

# THÈSE DE DOCTORAT

**Discipline :** *Biologie, médecine et santé*

**Spécialité :** « *Immunologie* »

**ECOLE DOCTORALE N° 605, *Biologie Santé***

FACULTE DE MEDECINE

UNIVERSITE DE NANTES

COMUE UNIVERSITÉ BRETAGNE LOIRE

Présentée par « **BERCELIN MANIANGOU ZONZEKA** »

« **Etude du polymorphisme allélique KIR pour optimiser la sélection  
Des donneurs en greffe de Cellules Souches Hématopoïétiques** »

**Thèse présentée et soutenue à « Nantes », le « 22 Octobre 2018 »**

**Unité de recherche :** Équipe 1 du Centre de Recherche en Cancérologie et Immunologie Nantes Angers  
INSERM UMR1232, CNRS ERL, Laboratoire de recherche de l'EFS Centre Pays de la Loire site de Nantes

**Thèse N° :**

## **Rapporteurs avant soutenance :**

Cyril Fauriat : Chargé de recherche, Plateforme d'Immunomonitoring en Cancérologie de Marseille

Christophe Picard : Directeur de recherche, laboratoire d'immunogénétique EFS AM

## **Composition du Jury :**

Président : Antoine Toubert Professeur des universités, Université Paris Diderot

Examineur : Antoine Toubert Professeur des universités, Université Paris Diderot

Dir. de thèse : Katia Gagne Directrice de recherche, Equipe 1 du CRCINA, INSERM UMR1232, CNRS

Co-directrice : Christelle Retière Directrice de recherche, Equipe 1 du CRCINA, INSERM UMR1232, CNRS

Encadrante : Berthe Marie Imbert Professeur des universités, Université de Nantes

## **Invité**

Patrice Chevallier : Professeur des universités, Praticien hospitalier, Université de Nantes

## Remerciements

Je tiens à exprimer mes plus vifs remerciements à ma directrice de Thèse, le Docteur Katia Gagne, à ma co-directrice de Thèse, le Docteur Christelle Retière, pour leur confiance, leur gentillesse, leur disponibilité, leurs précieux conseils qui m'ont permis d'avancer et pour la relecture de ce manuscrit de Thèse. Leurs compétences ainsi que leur rigueur scientifique m'ont beaucoup appris depuis mon stage de Master 2. Je remercie également le Professeur Berthe-Marie Imbert, pour avoir accepté d'être co-encadrante de mon travail de Thèse et, pour ses encouragements lors de mes comités de Thèse.

Je souhaiterais aussi remercier l'ensemble des membres de mon jury de Thèse à savoir les Docteurs Cyril Fauriat et Christophe Picard, rapporteurs, le Professeur Antoine Toubert, Président du jury, le Professeur Patrice Chevallier, invité, le Professeur Berthe-Marie Imbert et les Docteurs Katia Gagne et Christelle Retière, encadrants pour avoir accepté de faire partie de mon jury de Thèse.

Je tiens à remercier sincèrement :

- Les Docteurs Thierry Schneider et Frédéric Dehaut, Directeurs successifs de l'Établissement Français du Sang Centre-Pays de la Loire (EFS CPDL) site de Nantes, pour leur accueil au sein de cet établissement ainsi que l'ANRT et l'EFS pour le co-financement de cette Thèse ;
- Le Docteur Matthew Albert pour ses précieux conseils au début de ce projet en Master 2 et pour sa lettre de recommandation ;

- Les Docteurs Alexandre Walencik et Anne Cesbron-Gauthier du laboratoire HLA de l'EFS Centre-Pays de la Loire site de Nantes pour leur assistance dans le développement de la technologie NGS.KIR et l'accès à la plateforme MiSeq Illumina ;
- Les Docteurs Audrey Bihouet et Richard Redon pour l'accès à la Plateforme de Génomique de l'Institut du Thorax, INSERM, CNRS et de l'Université de Nantes ainsi qu'Eric Charpentier, bioinformaticien, pour le développement de l'algorithme d'analyse NGS « Bird » ;
- Le Docteur Mehdi Alizadeh de l'EFS de Rennes ainsi que l'informaticien Tanguy Regnault pour le développement du logiciel Profiler module KIR et la mise à jour de ce logiciel qui nous a permis d'analyser les données de ce travail de Thèse ;
- Les techniciennes du laboratoire de recherche de l'EFS CPDL site de Nantes, Mesdames Gaëlle David, Nolwenn Legrand et Catherine Willem pour leur savoir-faire et leurs conseils depuis mon stage de Master 2 ;
- Les étudiants du laboratoire de recherche de l'EFS CPDL site de Nantes, Dhon Roméo Makanga et Léa Dubreuil pour les bons moments passés ensemble ;
- Le personnel des laboratoires HLA, des bioréactifs et des prélèvements de l'EFS CPDL site de Nantes pour leur collaboration ;
- Les membres de l'équipe 1 INSERM U1232 du Centre de Recherche en Cancérologie et Immunologie Nantes-Angers à laquelle notre laboratoire de recherche est rattaché depuis janvier 2017.

Je remercie mon épouse, Juste Maniangou, pour son soutien et pour avoir été présente jusqu'à la fin de cette thèse. Je ne pourrais finir cette partie sans remercier mon fils Juge Maniangou âgé de 9 mois pour ses sourires qui m'ont toujours fait du bien.

Une pensée à mon cher oncle, le professeur François Diafouka pour ses nombreux conseils depuis Montpellier, tout au long de ma Thèse. Je remercie aussi tous mes frères et sœurs pour leur soutien.

Enfin, j'adresse toute mon affection à mon père Albert et à ma mère Céline, pour avoir toujours été là pour moi depuis ma naissance et pour avoir fait de moi ce que je suis.

## SOMMAIRE

<b>Liste des abréviations.....</b>	<b>1</b>
<b>Liste des figures.....</b>	<b>5</b>
<b>INTRODUCTION GENERALE.....</b>	<b>6</b>
<b>I. L'immunité innée et l'immunité adaptative.....</b>	<b>7</b>
1. Immunité innée.....	7
2. Immunité adaptative.....	7
3. Le Complexe Majeur d'Histocompatibilité.....	8
<b>II. Les cellules Natural Killer (NK).....</b>	<b>10</b>
1. Nomenclature des <i>Innate Lymphoid Cells</i> (ILCs).....	11
2. Développement, différenciation et mémoire des cellules NK.....	14
3. Le répertoire des cellules NK.....	18
3.1. Les récepteurs de la famille <i>Killer cell Immunoglobulin-like Receptor</i> (KIR).....	19
3.1.1. Structure protéique et nomenclature.....	20
3.1.2. Ligands des récepteurs KIR.....	24
3.1.3. Les gènes KIR.....	25
3.2. Les récepteurs de la famille <i>des Immunoglobulin-like Transcripts</i> (ILT).....	28
3.3. Les récepteurs de la famille des lectines.....	30
3.3.1. Les hétérodimères CD94/NKG2.....	30
3.3.2. Le récepteur NKG2D.....	31
3.3.3. Le récepteur NKp80.....	32
3.3.4. Le récepteur CD161.....	33

3.4. Les récepteurs de cytotoxicité naturelle (NCRs).....	34
3.4.1. Le récepteur NKp46.....	34
3.4.2. Le récepteur NKp44.....	35
3.4.3. Le récepteur NKp30.....	37
3.5. Autres récepteurs.....	38
3.5.1. Le récepteur 2B4.....	38
3.5.2. Le récepteur CD16.....	38
3.5.3. Le récepteur DNAM-1.....	39
3.5.4. Le récepteur TIGIT.....	39
4. Education des cellules NK .....	40
5. Fonctions des cellules NK.....	43
5.1. Production des cytokines et chimiokines.....	44
5.2. Prolifération.....	45
5.3. La cytotoxicité.....	45
6. Cellules NK et grossesse.....	48
7. Cellules NK et Immunité antivirale.....	49
7.1. Cellules NK et Cytomégalovirus (CMV).....	49
7.2. Cellules NK et virus de l'hépatite C (VHC).....	50
7.3. Cellules NK et virus de l'Immunodéficience Humaine (VIH).....	51
8. Immunothérapies NK .....	52
8.1. Approches thérapeutiques antitumorales.....	52
8.1.1. Cellules NK et cytokines.....	52
8.1.2. Cellules NK et anticorps.....	54
8.1.3. Le transfert adoptif des cellules NK.....	57
III. Cellules NK KIR <sup>+</sup> et greffes de CSH.....	61

1. Historique et évolution des greffes de CSH.....	61
2. Génétique HLA.....	64
3. Compatibilité HLA et sélection des donneurs allogéniques de CSH.....	65
4. Conditionnements.....	69
5. Impact des gènes KIR et ligands HLA de classe I en greffes de CSH.....	71
6. Expression des molécules HLA de classe I.....	74
7. Polymorphisme allélique des gènes KIR.....	75
8. Régulation transcriptionnelle des gènes KIR.....	81
9. Méthodes d'étude des gènes et allèles KIR.....	82
10. Analyse du répertoire des cellules NK KIR.....	86
<b>OBJECTIFS DU TRAVAIL DE THESE.....</b>	<b>90</b>
1. Travaux antérieurs de l'équipe.....	91
2. Questions en suspens.....	92
3. Objectifs du travail de thèse.....	93
<b>RESULTATS.....</b>	<b>94</b>
<b>Article N°1 : Détermination des allèles KIR par Séquençage Nouvelle Génération (NGS)</b> <i>(Front. Immunol. 2017)</i> .....	95
<b>Article N°2 : Le séquençage Nouvelle Génération : nouvel outil pour typer les allèles KIR en greffes de CSH</b> <i>(Editorial, Transfus. Clin. Biol. 2018)</i> .....	117
<b>Article N°3 en préparation : Impact du polymorphisme des gènes KIR2DL1/L2/L3/S2 sur le répertoire fonctionnel des cellules NK KIR<sup>+</sup></b> .....	121
<b>DISCUSSION ET PERSPECTIVES.....</b>	<b>175</b>
<b>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....</b>	<b>182</b>





## **LISTE DES ABREVIATIONS**

ADCC : Antibody Dependant Cellular Cytotoxicity

ADN : Acide DesoxyriboNucléique

ADNc : Acide DesoxyriboNucléique codant

AICL: Activation-Induced C-type Lectin

ARNm: Acide ribonucléique messenger

ATG : Anti-Thymocyte Globulin

β2m : Beta-2 microglobuline

BAT-3 : HLA-B Associated Transcript 3

BCR : B cell Receptor

BiKEs : Bi-specific Killer-cell Engagers

CAR : chimeric antigen receptor

CD : Cluster de Différenciation

CLP : Common Lymphoid Progenitor

CMH : Complexe Majeur d'Histocompatibilité

CMV : Cytomegalovirus

CPA : Cellule Présentatrice d'Antigène

CSF : Colony-Stimulating Factor

CSH : Cellules Souches Hématopoïétiques

DC : Dendritic Cell

DNAM-1 : DNAX Accessory Molecule 1

EFS-PL: Etablissement Français du sang Pays de la Loire

G-CSF : Granulocyte Colony Stimulating Factor

GM-CSF : Granulocyte Macrophage Colony Stimulating Factor

GvHD : Graft-versus-Host-Disease

GvL : Graft-versus-Leukemia

HLA : Human Leukocyte Antigen

HSPC : Heparan *Sulfate* Proteoglycans

HSCT : Hematopoietic Stem Cell Transplantation

IFN : Interferon

Ig : Immunoglobuline

IL : Interleukine

ILC : Innate Lymphoid Cell

ILT : Immunoglobulin-Like Transcript

iNK : Immature Natural Killer cell

IPD : Immuno Polymorphism Database

ITAM : Immunoreceptor Tyrosine-based Activation Motif

ITIM : Immunoreceptor Tyrosine-based Inhibition Motifs

ITSM : Immunoreceptor Tyrosine-based Switch Motif

KDa : Kilodalton

KIR : Killer Cell Immunoglobulin-like Receptor

KLRF1 : Killer Cell Lectin Like Receptor G1

LAK: Lymphokine-Activated Killer cell

LAL : Leucémie Aigüe Lymphoïde

LAM : Leucémie Aigüe Myéloïde

LAMP : Lysosomal-associated membrane protein

LILRA : Leulocyte-Immunoglobulin Like Receptor A

LILRB : Leulocyte-Immunoglobulin Like Receptor B

LLT1: Lectin-Like Transcript 1

LMC : Leucémie Myéloïde Chronique

LPS : Lipopolysaccharide

LRC : Leukocyte Receptor Complex

MIC-A, -B : MHC class I related protein A, B

MIP-1 $\alpha$ : Macrophage Inflammatory Protein 1 alpha

MLL5 : Mixed Lineage Leukemia-5

MM: Myélome Multiple

NCR : Natural Cytotoxicity Receptor

NCAM: Neural Cell Adhesion Molecule

NK : Natural Killer

NKC : Natural Killer cell Complex

NKG2 : Natural Killer Group 2

NGS: Next-Generation Sequencing

NKT: Natural Killer T

PAMP : Pathogen-Associated Molecular Pattern

PBMC : Peripheral Blood Mononuclear Cell

PCR : Polymerase Chain Reaction

PCNA: Proliferating Cell Nuclear Antigen

PD-L1: Programmed death-ligand 1

PRR : Pattern Recognition Receptor

PVR: Poliovirus receptor

PfEMP-1: Plasmodium falciparum erythrocyte membrane protein 1

RAE-1 : Retinoic Acid Early inducible 1

RIC : Reduced Intensity Conditioning

SBT : Sequence Based Typing

SFGMTC: Société Francophone de Greffe de Moelle et de Thérapie Cellulaire

SHIP : Phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate 5-phosphatase 1

SSOP: Sequence Specific Primers

SSP: Sequence Specific oligonucleotides Probes

SYK: spleen associated tyrosine kinase

TCR : T cell Receptor

TIGIT : T cell immunoreceptor with Ig and ITIM domains

TLR : Toll Like Receptor

TNF : Tumor Necrosis Factor

TNFR1 : Tumor Necrosis Factor Receptor I

TRAIL : TNF Related Apoptosis Inducing Ligand

TriKEs : Tri-Specific Killer-cell Engagers

TRM : Transplant Related Mortality

UCB : Umbilical Cord Blood

UCBT : Umbilical Cord Blood Transplantation

ULBP : UL16 Binding Protein

UTR : Untranslated Transcribed Region

VHC : Virus de l'Hépatite C

VIH : Virus de l'Immunodéficience Humaine

ZAP-70: zeta chain of T cell receptor associated protein kinase 70

## **LISTE DES FIGURES**

Figure 1 : Complexe HLA et structure des molécules HLA de classe I et II.....	9
Figure 2 : Sous populations des cellules NK CD56 <sup>+</sup> CD3 <sup>-</sup> .....	11
Figure 3 : Les sous populations des ILCs, fonctions et associations maladies.....	13
Figure 4 : Représentation schématique des stades de développement des cellules NK humaines.....	17
Figure 5 : Les récepteurs des cellules NK et leurs ligands.....	19
Figure 6 : Structure des récepteurs KIR et leurs ligands HLA de classe I.....	23
Figure 7 : Organisation des gènes KIR, haplotype et structure exons-introns.....	27
Figure 8 : Principaux modèles proposés sur l'éducation des cellules NK.....	43
Figure 9 : Sources de cellules souches hématopoïétiques.....	69
Figure 10 : Polymorphisme allélique des gènes KIR.....	77
Figure 11 : Alignement des séquences ADNc des allèles KIR2DL1.....	79
Figure 12 : Alignement des séquences en AA des allèles KIR2DL1.....	80
Figure 13 : Expression clonale des récepteurs KIR sur les cellules NK.....	89
Figure 14 : Proposition d'un arbre décisionnel pour la sélection des donneurs de CSH sur des bases alléliques KIR en greffes HLA haploidentiques.....	181

# **INTRODUCTION GENERALE**

## **I. L'immunité innée et l'immunité adaptative**

### **1. Immunité innée**

L'immunité innée constitue la première ligne de défense de l'organisme contre les pathogènes. Sa mise en place est immédiate après invasion par un pathogène (virus, bactérie, champignon ou parasite). Les réponses cellulaires de l'immunité innée sont assurées par les macrophages, cellules dendritiques, mastocytes, neutrophiles, éosinophiles, cellules épithéliales, cellules endothéliales, cellules Natural Killer (NK) et cellules Natural Killer T (NKT) et les lymphocytes T  $\gamma\delta$  (Turvey and Broide, 2010). Certaines cellules de cette immunité innée reconnaissent via les récepteurs PRR (*Pattern Recognition Receptors*) des motifs moléculaires associés aux pathogènes (PAMP), présents à la surface des microorganismes (bactérie, cellule fongique, parasite, particule virale), comme les composants de la paroi des bactéries (LPS) ou des champignons (Medzhitov and Janeway, 1997a). La reconnaissance de ces PAMPs conduit à l'activation de plusieurs types cellulaires de l'immunité innée, entraînant la production des médiateurs inflammatoires (IL-1, TNF- $\alpha$ , IL-6, IFN de type 1 et plusieurs chimiokines), qui interviendront dans le recrutement de certains acteurs immunitaires et dans la mise en place des réponses immunes adaptatives (Medzhitov and Janeway, 1997b).

### **2. Immunité adaptative**

Les réponses immunes adaptatives constituent, la deuxième ligne de défense de l'organisme contre les pathogènes après l'immunité innée. Ces réponses immunes adaptatives sont assurées par les lymphocytes T  $\alpha\beta$  et B capables de reconnaître spécifiquement via leurs récepteurs, les antigènes du « soi » et du « non soi ». Les lymphocytes B issus de la moelle osseuse reconnaissent via leur récepteur BCR (*B cell receptor*), des antigènes multivalents. Cette rencontre permettra aux lymphocytes B de s'activer et de se différencier en plasmocytes sécréteurs d'anticorps solubles neutralisants (réponse humorale) et en lymphocytes B mémoires. Par ailleurs, les lymphocytes T naïfs reconnaissent via leurs récepteurs TCR (*T cell*

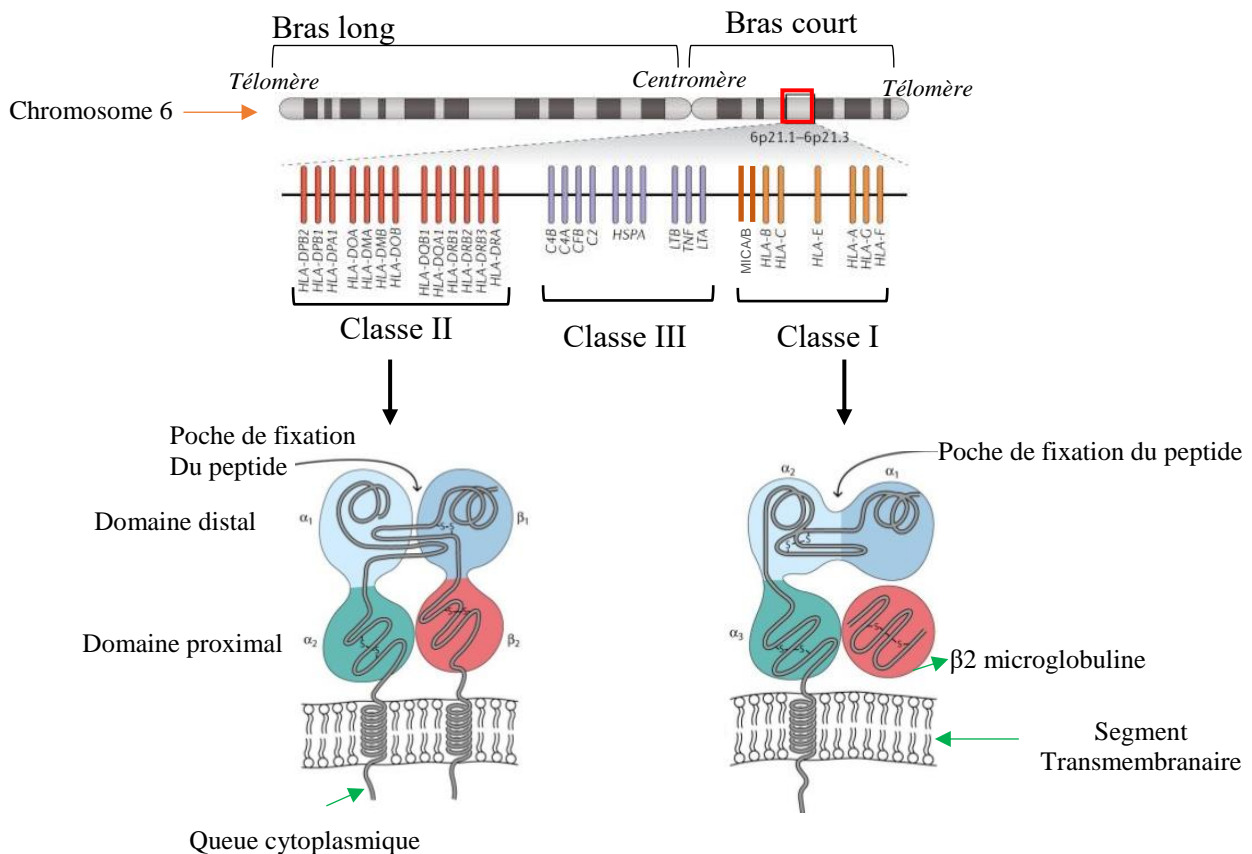
*receptor*), les fragments d'antigènes présentés par les molécules du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH), une fois appretés par la Cellule Présentatrice d'Antigène (CPA) (Bonilla and Oettgen, 2010). Ces molécules du CMH présentent des peptides antigéniques aux lymphocytes T naifs  $\alpha\beta$  n'ayant pas encore rencontré d'antigène spécifique. Cette reconnaissance permettra à ces lymphocytes T  $\alpha\beta$  naifs de devenir effecteurs et de se différencier en lymphocytes T mémoires.

### 3. Le Complexe Majeur d'Histocompatibilité

Chez l'homme, le CMH représente un ensemble de gènes situés sur le bras court du chromosome 6 codants notamment des molécules membranaires appelées HLA (*Human Leukocyte Antigen*) (Lamm et al., 1974). Ce complexe génétique HLA est subdivisé en trois régions : HLA de classe I, HLA de classe II et HLA de classe III, illustré dans la figure 1 (Trowsdale et al., 1991). La région HLA de classe I contient les gènes HLA de classe I classiques (HLA-A, HLA-B, HLA-C) et des gènes HLA de classe I non classiques (HLA-E, HLA-F et HLA-G). La région HLA de classe II contient les gènes HLA classiques (HLA-DP, HLA-DQ, HLA-DR), les pseudogènes et deux gènes HLA de classe II non classiques (HLA-DM et HLA-DO) (Monaco, 1993), (Horton et al., 2004). Enfin, la région HLA de classe III située entre les régions HLA de classe I et II, contient principalement les gènes TNF, C2, C4, BF et CYP21 (Gruen and Weissman, 2001). Les gènes HLA de classe I et II classiques sont codominants, transmis en bloc et polymorphes. Ces gènes HLA codent les chaînes  $\alpha$  pour la classe I et les chaînes  $\alpha$  et  $\beta$  pour la classe II, qui diffèrent respectivement dans leurs structures et en termes des peptides qu'elles présentent aux récepteurs des lymphocytes T (**Figure 1**). Les molécules HLA de classe I sont exprimées à la surface de toutes les cellules nucléées de l'organisme. Elles sont spécialisées dans la présentation des peptides issus du cytosol aux lymphocytes T CD8+. A l'inverse, les molécules HLA de classe II sont exprimées constitutivement sur un nombre limité des cellules de l'organisme, telles que les lymphocytes



B, les cellules dendritiques, les macrophages, les monocytes, les endothéliums des vaisseaux capillaires, les cellules épithéliales thymiques, certains épithéliums des voies digestives et respiratoires (Ma et al., 2012) (Xaus et al., 2000) (Rouse et al., 1982). Une fois exprimées à la surface, les molécules HLA de classe II présentent des peptides antigéniques aux lymphocytes T CD4+. Enfin, ces molécules HLA, plus précisément celles de classe I sont reconnues par une famille de récepteurs exprimés à la surface des cellules NK que nous décrivons dans les prochains chapitres. L'intérêt de ce système HLA dans le contexte des greffes de Cellules Souches Hématopoïétiques (CSH) sera abordé dans la partie III de ce manuscrit (Parham, 2018).

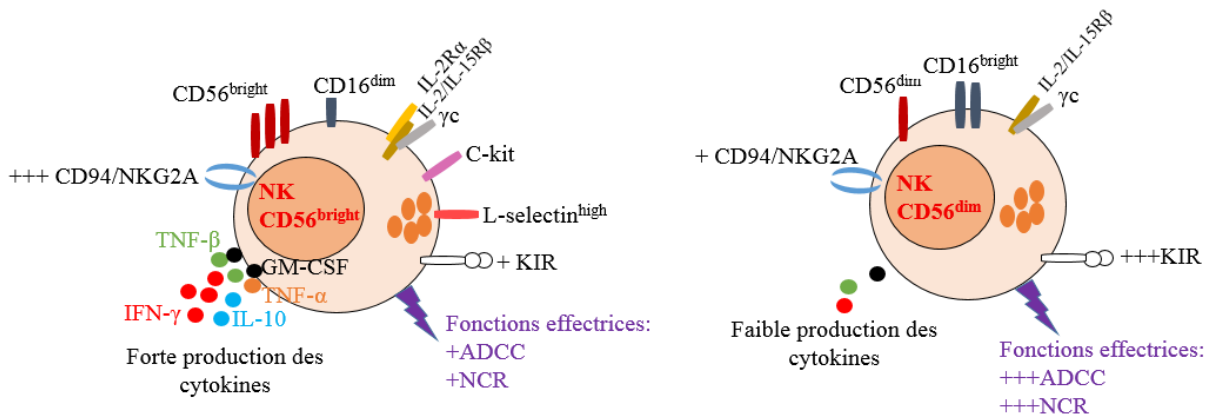


**Figure 1 : Complexe HLA et structure des molécules HLA de classe I et II**

Le complexe génique HLA situé sur le bras court du chromosome 6 est subdivisé en trois classes : les gènes HLA de classe I classiques (HLA-A, -B, -C), non-classiques (HLA-E, -F, -G) ou classe I like (MICA/B), les gènes HLA de classe II classiques (HLA-DR, DP, DQ) et non-classiques (HLA-DO, DM) et les gènes HLA de classe III (TNF, LT, HSPA, C2, C4). Les gènes HLA de classe I codent des molécules constituées d'une chaîne  $\alpha$  à trois domaines extracellulaires ( $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$  et  $\alpha_3$ ) associée à la  $\beta_2$  microglobuline. Par ailleurs, les gènes HLA de classe II codent des molécules constituées de deux chaînes  $\alpha$  ( $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$ ) et  $\beta$  ( $\beta_1$ ,  $\beta_2$ ) composées chacune de deux domaines extracellulaires (adaptée de Maria Gutierrez-Arcelus et al. Nat Rev Genet 2016 et Immunologie, Owen, Punt et Stranford, 2013).

## II. Les Cellules Natural Killer (NK)

Les cellules NK sont des cellules du système immunitaire innée codécouvertes chez la souris en 1975, par Ronald Hebermann et Rolf Kiessling, comme des cellules lymphocytaires non B et non T ayant une cytotoxicité naturelle anti-tumorale (Herberman et al. 1975), (Kiessling et al., 1975). Les cellules NK sont des lymphocytes granuleux représentant 5 à 20% des lymphocytes du sang périphérique (Ndhlovu et al., 2012). Au cours de ces dernières années, les fonctions effectrices de ces cellules NK ont été plus clairement décrites. Les cellules NK sont des cellules cytotoxiques constituant la première ligne de défense de l'organisme contre les pathogènes intracellulaires, les cellules infectées par les virus et les cellules transformées (Trinchieri, 1989). Chez l'homme, ces cellules NK sont généralement identifiées par l'absence d'expression de la molécule CD3 et l'expression du marqueur de surface CD56 (CD56<sup>+</sup>CD3<sup>-</sup>) (Ritz et al., 1988). La molécule CD56 correspond à l'isoforme de 140 kDa de la molécule d'adhésion N-CAM (*neural cell adhesion molecule*) exprimée également sur certaines sous-populations de lymphocytes T, les cellules musculaires et neurales (Lanier et al., 1989a). Deux grandes sous-populations de cellules NK peuvent être distinguées en cytométrie en flux, basées sur le niveau d'expression du marqueur de surface CD56 : Cellules NK CD56<sup>dim</sup> CD3<sup>-</sup> et NK CD56<sup>bright</sup> CD3<sup>-</sup>. Le marqueur de surface NKp46 peut être aussi utilisé pour identifier les cellules NK (Montaldo et al., 2013), (Walzer et al., 2007). Dans le sang périphérique, environ 90% des cellules NK sont CD56<sup>dim</sup> et 10% des cellules NK sont CD56<sup>bright</sup> (**figure 2**). Les cellules NK CD56<sup>dim</sup> sont très cytotoxiques et produisent de faibles quantités de cytokines (Nagler et al., 1989). Par contre, les cellules NK CD56<sup>bright</sup> sont moins cytotoxiques et produisent d'énormes quantités des cytokines immunorégulatrices (**figure 2**), telles que l'IFN- $\gamma$ , TNF- $\beta$  et le GM-CSF (Lanier et al., 1986), (Cooper et al., 2001).



**Figure 2 : Sous populations des cellules NK CD56<sup>+</sup>CD3<sup>-</sup>**

La sous-population des cellules NK CD56<sup>bright</sup>CD16<sup>dim</sup> (à gauche) représente environ 10% des cellules NK du sang périphérique. Elle exprime fortement le complexe CD94/NKG2A, faiblement les récepteurs KIR, secrète de grandes quantités de cytokines et elle est peu cytotoxique. A l'inverse, la sous-population des cellules NK CD56<sup>dim</sup>CD16<sup>bright</sup> (droite) représente 90% des cellules NK du sang périphérique. Elle exprime faiblement le complexe CD94/NKG2A, fortement les récepteurs KIR, secrète de faibles quantités de cytokines et elle est très cytotoxique.

En 2013, les cellules NK ont été initialement classifiées comme les membres prototypiques du groupe 1 des ILC (*Innate Lymphoid Cells*) sur la base de leurs caractéristiques fonctionnelles, telles que leur capacité à produire de l'IFN- $\gamma$  après activation (Spits et al., 2013), (Walker et al., 2013). Une nomenclature de ces ILC a alors été définie. En 2018, cette nomenclature a été redéfinie, les cellules NK constituent désormais un compartiment à part des ILC1 (Vivier et al., 2018).

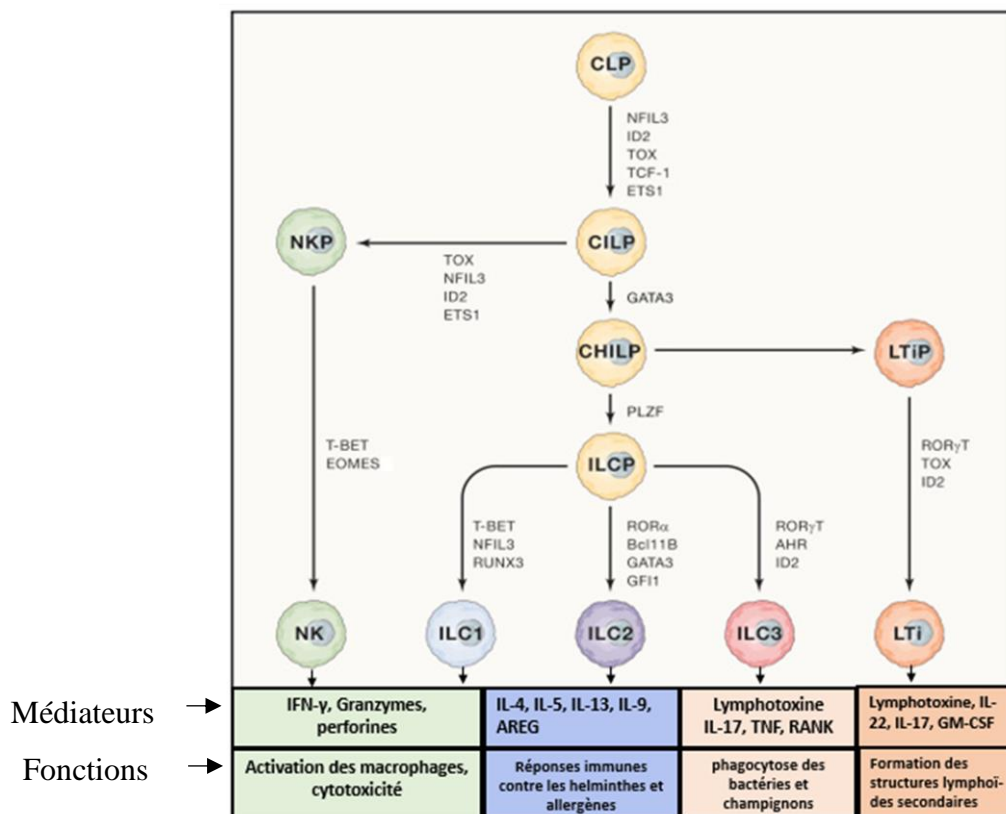
### 1. Nomenclature des *Innate Lymphoid Cells* (ILCs)

Les ILCs sont des sous-populations de lymphocytes n'exprimant pas les récepteurs d'antigènes des lymphocytes T et B (Vivier et al., 2018). En 2013, ces ILCs ont été classifiés en trois groupes ILC1, ILC2 et ILC3. A l'époque, le groupe 1 des ILCs était composé des cellules NK et des ILC1s. La nouvelle nomenclature des ILCs approuvée par l'IUIS (International Union of Immunological Societies), basée sur leurs développements ainsi que

leurs fonctions (**figure 3**), classifie désormais ces ILCs en cinq groupes : les cellules NK, ILC1s, ILC2s, ILC3s et les cellules LTi (Vivier et al., 2018).

Comparées aux cellules NK, les ILC1s sont généralement non cytotoxiques ou faiblement cytotoxiques et interviennent dans la défense de l'organisme contre les infections virales et bactériennes (Abt et al., 2015), (Vivier et al., 2018). Contrairement aux cellules NK produisant d'énormes quantités de perforine, les ILC1s produisent de faibles quantités de perforine. Ces deux types cellulaires partagent certaines caractéristiques communes, telles que la production d'IFN- $\gamma$  via le facteur de transcription T-bet et l'expression des récepteurs de cytotoxicité naturelle (NCRs) (Vivier et al., 2018). Par ailleurs, les ILCs du groupe 2 sont définis par leur capacité à produire des cytokines de type 2, telles que les IL-4, IL-5 et IL-13 (Moro et al., 2010) ainsi que leur capacité à résider au niveau des tissus (Gasteiger et al., 2015). La sécrétion des cytokines de type 2 par les ILC2s et IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  peut être dramatiquement affectée chez les patients atteints de LAM (Trabanelli et al., 2015). Les ILC2s interviennent dans les réponses immunitaires innées contre les parasites (helminthes). Elles sont capables de participer à la réparation des tissus endommagés par l'infection, en produisant le facteur de croissance AREG (Amphiregulin) (Monticelli et al., 2011). De plus, les ILC2s contiennent d'énormes quantités de facteur de transcription GATA3 comparées aux autres ILCs (Vivier et al., 2018). Les ILCs du groupe 3 produisent les cytokines IL-17, IL-22, TNF, GM-CSF, RANK et la lymphotoxine. La production de la cytokine IL-22 permet de maintenir l'homéostasie intestinale et de promouvoir la prolifération des cellules souches intestinales après de fortes doses de TBI (Total body irradiation) en greffes de CSH dans un modèle de souris (Hanash et al., 2012). Les ILC3s interviennent dans la phagocytose des bactéries extracellulaires (bactéries et champignons) et expriment le récepteur NKp44 décrit ultérieurement dans la partie 3.4.2. Les cellules LTi (Lymphoid tissue inducer) participent par contre à la formation des organes lymphoïdes secondaires pendant le développement embryonnaire, en produisant la

lymphotoxine (Mebius et al., 1997). Contrairement aux ILC3s exprimant le marqueur NKp44, les cellules LT<sub>i</sub> expriment les marqueurs de surface c-Kit et CCR6. Des études ont observé, une perte significative des ILCs circulants après chimiothérapie, suivie d'une reconstitution lente des ILC1s, ILC2s et ILC3s (Munneke et al., 2014). Les trajectoires de développement de ces 5 ILCs sont présentées sur la **figure 3**.



**Figure 3 : Développement des ILCs**

Les ILCs se développent à partir d'un progéniteur lymphoïde inné commun (CILP) issue du progéniteur lymphoïde commun (CLP). Le CILP peut se différencier soit en précurseurs des cellules NK (NKP) pour donner les cellules NK ou en CHILPs (Common Helper Innate Lymphoïde Progenitors) qui se différencie soit en progéniteurs LT<sub>i</sub>P (lymphoid tissue inducer progenitors) ou en progéniteur ILCP (innate lymphoïd cell precursors). Les LT<sub>i</sub>P se différencient en cellules LT<sub>i</sub>. Le progéniteur ILCP se différencie soit en ILC1 ou ILC2 ou en ILC3. Chaque stade de différenciation est dépendant de l'expression des facteurs de transcription indiqué : NFIL3 (nuclear factor IL-3 induced), Id2 (Inhibitor of DNA binding 2), TOX (thymocyte selection-associated high mobility group box protein), TCF-1 (T cell factor 1), ETS1 (avian erythroblastosis virus E26 homolog-1), GATA-3 (GATA binding protein 3), PLZF (promyelocytic leukemia zinc finger), T-bet (T-box transcription factor), Eomes (Eomesodermin), RUNX3 (runt-related transcription factor 3), ROR $\alpha$  (RAR-related orphan receptor  $\alpha$ ), Bcl11b (B cell lymphoma/leukemia 11b), Gfi1 (growth factor independent 1), ROR $\gamma$ t (RAR-related orphan receptor  $\gamma$ t) et AhR (aryl hydrocarbon receptor). Ces données ont été obtenues chez la souris (Vivier et al., 2018).

## 2. Développement, différenciation et mémoire des cellules NK

Le développement des lymphocytes NK humains, se fait dans la moelle osseuse (Caligiuri, 2008), (Colucci et al., 2003) et dans d'autres sites anatomiques tels que les organes lymphoïdes secondaires (Scoville et al., 2017). Chez l'homme, ces cellules NK se développent à partir d'un progéniteur lymphoïde CD34<sup>+</sup> commun aux lymphocytes T et B. Ce progéniteur lymphoïde commun (CLP) s'engage dans la lignée NK sous l'influence des certains signaux pour acquérir progressivement un phénotype mature et des capacités fonctionnelles. Les étapes de développement des cellules NK humaines ne sont pas encore bien établies. Brièvement, l'engagement dans la lignée NK se fait de façon progressive jusqu'au stade 3 (Scoville et al., 2017). La maturation fonctionnelle débute ensuite à partir de ce stade 3. Cependant, l'acquisition des fonctions effectrices telles que la production de l'IFN- $\gamma$  ne se fait qu'à partir du stade 4b (Scoville et al., 2017). L'acquisition des récepteurs sur les cellules NK se fait de façon coordonnée. Le récepteur CD161 apparait en premier, suivi de la molécule CD56, CD94/NKG2A, NKp46, NKG2D, les récepteurs KIRs et CD16 (Grzywacz et al., 2006). D'après le nouveau modèle proposé en 2017 (Scoville et al., 2017), basé sur l'expression différentielle de 7 marqueurs de surface (CD34, CD117, IL-1R1, CD94, NKp80, CD16 et CD57), le développement et la différenciation *ex vivo* des cellules NK humains se feraient en six grandes étapes.

### 2.1. Stade 1 : les progéniteurs des cellules NK (pro-NK)

L'engagement dans la lignée NK débute dans la moelle osseuse à partir du progéniteur pro-NK CD34<sup>+</sup>CD122<sup>-</sup>. Ce dernier donne lieu aux cellules pre-NK CD34<sup>+</sup>CD122<sup>+</sup> pouvant par la suite se différencier en réponse à l'IL-15 (Colucci et al., 2003). Les pro-NK expriment les marqueurs de surface CD34 et CD45RA mais n'expriment pas les molécules CD117, CD94, CD16, CD57, NKp80 et IL-1R1 (**Figure 4**). À ce stade de développement, on n'observe aucune

expression de l'ARNm du CD122 (IL2R $\beta$ ) et ces pro-NK sont par conséquent non répondeurs à l'IL-15.

### 2.2. Stade 2 : les pre-NK

La caractéristique définissant ce stade est l'acquisition des capacités à répondre à l'IL-15 soluble produite par les cellules stromales de la moelle osseuse (Mrozek et al., 1996) et la différenciation en cellules NK immatures (stade 3, **Figure 4**). Ce stade de développement est aussi marqué par l'acquisition du proto-oncogène c-kit (CD117) et la diminution de l'expression du récepteur CD34. Dans les organes lymphoïdes secondaires, ce stade est constitué par deux sous étapes (2a et 2b) fonctionnellement différentes selon l'expression du récepteur de type 1 de l'interleukine 1 (IL-1R1) (Scoville et al., 2016). Aux stades 2a et 2b, les cellules NK expriment le marqueur CD45RA des cellules T naïves, l'intégrine  $\beta$ 7, ID2 et présentent une faible ou une absence de détection du marqueur CD10 (Scoville et al., 2017). Cependant, les cellules du stade 2b sont uniques dans leur expression quasi-uniforme des marqueurs pan-ILC, CD161 et une absence de détection de l'ARNm de RAG1 exprimé dans les cellules des stades 1 et 2a. Contrairement aux cellules du stade 2b exprimant le récepteur à IL-1R1, les cellules du stade 2a n'expriment pas ce récepteur (Scoville et al., 2016).

