaction between KIR3DS1 and HLA-Bw4. Then, higher levels of KIR3DS1 expression were observed in HIV-1-exposed uninfected individuals (34), and a protective effect of the *KIR3DS1* and *HLA-Bw4*80I* association was shown on the inhibition of HIV replication in T cells mediated by autologous NK cells (35), without demonstrating a functional interaction between KIR3DS1 and HLA-Bw4 molecules.

The absence of an established and functional KIR3DS1-HLA-Bw4 interaction may be explained in part by the experimental approaches used, which were based on a KIR3DS1-transfected NKL cell line (35), Bw4⁺ tetramers (22), or KIR3DS1 fusion proteins (30, 33). Thus, in this study, we investigated directly KIR3DS1⁺ NK cells by flow cytometry from *KIR*- and *HLA*-genotyped PBMCs. Taking into account *KIR3DL1*, *KIR3DS1*, and *Bw4*, we studied frequencies, proliferation, and cytotoxic potential of this KIR3DS1⁺ NK cell population in parallel to the well-characterized KIR3DL1⁺ NK cell population in different Bw4⁺ and Bw4⁻ allogeneic environments.

Materials and Methods

Cells (PBMCs and cell lines)

PBMCs were isolated from citrate-phosphate-dextrose blood from healthy adult volunteers by gradient centrifugation on Ficoll-Hypaque (Lymphoprep, Axis-Shield; PoC). All blood donors were recruited at the Blood Transfusion Center (Établissement Français du Sang, Nantes, France) and informed consent was obtained from all individuals. EBV-B cell lines were obtained by EBV transformation of peripheral B cells using EBV supernatant harvested from the cell line B95-8 (American Type Culture Collection). FEB and DAX, both principal EBV-B cell lines used in the study, were obtained from two different HLA-typed blood donors: FEB (HLA-A*01:01; -B*08:08; -Cw*07:07) and DAX (HLA-A*02:03; -B*44:04; -Cw*05:05). B cells were isolated from PBMCs obtained from healthy individuals as described previously (36). HLA class-I deficient 721.221 lymphoblastoid EBV-B cells, referred to as 221 cells, and HLA class I-deficient immortalized myelogenous leukemia line K562 were used as controls in functional assays. The 221 cell line and B*1513- and B*3901-transfected 221 cells (respectively named 221-Bw4 and 221-Bw6) were used to assess NK cell cytotoxicity in functional assays. Cells were cultured in RPMI 1640 (Life Technologies) containing glutamine (Life Technologies) and penicillin-streptomycin (Life Technologies) and supplemented with 10% FBS (Life Technologies).

HLA and KIR genotyping

Genomic DNA was extracted from PBMC (37) and *HLA-A* and *-B* genes and *KIR3DL1/S1* gene were typed via molecular techniques using PCR-sequence-specific primers methods under the conditions recommended by the manufacturers, as described previously (38, 39).

In vitro model of NK cell expansion

Amplification of NK cells was evaluated using an in vitro model based on a protocol described previously (36). Briefly, PBMC were cultured with irradiated allogeneic EBV-B cell lines at a ratio (PBMC:EBV-B cells) of 10:1, in CellGro SCGM medium (CellGenix) containing 10% human AB serum, 50 U/ml penicillin (Life Technologies), 50 µg/ml streptomycin (Life Technologies), and 150 IU/ml IL-2 (Chiron). Cell phenotyping was performed for all conditions of stimulation at days 0, 6, 9, and 16. To assess different stimuli, PBMCs were equally stimulated by irradiated B cells or K562 cells at the same PBMC-stimulator cell ratio (10:1), IL-15 at 5 ng/ml or polyinosinic-polycytidylic acid (poly(IC)) at 50 µg/ml.

Phenotypic analysis by flow cytometry

Cell surface phenotype was determined by four-color flow cytometry using the following mouse anti-human mAbs: anti-KIR3DL1/S1-PE (Z27), anti-KIR3DL1-FITC (DX9) (Beckman Coulter, Immunotech), anti-CD3-PerCP (SK7), and anti-CD56-allophycocyanin (B159), from BD Biosciences. Anti-NGK2A (Z199; Beckman Coulter, Immunotech) mAb was labeled with the FITC fluorochrome before use. Cells were also stained with the corresponding isotype-matched control mAb. Results were expressed as percentages of NK cells expressing KIR3DL1 (CD3⁻CD56⁺Z27^{high/low}) or KIR3DS1 (CD3⁻CD56⁺Z27^{dim}). The purity of sorted B cells was checked using the anti-CD19 (HIB19; BD Biosciences) mAb. Data were collected using a FACSCalibur (BD Biosciences) and analyzed using FlowJo 6.2 software (TreeStar).

CD107a mobilization detected by flow cytometry

KIR3DS1⁺ and KIR3DL1⁺ NK cell subsets were tested for their cytolytic potential with the CD107a mobilization assay after stimulation with 221, K562, 221-Bw4 (B*1513), and 221-Bw6 (B*3901) cell lines. Preincubated NK cells with CD107-PECy5 or CD107a-FITC (H4A3; BD Biosciences) were incubated with the different target cells for 5 h at an E:T ratio of 1:1, with brefeldin A (Sigma-Aldrich) at 10 µg/ml for the last 4 h. The cells were surface stained with Z27-PE, NKG2A-FITC, and NKp46-allophycocyanin (9E2; BD Biosciences) or Z27-PE, CD3-PerCP, and NKG2A-allophycocyanin (131411; R&D Systems). Degranulation (CD107a expression) of Z27⁺NKG2A⁻ cells was studied by four-color flow cytometry, using NKp46-allophycocyanin-specific mAb to target NK cells with the fourth fluorophore. Data were collected using a FACSCalibur and analyzed using FlowJo 6.2 software.

Statistical analyses

Repeated-measures ANOVA using linear mixed models described previously (36) were used to examine changes in NK cell frequency over time and across EBV-B cell lines (FEB and DAX). *p* values <0.05 were considered to be statistically significant. Comparisons of KIR3DS1⁺ and KIR3DL1⁺ NK cell frequencies from two different series of individuals were performed using Student's *t* tests. Values of *p* < 0.05 were considered to be statistically significant.

Results

Induction of KIR3DS1 expression on stimulated NK cells

Three different patterns of KIR3DS1 expression could be observed on resting NK cells from *KIR3DS1*⁺-genotyped individuals by flow cytometry as illustrated in Fig. 1A; a Z27^{dim} population clearly distinguished itself from the Z27⁻ population, evaluated by an isotype control for individual D1, a lower Z27^{dim} population associated with the Z27⁻ population for individual D2, and no Z27^{dim} population for individual D3. In this study, we compared the frequencies of NK cells (CD3⁻CD56⁺) expressing KIR3DS1 (Z27^{dim}) by flow cytometry on resting cells (day 0) and cells stimulated (day 9) by allogeneic EBV-B cell lines. The study was conducted using PBMCs from healthy individuals for whom the *KIR3DL1/S1* gene is presented in Table I. In *KIR3DL1*⁻/*S1*⁺ individuals illustrated by D4 (Fig. 1B), KIR3DS1 expression was weak and difficult to determine on resting NK cells (3.2%). However, after stimulation of D4 PBMC, the KIR3DS1 receptor was expressed on a high proportion of NK cells (38.2%) at a low fluorescent intensity. As a control, in the *KIR3DL1*⁺/*S1*⁻ individual D5 (Fig. 1B), no Z27^{dim} population was detectable in resting and stimulated NK cells (CD3⁻CD56⁺). Because KIR3DS1 is expressed on a large proportion of stimulated NK cells from individuals whose resting NK cells do not express KIR3DS1 (Fig. 1C), KIR3DS1 expression is induced on the stimulated NK cell surface. KIR3DS1 expression after stimulation by allogeneic EBV-B cells displayed a peak at ~9 days (data not shown) in all *KIR3DS1*⁺/*KIR3DL1*⁻ or *KIR3DS1*⁺/*KIR3DL1*^{mut} individuals studied (*n* = 5; Fig. 1D). This increased KIR3DS1⁺ NK cell frequency after allogeneic EBV-B cell stimulation was also observed for all *KIR3DL1*⁺/*S1*⁺ individuals (*n* = 5) who expressed KIR3DL1 receptor with a low or high mean fluorescence intensity (Fig. 1E).

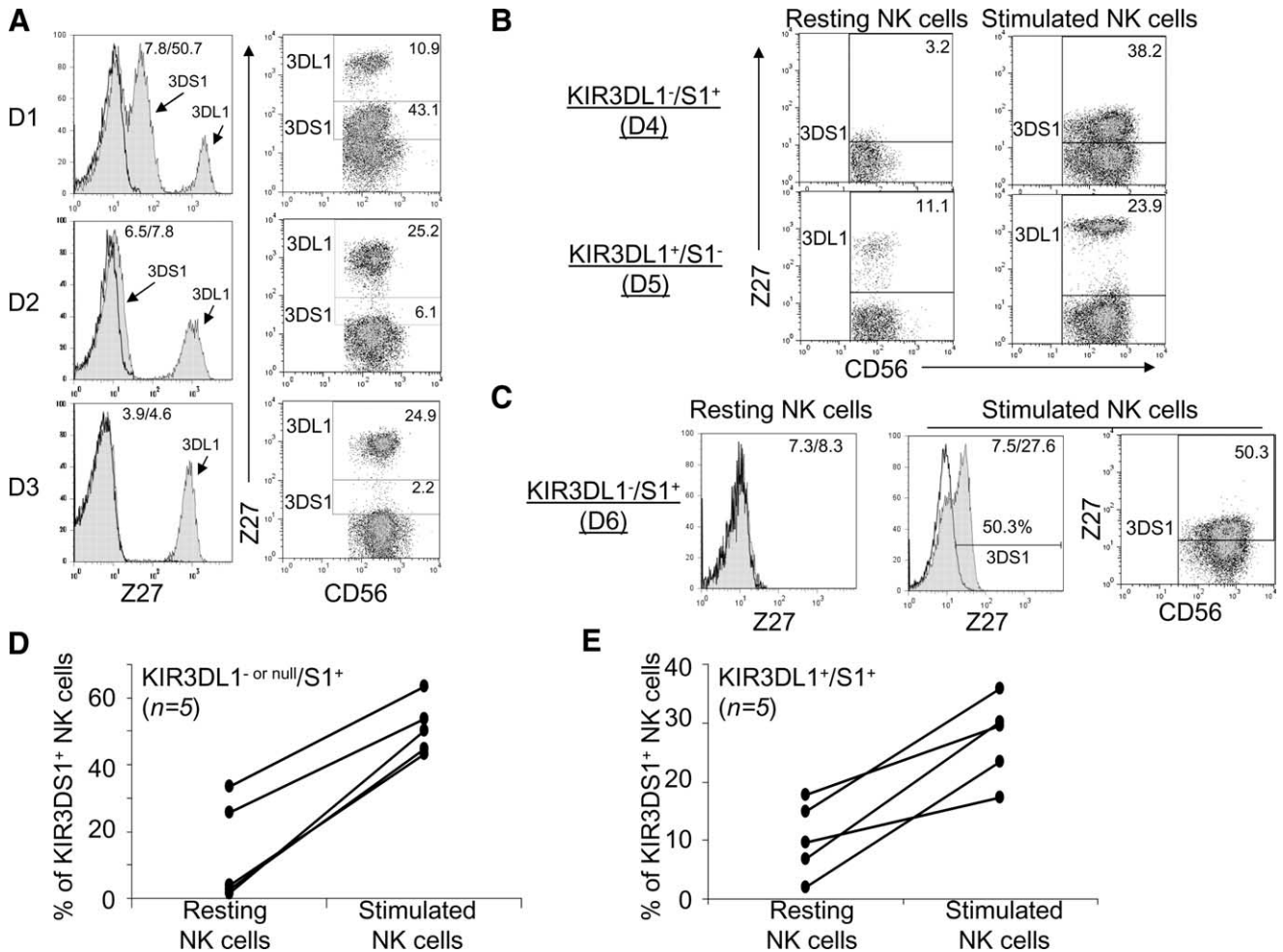


FIGURE 1. Induction of KIR3DS1 expression on NK cells. **A**, Three different patterns of KIR3DS1 expression were observed on resting NK cells from *KIR3DS1*⁺-genotyped individuals by flow cytometry using Z27 mAb. Histograms and density plots are gated on CD3⁻CD56⁺ NK cells and presented for three patterns of KIR3DS1 expression on NK cells, from three representative healthy *KIR3DS1*⁺ individuals. Cells were stained with the Z27 mAb (shaded histograms) and isotype control (open histograms). MFI values obtained with the isotype control and the Z27 mAb are indicated in histograms. The percentages of KIR3DL1⁺ and KIR3DS1⁺ NK cell subsets are indicated in the density plots. **B–E**, PBMCs were stimulated with an irradiated allogeneic EBV-B cell line and the KIR3DL1/S1 phenotype of resting (day 0) and stimulated NK cells (day 9) was determined by flow cytometry using Z27 mAb. **B**, Density plots are gated on resting or stimulated CD3⁻CD56⁺ NK cells. Data are from a *KIR3DL1*⁻/*S1*⁺ genotyped individual D4 and a *KIR3DL1*⁺/*S1*⁻ genotyped individual D5. The percentages of KIR3DL1⁺ and KIR3DS1⁺ NK cell subsets are indicated in the density plots. **C**, Histograms are gated on resting or stimulated CD3⁻CD56⁺ NK cells. Cells were stained with the Z27 mAb (shaded histograms) and isotype control (open histograms). MFI values obtained with the isotype control and the Z27 mAb are indicated in histograms. A density plot is gated on stimulated CD3⁻CD56⁺ NK cells. The percentage of KIR3DS1⁺ NK cell subset is indicated. Data are from a single individual representative of four (D4, D6, D8, and D14). **D**, KIR3DS1⁺ NK cell (CD3⁻CD56⁺) frequency was determined for five *KIR3DL1*⁻ or null (D4 and D6–D9) and **E**, five *KIR3DL1*⁺ (D10–D14) individuals on resting NK cells and allogeneic EBV-B cell-stimulated NK cells.

Induction of KIR3DS1 expression on NK cells by various stimuli

Because cell phenotype can be modified by cryopreservation and fixation, we investigated both parameters on KIR3DS1 expression. Interestingly, we observed a lower KIR3DS1⁺ NK cell frequency after one night and even 1 h of culture after thawing PBMCs in comparison with KIR3DS1⁺ NK cells freshly isolated from peripheral blood, as illustrated for individual D15 (supplemental Fig. S1A).⁴ In addition, cell fixation with 1% PFA before flow cytometric acquisition had a deleterious impact on KIR3DS1⁺ NK cell frequency in freshly isolated and thawed cells (supplemental Fig. S1A). These results were confirmed in 10 *KIR3DS1*⁺ genotyped individuals (D1, D2, and D15–D22, supplemental Fig. S1, B and C). Thus, to investigate the impact of different stimuli on KIR3DS1⁺ NK cell frequency, we performed the study from over-

night cultured PBMCs after thawing and determined the KIR3DS1⁺ NK cell phenotype without cell fixation. Given that EBV-B cell stimulation of PBMCs induced a large increase in KIR3DS1⁺ NK cell frequency, we assessed the impact of other stimuli on this latter cell population. To determine the impact of EBV on KIR3DS1 expression by NK cells, PBMC stimulations by an EBV-B cell line and their non-EBV-transformed counterpart cells were compared from four *KIR3DS1*⁺ genotyped individuals (D4, D13, D14, and D23). A high frequency of KIR3DS1⁺ NK cells was observed with EBV-B cells and B cells (Fig. 2, A and B) despite a less significant NK cell expansion with B cells (data not shown). Likewise, as illustrated for the *KIR3DL1*⁻/*S1*⁺ individual D17 in Fig. 2C, we studied the impact of the myelogenous K562 cell line in comparison with the lymphoblastoid EBV-B 721.221 cell line (221), poly(IC), and IL-15, on KIR3DS1 expression on NK cells from six

⁴ The online version of this article contains supplemental material.

Table I. HLA-Bw4 molecules and KIR3DL1/S1 genotypes of studied individuals

Individual	HLA Typing ^a				No. of HLA-Bw4	KIR Typing	
	A*	A*	B*	B*		3DL1	3DS1
D1	0101	2402	0801	3906	1	+	+
D2	0301	2301	3508	5001	0	+	+
D3	0201	2601	1801	4002	0	+	+
D4	0101	0201	0801	5101	1	-	+
D5	0201	0301	1501	4901	1	+	-
D6	02	02	40	51	1	<i>null^b</i>	+
D7	0201	3303	4901	5801	2	<i>null^b</i>	+
D8	0201	1101	4002	4402	1	<i>null^b</i>	+
D9	0201	0201	0801	5101	1	-	+
D10	02	02	07	35	0	+	+
D11	0301	0301	0801	1801	0	+	+
D12	0201	0201	3901	4402	1	+	+
D13	0101	0201	0801	4002	0	+	+
D14	3101	6801	1801	3901	0	+	+
D15	2402	2402	4901	5101	2	<i>null^b</i>	+
D16	2402	3402	1402	3502	1	<i>null^b</i>	+
D17	0201	0201	4002	5101	1	-	+
D18	02	03	5101	5501	1	+	+
D19	0205	2402	3801	4402	3	+	+
D20	0201	2402	1801	4002	1	+	+
D21	0201	0201	1801	3501	0	+	+
D22	03	11	15	40	0	+	+
D23	0201	3301	1402	1501	0	+	+
D24	0301	2402	0702	1401	1	+	-
D25	0201	3301	5201	5801	2	+	-
D26	1101	2301	3501	4403	1	+	-
D27	0201	2402	1501	1501	1	+	-
D28	0101	0201	0702	0801	0	+	-
D29	0301	6801	3502	1501	0	+	-
D30	0201	2402	0702	4002	1	+	-

^a Genes and alleles coding for HLA-Bw4 molecules are indicated in bold.

^b *KIR3DL1* gene is detected by PCR, but the cell surface expression of KIR3DL1 receptor is not detected by flow cytometry.

KIR3DS1⁺ genotyped individuals (D2, D14–D17, and D19; Fig. 2D). As a control, PBMCs were cultured in parallel in culture medium containing IL-2. Under this condition, no NK cell amplification (6.5% of resting D17 NK cells and 4.2% of cultured D17 NK cells) was observed. In the opposite, NK cell (CD3⁻CD56⁺) frequency increased after stimulation by 221 (64.3%), K562 (76.7%), poly(IC) (18.6%), and IL-15 (28.0%). The frequency of KIR3DS1⁺ NK cells (Z27⁺DX9⁻) increased not only with stimulator cells (221 or K562) regardless of their origin (lymphoid or myeloid) but also with poly(IC) and cytokines as IL-15 and IL-2 (medium). Of note, the magnitude of this increase is variable according to the studied individuals.

Impact of the Bw4 KIR ligand on KIR3DL1⁺, but not KIR3DS1⁺, NK cell expansion in vitro

The modulation of KIR2DL1⁺ and KIR2DS1⁺ NK cell frequencies by the allogeneic C2⁺ or C2⁻ environment that we have recently shown (36) raises the possibility that the HLA-Bw4 molecule could differentially modulate the in vitro KIR3DL1⁺ and KIR3DS1⁺ NK cell expansion. Using a model of NK cell expansion in vitro described previously (36), we investigated the impact of allogeneic HLA-Bw4 ligand on the changes in KIR3DL1⁺ and KIR3DS1⁺ NK cell frequency. PBMCs from *KIR3DL1/S1* genotyped individuals were stimulated with Bw4⁻ or Bw4⁺ irradiated allogeneic EBV-B cell lines. The frequency of NK cells (CD3⁻CD56⁺) expressing KIR3DL1⁺ (Z27^{low/high}) and KIR3DS1⁺ (Z27^{dim}) was determined by flow cytometry at days 0, 6, 9, and 16 after stimulation by either Bw4⁻ or Bw4⁺ EBV-B cell lines. A higher KIR3DL1⁺ NK cell frequency was observed in the Bw4⁻ condition (42% at day 16)

than in the Bw4⁺ condition (28.7% at day 16) of stimulation as illustrated for a representative *KIR3DL1*⁺/*S1*⁺ genotyped individual D23 (Fig. 3A). However, no significant difference in KIR3DS1⁺ NK cell frequency could be detected between these two Bw4⁻ and Bw4⁺ allogeneic conditions of stimulation (18.1 and 18.6%, respectively, at day 16). To confirm this observation, the analyses were conducted in 10 healthy *KIR3DL1*⁺-genotyped individuals (D5, D11, D12, and D24–D30) for whom *KIR3DL1/S1* genes are indicated in Table I. KIR3DL1⁺ NK cell frequency was significantly higher ($p = 0.003$) after stimulation of PBMCs with the Bw4⁻ EBV-B cell line (FEB) compared with stimulation with the Bw4⁺ EBV-B cell line (DAX) (Fig. 3B). Besides, 10 *KIR3DL1*⁺-genotyped individuals were stimulated with EBV-B cell lines expressing other HLA-Bw4 allelic encoded molecules than those expressed by DAX and with other Bw4⁻ EBV-B cell lines than FEB. Changes in KIR3DL1⁺ NK cell frequency according to the presence or the absence of Bw4 confirmed that the KIR3DL1⁺ NK cell frequency observed after stimulation is higher in a Bw4⁻ than in a Bw4⁺ environment (data not shown). As regards the KIR3DS1, stimulation of PBMCs from eight individuals (D4, D7, D8, D11 to D14 and D23) by Bw4⁻ or Bw4⁺ EBV-B cell lines similarly increased KIR3DS1⁺ NK cell frequency after 9 days of culture (Fig. 3C). We can therefore conclude that the frequency of the KIR3DL1⁺ NK cell pool is higher with Bw4⁻ than with Bw4⁺ EBV-B stimulator cells. However, the frequency of KIR3DS1⁺ NK cells is similar with Bw4⁻ and Bw4⁺ allogeneic EBV-B cells, suggesting that KIR3DS1⁺ NK cells do not preferentially respond to the presence of Bw4 ligand on stimulator cells.