### 2.3. Stade 3 : Cellules NK immatures (iNK)

Au cours de ce stade, les progéniteurs s'engagent définitivement dans la lignée NK en perdant l'expression du marqueur CD34 et de nombreux antigènes de surface associés aux lymphocytes T, B, monocytes, macrophages et aux cellules dendritiques. Par ailleurs, on observe une expression des marqueurs de surface associés aux cellules NK tels que CD2, CD7, CD56, CD161, 2B4, et NKp44 (Freud and Caligiuri, 2006). L'expression des récepteurs Killer cell Immunoglobulin like Receptor (KIR), CD94/NKG2, NKp46, NKG2D et CD16 n'est pas

encore acquise à ce stade (**Figure 4**). Bien que ce stade corresponde à l'engagement définitif des progéniteurs dans la lignée NK, ces cellules NK immatures ne sont cependant pas encore capables de sécréter l'IFN- $\gamma$  et de lyser les cellules présentant une perte d'expression des molécules HLA de classe I.

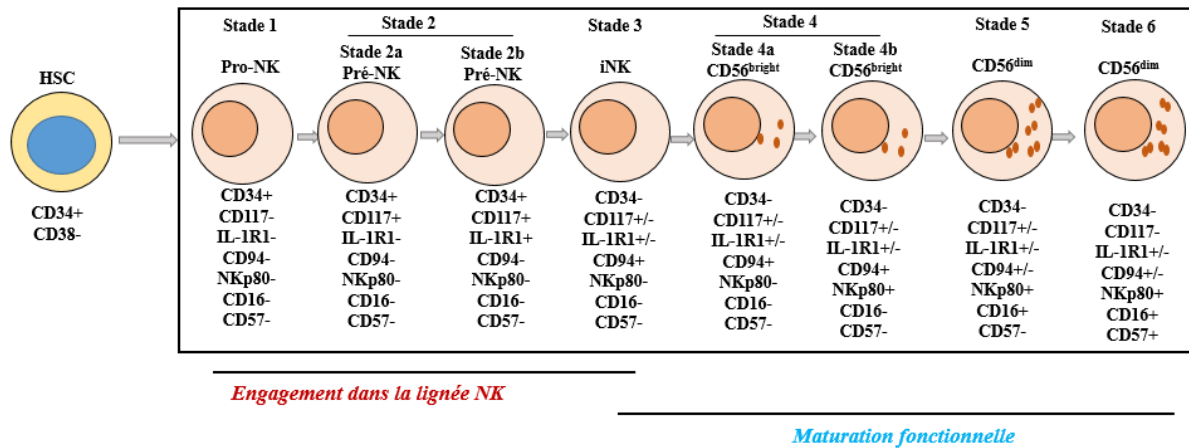
#### 2.4. Stade 4 : Les cellules NK CD56<sup>bright</sup>

La progression au stade 4 (**Figure 4**), est marquée par une diminution d'expression des marqueurs de surface CD117, CD33, CD127 et l'acquisition des récepteurs (NKG2A, NKG2D, NKp46, KIR), perforine intracellulaire, sécrétion d'énormes quantités d'IFN- $\gamma$  ainsi que le récepteur CD122 qui devient détectable par cytométrie en flux (Freud et al., 2006). À ce stade de développement, les cellules NK expriment fortement le marqueur CD56 (CD56<sup>bright</sup>), n'expriment pas encore le récepteur de faible affinité de la portion Fc (CD16) des immunoglobulines et sont très peu fournies en granules de perforines. Ce stade est subdivisé en deux sous stades (4a et 4b) selon l'expression du récepteur NKp80 sur les cellules NK (Freud et al., 2016). Le stade 4b se différencie du stade 4a, par l'expression du récepteur NKp80 sur les cellules NK et par leur capacité à produire de l'IFN- $\gamma$  et de libérer des granules cytotoxiques (Freud et al., 2016).

#### 2.5. Stades 5 et 6 : Les cellules NK CD56<sup>Dim</sup>

Ces deux stades sont marqués par la diminution progressive du niveau d'expression de la molécule CD56 (CD56<sup>Dim</sup>), une expression des récepteurs KIR, une forte expression du récepteur de faible affinité du fragment Fc des immunoglobulines (CD16) et une capacité à produire d'énormes quantités de granules cytotoxiques. Le stade 6 se différencie du stade 5 par l'acquisition du marqueur de maturité (CD57) et la perte complète du niveau d'expression de la molécule CD117 (**Figure 4**).





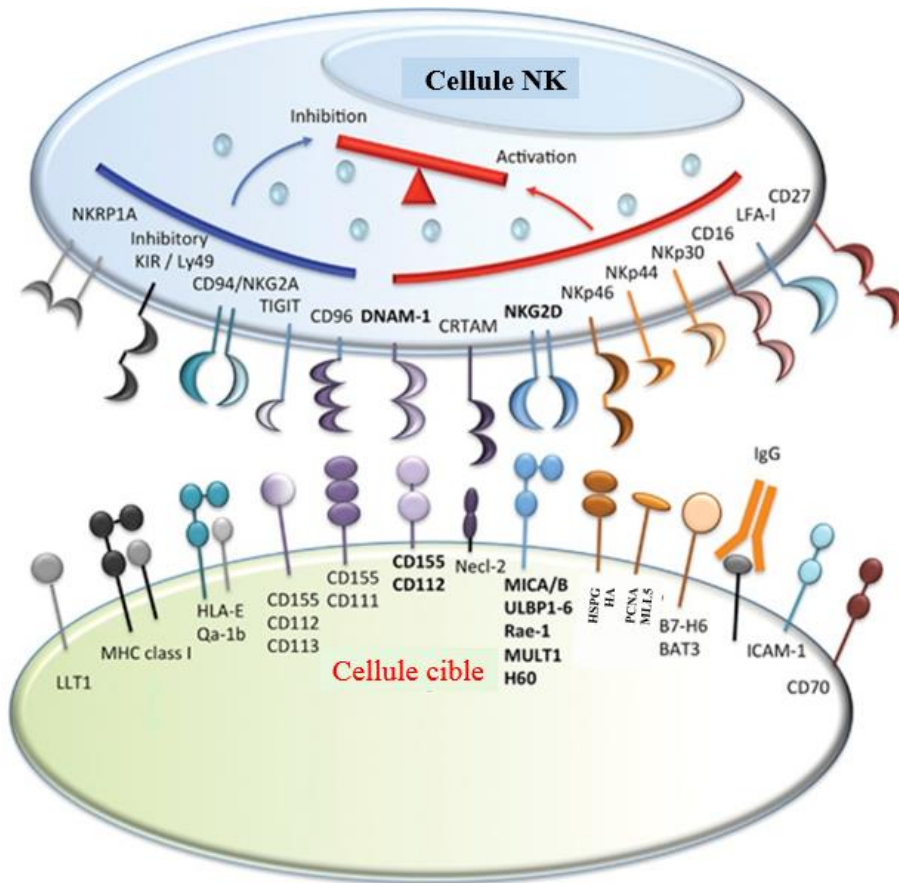
**Figure 4 : Représentation schématique des stades de développement des cellules NK humaines.** Ces stades sont définis selon le niveau d'expression des molécules CD34, CD117, IL-1R1, CD94, NKp80, CD16 et CD57 au cours du développement des cellules NK. L'engagement dans la lignée NK se fait de façon progressive jusqu'au stade 3. Au stade 3 débute la maturation fonctionnelle des cellules NK avec l'acquisition des fonctions effectrices à partir du stade 4b. La maturation phénotypique des cellules NK se termine par l'acquisition du marqueur CD57 au stade 6. L'acquisition des récepteurs KIR se fait progressivement à partir du stade 4a (*Inspirée Freud et al., 2006 et Scoville et al. 2017*).

## 2.6. Cellules NK mémoires

La mémoire immunologique est l'une des principales caractéristiques de l'immunité adaptative. Les cellules NK ont été longtemps considérées comme étant des cellules du système immunitaire inné à courte durée de vie, capable de lyser les cellules transformées ou infectées par un pathogène. Plusieurs données expérimentales ont suggéré que les cellules NK peuvent par exemple avoir une mémoire immunologique à longue durée de vie spécifique des haptènes et des virus (O'Leary et al., 2006) (Sun et al., 2009) (Paust et al., 2010) (Abdul-Careem et al., 2012) (Cerwenka and Lanier, 2016). La mémoire des cellules NK en réponse aux infections virales a été décrite chez la souris (Paust et al., 2010), le macaque rhésus (Reeves et al., 2015) et chez l'homme (Lopez-Vergès et al., 2011). Cette mémoire immunologique des cellules NK peut être induite par les cytokines IL-12, IL-15 et l'IL-18 intervenant dans la production de l'IFN- $\gamma$  après activation des cellules NK naïves (Berrien-Elliott et al., 2015).

### 3. Répertoire des cellules NK

Contrairement aux lymphocytes T et B, possédant un récepteur spécifique de l'antigène, les cellules NK expriment à leur surface un répertoire varié de récepteurs activateurs et inhibiteurs gouvernants ainsi leurs fonctions effectrices en interagissant avec les molécules HLA de classe I. Les récepteurs les mieux décrits sont les KIR, les lectines de type C, les NCRs et le marqueur CD16 médiant la cytotoxicité dépendante des anticorps (Lanier, 2005). Ces récepteurs sont exprimés de façon stochastique ou aléatoire à la surface des cellules NK, ceci implique que chaque cellule NK exprime à sa surface sa propre combinaison de récepteurs activateurs et inhibiteurs formant ainsi le répertoire NK (**Figure 5**). De plus, certains récepteurs comme les récepteurs KIR vont être exprimés de façon clonale à la surface des cellules NK d'un individu (Valiante et al., 1997). Cette grande diversité de répertoire, permet aux cellules NK d'être capable de discriminer les cellules du « soi » (saines), des cellules du « non soi » (transformées ou infectées par un virus). Dans cette partie, nous allons détailler la structure, la nomenclature, la génétique et les ligands de ces différents récepteurs pour mieux appréhender la complexité du répertoire des cellules NK.



**Figure 5 : Les récepteurs des cellules NK et leurs ligands**

Les molécules CMH de classe I sont reconnues par les récepteurs KIR chez l'homme et les récepteurs Ly49 chez la souris. BAT3 et B7-H6 sont reconnues par le récepteur NKp30; HA (viral hemagglutinin) peut être reconnue par le récepteur NKp30; HLA-E est reconnue par le complexe CD94/NKG2A; NKG2D interagit avec les molécules MICA/B et ULBP chez l'homme. DNAM-1 et TIGIT reconnaissent les molécules CD155 et CD112 (*adaptée de Chan et al., Cell Death Differ 2014*).

### **3.1. Les récepteurs de la famille des *Killer cell Immunoglobulin-like Receptor (KIR)***

Les KIR sont des récepteurs membranaires, découverts chez l'homme en 1990 par Alessandro Moretta, exprimés principalement sur les cellules NK (Moretta et al., 1990) et sur certaines sous-populations de lymphocytes T (Phillips et al., 1995). Chez la souris, les récepteurs Ly49 activateurs (Ly49D et H) (Mason et al., 1996) et inhibiteurs (Ly49A, C, E, G et I) (Hanke et al., 1999) ont été identifiés comme étant des homologues de ces récepteurs KIR.

Dans cette partie, nous décrivons la structure protéique de ces récepteurs, leur nomenclature internationale, leurs ligands HLA ainsi que la génétique de ces récepteurs.

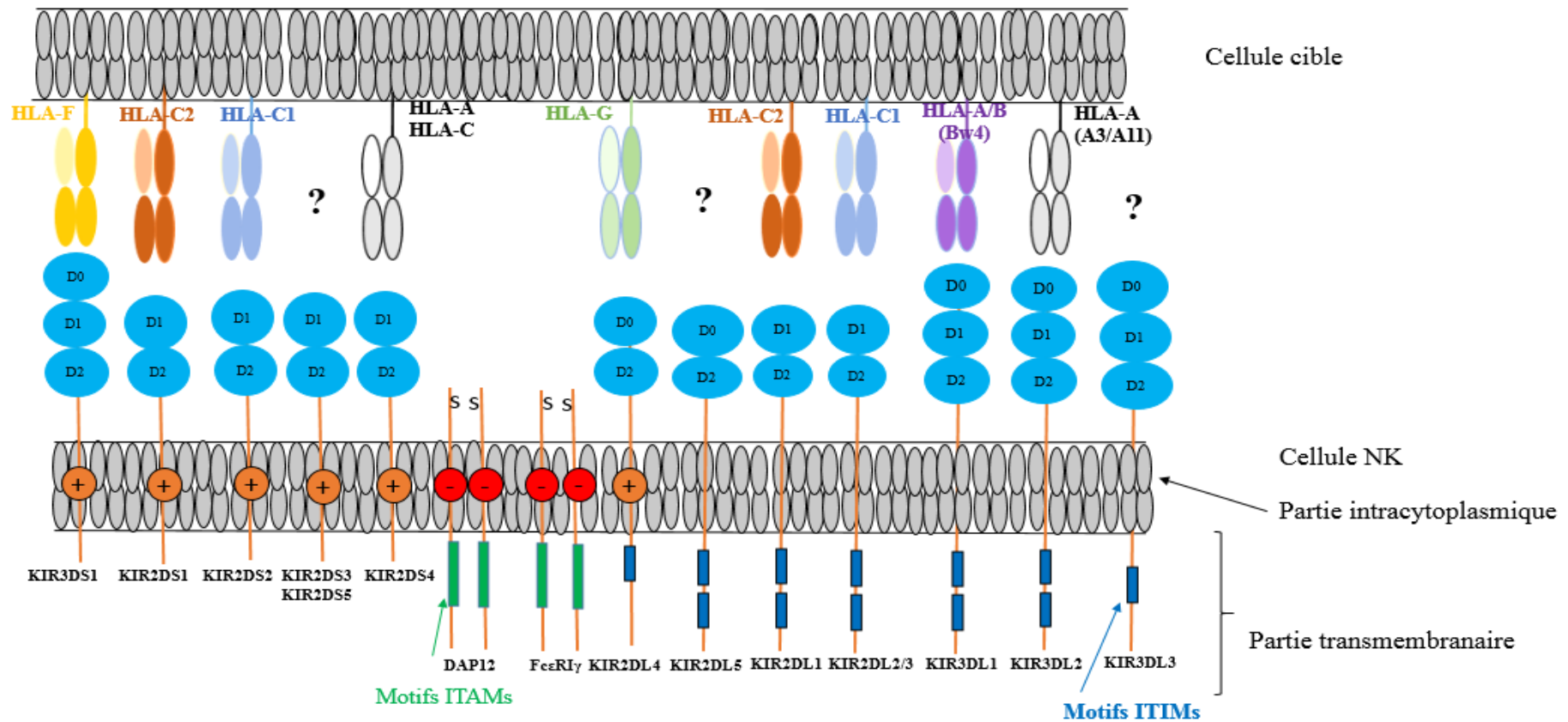
### **3.1.1. Structure protéique et nomenclature**

Les récepteurs KIR sont des glycoprotéines de la superfamille des immunoglobulines, composés de domaines extracellulaires, d'une région transmembranaire et d'une courte ou longue queue intracytoplasmique (**figure 6**). La nomenclature de ces récepteurs KIR (Marsh et al., 2003), (Middleton and Gonzelez, 2010), harmonisée au niveau mondial inclut l'acronyme KIR, suivi du nombre de domaines extracellulaires « 2D » ou « 3D » de type Ig et de la longueur de la queue cytoplasmique (« L » pour long, « S » pour court et « P » pour pseudogène). Le dernier digit désigne le nombre de récepteurs avec cette structure. Lorsque deux ou trois récepteurs KIR ont une structure et des séquences très similaires, une lettre doit être ajoutée pour les distinguer, par exemple les récepteurs KIR2DL5A et KIR2DL5B (Gómez-Lozano et al., 2002). La nomenclature concernant les allèles KIR sera abordée au chapitre III.

Les récepteurs KIR2D sont subdivisés en deux groupes en fonction des domaines distaux membranaires de type *Ig-like* présents (**Figure 6**). Les récepteurs KIR2D de type I (KIR2DL1, KIR2DL2, KIR2DL3, KIR2DS1, KIR2DS2, KIR2DS3, KIR2DS4 et KIR2DS5) sont composés des domaines extracellulaires D1 et D2. Les récepteurs KIR de type II (KIR2DL4, KIR2DL5) sont dépourvus de domaine D1 et sont composés des domaines extracellulaires D0 et D2. Les récepteurs KIR3D ont 3 domaines *Ig-like* extracellulaires (D0, D1 et D2). Les domaines D1 et D2 des récepteurs KIR2D de type I sont similaires aux domaines D1 et D2 des récepteurs KIR3D. La fonction inhibitrice ou activatrice de ces récepteurs KIR peut être prédite à partir de la longueur du domaine cytoplasmique. Les récepteurs KIR possédant une courte queue intracytoplasmique sont activateurs (S), et possèdent un résidu d'acide aminé positivement chargé dans la région transmembranaire, leur permettant de

s'associer à la molécule DAP12 possédant des motifs ITAMs (Immunoreceptor Tyrosine-based Activation Motif). Ces ITAMs sont capables de générer un signal d'activation à la cellule NK par phosphorylation des tyrosines, ce qui favorise le recrutement des tyrosines kinases Syk et ZAP-70 (Lanier et al., 1998a), (Vilches and Parham, 2002). Par contre, les récepteurs KIR ayant une longue queue intracytoplasmique sont inhibiteurs (L) et présentent deux motifs ITIMs (Immunoreceptor Tyrosine-based Inhibitory Motif) capables de transmettre un signal d'inhibition à la cellule NK, à l'exception du KIR2DL4. En effet, le récepteur KIR2DL4 possède un motif ITIM N-terminal et une arginine positivement chargée dans la région transmembranaire capable de s'associer à la molécule FcεRIγ possédant des motifs ITAMs pour exercer une activité activatrice via le recrutement des tyrosines kinases Syk et ZAP-70 (Rajagopalan et al., 2001), (Kikuchi-Maki et al., 2005). Les récepteurs KIR sont constitués de 306 à 456 résidus d'acides aminés. Le peptide « leader », de la plupart des récepteurs KIR est constitué de 21 résidus d'acides aminés. Cependant, la présence d'un codon d'initiation de la transcription différent génère un peptide leader plus long pour les récepteurs KIR2DL4 (Selvakumar et al., 1996). Le domaine D0 présent dans les récepteurs KIR3D et KIR2D de type II est constitué approximativement de 96 résidus d'acides aminés. Le domaine D1 des récepteurs KIR3D et KIR2D de type I est composé de 102 résidus d'acides aminés, tandis que le domaine D2 de tous les récepteurs KIR est constitué de 98 résidus d'acides aminés. La région transmembranaire de la plupart des récepteurs KIR a 20 résidus d'acide aminé, mais plus court d'un résidu pour les récepteurs KIR2DL1/2 à cause d'une délétion de trois paires de bases au niveau de l'exon 7 (Colonna and Samaridis, 1995) (Wagtmann et al., 1995). Enfin, la région cytoplasmique des récepteurs KIR présente des variations de longueur allant de 23 résidus d'acide aminés pour le récepteur KIR3DS1 à 96 résidus d'acides aminés pour le récepteur KIR3DL2 (Colonna and Samaridis, 1995) (Long et al., 1997) (Selvakumar et al., 1997). Ces récepteurs KIR et leurs gènes correspondants sont importants en greffes de CSH et dans

l'immunité antivirale. Ces aspects seront présentés dans le chapitre III et dans la partie 6 « **Cellules NK et Immunité antivirale** ». Ces récepteurs KIR reconnaissent certaines molécules HLA de classe I exprimées sur les cellules nucléées de l'organisme (Lanier, 2005).



**Figure 6 : Structure des récepteurs KIR et leurs ligands HLA de classe I**

Ces récepteurs KIR ont deux ou trois domaines extracellulaires (KIR2D ou 3D), un domaine transmembranaire et une queue intracytoplasmique. La longueur de la queue intracytoplasmique détermine la fonction activatrice (courte, *short*, KIR2DS ou 3DS) ou inhibitrice (longue, *long*, KIR2DL ou 3DL) du récepteur. Les récepteurs KIR inhibiteurs portent un ou deux motifs ITIM responsables du signal inhibiteur. Par contre, les récepteurs KIR activateurs ont un résidu d'acide d'aminé positivement chargé capable de s'associer avec la molécule adaptatrice DAP12 possédant un motif ITAM responsable de la transmission du signal activateur. Par ailleurs, le récepteur KIR2DL4 s'associe avec la molécule Fc $\zeta$ RI $\gamma$  pour la transmission du signal activateur. Les spécificités des récepteurs KIR2DL5, KIR3DL3, KIR2DS2, KIR2DS3 et KIR2DS5 restent à déterminer.

### **3.1.2. Ligands des récepteurs KIR**

Les récepteurs KIR ont pour ligands les molécules HLA de classe I (Ciccone et al., 1992), (Colonna et al., 1993), (Cella et al., 1994), (Mandelboim et al., 1996). Ainsi, toutes les molécules HLA-Cw représentent les ligands de certains récepteurs. Les molécules HLA-Cw du groupe C2 possédant une Asparagine en position 77 et une Lysine en position 80, sont reconnues par les récepteurs KIR2DL1 (Fan et al., 2001) et KIR2DS1 (Chewning et al., 2007), (Venstrom et al., 2012). Par contre, les molécules HLA-Cw du groupe C1 ayant une Sérine en position 77 et une Asparagine en position 80 dans la séquence de leur chaîne lourde, sont reconnues par les récepteurs KIR2DL2/3 et leur homologue activateur KIR2DS2 (Boyington et al., 2000), (Rajagopalan and Long, 2005). Il a été montré que le récepteur KIR2DS2 peut aussi reconnaître la molécule codée par l'allèle HLA-A\*11:01 (Liu et al., 2014). Contrairement au récepteur KIR2DL3, le récepteur KIR2DL2 interagit fortement avec les molécules HLA-C du groupe C1. En effet, cette forte avidité du récepteur KIR2DL2 avec les molécules du groupe C1 comparativement au récepteur KIR2DL3 est due à la substitution d'une arginine par une cystéine en position 148. De plus, les récepteurs KIR2DL2 et KIR2DL3 peuvent reconnaître certaines molécules du groupe C2 codées par les allèles HLA-C\*05:01 et C\*02:02 (Moesta et al., 2008). En 2013, nous avons montré que les récepteurs KIR2DL2 et KIR2DL3 reconnaissent fortement la molécule HLA-Cw4 codée par l'allèle HLA-C\*04:01 (David et al., 2013). Ainsi, l'avidité du récepteur KIR2DL3 pour les ligands HLA-C1 varie selon le produit d'allèle HLA-C reconnu (Gendzekhadze et al., 2009) et elle peut être modulée par la nature du peptide présenté (Boyington et al., 2001). Par ailleurs, les molécules HLA-A et HLA-B portant l'épitope Bw4 sont reconnues par le récepteur KIR3DL1 (Litwin et al., 1994), (Gumperz et al., 1995), (Foley et al., 2008). Les molécules HLA-A3 et HLA-A11 sont reconnues par le récepteur KIR3DL2 (Pende et al., 1996). Le récepteur KIR2DS4 reconnaît différentes molécules HLA-Cw du groupe C1 et C2 et HLA-A11 (Graef et al., 2009). Les ligands des récepteurs KIR2DS3



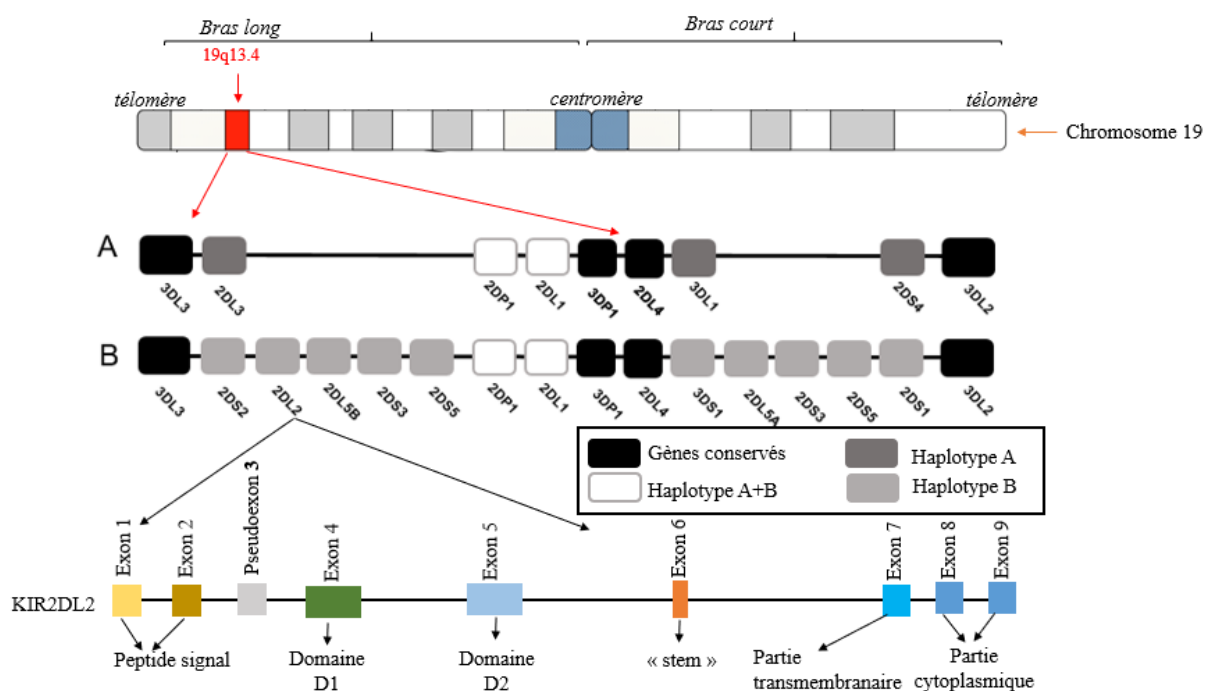
et KIR2DS5 ne sont pas encore connus. Par ailleurs, les molécules HLA de classe I non classiques telles que HLA-E, HLA-F et HLA-G sont reconnues respectivement par le complexe inhibiteur CD94/NKG2A (Braud et al., 1998), le récepteur activateur KIR3DS1 (Garcia-Beltran et al., 2016) et le récepteur KIR2DL4 (Rajagopalan and Long, 1999). L'interaction de la molécule HLA-G avec le récepteur KIR2DL4 contribue à la protection du fœtus de la lyse par les cellules NK utérines (Rouas-Freiss et al., 1997). De plus, la molécule HLA-G peut être aussi reconnue par le récepteur inhibiteur LILRB1 (ILT2) exprimé sur les cellules NK. Cette reconnaissance induit d'une part, la surexpression de l'ILT2 sur les cellules NK, lymphocytes T, cellules présentatrices d'antigènes (LeMaoult et al., 2005), et d'autre part une tolérance immunitaire contre le fœtus en inhibant la cytotoxicité des cellules NK contre les trophoblastes (Ponte et al., 1999). Cette reconnaissance des molécules HLA de classe I par les récepteurs KIR intervient dans l'éducation des cellules NK que nous décrivons dans la **partie 3** de ce chapitre II. Les ligands HLA des récepteurs KIR sont présentés dans la **Figure 6**.

### **3.1.3. Les gènes KIR**

Au niveau génétique, les récepteurs KIR sont codés par une famille de 15 gènes KIR fonctionnels (*KIR2DL1*, *KIR2DL2*, *KIR2DL3*, *KIR2DL4*, *KIR2DL5A*, *KIR2DL5B*, *KIR2DS1*, *KIR2DS2*, *KIR2DS3*, *KIR2DS4*, *KIR2DS5*, *KIR3DL1*, *KIR3DL2*, *KIR3DL3* et *KIR3DS1*) et 2 *pseudogènes* (*KIR2DP1* et *KIR3DP1*) localisés sur le bras long du chromosome 19 (q13.4) (Valiante et al., 1997), (Martin et al., 2000). La région contenant ces gènes KIR est divisée en segments centromériques et télomériques. Chaque segment est séparé par le pseudogène *KIR3DP1* et par le gène *KIR2DL4*. Le gène *KIR3DL3* est toujours le premier gène du segment centromérique, en revanche le gène *KIR3DL2* est le dernier gène du segment télomérique. Ces 4 gènes sont dits conservés car présents chez tous les individus (Middleton and Gonzelez, 2010). Le segment centromérique contient les gènes *KIR2DL1*, *-2DL2*, *-2DL3*, *-2DL5B*, -

2DS2, -2DS3, -2DP1 et -3DP1. Le segment télomérique contient les gènes KIR2DL4, -2DL5A, -2DS1, -2DS3, -2DS4, -3DL1, -3DL2 et -3DS1 (Vendelbosch et al., 2014). Ces gènes KIR sont organisés en deux haplotypes désignés A et B (Uhrberg et al., 1997). L'haplotype A contient 7 gènes KIR : KIR3DL3, -2DL3, -2DL1, -2DL4, -3DL1, -2DS4 et -3DL2. Par contre, les haplotypes B contiennent plus de gènes KIR et sont caractérisés par la présence d'un ou de plusieurs gènes KIR activateurs (Martin et al., 2004). Ces deux haplotypes KIR sont transmis suivant les lois de Mendel, ce qui permet d'avoir des individus de génotypes KIR AA, AB et BB. Le contenu en gènes KIR va donc varier selon les individus, ce qui permet de définir actuellement 605 génotypes KIR différents à travers le monde (Gonzalez-Galarza et al., 2018). La taille génomique des gènes KIR varie de 4 kb à 16kb et ils peuvent contenir jusqu'à 9 exons (<https://www.ebi.ac.uk/ipd/kir/introduction.html>) (**Figure 7**). Le gène le plus court est le pseudogène KIR3DP1 dont la taille peut atteindre 5 kb en fonction des allèles (Abraham et al., 2018). Cette taille est due au fait que ce pseudogène ne possède pas les exons 6 à 9. Cependant, les autres exons (1, 3, 4 et 5) du pseudogène KIR3DP1 partagent une forte homologie de séquences avec les séquences des gènes KIR3D. Le gène KIR3DL2 est par ailleurs le gène KIR le plus long dont la taille génomique peut atteindre 16 kb. La taille génomique des gènes KIR restants est comprise entre 10 à 14 kb. Cette variabilité de taille est due au fait que les gènes KIR n'ont pas tous le même nombre d'exons et que l'exon 9 de certains gènes KIR n'a pas la même taille (Colonna and Samaridis, 1995), (Döhning et al., 1996), (Torkar et al., 1998). Les gènes KIR présentent entre eux une homologie de séquences de près de 90% (Traherne et al., 2010). Chaque gène KIR est séparé de l'autre par une région dite « intergénique » (Vendelbosch et al., 2014). Ainsi, les amorces KIR utilisées dans notre projet dans l'article N°1 pour cibler ces gènes sont localisées dans ces régions intergéniques (Vendelbosch et al., 2013), ce qui permet de cibler tout le gène KIR en entier, de la région 5'-UTR jusqu'à la région 3'-UTR. Des variations du nombre de copies de gènes sont également décrits. Certains individus peuvent

contenir plus de deux copies d'un gène KIR, plus précisément les gènes KIR3DL1/S1 et KIR2DL1 (Vendelbosch et al., 2013). Cette variation du nombre de copies peut être une source de diversité fonctionnelle des cellules NK à travers les individus. En effet, Pelak et al ont montré que les cellules NK de donneurs sains HLA-B d'épitope Bw4-80I possédant plus de 2 copies du gène KIR3DL1/S1, inhibaient fortement la réplication du VIH-1 *in vitro* (Pelak et al., 2011). Khakoo et al. ont montré, un effet protecteur contre l'infection au virus de l'hépatite C pour les donneurs ayant deux copies du gène KIR2DL3 comparés aux donneurs homozygotes pour le gène KIR2DL2 ou hétérozygotes KIR2DL2/3. (Khakoo et al., 2004). De plus, on observe une fréquence élevée des gènes activateurs KIR2DS1 et KIR3DS1 chez les patients ayant éliminés spontanément le virus de l'hépatite B, comparé aux sujets non infectés (Zhi-ming et al., 2007). Le polymorphisme allélique des gènes KIR, sujet principal de ce travail de thèse sera abordé dans la partie III.



**Figure 7 : Organisation des gènes KIR, haplotype et structure exons-introns**

Les gènes KIR sont localisés sur le bras long du chromosome 19 humain (19q14.3). Ils sont organisés en 2 haplotypes (A et B) comme illustrés ici. L'haplotype A possède 9 gènes KIR dont 3 gènes KIR qui lui sont spécifiques (KIR2DL3, KIR2DS4 et KIR3DL1). Par contre, les haplotypes B peuvent posséder plusieurs gènes KIR activateurs et inhibiteurs. Les gènes KIR2DS2, KIR2DL2, KIR2DL5B, KIR2DS3, KIR3DS1, KIR2DL5A et KIR2DS1 sont spécifiques des haplotypes B. Les gènes conservés et les pseudogènes sont représentés en noir. Les exons 1 et 2 du récepteur KIR2DL2 codent le peptide signal. Les domaines D1 et D2 sont respectivement codés par les exons 4 et 5. L'exon 6 code la partie « stem » et l'exon 7 code la partie transmembranaire. Les exons 8 et 9 codent la partie intracytoplasmique.

### **3.2. Les récepteurs de la famille des *Immunoglobulin-like transcript (ILT)* ou *Leukocyte Immunoglobulin-like Receptor (LILR)***

Les récepteurs ILTs sont une famille de récepteurs inhibiteurs (LILRB) et activateurs (LILRA), faisant partie de la superfamille des immunoglobulines, exprimées à la surface des cellules NK, T, B et de certaines cellules myéloïdes (Colonna et al., 1999). Ces récepteurs sont également appelés MIR pour « Monocyte-macrophage Inhibitory Receptor » ou LIR pour « Leukocyte Inhibitory Receptor » ou CD85. L'acronyme LILR pour « Leukocyte immunoglobulin-like receptor » est actuellement utilisé pour désigner tous les récepteurs de cette famille. A l'heure actuelle, on dénombre 6 récepteurs LILR activateurs (LILRA1, 2, 3, 4, 5, 6) et 5 récepteurs LILR inhibiteurs (LILRB 1, 2, 3, 4 et 5). Les récepteurs LILR activateurs (LILRA) présentent entre 2 à 4 domaines extracellulaires Ig-like, une partie transmembranaire et un court domaine cytoplasmique qui se lie au domaine ITAM de la chaîne gamma du récepteur Fc des immunoglobulines (Tedla et al., 2011). L'interaction des récepteurs LILR activateurs à leurs ligands entraîne la phosphorylation des tyrosines présentes au niveau du domaine ITAM. Cette phosphorylation favorise le recrutement de certaines protéines tyrosines kinases, telles que ZAP-70 ou Src pour permettre la transmission du signal activateur (Gergely et al., 1999). Les récepteurs LILR activateurs ont été associés à certaines pathologies. Par exemple, le récepteur LILRA1 reconnaît la molécule HLA-B27 qui est fortement associée aux spondyloarthrites (Allen et al., 2001). L'expression du récepteur LILRA2 est élevée dans les lésions des patients lepromateux, ce qui suggère le rôle pathologique de ce récepteur dans la lèpre (Bleharski et al., 2003).

Par ailleurs, les récepteurs LILR inhibiteurs (LILRB) présentent entre 2 à 4 domaines extracellulaires Ig-like, une partie transmembranaire et une longue queue cytoplasmique composés de 2 à 4 motifs ITIMs qui sont déphosphorylés par les phosphatases inhibitrices (p56<sup>lck</sup>, SHP-1). Parmi les 11 récepteurs LILR, seuls les récepteurs LILRB1 (ILT2), LILRB5

(CD85C) et LILRA2 sont exprimés à la surface des cellules NK (Colonna et al., 1997) (Borges et al., 1997) (Tedla et al., 2008) (Lu et al., 2012). Les autres récepteurs LILR sont exprimés sur d'autres cellules du système immunitaire, telles que les cellules dendritiques, les monocytes et les macrophages (Fanger et al., 1998). Plusieurs ligands du récepteur inhibiteur LILRB1 ont été identifiés, à savoir : les molécules HLA de classe I classiques (HLA-A, HLA-B et HLA-C) et non classiques (HLA-G, HLA-E et HLA-F), (Willcox et al., 2003), (Allan et al., 2002), (Shiroishi et al., 2003). De plus, le récepteur LILRB1 est aussi capable d'interagir avec la protéine UL18 du cytomégalovirus (CMV), homologue des molécules HLA de classe I, qui fixe la  $\beta$ 2 microglobuline (Borges et al., 1997). On observe également une corrélation positive entre la surexpression du récepteur inhibiteur LILRB1 au niveau des cellules NK et l'infection au CMV après une transplantation des poumons. Ceci implique que la surexpression du récepteur LILRB1 peut constituer un biomarqueur pronostique pour l'infection au CMV chez les patients ayant reçu une greffe de poumons (Berg et al., 2003). Le récepteur LILRB1 ainsi que son ligand HLA-E peuvent également être surexprimés au niveau des cellules tumorales. Par conséquent, l'interaction de ce récepteur LILRB1 à son ligand peut favoriser l'inhibition des réponses immunes NK antitumorales. Ainsi, le blockage du récepteur LILRB1 (ILT2) restaure la lyse des cellules leucémiques (LAM et LAL) par les cellules NK (Godal et al., 2010).

A l'heure actuelle, les ligands des récepteurs LILRB5 et LILRA2 ne sont pas encore connus (Hirayasu and Arase, 2015). D'un point de vue génétique, ces récepteurs LILR activateurs et inhibiteurs sont codés par des gènes localisés dans la région LRC (Leukocyte Region Complex) sur le chromosome 19q13.4 (Hirayasu and Arase, 2015).

### **3.3. Les récepteurs de la famille des lectines**

#### **3.3.1. Les hétérodimères CD94/NKG2**

Chez l'homme, les récepteurs CD94/NKG2 sont des glycoprotéines de surface de la superfamille des lectines de type C, exprimées principalement sur les cellules NK et sur les lymphocytes T CD8. Comme décrit auparavant pour les ILT, on distingue également dans cette famille des récepteurs CD94/NKG2 inhibiteurs (A, B) et activateurs (C, E, H). Plusieurs récepteurs NKG2 sont connus à ce jour, tels que les récepteurs NKG2A, NKG2B, NKG2C, NKG2E et NKG2H dont les gènes codants ces molécules sont localisés sur le chromosome 12 (Aramburu et al., 1990). Les complexes CD94/NKG2A, CD94/NKG2B et CD94/NKG2C reconnaissent la molécule HLA classe I non classique, HLA-E (Braud et al., 1998), (Borrego et al., 1998), (Lee et al., 1998). L'expression de cette molécule HLA-E peut être augmentée par la protéine gpUL40 du CMV pour inhiber la lyse des cellules infectées par les cellules NK (Tomasec et al., 2000). La reconnaissance de la molécule HLA-E par le complexe inhibiteur CD94/NKG2A joue un rôle dans l'éducation des cellules NK CD94/ NKG2A<sup>+</sup> (Horowitz et al., 2016). Les récepteurs NKG2 sont exprimés, pour la plupart, à la surface des cellules NK sous forme d'hétérodimères associés à la chaîne CD94 en formant un pont disulfide (Lazetic et al., 1996), (Brooks et al., 1997). Chaque sous unité est composée, d'un domaine extracellulaire lectine de type C, des segments transmembranaire et cytoplasmique (Borrego et al., 2006). Le domaine extracellulaire des récepteurs NKG2A, C et E présente une homologie de séquences de plus de 94% et une homologie de séquences de 54% dans les domaines transmembranaire et intra-cytoplasmique respectivement (Borrego et al., 2002). Les récepteurs NKG2A et B, issus d'un épissage alternatif du même gène, ont deux motifs ITIMs dans leur région cytoplasmique formant ainsi des récepteurs inhibiteurs après liaison avec la chaîne CD94 (Brooks et al., 1997) (Bellón et al., 1999). Par contre, les récepteurs NKG2E et NKG2H issus d'un épissage alternatif du même gène possèdent un résidu positivement chargé dans le domaine transmembranaire. Ce

résidu permet aux récepteurs NKG2E, 2H et 2C de s'associer au motif ITAM de la protéine DAP12, pour transmettre le signal d'activation à la cellule NK (Bellón et al., 1999) (Lanier et al., 1998b). Dans l'infection à CMV, on observe une expansion de cellules NK exprimant le récepteur activateur NKG2C (Malmberg et al., 2012).

### **2.3.2. Le récepteur NKG2D**

Chez l'homme, le récepteur activateur NKG2D est une protéine membranaire de la famille des lectines de type II, codé par le gène *KLRK1* non polymorphe localisé dans le complexe NKC (Natural Killer Complex) sur le chromosome 12p12.3-p13.2 (Raulet, 2003), (Houchins et al., 1991), (Carapito et al., 2017). Ce récepteur est exprimé sur toutes les cellules NK humaines, sur certaines sous-populations de lymphocytes T et des cellules NKT et sur les macrophages activés (Raulet, 2003). Le récepteur NKG2D est un homodimère et fonctionne comme un récepteur activateur grâce à son interaction avec la molécule adaptatrice de signalisation DAP10, contenant un motif YINM. Ce motif est capable de recruter la sous unité P85 de la kinase phosphatidylinositol 3 et la protéine Grb2 qui s'associe avec Vav1 pour initier l'activation des cellules NK après interaction avec son ligand (Wensveen et al., 2018). Plusieurs ligands du NKG2D ont été identifiés chez l'homme et chez la souris (Raulet, 2003) (Champsaur and Lanier, 2010) (Eagle and Trowsdale, 2007). Chez l'homme, les ligands du NKG2D incluent six protéines ULBPs (UL16 binding protein) ou protéines RAET1 (Retinoic Acid Early Transcripts-1), et les molécules HLA classe I like MICA/B (Raulet et al., 2013). Contrairement aux molécules HLA de classe I classiques, les molécules MICA/B présentent un polymorphisme allélique limité. À l'heure actuelle, on dénombre 107 allèles MICA et 45 allèles MICB codants respectivement pour 82 et 29 différentes molécules (Abraham et al., 2018). Le polymorphisme allélique des molécules MICA peut être classé en deux groupes par rapport à l'acide aminé en position 129 (Méthionine ou Valine). Ce dimorphisme MICA-129 affecte

l'affinité du récepteur NKG2D à son ligand MICA. En effet, le récepteur NKG2D a une forte affinité pour les molécules MICA contenant une méthionine à la position 129 (exemple : MICA\*001, \*002, \*007 et \*017) par rapport aux protéines MICA ayant une valine (exemple : MICA\*004, \*006, \*008, \*009 et \*010) à cette position (Isernhagen et al., 2015). L'interaction prolongée du récepteur activateur NKG2D avec le ligand raet-1 chez la souris, conduit à une altération des capacités cytotoxiques des cellules NK (Oppenheim et al., 2005). Dans certaines infections virales, telles que l'infection au VIH-1, l'expression des molécules MICA, ULBP1, ULBP2, HLA-A et HLA-B peut être inhibée par la protéine Nef-1 entraînant ainsi une inhibition de la cytotoxicité, médiée par les cellules NK (Carboni et al., 2007). De plus, l'expression des molécules MICA/B, peut être inhibée par la protéine U21 de l'herpesvirus humain de type 7, pouvant favoriser l'inhibition de la cytotoxicité des cellules NK (Schneider and Hudson, 2011). Par ailleurs, l'expression des ligands du récepteur NKG2D peut être induite, sur certaines cellules tumorales favorisant ainsi la cytotoxicité médiée par les cellules NK (Park et al., 2011).