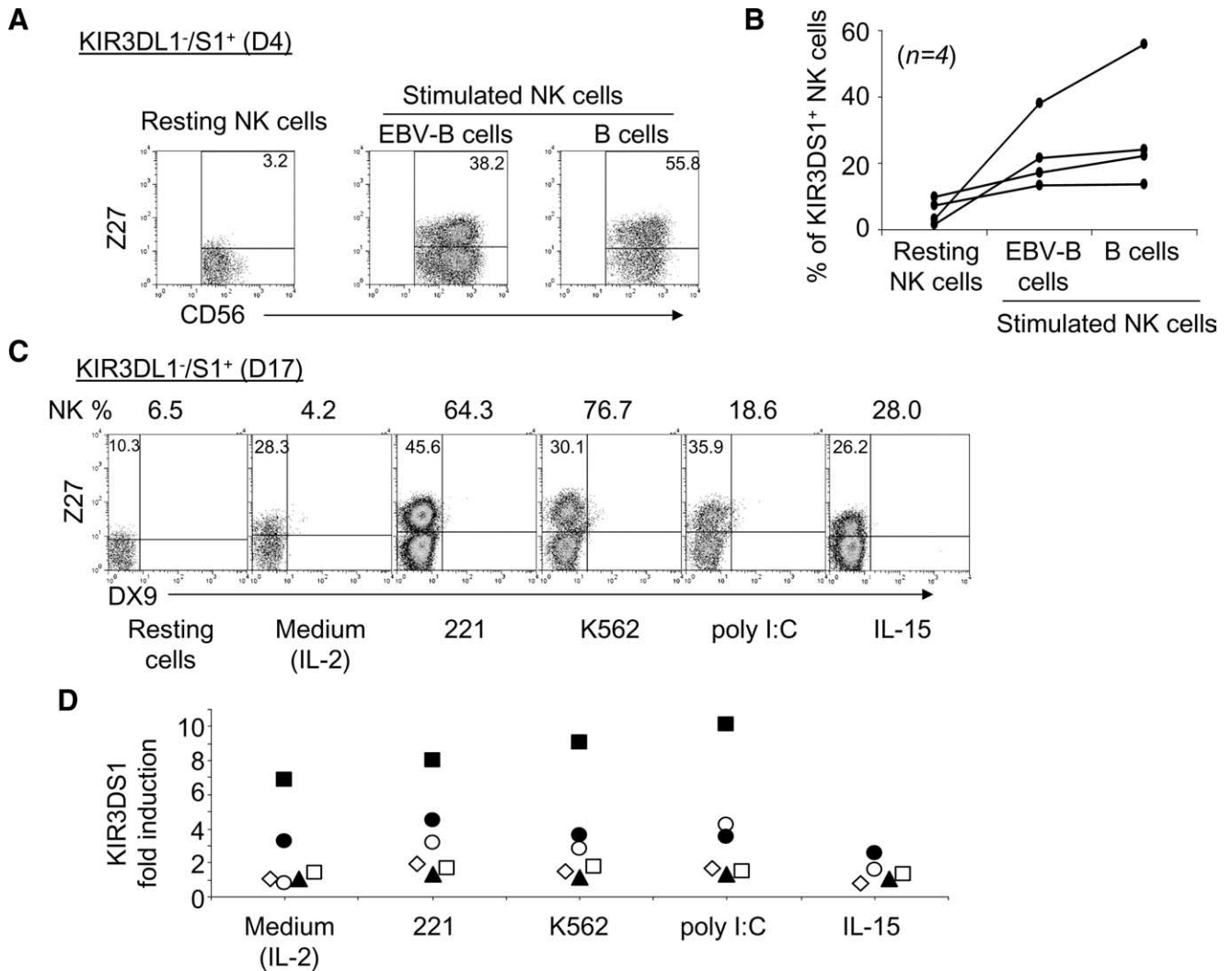


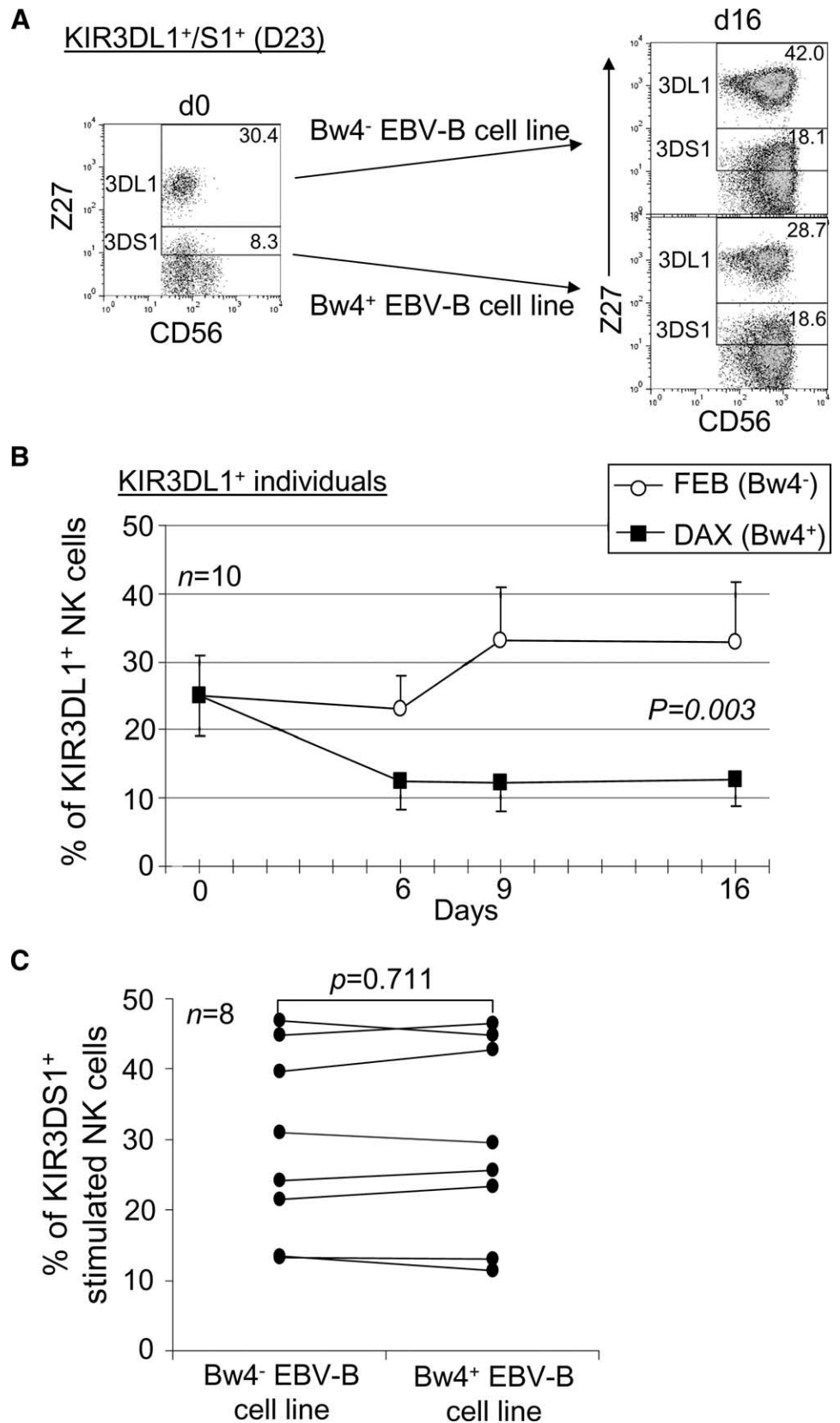
FIGURE 2. Induction of KIR3DS1 expression on NK cells by various stimuli. *A* and *B*, PBMCs from *KIR3DS1*⁺-genotyped individuals were stimulated with an allogeneic EBV-B cell line and the corresponding B cells. The KIR3DS1 phenotype of resting and stimulated NK cells (CD3⁻CD56⁺) was determined by flow cytometry using Z27 mAb. *A*, Density plots presenting percentages of the Z27⁺ cell subset are shown for resting (day 0) and stimulated (day 9) NK cells from a *KIR3DL1*⁻/*SI*⁺-genotyped individual D4. *B*, KIR3DS1⁺ NK cell (CD3⁻CD56⁺) frequencies determined for four *KIR3DS1*⁺ genotyped individuals (D4, D13, D14, and D23). *C* and *D*, PBMCs from *KIR3DS1*⁺-genotyped individuals were stimulated with culture medium (IL-2), 221, K562, poly(I:C), and IL-15. The phenotype of resting and stimulated cells was realized by flow cytometry. NK cells (CD3⁻CD56⁺) were stained with the Z27 and DX9 mAbs. *C*, Density plots presenting percentages of the KIR3DS1⁺ (Z27⁺DX9⁻) NK cell subset are shown from a representative *KIR3DL1*⁻/*SI*⁺-genotyped individual D17. *D*, KIR3DS1⁺ NK cell frequency fold induction (percentage of KIR3DS1⁺-stimulated NK cells/percentage of KIR3DS1⁺ resting NK cells) determined for six *KIR3DS1*⁺ genotyped individuals. ▲, D2; ■, D14; □, D15; ◇, D16; ●, D17; ○, D19.

In contrast to KIR3DL1⁺ NK cells, activation of KIR3DS1⁺ NK cell cytotoxicity is Bw4 independent

Because the HLA-Bw4 molecule did not influence KIR3DS1⁺ NK cell proliferation, we investigated whether this was also the case for the cytotoxic capacity of these cells. Degranulation experiments (CD107a expression), using 4-color flow cytometry, were performed from 10 *KIR3DL1*/*SI*-genotyped individuals (D1, D2, and D15 to D22) to determine the conditions of KIR3DL1⁺ and KIR3DS1⁺ NK cell cytotoxicity. First, because cell stimulation leads to induce KIR3DS1 expression on NK cells, PBMCs were amplified beforehand for 2 wk with the 221 cell line as stimulator cells to obtain a substantial KIR3DS1⁺ NK cell population. Given that CD94/NKG2A expression on KIR3DS1⁺ NK cells may inhibit the triggering signal of KIR3DS1 engagement with its ligand (40), only KIR3DS1⁺NKG2A⁻NKp46⁺ NK cells were targeted (Fig. 4A). NKp46-specific mAb was used to target NK cells with only one marker (41). Degranulation of these selected cells was

evaluated against HLA class I-deficient myeloid K562, lymphoid 221, 221-Bw6, and 221-Bw4 cell lines (Fig. 4B). As control, degranulation of KIR3DL1⁺NKG2A⁻ NK cells (Fig. 4A) was determined against the same target cells used in this cytotoxic assay (Fig. 4B). Stimulation by the 221 and K562 cell lines activated degranulation of both KIR3DS1⁺NKG2A⁻ and KIR3DL1⁺NKG2A⁻ NK cell subsets (Fig. 4B). However, while degranulation of KIR3DL1⁺NKG2A⁻ NK cells was inhibited by the 221-Bw4 cell line, no difference in degranulation of KIR3DS1⁺NKG2A⁻ NK cells was observed between stimulation with the 221-Bw4 and that with 221-Bw6 cell lines. Moreover, the same results were obtained with experiments of degranulation performed on resting KIR3DL1⁺NKG2A⁻ and KIR3DS1⁺NKG2A⁻ NK cells (data not shown), from resting PBMCs of five individuals. These degranulation assays did not allow us to ascertain a potential triggering engagement of KIR3DS1 with Bw4⁺ target cells.

FIGURE 3. Impact of the Bw4 KIR ligand on KIR3DL1⁺, but not KIR3DS1⁺ NK cell expansion in vitro. PBMCs from genotyped individuals were cultured with irradiated Bw4⁻ or Bw4⁺ EBV-B cell lines. NK cells, defined as the CD3⁻CD56⁺ population, were stained with the Z27 mAb. KIR3DS1⁺ cells were identified as the Z27^{dim} subset and KIR3DL1⁺ cells as the Z27^{low/high} subset. **A**, Density plots are gated on resting NK cells and on NK cells from KIR3DL1⁺/SI⁺-genotyped individual D23 after 16 days of stimulation by B*0801, B*0801 (Bw4⁻/Bw4⁻), or B*3501, B*4403 (Bw4⁻/Bw4⁺) EBV-B cell lines. Percentages of KIR3DL1⁺ and KIR3DS1⁺ NK cells are indicated in density plots. **B**, KIR3DL1⁺ NK cell frequencies were observed by flow cytometry for Bw4⁻ FEB and Bw4⁺ DAX EBV-B cell conditions of stimulation at days 0, 6, 9, and 16. Means and significant differences are shown for 10 KIR3DL1⁺/SI^{+/+}-genotyped individuals (D5, D11, D12, and D24–D30), $p = 0.003$. Repeated-measures ANOVA based on linear mixed models were used. **C**, D7, D8, D11, D12, and D13 PBMCs were stimulated with FEB (Bw4⁻) and DAX (Bw4⁺) EBV-B cell lines. D4 PBMCs were stimulated with B*1302, B*4402 (Bw4⁺/Bw4⁺) and B*0801, B*0801 (Bw4⁻/Bw4⁻) EBV-B cell lines. D14 PBMCs were stimulated with B*4002, B*4402 (Bw4⁻/Bw4⁺), and B*1402, B*1501 (Bw4⁻/Bw4⁻) EBV-B cell lines. D23 PBMCs were stimulated with B*3501, B*4403 (Bw4⁻/Bw4⁺) and B*0801, B*0801 (Bw4⁻/Bw4⁻) EBV-B cell lines. KIR3DS1⁺ NK cell frequencies were observed by flow cytometry for Bw4⁻ and Bw4⁺ EBV-B cell conditions of stimulation at day 9. No significant difference was observed for eight KIR3DL1^{+/+}/SI^{+/+}-genotyped individuals (D4, D7, D8, D11–D14, and D23), $p = 0.711$. A paired Student *t* test was used.



Impact of autologous Bw4 ligand on KIR3DL1 and KIR3DS1 expression by NK cells

The expression of autologous KIR ligand has been shown to have an impact on the corresponding KIR⁺ NK cell frequency in the peripheral blood (13, 19). HLA-Bw4 molecules are KIR3DL1 li-

gands, and genetic analyses have suggested that the HLA-Bw4 molecule could be the ligand of KIR3DS1. Thus, we hypothesized that the presence of HLA-Bw4 could influence the frequency of KIR3DS1⁺ NK cells, compared with KIR3DL1 as control. Phenotypic analyses were performed on KIR3DL1⁺ ($n = 53$) and/or

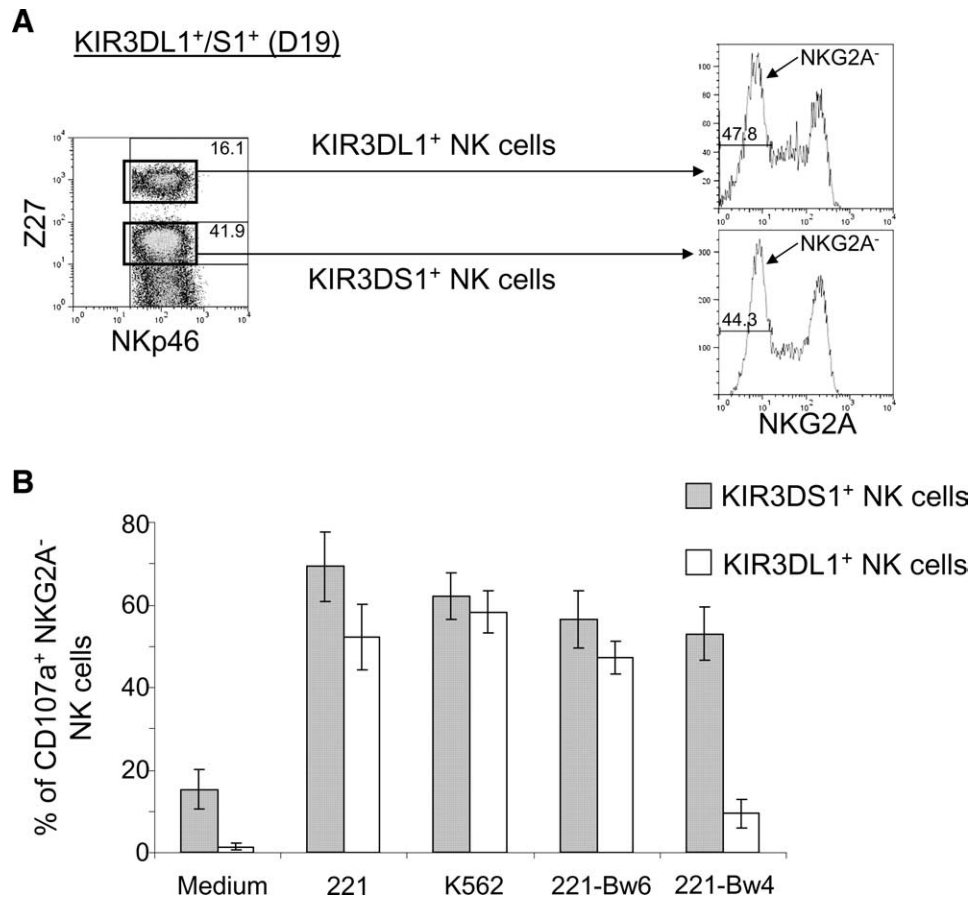


FIGURE 4. Contrary to KIR3DL1⁺ NK cells, activation of KIR3DS1⁺ NK cell cytotoxicity is Bw4 independent. PBMCs were amplified for 2 wk with the 221 cell line as stimulator cells to obtain a substantial KIR3DS1⁺ NK cell population. *A*, KIR3DS1⁺NKG2A⁻NKp46⁺ NK cells and KIR3DL1⁺NKG2A⁻ NK cells were targeted. A density plot is gated on NKp46⁺ NK cells. Percentages of KIR3DS1⁺ or KIR3DL1⁺ NK cells are indicated. Histograms showing the NKG2A phenotype of KIR3DL1⁺ NK cells and KIR3DS1⁺ NK cells are gated on Z27^{high} NK cells and Z27^{dim} NK cells, respectively. Percentages of NKG2A⁻ NK cells are indicated. Data are shown for a representative KIR3DL1⁺/S1⁺ individual D19 of 10 individuals studied (D1, D2, and D15 to D22). *B*, Degranulation of both KIR3DS1⁺NKG2A⁻NKp46⁺ ($n = 10$) and KIR3DL1⁺NKG2A⁻NKp46⁺ ($n = 7$) gated cell subsets was evaluated against HLA class I deficient myeloid K562 ($n = 6$), lymphoid 221 ($n = 10$), 221-Bw6 ($n = 9$), and 221-Bw4 ($n = 10$) cell lines. The E:T ratio was 1:1. Degranulation assays were performed as described in *Materials and Methods*. CD107a expression was defined by flow cytometry after stimulation with 221, K562, 221-Bw6, and 221-Bw4 in parallel to the control (medium). Means and SDs are shown for 10 individuals studied (D1, D2, and D15 to D22).

KIR3DS1⁺ ($n = 32$) genotyped PBMCs using KIR3DL1/S1-specific Z27 mAb. Surprisingly, no significant difference was observed between KIR3DL1⁺ NK cell frequency in PBMCs from

Bw4⁺ ($n = 38$) and Bw4⁻ ($n = 15$) individuals (Fig. 5*A*). Contrary to this, the frequency of KIR3DS1⁺ NK cells was significantly higher ($p = 0.002$) in the presence of at least one HLA-Bw4 motif

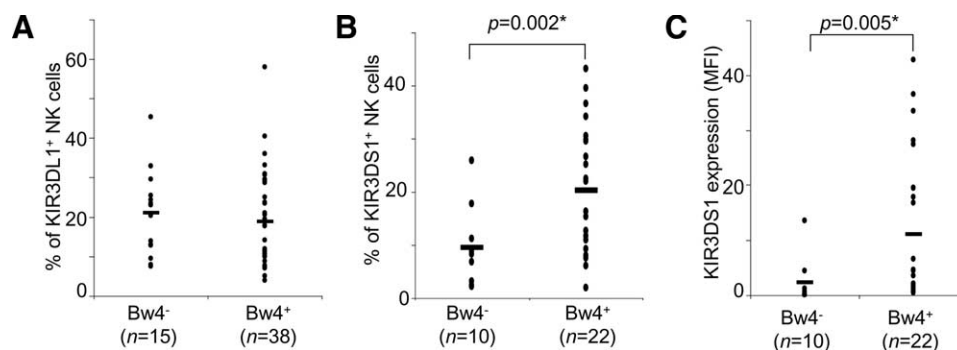


FIGURE 5. Impact of autologous Bw4 on KIR3DL1 and KIR3DS1 expression on NK cells. Flow cytometric analysis of NK cells from 53 KIR3DL1⁺- and 32 KIR3DS1⁺-genotyped individuals was performed with the anti-KIR3DL1/S1 mAb Z27. NK cells were described as CD3⁻CD56⁺KIR3DS1⁺ NK cells as the Z27^{dim} cell subset and KIR3DL1⁺ NK cells as the Z27^{low/high} cell subset. *A*, The frequencies of KIR3DL1⁺ NK cells were compared between Bw4⁻ ($n = 15$) and Bw4⁺ ($n = 38$) individuals, $p = 0.264$. *B*, The frequencies of KIR3DS1⁺ NK cells were compared between Bw4⁻ ($n = 10$) and Bw4⁺ ($n = 22$) individuals, $p = 0.002$. *C*, KIR3DS1 expression (MFI) on NK cells is lower in Bw4⁻ ($n = 10$) than in Bw4⁺ ($n = 22$) individuals, $p = 0.005$. Student's *t* test with bilateral distribution and unequal variance was used for all statistical analysis.

(Fig. 5B). Because three patterns of KIR3DS1 expression were observed (Fig. 1A), we suggested that the level of KIR3DS1 expression, provided by the median fluorescence intensity (MFI), could be a more relevant indicator than the KIR3DS1⁺ NK cell frequency, which itself is too difficult to assess. As a consequence, the MFI of the KIR3DS1⁺ cells stained with Z27 mAb was evaluated after subtraction of the background fluorescence of the negative or isotype control. By this approach, the level of KIR3DS1 expression on NK cells was also significantly higher ($p = 0.005$) in the presence of at least one HLA-Bw4 molecule than in its absence (Fig. 5C).

Discussion

The recent interest in *KIR3DS1* can be explained, not only by the newly discovered possibility to detect its expression by flow cytometry (30–33) but also by the genetic associations favoring protection to AIDS (27–29, 42–44), clearance of hepatitis C virus (23) and resistance to cervical neoplasia (25, 26) or hepatocellular carcinoma (24). In this study, we show for the first time that, even for individuals with a very low proportion of KIR3DS1⁺ NK cells on resting PBMCs, the expression of KIR3DS1 is induced on NK cells after stimulation with stimulator cells (221, K562, EBV-B cell lines, and B cells), poly(IC), and cytokines as IL-15 and IL-2. The fact that these various stimuli can induce KIR3DS1 expression suggests that this activating receptor could possibly be considered as a marker of NK cell activation. The induction of KIR expression on NK cells is poorly described in literature. Certain allelic variants of *KIR2DL4* have been shown to be induced on cultured NK cells, either as a full-length and detectable protein, or as a secreted receptor (45). A higher KIR3DS1 expression on NK cells has been observed in vivo in the context of HIV infection (34). As a result, this induction of KIR3DS1 expression might play a protective role in the control of viral infections.

Some genetic studies (23–29, 46–49) have highlighted an association of the *KIR3DS1* with HLA-Bw4 molecules, suggesting that the HLA-Bw4 molecules are the best candidate as the KIR3DS1 ligand. However, we show in this present study that even KIR3DL1⁺ NK cell frequency was significantly higher after 2 wk of coculture in a HLA-Bw4⁻ allogeneic environment than in a HLA-Bw4⁺ environment, the proliferation of KIR3DS1⁺ NK cells is not regulated by the Bw4⁺ environment. The expression of KIR3DS1 was equally induced regardless of the autologous or the allogeneic Bw4⁻ or Bw4⁺ environment. Moreover, degranulation assays, targeting amplified NKG2A⁻ KIR3DS1⁺ NK cells, did not allow us to discern a triggering functional interaction between KIR3DS1 and the Bw4 molecule, even though these experimental conditions are closer to the in vivo context than those of previous studies (22, 30, 33, 35).

Despite the absence of demonstrated regulation of KIR3DS1⁺ NK cell functions by HLA-Bw4 molecules, we found a statistically significant difference in KIR3DS1⁺ NK cell frequency and the level of KIR3DS1 expression, between the absence and the presence of at least one autologous *HLA-Bw4*. On the other hand, no significant difference was observed in KIR3DL1⁺ NK cell frequency according to the presence or absence of the autologous ligand Bw4. The discrepancy between these observations and previous reports (13, 32) can potentially be explained by different allelic distributions of *KIR3DL1/S1* and *HLA-Bw4* between our European cohort and American (32) and Japanese (13) cohorts (47–50). These data support an influence of HLA-Bw4 molecules in shaping the KIR3DS1⁺ NK cell subset during development.

One hypothesis proposed in the literature still supporting HLA-Bw4 as a ligand for KIR3DS1 is that a viral or a tumoral peptide is loaded by HLA-Bw4 molecules and stabilizes a functional in-

teraction with KIR3DS1. A previous study supported this loaded peptide model, with a reinforced lysis of Bw4⁺ cell targets infected by HIV-1 (35), but without pinpointing a particular peptide. It has been recently reported that a T cell escape variant HIV peptide bound to HLA-Cw4 constitutes a better ligand for KIR2DL1 than the consensus peptide (51). Moreover, different publications underlined the impact of the loaded peptide on the KIR-HLA affinity as described for KIR3DL2 (52) and KIR3DL1 (15). Another hypothesis is raised by the Ly49H⁺ (a murine activating KIR receptor counterpart) NK cell population which controls murine CMV infection by recognizing a murine MHC-like protein, m157 (53, 54). Thus, it is feasible to envisage that KIR3DS1 binds to a protein expressed by infected or tumor cells. This has already been shown for KIR2DS4, another activating KIR, which interacts functionally with a non-HLA ligand expressed only on tumoral cell lines (55).