### 3.3.2. Le récepteur NKp80

Le récepteur NKp80 est une protéine membranaire de 80 kDa appartenant à la famille des lectines de type C (Vitale et al., 2001). Ce récepteur activateur est exprimé sur toutes les cellules NK humaines activées ou au repos et sur certaines sous-populations de lymphocytes T (Vitale et al., 2001). Le récepteur NKp80 est aussi présent sur les lymphocytes T cytotoxiques des primates, mais absent chez les rongeurs (Biassoni et al., 2005) (Mavilio et al., 2005). Chez l'homme, ce récepteur est codé par le gène *KLRF1* (Killer cell lectin like receptor F1) situé dans le complexe NKC (Natural Killer gene Complex) sur le chromosome 12p12-p13 (Vogler and Steinle, 2011). Contrairement aux autres récepteurs NK activateurs, le récepteur NKp80 ne s'associe pas avec des protéines adaptatrices, mais utilise un motif « *hemi-ITAM* ». Ce motif



contient une tyrosine dans son domaine cytoplasmique capable de recruter la kinase Syk pour initier le signal d'activation (Dennehy et al., 2011), après interaction avec son ligand AICL (Activation-Induced C-type Lectin) exprimé sur les cellules NK activées ou sur les cellules myéloïdes et dendritiques (Hamann et al., 1997), (Klimosch et al., 2013). Ce récepteur est également utilisé, comme marqueur de maturation fonctionnelle *ex-vivo* des cellules NK humaines, dans le modèle de développement des cellules NK dans les organes lymphoïdes secondaires (Freud et al., 2016). Le gène *CLEC2B* codant le ligand AICL est localisé sur le chromosome 12 dans le complexe NKC à 7 kb du gène *KLRF1* codant pour le récepteur NKp80 (Vogler and Steinle, 2011).

### **3.3.3. Le récepteur CD161**

Le récepteur CD161 est une protéine appartenant à la famille des lectines de type C. Il est exprimé sur les lymphocytes T ( $\gamma\delta$  et  $\alpha\beta$ ), les cellules NKT et précocement pendant la maturation des cellules NK (Bennett et al., 1996), (Maggi et al., 2010). Son expression corrèle avec la fonction cytotoxique des cellules NK CD16<sup>+</sup> (Konjević et al., 2009). Plusieurs études, ont montré une modulation de l'expression de ce récepteur sur les cellules NK au cours des infections virales. Par exemple, l'infection au virus de l'hépatite C (VHC) est associée à une faible fréquence des cellules NK CD161<sup>+</sup> (Cosgrove et al., 2014). L'infection chronique au virus de l'immunodéficience humaine (VIH) entraîne une déplétion des cellules NK CD161<sup>+</sup> (Alter et al., 2004a) (Luteijn et al., 2011). Ce récepteur a pour ligand, LLT1 (Lectin Like Transcript-1) exprimé à la surface des lymphocytes B, des monocytes, au niveau du cerveau, du placenta et au niveau des testicules (Aldemir et al., 2005), (Llibre et al., 2016). L'interaction du récepteur CD161 à son ligand LLT1 conduit à une inhibition de l'activité cytolytique des cellules NK et de la production de l'IFN- $\gamma$  (Aldemir et al., 2005). De plus, la reconnaissance de

LLT1 par le récepteur CD161 exprimé sur les lymphocytes T CD8 inhibe la production de TNF $\alpha$  (Germain et al., 2011).

### **3.4. Les récepteurs de cytotoxicité naturelle (NCRs)**

La famille des récepteurs de cytotoxicité naturelle (NCR) est composée de trois récepteurs activateurs : NKp30, NKp44 et NKp46. Ces récepteurs furent parmi les premiers récepteurs activateurs à être découverts sur les cellules NK dans les années 90 (Sivori et al., 1997). Bien que structurellement non apparentés, ces récepteurs furent collectivement définis comme NCR pour leur capacité à activer fortement l'activité cytolytique des cellules NK (Moretta et al., 2001). Ces NCRs sont exprimés sur les cellules NK et sur certaines sous populations d'ILCs (Hudspeth et al., 2013). Dans les paragraphes suivants, nous décrirons plus précisément ces trois récepteurs activateurs.

#### **3.4.1. Le récepteur NKp46**

Le récepteur NKp46 encore appelé NCR1 fut le premier NCR à être identifié en 1997 chez l'homme (Sivori et al., 1997). Il est exprimé sur les cellules NK humaines activées ou au repos (Sivori et al., 1997) (Moretta et al., 2006). Ce récepteur activateur est capable de reconnaître certaines hémagglutinines virales (Mandelboim et al., 2001) et des protéoglycanes à héparane sulfate associés à la membrane (HSPGs), pouvant être surexprimés sur les cellules tumorales (Arnon et al., 2004), (Bloushtain et al., 2004). Le récepteur NKp46 est une glycoprotéine composée de 2 domaines extracellulaires de type C2, d'un domaine transmembranaire contenant une arginine positivement chargée et d'une région cytoplasmique comprenant 25 acides aminés. La portion cytoplasmique de cette protéine est dépourvue de motifs ITAMs mais peut s'associer aux protéines adaptatrices CD3 $\zeta$  et FcRI $\gamma$ , contenant des motifs ITAMs, grâce à l'arginine chargée de la partie transmembranaire pour activer la cascade

de signalisation cellulaire (Moretta et al., 2001). La structure de cette protéine est très proche du récepteur ILT2 (LILRB1), des récepteurs KIR, de la glycoprotéine VI et du fragment Fc $\alpha$ RI (Joyce and Sun, 2011). Le gène NKp46 codant cette protéine de 46 kDa, est localisé sur le bras long du chromosome 19 (19q13.42) dans la région LRC contenant les gènes KIR. Ce gène NKp46 n'est pas polymorphe comme les gènes KIR. Cependant, 5 isoformes de ce gène ont été décrits à savoir : NKp46a, NKp46b, NKp46c, NKp46d et le NKp46e (Shemesh et al., 2017). Les isoformes NKp46a, NKp46b et NKp46c ont 2 domaines extracellulaires (D1 et D2). Par contre, les isoformes NKp46d et NKp46e n'ont pas de domaine D1 mais possèdent uniquement un domaine extracellulaire D2. Contrairement aux isoformes des récepteurs NKp30 et NKp44, les isoformes de NKp46 peuvent être partiellement classifiés selon le niveau d'expression de la protéine à la surface cellulaire en utilisant les anticorps spécifiques des domaines D1 et D2. L'expression du NKp46 peut donc varier à la surface des cellules NK. Ce niveau d'expression corrèle avec l'ampleur de la cytotoxicité naturelle des cellules NK (Sivori et al., 1999) et pourrait permettre une meilleure éradication tumorale tout en minimisant les réactions néfastes comme la maladie du greffon contre l'hôte (GVHD) après greffe de CSHs (Ghadially et al., 2014).

### **3.4.2. Le récepteur NKp44**

Parmi les récepteurs de la famille NCR, le récepteur NKp44 ou NCR2 est l'unique récepteur activateur dont l'expression à la surface nécessite une stimulation des cellules NK du sang périphérique (Vitale et al., 1998), (Baychelier et al., 2013), (Mattiola et al., 2015). Le récepteur NKp44 représente donc le premier marqueur spécifique des cellules NK humaines activées. Dans ce contexte, la culture des cellules NK humaines en présence de l'IL-2 permet d'activer les cellules NK et d'augmenter leurs capacités cytolytiques contre différentes cibles (Ferrini et al., 1987) (Rosenberg and Lotze, 1986), suggérant une induction de l'expression du récepteur NKp44 sur ces cellules NK. Ce récepteur reconnaît le PCNA (Proliferating Cell

Nuclear Antigen) surexprimé sur les cellules cancéreuses (Rosental et al., 2011). La surexpression de PCNA sur les cellules cancéreuses inhibe les fonctions cytotoxiques des cellules NK après interaction avec le récepteur NKp44 (Rosental et al., 2011). De plus, le récepteur NKp44 peut reconnaître une isoforme de la protéine MLL5 (Mixed Lineage Leukemia-5), aussi connue comme la lysine méthyltransférase 2<sup>E</sup> (Baychelier et al., 2013). Ce ligand représente une forme tronquée de la protéine MLL5 contenant une séquence C-terminale permettant sa localisation à la surface cellulaire et son interaction avec le récepteur NKp44. L'expression de ce ligand est induite sur les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> par un peptide dérivé de la glycoprotéine gp41 du VIH chez les individus infectés par ce virus (Vieillard et al., 2005). Ce récepteur est aussi impliqué dans la reconnaissance de certaines bactéries (Esin et al., 2008), (Esin et al., 2013) et des hémagglutinines du virus influenza (Arnon et al., 2001). L'activation des cellules NK est possible via le recrutement des protéines adaptatrices DAP12 contenant des motifs d'activation ITAMs.

Le gène codant ce récepteur NKp44 de 44 kDa est localisé au sein de la région HLA de classe III sur le chromosome 6 (6p21.1). Il code pour 3 isoformes protéiques à savoir NKp44-1, NKp44-2 et le NKp44-3. Ces 3 isoformes sont composés d'un seul domaine extracellulaire de type V capable d'interagir avec son ligand, petit domaine de 64 acides aminés de long, d'un domaine transmembranaire contenant une lysine et d'un domaine cytoplasmique. Contrairement à l'isoforme NKp44-1 contenant un motif ITIM dans sa région cytoplasmique, les isoformes NKp44-2 et NKp44-3 ne présentent pas de motif ITIM à cause de la présence d'un codon stop précoce au niveau de l'exon 6 des isoformes codants ces 2 protéines (Shemesh et al., 2017). Il n'existe pas d'anticorps permettant de discriminer les 3 isoformes du NKp44. Néanmoins, leur détection est possible au niveau de l'ARNm (Shemesh et al., 2017).

### 3.4.3. Le récepteur NKp30

Chez l'homme, le NKp30 encore appelé NCR3 est une protéine membranaire de 30kDa exprimée à la surface des cellules NK matures (Pende et al., 1999). Cette protéine est composée d'un domaine extracellulaire et d'un domaine transmembranaire contenant une arginine chargée capable de fixer les molécules adaptatrices CD3 $\zeta$  et FcRI $\gamma$  pour médier l'activation des cellules NK (Kruse et al., 2014). Ce récepteur NKp30 peut reconnaître le domaine DBL-1 $\alpha$  de la protéine PfEMP-1 (*P. falciparum* erythrocyte membrane protein-1) du *plasmodium falciparum* (Mavoungou et al., 2007) et la protéine pp65 du cytomégalovirus humain (Arnon et al., 2005). L'interaction du récepteur NKp30 avec le pp65 entraîne une inhibition des cellules NK par dissociation de la chaîne CD3 $\zeta$  du récepteur NKp30 (Arnon et al., 2005). De plus, le récepteur NKp30 peut interagir avec les protéines B7H6 et BAT3 (HLA-B associated transcript-3) exprimées sur les cellules tumorales, entraînant une activation des cellules NK dépendante du récepteur NKp30 (Pogge von Strandmann et al., 2007), (Brandt et al., 2009).

D'un point de vue génétique, ce récepteur est codé par le gène NKp30 localisé au sein de la région HLA de classe III sur le chromosome 6 (6p21.1). A l'heure actuelle, il existe 6 isoformes de NKp30 à savoir : NKp30a, NKp30b, NKp30c, NKp30d, NKp30e et NKp30f. Les isoformes NKp30a, NKp30b et NKp30c sont connus pour être les plus fréquents. Ils codent les molécules ayant un domaine V extracellulaire et les trois autres isoformes (NKp30d, NKp30e et NKp30f) codent pour les molécules ayant un domaine extracellulaire de type C (Neville and Campbell, 1999). Ces différents isoformes NKp30 ne peuvent être détectés qu'au niveau de l'ARNm à cause du manque d'anticorps spécifiques. Les isoformes NKp30a et NKp30b entraînent l'activation des cellules NK qui est médiée par l'association avec la molécule adaptatrice CD3 $\zeta$ . Par ailleurs, l'isoforme NKp30c interagit faiblement avec la molécule CD3 $\zeta$  conduisant à l'activation de la kinase MAP p38 et donc à l'immunosuppression par sécrétion de l'IL-10 par les cellules NK (Delahaye et al., 2011). Cela suggère que les isoformes NKp30a

et NKp30b sont immunostimulateurs et que l'isoforme NKp30c est immunosuppresseur. Récemment, il a été montré que le niveau d'expression des isoformes de NKp30 au niveau des cellules mononucléées sanguines périphériques des patients atteints de tumeurs stromales gastro-intestinales est un biomarqueur prédictif de la survie de ces patients (Rusakiewicz et al., 2017).

### **3.5. Autres récepteurs**

#### **3.5.1. Le récepteur 2B4**

Le récepteur 2B4, encore appelé CD244, et son ligand CD48 sont les membres de la famille CD2, codés par des gènes localisés sur les chromosomes 1 humain et murin (Brown et al., 1998), (Lanier, 2005). Ce récepteur est exprimé sur les cellules NK, les lymphocytes T CD8<sup>+</sup>, les lymphocytes T  $\gamma\delta$  et sur les cellules myéloïdes (Nakajima and Colonna, 2000). Il présente deux domaines extracellulaires de type V/C2 et une longue queue cytoplasmique contenant des motifs ITSM (Immunoreceptor Tyrosine-based Switch Motif) ressemblant à des motifs ITIMs (Nakajima and Colonna, 2000), capables de recruter les protéines LAT et SAP pour initier l'activation des cellules NK matures (McNerney et al., 2005). Le récepteur 2B4 peut être un activateur ou inhibiteur selon le stade de différenciation des cellules NK à partir des précurseurs hématopoïétiques CD34<sup>+</sup>Lin<sup>-</sup>. En effet, ce récepteur est inhibiteur au cours des premiers stades de différenciation des cellules NK, puis devient activateur sur les cellules NK matures (Sivori et al., 2002).

#### **3.5.2. Le récepteur CD16 ou FC $\gamma$ RIII**

Le récepteur CD16 est un récepteur de faible affinité pour le fragment Fc des immunoglobulines. Ce récepteur existe sous deux isoformes : le récepteur CD16A exprimé essentiellement sur toutes les cellules NK CD56<sup>dim</sup> du sang périphérique et le récepteur CD16B

présent sur les neutrophiles. La reconnaissance des fragments Fc des anticorps IgG par le récepteur CD16A, conduit à l'activation des cellules NK et à la lyse de la cellule cible par le mécanisme de cytotoxicité cellulaire dépendante des anticorps (ADCC) (Romee et al., 2013) qui sera brièvement décrit dans la partie Immunothérapies NK .

### **3.5.3. Le récepteur DNAM-1 (DNAX accessory molecule-1)**

Le récepteur DNAM-1, aussi connu sous le nom de CD226 est une protéine appartenant à la superfamille des immunoglobulines, codée par le gène CD266 localisé sur le chromosome 18. Cette molécule exprimée constitutivement sur les cellules NK, lymphocytes T ( $\alpha\beta$  et  $\gamma\delta$ ) et les macrophages, fut découverte en 1996 comme une molécule d'adhésion facilitant les fonctions cytotoxiques des lymphocytes T et NK (Shibuya et al., 1996). Les ligands de DNAM-1 sont les molécules CD155 (NECL5 ou PVR) et CD112 (Nectin-2) exprimés sur les cellules infectées par un virus et sur les cellules tumorales (Bottino et al., 2003), (Pende et al., 2005). L'interaction de DNAM-1 exprimé sur les cellules NK avec ses ligands augmente la lyse des cellules cibles par les cellules NK. De plus, la molécule DNAM-1 est impliquée dans la surveillance et l'élimination de certaines tumeurs solides, telles que le sarcome d'Ewing (Cho et al., 2010). Enfin, le DNAM-1 partage les mêmes ligands avec le récepteur inhibiteur TIGIT décrit ci-après.

### **3.5.4. Le récepteur TIGIT**

TIGIT pour « *T cell immunoglobulin and ITIM domain* » est un récepteur inhibiteur découvert en 2009 (Yu et al., 2009), capable d'interagir avec les molécules CD155 (PVR ou NECL5) et CD112 (Nectin-2) comme le DNAM-1 (Bottino et al., 2003), (Pende et al., 2005). Ce récepteur TIGIT est exprimé sur les cellules NK et sur certaines sous populations des lymphocytes T (T Reg et cellules mémoires). Ce récepteur présente un domaine

immunoglobuline variable de type V, un domaine transmembranaire et un domaine cytoplasmique contenant un motif ITIM capable de recruter la phosphatase SHIP (Src homology-2 domain-containing inositol polyphosphate 5-phosphatase) pour inhiber la cytotoxicité des cellules NK (Liu et al., 2013). Le niveau d'expression de ce récepteur varie à la surface des cellules NK selon les individus : soit faible, moyen ou fort (Wang et al., 2015). Les cellules NK ayant une faible expression de TIGIT produisent plus d'IFN- $\gamma$ , ont une forte activité de dégranulation et un fort potentiel cytotoxique par rapport à celles exprimant fortement TIGIT (Wang et al., 2015). Son ligand CD155 est fortement exprimé sur les cellules dendritiques, fibroblastes, cellules endothéliales et sur certaines cellules tumorales (Sakisaka and Takai, 2004) (Fuchs and Colonna, 2006). Le récepteur TIGIT peut aussi reconnaître la protéine Fap2 de la bactérie *Fusobacterium nucleatum* présente dans le microenvironnement tumoral, ce qui entraîne l'inhibition de la lyse des cellules tumorales par les cellules NK (Gur et al., 2015). Par ailleurs, l'interaction de ce récepteur avec la molécule CD155 contribue dans l'éducation des cellules NK qui sera présenté ci-après dans la partie « Education des cellules NK humaines ».

#### **4. Éducation des cellules NK humaines**

L'éducation des cellules NK est un processus permettant aux cellules NK d'acquérir des capacités fonctionnelles et une tolérance au soi. Ce phénomène est médié par des interactions entre les récepteurs inhibiteurs des cellules NK avec leurs ligands qui peuvent être, soit des molécules HLA de classe I classiques ou non classiques ou soit des molécules indépendantes du CMH (He and Tian, 2017). Le processus d'éducation des cellules NK est régulé par des signaux inhibiteurs, activateurs et d'adhésion (**Figure 8**). De nos jours, plusieurs théories et concepts sont proposés pour expliquer le phénomène d'éducation des cellules NK.



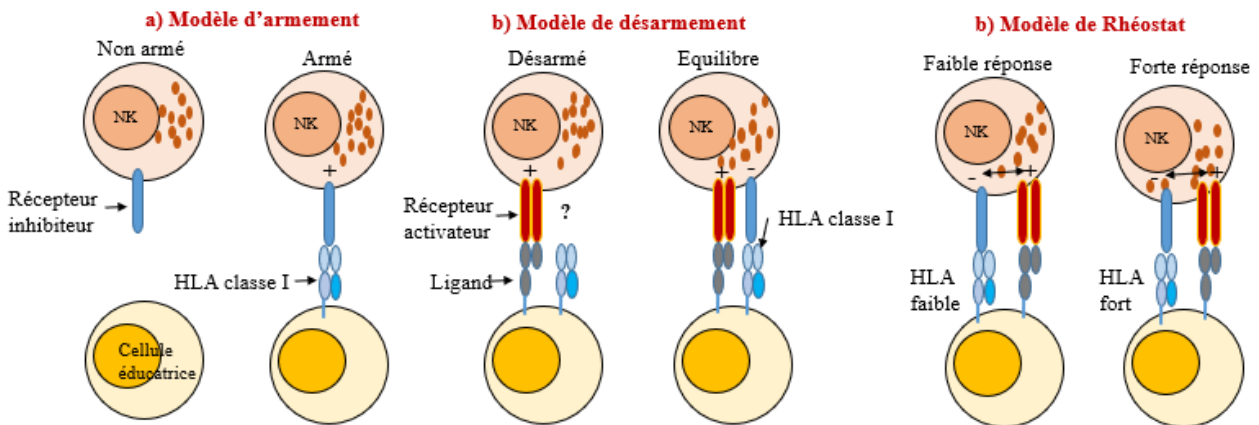
L'une des théories proposée pour expliquer le phénomène d'éducation des cellules NK par les molécules HLA de classe I, est la théorie de « *Licensing* » introduite pour la première fois par Yokoyama chez la souris en 2005 (Kim et al., 2005). Cette théorie stipule que les cellules NK, doivent interagir avec les molécules du CMH de classe I au cours de leur développement pour devenir fonctionnelles et que l'absence d'interaction génère des cellules NK hyporéactives (Kim et al., 2005), (Krueger et al., 2011). Cette théorie a donné lieu aux modèles d'armement, de désarmement et de rhéostat. L'hypothèse d'armement propose que la capacité de tuer des cellules NK ou de réagir à certains stimuli est conférée par le récepteur des cellules NK spécifique des molécules HLA de classe I (Elliott and Yokoyama, 2011). Chez l'homme, ce modèle est également supporté par plusieurs travaux dont ceux d'Anfossi et de Nash qui montraient que les récepteurs KIR inhibiteurs présents à la surface des cellules NK doivent interagir avec les molécules HLA de classe I du soi, pour acquérir les capacités fonctionnelles et devenir réactives (Anfossi et al., 2006) (Nash et al., 2014). L'hétérodimère CD94/NKG2A, un autre récepteur inhibiteur communément étudié, reconnaît la molécule HLA-E et semble jouer un rôle important dans l'éducation des cellules NK et la tolérance au soi (Braud et al., 1998). Il a été montré que les récepteurs KIR spécifiques des molécules HLA de classe I, ne sont pas capables d'éduquer les cellules NK dans le fœtus humain. Cependant, le récepteur NKG2A peut éduquer les cellules NK fœtales aussi bien que les cellules NK du sang périphérique (Ivarsson et al., 2013).

L'hypothèse de désarmement stipule qu'en absence d'un signal inhibiteur, les cellules NK restent activées et deviennent hyporéactives ou « désarmées ». En réalité, l'activation des cellules NK est régulée par une balance entre les récepteurs inhibiteurs et activateurs. En général, l'interaction des récepteurs activateurs avec leurs ligands HLA classe I permet aux cellules NK de s'activer pour éliminer les cellules infectées ou transformées. Cependant, il a été montré que l'engagement prolongé du récepteur NKG2D *in vivo* à son ligand

Rae-1 affecte la cytotoxicité des cellules NK les rendant ainsi tolérantes (Oppenheim et al., 2005). En plus, l'expression transgénique du ligand Rae-1 chez la souris entraîne une diminution de l'expression du récepteur NKG2D conduisant ainsi à une altération fonctionnelle des cellules NK médiée par le récepteur NKG2D (Oppenheim et al., 2005). Des études supplémentaires réalisées chez des souris transgéniques démontrent clairement l'effet négatif de l'engagement prolongé des récepteurs activateurs des cellules NK (Tripathy et al., 2008). Enfin, Fauriat et al. ont montré que l'engagement continu du récepteur activateur KIR2DS1 aux molécules HLA-Cw d'épitope C2 est associée à une diminution de la réponse des cellules NK en absence d'expression d'un récepteur KIR inhibiteur ou du complexe inhibiteur CD94/NKG2A (Fauriat et al., 2010a).

Le troisième modèle pour expliquer le mécanisme d'éducation est le modèle de Rhéostat. Ce modèle stipule que les réponses des cellules NK varient selon le nombre de récepteurs inhibiteurs et que ce phénomène n'est pas un phénomène qui peut être « Allumé » ou « Eteint » mais un phénomène réglable (Walzer, 2010), (Brodin et al., 2009a). Des études menées chez la souris ont montré que les cellules NK exprimant plusieurs récepteurs NKG2A et Ly49 répondent mieux au stimuli que ceux ayant juste un seul ou pas de récepteur inhibiteur dépendant des molécules HLA de classe I (Joncker et al., 2009) (Brodin et al., 2009b). D'autres études sur des souris déficientes en molécules CMH ont montré que les réponses effectrices des cellules NK augmentent avec le nombre de récepteurs inhibiteurs (Held, 2012) (Brodin et al., 2009b) (Johansson et al., 2005). En lien avec les études menées chez la souris, les cellules NK humaines ayant plusieurs copies de certains gènes KIR ont des compétences fonctionnelles beaucoup plus élevées par rapport à celles ayant un seul récepteur inhibiteur (Beziat et al., 2013), ce qui suggère que la réponse des cellules NK varie selon la contribution des signaux inhibiteurs (Brodin et al., 2009a).

Les molécules indépendantes du CMH, telles que la molécule CD155 reconnue par le récepteur inhibiteur TIGIT, contribuent aussi dans l'éducation des cellules NK. En effet, il a été montré que les cellules NK, exprimant le récepteur inhibiteur TIGIT chez des souris déficientes en CD155 sont hyporéactives comparées aux cellules NK des souris ayant le CD155 (He et al., 2017). Récemment, une nouvelle étude a donné naissance au modèle de confinement stipulant que le confinement des récepteurs associés aux molécules d'adhésion et au cytosquelette au niveau de la membrane cellulaire est indispensable dans l'éducation des cellules NK. Ce confinement induit l'éducation des cellules NK pour un contact cellulaire efficace et une activation séquentielle des cellules NK (He and Tian, 2017).



**Figure 8 : Principaux modèles proposés sur l'éducation des cellules NK**

a) Modèle d'armement : l'interaction d'un récepteur inhibiteur avec la molécule HLA de classe I permet aux cellules NK d'acquiescer des capacités fonctionnelles. b) Modèle de désarmement : l'interaction prolongée d'un récepteur activateur avec son ligand en l'absence d'un signal inhibiteur, les cellules NK deviennent désarmées ou anergiques. c) Modèle de rhéostat : l'acquisition des capacités des cellules NK dépend de la force du signal inhibiteur (*Inspiré de Höglund and Brodin 2010*).

## 5. Fonctions des cellules NK

Les fonctions des cellules NK sont médiées par les récepteurs inhibiteurs exprimés à leur surface qui, dans les conditions normales, inhibent les signaux fournis par l'engagement des récepteurs activateurs. Cette inhibition médiée par les récepteurs inhibiteurs s'oppose à l'activation des cellules NK, empêchant ainsi la lyse des cellules saines par les cellules NK (Watzl and Long, 2010). Chez l'homme, elle est principalement médiée par les récepteurs KIR

inhibiteurs reconnaissant spécifiquement les molécules HLA de classe I exprimées sur les cellules saines de l'organisme (Lanier, 2005). Les principaux récepteurs inhibiteurs, reconnaissant les molécules HLA de classe I classiques et non classiques sont : les récepteurs KIR et le complexe CD94/NKG2A (Golden-Mason and Rosen, 2013). Cependant dans les contextes infectieux ou tumoraux, la balance favorisant les signaux activateurs (Vidal et al., 2011) conduit à une activation des cellules NK via les motifs ITAMs. La majorité de ces récepteurs activateurs, fonctionnent comme des co-récepteurs nécessitant un deuxième signal fourni par la perte du signal d'inhibition, d'une stimulation par les cytokines ou par un second récepteur activateur (Bryceson et al., 2009) (Horng et al., 2007). L'activation de ces cellules NK peut conduire à l'élimination de la cellule cible par lyse spontanée. Aussi, la production des IgG neutralisants par les plasmocytes peut conduire à l'ADCC via le récepteur CD16A (FC $\gamma$ RIII) spécifique du fragment Fc des IgG. Les principales fonctions des cellules NK après activation vont donc être : la production des cytokines et chimiokines, la prolifération et la cytotoxicité.

### **5.1. Production de cytokines et chimiokines**

Les cellules NK ne sont pas seulement de simples cellules cytotoxiques mais sont aussi des cellules capables de produire après activation, des cytokines immunorégulatrices l'IFN $\gamma$ , IL-5, IL-10, IL-13, les cytokines pro-inflammatoires comme le TNF ( $\alpha$  et  $\beta$ ), IL-3 et le facteur de croissance GM-CSF (Cooper et al., 2001) (Cuturi, 1989) (Warren et al., 1995). Ces cytokines sont principalement produites pour la plupart d'entre elles, par la sous-population cellulaire NK CD56<sup>bright</sup> (Ferlazzo et al., 2004a). La sécrétion de ces cytokines peut être aussi induite par certaines cytokines stimulatrices, telles que : IL-2, IL-12 et IL-15 (Cuturi, 1989) (Trinchieri et al., 1984). En plus de la production des cytokines, ces cellules NK sécrètent fortement les chimiokines MCP-1 (CCL2), MIP-1 $\alpha$  (CCL3), MIP-1 $\beta$  (CCL4), RANTES

(CCL5), IL-8 (CXCL8) et de l'IP-10 (CXCL10) capables d'induire la chimiotaxie des leucocytes et d'autres types cellulaires (Mariani et al., 2001). Ces chimiokines sont détectables 1 h après stimulation des cellules NK et leur concentration peut rester stable pendant plusieurs heures (Fauriat et al., 2010b).

### **5.2. Prolifération**

Après production des cytokines, les cellules NK sont capables de proliférer et d'acquérir des propriétés associées à l'immunité adaptative. La pré-activation des cellules NK avec les cytokines IL-12, IL-15 et l'IL-18 génère une forte amplification et un prolongement des réponses cellulaires NK antitumorales (Pahl et al., 2018). L'IL-15 produite principalement par les cellules dendritiques, intervient aussi dans la survie des cellules NK et dans la production de l'IFN- $\gamma$  (Ferlazzo et al., 2004b). Des expériences *ex vivo* montrent, qu'en présence d'IL-15 et de la tyrosine kinase FLT3, la cytokine IL-21 est capable d'induire une forte prolifération des cellules NK humaines (Li et al., 2015a). Cependant, l'IL-21 altère la viabilité et la cytotoxicité des cellules NK amplifiées (Li et al., 2015a). La cytokine IL-2 est indispensable pour la survie des cellules NK. Elle permet aussi d'amplifier les cellules NK après culture des Cellules mononuclées du sang périphérique (PBMC) avec des cellules stimulatrices irradiées comme la lignée cellulaire K562 (Huang et al., 2008).

### **5.3. La cytotoxicité**

Comme décrit plus haut, les cellules saines de l'organisme expriment les molécules HLA de classe I capables d'interagir avec les récepteurs KIR ou CD94/NKG2A pour assurer une protection contre la lyse par les cellules NK. Cependant, dans certaines situations (tumeurs, infections virales, leucémies), on peut observer une perte ou un défaut d'expression des molécules HLA de classe I à la surface des cellules (*missing-self*) (Ljunggren and Kärre, 1990). Cette perte ou diminution d'expression des molécules HLA sur les cellules cibles entraîne une

perte de signal d'inhibition par les récepteurs KIRs ou CD94/NKG2A, favorisant ainsi l'activation des cellules NK et la lyse spontanée. De plus, on peut observer une induction des protéines de stress sur les cellules cibles qui seront reconnues par des récepteurs activateurs exprimés sur les cellules NK pour déclencher la cytotoxicité des cellules NK (Bottino et al., 2014).

Les cellules NK peuvent détruire les cellules cibles recouvertes d'anticorps par le mécanisme de cytotoxicité dépendante de l'anticorps (ADCC), qui peut être modulé *in vivo* par les récepteurs inhibiteurs Fc (Clynes et al., 2000). Brièvement, les cellules NK expriment le récepteur CD16 (FcγRIIIA) de faible affinité capable d'interagir avec le fragment Fc des IgG recouvertes sur les cellules cibles. Cette interaction favorise l'association du récepteur CD16 avec des protéines adaptatrices FcεRIγ ou CD3ζ, ce qui peut conduire à l'activation des cellules NK et à la libération de granules cytotoxiques pour détruire la cellule cible (Lanier et al., 1989b), (Lanier et al., 1991), (Vivier et al., 2008). Les granules cytotoxiques libérées contiennent principalement de la perforine et des sérines protéases (les granzymes) (Lieberman, 2003). La perforine est une protéine monomérique de 67kDa, découverte dans les années 80 (Dourmashkin et al., 1980) (Henkart et al., 1984), capable d'oligomériser en présence du calcium et à pH neutre, au niveau de la membrane cellulaire pour former des pores (Young et al., 1986). Elle est présente dans la plupart des cellules NK, les cellules NKT, les lymphocytes T  $\gamma\delta$  et  $\alpha\beta$  CD8<sup>+</sup>. Le rôle de cette protéine dans la cytotoxicité fut mis en évidence chez des souris génétiquement déficientes en perforine où les chercheurs observaient une altération de la protection contre les virus et les tumeurs (Trapani and Smyth, 2002). En effet, en se fixant à la membrane de la cellule cible, cette perforine forme des pores transmembranaires pour permettre la diffusion des granzymes dans le cytoplasme de la cellule cible. Les granzymes initient par la suite l'apoptose, et la cellule NK se détache de la cellule mourante (Voskoboinik et al., 2015). Ces granzymes sont un groupe de sérines protéases présentes dans les granules

sécrétoires et composées de 5 membres chez l'homme (A, B, H, K et M) et 11 membres chez la souris (A, B, C, D, E, F, G, K, L, M et N) (Anthony et al., 2010). Ces granzymes sont constitutivement synthétisées et stockées dans les cellules NK, les cellules NKT et dans les lymphocytes T  $\gamma\delta$  (Garcia-Sanz et al., 1990). Elles sont libérées lors de l'exocytose de granules lytiques. Chez l'homme, les granzymes les plus étudiées sont : granzymes A et B. La granzyme B est la granzyme pro-apoptotique la plus puissante à cause de sa capacité à cliver les protéines des cellules cibles au niveau de résidus aspartate (Mignon et al., 1998). La granzyme B est capable d'activer rapidement et efficacement la mort de la cellule cible par apoptose (Voskoboinik et al., 2015). Par contre, la granzyme A clive les protéines au niveau de résidus d'acides aminés basiques et active une mort cellulaire plus lente (Voskoboinik et al., 2015). Ces granules lytiques contiennent également du CD107a (LAMP-1), une protéine fortement glycosylée représentant approximativement 50% des protéines associées à la membrane des lysosomes. La protéine LAMP-1 joue un rôle important dans le trafic de la perforine et dans la cytotoxicité des cellules NK (Krzewski et al., 2013). En effet, cette protéine est fortement exprimée sur les cellules NK après activation, et son expression est fortement corrélée avec la sécrétion des cytokines et la cytotoxicité des cellules NK (Alter et al., 2004b).

La lyse des cellules cibles par les cellules NK peut aussi se faire par des mécanismes non dépendants de la dégranulation, tels que par engagement des ligands des récepteurs de mort cellulaire appartenant à la superfamille du TNF (FasL, TRAIL, TNFRI, ...etc) (Kumar et al., 2013). L'interaction de ces ligands avec leurs différents récepteurs présents sur les cellules tumorales conduira à l'apoptose des cellules tumorales via les caspases (Carotta, 2016), (Yamada et al., 2017). En somme, parmi les deux populations de cellules NK retrouvées en périphérie, cette capacité cytotoxique va être médiée majoritairement par les cellules NK  $CD56^{dim}$ .

## **6. Cellules NK et grossesse**

Les cellules NK sont les cellules du système immunitaire les plus nombreuses dans la muqueuse utérine pendant la formation du placenta (King et al., 1996), (Moffett-King, 2002). Ces cellules NK utérines sont aussi présentes dans l'endomètre des femmes non enceintes. L'origine de ces cellules NK utérines est toujours débattue, mais elles semblent proliférer et se différencier dans l'utérus probablement à partir d'un progéniteur précoce provenant du sang (Chantakru et al., 2002), (Male et al., 2010). Après ovulation, ces cellules NK utérines prolifèrent vigoureusement pour atteindre au moins 30% du stroma endométrial et décline en nombre après le deuxième trimestre de grossesse (Moffett et al., 2004). Ces cellules NK utérines contribuent au maintien de la grossesse par l'interaction des récepteurs inhibiteurs KIR2DL4, ILT2 avec la molécule HLA-G, et CD94/NKG2A avec la molécule HLA-E exprimée sur les trophoblastes (Rajagopalan and Long, 1999), (Navarro et al., 1999), (King et al., 2000a). De plus, les trophoblastes expriment les molécules HLA-Cw du groupe C1 et C2 pouvant être reconnues par les récepteurs inhibiteurs KIR2DL1 et KIR2DL2/3 des cellules NK utérines (King et al., 2000b). Plusieurs études ont suggéré qu'un répertoire NK KIR<sup>+</sup> limité prédispose aux fausses couches et à la prééclampsie. Le rôle des récepteurs KIR dans le maintien de la grossesse fut démontré pour la première fois par Chao et al. en 1999. Ils ont observé une diminution des proportions des cellules NK utérines KIR2DL1/S1 (EB6<sup>+</sup>) et KIR2DL2/3/S2 (GL183<sup>+</sup>) chez les femmes ayant une grossesse non embryonnaire (*anembryonic pregnancy*) comparées aux femmes présentant une grossesse normale (Chao et al., 1999). Ces résultats furent confirmés dans d'autres études où ils ont montré un pourcentage élevé de femmes ayant présenté une fausse couche spontanée, avec un répertoire NK KIR limité (Varla-Leftherioti et al., 2003). De plus, des études génétiques ont montré que les mères de génotype KIR AA n'ayant pas le gène KIR activateur KIR2DS1 lorsque le fœtus est HLA-C2, ont un risque élevé de prééclampsie (Hiby et al., 2004), (Flores et al., 2007), (Hiby et al., 2010). En effet, la



présence du récepteur KIR2DS1 spécifique des molécules HLA-Cw d'épitope C2 chez des mères de génotypes KIR B<sup>+</sup> améliore la placentation via la production de GM-CSF par les cellules NK utérines activées (Xiong et al., 2013).

## **7. Cellules NK et immunité antivirale**

Le rôle des cellules NK dans la défense de l'organisme contre les infections virales fut mis en évidence pour la première fois par Christine Biron en 1989, chez des adolescents déficients en cellules NK et souffrants d'infections sévères d'herpèsvirus (Biron et al., 1989). Leur intérêt fut démontré par la suite dans d'autres infections virales. Dans cette partie 7, nous décrirons le rôle des cellules NK dans les infections à cytomégalovirus, au virus de l'hépatite C et au virus de l'immunodéficience humaine.

### **7.1. Cellules NK et cytomégalovirus (CMV)**

Le cytomégalovirus humain est un virus de la famille des *herpesvirus-β* responsable d'infections pouvant persister tout au long de la vie (Ho, 1990). Chez les sujets immunocompétents, l'infection à CMV est souvent asymptomatique, mais sa réactivation devient une cause de morbidité importante chez les patients immunodéficients (Della Chiesa et al., 2013). Chez les porteurs sains, l'infection à CMV est contrôlée par les cellules NK et par les lymphocytes T (La Rosa and Diamond, 2012). Pour échapper aux cellules NK, le CMV a mis en place plusieurs mécanismes d'évasions. Par exemple, les cellules infectées par le CMV expriment la protéine UL18 du CMV qui fixe la β2 microglobuline des molécules HLA de classe I pour favoriser son interaction avec le récepteur inhibiteur ILT2 (Beck and Barrell, 1988). De plus, le peptide signal de la protéine gpUL40 du CMV se lie à la molécule HLA-E et permet le maintien du HLA-E à la surface des cellules infectées par le CMV qui sera reconnue par le complexe inhibiteur CD94/NKG2A exprimé sur les cellules NK (Tomasec et al., 2000). Les protéines UL142 et UL16 du CMV retiennent respectivement les molécules MICA et

MICB dans le cytoplasme des cellules infectées par le CMV, limitant l'activation des cellules NK par le récepteur activateur NKG2D (Chalupny et al., 2006), (Sutherland et al., 2001). Enfin, la protéine pp65 du CMV peut interagir avec le récepteur activateur NKp30 pour inhiber l'activation des cellules NK (Arnon et al., 2005). Des études ont montré une expansion des cellules NK exprimant le récepteur activateur NKG2C chez les individus infectés par le CMV mais non pas chez les individus non infectés (Gumá et al., 2004) (Guma, 2006), (Lopez-Vergès et al., 2011). Ces résultats ont également été obtenus, en greffes de cellules souches hématopoïétiques où les chercheurs observaient une maturation rapide des cellules NK associée à une expansion des cellules NK NKG2C<sup>+</sup>, chez des patients ayant une réactivation CMV (Della Chiesa et al., 2012) (Foley et al., 2012) (Béziat et al., 2013). De plus au laboratoire, nous avons montré que le récepteur inhibiteur KIR2DL3 est préférentiellement co-exprimé avec ces cellules NK NKG2C<sup>+</sup> amplifiées, ce qui confirme le rôle des cellules NK exprimant les récepteurs KIR2DL1 et KIR2DL3 dans le contrôle de l'infection au CMV (Djaoud et al., 2013). Certaines études génétiques montrent, une faible incidence de la réactivation du CMV après greffe de CSH issue des donneurs possédant les gènes activateurs KIR2DS2 et KIR2DS4. Par contre, aucune association n'a été observé pour les gènes inhibiteurs KIR2DL1/2/3/5 et KIR3DL1 (Zaia et al., 2009).

## **7.2. Cellules NK et virus de l'hépatite C (VHC)**

Le virus de l'hépatite C est un petit virus à ARN enveloppé appartenant à la famille des *Flaviviridae* (Chevaliez and Pawlotsky, 2012). L'infection au VHC entraîne une infection aigüe et chronique. Après l'infection aigüe, environ 70 à 80% des patients infectés développent l'infection chronique avec un risque de progression de la maladie vers la fibrose et le cancer du foie (Hoofnagle, 2002). La fréquence de cellules NK CD56<sup>bright</sup> est fortement élevée chez des patients chroniquement infectés comparés à ceux ayant éliminés le virus (Golden-Mason et al.,

2008). De plus, dans le cadre de l'infection chronique aux virus des hépatites C et B, on observe une fréquence élevée des cellules NK dans le foie par rapport au sang périphérique (Bonorino et al., 2009). Des études ont montré les effets bénéfiques de certaines combinaisons génétiques KIR/HLA dans la résolution de l'infection au VHC (Khakoo et al., 2004), (Romero et al., 2008), (Knapp et al., 2010). En effet, Khakoo et al. ont montré que l'interaction KIR2DL3/HLA-C1 est associée à une forte clairance du VHC chez les individus KIR2DL3 homozygotes d'environnement HLA-C1C1 (Khakoo et al., 2004). L'interaction du récepteur inhibiteur KIR2DL3 avec la molécule HLA-Cw3 est associée à une résolution spontanée du VHC (Knapp et al., 2010). Cependant, les associations KIR2DL2/HLA-C1 et KIR2DS2/HLA-C1 confèrent le risque de progression de l'infection chronique vers le cancer du foie chez les individus jeunes (Saito et al., 2018). D'autres études génétiques ont également observé, un effet protecteur du gène activateur KIR3DS1 en combinaison avec la molécule HLA-B d'épitope Bw4 80I contre la progression de l'infection chronique à l'HCV vers l'hépatocarcinome (López-Vázquez et al., 2005). Récemment, il a été montré que l'interaction du récepteur KIR3DS1 avec son ligand HLA-F surexprimé sur les cellules infectées par le VHC favorise le contrôle de la réplication du VHC par les cellules NK (Lunemann et al., 2018).

### **7.3. Cellules NK et Virus de l'Immunodéficience Humaine (VIH)**

Dans le cas de l'infection au VIH, plusieurs études supportent le rôle des cellules NK dans la protection contre le VIH et ou dans le contrôle de cette infection. En effet, certaines combinaisons génétiques KIR/HLA sont associées à une diminution de la progression de l'infection au VIH et à une protection contre l'infection par ce virus (Martin et al., 2002) (Martin et al., 2007) (Boulet et al., 2008a) (Boulet et al., 2008b). Par exemple, les combinaisons génétiques KIR3DS1/HLA-Bw4 80Ile homozygotes d'une part et KIR3DL1\*004/HLA-Bw4 80Ile homozygotes d'autre part chez les individus infectés par le VIH sont associées à une

diminution de la charge virale et de la progression de l'infection (Martin et al., 2002), (Martin et al., 2007). Une diminution de la charge virale est observée chez les patients chroniquement infectés par le VIH ayant soit les combinaisons KIR2DL2/S2 et HLA-C\*12:02 ou KIR2DL2/S2 et HLA-C\*14 :02 (Lin et al., 2016). Cette capacité des cellules NK exprimant les récepteurs KIR2DL2/S2 à inhiber fortement la réplication du VIH par rapport aux cellules NK KIR2DL2/S2<sup>-</sup> est confirmée *in vitro* à partir des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> infectés des donneurs HLA-C\*12 :02 homozygotes.

## **8. Immunothérapies NK**

Plusieurs stratégies d'immunothérapies des cellules NK ont été évaluées dans le but de stimuler l'activité des cellules NK pour détruire par exemple les cellules tumorales. Dans les paragraphes suivants, nous allons présenter les principales approches thérapeutiques évaluées.

### **8.1. Approches thérapeutiques antitumorales**

Les cellules NK jouent un rôle important dans l'immunosurveillance tumorale. Plusieurs études ont concentré leurs efforts sur les immunothérapies antitumorales à base de cellules NK. Les approches utilisées impliquent l'utilisation des cytokines pour stimuler les cellules NK, d'anticorps pour améliorer l'efficacité de l'ADCC et du transfert adoptif des cellules NK *ex vivo*.

#### **8.1.1. Les cellules NK et cytokines**

A l'heure actuelle, plusieurs cytokines sont connues pour avoir la capacité de promouvoir la prolifération des cellules NK et d'accroître leurs fonctions cytotoxiques, à savoir les interleukines IL-2, IL-15, IL-12, IL-18 et IL-21.

La cytokine IL-2 est produite par les lymphocytes T CD4<sup>+</sup>, T CD8<sup>+</sup>, T  $\gamma\delta$ , NK, NKT et par les cellules dendritiques activées (Granucci et al., 2001). Le récepteur de cette cytokine est

composé de trois sous unités à savoir IL-2R $\alpha$  (CD25), IL-2R $\beta$  (CD122) et IL-2R $\gamma$  (CD132). Cette cytokine avait été utilisée en clinique, seule ou combinée avec des cellules LAK (Lymphokine-activated killer cells), pour accroître la capacité cytolytique des cellules NK (Floros and Tarhini, 2015). Cependant, les résultats cliniques attendus étaient limités du fait que l'IL-2 pouvait aussi activer les lymphocytes T régulateurs exprimant le récepteur de haute affinité (CD25) à l'IL2. D'autres études sur cette cytokine ont montré que l'utilisation de fortes doses d'IL-2 pouvait activer l'endothélium vasculaire entraînant ainsi des blessures d'organes (Davis et al., 2015) (Floros and Tarhini, 2015). À cause des effets indésirables néfastes de l'IL-2, une super-cytokine IL-2 (super-2) a été générée et testée dans un modèle murin dans le but d'augmenter la capacité des cellules NK et promouvoir l'effet cytotoxique des lymphocytes T CD8+ et non pas des lymphocytes T régulateurs (Levin et al., 2012). Cette super-cytokine IL-2, est une forme mutée de la cytokine naturelle IL-2 ayant une forte affinité pour la sous-unité IL-2R $\beta$  (CD122) du récepteur à l'IL-2 et, pouvant fonctionner indépendamment de la sous-unité IL-2R $\alpha$  (CD25). Comparée à la cytokine naturelle IL-2, la super-2 induisait une forte expansion des lymphocytes cytotoxiques entraînant *in vivo* des meilleures réponses antitumorales (Levin et al., 2012). La cytokine IL-2 est utilisée après un transfert adoptif des cellules NK pour maintenir la survie et la fonction des cellules NK (Sakamoto et al., 2015).

Contrairement à l'IL-2, l'interleukine IL-15 ne favorise pas l'expansion des lymphocytes T régulateurs (Pillet et al., 2011) mais intervient plutôt dans le développement, l'expansion et l'homéostasie des cellules NK (Pillet et al., 2011) (Carson et al., 1997). Les capacités fonctionnelles de l'IL-15 ont donc suscité de nombreux intérêts thérapeutiques. La première version clinique de l'IL-15, fût la molécule recombinante humaine de IL-15 (*rhIL-15*), évaluée chez des patients cancéreux qui montraient une forte sécrétion de cytokines inflammatoires (IFN- $\alpha$  et IL-6) et une altération dramatique de l'homéostasie des cellules NK sanguines et de certaines sous populations de lymphocytes T (Conlon et al., 2015). A cause de

ces effets indésirables, cette molécule fut ensuite utilisée associée à des cellules NK adoptives pour traiter les patients atteints de Leucémie Aigue Myéloïde (LAM). Les résultats cliniques montraient une forte expansion des cellules NK adoptives (Cooley et al., 2012). L'utilisation d'un hétérodimère à IL-15, qui est une protéine chimérique de fusion de l'IL-15 avec la sous unité  $\alpha$  du récepteur à l'IL15 (IL15R $\alpha$ ), améliorait la capacité des cellules NK à réprimer la tumeur (Thaysen-Andersen et al., 2016) (Wu and Xu, 2010). Récemment, le super agoniste ALT-803 est entré en essai clinique comme un agent immunostimulateur des cellules NK pour traiter les lymphomes (Rosario et al., 2016). Ce super agoniste est un complexe issu de l'association d'un mutant à l'IL-15 avec la protéine de fusion IL-15R $\alpha$ -Fc (Rosario et al., 2016).

La cytokine IL-12, une cytokine pro inflammatoire hétérodimérique composée des sous unités p35 et p40 est capable d'augmenter les fonctions effectrices des cellules NK (Kobayashi et al., 1989). L'utilisation de fortes doses d'IL-12 chez les patients cancéreux ont montré des effets immunomodulateurs de cette cytokine sur les cellules NK et sur d'autres lymphocytes (Gollob et al., 2000) (Robertson et al., 2002). Par ailleurs, les effets de faibles doses d'IL-12 sur la fonction des cellules NK n'ont pas encore été décrits. Enfin, les cytokines IL-18 et IL-21 sont indispensables dans la survie et la maturation des cellules NK (Logan and Robertson, 2006).

### **8.1.2. Cellules NK et anticorps**

A l'heure actuelle, il existe trois types de traitements d'anticorps utilisés pour stimuler les réponses cytotoxiques des cellules NK. Le premier type d'anticorps concerne les anticorps capables de cibler les antigènes associés aux tumeurs dans le but d'activer le mécanisme de cytotoxicité dépendante des anticorps. Ces anticorps monoclonaux activent la cytotoxicité des cellules NK via l'interaction avec le récepteur CD16. Le deuxième type d'anticorps est capable

de cibler les récepteurs des cellules NK en particulier les points de contrôle immunitaire. Enfin, les nouvelles molécules sont capables d'activer la cytotoxicité dépendante des anticorps en reconnaissant en même temps la molécule CD16 des cellules NK et certains épitopes tumoraux (Childs and Carlsten, 2015).

Le récepteur activateur CD16a, exprimé sur les cellules NK, reconnaît les cellules tumorales recouvertes d'anticorps IgG. A ce jour, plusieurs anticorps spécifiques des tumeurs ont été développés, à savoir l'anticorps anti-CD20 pour le traitement des lymphomes B, l'anticorps anti-Her2 pour le traitement des cancers invasifs du sein surexprimant l'antigène Her2 et l'anticorps anti-CD38 pour le traitement des myélomes multiples et des leucémies lymphocytaires chroniques (Childs and Carlsten, 2015) (Kellner et al., 2016) (Miller, 2013). Il a été montré que l'immunocytokine anti-CD20-IL2 améliorait le traitement *in vitro* des lymphomes B (Ochoa et al., 2017). L'utilisation en 2016 de l'anticorps humanisé anti-CD33 (BI836858) avec 2 substitutions dans le domaine CH2 du fragment Fc des IgG1, montrait *in vitro* une augmentation de l'ADCC contre les blastes des LAM comparée à l'anti-CD33 non modifié (Vasu et al., 2016). Les cytokines telles que les IL-18, IL-2, IL-12, IL-15 et IL-21 sont connues pour avoir la capacité d'augmenter l'ADCC médiée par les cellules NK (Floros and Tarhini, 2015). Ces différents anticorps sont potentiellement capables d'augmenter la cytotoxicité des cellules NK par rapport aux anticorps naturels, ce qui pourrait représenter une nouvelle génération de thérapies innovantes. L'utilisation des anticorps bloquant l'activité inhibitrice des récepteurs KIR des cellules NK, tels que les molécules IPH2101 et IPH2102, ont montré une forte activité lytique des cellules NK *in vitro* et *in vivo* dans un modèle de xélogreffe murin de Leucémie Aigue Myéloïde (Romagne et al., 2009) (Wagtmann et al., 2007). L'anticorps bloquant IPH2101 spécifique des récepteurs KIR2D inhibiteurs, fût le premier à être utilisé en essai clinique de phase I chez des patients atteints de Myélomes Multiples (MM) et montrait une meilleure tolérance (Benson et al., 2010a). Cependant, l'essai

clinique de phase II mené sur les patients atteints entre décembre 2010 et mai 2011, montrait une réponse minimale (Korde et al., 2014). L'infusion de cet anticorps IPH2101 entraînait une déplétion significative et une diminution de la fonctionnalité des cellules NK exprimant les récepteurs KIR2D (Korde et al., 2014). Ces effets indésirables non attendus, étaient probablement dû au fait que les patients avaient reçu de fortes doses d' IPH2101, pendant une longue période entraînant ainsi une perte d'expression des récepteurs KIR2D associée à une perte de fonction cellulaire NK (Korde et al., 2014). Par ailleurs, la combinaison de cet anticorps à un agent immunomodulateur (lenalidomide) dans un essai clinique de phase I semblait montrer des résultats encourageants (Benson et al., 2015). Les cellules tumorales ont la capacité de surexprimer la molécule HLA-E non classique pour échapper au contrôle du système immunitaire (Martinet and Smyth, 2015). Cette surexpression entraîne l'inhibition de la cellule NK via la reconnaissance du HLA-E par le complexe CD94/NKG2A. L'utilisation de l'anticorps humanisé humZ270 (IPH2201) contre le récepteur NKG2A démontrait une augmentation de la cytotoxicité des cellules NK contre la leucémie humaine primaire dans un modèle murin. Plusieurs investigations cliniques sont actuellement en cours pour tester la sécurité et l'efficacité de cette molécule (Ruggeri et al., 2016). Les cellules tumorales peuvent surexprimer la molécule PD-L1 reconnue, par le récepteur PD-1 présent sur les cellules NK (Keir et al., 2008). Il a été montré que l'expression de PD-1 est fortement élevée, sur les lymphocytes des patients atteints de tumeurs malignes (MacFarlane et al., 2014) (Wiesmayr et al., 2012). Le blocage *in vitro* de PD-1 sur les cellules NK ou du ligand PD-L1 sur les cellules tumorales des patients atteints de Myélome Multiple, augmente la lyse des cellules autologues tumorales (Benson et al., 2010b). Plusieurs études sont actuellement en cours pour identifier des nouvelles stratégies de ciblage des autres inhibiteurs de points de contrôle immun (TIGIT, Tim-3...etc.) pour traiter les Leucémies Aigues Myéloïdes (Beyar-Katz and Gill, 2018).



Les BiKEs (Bi-specific killer engagers) ou TriKEs (Tri-specific killer engagers) sont de nouvelles molécules d'anticorps issues de la fusion de 2 ou 3 fragments Fab ou Fc, spécifiques des antigènes associés aux tumeurs ou du récepteur de la cellule effectrice (Gleason et al., 2012). Par exemple, ces molécules ont l'avantage de reconnaître différents épitopes du récepteur CD16, entraînant ainsi une forte ADCC via les cellules NK contre les cellules tumorales (Gleason et al., 2012). Récemment, l'utilisation d'un NKG2D-Fc-ADCC a potentiellement augmenté la réactivité anti-leucémique des cellules NK (Steinbacher et al., 2015). Il a été montré que les BiKEs issus de la fusion du récepteur CD16 avec le récepteur CD19 sont capables de déclencher directement l'activation des cellules NK contre les cellules B exprimant le marqueur CD19 (Chen et al., 2016). La combinaison d'un BiKE CD16x CD33 avec un inhibiteur de la métalloprotéinase-17 (ADAM-17) améliore *in vitro* l'efficacité thérapeutique des cellules NK contre les LAM (Wiernik et al., 2013). A l'heure actuelle, plusieurs BiKEs et TriKEs sont en cours de développement et évaluation pour cibler certaines tumeurs malignes.

### **8.1.3. Le transfert adoptif des cellules NK**

A ce jour, plusieurs stratégies de transfert adoptif des cellules NK ont été testées pour traiter les patients atteints des tumeurs, à savoir : le transfert de lignées cellulaires NK, l'utilisation des cellules NK génétiquement modifiées et le transfert des cellules NK dérivées des PBMCs autologues ou allogéniques.

Comparées à l'expansion *ex vivo* des cellules NK dérivées des PBMCs, les lignées cellulaires NK sont faciles à amplifier et sont des outils puissants pour des modifications génétiques. Par exemple, la lignée cellulaire NK-92 présente une cytotoxicité élevée contre les cellules tumorales dans des études précliniques et est l'unique lignée cellulaire approuvée pour

être utilisée en clinique, bien que son efficacité reste minimale dans les essais cliniques (Suck et al., 2016) (Tonn et al., 2013). D'autres lignées cellulaires, telles que NKG et NKL, sont très similaires à la lignée NK-92. Ces lignées cellulaires ont été testées *in vitro* et montrent une cytotoxicité contre certaines tumeurs mais n'ont jamais été testées chez des patients (Davis et al., 2015) (Chabannon et al., 2016). Les limitations pour l'utilisation clinique des lignées cellulaires NK, sont la persistance *in vivo* et le manque d'expression du récepteur CD16 sur la plupart des lignées (Jochems et al., 2016). Toutefois, l'absence du récepteur CD16 sur ces lignées cellulaires NK peut être améliorée par une expression transgénique (Jochems et al., 2016). Bien que, la persistance *in vivo* de ces lignées peut être écourtée par irradiation avant infusion, cette procédure peut aussi entraîner une diminution de la fonction de ces cellules ou perturber leur expansion (Davis et al., 2015) (Davies et al., 2014).

La modification génétique est un outil puissant utilisé, pour augmenter l'efficacité des cellules NK pour des finalités thérapeutiques. Cependant, les cellules NK sont résistantes à l'infection par des rétrovirus ; l'utilisation de cette approche est donc limitée à cause de l'efficacité de délivrance du gène (Brandstadter and Yang, 2011). L'efficacité de transfection rétrovirale des cellules NK peut être augmentée, en inhibant les mécanismes de défense intracellulaire antivirale des cellules NK (Sutlu et al., 2012). Des études ont également montré que l'électroporation de l'ARNm au lieu de l'ADNc est une stratégie efficace pour modifier génétiquement les cellules NK (Van Tendeloo et al., 2001). Cette approche fut aussi utilisée, pour électroporer les cellules NK avec de l'ARNm codant, pour un récepteur chimérique d'antigène spécifique du récepteur CD19 (Shimasaki et al., 2012). Les résultats montrent, *in vitro* et dans un modèle de souris leucémique, une augmentation de la cytotoxicité de ces cellules NK modifiées contre les tumeurs malignes lymphocytaires B (Shimasaki et al., 2012). A cause de certaines limites des CAR au niveau des lymphocytes T, telles que le risque de développer la maladie du greffon contre l'hôte (GVHD) et la durée pour les générer (plusieurs

semaines), cette stratégie des CAR est en train d'être appliquée pour modifier les cellules NK (Carotta, 2016) (Oberoi and Wels, 2013), (Mehta and Rezvani, 2018). Les premières générations de CAR des cellules NK n'ont pas de domaine stimulateur mais ont plutôt une chaîne CD3 $\zeta$  comme domaine de signalisation. D'autres études ont conduit à l'ajout d'un ou de deux domaines costimulateurs pour augmenter la cytotoxicité des cellules NK (Carotta, 2016) (Pittari et al., 2015) (Klingemann, 2014). Enfin, dans la deuxième génération des CARs des cellules NK, un endodomaine conçu a été ajouté pour améliorer la cytotoxicité (par exemple : 4-1BB plus CD3 $\zeta$ ) (Rahman and Iyer, 2015). Les CAR au niveau des cellules NK présentent plusieurs avantages, tels que : l'absence de GVHD, la persistance limitée des NK *in vivo*, l'absence d'amplification clonale des cellules NK et la capacité de ces cellules NK exprimant le CAR de reconnaître et cibler les cellules tumorales à partir de leurs récepteurs natifs (Rezvani et al., 2017). Cette capacité des cellules NK exprimant un CAR (NK CAR) à reconnaître aussi les cellules tumorales à partir de ses récepteurs natifs, pourrait être exploitée dans la sélection des donneurs des greffes de CSH en prenant en compte les incompatibilités KIR/HLA avec le receveur (Rezvani et al., 2017).

Les cellules NK dérivées des PBMCs présentent l'avantage d'être facilement collectées, et qu'elles peuvent être autologues ou allogéniques. Bien que faciles à collecter, elles sont parfois difficiles à congeler, décongeler et à amplifier. *Ex-vivo*, les cellules NK peuvent être activées et amplifiées en utilisant des cytokines ou des cellules nourricières « *feeder cells* » (Granzin et al., 2016) (Li et al., 2015b) (Sutlu et al., 2010). Les méthodes souvent utilisées pour séparer les cellules NK des PBMCs font appel à des billes immunomagnétiques pour dépléter les lymphocytes T (Teschner et al., 2014), suivie d'une étape d'enrichissement des cellules NK CD56+. Cependant pour des finalités cliniques, l'utilisation d'une technologie d'aphérèse ou d'un système CliniMACS est nécessaire pour avoir plus de cellules NK dans chaque lot (Lapteva et al., 2012). En effet, les cellules NK représentent environ 10% des cellules sanguines

circulantes. D'autres stratégies peuvent être également utilisées pour avoir un grand nombre des cellules NK à partir des PBMCs autologues ou allogéniques. Par exemple, la culture des PBMCs dans un milieu contenant 10% de plasma humain, IL-2, OK-432 avec un anticorps anti-CD16 permet d'avoir énormément de cellules NK au bout de 14 jours de culture (Deng et al., 2012). L'OK-432 encore appelé Picibanil, est un produit issu de la bactérie *streptococcus pyogenes* capable d'augmenter l'activité des cellules NK (Bonavida et al., 1986). La culture des PBMCs avec des cellules nourricières irradiées (lymphocytes T autologues stimulés) dans un milieu contenant de l'IL2 et de l'OK-432, permet d'avoir plus de 90% des cellules NK au bout de 20 jours (Sakamoto et al., 2015). Cependant, aucune réponse clinique n'a été observée lorsque ces cellules NK autologues amplifiées ont été utilisées chez des patients atteints de cancer digestif avancé (Sakamoto et al., 2015). Les raisons qui ont contribué à ces mauvais résultats sont, d'une part l'inhibition des cellules NK causées par les molécules HLA de classe I exprimées par certaines cellules tumorales (Carrega et al., 2009) (Mundy-Bosse et al., 2014) et, d'autre part l'absence d'incompatibilités KIR ligand HLA (Miller et al., 2005). L'infusion de cellules NK allogéniques a été largement utilisée dans les essais cliniques pour traiter certaines tumeurs, telles que les Leucémies Aigues Myéloïdes, Léucémies Myéloïdes Chroniques, mélanome, cancer du sein (Cheng et al., 2013). Certains de ces essais cliniques ont montré des résultats encourageants avec une augmentation du taux de réponse NK associée à une complète rémission (Romee et al., 2016) (Dolstra et al., 2017) (Miller et al., 2005) (Veluchamy et al., 2017) (Curti et al., 2011). Les greffes de Cellules Souches hématopoïétiques, qui seront présentées dans la partie III, constituent aussi une source des cellules NK dans le traitement de certaines maladies hématologiques.

### **III. Cellules NK KIR<sup>+</sup> et greffes de CSH**

#### **1. Historique et principes des greffes de CSH**

Les allogreffes de CSH, sont l'une des immunothérapies cellulaires utilisées dans le monde entier, pour traiter les tumeurs malignes hématologiques, les désordres congénitaux ou acquis du système hématopoïétique et certaines tumeurs solides (Appelbaum, 2007). La première transfusion de moelle osseuse fut réalisée en 1939 chez un patient souffrant d'une aplasie médullaire avec 43 transfusions au total sur 52 jours (Osgood, et al, 1939). Ces transfusions prolongèrent la vie de ce patient mais entraînèrent une polycythémie (augmentation des érythrocytes circulants) et une splénomégalie. Cette idée fut ensuite abandonnée pendant quelques années. C'est l'utilisation de la bombe atomique, pendant la deuxième guerre mondiale, qui poussa les chercheurs à trouver des solutions pour restaurer les fonctions de la moelle osseuse, chez les patients irradiés. Les tests de greffes de moelle osseuse, effectués sur des modèles de souris aplasiques en 1950, suggéraient que les fonctions de la moelle osseuse pouvaient être restaurées par une greffe syngénique de moelle osseuse (Rekers et al., 1950). Ces résultats poussèrent Barnes et collaborateurs en 1956 (Barnes et al., 1956), à mener des travaux sur deux groupes des souris atteintes de leucémie aigüe. Dans le premier groupe qui avait reçu une greffe syngénique de moelle osseuse après irradiation, la plupart des souris moururent de rechute. Dans le deuxième groupe qui avait reçu une greffe de moelle osseuse issue d'une souris non syngénique (allogénique), aucune rechute de la maladie ne fut observée, mais toutes les souris finirent par mourir après une perte de poids inexplicée.

Edward Donnall Thomas (prix Nobel de médecine en 1990) et son équipe à Seattle furent les premiers dans les années 50 à effectuer des greffes allogéniques de moelle osseuse chez l'homme (Thomas et al., 1957). Sur 6 patients, après un conditionnement comprenant à la fois une irradiation et de la chimiothérapie, seuls 2 ont survécu, les 4 autres sont décédés 100 jours après la transplantation. Dans les années 70, Donnall Thomas fut le premier à rapporter les

résultats de l'allogreffe sur une grande cohorte de patients, porteurs de leucémies aiguës (54 patients atteints de leucémie aiguë myéloïde (LAM) et 46 patients avec une leucémie aiguë lymphoblastique (LAL)). Dans cet essai clinique, 13 patients obtinrent la guérison, ce qui constituait déjà une avancée thérapeutique majeure (Thomas et al., 1977). Dans les années 80, Donnall Thomas, encore lui, rapporta un taux de guérison d'environ 50% chez des patients atteints de leucémie myéloïde chronique (LMC), après une allogreffe de moelle osseuse, démontrant l'intérêt de ce traitement dans cette maladie mortelle à l'époque (Thomas et al., 1986).

La première étape de la greffe est le conditionnement. Il s'agit en général d'une chimiothérapie ou d'une radio-chimiothérapie à visée principalement immunosuppressive permettant la prise du greffon. La deuxième étape est la greffe elle-même qui correspond à la transfusion d'un greffon. Trois types de greffons peuvent être utilisés en greffe de moelle. Il s'agit de récupérer chez le donneur des cellules souches hématopoïétiques (CSH) à l'origine des globules blancs, des globules rouges et des plaquettes. Les CSH sont naturellement localisées dans la moelle osseuse. Ainsi, historiquement les premiers greffons étaient donc des greffons médullaires nécessitant une anesthésie générale pour prélever la moelle, chez le donneur au niveau iliaque. A la fin des années 80 et au début des années 90, après la découverte des facteurs de croissance GM-CSF (Granulocyte Macrophage Colony Stimulating Factor) et G-CSF (granulocyte colony stimulating factor), les donneurs ont pu être stimulés avec ces molécules pour permettre la mobilisation et le passage des CSH de la moelle vers le sang périphérique (Socinski et al., 1988), évitant ainsi l'anesthésie générale au donneur. On parle de cellules souches périphériques (CSP). Les CSP sont recueillies alors par un système de cytophérèse au niveau des veines périphériques. Kessinger et collaborateurs sont parmi les premiers à montrer la faisabilité de la greffe allogénique avec CSP chez un patient atteint de LAL (Kessinger et al., 1989). Actuellement les greffes de CSP sont largement utilisées par rapport aux cellules souches

issues de la moelle osseuse (Hatzimichael and Tuthill, 2010). La troisième possibilité de constituer un greffon est de récupérer des CSH dans la veine ombilicale à la naissance d'un enfant. En effet, les CSH sont retrouvées en petite quantité dans le cordon ombilical, on parle alors de greffe de sang placentaire.

La principale complication de l'allogreffe est représentée par la maladie du greffon contre l'hôte (ou GVHD pour graft-versus-host disease). Elle est provoquée par l'alloréactivité des lymphocytes T du donneur contre les antigènes du receveur et provoque des atteintes d'organes assez typiques, principalement au niveau cutané, hépatique et digestif (Anasetti et al., 1989), (Krenger et al., 1997). Cette alloréactivité est d'autant plus forte que l'incompatibilité HLA (human leucocyte antigen) entre le donneur et le receveur est importante. Dans les années 50, la notion de compatibilité entre donneur et receveur est suspectée mais non identifiée. Il faut attendre les premiers travaux de Jean Dausset, prix Nobel de médecine et physiologie en 1980 pour sa découverte des premiers antigènes HLA, (Dausset and Brex, 1957), puis ceux d'équipes internationales pour aboutir à la fin des années 60 à l'établissement d'un premier système du soi ou HLA permettant de sélectionner correctement un donneur (van Rood, 1968). L'effet curateur de l'allogreffe repose sur l'effet GVL due aux lymphocytes T et NK issus du donneur qui détruisent les cellules tumorales résiduelles du receveur (Truitt and Atasoylu, 1991), (Zeis et al., 1997).

Dans les paragraphes suivants, nous présentons de façon succincte la génétique HLA avant d'aborder la compatibilité HLA et le choix du donneur ainsi que les différents types de conditionnements.

## **2. Génétique HLA**

Le complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) est un grand complexe génique très polymorphe, présent chez tous les vertébrés (Mosaad, 2015). Chez l'homme, ce complexe est appelé HLA parce que ces antigènes furent découverts pour la première fois sur des leucocytes dans les années 50 par Jean Dausset (Dausset and Brecy, 1957). La nomenclature HLA, inclut le nom du gène précédé du préfixe HLA, suivi du numéro du groupe d'allèles séparé par une étoile \*, suivi du numéro de la molécule HLA, suivi du numéro correspondant au nombre de substitutions au niveau de l'ADN dans les régions codantes, suivi du nombre de substitution dans les régions non codantes (Exemple : HLA-A\*01:01:01:01). Ces gènes HLA sont localisés sur le bras court du chromosome 6 (6p21.3), et sont répartis sur trois régions (Charles A Janeway et al., 2001). La région HLA de classe I contient les gènes classiques HLA-A, HLA-B et HLA-C mesurant 3,5 kb de taille et comportant jusqu'à 8 exons. Les gènes HLA présents dans cette région sont très polymorphes et on dénombre à l'heure actuelle 13680 allèles HLA de classe I dans la base de données IPD-IMGT/HLA (Release 3.33.0, 2018-07-11). Ces gènes HLA codent pour les molécules HLA de classe I constituées d'une chaîne lourde  $\alpha$  et d'une chaîne légère, la  $\beta$ 2 microglobuline. Cette chaîne lourde  $\alpha$  est organisée en trois domaines externes ( $\alpha$ 1,  $\alpha$ 2 et  $\alpha$ 3) contenant chacun un domaine transmembranaire et un segment d'ancrage cytoplasmique. Les domaines  $\alpha$ 1 et  $\alpha$ 2 forment la poche à peptide capable de fixer des peptides de 8 à 10 acides aminés. La majorité des polymorphismes décrits, est localisée dans la poche à peptides codée par les exons 2 et 3 des molécules HLA de classe I, et ces différences ont un rôle fonctionnel important, voilà pourquoi la plupart des techniques de typages HLA utilisées en routine ont longtemps ciblé ces deux exons les plus polymorphes. Par ailleurs, la région HLA de classe II contient les gènes HLA-DR, HLA-DP et HLA-DQ. Les gènes de cette région sont moins polymorphes par rapport à ceux de la classe I, et on compte actuellement 5091 allèles HLA de classe II (Release 3.33.0, 2018-07-11). La taille de ces gènes



varie entre 7 à 18 kb et comportent jusqu'à 6 exons. Ils codent pour des molécules HLA de classe II constituées chacune d'une chaîne  $\alpha$  et d'une chaîne  $\beta$ , qui s'associent de manière non covalente. Ces molécules sont des glycoprotéines de surface constituées d'un domaine externe, un segment transmembranaire et d'une queue cytoplasmique. La chaîne  $\alpha$  contient les domaines  $\alpha 1$  et  $\alpha 2$ , et la chaîne  $\beta$  contient les domaines  $\beta 1$  et  $\beta 2$ . Les domaines externes  $\alpha 1$  et  $\beta 1$  forment la poche à peptides capables de fixer des peptides de 12 à 15 acides aminés. La région de classe III ne code pour aucune molécule HLA, mais contient des gènes codants pour les composants du complément, ou du TNF (Beck and Trowsdale, 2000). Au fil des améliorations techniques, le typage des gènes HLA a été réalisé soit par PCR-SSP (Bunce and Passey, 2013), PCR-SSOP (Feng et al., 2001), PCR-SBT (Li et al., 2018) ou plus récemment par des techniques de séquençage nouvelle génération (NGS) (Hosomichi et al., 2015) suivant le niveau de résolution (générique ou allélique) recherché.

### **3. Compatibilité HLA et sélection des donneurs pour l'allogreffe**

Bien que pour une sélection optimale des donneurs en greffes de CSH, l'état de santé, l'âge, le sexe, lien familial, le groupe sanguin ABO et le statut CMV du donneur sont pris en considération, la compatibilité HLA entre donneur et receveur reste l'élément fondamental afin de limiter l'alloréactivité des lymphocytes T vis-à-vis des tissus de l'hôte. Cette compatibilité HLA entre donneur et receveur, dépend du niveau de résolution du typage HLA et du locus testé (Nunes et al., 2011). La faible résolution se réfère au typage des deux premiers digits précédant le 1<sup>er</sup> séparateur, la résolution intermédiaire correspond au typage des deux premiers digits après le 1<sup>er</sup> séparateur. La haute résolution se réfère au typage de tous les digits dans le 1<sup>er</sup>, 2<sup>ème</sup>, 3<sup>ème</sup> et 4<sup>ème</sup> champs. La sélection des donneurs de CSH se base donc, sur l'identité de ces gènes HLA entre le donneur et le receveur. Plusieurs recommandations sont régulièrement

faites, par la Société Francophone de Greffe de Moelle et de Thérapie Cellulaire (SFGM TC), sur le choix des donneurs (Dubois et al., 2016).

Le gold standard actuel (**Figure 9**) est de choisir un donneur HLA identique apparenté (donneur familial) ou non apparenté (donneur inscrit sur un fichier) pour les gènes HLA-A, -B, -C, -DRB1 et -DQB1 au niveau allélique. Puisque chaque individu est constitué de deux haplotypes HLA-A, -B, -C, -DRB1 et -DQB1, on parle de greffe 10/10 sur le plan HLA quand le donneur et le receveur partagent les mêmes haplotypes. On va parler de greffe génoidentique quand le donneur compatible HLA est un frère ou une sœur et de greffe phénoïdentique quand le donneur est un donneur de fichier.

Des greffes mis-match 9/10 sont aussi possibles. En cas d'incompatibilités 9/10, il est préférable de choisir une incompatibilité HLA pour le locus HLA-DQB1 (Morishima et al., 2015).

On parle de greffe 12/12 quand le typage allélique HLA-DPB1 est également disponible. Une incompatibilité au locus HLA-DPB1 entre donneur et receveur peut être recherchée car elle est parfois associée à une meilleure survie. On parle alors d'incompatibilité permissive HLA-DPB1 (Tiercy, 2016).

Les meilleurs résultats de greffes de CSH allogéniques sont observés avec des donneurs HLA identique apparenté (frère ou sœur du patient). Ces donneurs constituent donc le premier choix en termes de sélection d'un donneur pour une greffe de CSH allogénique. On choisit ensuite un donneur 10/10 de fichier puis éventuellement un donneur 9/10 car la survie des patients est meilleure dans le premier cas (Rubio et al., 2016).

Malheureusement, la possibilité de trouver un donneur HLA identique apparenté est d'environ 30% (Tiercy, 2016). En l'absence de donneur genoidentique, la possibilité en Europe de trouver un donneur de fichier 10/10 est d'environ 45 à 65%, un donneur de fichier 9/10 d'environ 20 à 30% (Tiercy, 2016).

Un certain nombre de patients n'ont donc pas de donneur identifié. On va alors avoir recours à des greffes dites alternatives, telles que la greffe de sang placentaire (**Figure 9**) ou la greffe haploidentique (Bejanyan et al., 2015).

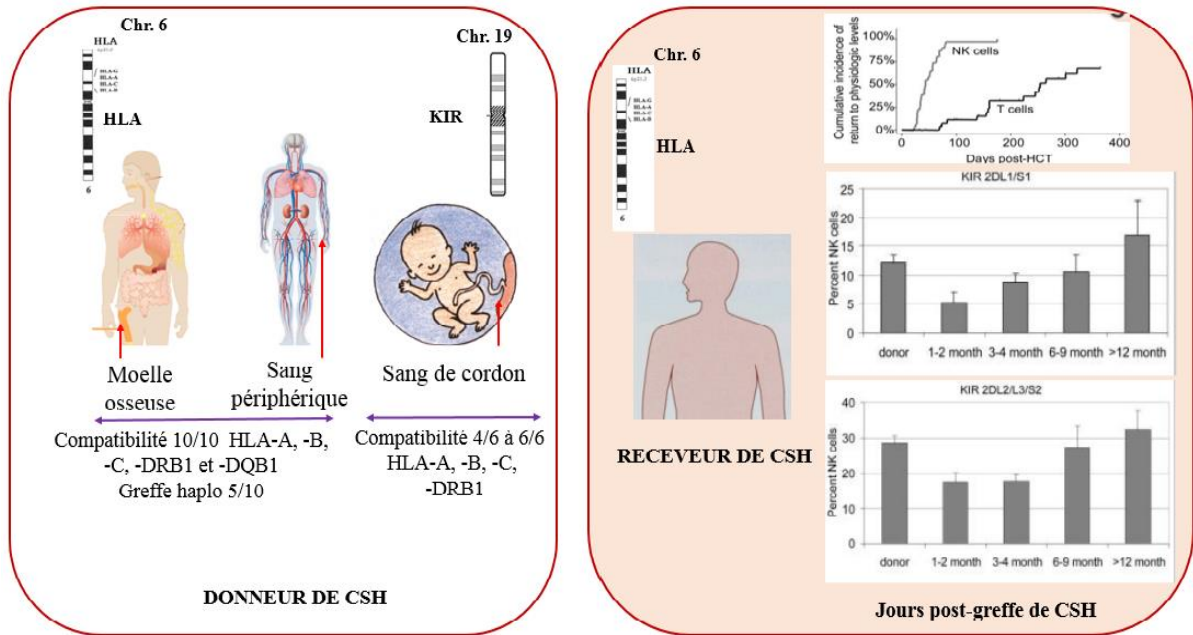
Les greffes de cordon ombilical sont surtout utilisées chez les enfants, et ce depuis 1988. On utilise alors une seule unité de sang placentaire. Chez les adultes, compte tenu du poids des patients, on utilise deux unités de sang placentaires pour avoir suffisamment de CSH pour permettre la prise de greffe. Les greffes de double sang placentaire chez l'adulte ont été développées à partir des années 2004/2005. Compte-tenu que le greffon placentaire, outre les CSH, contient des cellules T immatures, la compatibilité HLA requise entre patient et greffon placentaire est moins drastique : on peut se permettre des greffes 4/6 5/6 ou 6/6 en prenant en compte uniquement les loci HLA-A, -B (au niveau générique) et DRB1 (au niveau allélique) (Barker et al., 2005, Delaney and Ballen, 2010 ; Michel et al., 2013). Etant donné que les molécules HLA-C sont faiblement exprimées à la surface des cellules de l'organisme par rapport aux molécules HLA-A et HLA-B (Johnson, 2000), (Apps et al., 2015), le mismatch HLA-C est souvent aussi considéré comme permissif. Néanmoins, récemment l'intérêt d'un matching HLA C dans ce type de greffe a été rapporté (Hough et al., 2016). De plus, en cas d'incompatibilités HLA et pour éviter une non prise, il faut s'assurer que le patient n'a pas d'anticorps anti-HLA dirigés contre les antigènes HLA du cordon.

L'autre avantage de la greffe de cordon, à côté de l'utilisation de greffon non complètement compatible, est la moindre incidence de GVHD. Cependant la faible quantité de CSH contenue dans les greffons est associée à un risque accru de non prise et une reconstitution immunitaire retardée, source d'infections (Grewal et al., 2003).

Les greffes placentaires sont aujourd'hui challengées par les greffes haploidentiques, en particulier chez les adultes (75 allogreffes placentaires en 2017 contre 188 en 2013, rapport ABM 2017).

L'autre principale greffe alternative est donc la greffe haploidentique réalisée à partir d'un donneur familial haploidentique ou 5/10, c'est-à-dire que le donneur et receveur ne partagent qu'un haplotype HLA-A, -B, -C, -DR, -DQB1 sur deux. Il peut s'agir d'un parent, d'un frère ou une sœur, d'un enfant, d'un cousin ou d'une cousine, d'un neveu ou une nièce (Chevallier et al., 2015). La probabilité d'un patient d'être haploidentique avec le donneur est de 50% lorsqu'il s'agit de la fratrie et de 100% lorsqu'il s'agit des deux parents biologiques ou des enfants du patient (Chevallier et al., 2015). Dans ce contexte, les incompatibilités HLA de classe I, en particulier HLA-C, et KIR sont fréquentes. Initialement, ce type de greffe était associé à un taux de non prise important et de fortes incidences de GVHD. Dans les années 90, on a réalisé des T déplétion in vitro du greffon pour éviter la survenue de GVHD après ce type de greffe (Aversa et al., 1994) mais les résultats n'étaient pas à la hauteur car du fait de l'absence de lymphocytes T et d'effet GVL, le taux de rechute était très important. Certaines équipes développèrent donc l'ajout secondaire de lymphocytes T après la greffe pour avoir cet effet GVL sans grand succès (Solomon et al., 2012).

Actuellement les greffes haploidentiques sont tout-à-fait possible grâce à une T déplétion du greffon in vivo par administration de cyclophosphamide à forte dose précocement après la greffe, ce qui permet une destruction des lymphocytes T allo-réactifs du greffon et ainsi de réduire drastiquement l'incidence de GVHD sévère observée précédemment (Kanakry et al., 2015). Les cellules souches et les cellules effectrices, telles que les cellules NK, du greffon, ne sont pas détruites par le cyclophosphamide, ce qui permet la prise de greffe et l'action antitumorale des cellules effectrices (Martelli et al., 2014).



**Figure 9 : Sources de cellules souches hématopoïétiques**

Les CSH peuvent provenir soit de la moelle osseuse, du sang périphérique ou du sang de cordon ombilical. Les cellules NK sont en général les premières cellules à se reconstituer après greffe. L'expression des récepteurs KIR2DL1/L2/L3/S1/S2 est détectable à partir du 1<sup>er</sup> mois post-greffe de CSH non apparentée (Triplett et al. *Leukemia* 2009).