Finally, although in the KIR2DL1/KIR2DS1 pair only one of these two homologous receptors can be functional, depending on the presence or absence of HLA-C2 ligand (36), the KIR3DL1 and KIR3DS1 receptors do not act in the same way. In fact, KIR3DL1⁺ NK cell functions (degranulation and proliferation) are regulated by HLA-Bw4, but the regulation of KIR3DS1⁺ NK cell functions is Bw4 independent in physiological conditions. However, we highlight a large induction of KIR3DS1 expression on NK cells after stimulation with various stimuli and a higher KIR3DS1⁺ NK cell frequency in Bw4⁺ individuals. Altogether, these data suggest that, in contrast to KIR3DL1, KIR3DS1 is not implicated in non-self recognition by NK cells and does not recognize HLA-Bw4 molecules in physiological context. These results further the understanding of the role of KIR3DS1⁺ NK cells in controlling viral infections.

Acknowledgments

We are grateful to the blood donors.

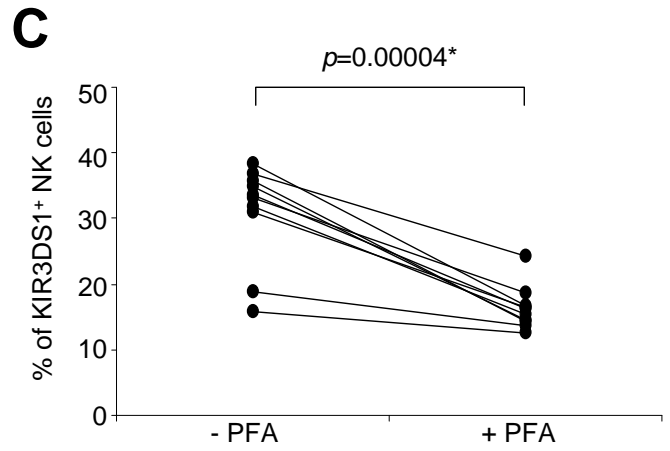
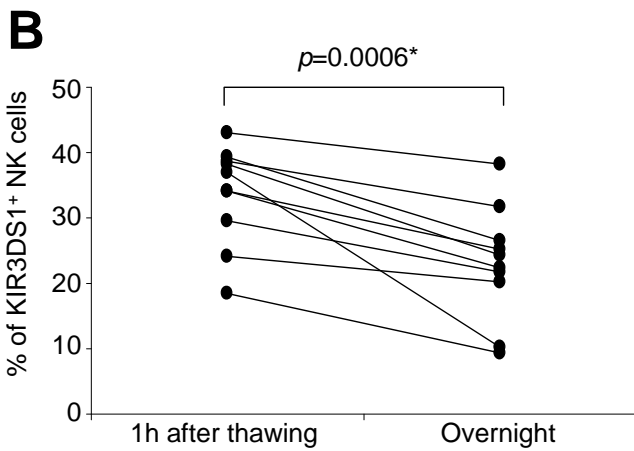
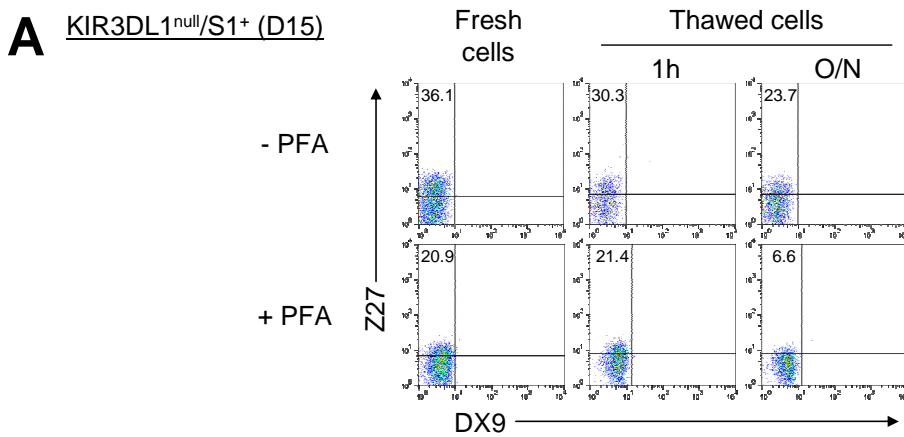
Disclosures

The authors have no financial conflict of interest.

References

- Ljunggren, H. G., and K. Karre. 1990. In search of the 'missing self': MHC molecules and NK cell recognition. *Immunol. Today* 11: 237–244.
- Ruggeri, L., M. Capanni, M. Casucci, I. Volpi, A. Tosti, K. Perruccio, E. Urbani, R. S. Negrin, M. F. Martelli, and A. Velardi. 1999. Role of natural killer cell alloreactivity in HLA-mismatched hematopoietic stem cell transplantation. *Blood* 94: 333–339.
- Ruggeri, L., M. Capanni, E. Urbani, K. Perruccio, W. D. Shlomchik, A. Tosti, S. Posati, D. Rogaia, F. Frassoni, F. Aversa, M. F. Martelli, and A. Velardi. 2002. Effectiveness of donor natural killer cell alloreactivity in mismatched hematopoietic transplants. *Science* 295: 2097–2100.
- Bignon, J. D., and K. Gagne. 2005. KIR matching in hematopoietic stem cell transplantation. *Curr. Opin. Immunol.* 17: 553–559.
- Bottino, C., L. Moretta, D. Pende, M. Vitale, and A. Moretta. 2004. Learning how to discriminate between friends and enemies, a lesson from natural killer cells. *Mol. Immunol.* 41: 569–575.
- Moretta, A., C. Bottino, M. Vitale, D. Pende, C. Cantoni, M. C. Mingari, R. Biassoni, and L. Moretta. 2001. Activating receptors and coreceptors involved in human natural killer cell-mediated cytotoxicity. *Annu. Rev. Immunol.* 19: 197–223.
- Moretta, L., and A. Moretta. 2004. Killer immunoglobulin-like receptors. *Curr. Opin. Immunol.* 16: 626–633.
- Trowsdale, J., R. Barten, A. Haude, C. A. Stewart, S. Beck, and M. J. Wilson. 2001. The genomic context of natural killer receptor extended gene families. *Immunol. Rev.* 181: 20–38.
- Vivier, E., and M. Daeron. 1997. Immunoreceptor tyrosine-based inhibition motifs. *Immunol. Today* 18: 286–291.
- Vely, F., and E. Vivier. 1997. Conservation of structural features reveals the existence of a large family of inhibitory cell surface receptors and noninhibitory/activatory counterparts. *J. Immunol.* 159: 2075–2077.
- Gardiner, C. M., L. A. Guethlein, H. G. Shilling, M. Pando, W. H. Carr, R. Rajalingam, C. Vilches, and P. Parham. 2001. Different NK cell surface phenotypes defined by the DX9 antibody are due to *KIR3DL1* gene polymorphism. *J. Immunol.* 166: 2992–3001.
- Pando, M. J., C. M. Gardiner, M. Gleimer, K. L. McQueen, and P. Parham. 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. *J. Immunol.* 171: 6640–6649.
13. Yawata, M., N. Yawata, M. Draghi, A. M. Little, F. Partheniou, and P. Parham. 2006. Roles for HLA and KIR polymorphisms in natural killer cell repertoire selection and modulation of effector function. *J. Exp. Med.* 203: 633–645.
 14. 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.
 15. Thananchai, H., G. Gillespie, M. P. Martin, A. Bashirova, N. Yawata, M. Yawata, P. Easterbrook, D. W. McVicar, K. Maenaka, P. Parham, et al. 2007. Cutting Edge: Allele-specific and peptide-dependent interactions between KIR3DL1 and HLA-A and HLA-B. *J. Immunol.* 178: 33–37.
 16. Sanjanwala, B., M. Draghi, P. J. Norman, L. A. Guethlein, and P. Parham. 2008. Polymorphic sites away from the Bw4 epitope that affect interaction of Bw4⁺ HLA-B with KIR3DL1. *J. Immunol.* 181: 6293–6300.
 17. Carr, W. H., M. J. Pando, and P. Parham. 2005. KIR3DL1 polymorphisms that affect NK cell inhibition by HLA-Bw4 ligand. *J. Immunol.* 175: 5222–5229.
 18. Cella, M., A. Longo, G. B. Ferrara, J. L. Strominger, and M. Colonna. 1994. NK3-specific natural killer cells are selectively inhibited by Bw4-positive HLA alleles with isoleucine 80. *J. Exp. Med.* 180: 1235–1242.
 19. Parham, P. 2006. Taking license with natural killer cell maturation and repertoire development. *Immunol. Rev.* 214: 155–160.
 20. Foley, B. A., D. De Santis, E. Van Beelen, L. J. Lathbury, F. T. Christiansen, and C. S. Witt. 2008. The reactivity of Bw4⁺ HLA-B and HLA-A alleles with KIR3DL1: implications for patient and donor suitability for haploidentical stem cell transplantations. *Blood* 112: 435–443.
 21. Kim, S., J. B. Sunwoo, L. Yang, T. Choi, Y. J. Song, A. R. French, A. Vlahiotis, J. F. Piccirillo, M. Cella, M. Colonna, et al. 2008. HLA alleles determine differences in human natural killer cell responsiveness and potency. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 105: 3053–3058.
 22. Gillespie, G. M., A. Bashirova, T. Dong, D. W. McVicar, S. L. Rowland-Jones, and M. Carrington. 2007. Lack of KIR3DS1 binding to MHC class I Bw4 tetramers in complex with CD8⁺ T cell epitopes. *AIDS Res. Hum. Retrovir.* 23: 451–455.
 23. Khakoo, S. I., C. L. Thio, M. P. Martin, C. R. Brooks, X. Gao, J. Astemborski, J. Cheng, J. J. Goedert, D. Vlahov, M. Hilgartner, et al. 2004. HLA and NK cell inhibitory receptor genes in resolving hepatitis C virus infection. *Science* 305: 872–874.
 24. Lopez-Vazquez, A., L. Rodrigo, J. Martinez-Borra, R. Perez, M. Rodriguez, J. L. Fdez-Morera, D. Fuentes, S. Rodriguez-Rodero, S. Gonzalez, and C. Lopez-Larrea. 2005. Protective effect of the HLA-Bw4I80 epitope and the killer cell immunoglobulin-like receptor 3DS1 gene against the development of hepatocellular carcinoma in patients with hepatitis C virus infection. *J. Infect. Dis.* 192: 162–165.
 25. Arnheim, L., J. Dillner, and C. B. Sanjeevi. 2005. A population-based cohort study of KIR genes and genotypes in relation to cervical intraepithelial neoplasia. *Tissue Antigens* 65: 252–259.
 26. Carrington, M., S. Wang, M. P. Martin, X. Gao, M. Schiffman, J. Cheng, R. Herrero, A. C. Rodriguez, R. Kurman, R. Mortel, et al. 2005. Hierarchy of resistance to cervical neoplasia mediated by combinations of killer immunoglobulin-like receptor and human leukocyte antigen loci. *J. Exp. Med.* 201: 1069–1075.
 27. Martin, M. P., X. Gao, J. H. Lee, G. W. Nelson, R. Detels, J. J. Goedert, S. Buchbinder, K. Hoots, D. Vlahov, J. Trowsdale, et al. 2002. Epistatic interaction between KIR3DS1 and HLA-B delays the progression to AIDS. *Nat. Genet.* 31: 429–434.
 28. Qi, Y., M. P. Martin, X. Gao, L. Jacobson, J. J. Goedert, S. Buchbinder, G. D. Kirk, S. J. O'Brien, J. Trowsdale, and M. Carrington. 2006. KIR/HLA pleiotropism: protection against both HIV and opportunistic infections. *PLoS Pathog.* 2: e79.
 29. Carrington, M., M. P. Martin, and J. van Bergen. 2008. KIR-HLA intercourse in HIV disease. *Trends Microbiol.* 16: 620–627.
 30. Carr, W. H., D. B. Rosen, H. Arase, D. F. Nixon, J. Michaelsson, and L. L. Lanier. 2007. Cutting Edge: KIR3DS1, a gene implicated in resistance to progression to AIDS, encodes a DAP12-associated receptor expressed on NK cells that triggers NK cell activation. *J. Immunol.* 178: 647–651.
 31. O'Connor, G. M., K. J. Guinan, R. T. Cunningham, D. Middleton, P. Parham, and C. M. Gardiner. 2007. Functional polymorphism of the KIR3DL1/S1 receptor on human NK cells. *J. Immunol.* 178: 235–241.
 32. Pascal, V., E. Yamada, M. P. Martin, G. Alter, M. Altfeld, J. A. Metcalf, M. W. Baseler, J. W. Adelsberger, M. Carrington, S. K. Anderson, and D. W. McVicar. 2007. Detection of KIR3DS1 on the cell surface of peripheral blood NK cells facilitates identification of a novel null allele and assessment of KIR3DS1 expression during HIV-1 infection. *J. Immunol.* 179: 1625–1633.
 33. Trundley, A., H. Frebel, D. Jones, C. Chang, and J. Trowsdale. 2007. Allelic expression patterns of KIR3DS1 and 3DL1 using the Z27 and DX9 antibodies. *Eur. J. Immunol.* 37: 780–787.
 34. Ravet, S., D. Scott-Algara, E. Bonnet, H. K. Tran, T. Tran, N. Nguyen, L. X. Truong, I. Theodorou, F. Barre-Sinoussi, G. Pancino, and P. Paul. 2007. Distinctive NK-cell receptor repertoires sustain high-level constitutive NK-cell activation in HIV-exposed uninfected individuals. *Blood* 109: 4296–4305.
 35. Alter, G., M. P. Martin, N. Teigen, W. H. Carr, T. J. Suscovich, A. Schneidewind, H. Streeck, M. Waring, A. Meier, C. Brander, et al. 2007. Differential natural killer cell-mediated inhibition of HIV-1 replication based on distinct KIR/HLA subtypes. *J. Exp. Med.* 204: 3027–3036.
 36. Morvan, M., G. David, V. Sebillé, A. Perrin, K. Gagne, C. Willem, N. Kerdudou, L. Denis, B. Clemenceau, G. Follea, J. D. Bignon, and C. Retiere. 2008. Autologous and allogeneic HLA KIR ligand environments and activating KIR control KIR NK-cell functions. *Eur. J. Immunol.* 38: 3474–3486.
 37. Miller, S. A., D. D. Dykes, and H. F. Polesky. 1988. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res.* 16: 1215.
 38. Marsh, S. G., P. Parham, B. Dupont, D. E. Geraghty, J. Trowsdale, D. Middleton, C. Vilches, M. Carrington, C. Witt, L. A. Guethlein, et al. 2003. Killer-cell immunoglobulin-like receptor (KIR) nomenclature report, 2002. *Tissue Antigens* 62: 79–86.
 39. Denis, L., J. Sivula, P. A. Gourraud, N. Kerdudou, R. Chout, C. Ricard, J. P. Moisan, K. Gagne, J. Partanen, and J. D. Bignon. 2005. Genetic diversity of KIR natural killer cell markers in populations from France, Guadeloupe, Finland, Senegal and Reunion. *Tissue Antigens* 66: 267–276.
 40. Braud, V. M., D. S. Allan, C. A. O'Callaghan, K. Soderstrom, A. D'Andrea, G. S. Ogg, S. Lazetic, N. T. Young, J. I. Bell, J. H. Phillips, L. L. Lanier, and A. J. McMichael. 1998. HLA-E binds to natural killer cell receptors CD94/NKG2A, B and C. *Nature* 391: 795–799.
 41. Walzer, T., S. Jaeger, J. Chaix, and E. Vivier. 2007. Natural killer cells: from CD3[−]NKp46⁺ to post-genomics meta-analyses. *Curr. Opin. Immunol.* 19: 365–372.
 42. Barbour, J. D., U. Sriram, S. J. Caillier, J. A. Levy, F. M. Hecht, and J. R. Oksenberg. Synergy or independence? Deciphering the interaction of HLA class I and NK cell KIR alleles in early HIV-1 disease progression. *PLoS Pathog.* 3: e43, 2007.
 43. Boulet, S., S. Sharafi, N. Simic, J. Bruneau, J. P. Routy, C. M. Tsoukas, and N. F. Bernard. 2008. Increased proportion of KIR3DS1 homozygotes in HIV-exposed uninfected individuals. *AIDS* 22: 595–599.
 44. Long, B. R., L. C. Ndhlovu, J. R. Oksenberg, L. L. Lanier, F. M. Hecht, D. F. Nixon, and J. D. Barbour. 2008. Conferral of enhanced natural killer cell function by KIR3DS1 in early human immunodeficiency virus type 1 infection. *J. Virol.* 82: 4785–4792.
 45. Goodridge, J. P., L. J. Lathbury, N. K. Steiner, C. N. Shulze, P. Pullikotil, N. G. Seidah, C. K. Hurley, F. T. Christiansen, and C. S. Witt. 2007. Three common alleles of KIR2DL4 (CD158d) encode constitutively expressed, inducible and secreted receptors in NK cells. *Eur. J. Immunol.* 37: 199–211.
 46. Gaudieri, S., D. DeSantis, E. McKinnon, C. Moore, D. Nolan, C. S. Witt, S. A. Mallal, and F. T. Christiansen. 2005. Killer immunoglobulin-like receptors and HLA act both independently and synergistically to modify HIV disease progression. *Genes Immun.* 6: 683–690.
 47. Norman, P. J., L. Abi-Rached, K. Gendzekhadze, D. Korbel, M. Gleimer, D. Rowley, D. Bruno, C. V. Carrington, D. Chandanayingyong, Y. H. Chang, et al. 2007. Unusual selection on the KIR3DL1/S1 natural killer cell receptor in Africans. *Nat. Genet.* 39: 1092–1099.
 48. Single, R. M., M. P. Martin, X. Gao, D. Meyer, M. Yeager, J. R. Kidd, K. K. Kidd, and M. Carrington. 2007. Global diversity and evidence for coevolution of KIR and HLA. *Nat. Genet.* 39: 1114–1119.
 49. Kulkarni, S., R. M. Single, M. P. Martin, R. Rajalingam, R. Badwe, N. Joshi, and M. Carrington. 2008. Comparison of the rapidly evolving KIR locus in Parsis and natives of India. *Immunogenetics* 60: 121–129.
 50. Middleton, D., L. Menchaca, H. Rood, and R. Komerofsky. 2003. New allele frequency database: <http://www.allelefrequencys.net>. *Tissue Antigens* 61: 403–407.
 51. Thananchai, H., T. Makadzange, K. Maenaka, K. Kuroki, Y. Peng, C. Conlon, S. Rowland-Jones, and T. Dong. 2009. Reciprocal recognition of an HLA-Cw4-restricted HIV-1 gp120 epitope by CD8⁺ T cells and NK cells. *AIDS* 23: 189–193.
 52. Hansasuta, P., T. Dong, H. Thananchai, M. Weekes, C. Willberg, H. Aldemir, S. Rowland-Jones, and V. M. Braud. 2004. Recognition of HLA-A3 and HLA-A11 by KIR3DL2 is peptide-specific. *Eur. J. Immunol.* 34: 1673–1679.
 53. Arase, H., E. S. Mocarski, A. E. Campbell, A. B. Hill, and L. L. Lanier. 2002. Direct recognition of cytomegalovirus by activating and inhibitory NK cell receptors. *Science* 296: 1323–1326.
 54. Smith, H. R., J. W. Heusel, I. K. Mehta, S. Kim, B. G. Dorner, O. V. Naidenko, K. Iizuka, H. Furukawa, D. L. Beckman, J. T. Pingel, et al. 2002. Recognition of a virus-encoded ligand by a natural killer cell activation receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99: 8826–8831.
 55. Katz, G., R. Gazit, T. I. Arnon, T. Gonen-Gross, G. Tarcic, G. Markel, R. Gruda, H. Achdout, O. Drize, S. Merims, and O. Mandelboim. 2004. MHC class I-independent recognition of NK-activating receptor KIR2DS4. *J. Immunol.* 173: 1819–1825.



Supplemental Figure S1. Modification of the KIR3DS1 phenotype by cryopreservation and fixation. A, Freshly isolated and thawed PBMC from KIR3DL1^{null}/S1⁺ individual D15 were stained with Z27 and DX9 mAbs, one hour or one night after thawing, and fixed or not with 1% PFA. Density plots are gated on CD3⁻ CD56⁺ NK cells. B-C, KIR3DS1⁺ NK cell frequencies from ten individuals (D1, D2 and D15 to D22) are shown : B, one hour and one night after thawing, C, without and with paraformaldehyde 1%.

DISCUSSION ET PERSPECTIVES

Pour la première fois, des anticorps monoclonaux permettant de discriminer les populations NK n'exprimant que la forme inhibitrice ou la forme activatrice des KIR ont été produits et caractérisés finement. Il est maintenant possible de cibler les cellules NK KIR2DS1⁺ (8C11⁻, EB6⁺), KIR2DL1⁺ (8C11⁺, GL183⁻) et KIR2DL2⁺ (1F12⁻, GL183⁺). Au niveau phénotypique, cela a permis de voir par exemple que KIR2DL1 et KIR2DS1 pouvaient être exprimés indépendamment. Au niveau fonctionnel, comme les études réalisées jusque là n'utilisaient que des anticorps commerciaux incapables de distinguer les KIR activateurs et inhibiteurs, ces nouveaux anticorps ouvrent la voie à des études plus poussées de l'impact des KIR, et en particulier des KIR activateurs, sur les fonctions des cellules NK. L'utilisation de la combinaison des anticorps 8C11 et EB6 nous a permis par exemple d'étudier la fonctionnalité des cellules NK qui expriment à leur surface le KIR2DS1, mais pas les autres récepteurs KIR qui reconnaissent les molécules HLA-Cw.

L'anticorps monoclonal issu du clone 1F12 peut se révéler intéressant pour étudier la fonctionnalité des populations NK KIR2DL2⁺ (1F12⁺, GL183⁻). En effet, contrairement au KIR2DL1 qui a pour ligands les seules molécules HLA de classe I du groupe C2, le KIR2DL2 semble reconnaître non seulement les molécules HLA de classe I du groupe C1, mais aussi certaines molécules du groupe C2 (Moesta *et al.* 2008). La possibilité de cibler la population NK exprimant le KIR2DL2 à sa surface va permettre d'étudier l'impact de ces différents ligands HLA, aussi bien au niveau autologue en termes d'éducation qu'au niveau allogénique en termes d'alloréactivité ou non des cellules NK KIR2DL2⁺. Cet anticorps permet également d'étudier la fonctionnalité des cellules NK KIR2DS2⁺ puisque les cellules 1F12⁺, GL183⁺ expriment forcément du KIR2DS2 chez les donneurs qui ne possèdent pas le gène KIR2DL3. Chez ces individus KIR2DL2⁺ KIR2DS2⁺ KIR2DL3⁺, le

marquage avec les anticorps 1F12 et GL183 permet en effet de distinguer deux populations 1F12⁺ GL183⁺, dont l'une est KIR2DS2⁺ et l'autre KIR2DL2⁺ KIR2DS2⁺.

De plus, la reconnaissance de certains variants alléliques du KIR2DL1 par les anticorps 8C11 et 1A6 peut aussi être un atout puisque la variabilité allélique KIR semble avoir un impact sur leur fonctionnalité, en particulier en ce qui concerne l'affinité avec le ligand HLA. Ceci a par exemple été montré pour le KIR3DL1, dont le polymorphisme allélique doit continuer d'être étudié, puisque certains variants alléliques dits « high » présentent une meilleure affinité pour leurs ligands, les molécules HLA de classe I présentant un motif Bw4, que les variants alléliques dits « low » (Yawata *et al.* 2006). Une étude récente montre également un impact du polymorphisme allélique KIR2DL1 sur l'inhibition de la dégranulation, de la production d'IFN- γ et de la cytotoxicité vis-à-vis de cellules cibles C2⁺ (Bari *et al.* 2009). Dans ce cas, c'est un résidu situé au niveau du domaine transmembranaire qui affecte le signal inhibiteur et l'expression du KIR2DL1 à la surface cellulaire. Il serait donc intéressant d'utiliser les anticorps 8C11 et 1A6 pour comparer la fonctionnalité des cellules NK n'exprimant que certains variants alléliques du KIR2DL1 à leur surface vis-à-vis de cellules cibles présentant ou non les ligands HLA correspondants.