#### **4. Conditionnements et Donneurs**

Le rôle du conditionnement pré-greffe est triple : faire de la place (destruction de l'hématopoïèse du receveur), réaliser une immunosuppression chez le receveur pour permettre l'installation du greffon, et si possible avoir une action antitumorale.

Les premiers conditionnements à être utilisés étaient myéloablatif (MAC pour myeloabaltive conditioning, destruction complète de la moelle du malade) comportant une irradiation corporelle totale (ICT) ou une association ICT avec du cyclophosphamide (endoxan) forte dose (Thomas et al., 1982). Ce type de conditionnement cause une cytopénie irréversible et l'apport de la greffe de CSH est obligatoire (Jethava et al., 2017). Les régimes de conditionnement MAC sont associés à une toxicité et une mortalité dépendant de plusieurs facteurs tels que l'âge du patient, l'âge du donneur, la compatibilité HLA, le sexe et le stade de la maladie. Compte-tenu de la toxicité de l'ICT, certaines équipes dans les années 80 démontrèrent l'intérêt et l'efficacité

de l'association du busulfan avec le cyclophosphamide en supprimant donc l'ICT du conditionnement (Tutschka et al., 1987).

Dans les années 90, les conditionnements à intensité réduite ou atténués (RIC pour reduced intensity conditioning) ont fait leur apparition, permettant de greffer des patients plus âgés ou co-morbides. Néanmoins, du fait que la moelle malade du patient n'est pas complètement détruite avec ces RIC, le taux de rechute est plus important après ce type de greffe qu'après une greffe avec conditionnement MAC. Ce régime de conditionnement entraîne une cytopénie d'une durée assez longue pour nécessiter l'apport d'un greffon de CSH (Bacigalupo et al., 2009). Les principales drogues utilisées pour les RIC sont : fludarabine, melphalan, busulfan, thiotépa à dose réduite, ICT à faible dose (Schmid et al., 2006). Globalement la dose des agents alkylants et de l'ICT sont réduites de 30% par rapport aux conditionnements MAC (Bacigalupo et al., 2009).

On distingue également, des conditionnements non myéloablatifs (NMA) qui ne nécessitent pas l'apport d'un greffon de CSH car ils n'entraînent pas de cytopénies. Il peut s'agir d'une association fludarabine et cyclophosphamide (Khouri et al., 1998), d'une ICT 1 ou 2 Grays (Ballen et al., 2004), d'une irradiation lymphoïde totale (TLI), ou d'un traitement par sérum antilymphocytaire ou antithymoglobuline (ATG) (Lowsky et al., 2005). Néanmoins, ces conditionnements NMA sont aujourd'hui abandonnés car associés à un taux de rechute trop important.

En greffe de CSH haploidentique, le conditionnement de référence est le conditionnement Baltimore avec de la fludarabine, de l'endoxan faible dose et une ICT 2 Grays pré-greffe suivi donc après la greffe d'administration de fortes doses d'endoxan aux jours 3 et 4 de la greffe (Luznik et al., 2008). Des variantes de ce conditionnement, développées par notre groupe ou d'autres, sont également utilisées (Retiere et al., 2017).

## **5. Impact des gènes KIR et ligands HLA de classe I en greffes de CSH**

Etant donné l'effet antileucémique des cellules NK, et le fait qu'elles se reconstituent rapidement après la greffe, bien avant les lymphocytes T, de nombreuses études se sont focalisées depuis le début des années 2000, sur le rôle de l'alloréactivité des cellules NK sur le devenir des greffes de CSH. La contribution clinique de l'alloréactivité des cellules NK KIR<sup>+</sup> en greffes de CSH a été démontrée de manière impressionnante par Ruggeri et collaborateurs en 2002. Dans un contexte de greffes de CSH HLA haploidentiques T déplétées in vitro, cette équipe italienne a montré pour la première fois l'effet bénéfique des incompatibilités KIR/HLA (Ruggeri et al., 2002a). Dans ces travaux, une diminution significative de la fréquence de la rechute et de la GVHD aigüe associée à une amélioration de la survie des patients atteints de LAM étaient observées, pour les couples présentant une incompatibilité KIR ligand dans le sens GvH, suggérant une potentielle alloréactivité des cellules NK KIR<sup>+</sup> (Ruggeri et al., 2002b). Cet effet bénéfique des incompatibilités KIR ligands fut également observé en 2003 par Giebel, en greffes de CSH de moelle osseuse non apparentées T déplétées HLA non identiques. Dans cette étude, on retrouvait une probabilité de survie de 87% à 5 ans, chez les patients présentant des incompatibilités KIR ligands avec le donneur (Giebel et al., 2003). Cependant, cet effet bénéfique des incompatibilités KIR ligand n'a pas été retrouvé dans d'autres études post-greffes de CSH HLA identiques 9/10 ou 10/10 non apparentées, probablement à cause des différences de protocoles de greffes utilisées dans ces études (Davies et al., 2002), (Farang et al., 2006), (Hsu et al., 2006), (Bignon and Gagne, 2005).

Etant donné leur essor chez l'adulte entre 2005 et 2015, le rôle des incompatibilités KIR ligand fut également évalué dans le contexte de greffes de sang placentaire non HLA compatible. Ainsi, en 2009, Willemze et collaborateurs ont montré que les incompatibilités KIR ligands entre le donneur et le receveur en greffes de CSH de sang de cordon ombilical, sont associées à une diminution de l'incidence de la rechute et à une amélioration de la survie des

patients (Willemze et al., 2009). Cependant, cet effet bénéfique n'a pas été retrouvé par Brunstein la même année chez les patients ayant reçu une ou deux unités de sang de cordon ombilical (Brunstein et al., 2009). Dans l'équipe, nous n'avons également observé aucun impact des incompatibilités KIR ligand sur la dominance du sang de cordon en cas de greffe de double sang placentaire (Rettman et al., BMT 2016).

En parallèle des études évaluant l'impact des incompatibilités KIR ligand reposant uniquement sur la connaissance des typages HLA de classe I des couples donneur/receveur, d'autres études ont été menées pour évaluer l'impact du polymorphisme des gènes KIR sur le devenir de greffes de CSH. En effet, le polymorphisme génotypique des gènes KIR chez le donneur peut potentiellement engendrer une alloréactivité des cellules NK KIR<sup>+</sup> et impacter le devenir des greffes de CSH. Ainsi, en 2010, Stringaris et collaborateurs observent que les gènes KIR télomérique KIR2DL5A, KIR2DS1 et KIR3DS1 sont associés à une diminution significative de la rechute post-greffe de CSH HLA identiques apparentées chez des patients atteints de LAM (Stringaris et al., 2010). D'autres études, évaluant l'effet des génotypes KIR du donneur, montrent que l'utilisation des CSH provenant des donneurs de génotypes KIR BB possédant les gènes KIR centromériques KIR2DL2 et KIR2DS2 est associée à une amélioration significative de la survie des patients en greffes de CSH non apparentées HLA identiques (Cooley et al., 2010). Au vu de ces résultats, ce groupe américain a pu développer un algorithme de sélection des donneurs sur des bases génotypiques KIR dans le but de prédire l'alloréactivité des cellules NK. Par ailleurs, l'effet bénéfique de certains gènes KIR dont le gène KIR2DS1 télomérique est rapporté chez des patients atteints de LAM ayant reçus une greffe de CSH HLA identique non apparentée (Venstrom et al., 2012).

A l'heure actuelle, très peu d'études ont été réalisées pour évaluer l'impact des incompatibilités KIR ligand ou KIR/HLA dans un contexte de greffe haploidentique. Récemment, une équipe Marseillaise a montré l'importance des incompatibilités KIR ligand en



termes de diminution significative de l'incidence de la rechute chez des patients atteints de LAM en greffes haploidentiques non T déplétées avec ajout de cyclophosphamide post-greffe (Wanquet et al., 2018). Notre équipe a également montré que les incompatibilités des gènes KIR2DL (L1 et L2/L3) /HLA-C sont associées à une augmentation de l'incidence de la maladie du greffon contre l'hôte, à une faible incidence de la rechute et à une meilleure survie des patients (**Article soumis, Annexe**).

Le rôle des incompatibilités KIR ligands, des gènes KIR et des combinaisons KIR/KIR ligand en greffes de CSH reste toujours controversé en raison de l'hétérogénéité des caractéristiques de greffes (HLA identiques ou pas) : taille de la cohorte, conditionnement, pathologies, source de greffon variables, et de la définition des incompatibilités KIR (prise en compte des incompatibilités KIR ligand seulement, ou prise en compte des gènes/génotypes KIR du donneur, ou prise en compte des combinaisons génétiques gènes KIR du donneur/KIR ligand du receveur). Les gènes KIR étant polymorphes au niveau génotypique et allélique comme discuté ci-après, ce polymorphisme peut impacter le phénotype, l'interaction avec les ligands HLA de classe I et la fonction des cellules NK comme démontré récemment pour le gène KIR3DL1 (Boudreau et al., 2017). En effet, Boudreau et collaborateurs ont montré que la combinaison génétique KIR3DL1-null/HLA-Bw4 est associée à un taux faible rechute et de mortalité après greffe de CSH T déplétées chez des patients atteints de LAM.

Au final, la meilleure connaissance des allèles KIR et HLA pour la prédiction de l'alloréactivité des cellules NK KIR<sup>+</sup> ainsi que la meilleure connaissance de la reconstitution du répertoire des cellules NK KIR<sup>+</sup> en post-greffe (Retière et al., 2018), devraient permettre dans le futur une meilleure sélection des donneurs en greffe de CSH.

## **6. Expression des molécules HLA de classe I**

Les molécules HLA de classe I sont exprimées, à la surface de cellules nucléées de l'organisme, à des niveaux d'expressions différents selon les types cellulaires. Leur expression peut être régulée par des hormones et cytokines (Mu et al., 2014). Cette expression se fait de façon codominante avec un maximum de 6 antigènes HLA de classe I classiques différents exprimés, codés par les gènes HLA-A, HLA-B et HLA-C issus du chromosome paternel et maternel (Charles A Janeway et al., 2001). En spectrométrie de masse, le niveau d'expression des molécules HLA-A, -B et -Cw codées par les allèles HLA-A\*02:01, HLA-B\*44:02 et HLA-C\*05:01 à la surface des lymphocytes du sang périphérique est vingt fois plus élevé par rapport à la molécule HLA-E non classique (Apps et al., 2015). Par contre en cytométrie en flux, le niveau d'expression des molécules HLA-A2 et HLA-B44 à la surface des lymphocytes du sang périphérique, codées par les allèles HLA-A\*02:01 et HLA-B\*44:02, est dix huit fois plus élevé par rapport à la molécule HLA-Cw5 codée par l'allèle HLA-C\*05:01 (Apps et al., 2015). L'expression de ces molécules HLA de classe I, plus précisément la molécule HLA-Cw, à la surface des cellules dépend de la nature de l'allèle présent et ou de l'haplotype HLA (Bettens et al., 2014). Le niveau d'expression des molécules HLA-C sur les cellules du patient est un déterminant clé sur le devenir de greffes de CSH HLA identique 9/10 avec une incompatibilité sur le locus HLA-C. Les incompatibilités HLA-Cw impliquant les produits d'allèles HLA-Cw faiblement exprimés sont mieux tolérés par le patient par rapport à celles impliquant des produits d'allèles HLA-Cw codant des molécules HLA-Cw fortement exprimées (Petersdorf et al., 2014). Ce niveau d'expression des molécules HLA-Cw sur les cellules est régulé, par le polymorphisme dans la région 3'-UTR controlant la fixation du micro-ARN miR-148. L'interaction du miR-148 dans la région 3'-UTR est associée à une diminution du niveau d'expression des molécules HLA-Cw. Par contre, une absence d'interaction de ce miR-148 sur cette région 3'-UTR est associée à une expression forte des molécules HLA-Cw (Kulkarni et

al., 2011). De plus, ce niveau d'expression des molécules HLA-Cw est aussi régulé, par le polymorphisme du variant rs2395471 située à 800 pb, en amont du site d'initiation de la transcription du gène HLA-C pouvant affecter l'affinité du facteur de transcription Oct-1 (Vince et al., 2016).

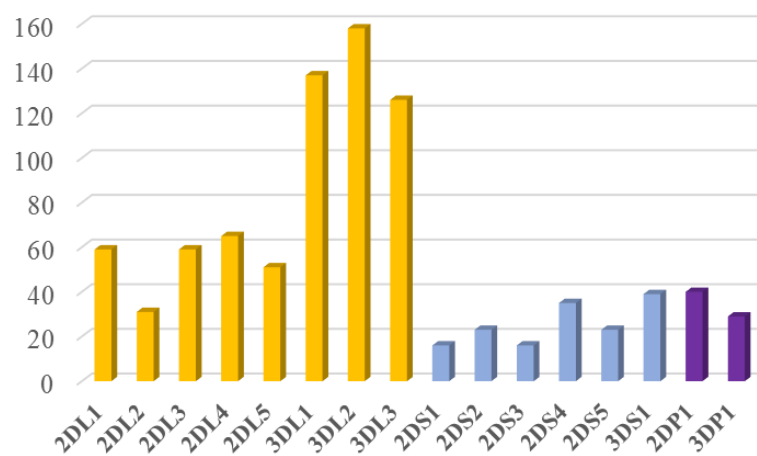
## **7. Polymorphisme allélique des gènes KIR**

En dehors de la diversité génotypique, présentée dans la partie II, le polymorphisme allélique des gènes KIR contribue significativement à la diversité du répertoire NK KIR (Shilling et al., 2002), (Kwon et al., 2000). Généré par des mutations ponctuelles et par des recombinaisons homologues, ce polymorphisme allélique touche différemment tous les gènes KIR, plus particulièrement les gènes KIR inhibiteurs (Hilton et al., 2015), (Norman et al., 2007). Contrairement aux gènes HLA de classe I présentant un polymorphisme allélique extrêmement élevé, touchant principalement les exons 2 et 3, le polymorphisme des gènes KIR est plus limité mais réparti sur tous les exons. La nomenclature des allèles KIR (Marsh et al., 2003) (Middleton and Gonzelez, 2010), harmonisée au niveau mondial inclut l'acronyme KIR, suivi du nombre de domaines extracellulaires « 2D » ou « 3D » et de la longueur de la queue cytoplasmique (« L » pour long, « S » pour court et « P » pour pseudogène). Le dernier digit avant l'astérisque \* désigne le nombre de gènes codant un récepteur avec cette structure. Lorsque deux ou trois gènes KIR ont une structure et des séquences très similaires, une lettre doit être ajoutée pour les distinguer, par exemple les gènes KIR2DL5A et KIR2DL5B (Gómez-Lozano et al., 2002). Les trois premiers digits après l'astérisque\* désignent les allèles qui diffèrent dans les séquences exoniques avec des mutations silencieuses. Les deux digits suivants indiquent les allèles qui diffèrent dans les séquences exoniques avec des mutations non silencieuses et les deux derniers digits sont utilisés pour distinguer les allèles qui diffèrent dans les régions non

codantes (intron, promoteur, etc.). Une lettre peut aussi être ajoutée pour représenter un allèle non exprimé (exemple : KIR2DL1\*013N).

A l'heure actuelle, 907 allèles KIR ont été répertoriés dans la base de données IPD-KIR (<https://www.ebi.ac.uk/ipd/kir/stats.html>). Les gènes KIR les plus polymorphes sont les KIR inhibiteurs (**figure 10**), plus particulièrement le KIR3DL2 (158 allèles) suivi du KIR3DL1 (137 allèles décrits). Les gènes KIR3DL1 et KIR3DS1 d'une part ainsi que les gènes KIR2DL2 et KIR2DL3 d'autre part sont considérés comme des allèles des mêmes gènes (Uhrberg et al., 1997), (Hsu et al., 2002). Des études ont montré que le polymorphisme allélique KIR3DL1 peut avoir un impact sur le phénotype, l'interaction avec le ligand HLA de classe I, la reconnaissance des anticorps anti-KIR3DL1 et sur la fonction des cellules NK (Gagne et al., 2013), (O'Connor et al., 2007), (Mulrooney et al., 2015). En effet, selon l'allèle KIR3DL1 présent, le niveau d'expression du récepteur KIR3DL1 à la surface des cellules NK sera soit nulle (KIR3DL1\*004, KIR3DL1\*019), faible (KIR3DL1\*005, KIR3DL1\*007) ou fort (KIR3DL1\*001, KIR3DL1\*01502, KIR3DL1\*020) (Gardiner et al., 2001), (Parham et al., 2011), (Gagne et al., 2013). Le polymorphisme dans les régions promotrices du gène KIR3DL1 impacte l'activité du promoteur et il est associé à des différences de fréquence d'expression de ce récepteur sur les cellules NK (Li et al., 2008). En 2005, Carr et al. ont montré que la présence de l'arginine à la position 238 du domaine D2 et de l'isoleucine à la position 320 du domaine transmembranaire permet au récepteur KIR3DL1\*002 d'interagir fortement avec son ligand HLA-Bw4 comparé au récepteur KIR3DL1\*007 possédant une glycine et une valine à ces différentes positions (Carr et al., 2005). Le polymorphisme des allèles KIR3DL2 impacte aussi sur le niveau d'expression de ces récepteurs sur les cellules NK. Les produits d'allèles KIR3DL2\*007 et KIR3DL2\*00902 sont connus pour être faiblement exprimés sur les cellules NK comparés au produit d'allèle KIR3DL2\*008 (Yawata et al., 2006). Le polymorphisme allélique de certains gènes KIR2D inhibiteurs, impacte aussi sur le niveau d'expression des

récepteurs sur les cellules NK. Il a été montré que le produit d'allèle KIR2DL1\*004 est faiblement exprimé sur les cellules NK par rapport au produit d'allèle KIR2DL1\*003 (Dunphy et al., 2015). Il a été aussi décrit que le polymorphisme du gène KIR2DL5 dans la région promotrice impacte sur le niveau d'expression de ce gène à la surface des cellules NK (Mulrooney et al., 2008). Les polymorphismes dans les régions promotrices des gènes KIR peut affecter la fixation de certains facteurs de transcription, tels que AP-1, Oct-1 et Ets-1 sur ces régions entraînant ainsi une faible expression de ces récepteurs KIR (Li et al., 2016).



**Figure 10 : Polymorphisme allélique des gènes KIR**

Les gènes KIR inhibiteurs sont les plus polymorphes plus précisément les gènes KIR3DL. A l'heure actuelle, 907 allèles KIR sont décrits dont 137 allèles KIR3DL1.

Le polymorphisme des allèles KIR s'étend généralement sur plusieurs exons (8 à 9 exons), la position des bases polymorphes varie selon le gène KIR considéré, comme illustré pour le gène KIR2DL1 (**figures 11 et 12**). A l'heure actuelle, il est difficile de représenter sur une même figure les positions polymorphes de tous allèles connus (907 allèles), de 15 gènes KIR fonctionnels.

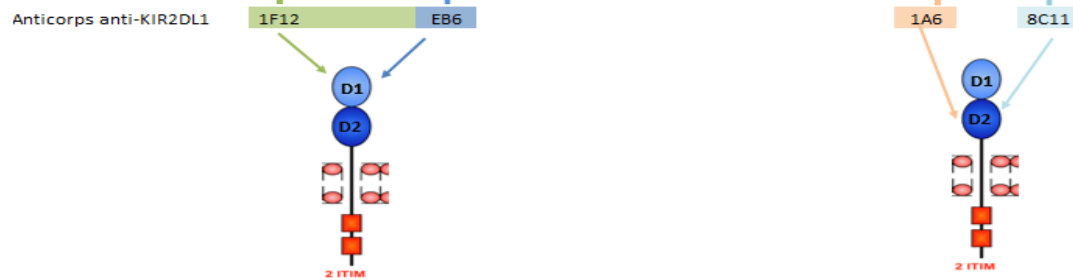
La répartition des allèles KIR peut varier selon les pays et les ethnies. Par exemple, pour le gène KIR2DL1, les allèles KIR2DL1\*001, \*002, \*003, et \*004 sont présents en Irlande du Nord (Meenagh et al., 2008), en Inde, Mexique et aux USA en fréquences variables. L'allèle

KIR2DL1\*005 est retrouvé en Inde à une fréquence de 43,8% (Rajalingam et al., 2002) et absent dans les populations Européennes. L'allèle KIR2DL1\*006 est présent au Ghana à une fréquence de moins de 1% et chez les Afro-américains à 11% (Hou et al., 2009). L'allèle KIR2DL1\*007 rare dans les populations Européennes est retrouvé en fréquences variables aux USA (7%) comme répertoriées dans la base de données <http://allelefrequencys.net/>. Faute de techniques de typages de tous les allèles comme détaillées dans la partie 9 « Méthodes d'études des gènes KIR et allèles », très peu d'études ont été menées en Europe sur la diversité de tous les allèles KIR. Les quelques études menées en France ont détecté les allèles KIR2DL4 (\*00102, \*00103, \*00201, \*00501, \*00801, \*00802, \*011, \*012), KIR2DS4\*003, KIR3DL1 (\*001, \*002, \*004, \*005, \*007, \*008, \*01501, \*01502, \*019, \*020) et KIR3DS1\*01301 dans la population (<http://allelefrequencys.net/>) (Buhler et al., 2009).

	EXON 1	PSEUDOEXON 3													EXON 4										EXON 5		EXON 6					EXON 7		EXON 8									
ADNc	13	107	110	144	166	188	194	230	259	262	313	331	333	343	358	379	404	454	523	549	550	576	582	598	608	621	709	714	724	725	739	796	801	813	849	867	888	907	908	949	997	1037	
2DL1*001	G	G	C	A	G	A	T	A	A	A	A	G	G	A	A	G	C	C	C	T	G	C	G	G	A	C	A	C	C	G	C	C	G	A	A	C	C	A	C	C	C	C	A
2DL1*002	T	G	C	A	G	A	T	A	A	A	A	G	G	A	A	G	C	C	C	T	G	C	G	G	A	C	A	C	C	G	C	C	G	A	A	C	C	A	C	C	C	C	A
2DL1*00301	G	G	G	G	A	T	A	A	A	A	A	G	G	A	A	G	T	C	C	T	G	C	G	G	A	C	A	G	C	G	C	C	G	A	A	C	C	A	C	C	C	C	A
2DL1*00302	G	G	G	G	A	T	A	A	A	A	A	G	G	A	A	G	T	C	C	T	G	C	G	G	A	C	A	C	C	G	C	C	G	A	A	C	C	A	C	C	C	C	A
2DL1*00303	G	G	G	A	G	A	T	A	A	A	A	G	G	A	A	G	T	C	C	T	G	C	G	G	A	C	A	C	C	G	C	C	G	G	A	C	C	A	C	C	C	C	A
2DL1*00304	G	G	G	G	A	T	A	A	A	A	A	G	G	A	A	G	T	C	C	T	G	C	A	G	A	C	A	C	C	G	C	C	G	A	A	C	C	A	C	C	C	C	A
2DL1*00305	G	G	G	G	A	T	A	A	A	A	A	G	G	A	A	G	T	C	C	T	G	C	G	G	A	C	A	C	C	G	C	C	G	A	A	C	C	A	C	C	C	G	A
2DL1*004	G	G	G	A	G	A	T	A	A	A	A	G	G	A	A	G	C	C	A	C	A	T	G	G	G	C	G	C	C	G	C	T	G	A	A	C	C	A	C	C	C	C	A
2DL1*005	G	G	G	A	G	A	T	A	A	A	A	G	G	A	A	G	T	C	C	T	G	T	G	G	G	C	A	C	C	G	C	C	G	A	G	C	C	A	C	C	C	G	A
2DL1*00601	G	G	G	A	G	A	T	A	A	A	A	G	G	A	A	G	T	C	C	C	G	C	G	G	A	C	A	C	C	G	C	T	G	A	A	C	C	A	C	C	C	C	A
2DL1*00602	G	G	G	G	A	T	A	A	A	A	A	G	G	A	A	G	T	C	C	T	G	C	G	G	A	C	A	C	C	G	C	T	G	A	A	C	C	A	C	C	C	C	A
2DL1*007	G	G	G	A	G	A	T	A	A	A	A	G	G	A	G	G	C	C	A	C	A	T	G	G	G	C	G	C	C	G	C	T	G	A	A	C	C	A	C	C	C	C	A
2DL1*008	T	A	C	A	G	A	T	A	A	A	A	G	G	A	A	G	C	C	C	T	G	C	G	G	A	C	A	C	C	G	C	C	G	A	A	C	C	A	C	C	C	C	A
2DL1*009	G	G	G	G	A	T	A	A	A	A	A	G	G	A	A	G	T	C	C	T	G	C	G	G	A	C	A	C	C	G	C	C	G	A	A	C	C	G	T	C	C	A	
2DL1*010	G	G	G	A	G	A	T	A	A	A	A	G	G	A	A	G	C	C	A	C	A	T	G	G	G	C	G	C	C	G	C	C	G	A	A	C	C	A	C	C	C	C	A
2DL1*01101	T	G	G	A	G	A	T	A	A	A	A	G	G	A	A	G	C	C	A	C	A	T	G	G	G	C	G	C	A	G	C	T	G	A	A	C	C	A	C	C	C	C	A
2DL1*01102	T	G	G	A	G	A	T	A	A	A	A	G	G	A	A	G	C	C	A	C	A	T	G	G	G	T	G	C	C	G	C	T	G	A	A	C	C	A	C	C	C	C	A
2DL1*012	G	G	G	A	G	A	T	A	A	A	A	G	G	A	A	G	C	C	C	T	G	C	G	G	A	C	A	C	C	G	C	C	G	A	A	C	C	A	C	C	C	C	A
2DL1*013N	T	G	G	A	T	A	T	A	A	A	A	G	G	A	A	G	C	C	A	C	A	T	G	G	G	C	G	C	C	G	C	T	G	A	A	C	C	A	C	C	C	C	A
2DL1*014	G	G	G	G	A	T	A	A	A	A	A	G	G	A	A	G	T	C	C	T	G	C	G	A	A	C	A	C	C	G	C	C	G	A	A	C	C	A	C	C	C	C	A
2DL1*015	G	G	G	G	A	T	A	A	A	A	A	G	G	A	A	G	T	C	C	T	G	C	G	G	A	C	A	C	C	G	C	C	G	A	A	C	A	A	C	C	C	C	A
2DL1*016	G	G	G	A	G	A	T	A	A	A	A	G	G	A	A	G	T	C	C	T	G	C	G	G	A	C	A	C	C	G	C	C	G	G	A	C	C	A	C	T	C	C	A
2DL1*017	G	G	G	G	A	T	A	A	A	A	A	G	G	A	A	G	T	C	C	T	G	C	G	G	A	C	A	C	C	A	C	C	G	A	A	C	C	A	C	C	C	C	A
2DL1*018	G	G	G	G	A	T	A	A	A	A	A	G	G	A	A	G	T	C	C	T	G	C	G	G	A	C	A	C	C	G	C	C	G	A	A	C	C	C	C	C	C	C	A
2DL1*019	G	G	G	A	G	A	T	A	A	A	A	G	G	A	A	G	C	C	C	T	G	C	G	G	A	C	A	C	C	G	G	C	G	G	A	C	C	A	C	C	C	C	A
2DL1*020	G	G	G	G	A	T	A	A	A	A	A	G	G	A	A	G	T	C	C	T	G	C	G	G	A	C	A	C	C	G	C	C	G	A	A	C	C	A	C	C	C	C	A
2DL1*021	T	G	C	A	G	A	T	A	A	A	A	G	G	A	A	C	C	C	C	T	G	C	G	G	A	C	A	C	C	G	C	C	G	A	A	C	C	A	C	C	C	C	A
2DL1*022	G	G	C	A	G	A	A	A	A	A	A	G	G	A	A	G	C	C	C	T	G	C	G	G	A	C	A	C	C	G	C	C	G	A	A	C	C	A	C	C	C	C	A
2DL1*023	G	G	G	A	G	A	T	A	A	A	C	T	G	G	A	G	T	C	C	T	G	C	G	G	A	C	A	C	C	G	C	C	G	G	A	C	C	A	C	C	C	C	A
2DL1*024	G	G	G	A	G	A	T	G	A	A	A	G	G	A	A	G	C	C	A	C	A	T	G	G	G	C	G	C	C	G	C	T	G	A	A	C	C	A	C	C	C	C	A
2DL1*025	G	G	G	G	A	T	A	A	A	A	A	G	G	A	A	G	T	T	C	T	G	C	G	G	A	C	A	C	C	G	C	C	G	A	A	C	C	A	C	C	C	C	A
2DL1*026	G	G	G	A	G	A	T	A	A	A	A	G	G	A	A	G	C	C	C	T	G	C	G	G	A	C	A	C	C	G	C	C	A	A	A	C	C	A	C	C	C	C	A
2DL1*027	G	G	G	G	A	T	A	A	A	A	A	G	G	A	A	G	T	C	C	T	G	C	G	A	A	C	A	C	C	G	C	C	G	A	A	C	C	A	C	C	C	C	A
2DL1*028	G	G	G	A	G	A	T	A	A	A	A	G	G	A	A	G	C	C	A	C	A	T	G	G	G	C	G	C	C	G	C	C	G	A	A	C	C	A	C	C	C	C	A
2DL1*029	G	G	G	A	G	A	T	A	A	A	A	T	T	A	A	G	C	C	A	C	A	T	G	G	G	C	G	C	C	G	C	T	G	A	A	C	C	A	C	C	C	C	A
2DL1*030	G	G	G	G	A	T	A	A	A	A	A	G	G	A	A	G	T	C	C	T	G	C	G	G	A	C	A	C	C	G	C	C	G	A	A	C	C	A	C	C	C	C	A
2DL1*031	G	G	G	G	G	T	A	A	A	A	A	G	G	A	A	G	T	C	C	T	G	C	G	G	A	C	A	C	C	G	C	C	G	A	A	C	C	A	C	C	C	C	A
2DL1*032N	G	G	G	G	A	T	A	A	A	A	A	G	G	A	A	G	T	C	C	T	G	C	G	G	A	G	A	C	C	G	C	C	G	A	A	C	C	A	C	C	C	C	A
2DL1*033	G	G	G	G	A	T	A	A	A	A	A	G	G	A	A	G	T	C	C	T	G	C	G	G	A	C	A	C	C	G	C	C	G	A	A	G	C	A	C	C	C	C	A
2DL1*034	T	G	G	G	A	T	A	A	A	A	A	G	G	A	A	G	T	C	C	T	G	C	G	G	A	C	A	C	C	G	C	C	G	A	A	C	C	A	C	C	C	C	A

Figure 11 : Alignement des séquences ADNc des allèles KIR2DL1. En bleu : bases polymorphes différenciant les allèles KIR2DL1

Acides aminés	Signal	D1 Ig domain													D2 Ig domain						Stem		Transmb	Queue cytoplasmique							
		15	16	42	44	50	56	66	67	84	90	94	99	106	114	131	154	162	174	179	182	186	216	221	226	245	268	275	282	296	312
2DL1*001	V	G	P	E	M	R	H	I	S	T	V	S	I	E	P	R	P	A	T	G	H	Y	K	R	L	R	S	D	T	R	T
2DL1*002	F	G	P	E	M	R	H	I	S	T	V	S	I	E	P	R	P	A	T	G	H	Y	K	R	L	R	S	D	T	R	T
2DL1*003	V	G	R	E	M	R	H	I	S	T	V	S	I	E	L	R	P	A	T	G	H	Y	K	R	L	R	S	D	T	R	T
2DL1*004	V	G	R	E	M	R	H	I	S	T	V	S	I	E	P	R	T	N	T	G	R	Y	E	R	L	C	S	D	T	R	T
2DL1*005	V	G	R	E	M	R	H	I	S	T	V	S	I	E	L	R	P	A	T	G	H	Y	K	R	L	R	S	D	T	R	A
2DL1*006	V	G	R	E	M	R	H	I	S	T	V	S	I	E	L	R	P	A	T	G	H	Y	K	R	L	C	S	D	T	R	T
2DL1*007	V	G	R	E	M	R	H	I	S	T	V	S	V	E	P	R	T	N	T	G	R	Y	E	R	L	C	S	D	T	R	T
2DL1*008	F	D	P	E	M	R	H	I	S	T	V	S	I	E	P	R	P	A	T	G	H	Y	K	R	L	R	S	D	T	R	T
2DL1*009	V	G	R	E	M	R	H	I	S	T	V	S	I	E	L	R	P	A	T	G	H	Y	K	R	L	R	S	D	V	R	T
2DL1*010	V	G	R	E	M	R	H	I	S	T	V	S	I	E	P	R	T	N	T	G	R	Y	E	R	L	C	S	D	T	R	T
2DL1*011	F	G	R	E	M	R	H	I	S	T	V	S	I	E	P	R	T	N	T	G	R	Y	E	R	L	C	S	D	T	R	T
2DL1*012	V	G	R	E	M	R	H	I	S	T	V	S	I	E	P	R	P	A	T	G	H	Y	K	R	L	R	S	D	T	R	T
2DL1*014	V	G	R	E	M	R	H	I	S	T	V	S	I	E	L	R	P	A	T	S	H	Y	K	R	L	R	S	D	T	R	T
2DL1*015	V	G	R	E	M	R	H	I	S	T	V	S	I	E	L	R	P	A	T	G	H	Y	K	R	L	R	S	E	T	R	T
2DL1*016	V	G	R	E	M	R	H	I	S	T	V	S	I	E	L	R	P	A	T	G	H	Y	K	R	L	R	S	D	T	C	R
2DL1*017	V	G	R	E	M	R	H	I	S	T	V	S	I	E	L	R	P	A	T	G	H	Y	K	Q	L	R	S	D	T	R	T
2DL1*018	V	G	R	E	M	R	H	I	S	T	V	S	I	E	L	R	P	A	T	G	H	Y	K	R	L	R	S	D	T	R	T
2DL1*019	V	G	R	E	M	R	H	I	S	T	V	S	I	E	P	R	P	A	T	G	H	Y	K	R	V	R	S	D	P	R	T
2DL1*020	V	G	R	E	M	R	H	I	G	T	V	S	I	E	L	R	P	A	T	G	H	Y	K	R	L	R	S	D	T	R	T
2DL1*021	F	G	P	E	M	R	H	I	S	T	V	S	I	Q	P	R	P	A	T	G	H	Y	K	R	L	R	S	D	T	R	T
2DL1*022	V	G	P	E	K	R	H	I	S	T	V	S	I	E	P	R	P	A	T	G	H	Y	K	R	L	R	S	D	T	R	T
2DL1*023	V	G	R	E	M	R	H	I	S	P	L	S	I	E	L	R	P	A	T	G	H	Y	K	R	L	R	S	D	T	R	T
2DL1*024	V	G	R	E	M	R	R	I	S	T	V	S	I	E	L	R	T	N	T	G	R	Y	E	R	L	C	S	D	T	R	T
2DL1*025	V	G	R	E	M	R	H	I	S	T	V	S	I	E	L	W	P	A	T	G	H	Y	K	R	L	R	S	D	T	R	T
2DL1*026	V	G	R	E	M	R	H	I	S	T	V	S	I	E	P	R	P	A	T	G	H	Y	K	R	L	R	S	D	T	R	T
2DL1*027	V	G	R	E	M	R	H	I	S	T	V	S	I	E	L	R	P	A	N	S	H	Y	K	R	L	R	S	D	T	R	T
2DL1*028	V	G	R	E	M	R	H	V	S	T	V	S	I	E	P	R	T	N	T	G	R	Y	E	R	L	C	S	D	T	R	T
2DL1*029	V	G	R	E	M	R	H	I	S	T	F	S	I	E	P	R	T	N	T	G	R	Y	E	R	L	C	S	D	T	R	T
2DL1*030	V	G	R	E	M	R	H	I	S	T	V	G	I	E	L	R	P	A	T	G	H	Y	K	R	L	R	S	D	T	R	T
2DL1*031	V	G	R	G	M	R	H	I	S	T	V	S	I	E	L	R	P	A	T	G	H	Y	K	R	L	R	S	D	T	R	T
2DL1*032N	V	G	R	E	M	R	H	I	S	T	V	S	I	E	L	R	P	A	T	G	H	X	K	R	L	R	S	D	T	R	T
2DL1*033	V	G	R	E	M	R	H	I	S	T	V	S	I	E	L	R	P	A	T	G	H	Y	K	R	L	R	R	D	T	R	T
2DL1*034	F	G	R	E	M	R	H	I	S	T	V	S	I	E	L	R	P	A	T	G	H	Y	K	R	L	R	S	D	T	R	T



**Figure 12 : Alignement des séquences en Acides aminés des allèles KIR2DL1.** Colorées : bases polymorphes différenciant les allèles KIR2DL1 et sites de reconnaissance des anticorps anti-KIR2DL1 (vert : 1F12, bleu foncé : EB6, beige : 1A6, bleu clair : 8C11). D1 et D2= domaines protéiques.



## **8. Régulation transcriptionnelle des gènes KIR**

À l'exception du gène KIR2DL4 exprimé sur toutes les cellules NK (Stulberg et al., 2007), l'expression des autres gènes KIR se fait de façon clonale (Cicone et al., 1992). En d'autres termes, ces gènes KIR subissent un phénomène de « variéation » gouverné par des facteurs épigénétiques (Chan et al., 2005). Les hypothèses actuelles expliquant ce phénomène de « variéation », sont principalement basées sur la méthylation de l'ADN (Santourlidis et al., 2002). Ces études montraient que les gènes KIR2DL3, KIR3DL1 et KIR3DL2 non exprimés dans la lignée cellulaire NKL aussi bien que dans les cellules NK fraîchement isolées étaient méthylés au niveau des îlots CpG proches du site d'initiation de la transcription (Santourlidis et al., 2002), (Chan et al., 2003), (Chan et al., 2005). L'inhibition de cette méthylation avec de l'agent déméthylant 5-aza induisait l'expression des produits de ces gènes KIR (Santourlidis et al., 2002), (Chan et al., 2003), (Chan et al., 2005). A l'heure actuelle, trois principaux types de promoteurs sont connus, à savoir les promoteurs distaux, intermédiaires et proximaux. La région promotrice KIR distale située en amont des promoteurs KIR proximaux, contient plusieurs sites de fixation de certains facteurs de transcription tels que USF, AML, Myc, Elk-1, NF-E2 et Ets pour les gènes KIR3DL1 et KIR2DL4 (Stulberg et al., 2007). Ces promoteurs KIR distaux, sont généralement situés dans les régions intergéniques des gènes KIR (Stulberg et al., 2007), (Cichocki et al., 2011). Ces promoteurs distaux sont actifs dans les précurseurs des cellules NK n'exprimant pas de récepteurs KIR (Cichocki et al., 2009). La stimulation des cellules NK par de l'IL-15 améliore l'interaction du facteur de transcription endogène c-Myc dans ces régions promotrices distales entraînant ainsi une augmentation de la transcription des gènes KIR (Cichocki et al., 2009). Entre les promoteurs KIR distaux et KIR proximaux, se trouvent des promoteurs KIR intermédiaires tels que Pro1 présents dans tous les gènes KIR (Pascal et al., 2006). La transcription en sens inverse de ce promoteur Pro1 produit un ARN double brin non codant capable d'inhiber la transcription des gènes KIR (Pascal et al., 2006),

(Davies et al., 2007), (Wright et al., 2013) car les transcrits en sens inverse sont uniquement retrouvés dans les cellules NK dépourvues de récepteurs KIR (Davies et al., 2007). L'analyse de la région promotrice intermédiaire Pro1, a récemment montré quatre sites potentiels de fixation des facteurs de transcription C/EBP, AP-1, Oct-1 et Ets (Li et al., 2016). Les promoteurs KIR proximaux s'étendent sur une région de 270 pb, en amont du site du codon d'initiation de la traduction (Stewart et al., 2003). Ces promoteurs KIR proximaux contiennent plusieurs sites de liaison de facteurs de transcription, tels que CREB et AP-1 pour le gène KIR2DL4 et TCF-2 et STAT pour le gène KIR3DL1 (Stewart et al., 2003). L'activité de ces promoteurs KIR proximaux est bidirectionnelle. La transcription en sens inverse de ces promoteurs proximaux est associée à une inhibition de la transcription des gènes KIR via la production d'un ARN double brin non codant (Anderson, 2014). Enfin, le promoteur intermédiaire Pro1 semble représenter l'élément clé dans le contrôle des profils d'expression des récepteurs KIR, et la fonction primaire du promoteur proximal est le contrôle du phénomène de « variéation » des allèles KIR (Wright et al., 2014), (Li et al., 2016).

## **9. Méthodes d'études des gènes et allèles KIR**

Les méthodes de typage des gènes et allèles KIR, sont calquées sur celles utilisées pour étudier le polymorphisme des gènes HLA. De nos jours, plusieurs techniques ont été développées pour connaître le contenu en gènes ou en allèles KIR d'un individu. Ces techniques sont, d'une part des techniques de non séquençage d'ADN (PCR-SSP, PCR-SSOP, RT-PCR, PCR multiplex) (Schellekens et al., 2014) et, d'autre part des techniques de séquençage d'ADN (séquençage bi-allélique et séquençage nouvelle génération (NGS)). La PCR-SSP est la technique communément utilisée, pour connaître le contenu en gènes KIR d'un individu. Elle fut la première technique, à être développée en 1997 qui permettait de détecter la présence ou

non d'un gène KIR, en utilisant de l'ADN génomique et des couples d'amorces spécifiques de chaque KIR (Uhrberg et al., 1997). Cette technique fut par la suite optimisée pour permettre l'identification de nouveaux gènes et allèles de certains gènes KIR (Vilches et al. 2007), (Martin and Carrington, 2008). De nos jours, cette technique est toujours utilisée pour étudier les allèles KIR fonctionnels à partir de couples d'amorces spécifiques de certains groupes d'allèles (Bari et al., 2015). Cependant, la PCR-SSP produit des amplicons d'environ 2 kb en taille (Norman et al., 2002), générant parfois des faux négatifs à cause de la mauvaise qualité de l'ADN et ciblant un polymorphisme limité. Des techniques de PCR-SSP multiplex furent aussi développées pour surmonter certaines limites de la PCR-SSP. Ces PCR-SSP multiplex utilisent des groupes d'amorces permettant d'amplifier tous les gènes KIR d'un individu en utilisant, par exemple quatre groupes d'amorces (Sun et al., 2004) (Kulkarni et al., 2010). La PCR-SSP multiplex est utilisée, dans notre laboratoire, pour le génotypage KIR. Cette technique présente l'avantage, de générer des amplicons de moins de 1 kb et donne de bons résultats sur des ADN partiellement dégradés (Sun et al., 2004). La PCR-SSOP, quant à elle, est une autre technique utilisée pour détecter les gènes KIR. Cette technique nécessite d'avoir un grand volume d'ADN à tester pour la PCR, beaucoup de réactifs, et des étapes post-PCR lourdes (Crum et al., 2000). Les techniques de PCR-SSP et SSOP, restent souvent limitées à quelques gènes KIR et prennent globalement du temps, manquent de capacité pour caractériser de nouveaux allèles, quantifier le nombre de copies des gènes et ne sont pas adaptées pour l'analyse d'un grand nombre d'échantillons (Jiang et al., 2016). D'autres techniques ont été également développées, pour identifier la présence ou l'absence de chaque gène KIR chez un individu à savoir la RT-PCR et la qPCR multiplex. La technique de RT-PCR développée par Alves et al. en 2009 présente l'avantage d'être simple, fortement sensible, spécifique et ne nécessite pas d'étapes supplémentaires après la PCR (Alves et al., 2009). Enfin, la technique PCR quantitative multiplex à l'avantage d'identifier non pas que la présence ou l'absence des gènes KIR mais

aussi le nombre des copies des gènes, capable d'impacter le niveau d'expression des récepteurs KIR sur les cellules NK (Jiang et al., 2016).