Enfin, ces anticorps peuvent être utilisés comme marqueurs chez certains patients afin d'analyser au niveau phénotypique et fonctionnel les populations NK exprimant des récepteurs KIR à leur surface dont le rôle protecteur ou délétère a été mis en évidence au niveau génétique dans certaines pathologies. C'est le cas par exemple des fausses couches dans le contexte de la grossesse (Moffett and Hiby 2009), des maladies auto-immunes (Jiao *et al.* 2008, Flodstrom-Tullberg *et al.* 2009) et des infections virales (Carrington *et al.*

2008) où un impact des récepteurs KIR activateurs a pu être déterminé. La possibilité de distinguer ces différentes populations devrait se révéler très utile par la suite pour comprendre le rôle joué par chacun de ces récepteurs KIR dans la régulation des fonctions des cellules NK.

Ces combinaisons d'anticorps nous ont permis de montrer que les cellules NK exprimant le KIR2DS1 à leur surface sont alloréactives vis-à-vis de cellules cibles qui présentent le ligand C2, et ceci uniquement chez des individus C2⁻. C'est l'inverse qui se produit pour le récepteur inhibiteur KIR2DL1 puisque c'est uniquement chez les individus C2⁺ que ce récepteur est fonctionnel et protège de la lyse NK les cellules qui présentent son ligand C2 (Anfossi *et al.* 2006). Nous avons confirmé ici cette règle pour la fonction de prolifération puisque la fréquence des cellules NK KIR2DL1⁺ d'un individu C2⁺ est moins importante après stimulation par des lymphocytes B C2⁺ que C2⁻, alors que cette fréquence reste similaire chez un individu C2⁻. Ainsi, chez un individu KIR2DL1⁺ KIR2DS1⁺ seules les cellules KIR2DL1⁺ sont fonctionnelles s'il est C2⁺ et seules les cellules KIR2DS1⁺ sont fonctionnelles s'il est C2⁻. Ces deux récepteurs ne sont donc pas engagés chez un même individu, sauf peut être lors d'une infection virale telle que l'EBV.

En effet, lorsque les cellules stimulatrices sont des lignées B-EBV, il semble que cette absence d'éducation est levée puisque l'augmentation de la fréquence des cellules NK KIR2DL1⁺ en réponse à l'absence du ligand C2 dans l'environnement allogénique est observée aussi bien chez les individus C2⁺ que C2⁻. Dans les infections virales ou les processus tumoraux, la balance entre inhibition et activation semble perturbée, ce qui peut induire une prolifération de cellules NK pourtant non éduquées. Les maladies auto-immunes ou les leucémies NK pourraient également être consécutives à une absence de

tolérance au soi de cellules NK exprimant des KIR activateurs dont les ligands sont exprimés par les cellules de l'individu.

Nous avons donc pu montrer que chez un individu qui possède les deux gènes, KIR2DL1 et KIR2DS1, seule l'une des deux populations exprimant l'un des récepteurs est fonctionnelle en fonction de la présence ou non du ligand C2 au niveau autologue. Ces observations sont particulièrement importantes d'une part car elles permettent de mieux comprendre le rôle joué par les récepteurs KIR activateurs dans la modulation des fonctions NK (cytotoxicité, production de cytokines et prolifération) et d'autre part car elles peuvent avoir des implications en greffes de CSH. En effet, les cellules NK KIR2DS1⁺ issues d'un individu C2⁻ présentent une potentielle alloréactivité vis-à-vis de tumeurs allogéniques C2⁺ et pourraient donc ainsi contribuer à l'effet GvL dans le cadre de greffes avec des incompatibilités HLA-Cw. Il sera ensuite nécessaire de confirmer *in vivo* ces règles de l'alloréactivité NK afin de définir des critères de sélection des donneurs de CSH selon leurs KIR activateurs, l'éducation de leurs cellules NK KIR⁺ et leur typage HLA en terme de ligands KIR.

Ces résultats ont été confirmés par une étude récente qui montre une lyse directe des cellules leucémiques C2⁺ par les cellules NK KIR2DS1⁺ (Pende *et al.* 2009). Le rôle des récepteurs KIR activateurs dans le traitement des leucémies par greffe de CSH est d'ailleurs dans une étude portant sur 448 patients atteints d'AML. Les donneurs de cette cohorte avec un haplotype B étaient associés avec une survie sans rechute plus importante (Cooley *et al.* 2009), les haplotypes B étant caractérisés par la présence de plus d'un gène KIR activateur. La présence chez le donneur d'un autre récepteur activateur, le KIR3DS1, a récemment été décrite au laboratoire comme ayant un effet bénéfique dans la greffe de

CSH (Gagne *et al.* 2009). L'expression et la fonction du KIR3DS1 ont également été étudiées au cours de ma thèse.

Si les résultats obtenus concernant l'influence du HLA autologue sur la fréquence des cellules NK KIR3DL1⁺ et KIR3DS1⁺ sont en contradiction avec les données publiées précédemment (Yawata *et al.* 2006; Pascal *et al.* 2007), c'est probablement à cause des différences d'origines des cohortes, japonaise et nord-américaine respectivement dans les études précédentes alors que notre cohorte est d'origine européenne. Toutefois, ces résultats sont en accord avec une étude menée plus récemment (Alter *et al.* 2009) où une augmentation de la fréquence des cellules NK KIR3DS1⁺ est observée chez les individus Bw4⁺. Si cette différence n'est pas significative dans leur cohorte d'individus sains, elle le devient chez leurs patients infectés par le VIH, ce qui converge vers l'hypothèse selon laquelle le KIR3DS1 joue un rôle important dans cette infection.

L'interaction entre KIR3DS1 et son ligand potentiel Bw4*80I peut se produire selon plusieurs options. Tout d'abord, il est possible que l'interaction entre KIR3DS1 et les molécules Bw4*80I soit stabilisée par le chargement d'un peptide viral ou tumoral. C'est en effet le cas de son homologue inhibiteur, le KIR3DL1, dont l'interaction avec les molécules HLA-Bw4 est stabilisée par certains peptides chargés (Thananchai *et al.* 2007). Il est également possible qu'un peptide issu de protéines induites par le stress comme MICA ou Hsp70 favorise l'interaction entre KIR3DS1 et les molécules Bw4*80I. Une autre hypothèse envisageable est que cette interaction entre KIR3DS1 et les molécules Bw4*80I ne se produise pas via les cellules NK mais via d'autres cellules de l'immunité capables de former une synapse immunologique activatrice forte entre les cellules cibles et effectrices. C'est peut être le cas de lymphocytes T mémoires KIR3DS1⁺ dont l'interaction

entre le TCR et le complexe HLA-peptide est tellement forte qu'elle va permettre l'interaction KIR3DS1/Bw4*80I au niveau de la synapse immunologique, ce qui pourrait potentialiser l'activation du lymphocyte T via ce signal de co-stimulation.

Plusieurs études viennent donner du crédit à ces hypothèses. Tout d'abord, les données *ex vivo* collectées par Alter *et al.* confirment l'importance d'étudier la fonction de prolifération des cellules NK selon les différents environnements HLA, et en particulier de celles qui expriment le KIR3DS1. Dans leur étude, ils observent en effet une expansion plus importante des cellules NK KIR3DS1⁺ en présence du ligand HLA potentiel Bw4*80I, dans le contexte d'une infection aiguë au VIH. Même s'ils ne nous permettent pas de mettre en évidence une interaction fonctionnelle entre KIR3DS1 et son potentiel ligand HLA, les associations génétiques bénéfiques reportées dans certaines pathologies, ainsi que nos résultats sur l'expression du KIR3DS1 par les cellules NK et ceux de l'équipe de Galit Alter dans le contexte du VIH semblent donc indiquer que les ligands potentiels du KIR3DS1 sont bien les molécules HLA présentant un motif Bw4 avec une isoleucine en position 80, et ce malgré quelques études génétiques contradictoires (Gaudieri *et al.* 2005; O'Connell *et al.* 2009).

Enfin, il est également probable que le ligand du KIR3DS1 ne soit pas une molécule HLA de classe I mais une protéine virale ou tumorale. C'est le cas par exemple d'un homologue murin des KIR activateurs, le récepteur Ly49H, dont le ligand est la protéine m157 encodée par le Cytomégalo virus murin (mCMV) et qui permet le contrôle de l'infection à mCMV chez les souris qui possèdent ce gène (Arase *et al.* 2002; Smith *et al.* 2002). Chez l'Homme, le récepteur activateur KIR2DS4 possède quant à lui un ligand non HLA qui n'est exprimé que sur des tumeurs (Katz *et al.* 2004). L'utilisation combinée

des cellules NK stimulées, qui présentent une forte proportion de cellules KIR3DS1⁺, et d'un modèle viral tel que l'infection à CMV, ou de lignées tumorales, devrait permettre de confirmer ou non certaines de ces hypothèses. Toutes ces données fonctionnelles doivent nous permettre de mieux comprendre les mécanismes de contrôle des infections virales par les cellules NK KIR⁺ ou ceux de l'alloréactivité NK en greffe de CSH, et ce particulièrement en regard de l'éducation des cellules NK via l'environnement HLA autologue.

Des données non publiées de l'équipe de Nicolas Dulphy montrent en effet que les cellules NK KIR⁺ sont éduquées via les molécules HLA du donneur, mais pas celles du receveur, au bout de trois mois après la greffe (Haas *et al.* 2009, présentation orale). Ceci suggère que l'éducation des cellules NK se déroule bien via les CSH. Une autre étude récente démontre quant à elle que dans les trois premiers mois suivant la greffe de CSH, les cellules NK non éduquées exprimant des récepteurs KIR inhibiteurs spécifiques de molécules HLA du non soi présentent malgré tout des fonctions effectrices (Yu *et al.* 2009b). Ces cellules NK sont en effet capables de produire des cytokines et d'être cytotoxiques après stimulation par des cellules cibles tumorales qui ne possèdent pas les ligands des KIR inhibiteurs exprimés. Ceci contraste avec le comportement des cellules NK éduquées face au « soi manquant » et montre que dans le contexte de la greffe de CSH, les cellules NK non éduquées peuvent contourner les effets du *licensing* et être fonctionnelles selon un mécanisme de ligand HLA manquant moins restrictif. La greffe de CSH peut fournir un environnement où les cytokines pro-inflammatoires conduisent à lever les mécanismes responsables de la tolérance au soi, tout comme l'infection à mCMV permet de contourner les effets de l'éducation chez la souris (Sun and Lanier 2008). Dans ce cas, les cellules NK murines sont tolérantes aux cellules déficientes en CMH de classe I

et cette tolérance est rapidement levée après infection par le mCMV. Les cytokines capables d'induire *in vivo* l'activation des cellules NK non éduquées semblent produites seulement dans certaines conditions de greffe puisque cet effet n'est pas observé dans certaines autres études (Chen *et al.* 2006; Ruggeri *et al.* 2007). La tolérance peut donc être altérée par certaines infections virales et lors de la greffe de CSH.

Comme cela a été évoqué précédemment, les associations observées au niveau génétique entre la prédisposition à certaines maladies ou un rôle protecteur et la présence de certains KIR pourraient s'expliquer par la modulation des fonctions d'autres lymphocytes que les cellules NK. Les KIR sont en effet exprimés également à la surface des lymphocytes T à de faibles fréquences qui augmentent avec l'âge (Snyder *et al.* 2002). En effet, l'acquisition de l'expression des KIR par les lymphocytes T est tardive puisqu'elle se produit après les réarrangement du TcR (Vely *et al.* 2001) et semble consécutive à la stimulation antigénique. Les mécanismes épigénétiques qui régulent l'expression des KIR sont différents pour les lymphocytes T (Li *et al.* 2009). Les KIR pourraient participer à la régulation des fonctions des lymphocytes T (cytotoxicité, production de cytokines et prolifération). Par exemple, les lymphocytes T qui expriment des KIR prolifèrent moins que ceux qui n'en expriment pas (Vivier and Anfossi 2004). L'impact des KIR, et en particulier les activateurs, sur la fonction des lymphocytes T est toutefois très peu documenté. Les principaux KIR exprimés par les lymphocytes T sont KIR2DL2, KIR2DL3 et KIR2DS2, et il été montré récemment que les lymphocytes T CD4⁺ en exprimaient uniquement soit la forme activatrice, soit la forme inhibitrice, mais pas les deux (Remtoula *et al.* 2008). Malgré cela, grâce aux anticorps produits et caractérisés au laboratoire, nous avons également pu montrer que les lymphocytes T exprimaient également du KIR2DS1 et du KIR2DL1. L'impact potentiel de ce dernier sur

les fonctions des lymphocytes T a d'ailleurs été démontré récemment grâce à une lignée Jurkat (CD4⁺) transfectée pour exprimer le KIR2DL1. Cette transfection résulte en deux effets opposés : en présence du ligand C2, la fonctionnalité du lymphocyte T est inhibée alors qu'en absence du ligand, le lymphocyte T est activé (Fourmentraux-Neves *et al.* 2008).

D'autres arguments en faveur d'un rôle des KIR dans le contrôle des fonctions T sont apportés par une étude particulièrement intéressante réalisée dans le contexte de réactivations à CMV consécutives à une greffe de CSH. En effet, chez des receveurs avec une réactivation à CMV, des lymphocytes T CD8⁺ spécifiques du CMV qui expriment des KIR sont retrouvés, alors que chez les donneurs, ces lymphocytes T spécifiques du CMV n'en expriment pas (van der Veken *et al.* 2009). Une autre étude a montré que l'expression des KIR sur les lymphocytes T pouvait être induite par l'IL-2, un agent déméthylant mais aussi une infection parasitaire (Hermann *et al.* 2009). L'acquisition de tels récepteurs soulève évidemment des questions concernant leur impact sur la fonctionnalité des lymphocytes T. Il est possible en effet que si le ligand d'un récepteur KIR est présent sur une cellule cible reconnue via le TcR, l'interaction KIR-ligand pourrait soit diminuer la lyse T s'il s'agit d'un inhibiteur, soit la potentialiser s'il s'agit d'un activateur. De plus, si ces récepteurs KIR sont fonctionnels sur les lymphocytes T, l'impact du HLA autologue sur leur fonctionnalité devra être étudié puisque son rôle a été démontré dans le cas des cellules NK KIR⁺ via les mécanismes d'éducation. Il est en effet nécessaire de déterminer si un KIR inhibiteur exprimé par un lymphocyte T est fonctionnel uniquement chez les individus qui expriment son ligand HLA. De même, l'impact des ligands des KIR activateurs devra être étudié au niveau autologue afin de voir si ces récepteurs participent aussi à la tolérance des lymphocytes T qui les expriment.

Afin d'établir si les fonctions des lymphocytes T sont régulées par les KIR qu'ils expriment, nous avons donc mis en place pour la fin de mon travail de thèse un modèle d'étude des KIR exprimés par les lymphocytes T spécifiques du CMV. L'infection à CMV représente en effet une complication virale majeure en greffe de CSH. L'impact bénéfique de certains gènes *KIR* ainsi que l'importance de la réponse T spécifique du CMV (Barron *et al.* 2009) sur le contrôle de cette infection ont pu être mis en évidence. De plus, l'acquisition de l'expression des KIR par les lymphocytes T spécifiques du CMV dans le contexte d'une réactivation à CMV suggère un rôle régulateur de ces récepteurs dans l'élimination des cellules infectées. Un intérêt tout particulier sera ainsi apporté aux KIR activateurs puisque nous disposons des combinaisons d'anticorps nécessaires pour cibler les lymphocytes T exprimant le KIR2DS1 (population 8C11⁻, EB6⁺), le KIR3DS1 (population DX9⁻, Z27⁺) mais aussi le KIR2DS2 (population 1F12⁺, GL183⁺ chez les donneurs KIR2DL3⁻). Les lymphocytes T exprimant des KIR inhibiteurs pourront également être étudiés comme contrôle puisque nous pouvons cibler le KIR2DL1 (population 8C11⁺, GL183⁻), le KIR3DL1 (population DX9⁺, Z27⁺), le KIR2DL2 (population 1F12⁻, GL183⁺) et le KIR2DL3 (population GL183⁺ chez les donneurs KIR2DL2/S2⁻). La spécificité du TcR choisie est celle pour le complexe formé par la molécule HLA-A2 et le peptide NLVPMVATV issu de la protéine pp65, un composant de la matrice du CMV. La molécule HLA-A2 est en effet la plus fréquente dans la population caucasienne, ce qui nous permet de rechercher dans notre cohorte de donneurs de sang volontaires des individus HLA-A2⁺, CMV⁺ dont les génotypes KIR et HLA sont connus.

Ce modèle pourra également être utilisé avec des lymphocytes T spécifiques d'autres infections virales (VIH, hépatite C) ou de tumeurs, voire des lymphocytes T

anormaux retrouvés dans les maladies auto-immunes, afin de déterminer si les associations génétiques retrouvées dans ces contextes pathologiques se traduisent au niveau fonctionnel par un rôle non pas sur les cellules NK mais plutôt sur les lymphocytes T.

BIBLIOGRAPHIE

- Abi-Rached, L. and P. Parham (2005). "Natural selection drives recurrent formation of activating killer cell immunoglobulin-like receptor and Ly49 from inhibitory homologues." J Exp Med **201**(8): 1319-32.
- Ahlenstiel, G., M. P. Martin, X. Gao, M. Carrington and B. Rehermann (2008). "Distinct KIR/HLA compound genotypes affect the kinetics of human antiviral natural killer cell responses." J Clin Invest **118**(3): 1017-26.
- Akira, S. and K. Takeda (2004). "Toll-like receptor signalling." Nat Rev Immunol **4**(7): 499-511.
- Aldemir, H., V. Prod'homme, M. J. Dumaurier, C. Retiere, G. Poupon, J. Cazareth, F. Bihl and V. M. Braud (2005). "Cutting edge: lectin-like transcript 1 is a ligand for the CD161 receptor." J Immunol **175**(12): 7791-5.
- Aldrich, C. J., A. DeCloux, A. S. Woods, R. J. Cotter, M. J. Soloski and J. Forman (1994). "Identification of a Tap-dependent leader peptide recognized by alloreactive T cells specific for a class Ib antigen." Cell **79**(4): 649-58.
- Alter, G., J. M. Malenfant and M. Altfeld (2004). "CD107a as a functional marker for the identification of natural killer cell activity." J Immunol Methods **294**(1-2): 15-22.
- Alter, G., M. P. Martin, N. Teigen, W. H. Carr, T. J. Suscovich, A. Schneidewind, H. Streeck, M. Waring, A. Meier, C. Brander, J. D. Lifson, T. M. Allen, M. Carrington and M. Altfeld (2007). "Differential natural killer cell-mediated inhibition of HIV-1 replication based on distinct KIR/HLA subtypes." J Exp Med **204**(12): 3027-36.
- Alter, G., S. Rihn, K. Walter, A. Nolting, M. Martin, E. S. Rosenberg, J. S. Miller, M. Carrington and M. Altfeld (2009). "HLA class I subtype-dependent expansion of KIR3DS1+ and KIR3DL1+ NK cells during acute human immunodeficiency virus type 1 infection." J Virol **83**(13): 6798-805.
- Anfossi, N., P. Andre, S. Guia, C. S. Falk, S. Roetynck, C. A. Stewart, V. Bresó, C. Frassati, D. Reviron, D. Middleton, F. Romagne, S. Ugolini and E. Vivier (2006). "Human NK cell education by inhibitory receptors for MHC class I." Immunity **25**(2): 331-42.
- Aramburu, J., M. A. Balboa, A. Ramirez, A. Silva, A. Acevedo, F. Sanchez-Madrid, M. O. De Landazuri and M. Lopez-Botet (1990). "A novel functional cell surface dimer (Kp43) expressed by natural killer cells and T cell receptor-gamma/delta+ T lymphocytes. I. Inhibition of the IL-2-dependent proliferation by anti-Kp43 monoclonal antibody." J Immunol **144**(8): 3238-47.
- Arase, H., E. S. Mocarski, A. E. Campbell, A. B. Hill and L. L. Lanier (2002). "Direct recognition of cytomegalovirus by activating and inhibitory NK cell receptors." Science **296**(5571): 1323-6.
- Arnon, T. I., M. Lev, G. Katz, Y. Chernobrov, A. Porgador and O. Mandelboim (2001). "Recognition of viral hemagglutinins by NKp44 but not by NKp30." Eur J Immunol **31**(9): 2680-9.

Arnon, T. I., H. Achdout, N. Lieberman, R. Gazit, T. Gonen-Gross, G. Katz, A. Bar-Ilan, N. Bloushtain, M. Lev, A. Joseph, E. Kedar, A. Porgador and O. Mandelboim (2004). "The mechanisms controlling the recognition of tumor- and virus-infected cells by NKp46." Blood **103**(2): 664-72.

Arnon, T. I., H. Achdout, O. Levi, G. Markel, N. Saleh, G. Katz, R. Gazit, T. Gonen-Gross, J. Hanna, E. Nahari, A. Porgador, A. Honigman, B. Plachter, D. Mevorach, D. G. Wolf and O. Mandelboim (2005). "Inhibition of the NKp30 activating receptor by pp65 of human cytomegalovirus." Nat Immunol **6**(5): 515-23.

Arnon, T. I., G. Markel and O. Mandelboim (2006). "Tumor and viral recognition by natural killer cells receptors." Semin Cancer Biol **16**(5): 348-58.

Artavanis-Tsakonas, K., K. Eleme, K. L. McQueen, N. W. Cheng, P. Parham, D. M. Davis and E. M. Riley (2003). "Activation of a subset of human NK cells upon contact with Plasmodium falciparum-infected erythrocytes." J Immunol **171**(10): 5396-405.

Azzoni, L., O. Zatsepina, B. Abebe, I. M. Bennett, P. Kanakaraj and B. Perussia (1998). "Differential transcriptional regulation of CD161 and a novel gene, 197/15a, by IL-2, IL-15, and IL-12 in NK and T cells." J Immunol **161**(7): 3493-500.

Bahler, D. W., L. Hartung, S. Hill, G. M. Bowen and E. C. Vonderheid (2008). "CD158k/KIR3DL2 is a useful marker for identifying neoplastic T-cells in Sezary syndrome by flow cytometry." Cytometry B Clin Cytom **74**(3): 156-62.

Balsamo, M., F. Scordamaglia, G. Pietra, C. Manzini, C. Cantoni, M. Boitano, P. Queirolo, W. Vermi, F. Facchetti, A. Moretta, L. Moretta, M. C. Mingari and M. Vitale (2009). "Melanoma-associated fibroblasts modulate NK cell phenotype and antitumor cytotoxicity." Proc Natl Acad Sci U S A.

Bari, R., T. Bell, W. H. Leung, Q. P. Vong, W. K. Chan, N. Das Gupta, M. Holladay, B. Rooney and W. Leung (2009). "Significant functional heterogeneity among KIR2DL1 alleles and a pivotal role of Arginine245." Blood.

Barron, M. A., D. Gao, K. L. Springer, J. A. Patterson, M. W. Brunvand, P. A. McSweeney, C. Zeng, A. E. Baron and A. Weinberg (2009). "Relationship of reconstituted adaptive and innate cytomegalovirus (CMV)-specific immune responses with CMV viremia in hematopoietic stem cell transplant recipients." Clin Infect Dis **49**(12): 1777-83.

Bauer, S., V. Groh, J. Wu, A. Steinle, J. H. Phillips, L. L. Lanier and T. Spies (1999). "Activation of NK cells and T cells by NKG2D, a receptor for stress-inducible MICA." Science **285**(5428): 727-9.

Beck, S. and B. G. Barrell (1988). "Human cytomegalovirus encodes a glycoprotein homologous to MHC class-I antigens." Nature **331**(6153): 269-72.

Bennett, I. M., O. Zatsepina, L. Zamai, L. Azzoni, T. Mikheeva and B. Perussia (1996). "Definition of a natural killer NKR-P1A+/CD56-/CD16- functionally immature human NK cell subset that differentiates in vitro in the presence of interleukin 12." J Exp Med **184**(5): 1845-56.

Bertone, S., F. Schiavetti, R. Bellomo, C. Vitale, M. Ponte, L. Moretta and M. C. Mingari (1999). "Transforming growth factor-beta-induced expression of CD94/NKG2A inhibitory receptors in human T lymphocytes." Eur J Immunol **29**(1): 23-9.

Besson, C., S. Roetyncq, F. Williams, L. Orsi, C. Amiel, C. Lependeven, G. Antoni, O. Hermine, P. Brice, C. Ferme, P. Carde, D. Canioni, J. Briere, M. Raphael, J. C. Nicolas, J. Clavel, D. Middleton, E. Vivier and L. Abel (2007). "Association of killer cell immunoglobulin-like receptor genes with Hodgkin's lymphoma in a familial study." PLoS One **2**(5): e406.

Betts, M. R., J. M. Brenchley, D. A. Price, S. C. De Rosa, D. C. Douek, M. Roederer and R. A. Koup (2003). "Sensitive and viable identification of antigen-specific CD8+ T cells by a flow cytometric assay for degranulation." J Immunol Methods **281**(1-2): 65-78.

Bhat, R. and C. Watzl (2007). "Serial killing of tumor cells by human natural killer cells - enhancement by therapeutic antibodies." PLoS One **2**(3): e326.

Biassoni, R., M. Falco, A. Cambiaggi, P. Costa, S. Verdiani, D. Pende, R. Conte, C. Di Donato, P. Parham and L. Moretta (1995). "Amino acid substitutions can influence the natural killer (NK)-mediated recognition of HLA-C molecules. Role of serine-77 and lysine-80 in the target cell protection from lysis mediated by "group 2" or "group 1" NK clones." J Exp Med **182**(2): 605-9.

Bignon, J. D. and K. Gagne (2005). "KIR matching in hematopoietic stem cell transplantation." Curr Opin Immunol **17**(5): 553-9.

Biron, C. A., K. S. Byron and J. L. Sullivan (1989). "Severe herpesvirus infections in an adolescent without natural killer cells." N Engl J Med **320**(26): 1731-5.

Biron, C. A., H. A. Young and M. T. Kasaian (1990). "Interleukin 2-induced proliferation of murine natural killer cells in vivo." J Exp Med **171**(1): 173-88.

Biron, C. A. (1997). "Activation and function of natural killer cell responses during viral infections." Curr Opin Immunol **9**(1): 24-34.

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

Bishara, A., D. De Santis, C. C. Witt, C. Brautbar, F. T. Christiansen, R. Or, A. Nagler and S. Slavin (2004). "The beneficial role of inhibitory KIR genes of HLA class I NK epitopes in haploidentically mismatched stem cell allografts may be masked by residual donor-alloreactive T cells causing GVHD." Tissue Antigens **63**(3): 204-11.

Blom, B. and H. Spits (2006). "Development of human lymphoid cells." Annu Rev Immunol **24**: 287-320.

Bloushtain, N., U. Qimron, A. Bar-Ilan, O. Hershkovitz, R. Gazit, E. Fima, M. Korc, I. Vlodaysky, N. V. Bovin and A. Porgador (2004). "Membrane-associated heparan sulfate

proteoglycans are involved in the recognition of cellular targets by NKp30 and NKp46." J Immunol **173**(4): 2392-401.

Boles, K. S., S. E. Stepp, M. Bennett, V. Kumar and P. A. Mathew (2001). "2B4 (CD244) and CS1: novel members of the CD2 subset of the immunoglobulin superfamily molecules expressed on natural killer cells and other leukocytes." Immunol Rev **181**: 234-49.

Borrego, F., M. Ulbrecht, E. H. Weiss, J. E. Coligan and A. G. Brooks (1998). "Recognition of human histocompatibility leukocyte antigen (HLA)-E complexed with HLA class I signal sequence-derived peptides by CD94/NKG2 confers protection from natural killer cell-mediated lysis." J Exp Med **187**(5): 813-8.

Bottino, C., R. Castriconi, D. Pende, P. Rivera, M. Nanni, B. Carnemolla, C. Cantoni, J. Grassi, S. Marcenaro, N. Reymond, M. Vitale, L. Moretta, M. Lopez and A. Moretta (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**(4): 557-67.

Boulet, S., M. Kleyman, J. Y. Kim, P. Kanya, S. Sharafi, N. Simic, J. Bruneau, J. P. Routy, C. M. Tsoukas and N. F. Bernard (2008). "A combined genotype of KIR3DL1 high expressing alleles and HLA-B*57 is associated with a reduced risk of HIV infection." Aids **22**(12): 1487-91.

Boyton, R. J., J. Smith, R. Ward, M. Jones, L. Ozerovitch, R. Wilson, M. Rose, J. Trowsdale and D. M. Altmann (2006). "HLA-C and killer cell immunoglobulin-like receptor genes in idiopathic bronchiectasis." Am J Respir Crit Care Med **173**(3): 327-33.

Brandt, C. S., M. Baratin, E. C. Yi, J. Kennedy, Z. Gao, B. Fox, B. Haldeman, C. D. Ostrander, T. Kaifu, C. Chabannon, A. Moretta, R. West, W. Xu, E. Vivier and S. D. Levin (2009). "The B7 family member B7-H6 is a tumor cell ligand for the activating natural killer cell receptor NKp30 in humans." J Exp Med **206**(7): 1495-503.

Braud, V., E. Y. Jones and A. McMichael (1997). "The human major histocompatibility complex class Ib molecule HLA-E binds signal sequence-derived peptides with primary anchor residues at positions 2 and 9." Eur J Immunol **27**(5): 1164-9.

Braud, V. M., D. S. Allan, C. A. O'Callaghan, K. Soderstrom, A. D'Andrea, G. S. Ogg, S. Lazetic, N. T. Young, J. I. Bell, J. H. Phillips, L. L. Lanier and A. J. McMichael (1998). "HLA-E binds to natural killer cell receptors CD94/NKG2A, B and C." Nature **391**(6669): 795-9.

Brodin, P. and P. Hoglund (2008). "Beyond licensing and disarming: a quantitative view on NK-cell education." Eur J Immunol **38**(11): 2934-7.

Brodin, P., K. Karre and P. Hoglund (2009a). "NK cell education: not an on-off switch but a tunable rheostat." Trends Immunol **30**(4): 143-9.

Brodin, P., T. Lakshmikanth, S. Johansson, K. Karre and P. Hoglund (2009b). "The strength of inhibitory input during education quantitatively tunes the functional responsiveness of individual natural killer cells." Blood **113**(11): 2434-41.

Brooks, A. G., P. E. Posch, C. J. Scorzelli, F. Borrego and J. E. Coligan (1997). "NKG2A complexed with CD94 defines a novel inhibitory natural killer cell receptor." J Exp Med **185**(4): 795-800.

Brown, M. G., A. O. Dokun, J. W. Heusel, H. R. Smith, D. L. Beckman, E. A. Blattenberger, C. E. Dubbelde, L. R. Stone, A. A. Scalzo and W. M. Yokoyama (2001). "Vital involvement of a natural killer cell activation receptor in resistance to viral infection." Science **292**(5518): 934-7.

Brunetta, E., M. Fogli, S. Varchetta, L. Bozzo, K. L. Hudspeth, E. Marcenaro, A. Moretta and D. Mavilio "Chronic HIV-1 viremia reverses NKG2A/NKG2C ratio on natural killer cells in patients with human cytomegalovirus co-infection." Aids **24**(1): 27-34.

Bryceson, Y. T. and E. O. Long (2008). "Line of attack: NK cell specificity and integration of signals." Curr Opin Immunol **20**(3): 344-52.

Burkhardt, J. K., S. Hester and Y. Argon (1989). "Two proteins targeted to the same lytic granule compartment undergo very different posttranslational processing." Proc Natl Acad Sci U S A **86**(18): 7128-32.

Butsch Kovacic, M., M. Martin, X. Gao, T. Fuksenko, C. J. Chen, Y. J. Cheng, J. Y. Chen, R. Apple, A. Hildesheim and M. Carrington (2005). "Variation of the killer cell immunoglobulin-like receptors and HLA-C genes in nasopharyngeal carcinoma." Cancer Epidemiol Biomarkers Prev **14**(11 Pt 1): 2673-7.

Campbell, K. S., M. Cella, M. Carretero, M. Lopez-Botet and M. Colonna (1998). "Signaling through human killer cell activating receptors triggers tyrosine phosphorylation of an associated protein complex." Eur J Immunol **28**(2): 599-609.

Carayannopoulos, L. N., O. V. Naidenko, D. H. Fremont and W. M. Yokoyama (2002). "Cutting edge: murine UL16-binding protein-like transcript 1: a newly described transcript encoding a high-affinity ligand for murine NKG2D." J Immunol **169**(8): 4079-83.

Carlens, S., M. Gilljam, B. J. Chambers, J. Aschan, H. Guven, H. G. Ljunggren, B. Christensson and M. S. Dilber (2001). "A new method for in vitro expansion of cytotoxic human CD3-CD56+ natural killer cells." Hum Immunol **62**(10): 1092-8.

Carlsten, M., N. K. Bjorkstrom, H. Norell, Y. Bryceson, T. van Hall, B. C. Baumann, M. Hanson, K. Schedvins, R. Kiessling, H. G. Ljunggren and K. J. Malmberg (2007). "DNAX accessory molecule-1 mediated recognition of freshly isolated ovarian carcinoma by resting natural killer cells." Cancer Res **67**(3): 1317-25.

Carr, W. H., D. B. Rosen, H. Arase, D. F. Nixon, J. Michaelsson and L. L. Lanier (2007). "Cutting Edge: KIR3DS1, a gene implicated in resistance to progression to AIDS, encodes a DAP12-associated receptor expressed on NK cells that triggers NK cell activation." J Immunol **178**(2): 647-51.

Carretero, M., C. Cantoni, T. Bellon, C. Bottino, R. Biassoni, A. Rodriguez, J. J. Perez-Villar, L. Moretta, A. Moretta and M. Lopez-Botet (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**(2): 563-7.

Carrington, M., S. Wang, M. P. Martin, X. Gao, M. Schiffman, J. Cheng, R. Herrero, A. C. Rodriguez, R. Kurman, R. Mortel, P. Schwartz, A. Glass and A. Hildesheim (2005). "Hierarchy of resistance to cervical neoplasia mediated by combinations of killer immunoglobulin-like receptor and human leukocyte antigen loci." J Exp Med **201**(7): 1069-75.

Carrington, M., M. P. Martin and J. van Bergen (2008). "KIR-HLA intercourse in HIV disease." Trends Microbiol **16**(12): 620-7.

Cerboni, C., M. Mousavi-Jazi, H. Wakiguchi, E. Carbone, K. Karre and K. Soderstrom (2001). "Synergistic effect of IFN-gamma and human cytomegalovirus protein UL40 in the HLA-E-dependent protection from NK cell-mediated cytotoxicity." Eur J Immunol **31**(10): 2926-35.

Cerwenka, A., A. B. Bakker, T. McClanahan, J. Wagner, J. Wu, J. H. Phillips and L. L. Lanier (2000). "Retinoic acid early inducible genes define a ligand family for the activating NKG2D receptor in mice." Immunity **12**(6): 721-7.

Cerwenka, A., J. L. Baron and L. L. Lanier (2001). "Ectopic expression of retinoic acid early inducible-1 gene (RAE-1) permits natural killer cell-mediated rejection of a MHC class I-bearing tumor in vivo." Proc Natl Acad Sci U S A **98**(20): 11521-6.

Chan, H. W., Z. B. Kurago, C. A. Stewart, M. J. Wilson, M. P. Martin, B. E. Mace, M. Carrington, J. Trowsdale and C. T. Lutz (2003). "DNA methylation maintains allele-specific KIR gene expression in human natural killer cells." J Exp Med **197**(2): 245-55.

Chan, H. W., J. S. Miller, M. B. Moore and C. T. Lutz (2005). "Epigenetic control of highly homologous killer Ig-like receptor gene alleles." J Immunol **175**(9): 5966-74.

Chang, C., A. Rodriguez, M. Carretero, M. Lopez-Botet, J. H. Phillips and L. L. Lanier (1995). "Molecular characterization of human CD94: a type II membrane glycoprotein related to the C-type lectin superfamily." Eur J Immunol **25**(9): 2433-7.

Chapman, T. L., A. P. Heikeman and P. J. Bjorkman (1999). "The inhibitory receptor LIR-1 uses a common binding interaction to recognize class I MHC molecules and the viral homolog UL18." Immunity **11**(5): 603-13.

Chen, C., M. Busson, V. Rocha, M. L. Appert, V. Lepage, N. Dulphy, P. Haas, G. Socie, A. Toubert, D. Charron and P. Loiseau (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**(6): 437-44.

Chewning, J. H., C. N. Gudme, K. C. Hsu, A. Selvakumar and B. Dupont (2007). "KIR2DS1-positive NK cells mediate alloresponse against the C2 HLA-KIR ligand group in vitro." J Immunol **179**(2): 854-68.

Chklovskaya, E., P. Nowbakht, C. Nissen, A. Gratwohl, M. Bargetzi and A. Wodnar-Filipowicz (2004). "Reconstitution of dendritic and natural killer-cell subsets after allogeneic stem cell transplantation: effects of endogenous flt3 ligand." Blood **103**(10): 3860-8.

Chlewicki, L. K., C. A. Velikovsky, V. Balakrishnan, R. A. Mariuzza and V. Kumar (2008). "Molecular basis of the dual functions of 2B4 (CD244)." J Immunol **180**(12): 8159-67.

Chowdhury, D. and J. Lieberman (2008). "Death by a thousand cuts: granzyme pathways of programmed cell death." Annu Rev Immunol **26**: 389-420.

Ciccione, E., D. Pende, O. Viale, A. Than, C. Di Donato, A. M. Orengo, R. Biassoni, S. Verdiani, A. Amoroso, A. Moretta and et al. (1992). "Involvement of HLA class I alleles in natural killer (NK) cell-specific functions: expression of HLA-Cw3 confers selective protection from lysis by alloreactive NK clones displaying a defined specificity (specificity 2)." J Exp Med **176**(4): 963-71.

Clausen, J., D. Wolf, A. L. Petzer, E. Gunsilius, P. Schumacher, B. Kircher, G. Gastl and D. Nachbaur (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**(3): 520-8.

Clemenceau, B., G. Gallot, R. Vivien, J. Gaschet, M. Campone and H. Vie (2006). "Long-term preservation of antibody-dependent cellular cytotoxicity (ADCC) of natural killer cells amplified in vitro from the peripheral blood of breast cancer patients after chemotherapy." J Immunother **29**(1): 53-60.

Cohen, G. B., R. T. Gandhi, D. M. Davis, O. Mandelboim, B. K. Chen, J. L. Strominger and D. Baltimore (1999). "The selective downregulation of class I major histocompatibility complex proteins by HIV-1 protects HIV-infected cells from NK cells." Immunity **10**(6): 661-71.

Collins, K. L., B. K. Chen, S. A. Kalams, B. D. Walker and D. Baltimore (1998). "HIV-1 Nef protein protects infected primary cells against killing by cytotoxic T lymphocytes." Nature **391**(6665): 397-401.

Colonna, M. and J. Samaridis (1995). "Cloning of immunoglobulin-superfamily members associated with HLA-C and HLA-B recognition by human natural killer cells." Science **268**(5209): 405-8.

Colonna, M., F. Navarro, T. Bellon, M. Llano, P. Garcia, J. Samaridis, L. Angman, M. Cella and M. Lopez-Botet (1997). "A common inhibitory receptor for major histocompatibility complex class I molecules on human lymphoid and myelomonocytic cells." J Exp Med **186**(11): 1809-18.

Colucci, F., C. Soudais, E. Rosmaraki, L. Vanes, V. L. Tybulewicz and J. P. Di Santo (1999). "Dissecting NK cell development using a novel alymphoid mouse model:

investigating the role of the c-abl proto-oncogene in murine NK cell differentiation." J Immunol **162**(5): 2761-5.

Colucci, F., M. A. Caligiuri and J. P. Di Santo (2003). "What does it take to make a natural killer?" Nat Rev Immunol **3**(5): 413-25.

Cook, M., D. Briggs, C. Craddock, P. Mahendra, D. Milligan, C. Fegan, P. Darbyshire, S. Lawson, E. Boxall and P. Moss (2006). "Donor KIR genotype has a major influence on the rate of cytomegalovirus reactivation following T-cell replete stem cell transplantation." Blood **107**(3): 1230-2.

Cook, M. A., D. W. Milligan, C. D. Fegan, P. J. Darbyshire, P. Mahendra, C. F. Craddock, P. A. Moss and D. C. Briggs (2004). "The impact of donor KIR and patient HLA-C genotypes on outcome following HLA-identical sibling hematopoietic stem cell transplantation for myeloid leukemia." Blood **103**(4): 1521-6.

Cooley, S., E. Trachtenberg, T. L. Bergemann, K. Saeteurn, J. Klein, C. T. Le, S. G. Marsh, L. A. Guethlein, P. Parham, J. S. Miller and D. J. Weisdorf (2009). "Donors with group B KIR haplotypes improve relapse-free survival after unrelated hematopoietic cell transplantation for acute myelogenous leukemia." Blood **113**(3): 726-32.

Cooper, M. A., T. A. Fehniger and M. A. Caligiuri (2001). "The biology of human natural killer-cell subsets." Trends Immunol **22**(11): 633-40.

Cosman, D., N. Fanger, L. Borges, M. Kubin, W. Chin, L. Peterson and M. L. Hsu (1997). "A novel immunoglobulin superfamily receptor for cellular and viral MHC class I molecules." Immunity **7**(2): 273-82.

Daniels, K. A., G. Devora, W. C. Lai, C. L. O'Donnell, M. Bennett and R. M. Welsh (2001). "Murine cytomegalovirus is regulated by a discrete subset of natural killer cells reactive with monoclonal antibody to Ly49H." J Exp Med **194**(1): 29-44.

Derre, L., M. Corvaisier, M. C. Pandolfino, E. Diez, F. Jotereau and N. Gervois (2002). "Expression of CD94/NKG2-A on human T lymphocytes is induced by IL-12: implications for adoptive immunotherapy." J Immunol **168**(10): 4864-70.

Di Santo, J. P. (2006). "Natural killer cell developmental pathways: a question of balance." Annu Rev Immunol **24**: 257-86.

Diefenbach, A., A. M. Jamieson, S. D. Liu, N. Shastri and D. H. Raulet (2000). "Ligands for the murine NKG2D receptor: expression by tumor cells and activation of NK cells and macrophages." Nat Immunol **1**(2): 119-26.

Diefenbach, A., E. R. Jensen, A. M. Jamieson and D. H. Raulet (2001). "Rae1 and H60 ligands of the NKG2D receptor stimulate tumour immunity." Nature **413**(6852): 165-71.

Diefenbach, A., J. K. Hsia, M. Y. Hsiung and D. H. Raulet (2003). "A novel ligand for the NKG2D receptor activates NK cells and macrophages and induces tumor immunity." Eur J Immunol **33**(2): 381-91.

Draghi, M., A. Pashine, B. Sanjanwala, K. Gendzekhadze, C. Cantoni, D. Cosman, A. Moretta, N. M. Valiante and P. Parham (2007). "NKp46 and NKG2D recognition of infected dendritic cells is necessary for NK cell activation in the human response to influenza infection." J Immunol **178**(5): 2688-98.

Dvorak, A. M., S. J. Galli, J. A. Marcum, G. Nabel, H. der Simonian, J. Goldin, R. A. Monahan, K. Pyne, H. Cantor, R. D. Rosenberg and H. F. Dvorak (1983). "Cloned mouse cells with natural killer function and cloned suppressor T cells express ultrastructural and biochemical features not shared by cloned inducer T cells." J Exp Med **157**(3): 843-61.

Exley, M., S. Porcelli, M. Furman, J. Garcia and S. Balk (1998). "CD161 (NKR-P1A) costimulation of CD1d-dependent activation of human T cells expressing invariant V alpha 24 J alpha Q T cell receptor alpha chains." J Exp Med **188**(5): 867-76.

Fauriat, C., M. A. Ivarsson, H. G. Ljunggren, K. J. Malmberg and J. Michaelsson (2009). "Education of human natural killer cells by activating killer cell immunoglobulin-like receptors." Blood.

Ferlazzo, G. and C. Munz (2004). "NK cell compartments and their activation by dendritic cells." J Immunol **172**(3): 1333-9.

Fernandez, N. C., E. Treiner, R. E. Vance, A. M. Jamieson, S. Lemieux and D. H. Raulet (2005). "A subset of natural killer cells achieves self-tolerance without expressing inhibitory receptors specific for self-MHC molecules." Blood **105**(11): 4416-23.

Ferrini, S., A. Cambiaggi, R. Meazza, S. Sforzini, S. Marciano, M. C. Mingari and L. Moretta (1994). "T cell clones expressing the natural killer cell-related p58 receptor molecule display heterogeneity in phenotypic properties and p58 function." Eur J Immunol **24**(10): 2294-8.

Fire, A., S. Xu, M. K. Montgomery, S. A. Kostas, S. E. Driver and C. C. Mello (1998). "Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*." Nature **391**(6669): 806-11.

Fischer, J. C., H. Ottinger, S. Ferencik, M. Sribar, M. Punzel, D. W. Beelen, M. A. Schwan, H. Grosse-Wilde, P. Wernet and M. Uhrberg (2007). "Relevance of C1 and C2 epitopes for hemopoietic stem cell transplantation: role for sequential acquisition of HLA-C-specific inhibitory killer Ig-like receptor." J Immunol **178**(6): 3918-23.

Flodstrom-Tullberg, M., Y. T. Bryceson, F. D. Shi, P. Hoglund and H. G. Ljunggren (2009). "Natural killer cells in human autoimmunity." Curr Opin Immunol **21**(6): 634-40.

Fogler, W. E., K. Volker, K. L. McCormick, M. Watanabe, J. R. Ortaldo and R. H. Wiltrot (1996). "NK cell infiltration into lung, liver, and subcutaneous B16 melanoma is mediated by VCAM-1/VLA-4 interaction." J Immunol **156**(12): 4707-14.

Foley, B., D. De Santis, L. Lathbury, F. Christiansen and C. Witt (2008). "KIR2DS1-mediated activation overrides NKG2A-mediated inhibition in HLA-C C2-negative individuals." Int Immunol **20**(4): 555-63.

Fourmentraux-Neves, E., A. Jalil, S. Da Rocha, C. Pichon, S. Chouaib, G. Bismuth and A. Caignard (2008). "Two opposite signaling outputs are driven by the KIR2DL1 receptor in human CD4+ T cells." Blood **112**(6): 2381-9.

Freud, A. G. and M. A. Caligiuri (2006). "Human natural killer cell development." Immunol Rev **214**: 56-72.

Freud, A. G., A. Yokohama, B. Becknell, M. T. Lee, H. C. Mao, A. K. Ferketich and M. A. Caligiuri (2006). "Evidence for discrete stages of human natural killer cell differentiation in vivo." J Exp Med **203**(4): 1033-43.

Friese, M. A., M. Platten, S. Z. Lutz, U. Naumann, S. Aulwurm, F. Bischof, H. J. Buhring, J. Dichgans, H. G. Rammensee, A. Steinle and M. Weller (2003). "MICA/NKG2D-mediated immunogene therapy of experimental gliomas." Cancer Res **63**(24): 8996-9006.

Fukuda, M. (1991). "Lysosomal membrane glycoproteins. Structure, biosynthesis, and intracellular trafficking." J Biol Chem **266**(32): 21327-30.

Gagne, K., G. Brizard, B. Gueglio, N. Milpied, P. Herry, F. Bonneville, M. L. Cheneau, N. Schleinitz, A. Cesbron, G. Follea, J. L. Harrousseau and J. D. Bignon (2002). "Relevance of KIR gene polymorphisms in bone marrow transplantation outcome." Hum Immunol **63**(4): 271-80.

Gagne, K., M. Busson, J. D. Bignon, M. L. Balere-Appert, P. Loiseau, A. Dormoy, V. Dubois, P. Perrier, I. Jollet, M. Bois, D. Masson, A. Moine, L. Absi, D. Blaise, D. Charron and C. Raffoux (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**(11): 1366-75.