Des techniques de séquençage peuvent aussi être utilisées pour déterminer le contenu en gènes ou en allèles KIR d'un individu. Ces techniques sont : le séquençage bi-allélique (SBT) et le séquençage nouvelle génération (NGS). La faisabilité de la SBT pour le typage des gènes ou allèles KIR fut démontrée dans plusieurs études (Hou et al., 2012) (Zhang and Deng, 2017). Cette technique de première génération a permis d'étudier la diversité des gènes KIR et de découvrir de nombreux nouveaux allèles KIR (Bao et al., 2010) (Zhen et al., 2015). La technique SBT fut initialement décrite en 1977 par Gilbert et Maxam (Maxam and Gilbert, 1977) en utilisant une approche de séquençage chimique et puis par Sanger (Sanger et al., 1977) en séquençant de l'ADN du bactériophage varphiX174 avec des terminateurs de chaînes. Ceci leur a valu le prix Nobel de chimie en 1980. La méthode de Sanger est largement utilisée en SBT et c'est la plus simple parmi les deux (Ambardar et al., 2016). La technique de séquençage de Sanger est précédée d'une étape d'amplification du gène KIR d'intérêt par réaction de polymérisation en chaîne (PCR) pour générer des matrices qui seront ensuite utilisées en séquençage. Cependant, cette technique est spécifique d'un seul locus et ne permet d'effectuer que 96 réactions de séquençage en parallèle (Rizzo and Buck, 2012). Ces premières technologies de séquençage ont fini par évoluer en deuxième et en troisième génération de séquençage (NGS) à partir des années 2004. En fait, ces séquençages de nouvelle génération possèdent plusieurs avantages, tels que la capacité de séquencer en parallèle tous les gènes KIR de plusieurs donneurs dans une même réaction, une meilleure sensibilité, séquençage monoallélique des gènes, l'absence d'ambiguïtés cis trans et la capacité d'identifier les nouveaux allèles ou les allèles déjà connus. De plus, le NGS peut être utilisé dans l'étude de l'exome, du génome entier et pour analyser les composants génomiques au niveau transcriptomique, épigénétique et de la structure de la chromatine (Pareek et al., 2011).

(Metzker, 2010). A l'heure actuelle, il existe deux plateformes technologiques majeures des séquenceurs de 2<sup>ème</sup> génération à savoir : les technologies Ion Torrent et Illumina. Ces deux technologies diffèrent entre elles dans leurs chimies de séquençage expliquant ainsi les différences dans le débit de séquençage, la longueur des « reads », le taux d'erreurs, la couverture de séquençage et la durée de séquençage (Loman et al., 2012). Contrairement aux autres nouvelles générations de séquençage, la technologie Illumina est connue pour générer moins d'erreurs, un haut débit et des étapes entièrement automatisées (Pillai et al., 2017). Dans cette technologie, les gènes d'intérêt peuvent être capturés par PCR long range et ensuite fragmentés en des fragments d'au moins 300 pb pour préparer la librairie. Des adaptateurs sont ensuite ajoutés dans la réaction pour permettre la reconnaissance de ces fragments d'ADN sur la flowcell pendant le séquençage. Après une étape de purification sur billes, différentes séquences nucléotidiques de 8 ou 9 pb (index) sont ajoutées à chaque librairie pour permettre de combiner plusieurs échantillons dans une même réaction. Ces fragments d'ADN, sont ensuite injectés dans le séquenceur, après dénaturation pour une amplification clonale par PCR bridge, pour générer des « clusters » identiques de chaque matrice d'ADN sur un support en verre nommé « flowcell » (Su et al., 2011). La réaction de séquençage commence par l'addition d'amorces de séquençage universelle s'hybridant sur les séquences d'adaptateurs ajoutées préalablement (Liu et al., 2012). La chimie de séquençage comporte trois étapes. Premièrement, la chaîne d'extension est effectuée en utilisant de l'ADN polymérase et quatre terminateurs nucléotidiques réversibles, marqués chacun avec un marqueur fluorescent différent. L'incorporation d'un nucléotide complémentaire entraîne la fin de la polymérisation. Les nucléotides non incorporés sont ensuite nettoyés et chaque base incorporée est identifiée après excitation par une caméra. Enfin, le fluorochrome et les terminateurs sont chimiquement clivés pour préparer les matrices au prochain cycle. Ces étapes sont répétées sur plus de 100 cycles générant ainsi une série chronologique d'images colorées qui seront converties en des

séquences de lectures ou « reads » (Moorthie et al., 2011). Ces séquences sont par la suite collectées pour être analysées avec des logiciels bio-informatiques. Par ailleurs, les technologies de séquençage NGS de 3<sup>ème</sup> génération présentent l'avantage de générer des long reads allant jusqu'à 100 kb facilitant ainsi l'alignement des séquences au génome de référence, particulièrement dans les régions répétées facilitant les analyses (Moorthie et al., 2011). Cependant, ces technologies NGS de 3<sup>ème</sup> génération génèrent à l'heure actuelle beaucoup d'erreurs pendant le séquençage. La faisabilité de ces séquençages de nouvelle génération (NGS) dans la détermination des allèles KIR, (Bultitude et al. 2018) (Kidd et al., 2014) (Norman et al., 2016) et la définition des haplotypes KIR (Bruijnesteijn et al., 2018), a été récemment démontrée dans quelques études.

#### **10. Analyse du répertoire des cellules NK KIR<sup>+</sup>**

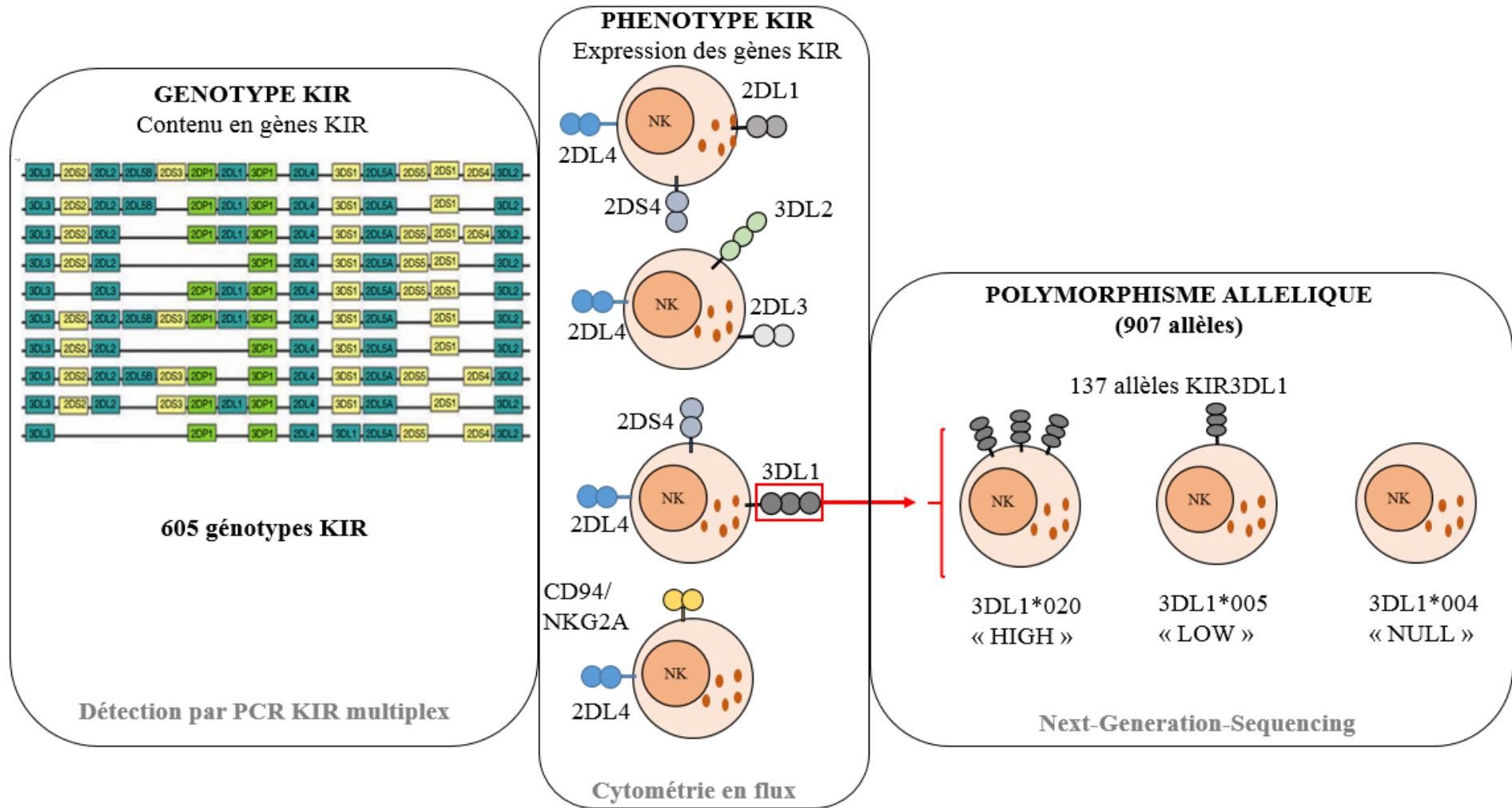
L'acquisition des récepteurs KIR survient progressivement au cours du développement des cellules NK (Björkström et al., 2010). Cette expression est augmentée au dernier stade de développement des cellules NK via la voie de signalisation de Notch (Felices et al., 2014). L'expression de certains récepteurs KIR sur les cellules NK ou sur certains lymphocytes T peut être détectée en cytométrie en flux (**figure 13**), en utilisant des combinaisons d'anticorps permettant de discriminer les sous populations des cellules NK exprimant chaque KIR. Ainsi, l'utilisation de la combinaison d'anticorps monoclonaux DX9 et Z27 spécifiques du KIR3DL1 et du KIR3DL1/S1 permet d'identifier le profil d'expression des produits d'allèles KIR3DL1 sur les cellules NK (**figure 13**) (Trundley et al., 2007). Les récepteurs KIR2D fonctionnels tels que les KIR2DL1/L2/L3/S1/S2 peuvent être détectés avec les anticorps commercialisés EB6, anti-2DL3, anti-2DL1, GL183, P50 (Vitale et al., 2004), (Falco et al., 2010) et avec des anticorps produits dans notre laboratoire de recherche tels que 8C11, 1F12, 4A8 et 1A6 (David et al., 2009). L'anticorps EB6 reconnaît l'arginine (R) situé en position 50 du domaine D1 des

récepteurs KIR2DL1 et KIR2DS1 codés par tous leurs allèles connus à ce jour, comme illustré pour le récepteur KIR2DL1 sur **la figure 12** (Falco et al., 2010). De plus, cet anticorps peut reconnaître l'arginine (R) en position 50 des produits des allèles KIR2DL3\*004, KIR2DL3\*005, KIR2DL3\*010, KIR2DL3\*014, KIR2DL3\*017 et KIR2DL3\*018. L'anticorps anti-2DL3 spécifique du récepteur KIR2DL3, reconnaît la glutamine (Q) en position 35 des produits de tous les allèles KIR2DL3 sauf les allèles KIR2DL3\*004, KIR2DL3\*005, KIR2DL3\*010, KIR2DL3\*014, KIR2DL3\*015, KIR2DL3\*017 et KIR2DL3\*018 possédant l'acide glutamique (E) à cette position 35 (Vitale et al., 2004), (Falco et al., 2010). Les anticorps anti-2DL1, GL183 et P50 reconnaissent respectivement les récepteurs KIR2DL1, KIR2DL2/L3/S2 et KIR2DS4. Le site de reconnaissance de ces anticorps n'est pas bien connu. L'anticorps 8C11, reconnaît la proline (P) en position 154 du domaine D2 de tous les produits des allèles KIR2DL2/L3/S2 et KIR2DL1 sauf les produits des allèles KIR2DL1\*004, KIR2DL1\*007, KIR2DL1\*010, KIR2DL1\*011 et KIR2DL1\*024, comme illustré sur **la figure 12**. L'anticorps 1F12, reconnaît la proline en position 16 du domaine D1 des produits de tous les allèles KIR2DL3/S2 et des produits des allèles KIR2DL2\*004, KIR2DL2\*006, KIR2DL2\*011, KIR2DL1\*001, KIR2DL1\*002, KIR2DL1\*008, KIR2DL1\*021 et KIR2DL1\*022, comme illustré sur **la figure 12** (David et al., 2009). L'anticorps 4A8 reconnaît l'arginine (R) situé en position 33 du domaine D1 des produits de tous les allèles KIR2DL2/L3 et KIR2DS2. Enfin, l'anticorps 1A6 spécifique va reconnaître la proline en position 114 du domaine D2 des produits de tous les allèles KIR2DL2/L3/S1/S2 sauf l'allèle KIR2DL3\*011 possédant une leucine (L) à cette position. Cet anticorps peut aussi reconnaître les produits d'allèles KIR2DL1\*001, KIR2DL1\*002, KIR2DL1\*004, KIR2DL1\*007 et d'autres allèles KIR2DL1 possédant une proline (P) la position 114 du domaine D2 (**figure 12**). La combinaison de ces anticorps, permet d'étudier le niveau d'expression des produits de chaque allèle KIR, sur les cellules NK et sur certaines sous-populations de lymphocytes T. Ce niveau

d'expression des récepteurs KIR, sur les cellules NK peut être impacté par la nature de l'allèle, comme montré pour le récepteur KIR3DL1. L'expression du récepteur KIR3DL3 est faible ou parfois indétectable sur les cellules NK circulantes (Long et al., 2001).

Plusieurs paramètres peuvent orienter la structuration du répertoire des cellules NK KIR<sup>+</sup>, tels que l'environnement HLA de classe I du donneur, le statut CMV et la vieillesse. Le rôle des gènes HLA de classe I sur la formation du repertoire NK KIR est toujours débattu. Certaines études ont montré que, l'environnement HLA de classe I joue un rôle sur l'expression des récepteurs KIR sur les cellules NK. La présence du ligand HLA classe I d'un récepteur KIR donné chez un individu est associée à une augmentation de la fréquence des cellules NK exprimant ce récepteur KIR (Yawata et al., 2006), (Schönberg et al., 2011). Cependant, d'autres études ont montré que la présence du ligand HLA de classe I chez le donneur n'influence pas la formation du repertoire KIR (Andersson et al., 2009). Par ailleurs, l'infection à CMV entraîne une forte expansion des cellules NK NKG2C<sup>+</sup> associée à une co-expression avec le récepteur KIR2DL3 (Gumá et al., 2004) (Guma, 2006), (Djaoud et al., 2013). Enfin, le pourcentage des cellules NK et le niveau d'expression des récepteurs KIR sur les cellules NK augmentent avec l'âge de l'individu (Lutz et al., 2005).





**Figure 13 : Expression clonale des récepteurs KIR sur les cellules NK**

Les récepteurs KIR sont exprimés de façon clonale sur les cellules NK (cadran du milieu). Cette expression est gouvernée par plusieurs facteurs, tels que le génotype KIR de l'individu et le polymorphisme allélique. Différents clones NK peuvent être présents chez un individu. Ici, 4 clones représentatifs sont illustrés exprimant différentes combinaisons de récepteurs KIR activateurs et inhibiteurs exprimés.

# **LES OBJECTIFS DES TRAVAUX DE THESE**

## 1. Travaux antérieurs de l'équipe

Notre équipe de recherche développe une thématique axée sur la compréhension des mécanismes immunitaires d'histocompatibilité en greffes de CSH allogéniques en ciblant certains récepteurs NK.

Sur le plan immunogénétique, nous avons étudié, outre la diversité des gènes KIR dans différentes populations (Denis et al., 2005), l'impact des gènes KIR entre donneurs et receveurs sur le devenir des greffes de CSH (MO et CSP) (Gagne et al., 2002), (Bignon and Gagne, 2005), (Gagne et al., 2007). Ainsi, sur un effectif local de greffes de CSH, nous avons montré que certaines incompatibilités des gènes KIR au niveau générique entre donneur/receveur étaient associées à un risque accru de GvHD aigue (Gagne et al., 2002). Sur un effectif national de greffes de CSH, nous avons montré que la combinaison « gène KIR3DL1/3DS1 présent chez le donneur et ligand Bw4 présent chez le receveur » était associée à une diminution de l'incidence de la rechute chez des couples HLA non-identiques (Gagne et al., 2009). Sur un plan plus fondamental, nous avons rapporté l'impact phénotypique et fonctionnel du polymorphisme allélique KIR3DL1 chez une cohorte de donneurs de sang (Gagne et al., 2013). En parallèle, grâce à l'utilisation d'anticorps anti-KIR spécifiques développés au laboratoire permettant de discriminer les récepteurs KIR inhibiteurs de leurs homologues activateurs (David et al., 2009), nos travaux ont permis de mieux comprendre l'immunobiologie des sous-populations NK KIR<sup>+</sup> qui expriment notamment les récepteurs KIR2DS1 (Morvan et al., 2008), KIR2DS2 (David et al., 2013) et KIR3DS1 (Morvan et al., 2009). En particulier, nous avons montré que le récepteur KIR2DL3 présente un large spectre de reconnaissance des molécules HLA de classe I contrairement à une spécificité de ligand stricte pour le récepteur KIR2DL1 (David et al., 2013). Entre 2011 et 2015, nous nous sommes focalisés sur le rôle d'une alloréactivité NK KIR<sup>+</sup> sur la prise et sur l'effet anti-leucémique post-dUCBT. Sur un effectif local de dUCBT, nous avons montré que la présence du gène KIR3DL1 chez le cordon

« perdant » associée à l'absence du ligand correspondant Bw4 chez le cordon « gagnant » est associée à la dominance d'un seul cordon, à un délai de reconstitution des neutrophiles plus court et à une incidence de rechute augmentée (Rettman et al., 2017). Le récepteur KIR3DL1 est exprimé au niveau des cellules NK de sang de cordon et ces cellules NK KIR3DL1<sup>+</sup> de cordon sont alloréactives vis-à-vis de cibles Bw4- (Rettman et al., 2017). Depuis 2015, nos travaux se concentrent sur l'étude de la reconstitution des cellules NK post-greffes de CSH HLA haplo-identiques non T déplétées avec ajout de cyclophosphamide en pleine essor (Retière et al., 2018).

## **2. Questions en suspens**

Dans les diverses études immunogénétiques menées jusqu'à présent au laboratoire en greffes de CSH, l'analyse du polymorphisme des gènes KIR est faite uniquement au niveau « générique » (gène KIR présent ou absent) et aucune étude de l'impact du polymorphisme allélique de tous les gènes KIR sur le répertoire fonctionnel NK KIR<sup>+</sup> n'a été rapportée jusqu'à présent. Nos travaux combinant à la fois des études génétiques et cellulaires confortent la nécessité d'étudier plus finement la diversité allélique des gènes KIR afin de mieux appréhender l'alloréactivité des cellules NK KIR<sup>+</sup>. L'opportunité de pouvoir évaluer le polymorphisme allélique KIR devrait permettre de mieux définir les sous-populations NK KIR<sup>+</sup> fonctionnelles.

La connaissance du polymorphisme allélique des gènes HLA a pu se faire grâce au développement des techniques de typages. Ces dernières années, l'avènement de la technologie NGS permet d'étudier finement le polymorphisme allélique des gènes HLA notamment au laboratoire HLA de l'EFS de Nantes où sont déterminés les allèles HLA des couples donneur/receveur de greffes de CSH réalisées au service d'hématologie du CHU de Nantes. Notre laboratoire a souhaité développer une approche NGS appliquée à l'étude du

polymorphisme allélique KIR qui potentiellement peut impacter le phénotype et la fonction des cellules NK KIR<sup>+</sup>. L'intérêt grandissant des greffes haploidentiques non T déplétées avec de fortes doses de cyclophosphamide post-greffe constitue un contexte favorable aux incompatibilités KIR/HLA et notre équipe a montré récemment l'importance de ces incompatibilités KIR/HLA, plus particulièrement les incompatibilités KIR2DL/HLA-C, sur le devenir des greffes de CSH (**Article soumis, annexe**). L'investigation de ces incompatibilités KIR2DL/HLA-C au niveau allélique pourrait permettre d'identifier les combinaisons d'allèles KIR2DL/HLA-C bénéfiques afin de mieux sélectionner les donneurs de greffes de CSH sur des bases alléliques KIR/HLA.

### **3. Objectifs du travail de thèse**

Mon projet de thèse vise donc :

- 1) À mettre en place une nouvelle approche d'étude du polymorphisme de tous les gènes KIR par NGS pour le typage des allèles KIR (**Articles N°1, N°2**) ;
- 2) De mettre en lien les données alléliques KIR avec le phénotype et la fonction des cellules NK KIR<sup>+</sup> par cytométrie multi-couleurs dans le but de mieux comprendre la structuration et la fonction du répertoire NK KIR<sup>+</sup> (**Article N°3 en préparation**).

# **RESULTATS**

## **RESULTATS**

Article N°1 : Détermination des allèles KIR par Séquençage Nouvelle Génération (NGS)

**Killer Immunoglobulin-like Receptor determination using Next-Generation Sequencing technology**

**Maniangou Bercelin**, Legrand Nolwenn, Alizadeh Mehdy, Guyet Ulysse, Willem Cathérine, David Gaele, Charpentier Eric, Walencik Alexandre, Retière Christelle, Gagne Katia.

(Publié en Mai 2017, *Frontiers in Immunology*, IF : 5.51)

L'étude du polymorphisme allélique de tous les KIR, reste difficile à investiguer par manque de techniques appropriées. A ce jour, plusieurs techniques peuvent être utilisées pour déterminer le contenu en allèles KIR d'un individu, telles que la PCR-SSP, PCR-SSOP et la PCR-SBT (Schellekens et al., 2014). Ces techniques sont souvent spécifiques d'un seul locus. Des technologies de séquençage nouvelle génération peuvent également être utilisées pour connaître le contenu en allèles KIR de donneurs, comme démontré dans l'étude de l'exome au laboratoire de Peter Parham aux USA (Kidd et al., 2014). La méthode de capture de l'exome par NGS, pour l'étude du polymorphisme des allèles KIR, développée dans ce laboratoire américain est très intéressante et a permis la découverte de 31 nouveaux allèles KIR chez 15 individus. Cependant, cette méthode de typage des allèles KIR ne permet pas de cibler uniquement les allèles KIR mais aussi des variants HLA et d'autres gènes. De plus, cette approche prend énormément du temps et ne peut pas être utilisée en routine pour le typage des allèles KIR. Le processus de séquençage génère énormément de données nécessitant d'avoir des algorithmes d'analyses performants pour prendre en compte l'analyse des gènes KIR, HLA et autres (Maniangou et al., 2018). Par conséquent, nous avons décidé de développer une approche technologique NGS pour déterminer le contenu en allèles de tous les gènes KIR d'un individu, dans le but d'étudier la diversité de ces allèles KIR chez les donneurs de sang de l'Etablissement Français du sang Pays de la Loire (EFS-PL) site de Nantes. Cette approche technologique NGS de Nantes a été développée à partir de trente ADN de référence du 10<sup>ème</sup> Workshop International d'Histocompatibilité et d'Immunogénétique, dont le typage allélique HLA et KIR est connu pour certains gènes. Les gènes KIR de chaque ADN de référence ont été préalablement capturés, par PCR long range avec 6 amorces KIR intergéniques dont 5 décrites dans la littérature (Vendelbosch et al., 2013) plus une amorce KIR2DL3 conçue au laboratoire. Ensuite, les produits PCR ont été séquencés et analysés pour connaître le typage allélique KIR. Dans notre approche, nous confirmons l'amplification et le séquençage de tous les gènes KIR.



Cependant, le gène KIR2DL5A ne ressortait pas avec le logiciel d'analyse *Profiler* dû probablement à un problème de « mapping » avec la référence utilisée dans l'ancienne version de *Profiler*. La nouvelle version du logiciel *Profiler* arrive à détecter tous les allèles KIR2DL5A. La moyenne de couverture de séquençage des gènes KIR allait de 62.5x (KIR2DS4) à 2.373x (KIR3DP1) entraînant une moyenne de couverture de séquençage de 316.5x pour tous les gènes KIR sauf le gène KIR2DL5A. Cette couverture de séquençage pour chaque gène KIR corrélait significativement avec la taille génomique de ces gènes ( $r = 0.85$ ,  $p < 0.0001$ ). Aussi, la moyenne du pourcentage d'alignement des gènes KIR par rapport à leurs références allait de 86.2% (KIR3DL2) à 98.2% (KIR2DP1 et KIR3DP1). Pour l'assignement des allèles KIR de chaque ADN de référence testé, nous avons d'un part collaboré avec les bioinformaticiens de la plateforme génomique de Nantes (E. Charpentier, U. Guyet) pour développer un algorithme d'analyse des données NGS KIR et d'autre part avec le laboratoire de Recherche de l'EFS de Rennes (Dr M. Alizadeh) pour l'utilisation du logiciel « *Profiler* », préalablement développé pour l'analyse des données NGS HLA mais optimisé pour l'analyse des gènes KIR. Une comparaison détaillée des typages alléliques de chaque gène KIR obtenus par notre approche NGS avec ceux obtenus sur 22 ADNs de référence par l'approche NGS exome (Norman et al., 2016), montre une concordance de 100% pour 11 gènes KIR (KIR2DS2, KIR2DL5B, KIR2DS3, KIR2DL1, KIR2DL4, KIR3DL1, KIR3DS1, KIR2DL5A, KIR2DS5, KIR2DS1 et KIR2DS4) et une concordance allant de 80% à 91% pour les gènes KIR restants. Par notre approche NGS.KIR, nous avons pu identifier de nombreux allèles KIR sur ces 30 ADNs de référence testés par rapport à ceux connus dans la base des données IPD-KIR. L'ensemble de résultats présentés dans ce 1<sup>er</sup> article, montre la fiabilité de notre approche NGS.KIR, pour l'étude du polymorphisme allélique KIR chez les donneurs de greffes de CSH.



# Killer Immunoglobulin-Like Receptor Allele Determination Using Next-Generation Sequencing Technology

**Bercelin Maniangou<sup>1,2</sup>, Nolwenn Legrand<sup>1,2</sup>, Mehdi Alizadeh<sup>3</sup>, Ulysse Guyet<sup>4</sup>, Catherine Willem<sup>1,2</sup>, Gaëlle David<sup>1,2</sup>, Eric Charpentier<sup>4</sup>, Alexandre Walencik<sup>5</sup>, Christelle Retière<sup>1,2</sup> and Katia Gagne<sup>1,2,5,6\*</sup>**

<sup>1</sup>Etablissement Français du Sang Pays de la Loire, Nantes, France, <sup>2</sup>CRCINA, INSERM U1232 CNRS, Université d'Angers, Université de Nantes, Nantes, France, <sup>3</sup>Laboratoire de Recherche et Développement, EFS Rennes, Rennes, France, <sup>4</sup>L'institut du thorax, INSERM, CNRS, UNIV Nantes, Nantes, France, <sup>5</sup>Laboratoire d'Histocompatibilité, EFS Nantes, Nantes, France, <sup>6</sup>LabeX Transplantex, Université de Strasbourg, Strasbourg, France

## OPEN ACCESS

### Edited by:

Gianfranco Pittari,  
Hamad Medical Corporation, Qatar

### Reviewed by:

Daniel Olive,  
Institut national de la santé et de la  
recherche médicale  
(INSERM), France  
Dean Anthony Lee,  
The Research Institute at Nationwide  
Children's Hospital, USA  
Mary Carrington,  
Leidos Biomedical Research Inc.,  
USA

### \*Correspondence:

Katia Gagne  
katia.gagne@efs.sante.fr

### Specialty section:

This article was submitted to  
Alloimmunity and Transplantation,  
a section of the journal  
Frontiers in Immunology

**Received:** 23 January 2017

**Accepted:** 24 April 2017

**Published:** 19 May 2017

### Citation:

Maniangou B, Legrand N,  
Alizadeh M, Guyet U, Willem C,  
David G, Charpentier E, Walencik A,  
Retière C and Gagne K (2017) Killer  
Immunoglobulin-Like Receptor Allele  
Determination Using Next-Generation  
Sequencing Technology.  
*Front. Immunol.* 8:547.  
doi: 10.3389/fimmu.2017.00547

The impact of natural killer (NK) cell alloreactivity on hematopoietic stem cell transplantation (HSCT) outcome is still debated due to the complexity of graft parameters, HLA class I environment, the nature of killer cell immunoglobulin-like receptor (KIR)/KIR ligand genetic combinations studied, and KIR<sup>+</sup> NK cell repertoire size. KIR genes are known to be polymorphic in terms of gene content, copy number variation, and number of alleles. These allelic polymorphisms may impact both the phenotype and function of KIR<sup>+</sup> NK cells. We, therefore, speculate that polymorphisms may alter donor KIR<sup>+</sup> NK cell phenotype/function thus modulating post-HSCT KIR<sup>+</sup> NK cell alloreactivity. To investigate KIR allele polymorphisms of all KIR genes, we developed a next-generation sequencing (NGS) technology on a MiSeq platform. To ensure the reliability and specificity of our method, genomic DNA from well-characterized cell lines were used; high-resolution KIR typing results obtained were then compared to those previously reported. Two different bioinformatic pipelines were used allowing the attribution of sequencing reads to specific KIR genes and the assignment of KIR alleles for each KIR gene. Our results demonstrated successful long-range KIR gene amplifications of all reference samples using intergenic KIR primers. The alignment of reads to the human genome reference (hg19) using BiRD pipeline or visualization of data using Profiler software demonstrated that all KIR genes were completely sequenced with a sufficient read depth (mean 317x for all loci) and a high percentage of mapping (mean 93% for all loci). Comparison of high-resolution KIR typing obtained to those published data using exome capture resulted in a reported concordance rate of 95% for centromeric and telomeric KIR genes. Overall, our results suggest that NGS can be used to investigate the broad KIR allelic polymorphism. Hence, these data improve our knowledge, not only on KIR<sup>+</sup> NK cell alloreactivity in HSCT but also on the role of KIR<sup>+</sup> NK cell populations in control of viral infections and diseases.

**Keywords:** high-resolution killer cell immunoglobulin-like receptor typing, allele polymorphism, next-generation sequencing, International Histocompatibility Workshop DNA samples, Natural killer cells

## INTRODUCTION

Hematopoietic stem cell transplantation (HSCT) provides a curative therapy for many patients with hematological malignancies (1). Donors for HSCT are currently selected based on the level of matching for HLA-A, -B, -C, -DRB1, and -DQB1 loci. Siblings, 10/10 HLA matched, remain the gold standard. However, substantial risks of morbidity and mortality caused by disease relapse (2), graft-vs-host-disease (GvHD) (3), and infection (4) are still prevalent after related, or unrelated HSCT. Natural killer (NK) cells are the first post-HSCT cells, reconstituting antiviral and antitumoral activity (5). NK cells are able to recognize the missing-self *via* killer cell immunoglobulin-like receptors (KIRs) (6). Ruggeri et al. (7) were first to report the beneficial effect of KIR ligand mismatched donor NK cell alloreactivity after T cell-depleted HLA haplo-identical HSCT resulting in less relapse, less GvHD, and better overall survival in patients with acute myeloid leukemia. The impact of KIR<sup>+</sup> NK cell alloreactivity on HSCT outcome is still controversial due to the heterogeneity of graft parameters, HLA class I environment, nature of KIR/KIR ligand genetic combinations studied, and KIR<sup>+</sup> NK cell repertoire size (8–12).

As HLA class I genes, KIR genes are highly polymorphic (13). In humans, 16 KIR genes have been described including eight inhibitory genes (2DL1/L2/L3/L4/L5, 3DL1/L2/L3), 6 activating genes (2DS1/S2/S3/S4/S5, 3DS1), 2 two pseudogenes (2DP1, 3DP1). These genes are located within the leukocyte receptor cluster found on chromosome 19q13.4, spanning a region of 150 kb. Within a population, the genotypic diversity of KIR genes occurs at different levels. First, the number and nature of KIR genes vary between individuals defining different KIR haplotypes. KIR haplotypes are classified into group A and group B (14). The group A haplotype is defined by a fixed set of nine KIR genes: four framework KIR genes (3DL3, 3DP1, 3DL2, and 2DL4) that form the centromeric and telomeric part of KIR locus, three inhibitory KIR (2DL1, 2DL3, and 3DL1), a pseudogene (2DP1), and a single activating KIR gene (2DS4). The group B haplotype is defined as having a variable number of KIR genes (7–14) including the four framework KIR genes and specific KIR genes (2DS2, 2DL2, 2DL5, 2DS3, and 2DS1). Second, a variable number of copies [copy number variation (CNV)] of the gene generated by recombination and replication have also been described for some KIR genes particularly those of the B haplotype (15–17). The CNV seems to influence the licensing of KIR<sup>+</sup> NK cells (18). Overall, various KIR genotypes can be observed in a population. All KIR genes, and especially for inhibitory KIR, a high degree of allelic polymorphism has been described. The latest KIR Immuno Polymorphism Database (IPD–KIR) describes 753 KIR alleles. KIR allele polymorphisms need to be investigated throughout the exon and the intron regions, and regulatory regions as shown for KIR3DL1 (19). In contrast to HLA class I genes, structure and length of KIR genes vary. KIR allele polymorphisms impact both KIR<sup>+</sup> NK cell phenotype and function, as we and other groups having described for KIR3DL1 (20–25) and for KIR2DL2/L3 (26). Differences in the intensity of expression (strong, weak, or null) have been described for the KIR3DL1 receptor, defining different allotypes according to the

KIR3DL1/3DS1 allele combinations present in healthy individuals (21, 27). Furthermore, the nature of KIR3DL1 alleles does not only impact the KIR3DL1 cell density but also the strength of the KIR3DL1–HLA interactions which in turn can affect NK cell functions (28, 29). The recognition of KIR allotypes using anti-KIR monoclonal antibodies also varies depending on the KIR allele polymorphism (30).

Taking these points into account, it is therefore necessary to thoroughly investigate the phenotypic and functional impact of KIR allele polymorphisms. Until now, potential KIR<sup>+</sup> NK cell alloreactivity in HSCT was mainly evaluated depending on the KIR/KIR ligand genetic combinations present and analyzed only at a generic level (i.e., presence or absence of KIR genes and KIR ligand). We speculate that KIR allele polymorphisms may alter donor KIR<sup>+</sup> NK cell phenotype/function, and thus modulate their alloreactivity affecting HSCT outcome. However, the impact of KIR allele polymorphisms on HSCT outcome remains difficult to assess due to the lack of suitable allele typing methods for all KIR genes. Until recently, several standard methods are used to type KIR genes at allelic level. Those methods include sequence-specific oligoprobe hybridization (31–37), sequence-specific primer (SSP) typing (22), SNP assay (38), Sanger sequence-based typing (SBT) (20, 39–42), high-resolution melting (43), and also combined SSP/SBT (21, 44). KIR allelic polymorphisms have been investigated for a few functional KIR genes (KIR2DL1/2DL2/2DL3/2DS1/3DL1/3DS1). Standard methods to type KIR genes at allelic level are usually single KIR locus specific and/or target a limited polymorphism. In addition, the constant increase in the number of KIR alleles described generates more and more ambiguous KIR typing in heterozygous samples since KIR polymorphism can extend over the entire gene. Recent advances in high-throughput sequencing technology [next-generation sequencing (NGS)], especially in immunology and hematology (45), enable determination of KIR alleles and KIR gene CNV. The extent of KIR allele polymorphisms, as demonstrated by exome capture, reported 37 new KIR alleles from 15 healthy South African individuals (46). Recently, whole KIR genome sequencing by NGS was used as a control method to validate CNV genotyping in the KIR locus (17). An exome capture that focused on KIR and HLA class I loci was also recently described (47). In this study, we developed a reliable NGS method for high quality DNA samples and easily implemented for the study of KIR allele polymorphisms.

## MATERIALS AND METHODS

### Samples

Thirty B-EBV cell lines from the 10th International Histocompatibility Workshop (IHW) were selected from a well-characterized panel known for their KIR gene content. KIR genotype information, including KIR allele typing of some KIR genes for all these B-EBV cell lines, was obtained either from the IPD/KIR database or from literature for specific KIR loci. Known KIR genotypes and allele typing of these 30 B-EBV cell lines are provided in the Table S1 in Supplementary Material.

## KIR Long-Range (LR) PCR and Primers

DNA genomic extractions were performed from B-EBV cell lines using a Nucleospin blood kit (Macherey-Nagel, Duren, Germany). The concentration and the purity of all DNA samples were checked on a NanoDrop 2000C spectrophotometer (ThermoFisher, Wilmington, DE, USA) by measuring the ratio of absorbance at 260 and 280 nm. In parallel, 1.5 µg of each DNA sample was loaded on an agarose gel to check the DNA integrity. For KIR LR PCR, five intergenic KIR primers already described (17) and one additional *in-house* designed primer including four forward primers (#1, 5'-gccaataaacatctgtgctgctcagct-3'; #2, 5'-ctcacaacatctgtgtgctgctaactga-3'; #4, 5'-acggctgcctgtctgcacagacagcacc-3'; #6, 5'-cacatgctgcaccggctcagtcgagccga-3') and two reverse primers (#3, 5'-ttggagaggtggcaggggtcaagt-3'; #5, 5'-ctccatctgagggtcccgtgaatg-3') were used to amplify the whole KIR genome.

The KIR LR-PCR protocol was optimized using the method described by Vendelbosch et al. (17). Briefly, KIR LR-PCR was performed with 2.5 U of PrimeSTAR GXL DNA Polymerase (Ozyme, Saint-Quentin en Yvelines, France), 1× PrimeSTAR GXL buffer, 200 µM of dNTP mixture (Ozyme) and 0.2 µM final concentration of each KIR primer. The LR-PCR reaction was performed in a C1000 Touch™ Thermal Cycler (Biorad, Marnes la Coquette, France) consisted of an initial denaturation of 2 min at 94°C followed by 30 cycles of 20 s at 94°C, 12 min at 68°C and 1 cycle of final elongation of 10 min at 72°C in the final 50 µL volume. This protocol enables amplification of each KIR gene from 5' to 3' untranslated regions (UTR). The final KIR LR-PCR product was run on 0.7% Seakem agarose gel in TBE1X (Lonza, Verviers, Belgium) and visualized by staining with the SYBR® safe (Invitrogen, Villebon sur Yvette, France) using the SimplyLoad™ Tandem DNA ladder size marker (Ozyme) to confirm the amplification and correct fragment size as well as to check for non-specific amplification.

## Library Preparation and Sequencing

Qubit dsDNA High Sensitivity Assay Kit (Life Technologies, Villebon sur Yvette, France) was used to quantify the starting DNA library in the Qubit® fluorometer (Life Technologies). The library preparation was performed using the NGSgo GENDX kit (Bedia Genomics, Chavenay, France). To achieve the optimal insert size and library concentration, 250 ng of each genomic DNA was randomly fragmented according to the manufacturer's instructions. Briefly, 8.25 µL of NGSgo master mix (prepared from 2 µL of NGSgo-LibrX Fragmentase buffer plus 3.25 µL of NGSgo-LibrX End Prep buffer plus 1.5 µL of NGSgo-LibrX Fragmentase Enzyme plus 1.5 µL NGSgo-LibrX End Prep Enzyme) (Bedia Genomics, Chavenay, France) was added to each genomic DNA in a final volume of 32.5 µL. The fragmentation, end-repair, and dA-tailing reactions were performed in a T100™ Thermal Cycler (Biorad, France) consisted of 20 min of fragmentation and end-repair at 25°C followed by 10 min of dA-tailing at 70°C. The dA-tailed DNA fragments of each sample were then subjected to adapter ligation in 9.25 µL of an NGSgo master mix containing 7.5 µL of NGSgo-LibrX Ligase mix, 0.5 µL of NGSgo-LibrX Ligation Enhancer, 0.25 µL of NGSgo-Indx adapter for Illumina, and 1 µL of nuclease free water. The adapter ligation reaction took place in a T100™ Thermal Cycler (Biorad, France) for 15 min at

20°C followed by a cooling step at 15°C. The first cleaning and size selecting of the samples after adapter ligation were performed in a 0.45× beads:DNA ratio by using the Agencourt® Ampure XP (Beckman Coulter, Villepinte, France) according to the manufacturer's instructions and eluted in 12.5 µL of 0.1× elution buffer (Lonza Rockland, USA). The size-selected, adapter-ligated DNA fragments of each DNA sample were then dual indexed with 15 µL of NGSgo reaction mix made from 12.5 µL of NGSgo-LibrX HiFi PCR mix plus 1.25 µL of NGSgo-Indx IN-5 and 1.25 µL of NGSgo-Indx IN-7 in a final volume of 25 µL followed by a PCR reaction in a T100™ Thermal Cycler (Biorad). PCR cycling was performed as follows: an initial denaturation of 30 s at 98°C followed by 10 cycles of 10 s at 98°C, 30 s at 65°C, 30 s at 72°C and 1 cycle of final elongation step of 5 min at 72°C in the final volume of 25 µL. A second DNA cleaning and size selecting was performed in a 0.6× beads: DNA ratio by using the Agencourt® Ampure XP beads according to the manufacturer instructions and eluted in 16.5 µL of 0.1× elution buffer (Lonza Rockland, USA).