Gasser, S. and D. H. Raulet (2006). "Activation and self-tolerance of natural killer cells." Immunol Rev **214**: 130-42.

Gati, A., S. Da Rocha, N. Guerra, B. Escudier, A. Moretta, S. Chouaib, E. Angevin and A. Caignard (2004). "Analysis of the natural killer mediated immune response in metastatic renal cell carcinoma patients." Int J Cancer **109**(3): 393-401.

Gaudieri, S., D. DeSantis, E. McKinnon, C. Moore, D. Nolan, C. S. Witt, S. A. Mallal and F. T. Christiansen (2005). "Killer immunoglobulin-like receptors and HLA act both independently and synergistically to modify HIV disease progression." Genes Immun **6**(8): 683-90.

Gazit, R., B. Z. Garty, Y. Monselise, V. Hoffer, Y. Finkelstein, G. Markel, G. Katz, J. Hanna, H. Achdout, R. Gruda, T. Gonen-Gross and O. Mandelboim (2004). "Expression of KIR2DL1 on the entire NK cell population: a possible novel immunodeficiency syndrome." Blood **103**(5): 1965-6.

Gilfillan, S., C. J. Chan, M. Cella, N. M. Haynes, A. S. Rapaport, K. S. Boles, D. M. Andrews, M. J. Smyth and M. Colonna (2008). "DNAM-1 promotes activation of cytotoxic lymphocytes by nonprofessional antigen-presenting cells and tumors." J Exp Med **205**(13): 2965-73.

- Gillespie, G. M., A. Bashirova, T. Dong, D. W. McVicar, S. L. Rowland-Jones and M. Carrington (2007). "Lack of KIR3DS1 binding to MHC class I Bw4 tetramers in complex with CD8+ T cell epitopes." *AIDS Res Hum Retroviruses* **23**(3): 451-5.
- Glas, R., L. Franksson, C. Une, M. L. Eloranta, C. Ohlen, A. Orn and K. Karre (2000). "Recruitment and activation of natural killer (NK) cells in vivo determined by the target cell phenotype. An adaptive component of NK cell-mediated responses." *J Exp Med* **191**(1): 129-38.
- Graef, T., A. K. Moesta, P. J. Norman, L. Abi-Rached, L. Vago, A. M. Older Aguilar, M. Gleimer, J. A. Hammond, L. A. Guethlein, D. A. Bushnell, P. J. Robinson and P. Parham (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**(11): 2557-72.
- Groh, V., K. Smythe, Z. Dai and T. Spies (2006). "Fas-ligand-mediated paracrine T cell regulation by the receptor NKG2D in tumor immunity." *Nat Immunol* **7**(7): 755-62.
- Guerra, N., Y. X. Tan, N. T. Joncker, A. Choy, F. Gallardo, N. Xiong, S. Knoblauch, D. Cado, N. M. Greenberg and D. H. Raulet (2008). "NKG2D-deficient mice are defective in tumor surveillance in models of spontaneous malignancy." *Immunity* **28**(4): 571-80.
- 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**(3): 1133-44.
- Gumperz, J. E., L. D. Barber, N. M. Valiante, L. Percival, J. H. Phillips, L. L. Lanier and P. Parham (1997). "Conserved and variable residues within the Bw4 motif of HLA-B make separable contributions to recognition by the NKB1 killer cell-inhibitory receptor." *J Immunol* **158**(11): 5237-41.
- Halfteck, G. G., M. Elboim, C. Gur, H. Achdout, H. Ghadially and O. Mandelboim (2009). "Enhanced in vivo growth of lymphoma tumors in the absence of the NK-activating receptor Nkp46/NCR1." *J Immunol* **182**(4): 2221-30.
- Hansasuta, P., T. Dong, H. Thananchai, M. Weekes, C. Willberg, H. Aldemir, S. Rowland-Jones and V. M. Braud (2004). "Recognition of HLA-A3 and HLA-A11 by KIR3DL2 is peptide-specific." *Eur J Immunol* **34**(6): 1673-9.
- Hansen, D. S., M. C. D'Ombra and L. Schofield (2007). "The role of leukocytes bearing Natural Killer Complex receptors and Killer Immunoglobulin-like Receptors in the immunology of malaria." *Curr Opin Immunol* **19**(4): 416-23.
- Hayashi, T., K. Imai, Y. Morishita, I. Hayashi, Y. Kusunoki and K. Nakachi (2006). "Identification of the NKG2D haplotypes associated with natural cytotoxic activity of peripheral blood lymphocytes and cancer immunosurveillance." *Cancer Res* **66**(1): 563-70.

Herberman, R. B., M. E. Nunn, H. T. Holden and D. H. Lavrin (1975a). "Natural cytotoxic reactivity of mouse lymphoid cells against syngeneic and allogeneic tumors. II. Characterization of effector cells." Int J Cancer **16**(2): 230-9.

Herberman, R. B., M. E. Nunn and D. H. Lavrin (1975b). "Natural cytotoxic reactivity of mouse lymphoid cells against syngeneic acid allogeneic tumors. I. Distribution of reactivity and specificity." Int J Cancer **16**(2): 216-29.

Hermann, E., A. Berthe, C. Truyens, C. Alonso-Vega, R. Parrado, F. Torrico, Y. Carlier and V. M. Braud (2009). "Killer cell immunoglobulin-like receptor expression induction on neonatal CD8(+) T cells in vitro and following congenital infection with *Trypanosoma cruzi*." Immunology.

Ho, J. W., O. Hershkovitz, M. Peiris, A. Zilka, A. Bar-Ilan, B. Nal, K. Chu, M. Kudelko, Y. W. Kam, H. Achdout, M. Mandelboim, R. Altmeyer, O. Mandelboim, R. Bruzzone and A. Porgador (2008). "H5-type influenza virus hemagglutinin is functionally recognized by the natural killer-activating receptor NKp44." J Virol **82**(4): 2028-32.

Hollenbach, J. A., M. B. Ladner, K. Saetern, K. D. Taylor, L. Mei, T. Haritunians, D. P. McGovern, H. A. Erlich, J. I. Rotter and E. A. Trachtenberg (2009). "Susceptibility to Crohn's disease is mediated by KIR2DL2/KIR2DL3 heterozygosity and the HLA-C ligand." Immunogenetics.

Holm, S. J., K. Sakuraba, L. Mallbris, K. Wolk, M. Stahle and F. O. Sanchez (2005). "Distinct HLA-C/KIR genotype profile associates with guttate psoriasis." J Invest Dermatol **125**(4): 721-30.

Hou, L., N. K. Steiner, M. Chen, I. Belle, A. L. Kubit, J. Ng and C. K. Hurley (2008). "Limited allelic diversity of stimulatory two-domain killer cell immunoglobulin-like receptors." Hum Immunol **69**(3): 174-8.

Houchins, J. P., T. Yabe, C. McSherry and F. H. Bach (1991). "DNA sequence analysis of NKG2, a family of related cDNA clones encoding type II integral membrane proteins on human natural killer cells." J Exp Med **173**(4): 1017-20.

Houchins, J. P., L. L. Lanier, E. C. Niemi, J. H. Phillips and J. C. Ryan (1997). "Natural killer cell cytolytic activity is inhibited by NKG2-A and activated by NKG2-C." J Immunol **158**(8): 3603-9.

Hsu, K. C., C. A. Keever-Taylor, A. Wilton, C. Pinto, G. Heller, K. Arkun, R. J. O'Reilly, M. M. Horowitz and B. Dupont (2005). "Improved outcome in HLA-identical sibling hematopoietic stem-cell transplantation for acute myelogenous leukemia predicted by KIR and HLA genotypes." Blood **105**(12): 4878-84.

Iguchi-Manaka, A., H. Kai, Y. Yamashita, K. Shibata, S. Tahara-Hanaoka, S. Honda, T. Yasui, H. Kikutani, K. Shibuya and A. Shibuya (2008). "Accelerated tumor growth in mice deficient in DNAM-1 receptor." J Exp Med **205**(13): 2959-64.

- Jabri, B., J. M. Selby, H. Negulescu, L. Lee, A. I. Roberts, A. Beavis, M. Lopez-Botet, E. C. Ebert and R. J. Winchester (2002). "TCR specificity dictates CD94/NKG2A expression by human CTL." Immunity **17**(4): 487-99.
- Jaleco, A. C., B. Blom, P. Res, K. Weijer, L. L. Lanier, J. H. Phillips and H. Spits (1997). "Fetal liver contains committed NK progenitors, but is not a site for development of CD34+ cells into T cells." J Immunol **159**(2): 694-702.
- Jamieson, A. M., A. Diefenbach, C. W. McMahon, N. Xiong, J. R. Carlyle and D. H. Raulet (2002). "The role of the NKG2D immunoreceptor in immune cell activation and natural killing." Immunity **17**(1): 19-29.
- Jiao, Y. L., C. Y. Ma, L. C. Wang, B. Cui, J. Zhang, L. You, Z. J. Chen, J. F. Li and Y. R. Zhao (2008). "Polymorphisms of KIRs gene and HLA-C alleles in patients with ankylosing spondylitis: possible association with susceptibility to the disease." J Clin Immunol **28**(4): 343-9.
- Johansson, M. H., C. Bieberich, G. Jay, K. Karre and P. Hoglund (1997). "Natural killer cell tolerance in mice with mosaic expression of major histocompatibility complex class I transgene." J Exp Med **186**(3): 353-64.
- Joncker, N. T. and D. H. Raulet (2008). "Regulation of NK cell responsiveness to achieve self-tolerance and maximal responses to diseased target cells." Immunol Rev **224**: 85-97.
- Joncker, N. T., N. C. Fernandez, E. Treiner, E. Vivier and D. H. Raulet (2009). "NK cell responsiveness is tuned commensurate with the number of inhibitory receptors for self-MHC class I: the rheostat model." J Immunol **182**(8): 4572-80.
- Juelke, K., M. Killig, A. Thiel, J. Dong and C. Romagnani (2009). "Education of hyporesponsive NK cells by cytokines." Eur J Immunol **39**(9): 2548-55.
- Kannan, K., R. M. Stewart, W. Bounds, S. R. Carlsson, M. Fukuda, K. W. Betzing and R. F. Holcombe (1996). "Lysosome-associated membrane proteins h-LAMP1 (CD107a) and h-LAMP2 (CD107b) are activation-dependent cell surface glycoproteins in human peripheral blood mononuclear cells which mediate cell adhesion to vascular endothelium." Cell Immunol **171**(1): 10-9.
- Karimi, M., T. M. Cao, J. A. Baker, M. R. Verneris, L. Soares and R. S. Negrin (2005). "Silencing human NKG2D, DAP10, and DAP12 reduces cytotoxicity of activated CD8+ T cells and NK cells." J Immunol **175**(12): 7819-28.
- Karlsen, T. H., K. M. Boberg, M. Olsson, J. Y. Sun, D. Senitzer, A. Bergquist, E. Schrupf, E. Thorsby and B. A. Lie (2007). "Particular genetic variants of ligands for natural killer cell receptors may contribute to the HLA associated risk of primary sclerosing cholangitis." J Hepatol **46**(5): 899-906.
- Karre, K., H. G. Ljunggren, G. Piontek and R. Kiessling (1986). "Selective rejection of H-2-deficient lymphoma variants suggests alternative immune defence strategy." Nature **319**(6055): 675-8.

Karre, K. (2002). "NK cells, MHC class I molecules and the missing self." Scand J Immunol **55**(3): 221-8.

Katz, G., G. Markel, S. Mizrahi, T. I. Arnon and O. Mandelboim (2001). "Recognition of HLA-Cw4 but not HLA-Cw6 by the NK cell receptor killer cell Ig-like receptor two-domain short tail number 4." J Immunol **166**(12): 7260-7.

Katz, G., R. Gazit, T. I. Arnon, T. Gonen-Gross, G. Tarcic, G. Markel, R. Gruda, H. Achdout, O. Drize, S. Merims and O. Mandelboim (2004). "MHC class I-independent recognition of NK-activating receptor KIR2DS4." J Immunol **173**(3): 1819-25.

Khakoo, S. I., C. L. Thio, M. P. Martin, C. R. Brooks, X. Gao, J. Astemborski, J. Cheng, J. J. Goedert, D. Vlahov, M. Hilgartner, S. Cox, A. M. Little, G. J. Alexander, M. E. Cramp, S. J. O'Brien, W. M. Rosenberg, D. L. Thomas and M. Carrington (2004). "HLA and NK cell inhibitory receptor genes in resolving hepatitis C virus infection." Science **305**(5685): 872-4.

Kiessling, R., E. Klein, H. Pross and H. Wigzell (1975a). "'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**(2): 117-21.

Kiessling, R., E. Klein and H. Wigzell (1975b). "'Natural' killer cells in the mouse. I. Cytotoxic cells with specificity for mouse Moloney leukemia cells. Specificity and distribution according to genotype." Eur J Immunol **5**(2): 112-7.

Kim, K. D., S. C. Choi, A. Kim, Y. K. Choe, I. S. Choe and J. S. Lim (2001). "Dendritic cell-tumor coculturing vaccine can induce antitumor immunity through both NK and CTL interaction." Int Immunopharmacol **1**(12): 2117-29.

Kim, S., J. Poursine-Laurent, S. M. Truscott, L. Lybarger, Y. J. Song, L. Yang, A. R. French, J. B. Sunwoo, S. Lemieux, T. H. Hansen and W. M. Yokoyama (2005). "Licensing of natural killer cells by host major histocompatibility complex class I molecules." Nature **436**(7051): 709-13.

Kitawaki, J., B. Xu, H. Ishihara, M. Fukui, G. Hasegawa, N. Nakamura, S. Mizuno, M. Ohta, H. Obayashi and H. Honjo (2007). "Association of killer cell immunoglobulin-like receptor genotypes with susceptibility to endometriosis." Am J Reprod Immunol **58**(6): 481-6.

Lanier, L. L., A. M. Le, C. I. Civin, M. R. Loken and J. H. Phillips (1986). "The relationship of CD16 (Leu-11) and Leu-19 (NKH-1) antigen expression on human peripheral blood NK cells and cytotoxic T lymphocytes." J Immunol **136**(12): 4480-6.

Lanier, L. L., C. Chang and J. H. Phillips (1994). "Human NKR-P1A. A disulfide-linked homodimer of the C-type lectin superfamily expressed by a subset of NK and T lymphocytes." J Immunol **153**(6): 2417-28.

Lanier, L. L., B. Corliss, J. Wu and J. H. Phillips (1998). "Association of DAP12 with activating CD94/NKG2C NK cell receptors." Immunity **8**(6): 693-701.

- Lanier, L. L. (2008). "Evolutionary struggles between NK cells and viruses." Nat Rev Immunol **8**(4): 259-68.
- Lazetic, S., C. Chang, J. P. Houchins, L. L. Lanier and J. H. Phillips (1996). "Human natural killer cell receptors involved in MHC class I recognition are disulfide-linked heterodimers of CD94 and NKG2 subunits." J Immunol **157**(11): 4741-5.
- Le Drean, E., F. Vely, L. Olcese, A. Cambiaggi, S. Guia, G. Krystal, N. Gervois, A. Moretta, F. Jotereau and E. Vivier (1998). "Inhibition of antigen-induced T cell response and antibody-induced NK cell cytotoxicity by NKG2A: association of NKG2A with SHP-1 and SHP-2 protein-tyrosine phosphatases." Eur J Immunol **28**(1): 264-76.
- Lee, K. M., M. E. McNerney, S. E. Stepp, P. A. Mathew, J. D. Schatzle, M. Bennett and V. Kumar (2004). "2B4 acts as a non-major histocompatibility complex binding inhibitory receptor on mouse natural killer cells." J Exp Med **199**(9): 1245-54.
- Lee, N., D. R. Goodlett, A. Ishitani, H. Marquardt and D. E. Geraghty (1998a). "HLA-E surface expression depends on binding of TAP-dependent peptides derived from certain HLA class I signal sequences." J Immunol **160**(10): 4951-60.
- Lee, N., M. Llano, M. Carretero, A. Ishitani, F. Navarro, M. Lopez-Botet and D. E. Geraghty (1998b). "HLA-E is a major ligand for the natural killer inhibitory receptor CD94/NKG2A." Proc Natl Acad Sci U S A **95**(9): 5199-204.
- Lee, S. H., A. Zafer, Y. de Repentigny, R. Kothary, M. L. Tremblay, P. Gros, P. Duplay, J. R. Webb and S. M. Vidal (2003). "Transgenic expression of the activating natural killer receptor Ly49H confers resistance to cytomegalovirus in genetically susceptible mice." J Exp Med **197**(4): 515-26.
- Lepin, E. J., J. M. Bastin, D. S. Allan, G. Roncador, V. M. Braud, D. Y. Mason, P. A. van der Merwe, A. J. McMichael, J. I. Bell, S. H. Powis and C. A. O'Callaghan (2000). "Functional characterization of HLA-F and binding of HLA-F tetramers to ILT2 and ILT4 receptors." Eur J Immunol **30**(12): 3552-61.
- Lettau, M., H. Schmidt, D. Kabelitz and O. Janssen (2007). "Secretory lysosomes and their cargo in T and NK cells." Immunol Lett **108**(1): 10-9.
- Levinson, R. D., Z. Du, L. Luo, D. Monnet, T. Tabary, A. P. Brezin, L. Zhao, D. W. Gjerfson, G. N. Holland, E. F. Reed, J. H. Cohen and R. Rajalingam (2008). "Combination of KIR and HLA gene variants augments the risk of developing birdshot chorioretinopathy in HLA-A*29-positive individuals." Genes Immun **9**(3): 249-58.
- Li, G., M. Yu, C. M. Weyand and J. J. Goronzy (2009). "Epigenetic regulation of killer immunoglobulin-like receptor expression in T cells." Blood **114**(16): 3422-30.
- Lieberman, J. (2003). "The ABCs of granule-mediated cytotoxicity: new weapons in the arsenal." Nat Rev Immunol **3**(5): 361-70.
- Lin, A., H. Xu and W. Yan (2007). "Modulation of HLA expression in human cytomegalovirus immune evasion." Cell Mol Immunol **4**(2): 91-8.

Litwin, V., J. Gumperz, P. Parham, J. H. Phillips and L. L. Lanier (1994). "NKB1: a natural killer cell receptor involved in the recognition of polymorphic HLA-B molecules." J Exp Med **180**(2): 537-43.

Ljunggren, H. G. and K. Karre (1990). "In search of the 'missing self': MHC molecules and NK cell recognition." Immunol Today **11**(7): 237-44.

Llano, M., N. Lee, F. Navarro, P. Garcia, J. P. Albar, D. E. Geraghty and M. Lopez-Botet (1998). "HLA-E-bound peptides influence recognition by inhibitory and triggering CD94/NKG2 receptors: preferential response to an HLA-G-derived nonamer." Eur J Immunol **28**(9): 2854-63.

Lodoen, M., K. Ogasawara, J. A. Hamerman, H. Arase, J. P. Houchins, E. S. Mocarski and L. L. Lanier (2003). "NKG2D-mediated natural killer cell protection against cytomegalovirus is impaired by viral gp40 modulation of retinoic acid early inducible 1 gene molecules." J Exp Med **197**(10): 1245-53.

London, L., B. Perussia and G. Trinchieri (1986). "Induction of proliferation in vitro of resting human natural killer cells: IL 2 induces into cell cycle most peripheral blood NK cells, but only a minor subset of low density T cells." J Immunol **137**(12): 3845-54.

Long, B. R., L. C. Ndhlovu, J. R. Oksenberg, L. L. Lanier, F. M. Hecht, D. F. Nixon and J. D. Barbour (2008). "Conferral of enhanced natural killer cell function by KIR3DS1 in early human immunodeficiency virus type 1 infection." J Virol **82**(10): 4785-92.

Lopez-Vazquez, A., L. Rodrigo, J. Martinez-Borra, R. Perez, M. Rodriguez, J. L. Fdez-Morera, D. Fuentes, S. Rodriguez-Rodero, S. Gonzalez and C. Lopez-Larrea (2005). "Protective effect of the HLA-Bw4I80 epitope and the killer cell immunoglobulin-like receptor 3DS1 gene against the development of hepatocellular carcinoma in patients with hepatitis C virus infection." J Infect Dis **192**(1): 162-5.

Lotzova, E., C. A. Savary and R. E. Champlin (1993). "Genesis of human oncolytic natural killer cells from primitive CD34+CD33- bone marrow progenitors." J Immunol **150**(12): 5263-9.

Luhm, J., J. M. Brand, P. Koritke, M. Hoppner, H. Kirchner and C. Frohn (2002). "Large-scale generation of natural killer lymphocytes for clinical application." J Hematother Stem Cell Res **11**(4): 651-7.

Luszczek, W., M. Manczak, M. Cislo, P. Nockowski, A. Wisniewski, M. Jasek and P. Kusnierczyk (2004). "Gene for the activating natural killer cell receptor, KIR2DS1, is associated with susceptibility to psoriasis vulgaris." Hum Immunol **65**(7): 758-66.

Majorczyk, E., A. Pawlik, W. Luszczek, I. Nowak, A. Wisniewski, M. Jasek and P. Kusnierczyk (2007). "Associations of killer cell immunoglobulin-like receptor genes with complications of rheumatoid arthritis." Genes Immun **8**(8): 678-83.

Malnati, M. S., M. Peruzzi, K. C. Parker, W. E. Biddison, E. Ciccone, A. Moretta and E. O. Long (1995). "Peptide specificity in the recognition of MHC class I by natural killer cell clones." Science **267**(5200): 1016-8.

- Mandelboim, O., S. B. Wilson, M. Vales-Gomez, H. T. Reyburn and J. L. Strominger (1997). "Self and viral peptides can initiate lysis by autologous natural killer cells." Proc Natl Acad Sci U S A **94**(9): 4604-9.
- Mandelboim, O., N. Lieberman, M. Lev, L. Paul, T. I. Arnon, Y. Bushkin, D. M. Davis, J. L. Strominger, J. W. Yewdell and A. Porgador (2001). "Recognition of haemagglutinins on virus-infected cells by NKp46 activates lysis by human NK cells." Nature **409**(6823): 1055-60.
- Marsh, S. G., P. Parham, B. Dupont, D. E. Geraghty, J. Trowsdale, D. Middleton, C. Vilches, M. Carrington, C. Witt, L. A. Guethlein, H. Shilling, C. A. Garcia, K. C. Hsu and H. Wain (2003). "Killer-cell immunoglobulin-like receptor (KIR) nomenclature report, 2002." Tissue Antigens **62**(1): 79-86.
- Martelli, M. F. and Y. Reisner (2002). "Haploidentical 'megadose' CD34+ cell transplants for patients with acute leukemia." Leukemia **16**(3): 404-5.
- Martin, A. M., E. M. Freitas, C. S. Witt and F. T. Christiansen (2000). "The genomic organization and evolution of the natural killer immunoglobulin-like receptor (KIR) gene cluster." Immunogenetics **51**(4-5): 268-80.
- Martin, M. P., X. Gao, J. H. Lee, G. W. Nelson, R. Detels, J. J. Goedert, S. Buchbinder, K. Hoots, D. Vlahov, J. Trowsdale, M. Wilson, S. J. O'Brien and M. Carrington (2002). "Epistatic interaction between KIR3DS1 and HLA-B delays the progression to AIDS." Nat Genet **31**(4): 429-34.
- Martin, M. P., Y. Qi, X. Gao, E. Yamada, J. N. Martin, F. Pereyra, S. Colombo, E. E. Brown, W. L. Shupert, J. Phair, J. J. Goedert, S. Buchbinder, G. D. Kirk, A. Telenti, M. Connors, S. J. O'Brien, B. D. Walker, P. Parham, S. G. Deeks, D. W. McVicar and M. Carrington (2007). "Innate partnership of HLA-B and KIR3DL1 subtypes against HIV-1." Nat Genet **39**(6): 733-40.
- Maxwell, L. D., A. Wallace, D. Middleton and M. D. Curran (2002). "A common KIR2DS4 deletion variant in the human that predicts a soluble KIR molecule analogous to the KIR1D molecule observed in the rhesus monkey." Tissue Antigens **60**(3): 254-8.
- Mendez, A., H. Granda, A. Meenagh, S. Contreras, R. Zavaleta, M. F. Mendoza, L. Izquierdo, M. E. Sarmiento, A. Acosta and D. Middleton (2006). "Study of KIR genes in tuberculosis patients." Tissue Antigens **68**(5): 386-9.
- Michaelsson, J., C. Teixeira de Matos, A. Achour, L. L. Lanier, K. Karre and K. Soderstrom (2002). "A signal peptide derived from hsp60 binds HLA-E and interferes with CD94/NKG2A recognition." J Exp Med **196**(11): 1403-14.
- Micucci, F., A. Zingoni, M. Piccoli, L. Frati, A. Santoni and R. Galandri (2006). "High-efficient lentiviral vector-mediated gene transfer into primary human NK cells." Exp Hematol **34**(10): 1344-52.

- Middleton, D., I. Halfpenny, A. Meenagh, F. Williams, J. Sivula and E. Tuomilehto-Wolf (2006). "Investigation of KIR gene frequencies in type 1 diabetes mellitus." Hum Immunol **67**(12): 986-90.
- Miller, J. D., D. A. Weber, C. Ibegbu, J. Pohl, J. D. Altman and P. E. Jensen (2003). "Analysis of HLA-E peptide-binding specificity and contact residues in bound peptide required for recognition by CD94/NKG2." J Immunol **171**(3): 1369-75.
- Miller, J. S., K. A. Alley and P. McGlave (1994). "Differentiation of natural killer (NK) cells from human primitive marrow progenitors in a stroma-based long-term culture system: identification of a CD34+7+ NK progenitor." Blood **83**(9): 2594-601.
- Miller, J. S. and V. McCullar (2001). "Human natural killer cells with polyclonal lectin and immunoglobulinlike receptors develop from single hematopoietic stem cells with preferential expression of NKG2A and KIR2DL2/L3/S2." Blood **98**(3): 705-13.
- Miller, J. S., S. Cooley, P. Parham, S. S. Farag, M. R. Verneris, K. L. McQueen, L. A. Guethlein, E. A. Trachtenberg, M. Haagenson, M. M. Horowitz, J. P. Klein and D. J. Weisdorf (2007). "Missing KIR ligands are associated with less relapse and increased graft-versus-host disease (GVHD) following unrelated donor allogeneic HCT." Blood **109**(11): 5058-61.
- Mingari, M. C., C. Vitale, C. Cantoni, R. Bellomo, M. Ponte, F. Schiavetti, S. Bertone, A. Moretta and L. Moretta (1997). "Interleukin-15-induced maturation of human natural killer cells from early thymic precursors: selective expression of CD94/NKG2-A as the only HLA class I-specific inhibitory receptor." Eur J Immunol **27**(6): 1374-80.
- Mingari, M. C., M. Ponte, S. Bertone, F. Schiavetti, C. Vitale, R. Bellomo, A. Moretta and L. Moretta (1998). "HLA class I-specific inhibitory receptors in human T lymphocytes: interleukin 15-induced expression of CD94/NKG2A in superantigen- or alloantigen-activated CD8+ T cells." Proc Natl Acad Sci U S A **95**(3): 1172-7.
- Moesta, A. K., P. J. Norman, M. Yawata, N. Yawata, M. Gleimer and P. Parham (2008). "Synergistic polymorphism at two positions distal to the ligand-binding site makes KIR2DL2 a stronger receptor for HLA-C than KIR2DL3." J Immunol **180**(6): 3969-79.
- Moffett, A. and S. Hiby (2009). "Influence of activating and inhibitory killer immunoglobulin-like receptors on predisposition to recurrent miscarriages." Hum Reprod **24**(8): 2048-9.
- Momot, T., S. Koch, N. Hunzelmann, T. Krieg, K. Ulbricht, R. E. Schmidt and T. Witte (2004). "Association of killer cell immunoglobulin-like receptors with scleroderma." Arthritis Rheum **50**(5): 1561-5.
- Moretta, A., C. Bottino, D. Pende, G. Tripodi, G. Tambussi, O. Viale, A. Orengo, M. Barbaresi, A. Merli, E. Ciccone and et al. (1990a). "Identification of four subsets of human CD3-CD16+ natural killer (NK) cells by the expression of clonally distributed functional surface molecules: correlation between subset assignment of NK clones and ability to mediate specific alloantigen recognition." J Exp Med **172**(6): 1589-98.

Moretta, A., G. Tambussi, C. Bottino, G. Tripodi, A. Merli, E. Ciccone, G. Pantaleo and L. Moretta (1990b). "A novel surface antigen expressed by a subset of human CD3- CD16+ natural killer cells. Role in cell activation and regulation of cytolytic function." J Exp Med **171**(3): 695-714.

Moretta, A., R. Biassoni, C. Bottino, M. C. Mingari and L. Moretta (2000). "Natural cytotoxicity receptors that trigger human NK-cell-mediated cytotoxicity." Immunol Today **21**(5): 228-34.

Moretta, L. and A. Moretta (2004). "Killer immunoglobulin-like receptors." Curr Opin Immunol **16**(5): 626-33.

Morice, W. G., P. J. Kurtin, P. J. Leibson, A. Tefferi and C. A. Hanson (2003). "Demonstration of aberrant T-cell and natural killer-cell antigen expression in all cases of granular lymphocytic leukaemia." Br J Haematol **120**(6): 1026-36.

Mrozek, E., P. Anderson and M. A. Caligiuri (1996). "Role of interleukin-15 in the development of human CD56+ natural killer cells from CD34+ hematopoietic progenitor cells." Blood **87**(7): 2632-40.

Murphy, W. J., V. Kumar and M. Bennett (1987). "Rejection of bone marrow allografts by mice with severe combined immune deficiency (SCID). Evidence that natural killer cells can mediate the specificity of marrow graft rejection." J Exp Med **165**(4): 1212-7.

Nakajima, T., O. Goek, X. Zhang, S. L. Kopecky, R. L. Frye, J. J. Goronzy and C. M. Weyand (2003). "De novo expression of killer immunoglobulin-like receptors and signaling proteins regulates the cytotoxic function of CD4 T cells in acute coronary syndromes." Circ Res **93**(2): 106-13.

Namekawa, T., M. R. Snyder, J. H. Yen, B. E. Goehring, P. J. Leibson, C. M. Weyand and J. J. Goronzy (2000). "Killer cell activating receptors function as costimulatory molecules on CD4+CD28null T cells clonally expanded in rheumatoid arthritis." J Immunol **165**(2): 1138-45.

Nattermann, J., H. D. Nischalke, V. Hofmeister, B. Kupfer, G. Ahlenstiel, G. Feldmann, J. Rockstroh, E. H. Weiss, T. Sauerbruch and U. Spengler (2005). "HIV-1 infection leads to increased HLA-E expression resulting in impaired function of natural killer cells." Antivir Ther **10**(1): 95-107.

Naumova, E., A. Mihaylova, K. Stoitchkov, M. Ivanova, L. Quin and M. Toneva (2005). "Genetic polymorphism of NK receptors and their ligands in melanoma patients: prevalence of inhibitory over activating signals." Cancer Immunol Immunother **54**(2): 172-8.

Naumova, E., A. Mihaylova, M. Ivanova and S. Mihailova (2007). "Impact of KIR/HLA ligand combinations on immune responses in malignant melanoma." Cancer Immunol Immunother **56**(1): 95-100.

- Navarro, F., M. Llano, T. Bellon, M. Colonna, D. E. Geraghty and M. Lopez-Botet (1999). "The ILT2(LIR1) and CD94/NKG2A NK cell receptors respectively recognize HLA-G1 and HLA-E molecules co-expressed on target cells." Eur J Immunol **29**(1): 277-83.
- Nelson, G. W., M. P. Martin, D. Gladman, J. Wade, J. Trowsdale and M. Carrington (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**(7): 4273-6.
- Nguyen, S., N. Dhedin, J. P. Vernant, M. Kuentz, A. Al Jijakli, N. Rouas-Freiss, E. D. Carosella, A. Boudifa, P. Debre and V. Vieillard (2005). "NK-cell reconstitution after haploidentical hematopoietic stem-cell transplantations: immaturity of NK cells and inhibitory effect of NKG2A override GvL effect." Blood **105**(10): 4135-42.
- Nguyen, S., V. Beziat, N. Dhedin, M. Kuentz, J. P. Vernant, P. Debre and V. Vieillard (2009). "HLA-E upregulation on IFN-gamma-activated AML blasts impairs CD94/NKG2A-dependent NK cytotoxicity after haplo-mismatched hematopoietic SCT." Bone Marrow Transplant **43**(9): 693-9.
- Nowakowski, G. S., W. G. Morice, R. L. Phylipy, C. Y. Li and A. Tefferi (2005). "Human leucocyte antigen class I and killer immunoglobulin-like receptor expression patterns in T-cell large granular lymphocyte leukaemia." Br J Haematol **128**(4): 490-2.
- O'Connell, K. A., Y. Han, T. M. Williams, R. F. Siliciano and J. N. Blankson (2009). "Role of natural killer cells in a cohort of elite suppressors: low frequency of the protective KIR3DS1 allele and limited inhibition of human immunodeficiency virus type 1 replication in vitro." J Virol **83**(10): 5028-34.
- Orange, J. S., K. D. Stone, S. E. Turvey and K. Krzewski (2004). "The Wiskott-Aldrich syndrome." Cell Mol Life Sci **61**(18): 2361-85.
- Ortonne, N., D. Huet, C. Gaudez, A. Marie-Cardine, V. Schiavon, M. Bagot, P. Musette and A. Bensussan (2006). "Significance of circulating T-cell clones in Sezary syndrome." Blood **107**(10): 4030-8.
- Ortonne, N., S. Le Gouvello, H. Mansour, C. Poillet, N. Martin, M. H. Delfau-Larue, K. Leroy, J. P. Farcet, M. Bagot and A. Bensussan (2008). "CD158K/KIR3DL2 transcript detection in lesional skin of patients with erythroderma is a tool for the diagnosis of Sezary syndrome." J Invest Dermatol **128**(2): 465-72.
- Osada, T., T. Clay, A. Hobeika, H. K. Lyerly and M. A. Morse (2006). "NK cell activation by dendritic cell vaccine: a mechanism of action for clinical activity." Cancer Immunol Immunother **55**(9): 1122-31.
- Palmieri, G., V. Tullio, A. Zingoni, M. Piccoli, L. Frati, M. Lopez-Botet and A. Santoni (1999). "CD94/NKG2-A inhibitory complex blocks CD16-triggered Syk and extracellular regulated kinase activation, leading to cytotoxic function of human NK cells." J Immunol **162**(12): 7181-8.

Pando, M. J., C. M. Gardiner, M. Gleimer, K. L. McQueen and P. Parham (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." J Immunol **171**(12): 6640-9.

Pascal, V., M. J. Stulberg and S. K. Anderson (2006). "Regulation of class I major histocompatibility complex receptor expression in natural killer cells: one promoter is not enough!" Immunol Rev **214**: 9-21.

Pascal, V., E. Yamada, M. P. Martin, G. Alter, M. Altfeld, J. A. Metcalf, M. W. Baseler, J. W. Adelsberger, M. Carrington, S. K. Anderson and D. W. McVicar (2007). "Detection of KIR3DS1 on the cell surface of peripheral blood NK cells facilitates identification of a novel null allele and assessment of KIR3DS1 expression during HIV-1 infection." J Immunol **179**(3): 1625-33.

Penafuerte, C., N. Bautista-Lopez, B. Mohamed-Rachid, J. P. Routy and J. Galipeau (2009). "The human ortholog of granulocyte macrophage colony-stimulating factor and interleukin-2 fusion protein induces potent ex vivo natural killer cell activation and maturation." Cancer Res **69**(23): 9020-8.

Pende, D., S. Parolini, A. Pessino, S. Sivori, R. Augugliaro, L. Morelli, E. Marcenaro, L. Accame, A. Malaspina, R. Biassoni, C. Bottino, L. Moretta and A. Moretta (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**(10): 1505-16.

Pende, D., C. Cantoni, P. Rivera, M. Vitale, R. Castriconi, S. Marcenaro, M. Nanni, R. Biassoni, C. Bottino, A. Moretta and L. Moretta (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**(4): 1076-86.

Pende, D., S. Marcenaro, M. Falco, S. Martini, M. E. Bernardo, D. Montagna, E. Romeo, C. Cognet, M. Martinetti, R. Maccario, M. C. Mingari, E. Vivier, L. Moretta, F. Locatelli and A. Moretta (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**(13): 3119-29.

Perussia, B., C. Ramoni, I. Anegon, M. C. Cuturi, J. Faust and G. Trinchieri (1987). "Preferential proliferation of natural killer cells among peripheral blood mononuclear cells cocultured with B lymphoblastoid cell lines." Nat Immun Cell Growth Regul **6**(4): 171-88.

Peruzzi, M., N. Wagtmann and E. O. Long (1996). "A p70 killer cell inhibitory receptor specific for several HLA-B allotypes discriminates among peptides bound to HLA-B*2705." J Exp Med **184**(4): 1585-90.

Pessino, A., S. Sivori, C. Bottino, A. Malaspina, L. Morelli, L. Moretta, R. Biassoni and A. Moretta (1998). "Molecular cloning of NKp46: a novel member of the immunoglobulin superfamily involved in triggering of natural cytotoxicity." J Exp Med **188**(5): 953-60.

Peters, P. J., J. Borst, V. Oorschot, M. Fukuda, O. Krahenbuhl, J. Tschopp, J. W. Slot and H. J. Geuze (1991). "Cytotoxic T lymphocyte granules are secretory lysosomes, containing both perforin and granzymes." J Exp Med **173**(5): 1099-109.

Phillips, J. H., J. E. Gumperz, P. Parham and L. L. Lanier (1995). "Superantigen-dependent, cell-mediated cytotoxicity inhibited by MHC class I receptors on T lymphocytes." Science **268**(5209): 403-5.

Piccioli, D., S. Sbrana, E. Melandri and N. M. Valiante (2002). "Contact-dependent stimulation and inhibition of dendritic cells by natural killer cells." J Exp Med **195**(3): 335-41.

Pipkin, M. E. and J. Lieberman (2007). "Delivering the kiss of death: progress on understanding how perforin works." Curr Opin Immunol **19**(3): 301-8.

Plougastel, B., T. Jones and J. Trowsdale (1996). "Genomic structure, chromosome location, and alternative splicing of the human NKG2A gene." Immunogenetics **44**(4): 286-91.

Plougastel, B. and J. Trowsdale (1997). "Cloning of NKG2-F, a new member of the NKG2 family of human natural killer cell receptor genes." Eur J Immunol **27**(11): 2835-9.

Pogge von Strandmann, E., V. R. Simhadri, B. von Tresckow, S. Sasse, K. S. Reiners, H. P. Hansen, A. Rothe, B. Boll, V. L. Simhadri, P. Borchmann, P. J. McKinnon, M. Hallek and A. Engert (2007). "Human leukocyte antigen-B-associated transcript 3 is released from tumor cells and engages the Nkp30 receptor on natural killer cells." Immunity **27**(6): 965-74.

Poggi, A., P. Costa, L. Morelli, C. Cantoni, N. Pella, F. Spada, R. Biassoni, L. Nanni, V. Revello, E. Tomasello, M. C. Mingari, A. Moretta and L. Moretta (1996). "Expression of human NKR1A by CD34+ immature thymocytes: NKR1A-mediated regulation of proliferation and cytolytic activity." Eur J Immunol **26**(6): 1266-72.

Poggi, A., P. Costa, E. Tomasello and L. Moretta (1998). "IL-12-induced up-regulation of NKR1A expression in human NK cells and consequent NKR1A-mediated down-regulation of NK cell activation." Eur J Immunol **28**(5): 1611-6.

Poszepczynska-Guigne, E., V. Schiavon, M. D'Incan, H. Echchakir, P. Musette, N. Ortonne, L. Boumsell, A. Moretta, A. Bensussan and M. Bagot (2004). "CD158k/KIR3DL2 is a new phenotypic marker of Sezary cells: relevance for the diagnosis and follow-up of Sezary syndrome." J Invest Dermatol **122**(3): 820-3.

Price, P., C. Witt, D. de Santis and M. A. French (2007). "Killer immunoglobulin-like receptor genotype may distinguish immunodeficient HIV-infected patients resistant to immune restoration diseases associated with herpes virus infections." J Acquir Immune Defic Syndr **45**(3): 359-61.

Qi, Y., M. P. Martin, X. Gao, L. Jacobson, J. J. Goedert, S. Buchbinder, G. D. Kirk, S. J. O'Brien, J. Trowsdale and M. Carrington (2006). "KIR/HLA pleiotropism: protection against both HIV and opportunistic infections." PLoS Pathog **2**(8): e79.

- Rabinowich, H., P. Sedlmayr, R. B. Herberman and T. L. Whiteside (1991). "Increased proliferation, lytic activity, and purity of human natural killer cells cocultured with mitogen-activated feeder cells." Cell Immunol **135**(2): 454-70.
- Rajagopalan, S. and E. O. Long (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**(8): 1523-8.
- Rajagopalan, S., J. Fu and E. O. Long (2001). "Cutting edge: induction of IFN-gamma production but not cytotoxicity by the killer cell Ig-like receptor KIR2DL4 (CD158d) in resting NK cells." J Immunol **167**(4): 1877-81.
- Rao, M. K. and M. F. Wilkinson (2006). "Tissue-specific and cell type-specific RNA interference in vivo." Nat Protoc **1**(3): 1494-501.
- Raulet, D. H. (2003). "Roles of the NKG2D immunoreceptor and its ligands." Nat Rev Immunol **3**(10): 781-90.
- Raulet, D. H. and R. E. Vance (2006). "Self-tolerance of natural killer cells." Nat Rev Immunol **6**(7): 520-31.
- Remtoula, N., A. Bensussan and A. Marie-Cardine (2008). "Cutting edge: selective expression of inhibitory or activating killer cell Ig-like receptors in circulating CD4+ T lymphocytes." J Immunol **180**(5): 2767-71.
- Reynolds, A., D. Leake, Q. Boese, S. Scaringe, W. S. Marshall and A. Khvorova (2004). "Rational siRNA design for RNA interference." Nat Biotechnol **22**(3): 326-30.
- Robinson, J., M. J. Waller, P. Stoehr and S. G. Marsh (2005). "IPD--the Immuno Polymorphism Database." Nucleic Acids Res **33**(Database issue): D523-6.
- Roetynck, S., M. Baratin, S. Johansson, C. Lemmers, E. Vivier and S. Ugolini (2006). "Natural killer cells and malaria." Immunol Rev **214**: 251-63.
- Romero, V., J. Azocar, J. Zuniga, O. P. Clavijo, D. Terreros, X. Gu, Z. Husain, R. T. Chung, C. Amos and E. J. Yunis (2008). "Interaction of NK inhibitory receptor genes with HLA-C and MHC class II alleles in Hepatitis C virus infection outcome." Mol Immunol **45**(9): 2429-36.
- Rosen, D. B., J. Bettadapura, M. Alsharifi, P. A. Mathew, H. S. Warren and L. L. Lanier (2005). "Cutting edge: lectin-like transcript-1 is a ligand for the inhibitory human NKR-P1A receptor." J Immunol **175**(12): 7796-9.
- Rosen, D. B., W. Cao, D. T. Avery, S. G. Tangye, Y. J. Liu, J. P. Houchins and L. L. Lanier (2008). "Functional consequences of interactions between human NKR-P1A and its ligand LIT1 expressed on activated dendritic cells and B cells." J Immunol **180**(10): 6508-17.

- Rosmaraki, E. E., I. Douagi, C. Roth, F. Colucci, A. Cumano and J. P. Di Santo (2001). "Identification of committed NK cell progenitors in adult murine bone marrow." Eur J Immunol **31**(6): 1900-9.
- Ruggeri, L., M. Capanni, M. Casucci, I. Volpi, A. Tosti, K. Perruccio, E. Urbani, R. S. Negrin, M. F. Martelli and A. Velardi (1999). "Role of natural killer cell alloreactivity in HLA-mismatched hematopoietic stem cell transplantation." Blood **94**(1): 333-9.
- Ruggeri, L., M. Capanni, E. Urbani, K. Perruccio, W. D. Shlomchik, A. Tosti, S. Posati, D. Rogaia, F. Frassoni, F. Aversa, M. F. Martelli and A. Velardi (2002). "Effectiveness of donor natural killer cell alloreactivity in mismatched hematopoietic transplants." Science **295**(5562): 2097-100.
- Ruggeri, L., F. Aversa, M. F. Martelli and A. Velardi (2006). "Allogeneic hematopoietic transplantation and natural killer cell recognition of missing self." Immunol Rev **214**: 202-18.
- Ruggeri, L., A. Mancusi, M. Capanni, E. Urbani, A. Carotti, T. Aloisi, M. Stern, D. Pende, K. Perruccio, E. Burchielli, F. Topini, E. Bianchi, F. Aversa, M. F. Martelli and A. Velardi (2007). "Donor natural killer cell allorecognition of missing self in haploidentical hematopoietic transplantation for acute myeloid leukemia: challenging its predictive value." Blood **110**(1): 433-40.
- Ryan, J. C., J. Turck, E. C. Niemi, W. M. Yokoyama and W. E. Seaman (1992). "Molecular cloning of the NK1.1 antigen, a member of the NKR-P1 family of natural killer cell activation molecules." J Immunol **149**(5): 1631-5.
- Saez-Borderias, A., N. Romo, G. Magri, M. Guma, A. Angulo and M. Lopez-Botet (2009). "IL-12-dependent inducible expression of the CD94/NKG2A inhibitory receptor regulates CD94/NKG2C+ NK cell function." J Immunol **182**(2): 829-36.
- Sanchez, M. J., M. O. Muench, M. G. Roncarolo, L. L. Lanier and J. H. Phillips (1994). "Identification of a common T/natural killer cell progenitor in human fetal thymus." J Exp Med **180**(2): 569-76.
- Santourlidis, S., H. I. Trompeter, S. Weinhold, B. Eisermann, K. L. Meyer, P. Wernet and M. Uhrberg (2002). "Crucial role of DNA methylation in determination of clonally distributed killer cell Ig-like receptor expression patterns in NK cells." J Immunol **169**(8): 4253-61.
- Schatzle, J. D., S. Sheu, S. E. Stepp, P. A. Mathew, M. Bennett and V. Kumar (1999). "Characterization of inhibitory and stimulatory forms of the murine natural killer cell receptor 2B4." Proc Natl Acad Sci U S A **96**(7): 3870-5.
- Scquizzato, E., A. Teramo, M. Miorin, M. Facco, F. Piazza, F. Noventa, L. Trentin, C. Agostini, R. Zambello and G. Semenzato (2007). "Genotypic evaluation of killer immunoglobulin-like receptors in NK-type lymphoproliferative disease of granular lymphocytes." Leukemia **21**(5): 1060-9.

Selvakumar, A., U. Steffens and B. Dupont (1996). "NK cell receptor gene of the KIR family with two IG domains but highest homology to KIR receptors with three IG domains." Tissue Antigens **48**(4 Pt 1): 285-94.

Shibuya, A., D. Campbell, C. Hannum, H. Yssel, K. Franz-Bacon, T. McClanahan, T. Kitamura, J. Nicholl, G. R. Sutherland, L. L. Lanier and J. H. Phillips (1996). "DNAM-1, a novel adhesion molecule involved in the cytolytic function of T lymphocytes." Immunity **4**(6): 573-81.

Shum, B. P., L. R. Flodin, D. G. Muir, R. Rajalingam, S. I. Khakoo, S. Cleland, L. A. Guethlein, M. Uhrberg and P. Parham (2002). "Conservation and variation in human and common chimpanzee CD94 and NKG2 genes." J Immunol **168**(1): 240-52.

Single, R. M., M. P. Martin, X. Gao, D. Meyer, M. Yeager, J. R. Kidd, K. K. Kidd and M. Carrington (2007). "Global diversity and evidence for coevolution of KIR and HLA." Nat Genet **39**(9): 1114-9.