Quality control procedure for the library preparation included verification of fragment size before and after purification by using the QiAxcel Advanced System (QiAgen, Courtaboeuf, France). The pooled and barcoded libraries were denaturated with 0.2 M of NaOH and diluted in the pre-chilled HT1-buffer to obtain a final library concentration of 12 pM. The final denatured library was subsequently sequenced by using the MiSeq sequencer (Illumina, Biogenouest Genomics Platform Core Facility, Nantes, France; HLA Laboratory, EFS Nantes, France) with 500 cycles v2 kits, which generated 250-bp end sequence reads.

## Sequencing Data Analysis and KIR Allele Assignment

The quality of the Illumina raw data sequences obtained was monitored by using the Sequencing Analysis Viewer Illumina software. The quality of the base calling from images and sequences was determined by the quality score (Q30) which must be ≥75% for 2 × 250 bp reads. KIR reads were mapped to the human genome reference sequence hg19 (GRCh37) by using the Burrows–Wheeler Aligner Memory Efficient Mapping (BWA-MEM) tool. The binary alignment map (BAM) files containing mapped reads were then visualized on Integrative Genomics Viewer (IGV) algorithm (48).

In parallel, raw KIR sequences were aligned and visualized using the Profiler software version 1.70, initially developed by Dr. M. Alizadeh (Research Laboratory, Blood Bank, Rennes, France) for NGS-based HLA typing (49). A flowchart for data analysis using the Profiler software is provided in Figure S1 in Supplementary Material. The first step of analysis consists by merging R1 and R2 sequences to each other when at least 10 complementary bases were found between R1 and R2 of the same cluster. During this phase, for each inconsistency of base calling, the quality value was used to select the best assignment. All sequences issued from a cluster for which we could not determine complementary between R1 and R2 remained unchanged. All sequences were transformed to FASTA format at the end of this step. The second step of analysis consists of phasing each of the sequences obtained in step one by using Blast algorithm. The third step of analysis consists by merging all sequences together

using Blast information. In this step, the depth for each position and the number of sequences for each allele were calculated. The first three steps are managed in a Linux environment. The last step is presentation and assignment of each construction based on database information in a friendly interface for user, all mismatches and differences to the database are extracted and presented to the user.

For KIR allele assignment, a manual bioinformatic pipeline was first used in the absence of available softwares. This consisted of exporting from IGV, all exon sequences of each KIR gene and comparing polymorphic bases with those referenced from the IPD–KIR database. Then, two different bioinformatics algorithms were used: the first one, hereafter called “BiRD,” was developed by the BiRD platform (E. Charpentier, U. Guyet, Genomics and Bioinformatics Core Facility GenoBiRD, Nantes, France) and consists of an analysis pipeline built with Snakemake on the same logic as the manual method. A flowchart for data analysis using the BiRD software is provided in Figure S2 in Supplementary Material.

### Harvesting KIR-Specific Reads

First, raw sequences from fastq files are processed through cutadapt (v1.8.1) in order to remove Illumina adapter sequences. The cleaned reads are then mapped to hg19 (GRCh37) reference genome using BWA-MEM (v0.7.12) with the default parameters.

### Determining Presence/Absence of KIR Genes

Absence or presence of KIR genes is evaluated using GATK DepthOfCoverage on the BAM and using a browser extensible data (BED) file describing the chromosome position of each gene (except KIR2DP1 and KIR3DP1). Coverage mean is calculated on each gene position, and a threshold of 10 is applied in order to ascertain its absence or presence. Presence/absence of KIR genes defined by NGS is concordant to the KIR genotype of the 30 IHW samples, stratified by AA vs Bx genotypes, previously validated in our laboratory by PCR-SSP multiplex method (data not shown).

### Determining KIR Alleles

Allele-specific nucleotide positions are extracted manually using IPD–KIR alignment tool.<sup>1</sup> For every gene, the Nucleotide—CDS of all alleles are aligned against the default reference allele. A python script is then used to reformat the multipage alignments in order to have one allele alignment per line. A second python script is utilized to extract all variations from the default reference allele and map the exon position number of these variations to the chromosome position. A file is created for each gene listing all the variations found for every allele. Bases at these positions are then called using SAMTools (v1.2-2) mpileup for all samples. Finally, KIR alleles are determined by calculating the percentage of nucleotide matches between the base calls and the allele variations for each KIR allele, the highest percentage giving the most confident allele.

The second algorithm used for KIR allele assignment was the Profiler software, previously described in Figure S1 in Supplementary Material, version 1.70 (49), which permits to

directly assign KIR alleles at the highest level resolution (seven digits) since full intron and exon sequences were considered and also provides quality data such as mean coverage for each KIR locus. The fragment size percentage of sequences for each allele/locus was also considered as well as percentage of mapping for each KIR gene.

Overall, KIR allele assignment for each locus and for all samples corresponds to the combined KIR results obtained using manual pipelines, BiRD, and Profiler softwares. KIR alleles were assigned on the basis of the known DNA sequences identity within the IPD/KIR database.<sup>2</sup> KIR alleles are named in an analogous fashion as the nomenclature used for HLA class I alleles. After the gene name, an asterisk is used as a separator before a numerical allele designation. The first three digits of the numerical designation are used to indicate alleles that differ in the sequences of their encoded proteins. The next two digits are used to distinguish alleles that only differ by synonymous (non-coding) differences within the coding sequence. The final two digits are used to distinguish alleles that only differ by substitutions in an intron, promoter, or other non-coding region of the sequence.

## RESULTS

### LR KIR Gene Amplifications

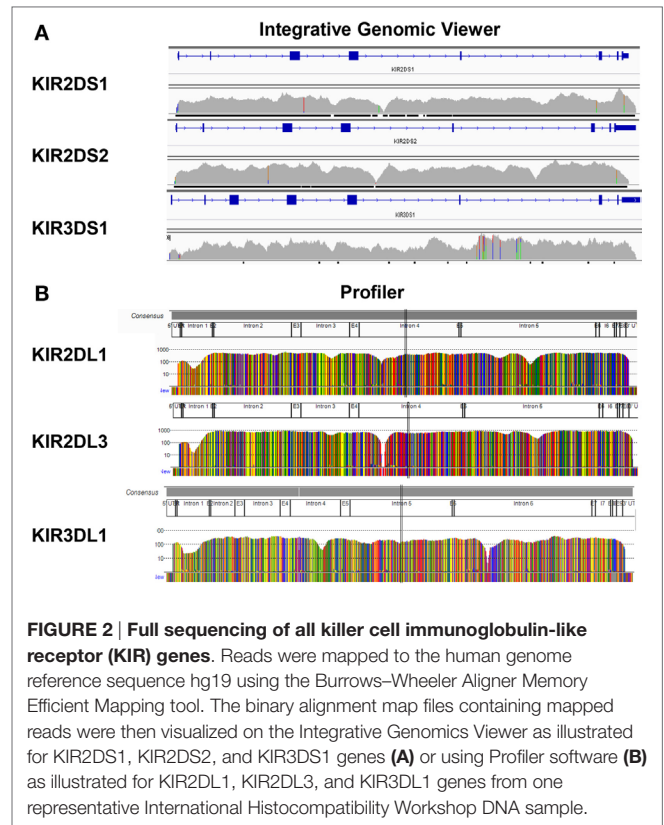
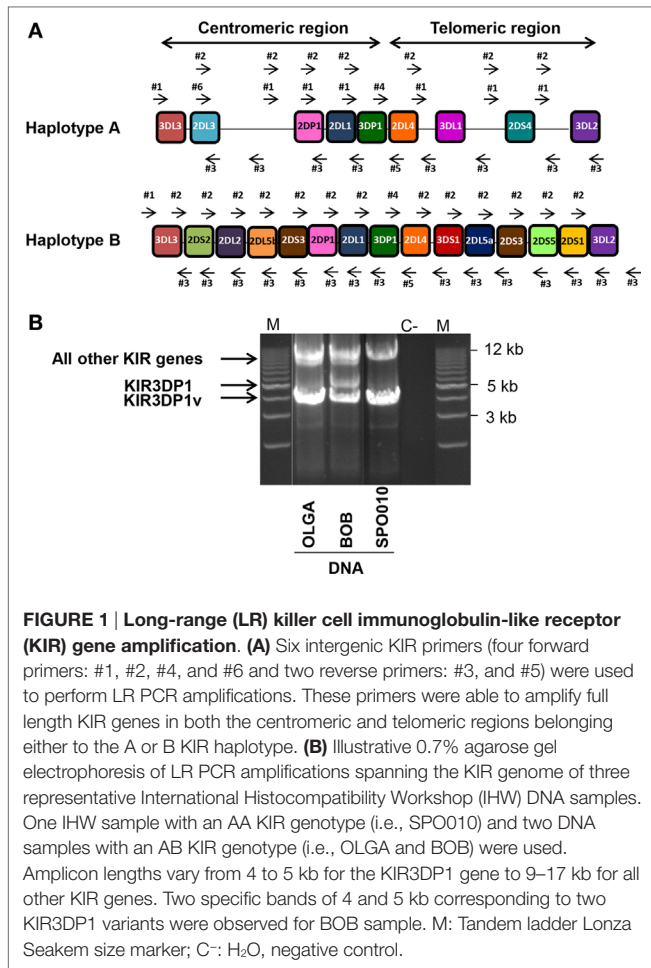
Thirty reference IHW samples with known KIR genotyping (Table S1 in Supplementary Material) were used to validate our NGS method for typing of each KIR gene at allelic resolution. DNA integrity, checked by loading each sample on an agarose gel, confirmed high quality for all samples (data not shown). In order to amplify all KIR genes from the 5′ UTR to the 3′ UTR, six intergenic KIR primers were chosen to allow the amplification of framework KIR genes. These intergenic primers also amplify KIR genes located either in the centromeric or telomeric region, which belong to the A and/or B specific KIR haplotype genes (Figure 1A). A robust LR amplification of KIR genes was obtained for all samples as illustrated for three representative IHW samples (Figure 1B). One specific band between 4 and 5 kb for the KIR3DP1 pseudogene and another specific band between 9 and 17 kb corresponding to a cluster of all other KIR genes were observed, irrespective of KIR AA or AB genotype (Figure 1B) as KIR genomic length varies depending on KIR genes (Table S2 in Supplementary Material). For some IHW samples such as BOB, two specific bands at 4 and 5 kb were observed for the KIR3DP1 gene corresponding to KIR3DP1\*003 and KIR3DP1\*001 variants, respectively, whereas only one band at 4 kb specific of KIR3DP1\*003 variant was observed for OLGA and SPO010 samples (Figure 1B).

### Complete Sequencing of All KIR Genes

In order to check the specificity of KIR LR-PCR obtained, amplicons were further fragmented and sequenced on paired end 2 × 250 bp from Illumina MiSeq platform. The sequencing of all amplicons yielded a total of 6.3 Gb, which was generated from a 755 ± 31 K/mm<sup>2</sup> cluster density (data not shown). Approximately 88.2% of the clusters passed QC filters and on

<sup>1</sup><https://www.ebi.ac.uk/ipd/kir/align.html>.

<sup>2</sup><http://www.ebi.ac.uk/ipd/kir/alleles.html>



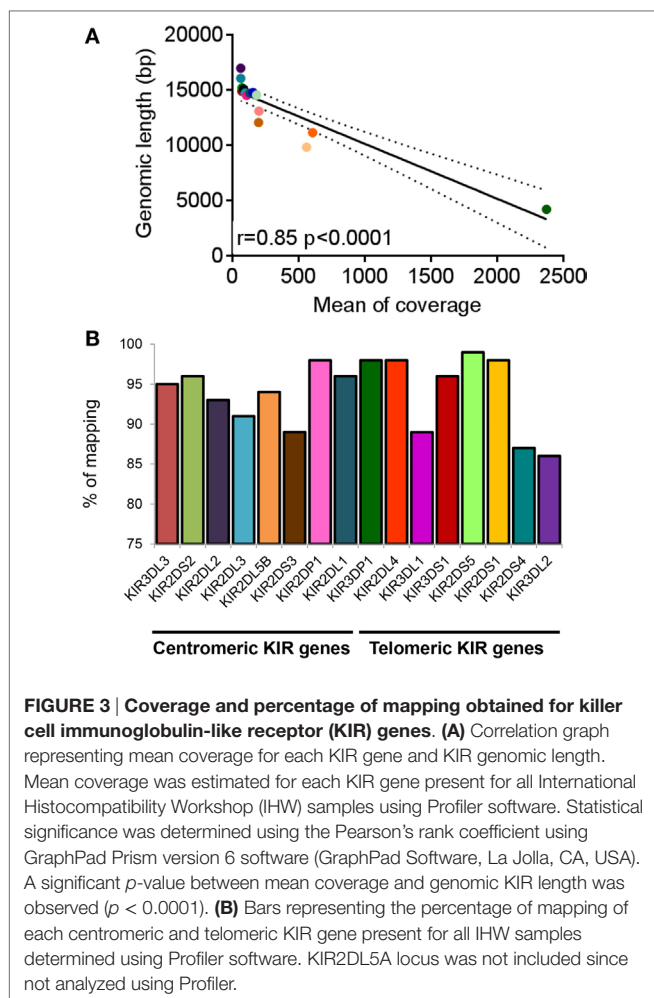
average, 82.4% of both reads passed with a Q30 > 82% (data not shown). Thus, analysis of FastQ data obtained from all IHW samples reported an excellent quality control. The entire length of KIR genes was sequenced with good coverage as illustrated for KIR2DS1, KIR2DS2, and KIR3DS1 (Figure 2A) activating genes, and for KIR2DL1, KIR2DL3, and KIR3DL1 (Figure 2B) inhibitory genes using either IGV or Profiler software, respectively. For all genes, the depth of coverage varies most at the beginning and at the end of the amplicons, but all key regions were sufficiently covered. In particular, we observed that mean coverage ranged from 62.5× (KIR2DS4) to 2,373.3× (KIR3DP1) leading to a mean coverage of 316.55× for all KIR genes except for KIR2DL5A genes since not analyzed using Profiler (Table S3 in Supplementary Material). A significant correlation was observed between mean coverage and genomic KIR length ( $r = 0.85, p < 0.0001$ ) as illustrated Figure 3A. Indeed, the lower the genomic length, the higher the mean coverage is as illustrated for the KIR3DP1 gene. The mean percentage of mapping, established by the coverage of amplicon, ranged from 86.2% (KIR3DL2) to 98.2% (KIR2DP1 and KIR3DP1) (Figure 3B; Table S3 in Supplementary Material) suggesting that sufficient read depth was obtained for determination of all KIR genes. However, KIR2DL5A reads could have been mapped

only using BWA-MEM software and BiRD algorithm. Overall, these results demonstrate the efficiency of our NGS-KIR allele typing approach to capture the full KIR genomic locus and the uniformity of coverage for each KIR locus confers assurance for KIR allele assignment.

### Specificity of NGS-Based KIR Allele Typing

Due to the high degree of KIR polymorphisms and the fact that NGS technology generates a lot of sequencing reads, three different algorithms were evaluated to increase the reliability of KIR allele assignment as reported for NGS-based HLA typing (50). KIR allele assignment was first done manually and then confirmed using both BiRD pipeline and Profiler software. Overall, resulting KIR allele assignments of the 30 reference IHW samples were feasible for all loci and for the majority of samples without remaining ambiguities (Table 1).

We further evaluated the strength of our NGS-based method for KIR allele assignment. For all IHW reference samples tested ( $N = 30$ ), the number of KIR alleles previously known in the IPD/KIR database and those obtained by our NGS-KIR based typing approach was compared for each KIR locus. As an example, from the 30 IHW samples tested, only 5 KIR3DL3 alleles out of 60 expected alleles for this framework gene were previously known in the IPD/KIR database (Table S1 in Supplementary Material), 54 KIR3DL3 alleles from 24 heterozygous and 6 homozygous samples (Table 1) were assigned



by our NGS-based KIR allele typing approach (Figure 4). Our NGS-based KIR allele typing approach permits identification of additional framework KIR alleles, e.g., KIR3DP1 ( $n = 43$ ), KIR2DL4 ( $n = 48$ ), and KIR3DL2 ( $n = 44$ ) (Table 1; Figure 4). NGS-based KIR typing method also allows the identification of polymorphisms of well-functionally characterized KIR by increasing the number of assigned KIR alleles of the 30 IHW samples available in the IPD/KIR database (Table S1 in Supplementary Material), e.g., KIR2DL1 ( $n = 30$ ), KIR2DL2 ( $n = 10$ ), KIR2DS1 ( $n = 11$ ), KIR2DS2 ( $n = 12$ ), KIR3DL1 ( $n = 35$ ), and KIR3DS1 ( $n = 11$ ) (Table 1; Figure 4). The number of activating KIR2DS1, KIR2DS2, and KIR3DS1 assigned alleles by NGS remained low because only IHW samples with the corresponding activating KIR gene were included in this analysis. Overall, a higher number of KIR alleles were identified from these 30 IHW samples by our shotgun NGS methodology compared to those previously characterized by other less sensitive methods, as referred to in the IPD/KIR database ( $N = 422$  vs  $N = 233$ , respectively).

The knowledge of KIR allele typing of IHW samples, recently updated thanks to an exome capture (47), permits to evaluate the concordance of our NGS-based KIR allele results (Table 1) with

those of Norman et al. since 22 IHW samples were commonly used in both methods (Table S1 in Supplementary Material). In this case, a large number of allelic KIR typing for all loci was compared ensuring the reliability of our NGS-based KIR allele typing method. For each KIR locus and for the 22 IHW concerned samples, KIR allele typing results were divided into: concordant (one KIR allele matched for homozygous samples or two KIR alleles matched for heterozygous samples), semi-concordant (one KIR allele matched and one KIR allele mismatched), and discordant (one KIR allele mismatched for homozygous sample or two KIR alleles mismatched for heterozygous sample). For each KIR allele, only the first three digits were taken into account for the assessment of concordance. Complete concordance (100%) of KIR allele typing was demonstrated in 11 KIR genes. The concordant genes were KIR2DS2 (8 samples out of 8), KIR2DL5B (2 out of 2), KIR2DS3 (1 out of 1), KIR2DL1 (18 out of 18), KIR2DL4 (22 out of 22), KIR3DL1 (17 out of 17), KIR3DS1 (7 out of 7), KIR2DL5A (7 out of 7), KIR2DS5 (6 out of 6), KIR2DS1 (6 out of 6), and KIR2DS4 (16 out of 16) (Figure 5). Concordant results were observed, but at a lesser frequency for KIR3DL3 (20 out of 22, i.e., 91%), KIR2DL2 (4 out of 5, i.e., 80%), KIR2DL3 (7 out of 8, i.e., 88%), KIR2DP1 (16 out of 20, i.e., 80%), KIR3DP1 (16 out of 18, i.e., 89%), and KIR3DL2 (16 out of 18, i.e., 89%) (Figure 5).

Ten semi-discordant KIR allele results and two discordant KIR allele results between our NGS-based method and exome data were identified (Table 2). Except for the pseudogene KIR2DP1, with four IHW samples, these discrepancies were limited to 1 or 2 out of 22 IHW samples per locus (Table 2). KIR allele determinations using manual, BiRD algorithm, and different versions (the latest one Rev 2.0.188) of Profiler software were carefully reviewed. Only IHW samples sequenced on different runs and with the same KIR allelic results were reported (data not shown). These potential discrepancies (5%), possibly linked to the design and implementation of each algorithm, need to be further validated by another typing method such as SSP or sequencing.

Overall, our NGS-based method and exome data showed a rate of concordance of 95% for all loci, established for all KIR genes on 22 IHW samples, suggesting a reliable method.

## DISCUSSION

In this study, we developed an NGS-based KIR allele typing approach to characterize the sequence of all polymorphic KIR genes. Our method of typing all KIR genes at high resolution provides an alternative, easily implemented method practice, to study the KIR allele polymorphisms. It may be a cheaper method than exome capture (47). This tool is currently adapted to the KIR gene large-scale analysis. Using our approach, the majority of KIR alleles previously uncharacterized by standard methods were clearly identified from genomic DNA of 30 B-EBV cell lines from the 10th IHW. High quality DNA samples, high fidelity of enzyme polymerase, and a reliable library preparation were needed since evaluation of different Taq polymerase enzymes

**TABLE 1 | Next-generation sequencing-based killer cell immunoglobulin-like receptor (KIR) allele typings of 30 reference B-EBV cell lines from the 10th International Histocompatibility Workshop.**

ID	Centromeric KIR genes									Telomeric KIR genes								
	3DL3	2DS2	2DL2	2DL3	2DL5B	2DS3	2DP1	2DL1	3DP1	2DL4	3DL1	3DS1	2DL5A	2DS3	2DS5	2DS1	2DS4	3DL2
AMAI	*013 *041			+			*00301 *004	+	*003 *006	*0080101 *0080102	*001						*00301	*00101
AMALA	*00402 *00802	*00101	*00301	*001			*00201	*00302	*007 *00901	*00102 *00501	*01502	*01301	*001	*00201	*00201	*001		*0020105 *0070102
BOB	*00101 *01303	*00101	*00301	*00201			*00301	*00302	*002 *00302	*001 *005	*002	*01301	*00101	*00201	*00201	*001		*0020101 *0070102
BRIP	*00801	*00104 *004	*00301	+		*00103 *00201	*0010201 *0020101	*00302	+	*0010305 *00501	*008	*01301	*00103 *00501	*00103 *00201		*002	*003	*0070102 *0070103
CALOG ERO	*00207 *01001			+			*00201	*00302	*00302 *010	*008	*001 *004						*00301 *00601	*00101 *00301
COX	*00102 *00103			*00201 *007			*00301	*00201	*005 *006	*00501* *011	*005010	*055	*00101	*00201	*00201	*010		*00103 *007
DEU	*00101 *01402	*00101	*001	*00201			*00301	*00201	*001 *006	*00801 *011	*00101 *00501						*003 *010	*01001 *01101
DKB	*00101 *006			+			*00301	*00201	*00302 *006	*0010201 *00103	*002 *02001						*00101	*0020101 *00902
HO301	*014	*00101 *002	*00101 *00301		*010	*00103 *00201	*00102	*004 *010	*003010 *004	*00102	*002			*00103 *00201			*001	*00201
HID	*01402 *018			*00101			*00201	*00302	*00302 *010	*00102	*01502						*00101	*00201
HOM-2	*00101 *0090101			+			*00201	*00302	*00302 *006	*00801 *00802	*001 *004						*00301 *00601	*0010102 *00501
HOR	*001 *048			+			*00301	*00201	+	*00501		*01301	*00101	*002	*00201			*007 *021
JHAF	*00901 *026			*00101			*002	*00302	*00302	*011	*00501						*010	*001 *01001
JVM	*007 *00801	*00101	*00301	+			*005	*00302	*001 *00302	*00103 *00801	*00101 *008						*003010	*00101 *009
KAS011	*00901 *01302			+			*002 *00301	*00201 *00302	*00302 *006	*00103 *005	*008	*01301	*00101	*00201	*00201	*00301		*01001 *019
KAS116	*013 *01501			+			*002	*00302	+	*011	*00501						*010	*0103 *010
LBUF	*00301 *0090101	+	+	*001			*002	+	*00302 *0090102	*00102 *011	+						+	+
LUY	*001 *02701			*00101 *00501			*00201 *00301	*00302	*00302	*00801 *011	*00401 *00501						*00601 *010	*001 *00501
MOU	*00207 *00801			*001			*00201	*00302	*00302	*00801	*00101 *00401						*00301 *00601	*010 *01101

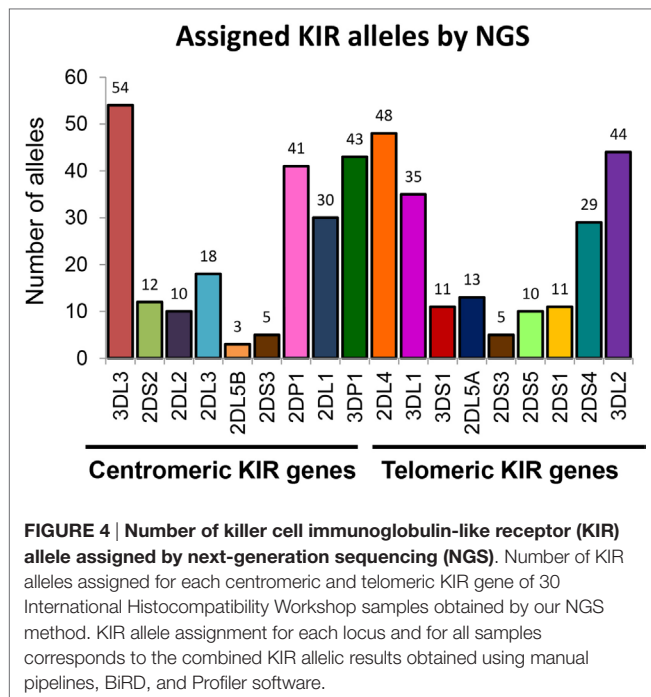
*(Continued)*



TABLE 1 | Continued

ID	Centromeric KIR genes									Telomeric KIR genes								
	3DL3	2DS2	2DL2	2DL3	2DL5B	2DS3	2DP1	2DL1	3DP1	2DL4	3DL1	3DS1	2DL5A	2DS3	2DS5	2DS1	2DS4	3DL2
OLGA	*00201 *00902			*00101			*00201 *006	*00302	*00302	*005 *011	*001 *00501	*01301	*00103		*002	*002	*010	*00701
PE117	*00101 *01002			*00101 *00201			*00201 *00301	*00201 *00302	*00901	*00501 *00802	*00401	*01301	*001		*00201	*00201	*00601	*00701 *018
PF04015	*01402	*00101	*00101 *003						*001	*011	*00501						*010	*00103
RSH	*0040202 *00901	*00101	+	+	*004		*00201 *009	*00302 *01201	*00304 *008	*0010307 *011	*00501 *017				*006		+	+
SAVC	*00801 *00202			*00101			*008 *00201	*00302	*00302	*00102 *00802	*00401 *01502						*006010	2*00202 *00301
SPO010	*00206			+			*00201	*00302	+	*011	*0050101						*010	*001
T7526	*0090101			*00101			*00201	*00302	*00302	*00501 *00102	*01502	*013	*00101		*00201	*002	*001	*0020105 *0070102
VAVY	*002 *017			*00101 *00201			*002 *003	*002 *00302	*00302 *006	*011	*00501						*010	*0010302
WT51	*00103 *036	*00101	+	+	*00201	+	*001 *004	+	+	*00501		*01301	*00101 *00501	+	*002	*002		+
WDV	*00301 *0090101	*00101	*003	+		*002	*002	*00302 *00901	*00302	*00501		*01301	*00501	*002		*00201		*0070103
YAR	*00102			+			*002 *003	+	*00302 *006	*0010201 *011	+						+	+

Results are presented according to the centromeric or telomeric localization of KIR genes on human genome. KIR alleles were named according to the last nomenclature available on the IPD/KIR database (<http://www.ebi.ac.uk/ipd/kir/>). + indicates the presence of a specific KIR gene. ID, sample identification.



and library preparation kits gave conflicting results (data not shown).

Our study evaluated the performance of different algorithms for KIR allele assignment. Reliability of the manual, BiRD pipeline, and Profiler software was tested since neither algorithm alone was able to provide 100% accuracy for all KIR loci. Our results showed that the Profiler software was reliable to assign KIR alleles through the full length of each KIR gene, excluding KIRDL5A variants. In this case, KIR2DL5A and KIR2DL5B sequences were too closed, and Profiler software failed to accurately analyze both sequences. Since all coding, non-coding, and regulatory regions were explored, one could expect that a lot of new KIR alleles will soon be described. Analysis with Profiler consists of two distinct parts. The first part is performed in three steps in a Linux environment: the first step corresponds to the merging of each R1 and R2 issued from the same cluster to each other, each time that a complementarity of at least 10 bases is found, with correction or base calling inconsistencies using a quality value for each nucleotide. There are two interests in this step: longer sequences and lower sequences number were analyzed. The second step corresponds to the phasing of each sequence based on KIR databases using Blast algorithm. Third, the data file from Blast was used to merge all sequences together to construct each allele. In this step, calculation for depth of each position and the number of sequences used for each allele are determined. The second part is done on a Windows environment. A friendly interface presents graphics of all sequences for all studied loci. Assignment of all sequences is done using a database, highlighting all mismatches compared to reference and also differences between KIR alleles selected. Each allele is scored for quality control as per the European Federation for Immunogenetics guideline.

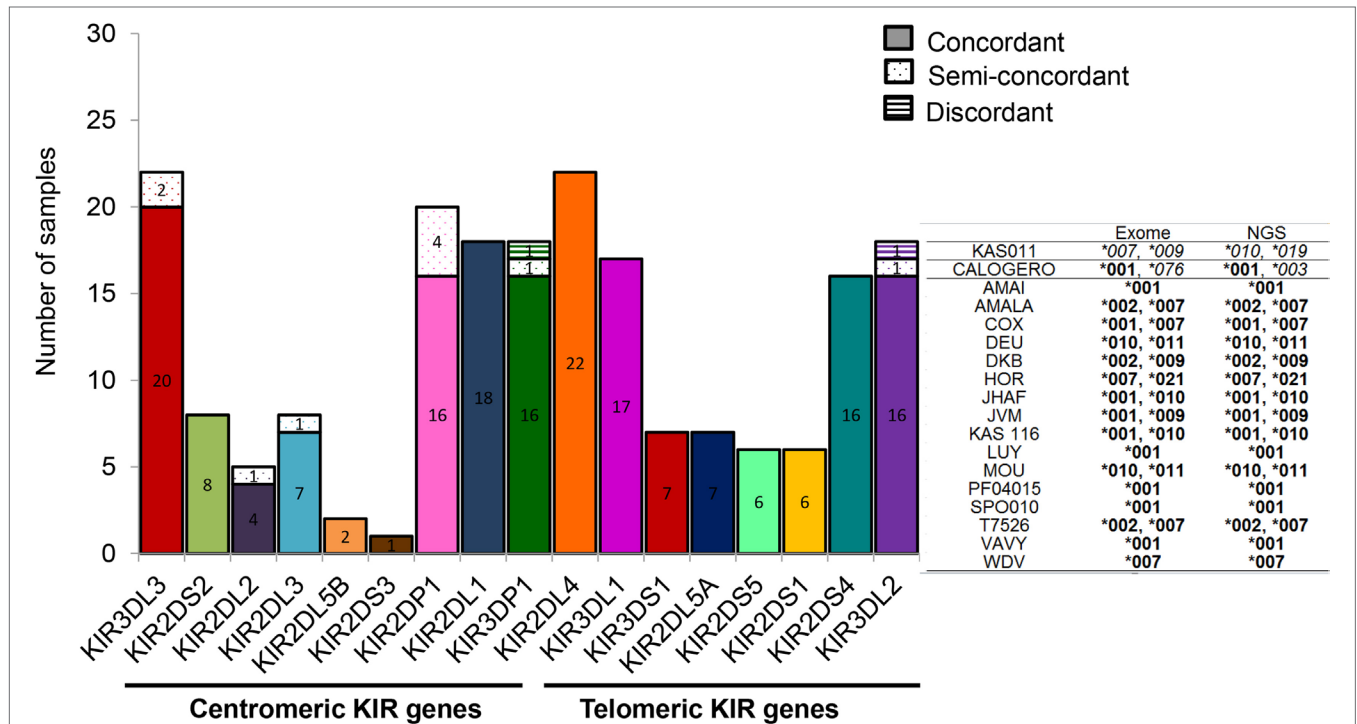
Killer cell immunoglobulin-like receptor alleles of all genes including KIR2DL5A, but excluding the pseudogenes KIR2DP1 and KIR3DP1, were assigned using BiRD algorithm. However, many allelic ambiguities remained when this pipeline was used alone (data not shown). It is likely that this is due to the fact that only coding regions (CDS) were taken into account for allele variation comparison. Analysis of all exon/intron polymorphisms, CNV detection, summary statistics of call accuracy for KIR gene content (presence/absence) and for KIR allele identification needs to be completed. Furthermore, the two pseudogenes KIR2DP1 and KIR3DP1 could be manually added to the BED file describing the gene positions on the genome in order to include them in the analysis pipeline.

Due to the time-consuming nature of manual KIR allele assignment, two different algorithms are needed to ensure the reliability of NGS-based typing methods for the identification of KIR allele polymorphisms.

Until now, KIR genetic population studies have often been restricted to the identification of KIR gene content, or of A and/or B KIR haplotypes (51, 52). Determination of KIR alleles in healthy individuals of a given population may provide a better definition of KIR haplotypes (52) and KIR gene linkage disequilibrium (53) and will considerably increase the IPD/KIR database.

The implementation of our suitable NGS.KIR method will enable analysis of all allelic polymorphism within KIR genes extending to all coding, non-coding, and regulatory regions. A link between KIR allelic polymorphism and the expression level and/or function of the corresponding KIR<sup>+</sup> NK cells is necessary for all KIR genes as previously established for the expression level of HLA-A and HLA-Cw molecules (54–56). We speculate that KIR allelic polymorphisms may affect not only the distribution and function of these gene products but also the licensing of NK subpopulations as described for HLA class I molecules (57, 58). Deep analysis of KIR<sup>+</sup> NK cell phenotype and function depending on KIR and HLA class I alleles present is needed to assess the diversity of KIR<sup>+</sup> NK cell repertoire (21, 59), as well as the specificity of anti-KIR antibodies (30, 60). Overall, the analysis of KIR allelic polymorphisms combined with the autologous HLA class I environment will enable better evaluation of KIR<sup>+</sup> NK cell functional subpopulations (61). This functional KIR<sup>+</sup> NK cell repertoire will be better defined by taking into account the nature of KIR alleles present in addition to the autologous HLA class I environment.

Investigation of KIR allelic polymorphism may be of an immunological interest in the context of viral infections such as those related to CMV (62), HIV (63), HCV (64), and of human reproduction (65). In the context of HSCT, inclusion of KIR allele typing in addition to HLA typing may provide a better evaluation of HSC donor's KIR<sup>+</sup> NK cell repertoire (21, 59, 60, 66, 67). An identification of those with the best antileukemic potential will provide a potential tool to determine an early posttransplant hematopoietic chimerism when donor and recipient have identical KIR genotypes (68) as well as the impact of KIR<sup>+</sup> NK cell alloreactivity on HSCT outcome (69–73). The functional relevance of typing both KIR and HLA genes at



**FIGURE 5 | Specificity of next-generation sequencing (NGS)-based killer cell immunoglobulin-like receptor (KIR) allele typing.** Bars representing the numbers of KIR allele typing obtained by our NGS-based method from 22 International Histocompatibility Workshop (IHW) samples compared with those assigned by exome analysis (47). In this case, KIR allele typing for each locus and for all samples corresponds to the combined KIR allelic results obtained using manual pipelines, BIRD, and Profler softwares. Each bar represents one specific centromeric or telomeric KIR gene. Concordant (one KIR allele matched for homozygous typing or two KIR alleles matched for heterozygous typing), semi-discordant (one KIR allele mismatched for heterozygous typing), and discordant KIR allele typing (one KIR allele mismatched for homozygous typing or two KIR alleles mismatched for heterozygous typing) were highlighted by a specific color code. Representative KIR3DL2 typing of IHW samples obtained by exome analysis compared to those assigned by NGS method is provided in the right of the graphs. Concordances are highlighted in bold and discordances in italics.

**TABLE 2 | Discordant killer cell immunoglobulin-like receptor (KIR) typing of International Histocompatibility Workshop samples observed between typing obtained by exome capture<sup>a</sup> (47) and those obtained by next generation sequencing (NGS) in this study.<sup>b</sup>**

ID	Centromeric KIR genes						Telomeric KIR genes					
	3DL3		2DL2		2DL3		2DP1		3DP1		3DL2	
	Exome KIR typing <sup>a</sup>	NGS typing <sup>b</sup>	Exome KIR typing <sup>a</sup>	NGS typing <sup>b</sup>	Exome KIR typing <sup>a</sup>	NGS typing <sup>b</sup>	Exome KIR typing <sup>a</sup>	NGS typing <sup>b</sup>	Exome KIR typing <sup>a</sup>	NGS typing <sup>b</sup>	Exome KIR typing <sup>a</sup>	NGS typing <sup>b</sup>
AMAI							<i>*003, *013</i>	<i>*00301, *004</i>				
CALOGERO	<i>*00207, *017</i>	<i>*00207, *01001</i>							<i>*002, *00302</i>	<i>*00302, *010</i>	<i>*00101, *076</i>	<i>*00101, *00301</i>
COX					<i>*002</i>	<i>*00201, *007</i>						
DKB									<i>*015</i>	<i>*00302, *006</i>		
KAS011							<i>*002</i>	<i>*002, *00301</i>			<i>*00701, *00902</i>	<i>*01001, *019</i>
LUY							<i>*002, *016</i>	<i>*00201, *00301</i>				
PF04015			<i>*003</i>	<i>*00101, *003</i>								
WT51							<i>*004, *018</i>	<i>*004, *001</i>				
YAR	<i>*00102, *044</i>	<i>*00102</i>										

Discrepancies are shown in italics for each KIR locus concerned. Allelic typing in bold represent concordant alleles. KIR alleles were named according to the last KIR nomenclature. ID, sample identification.

high resolution may help determine their combined effects on outcome of HSCT.

## AUTHOR CONTRIBUTIONS

BM performed KIR allele typing by next-generation sequencing, KIR allele assignment, interpretation of data, and wrote the manuscript. NL performed DNA extractions from EBV-B cell lines, KIR genotyping and KIR allele typing by next-generation sequencing and commented on the manuscript. MA upgraded Profiler software integrating a KIR module, analyzed data, and commented on the manuscript. UG developed a pipeline for KIR allele assignment, analyzed data, and commented on the manuscript. CW and GD performed DNA extractions from EBV-B cell lines and commented on the manuscript. EC supervised the development of a pipeline for KIR allele assignment, provided a bioinformatic help on KIR read mapping, and commented on the manuscript. AW provided advices on the library construction setting and commented on the manuscript. CR designed the study, analyzed and interpreted data, commented on the manuscript, and contributed to writing the manuscript. KG designed the study, analyzed data, and wrote the paper. All the authors have approved the manuscript for publication.

## REFERENCES

- Juric MK, Ghimire S, Ogonek J, Weissinger EM, Holler E, van Rood JJ, et al. Milestones of hematopoietic stem cell transplantation from first human studies to current developments. *Front Immunol* (2016) 7:470. doi:10.3389/fimmu.2016.00470
- Barrett AJ, Battiwalla M. Relapse after allogeneic stem cell transplantation. *Expert Rev Hematol* (2010) 3(4):429–41. doi:10.1586/ehm.10.32
- Petersdorf EW. The major histocompatibility complex: a model for understanding graft-versus-host disease. *Blood* (2013) 122(11):1863–72. doi:10.1182/blood-2013-05-355982
- Ogonek J, Kralj Juric M, Ghimire S, Varanasi PR, Holler E, Greinix H, et al. Immune reconstitution after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Front Immunol* (2016) 7:507. doi:10.3389/fimmu.2016.00507
- Ullah MA, Hill GR, Tey SK. Functional reconstitution of natural killer cells in allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Front Immunol* (2016) 7:144. doi:10.3389/fimmu.2016.00144
- Thielens A, Vivier E, Romagné F. NK cell MHC class I specific receptors (KIR): from biology to clinical intervention. *Curr Opin Immunol* (2012) 24(2):239–45. doi:10.1016/j.coi.2012.01.001
- Ruggeri L, Capanni M, Urbani E, Perruccio K, Shlomchik WD, Tosti A, et al. Effectiveness of donor natural killer cell alloreactivity in mismatched hematopoietic transplants. *Science* (2002) 295(5562):2097–100. doi:10.1126/science.1068440
- Shilling HG, Young N, Guethlein LA, Cheng NW, Gardiner CM, Tyan D, et al. Genetic control of human NK cell repertoire. *J Immunol* (2002) 169(1):239–47. doi:10.4049/jimmunol.169.1.239
- Yawata M, Yawata N, Draghi M, Partheniou F, Little AM, Parham P. MHC class I-specific inhibitory receptors and their ligands structure diverse human NK-cell repertoires toward a balance of missing self-response. *Blood* (2008) 112(6):2369–80. doi:10.1182/blood-2008-03-143727
- Kim S, Sunwoo JB, Yang L, Choi T, Song YJ, French AR, et al. HLA alleles determine differences in human natural killer cell responsiveness and potency. *Proc Natl Acad Sci U S A* (2008) 105(8):3053–8. doi:10.1073/pnas.0712229105
- Babor F, Fischer JC, Uhrberg M. The role of KIR genes and ligands in leukemia surveillance. *Front Immunol* (2013) 4:27. doi:10.3389/fimmu.2013.00027

## ACKNOWLEDGMENTS

The authors are most grateful to Audrey Donnart, Dr. Audrey Bihouée, and Dr. Richard Redon of the Genomics and Bioinformatics Core Facility of Nantes (GenoBiRD, Biogenouest, Nantes, France) for their technical support. The authors would also like to thank Dr. Anne Cesbron (HLA laboratory, EFS Nantes, France) for the access of MiSeq platform, Dr. Kenza Belhaj (EFS La Plaine Saint Denis, France) for her contribution in KIR pipeline development by GenoBIRD genomics platform, Britt House Europe (Hegenheim, France), and Dr. David Senitzer (Division of Hematology and Bone Marrow Transplantation, Duarte, CA, USA) for help in the editing of the manuscript. This work was supported by EFS Pays de la Loire and by grants from International Research Group on unrelated Hematopoietic stem cell Transplantation (IRGHET 2015), Etablissement Français du Sang (EFS 2016-09), and Association Leucémie Espoir Atlantique Famille (LEAF). BM is a PhD student supported by a CIFRE/EFS Pays de la Loire/Nantes Université no. 481/2015 grant.