Sivori, S., M. Vitale, L. Morelli, L. Sanseverino, R. Augugliaro, C. Bottino, L. Moretta and A. Moretta (1997). "p46, a novel natural killer cell-specific surface molecule that mediates cell activation." J Exp Med **186**(7): 1129-36.

Sivori, S., D. Pende, C. Bottino, E. Marcenaro, A. Pessino, R. Biassoni, L. Moretta and A. Moretta (1999). "NKp46 is the major triggering receptor involved in the natural cytotoxicity of fresh or cultured human NK cells. Correlation between surface density of NKp46 and natural cytotoxicity against autologous, allogeneic or xenogeneic target cells." Eur J Immunol **29**(5): 1656-66.

Sivori, S., M. Falco, E. Marcenaro, S. Parolini, R. Biassoni, C. Bottino, L. Moretta and A. Moretta (2002). "Early expression of triggering receptors and regulatory role of 2B4 in human natural killer cell precursors undergoing in vitro differentiation." Proc Natl Acad Sci U S A **99**(7): 4526-31.

Sivori, S., C. Cantoni, S. Parolini, E. Marcenaro, R. Conte, L. Moretta and A. Moretta (2003). "IL-21 induces both rapid maturation of human CD34+ cell precursors towards NK cells and acquisition of surface killer Ig-like receptors." Eur J Immunol **33**(12): 3439-47.

Sjolin, H., E. Tomasello, M. Mousavi-Jazi, A. Bartolazzi, K. Karre, E. Vivier and C. Cerboni (2002). "Pivotal role of KARAP/DAP12 adaptor molecule in the natural killer cell-mediated resistance to murine cytomegalovirus infection." J Exp Med **195**(7): 825-34.

Smith, H. R., J. W. Heusel, I. K. Mehta, S. Kim, B. G. Dorner, O. V. Naidenko, K. Iizuka, H. Furukawa, D. L. Beckman, J. T. Pingel, A. A. Scalzo, D. H. Fremont and W. M. Yokoyama (2002). "Recognition of a virus-encoded ligand by a natural killer cell activation receptor." Proc Natl Acad Sci U S A **99**(13): 8826-31.

Snyder, M. R., L. O. Muegge, C. Offord, W. M. O'Fallon, Z. Bajzer, C. M. Weyand and J. J. Goronzy (2002). "Formation of the killer Ig-like receptor repertoire on CD4+CD28null T cells." J Immunol **168**(8): 3839-46.

Sobecks, R. M., E. J. Ball, J. P. Maciejewski, L. A. Rybicki, S. Brown, M. Kalaycio, B. Pohlman, S. Andresen, K. S. Theil, R. Dean and B. J. Bolwell (2007). "Survival of AML patients receiving HLA-matched sibling donor allogeneic bone marrow transplantation correlates with HLA-Cw ligand groups for killer immunoglobulin-like receptors." Bone Marrow Transplant **39**(7): 417-24.

Spits, H., B. Blom, A. C. Jaleco, K. Weijer, M. C. Verschuren, J. J. van Dongen, M. H. Heemskerk and P. C. Res (1998). "Early stages in the development of human T, natural killer and thymic dendritic cells." Immunol Rev **165**: 75-86.

Stewart, C. A., J. Van Bergen and J. Trowsdale (2003). "Different and divergent regulation of the KIR2DL4 and KIR3DL1 promoters." J Immunol **170**(12): 6073-81.

Stewart, C. A., F. Laugier-Anfossi, F. Vely, X. Saulquin, J. Riedmuller, A. Tisserant, L. Gauthier, F. Romagne, G. Ferracci, F. A. Arosa, A. Moretta, P. D. Sun, S. Ugolini and E. Vivier (2005). "Recognition of peptide-MHC class I complexes by activating killer immunoglobulin-like receptors." Proc Natl Acad Sci U S A **102**(37): 13224-9.

Storset, A. K., S. Kulberg, I. Berg, P. Boysen, J. C. Hope and E. Dissen (2004). "NKp46 defines a subset of bovine leukocytes with natural killer cell characteristics." Eur J Immunol **34**(3): 669-76.

Sun, J. C. and L. L. Lanier (2008). "Cutting edge: viral infection breaks NK cell tolerance to "missing self". " J Immunol **181**(11): 7453-7.

Suzuki, Y., Y. Hamamoto, Y. Ogasawara, K. Ishikawa, Y. Yoshikawa, T. Sasazuki and M. Muto (2004). "Genetic polymorphisms of killer cell immunoglobulin-like receptors are associated with susceptibility to psoriasis vulgaris." J Invest Dermatol **122**(5): 1133-6.

Takahashi, T., M. Nieda, Y. Koezuka, A. Nicol, S. A. Porcelli, Y. Ishikawa, K. Tadokoro, H. Hirai and T. Juji (2000). "Analysis of human V alpha 24+ CD4+ NKT cells activated by alpha-glycosylceramide-pulsed monocyte-derived dendritic cells." J Immunol **164**(9): 4458-64.

Takahashi, T., S. Dejbakhsh-Jones and S. Strober (2006). "Expression of CD161 (NKR-P1A) defines subsets of human CD4 and CD8 T cells with different functional activities." J Immunol **176**(1): 211-6.

Tangye, S. G., J. H. Phillips and L. L. Lanier (2000). "The CD2-subset of the Ig superfamily of cell surface molecules: receptor-ligand pairs expressed by NK cells and other immune cells." Semin Immunol **12**(2): 149-57.

Tay, C. H., R. M. Welsh and R. R. Brutkiewicz (1995). "NK cell response to viral infections in beta 2-microglobulin-deficient mice." J Immunol **154**(2): 780-9.

Thananchai, H., G. Gillespie, M. P. Martin, A. Bashirova, N. Yawata, M. Yawata, P. Easterbrook, D. W. McVicar, K. Maenaka, P. Parham, M. Carrington, T. Dong and S. Rowland-Jones (2007). "Cutting Edge: Allele-specific and peptide-dependent interactions between KIR3DL1 and HLA-A and HLA-B." J Immunol **178**(1): 33-7.

Thomas, R., R. Apps, Y. Qi, X. Gao, V. Male, C. O'Huigin, 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**(12): 1290-4.

Tomasec, P., V. M. Braud, C. Rickards, M. B. Powell, B. P. McSharry, S. Gadola, V. Cerundolo, L. K. Borysiewicz, A. J. McMichael and G. W. Wilkinson (2000). "Surface expression of HLA-E, an inhibitor of natural killer cells, enhanced by human cytomegalovirus gpUL40." Science **287**(5455): 1031.

Topham, N. J. and E. W. Hewitt (2009). "Natural killer cell cytotoxicity: how do they pull the trigger?" Immunology **128**(1): 7-15.

Toyama-Sorimachi, N., Y. Taguchi, H. Yagita, F. Kitamura, A. Kawasaki, S. Koyasu and H. Karasuyama (2001). "Mouse CD94 participates in Qa-1-mediated self recognition by NK cells and delivers inhibitory signals independent of Ly-49." J Immunol **166**(6): 3771-9.

Trapani, J. A. and P. I. Bird (2008). "A renaissance in understanding the multiple and diverse functions of granzymes?" Immunity **29**(5): 665-7.

Trinchieri, G. (1989). "Biology of natural killer cells." Adv Immunol **47**: 187-376.

Tripathy, S. K., P. A. Keyel, L. Yang, J. T. Pingel, T. P. Cheng, A. Schneeberger and W. M. Yokoyama (2008). "Continuous engagement of a self-specific activation receptor induces NK cell tolerance." J Exp Med **205**(8): 1829-41.

Trompeter, H. I., N. Gomez-Lozano, S. Santourlidis, B. Eisermann, P. Wernet, C. Vilches and M. Uhrberg (2005). "Three structurally and functionally divergent kinds of promoters regulate expression of clonally distributed killer cell Ig-like receptors (KIR), of KIR2DL4, and of KIR3DL3." J Immunol **174**(7): 4135-43.

Trowsdale, J. (2001). "Genetic and functional relationships between MHC and NK receptor genes." Immunity **15**(3): 363-74.

Trowsdale, J., R. Barten, A. Haude, C. A. Stewart, S. Beck and M. J. Wilson (2001). "The genomic context of natural killer receptor extended gene families." Immunol Rev **181**: 20-38.

Trundley, A., H. Frebel, D. Jones, C. Chang and J. Trowsdale (2007). "Allelic expression patterns of KIR3DS1 and 3DL1 using the Z27 and DX9 antibodies." Eur J Immunol **37**(3): 780-7.

Trundley, A. E., S. E. Hiby, C. Chang, A. M. Sharkey, S. Santourlidis, M. Uhrberg, J. Trowsdale and A. Moffett (2006). "Molecular characterization of KIR3DL3." Immunogenetics **57**(12): 904-16.

Tschopp, J. and M. Nabholz (1990). "Perforin-mediated target cell lysis by cytolytic T lymphocytes." Annu Rev Immunol **8**: 279-302.

Uhrberg, M., N. M. Valiante, B. P. Shum, H. G. Shilling, K. Lienert-Weidenbach, B. Corliss, D. Tyan, L. L. Lanier and P. Parham (1997). "Human diversity in killer cell inhibitory receptor genes." Immunity **7**(6): 753-63.

Uhrberg, M. (2005). "Shaping the human NK cell repertoire: an epigenetic glance at KIR gene regulation." Mol Immunol **42**(4): 471-5.

Ulbrecht, M., S. Martinozzi, M. Grzeschik, H. Hengel, J. W. Ellwart, M. Pla and E. H. Weiss (2000). "Cutting edge: the human cytomegalovirus UL40 gene product contains a ligand for HLA-E and prevents NK cell-mediated lysis." J Immunol **164**(10): 5019-22.

Vales-Gomez, M., H. T. Reyburn, R. A. Erskine, M. Lopez-Botet and J. L. Strominger (1999). "Kinetics and peptide dependency of the binding of the inhibitory NK receptor CD94/NKG2-A and the activating receptor CD94/NKG2-C to HLA-E." Embo J **18**(15): 4250-60.

Valiante, N. M., M. Uhrberg, H. G. Shilling, K. Lienert-Weidenbach, K. L. Arnett, A. D'Andrea, J. H. Phillips, L. L. Lanier and P. Parham (1997). "Functionally and structurally distinct NK cell receptor repertoires in the peripheral blood of two human donors." Immunity **7**(6): 739-51.

van Bergen, J., A. Thompson, C. Retiere, J. Trowsdale and F. Koning (2009). "Cutting edge: killer Ig-like receptors mediate "missing self" recognition in vivo." J Immunol **182**(5): 2569-72.

van der Slik, A. R., B. P. Koeleman, W. Verduijn, G. J. Bruining, B. O. Roep and M. J. Giphart (2003). "KIR in type 1 diabetes: disparate distribution of activating and inhibitory natural killer cell receptors in patients versus HLA-matched control subjects." Diabetes **52**(10): 2639-42.

van der Veken, L. T., M. D. Campelo, M. A. van der Hoorn, R. S. Hagedoorn, H. M. van Egmond, J. van Bergen, R. Willemze, J. H. Falkenburg and M. H. Heemskerk (2009). "Functional analysis of killer Ig-like receptor-expressing cytomegalovirus-specific CD8+ T cells." J Immunol **182**(1): 92-101.

Vance, R. E., A. M. Jamieson and D. H. Raulet (1999). "Recognition of the class Ib molecule Qa-1(b) by putative activating receptors CD94/NKG2C and CD94/NKG2E on mouse natural killer cells." J Exp Med **190**(12): 1801-12.

Vely, F., M. Peyrat, C. Couedel, J. Morcet, F. Halary, F. Davodeau, F. Romagne, E. Scotet, X. Saulquin, E. Houssaint, N. Schleinitz, A. Moretta, E. Vivier and M. Bonneville (2001). "Regulation of inhibitory and activating killer-cell Ig-like receptor expression occurs in T cells after termination of TCR rearrangements." J Immunol **166**(4): 2487-94.

Verheyden, S., M. Bernier and C. Demanet (2004). "Identification of natural killer cell receptor phenotypes associated with leukemia." Leukemia **18**(12): 2002-7.

Verheyden, S., R. Schots, W. Duquet and C. Demanet (2005). "A defined donor activating natural killer cell receptor genotype protects against leukemic relapse after related HLA-identical hematopoietic stem cell transplantation." Leukemia **19**(8): 1446-51.

- Vilches, C., C. M. Gardiner and P. Parham (2000a). "Gene structure and promoter variation of expressed and nonexpressed variants of the KIR2DL5 gene." J Immunol **165**(11): 6416-21.
- Vilches, C., R. Rajalingam, M. Uhrberg, C. M. Gardiner, N. T. Young and P. Parham (2000b). "KIR2DL5, a novel killer-cell receptor with a D0-D2 configuration of Ig-like domains." J Immunol **164**(11): 5797-804.
- Vilches, C. and P. Parham (2002). "KIR: diverse, rapidly evolving receptors of innate and adaptive immunity." Annu Rev Immunol **20**: 217-51.
- Vitale, M., C. Bottino, S. Sivori, L. Sanseverino, R. Castriconi, E. Marcenaro, R. Augugliaro, L. Moretta and A. Moretta (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**(12): 2065-72.
- Vitale, M., M. Falco, R. Castriconi, S. Parolini, R. Zambello, G. Semenzato, R. Biassoni, C. Bottino, L. Moretta and A. Moretta (2001). "Identification of NKp80, a novel triggering molecule expressed by human NK cells." Eur J Immunol **31**(1): 233-42.
- Vivier, E., P. Morin, C. O'Brien, B. Druker, S. F. Schlossman and P. Anderson (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**(1): 206-10.
- Vivier, E. and N. Anfossi (2004). "Inhibitory NK-cell receptors on T cells: witness of the past, actors of the future." Nat Rev Immunol **4**(3): 190-8.
- Wagtmann, N., R. Biassoni, C. Cantoni, S. Verdiani, M. S. Malnati, M. Vitale, C. Bottino, L. Moretta, A. Moretta and E. O. Long (1995a). "Molecular clones of the p58 NK cell receptor reveal immunoglobulin-related molecules with diversity in both the extra- and intracellular domains." Immunity **2**(5): 439-49.
- Wagtmann, N., S. Rajagopalan, C. C. Winter, M. Peruzzi and E. O. Long (1995b). "Killer cell inhibitory receptors specific for HLA-C and HLA-B identified by direct binding and by functional transfer." Immunity **3**(6): 801-9.
- Waldmann, T., Y. Tagaya and R. Bamford (1998). "Interleukin-2, interleukin-15, and their receptors." Int Rev Immunol **16**(3-4): 205-26.
- Walzer, T., M. Blery, J. Chaix, N. Fuseri, L. Chasson, S. H. Robbins, S. Jaeger, P. Andre, L. Gauthier, L. Daniel, K. Chemin, Y. Morel, M. Dalod, J. Imbert, M. Pierres, A. Moretta, F. Romagne and E. Vivier (2007a). "Identification, activation, and selective in vivo ablation of mouse NK cells via NKp46." Proc Natl Acad Sci U S A **104**(9): 3384-9.
- Walzer, T., S. Jaeger, J. Chaix and E. Vivier (2007b). "Natural killer cells: from CD3(-)NKp46(+) to post-genomics meta-analyses." Curr Opin Immunol **19**(3): 365-72.

- Wang, E. C., B. McSharry, C. Retiere, P. Tomasec, S. Williams, L. K. Borysiewicz, V. M. Braud and G. W. Wilkinson (2002). "UL40-mediated NK evasion during productive infection with human cytomegalovirus." Proc Natl Acad Sci U S A **99**(11): 7570-5.
- Watzl, C., C. C. Stebbins and E. O. Long (2000). "NK cell inhibitory receptors prevent tyrosine phosphorylation of the activation receptor 2B4 (CD244)." J Immunol **165**(7): 3545-8.
- Welte, S., S. Kuttruff, I. Waldhauer and A. Steinle (2006). "Mutual activation of natural killer cells and monocytes mediated by NKp80-AICL interaction." Nat Immunol **7**(12): 1334-42.
- Westgaard, I. H., S. F. Berg, J. T. Vaage, L. L. Wang, W. M. Yokoyama, E. Dissen and S. Fossum (2004). "Rat NKp46 activates natural killer cell cytotoxicity and is associated with FcepsilonRIgamma and CD3zeta." J Leukoc Biol **76**(6): 1200-6.
- Williams, N. S., J. Klem, I. J. Puzanov, P. V. Sivakumar, J. D. Schatzle, M. Bennett and V. Kumar (1998). "Natural killer cell differentiation: insights from knockout and transgenic mouse models and in vitro systems." Immunol Rev **165**: 47-61.
- Wilson, J. L., J. Charo, A. Martin-Fontecha, P. Dellabona, G. Casorati, B. J. Chambers, R. Kiessling, M. T. Bejarano and H. G. Ljunggren (1999a). "NK cell triggering by the human costimulatory molecules CD80 and CD86." J Immunol **163**(8): 4207-12.
- Wilson, J. L., L. C. Heffler, J. Charo, A. Scheynius, M. T. Bejarano and H. G. Ljunggren (1999b). "Targeting of human dendritic cells by autologous NK cells." J Immunol **163**(12): 6365-70.
- Wilson, M. J., M. Torkar, A. Haude, S. Milne, T. Jones, D. Sheer, S. Beck and J. Trowsdale (2000). "Plasticity in the organization and sequences of human KIR/ILT gene families." Proc Natl Acad Sci U S A **97**(9): 4778-83.
- Winter, C. C. and E. O. Long (1997). "A single amino acid in the p58 killer cell inhibitory receptor controls the ability of natural killer cells to discriminate between the two groups of HLA-C allotypes." J Immunol **158**(9): 4026-8.
- Wu, J., Y. Song, A. B. Bakker, S. Bauer, T. Spies, L. L. Lanier and J. H. Phillips (1999). "An activating immunoreceptor complex formed by NKG2D and DAP10." Science **285**(5428): 730-2.
- Wu, J. D., L. M. Higgins, A. Steinle, D. Cosman, K. Haugk and S. R. Plymate (2004). "Prevalent expression of the immunostimulatory MHC class I chain-related molecule is counteracted by shedding in prostate cancer." J Clin Invest **114**(4): 560-8.
- Yawata, M., N. Yawata, M. Draghi, A. M. Little, F. Partheniou and P. Parham (2006). "Roles for HLA and KIR polymorphisms in natural killer cell repertoire selection and modulation of effector function." J Exp Med **203**(3): 633-45.

- Yen, J. H., B. E. Moore, T. Nakajima, D. Scholl, D. J. Schaid, C. M. Weyand and J. J. Goronzy (2001). "Major histocompatibility complex class I-recognizing receptors are disease risk genes in rheumatoid arthritis." J Exp Med **193**(10): 1159-67.
- Yokoyama, W. M. and B. F. Plougastel (2003). "Immune functions encoded by the natural killer gene complex." Nat Rev Immunol **3**(4): 304-16.
- Yokoyama, W. M., S. Kim and A. R. French (2004). "The dynamic life of natural killer cells." Annu Rev Immunol **22**: 405-29.
- Yokoyama, W. M. and S. Kim (2006). "Licensing of natural killer cells by self-major histocompatibility complex class I." Immunol Rev **214**: 143-54.
- Yu, J., G. Heller, J. Chewning, S. Kim, W. M. Yokoyama and K. C. Hsu (2007). "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 **179**(9): 5977-89.
- Yu, J., H. C. Mao, M. Wei, T. Hughes, J. Zhang, I. K. Park, S. Liu, S. McClory, G. Marcucci, R. Trotta and M. A. Caligiuri (2009a). "CD94 surface density identifies a functional intermediary between the CD56bright and CD56dim human NK cell subsets." Blood.
- Yu, J., J. M. Venstrom, X. R. Liu, J. Pring, R. S. Hasan, R. J. O'Reilly and K. C. Hsu (2009b). "Breaking tolerance to self, circulating natural killer cells expressing inhibitory KIR for non-self HLA exhibit effector function after T cell-depleted allogeneic hematopoietic cell transplantation." Blood **113**(16): 3875-84.
- Zambello, R., M. Falco, M. Della Chiesa, L. Trentin, D. Carollo, R. Castriconi, G. Cannas, S. Carlomagno, A. Cabrelle, T. Lamy, C. Agostini, A. Moretta, G. Semenzato and M. Vitale (2003). "Expression and function of KIR and natural cytotoxicity receptors in NK-type lymphoproliferative diseases of granular lymphocytes." Blood **102**(5): 1797-805.
- Zhou, H., V. Kartsogiannis, J. M. Quinn, C. Ly, C. Gange, J. Elliott, K. W. Ng and M. T. Gillespie (2002). "Osteoclast inhibitory lectin, a family of new osteoclast inhibitors." J Biol Chem **277**(50): 48808-15.
- Zitvogel, L. (2002). "Dendritic and natural killer cells cooperate in the control/switch of innate immunity." J Exp Med **195**(3): F9-14.

RESUME

Contribution à l'étude des mécanismes de l'alloréactivité des cellules Natural Killer humaines

Les cellules NK sont des effecteurs de l'immunité innée antivirale et anti tumorale. Ces cellules expriment des KIR inhibiteurs spécifiques des molécules HLA de classe I qui sont impliqués dans la reconnaissance du *soi manquant*. Le rôle bénéfique des cellules NK alloréactives en greffe de CSH a été bien établi dans l'effet anti-leucémique mais les mécanismes de l'alloréactivité qui mettent en jeu des KIR inhibiteurs et activateurs sont encore mal appréhendés. Afin d'étudier le rôle des KIR activateurs, différents anticorps spécifiques du KIR2DS2 et d'autres KIR ont été produits et caractérisés au laboratoire. Associés à des anticorps commerciaux, ils permettent de discriminer les sous-populations NK qui expriment l'isoforme KIR inhibitrice ou activatrice. Ces outils nous ont permis de montrer que les cellules NK KIR2DS1⁺ sont alloréactives vis-à-vis de cellules cibles exprimant le ligand C2, uniquement chez les individus C2⁻. Afin d'approfondir l'étude du KIR2DS1, une approche d'ARN interférence a été développée afin d'éteindre son expression. Enfin, nous avons montré une induction de l'expression du KIR3DS1, un autre KIR activateur, sur les lymphocytes stimulés. Cependant, aucune régulation des fonctions des cellules NK KIR3DS1⁺ via les molécules HLA-Bw4 n'a pu être démontrée. Nos résultats laissent suggérer que l'interaction KIR3DS1/HLA-Bw4 pourrait être effective dans certains contextes pathologiques ou inflammatoires. L'ensemble de ces données permet de contribuer à une meilleure compréhension des mécanismes de l'alloréactivité NK et de mieux préciser les règles qui permettraient de choisir les donneurs de CSH susceptibles de favoriser une alloréactivité NK bénéfique.

Mots clés : cellules NK, alloréactivité, KIR, greffe de CSH

Contribution to the study of mechanisms controlling human Natural Killer cell alloreactivity

NK cells are innate immune effectors involved in antiviral and antitumor responses. *Missing self* recognition is mediated by the inhibitory KIRs expressed by these cells. After HSCT, alloreactive NK cells play a role in the beneficial *Graft versus Leukaemia* effect but the mechanisms of alloreactivity mediated by inhibitory and activating KIRs are still poorly understood. Monoclonal antibodies specific for KIR2DS2 and others KIRs were produced and characterized at the laboratory in order to study the role of activating KIRs. They can be used in combination with commercial antibodies to discriminate NK cell subsets that express the inhibitory or activating KIR isoform. Using these tools, we showed that KIR2DS1⁺ NK cells were alloreactive against target cells expressing the C2 ligand, only in C2⁻ individuals. Then, RNA interference was developed to silence KIR2DS1 expression and to extend this study. Finally, induction of KIR3DS1 (another activating KIR) expression was shown on stimulated cells. However, no regulation of KIR3DS1⁺ NK cell functions by Bw4 molecules could be demonstrated. Our results suggest that the KIR3DS1/Bw4 interaction is functional only in pathological or inflammatory contexts. These data improve our understanding of NK cell alloreactivity and define rules to choose HSC donors providing beneficial alloreactive NK cells.

Keywords : NK cells, alloreactivity, KIR, HSCT