## SUPPLEMENTARY MATERIAL

The Supplementary Material for this article can be found online at <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fimmu.2017.00547/full#supplementary-material>.

- Shaffer BC, Hsu KC. How important is NK alloreactivity and KIR in allogeneic transplantation? *Best Pract Res Clin Haematol* (2016) 29(4):351–8. doi:10.1016/j.beha.2016.10.010
- Trowsdale J. Genetic and functional relationships between MHC and NK receptor genes. *Immunity* (2001) 15(3):363–74. doi:10.1016/S1074-7613(01)00197-2
- Uhrberg M, Valiante NM, Shum BP, Shilling HG, Lienert-Weidenbach K, Corliss B, et al. Human diversity in killer cell inhibitory receptor genes. *Immunity* (1997) 7(6):753–63. doi:10.1016/S1074-7613(00)80394-5
- Pontikos N, Smyth DJ, Schuilenburg H, Howson JM, Walker NM, Burren OS, et al. A hybrid qPCR/SNP array approach allows cost efficient assessment of KIR gene copy numbers in large samples. *BMC Genomics* (2014) 15:274. doi:10.1186/1471-2164-15-274
- Traherne J, Martin M, Ward R, Ohashi M, Pellett F, Gladman D, et al. Mechanisms of copy number variation and hybrid gene formation in the KIR immune gene complex. *Hum Mol Genet* (2010) 19(5):737–51. doi:10.1093/hmg/ddp538
- Vendelbosch S, de Boer M, Gouw RA, Ho CK, Geissler J, Swelsen WT, et al. Extensive variation in gene copy number at the killer immunoglobulin-like receptor locus in humans. *PLoS One* (2013) 8(6):e67619. doi:10.1371/journal.pone.0067619
- Béziat V, Traherne JA, Liu LL, Jayaraman J, Enqvist M, Larsson S, et al. Influence of KIR gene copy number on natural killer cell education. *Blood* (2013) 121(3):4703–7. doi:10.1182/blood-2012-10-461442
- Sun JY, Oki A, Senitzer D. Alleles and intron polymorphism of KIR3DL1 shown by combination of allele group-specific primers and sequencing. *Tissue Antigens* (2008) 72(6):578–80. doi:10.1111/j.1399-0039.2008.01141.x
- Norman PJ, Abi-Rached L, Gendzekhadze K, Korbel D, Gleimer M, Rowley D, et al. Unusual selection on the KIR3DL1/S1 natural killer cell receptor in Africans. *Nat Genet* (2007) 39(9):1092–9. doi:10.1038/ng2111
- Gagne K, Willem C, Legrand N, Djaoud Z, David G, Rettman P, et al. Both the nature of KIR3DL1 alleles and the KIR3DL1/S1 allele combination affect the KIR3DL1 NK-cell repertoire in the French population. *Eur J Immunol* (2013) 43(4):1085–98. doi:10.1002/eji.201243007
- Gardiner CM, Guethlein LA, Shilling HG, Pando M, Carr WH, Rajalingam R, et al. Different NK cell surface phenotypes defined by the DX9 antibody are

- due to KIR3DL1 gene polymorphism. *J Immunol* (2001) 166(5):2992–3001. doi:10.4049/jimmunol.166.5.2992
23. O'Connor GM, Guinan KJ, Cunningham RT, Middleton D, Parham P, Gardiner CM. Functional polymorphism of the KIR3DL1/S1 receptor on human NK cells. *J Immunol* (2007) 178(1):235–41. doi:10.4049/jimmunol.178.1.235
  24. Thomas R, Yamada E, Alter G, Martin MP, Bashirova AA, Norman PJ, et al. Novel KIR3DL1 alleles and their expression levels on NK cells: convergent evolution of KIR3DL1 phenotype variation? *J Immunol* (2008) 180(10):6743–50. doi:10.4049/jimmunol.180.10.6743
  25. Saunders PM, Pymm P, Pietra G, Hughes VA, Hitchen C, O'Connor GM, et al. Killer cell immunoglobulin-like receptor 3DL1 polymorphism defines distinct hierarchies of HLA class I recognition. *J Exp Med* (2016) 213(5):791–807. doi:10.1084/jem.20152023
  26. Bari R, Thapa R, Bao J, Li Y, Zheng J, Leung W. KIR2DL2/2DL3-E(35) alleles are functionally stronger than Q(35) alleles. *Sci Rep* (2016) 6:23689. doi:10.1038/srep23689
  27. Parham P, Norman PJ, Abi-Rached L, Guethlein LA. Variable NK cell receptors exemplified by human KIR3DL1/S1. *J Immunol* (2011) 187(1):11–9. doi:10.4049/jimmunol.0902332
  28. Carr WH, Pando MJ, Parham P. KIR3DL1 polymorphisms that affect NK cell inhibition by HLA-Bw4 ligand. *J Immunol* (2005) 175(8):5222–9. doi:10.4049/jimmunol.175.8.5222
  29. Mulrooney TJ, Zhang AC, Goldgr Y, Boudreau JE, Hsu KC. KIR3DS1-specific D0 domain polymorphisms disrupt KIR3DL1 surface expression and HLA binding. *J Immunol* (2015) 195(3):1242–50. doi:10.4049/jimmunol.1500243
  30. Falco M, Romeo E, Marcenaro S, Martini S, Vitale M, Bottino C, et al. Combined genotypic and phenotypic killer cell Ig-like receptor analyses reveal KIR2DL3 alleles displaying unexpected monoclonal antibody reactivity: identification of the amino acid residues critical for staining. *J Immunol* (2010) 185(1):433–41. doi:10.4049/jimmunol.0903632
  31. Halfpenny IA, Middleton D, Barnett YA, Williams F. Investigation of killer cell immunoglobulin-like receptor gene diversity: IV. KIR3DL1/S1. *Hum Immunol* (2004) 65(6):602–12. doi:10.1016/j.humimm.2004.03.003
  32. Keaney L, Williams F, Meenagh A, Sleator C, Middleton D. Investigation of killer cell immunoglobulin-like receptor gene diversity III. KIR2DL3. *Tissue Antigens* (2004) 64(2):188–94. doi:10.1111/j.1399-0039.2004.00263.x
  33. Maxwell LD, Williams F, Gilmore P, Meenagh A, Middleton D. Investigation of killer cell immunoglobulin-like receptor gene diversity: II. KIR2DS4. *Hum Immunol* (2004) 65(6):613–21. doi:10.1016/j.humimm.2004.02.028
  34. Williams F, Meenagh A, Sleator C, Middleton D. Investigation of killer cell immunoglobulinlike receptor gene diversity: I. KIR2DL4. *Hum Immunol* (2004) 65(1):31–8. doi:10.1016/j.humimm.2003.10.009
  35. Meenagh A, Williams F, Sleator C, Halfpenny IA, Middleton D. Investigation of killer cell immunoglobulin-like receptor gene diversity V. KIR3DL2. *Tissue Antigens* (2004) 64(3):226–34. doi:10.1111/j.1399-0039.2004.00272.x
  36. Meenagh A, Gonzalez A, Sleator C, McQuaid S, Middleton D. Investigation of killer cell immunoglobulin-like receptor gene diversity, KIR2DL1 and KIR2DS1. *Tissue Antigens* (2008) 72(4):383–91. doi:10.1111/j.1399-0039.2008.01093.x
  37. Gonzalez A, Meenagh A, Sleator C, Middleton D. Investigation of killer cell immunoglobulin-like receptor (KIR) gene diversity: KIR2DL2, KIR2DL5 and KIR2DS5. *Tissue Antigens* (2008) 72(1):11–20. doi:10.1111/j.1399-0039.2008.01050.x
  38. Bari R, Leung M, Turner VE, Embrey C, Rooney B, Holladay M, et al. Molecular determinant-based typing of KIR alleles and KIR ligands. *Clin Immunol* (2011) 138(3):274–81. doi:10.1016/j.clim.2010.12.002
  39. Zhu FM, Jiang K, Lv QF, He J, Yan LX. Investigation of killer cell immunoglobulin-like receptor KIR2DL4 diversity by sequence-based typing in Chinese population. *Tissue Antigens* (2006) 67(3):214–21. doi:10.1111/j.1399-0039.2006.00562.x
  40. Thananchai H, Gillespie G, Martin MP, Bashirova A, Yawata N, Yawata M, et al. Cutting edge: allele-specific and peptide-dependent interactions between KIR3DL1 and HLA-A and HLA-B. *J Immunol* (2007) 178(1):33–7. doi:10.4049/jimmunol.178.1.33
  41. Schellekens J, Tilanus MG, Rozemuller EH. The elucidation of KIR2DL4 gene polymorphism. *Mol Immunol* (2008) 45(7):1900–6. doi:10.1016/j.molimm.2007.10.038
  42. Hou L, Chen M, Steiner N, Kariyawasam K, Ng J, Hurley CK. Killer cell immunoglobulin-like receptors (KIR) typing by DNA sequencing. *Methods Mol Biol* (2012) 882:431–68. doi:10.1007/978-1-61779-842-9\_25
  43. Gonzalez A, McErlean C, Meenagh A, Shovlin T, Middleton D. Killer cell immunoglobulin-like receptor allele discrimination by high-resolution melting. *Hum Immunol* (2009) 70(10):858–63. doi:10.1016/j.humimm.2009.07.006
  44. Witt CS, Martin A, Christiansen FT. Detection of KIR2DL4 alleles by sequencing and SSCP reveals a common allele with a shortened cytoplasmic tail. *Tissue Antigens* (2000) 56(3):248–57. doi:10.1034/j.1399-0039.2000.560307.x
  45. Mori A, Deola S, Xumerle L, Mijatovic V, Malerba G, Monsurro V. Next generation sequencing: new tools in immunology and hematology. *Blood Res* (2013) 48(4):242–9. doi:10.5045/br.2013.48.4.242
  46. Kidd JM, Sharpton TJ, Bobo D, Norman PJ, Martin AR, Carpenter ML, et al. Exome capture from saliva produces high quality genomic and metagenomic data. *BMC Genomics* (2014) 15:262. doi:10.1186/1471-2164-15-262
  47. Norman PJ, Hollenbach JA, Nemat-Gorgani N, Marin WM, Norberg SJ, Ashouri E, et al. Defining KIR and HLA class I genotypes at highest resolution via high-throughput sequencing. *Am J Hum Genet* (2016) 99(2):375–91. doi:10.1016/j.ajhg.2016.06.023
  48. Robinson JT, Thorvaldsdóttir H, Winckler W, Guttman M, Lander ES, Getz G, et al. Integrative genomics viewer. *Nat Biotechnol* (2011) 29(1):24–6. doi:10.1038/nbt.1754
  49. Alizadeh M, Frassati C, Santiago S, Regnault T, Abi-Rached L, Picard C, et al. Validation of profiler software: new analyser of HLA sequences from NGS. *HLA* (2016) 87:270.
  50. Duke JL, Lind C, Mackiewicz K, Ferriola D, Papazoglou A, Gasiewski A, et al. Determining performance characteristics of an NGS-based HLA typing method for clinical applications. *HLA* (2016) 87(3):141–52. doi:10.1111/tan.12736
  51. Denis L, Sivula J, Gourraud PA, Kerdudou N, Chout R, Ricard C, et al. Genetic diversity of KIR natural killer cell markers in populations from France, Guadeloupe, Finland, Senegal and Reunion. *Tissue Antigens* (2005) 66(4):267–76. doi:10.1111/j.1399-0039.2005.00473.x
  52. Vierra-Green C, Roe D, Hou L, Hurley CK, Rajalingam R, Reed E, et al. Allele-level haplotype frequencies and pairwise linkage disequilibrium for 14 KIR loci in 506 European-American individuals. *PLoS One* (2012) 7(11):e47491. doi:10.1371/journal.pone.0047491
  53. Gourraud P, Meenagh A, Cambon-Thomsen A, Middleton D. Linkage disequilibrium organization of the human KIR superlocus: implications for KIR data analyses. *Immunogenetics* (2010) 62(11–12):729–40. doi:10.1007/s00251-010-0478-4
  54. Petersdorf EW, Gooley TA, Malkki M, Bacigalupo AP, Cesbron A, Du Toit E, et al. HLA-C expression levels define permissible mismatches in hematopoietic cell transplantation. *Blood* (2014) 124(26):3996–4003. doi:10.1182/blood-2014-09-599969
  55. Tiercy JM. HLA-C incompatibilities in allogeneic unrelated hematopoietic stem cell transplantation. *Front Immunol* (2014) 5:216. doi:10.3389/fimmu.2014.00216
  56. René C, Lozano C, Villalba M, Eliaou JF. 5' and 3' untranslated regions contribute to the differential expression of specific HLA-A alleles. *Eur J Immunol* (2015) 45(12):3454–63. doi:10.1002/eji.201545927
  57. Sips M, Liu Q, Draghi M, Ghebremichael M, Berger CT, Suscovich TJ, et al. HLA-C levels impact natural killer cell subset distribution and function. *Hum Immunol* (2016) 77(12):1147–53. doi:10.1016/j.humimm.2016.08.004
  58. Horowitz A, Djaoud Z, Nemat-Gorgani N, Blokhuis J, Hilton HG, Béziat V, et al. Class I HLA haplotypes form two schools that educate NK cells in different ways. *Sci Immunol* (2016) 1(3):eaag1672. doi:10.1126/sciimmunol.aag1672
  59. David G, Djaoud Z, Willem C, Legrand N, Rettman P, Gagne K, et al. Large spectrum of HLA-C recognition by KIR2DL2 and KIR2DL3 and restricted C1 specificity of KIR2DS2: dominant impact of KIR2DL2/2DS2 on KIR2D NK cell repertoire formation. *J Immunol* (2013) 191(9):4778–88. doi:10.4049/jimmunol.1301580
  60. David G, Morvan M, Gagne K, Kerdudou N, Willem C, Devys A, et al. Discrimination between the main activating and inhibitory killer cell immunoglobulin-like receptor positive natural killer cell subsets using newly characterized monoclonal antibodies. *Immunology* (2009) 128(2):172–84. doi:10.1111/j.1365-2567.2009.03085.x

61. Béziat V, Hilton H, Norman PJ, Traherne JA. Deciphering the KIR system at super-resolution for NK and T cell biology. *Immunology* (2016) 150(3):248–64. doi:10.1111/imm.12684
62. Djaoud Z, David G, Bressollette C, Willem C, Rettman P, Gagne K, et al. Amplified NKG2C+ NK cells in cytomegalovirus (CMV) infection preferentially express killer cell Ig-like receptor 2DL: functional impact in controlling CMV-infected dendritic cells. *J Immunol* (2013) 191(5):2708–16. doi:10.4049/jimmunol.1301138
63. Boudreau JE, Mulrooney TJ, Le Luduec JB, Barker E, Hsu KC. KIR3DL1 and HLA-B density and binding calibrate NK education and response to HIV. *J Immunol* (2016) 196(8):3398–410. doi:10.4049/jimmunol.1502469
64. Khakoo SI, Thio CL, Martin MP, Brooks CR, Gao X, Astemborski J, et al. HLA and NK cell inhibitory receptor genes in resolving hepatitis C virus infection. *Science* (2004) 305(5685):872–4. doi:10.1126/science.1097670
65. Penman BS, Moffett A, Chazara O, Gupta S, Parham P. Reproduction, infection and killer-cell immunoglobulin-like receptor haplotype evolution. *Immunogenetics* (2016) 68(10):755–64. doi:10.1007/s00251-016-0935-9
66. Morvan M, Willem C, Gagne K, Kerdudou N, David G, Sébille V, et al. Phenotypic and functional analyses of KIR3DL1+ and KIR3DS1+ NK cell subsets demonstrate differential regulation by Bw4 molecules and induced KIR3DS1 expression on stimulated NK cells. *J Immunol* (2009) 182(11):6727–35. doi:10.4049/jimmunol.0900212
67. Rettman P, Willem C, David G, Riou R, Legrand N, Esbelin J, et al. New insights on the natural killer cell repertoire from a thorough analysis of cord blood cells. *J Leukoc Biol* (2016) 100(3):374–85. doi:10.1189/jlb.1HI0116-036R
68. Rettman P, Legrand N, Willem C, Lodé L, Chevallier P, Cesbron A, et al. Use of killer cell immunoglobulin-like receptor (KIR) genes as early markers of haematopoietic chimerism after double-umbilical cord blood transplantation. *Haematologica* (2015) 100(11):475–9. doi:10.3324/haematol.2015.127993
69. Alicata C, Pende D, Meazza R, Canevali P, Loiacono F, Bertaina A, et al. Hematopoietic stem cell transplantation: improving alloreactive Bw4 donor selection by genotyping codon 86 of KIR3DL1/S1. *Eur J Immunol* (2016) 46(6):1511–7. doi:10.1002/eji.201546236
70. Gagne K, Busson M, Balere-Appert ML, Absi L, Jollet I, Bignon JD, et al. Relevance of KIR gene matching in unrelated hematopoietic stem cell transplantations. *Tissue Antigens* (2007) 69(Suppl 1):118–22. doi:10.1111/j.1399-0039.2006.76210.x
71. Gagne K, Busson M, Bignon JD, Balere-Appert ML, Loiseau P, Dormoy A, et al. Donor KIR3DL1/3DS1 gene and recipient Bw4 KIR ligand as prognostic markers for outcome in unrelated hematopoietic stem cell transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant* (2009) 15(11):1366–75. doi:10.1016/j.bbmt.2009.06.015
72. Rettman P, Willem C, Volteau C, Legrand N, Chevallier P, Lodé L, et al. Impact of graft-versus-graft NK cell alloreactivity on single unit dominance after double umbilical cord blood transplantation. *Transplantation* (2016). doi:10.1097/TP.0000000000001545
73. Rettman P, Malard F, Legrand N, Avinens O, Eliaou J, Picard C, et al. Impact of KIR/HLA genetic combinations on double umbilical cord blood transplantation outcomes. Results of a French multicentric retrospective study on behalf of the Société Francophone de Greffe de Moelle et de Thérapie Cellulaire (SFGM-TC) and the Société Francophone d'Histocompatibilité et d'Immunogénétique (SFHI). *Bone Marrow Transplant* (2016) 51(11):1499–503. doi:10.1038/bmt.2016.151

**Conflict of Interest Statement:** The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Copyright © 2017 Maniangou, Legrand, Alizadeh, Guyet, Willem, David, Charpentier, Walencik, Retière and Gagne. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) or licensor are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

Centromeric KIR genes

ID	3DL3		2DS2		2DL2		2DL3		2DL5B		2DS3		2DP1		2DL1		3DP1	
	IPD <sup>1</sup>	exome <sup>2</sup>	IPD <sup>1</sup>	exome <sup>2</sup>	IPD <sup>1</sup>	exome <sup>2</sup>	IPD <sup>1</sup>	exome <sup>2</sup>	IPD <sup>1</sup>	exome <sup>2</sup>	IPD <sup>1</sup>	exome <sup>2</sup>	IPD <sup>1</sup>	exome <sup>2</sup>	IPD <sup>1</sup>	exome <sup>2</sup>	IPD <sup>1</sup>	exome <sup>2</sup>
AMAI	+	*01309, *041	-	-	-	-	*002, *005	*002, *005	-	-	-	-	+	*003, *013	*002, *001	*001, *01202	*003	*00302, *006
AMALA	+	*00402, *00802	+	*001	*003	*003	*001	*001	-	-	-	-	+	*002	*003	*00302	*001, *003	*007, *009
BOB	+		+		+		+		-	-	-	-	+				*001, *003	
BRIP	+		+		+		+		B		+		+				*003	
CALOGERO	+	*00207, *017	-	-	-	-	+	*001	-	-	-	-	+	*002	+	*00302	*003	*002, *00302
COX	*00102	*00103, *00102	-	-	-	-	*002	*002	-	-	-	-	*003	*003	*002	*002	*005, *006	*005, *006
DEU	+	*00101, *01402	+	*001	*001	*001	*002	*002	-	-	-	-	+	*003	*002	*002	*001, *003	*001, *006
DKB	+	*00101, *00602	-	-	-	-	+	*002	-	-	-	-	+	*003	+	*002	*003	*015
HO301	+		+		+		-		B		+		+				*001, *003	
HID	+		-		-		+		-		-		+				*003	
HOM-2	+		-		-		+		-		-		+				*003	
HOR	+	*00102, *048	-	-	-	-	*002	*002	-	-	-	-	+	*003	*002	*002	*003	*01002, *015
JHAF	+	*00901, *026	-	-	-	-	*001	*001	-	-	-	-	+	*002, *00203	*00302	*00302	*003	*00302
JVM	+	*007, *00801	+	*001	+	*003	+	*001	-	-	-	-	+	*005	+	*00302	*001, *003	*001, *00302
KAS011	+	*00901, *01302	-	-	-	-	*001, *002	*001, *002	-	-	-	-	+	*002, *00203	*002, *00302	*002, *00302	*003	*00302, *006
KAS116	+	*01302, *01501	-	-	-	-	+	*001	-	-	-	-	+	*002	+	*00302	*003	*00302
LBUF	+	*00301, *00901	+	*001	*003	*003	*001	*001	-	-	-	-	+	*00203	*00302	*00302	*001, *003	*00302, *009
LUY	+	*00101, *02701	-	-	-	-	+	*001, *005	-	-	-	-	+	*002, *016	+	*00302	*003	*00302
MOU	+	*00207, *00801	-	-	-	-	*001	*001	-	-	-	-	+	*002, *005	*00302	*00302	*003	*00302
OLGA	+		-		-		+		-		-		+		+		*003	
PE117	+		-		-		*001, *002		-		-		+		*002, *00302		*003	
PF04015	+	*01402	+	*001	+	*003	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	*001/ 002	*001
RSH	*0040202, *0090101	*00402, *0901	*0010109	*001	*0010104	*001	*0010107	*001	*004	*004	-	-	*0020105	*002, *009	*0030209, *01201	*00302, *01201	*0030401, *008	*00304, *008
SAVC	+		-		-		*001		-		-		+		*00302		*003	
SPO010	+	*00206	-	-	-	-	+	*001	-	-	-	-	+	*00203	+	*00302	*003	*00302
T7526	00801, 00802	*00901	0010110	-	0030107	-	0010108	*001	-	-	0020102	-	0020106	*002	0030205	*00302	*003	*00302
VAVY	+	*00206, *017	-	-	*011	-	+	*001, *002	-	-	-	-	+	*00203, *003	+	*002, *00302	*003	*00302, *006
WT51	+	*00103, *036	+	*001	+	*001	+	*002	+	*002	+	*00103/ 002	+	*004, *018	+	*002, *00401	+	*00301, *006
WDV	+	*00301, *00901	+	*001	*003	*003	*001	*001	-	-	+	*002	+	*002	*00302	*00302	*001, *003	*00302, *009
YAR	+	*00102, *044	-	-	-	-	*001, *002	*001, *002	-	-	-	-	+	*002, *003	*002, *00302	*002, *00302	*003	*00302, *006

Supplemental Table 1: KIR genotyping of thirty reference B-EBV cell lines from the 10th International Histocompatibility Workshop (IHW). Results are presented according to the centromeric or telomeric localization of KIR genes on human genome. "+" indicates the presence of a specific KIR gene. "-" indicates the absence of a specific KIR gene. Allelic KIR typing were obtained either from IPD/KIR database<sup>1</sup> or from exome data<sup>2</sup> [47].

Telomeric KIR genes																		
ID	2DL4		3DL1		3DS1		2DL5A		2DS3		2DS5		2DS1		2DS4		3DL2	
	IPD <sup>1</sup>	exome <sup>2</sup>	IPD <sup>1</sup>	exome <sup>2</sup>	IPD <sup>1</sup>	exome <sup>2</sup>	IPD <sup>1</sup>	exome <sup>2</sup>	IPD <sup>1</sup>	exome <sup>2</sup>	IPD <sup>1</sup>	exome <sup>2</sup>	IPD <sup>1</sup>	exome <sup>2</sup>	IPD <sup>1</sup>	exome <sup>2</sup>	IPD <sup>1</sup>	exome <sup>2</sup>
AMAI	*00801, 0080102	*00801, *00801	*00101	*001	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	*003	*003	*001	*00101
AMALA	*00102, *005	*00102, *00501	*003	*01502	*013	*013	*001	*001	-	-	*002	*002	*002	*002	*00101	*00101	*002, *007	*00201, *00701
BOB	+		+		+		+		-		+		+		*001/ 002		+	
BRIP	+		+		+		+		+		-		+		*003-006		+	
CALOGERO	+	*00801, *00802	+	*001, *00401	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	*003-006	*003, *006	+	*00101, *076
COX	*00501	*00501, *011	-	*00501	*055	*055	*0010101	*001	-	-	*0020103	*002	*0020103	*002	-	*010	*0070102	*00103, *00701
DEU	*00202, *005	*00801, *011	*00101, *005	*001, *00501	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	*003	*003, *010	*010, *011	*010, *011
DKB	+	*00102, *00103	+	*002, *020	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	*001/ 002	*00101	+	*00201, *00902
HO301	+		+		-	-	-	-	+		-	-	-	-	*001/ 002		+	
HID	+		+		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	*001/ 002		+	
HOM-2	*0080101 *0080201		+		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	*003, *006		*010, *021	
HOR	*005	*00501	-		*013	*013	*001	*001	-	-	*002	*002	*002	*002	-	-	*010, *021	*00701, *021
JHAF	*011	*011	*005	*00501	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	*003	*010	*001, *010	*00103, *010
JVM	+	*00103, *00801	+	*001, *008	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	*003-006	*003	+	*00101, *00901
KAS011	*00102, *005	*00103, *00501	*008	*008	*013	*013	*001	*001	-	-	*002	*002	*002	*002	*003	*003	*007, *009	*00701, *00902
KAS116	+	*011	+	*00501	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	*003, *006	*010	+	*00103, *010
LBUF	*00102, *005	*00102, *011	*002, *005	*002, *00501	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	*00101, *003	*00101, *010	*001, *002	*00103, *00201
LUY	+	*00801, *011	+	*00401, *00501	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	*003, *006	*006, *010	+	*00103, *00501
MOU	*0080101	*00801	*00101, *004	*001, *00401	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	*003, *006	*003, *006	*010, *011	*01101, *01004
OLGA	+		+		+		+		-		+		+		*003-006		+	
PE117	*00201, *005		*004		*013		*001		-		*002		*002		*006		*005, *007	
PF04015	+	*011	+	*00501	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	*003-006	*010	+	*00103
RSH	*0010307, *011	*00103, *011	*0050102, *01701	*00501, *017	-	-	-	-	-	-	*005	*006	-	-	*0010108, *010	*00101, *010	*010, *023	*010, *023
SAVC	*00201, *00102		*003, *004		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	*00101, *006		*002, *003	
SPO010	+	*011	+	*00501	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	*003-006	*010	+	*00103
T7526	*0010201, *00501	*00103, *00501	0150203	*01502	*0130103	*013	+	*001	0020102	-	+	*002	*0020106	*002	*0010107	*00101	0105, *007	*00201, *00701
VAVY	*011	*011	+	*00501	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	*003, *006	*010	+	*00103
WT51	+	*00501	-	-	+	*013	+	*001, *005	+	*00103/*0 02	+	*002	+	*002	-	-	+	*00701
WDV	*00501	*00501	-		*013	*013	*005	*005	+	*002	-	-	*002	*002	-	-	*007	*00701
YAR	*00102,*0 05	*00102, *011	*002, *005	*002, *00501	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	*00101, *003	*00101, *010	*001, *002	*00103, *00201

**Supplemental Table 1: KIR genotyping of thirty reference B-EBV cell lines from the 10th International Histocompatibility Workshop (IHW). Results are presented according to the centromeric or telomeric localization of KIR genes on human genome. "+" indicates the presence of a specific KIR gene. "-" indicates the absence of a specific KIR gene. Allelic KIR typing were obtained either from IPD/KIR database<sup>1</sup> or from exome data<sup>2</sup> [47].**

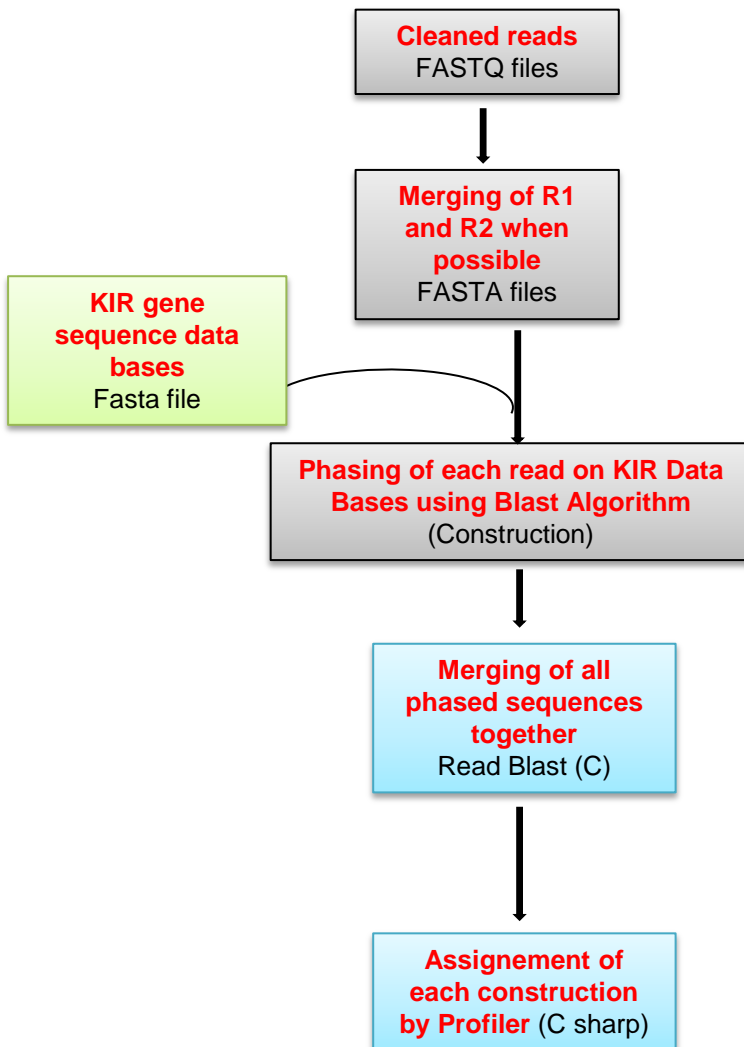


KIR gene	Reference allele	Genomic length (bp)
KIR2DL1	2DL1*0020101	14739
KIR2DL2	2DL2*0010101	14812
KIR2DL3	2DL3*0010101	14761
KIR2DL4	2DL4*0010201	11177
KIR2DL5	2DL5A*0010101	9901
KIR2DL5	2DL5B*0020101	9850
KIR2DS1	2DS1*0020101	14720
KIR2DS2	2DS2*0010101	14577
KIR2DS3	2DS3*0010301	15103
KIR2DS4	2DS4*0010101	16092
KIR2DS5	2DS5*0020101	15248
KIR3DL1	3DL1*0010101	14546
KIR3DL2	3DL2*0010101	17009
KIR3DL3	3DL3*0030101	12084
KIR3DS1	3DS1*0130101	14932
KIR2DP1	2DP1*0010201	13128
KIR3DP1	3DP1*0030101	4236

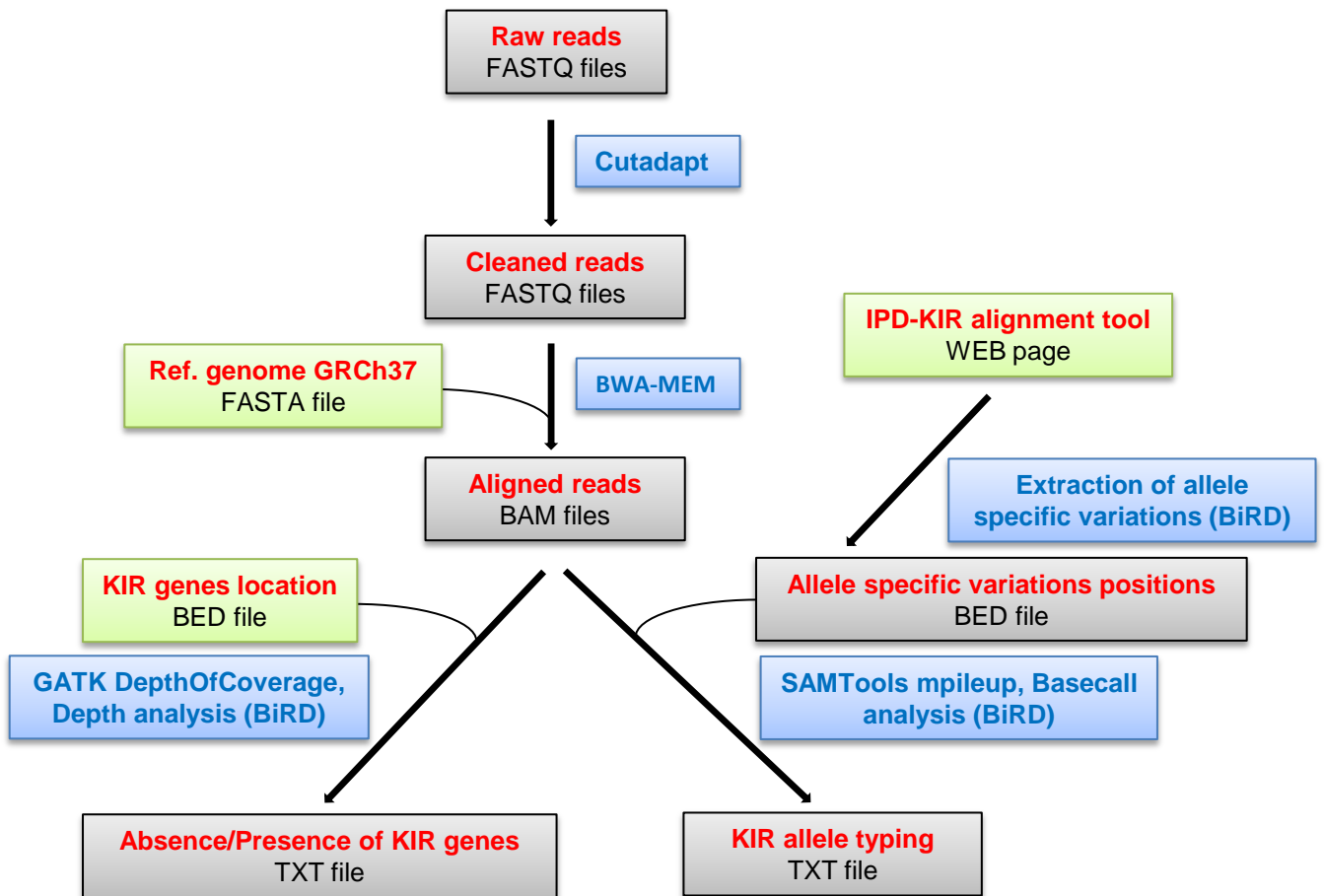
**Supplemental Table 2:** KIR genomic lengths in base pairs (bp) of one reference allele for all KIR genes. KIR alleles were named according to the last nomenclature from IPD.KIR database (<http://www.ebi.ac.uk/cgi-bin/ipd/kir/>).

	Mean of coverage	% Mapping
KIR3DL3	198.2	95.0
KIR2DS2	182.8	95.5
KIR2DL2	156.0	92.9
KIR2DL3	96.0	90.9
KIR2DL5B	560.1	94.1
KIR2DS3	84.2	89.2
KIR2DP1	201.3	98.2
KIR2DL1	132.2	96.0
KIR3DP1	2373.3	98.2
KIR2DL4	605.8	97.9
KIR3DL1	107.7	89.0
KIR3DS1	71.1	95.5
KIR2DL5A	undetermined	undetermined
KIR2DS5	72.5	92.9
KIR2DS1	97.5	95.8
KIR2DS4	62.5	86.6
KIR3DL2	63.6	86.2
<b>All loci</b>	<b>316.55</b>	<b>93.37</b>

**Supplemental Table 3:** Mean coverage and percentage of mapping obtained for each KIR gene using Profiler software



**Supplemental Figure 1: Profiler pipeline description.** Grey boxes represent files resulting from the main steps of the pipeline. Green boxes correspond to public data files. Blue boxes correspond to algorithm developed by EFS written in C language and C sharp.



**Supplemental Figure 2: BiRD pipeline description.** Grey boxes represent files resulting from the main steps of the pipeline. Blue boxes correspond to publicly available bioinformatic NGS tools, and scripts developed on BiRD platform; Green boxes correspond to public data files. The pipeline was written in Snakemake, the workflow management system which can benefit from parallelization on high performance computing architectures

**Article N°2** : Le séquençage Nouvelle Génération : nouvel outil pour typer les allèles KIR en greffes de CSH (*Editorial, Transfus. Clin. Biol. 2018*)

**Next-generation sequencing technology a new tool for killer cell immunoglobulin-like receptor allele typing in hematopoietic stem cell transplantation**

**Bercelin Maniangou, Christelle Retière and Katia Gagne**



Disponible en ligne sur

**ScienceDirect**  
www.sciencedirect.com

Elsevier Masson France

**EM|consulte**  
www.em-consulte.com

**TRANSFUSION**  
CLINIQUE ET BIOLOGIQUE

Transfusion Clinique et Biologique xxx (2017) xxx–xxx

Research perspectives

## Editorial: Next-generation sequencing technology a new tool for killer cell immunoglobulin-like receptor allele typing in hematopoietic stem cell transplantation

*Éditorial : séquençage nouvelle génération, un nouvel outil pour typer les allèles killer cell immunoglobulin-like receptor en greffes de cellules souches hématopoïétiques*

B. Maniangou<sup>a,b,\*</sup>, C. Retière<sup>a,b</sup>, K. Gagne<sup>a,b,c</sup>

<sup>a</sup> *Établissement français du sang (EFS) Pays-de-la-Loire, laboratoire de recherche, 34, boulevard Jean-Monnet, 44011 Nantes, France*

<sup>b</sup> *Inserm U1232, CNRS, CNRS ERL, centre de recherche en cancérologie et immunologie Nantes Angers (CRCINA), équipe 1, 8, quai Moncousu, 44007 Nantes, France*

<sup>c</sup> *Établissement français du sang Pays-de-la-Loire, laboratoire HLA, 34, boulevard Jean-Monnet, 44011 Nantes cedex, France*

### Abstract

*Killer cell Immunoglobulin-like Receptor (KIR)* genes are a family of genes located together within the leukocyte receptor cluster on human chromosome 19q13.4. To date, 17 *KIR* genes have been identified including nine inhibitory genes (*2DL1/L2/L3/L4/L5A/L5B*, *3DL1/L2/L3*), six activating genes (*2DS1/S2/S3/S4/S5*, *3DS1*) and two pseudogenes (*2DP1*, *3DP1*) classified into group A (KIR A) and group B (KIR B) haplotypes. The number and the nature of *KIR* genes vary between the individuals. In addition, these *KIR* genes are known to be polymorphic at allelic level (907 alleles described in July 2017). *KIR* genes encode for receptors which are predominantly expressed by Natural Killer (NK) cells. KIR receptors recognize HLA class I molecules and are able to kill residual recipient leukemia cells, and thus reduce the likelihood of relapse. KIR alleles of Hematopoietic Stem Cell (HSC) donor would require to be known (Alicata et al. *Eur J Immunol* 2016) because the KIR allele polymorphism may affect both the KIR<sup>+</sup> NK cell phenotype and function (Gagne et al. *Eur J Immunol* 2013; Bari R, et al. *Sci Rep* 2016) as well as HSCT outcome (Boudreau et al. *JCO* 2017). The introduction of the Next Generation Sequencing (NGS) has overcome current conventional DNA sequencing method limitations, known to be time consuming. Recently, a novel NGS KIR allele typing approach of all *KIR* genes was developed by our team in Nantes from 30 reference DNAs (Maniangou et al. *Front in Immunol* 2017). This NGS KIR allele typing approach is simple, fast, reliable, specific and showed a concordance rate of 95% for centromeric and telomeric *KIR* genes in comparison with high-resolution KIR typing obtained to those published data using exome capture (Norman PJ et al. *Am J Hum Genet* 2016). This NGS KIR allele typing approach may also be used in reproduction and to better study KIR<sup>+</sup> NK cell implication in the control of viral infections.

© 2017 Elsevier Masson SAS. All rights reserved.

**Keywords:** High-resolution killer cell immunoglobulin-like receptor typing; Allele polymorphism; Next-generation sequencing; Natural killer cells; Hematopoietic stem cell transplantation

### Résumé

Les gènes *Killer cell Immunoglobulin-like Receptor (KIR)* sont une famille de 15 gènes, localisés chez l'homme sur le bras long du chromosome 19. Ces gènes *KIR* peuvent être inhibiteurs (*2DL1/L2/L3/L4/L5A/L5B*, *3DL1/L2/L3*) ou activateurs (*2DS1/S2/S3/S4/S5*, *3DS1*) et sont organisés en deux groupes d'haplotypes : haplotype A ou B. Le nombre et la nature des gènes KIR présents varient selon les individus. De plus, ces gènes *KIR* sont connus pour être polymorphes au niveau allélique (907 allèles décrits en juillet 2017). Les gènes KIR codent pour des récepteurs KIR

\* Corresponding author. EFS Pays de la Loire, laboratoire de recherche, 34, boulevard Jean-Monnet, 44011 Nantes, France.

E-mail addresses: [bercelin.maniangou@efs.sante.fr](mailto:bercelin.maniangou@efs.sante.fr) (B. Maniangou), [christelle.retiere@efs.sante.fr](mailto:christelle.retiere@efs.sante.fr) (C. Retière), [katia.gagne@efs.sante.fr](mailto:katia.gagne@efs.sante.fr) (K. Gagne).

inhibiteurs ou activateurs, exprimés principalement sur les cellules tueuses naturelles (NK). Les récepteurs KIR ont pour ligands les molécules HLA de classe I et sont capables de lyser les cellules leucémiques résiduelles des patients après greffe de cellules souches hématopoïétiques (CSH). Le contenu en allèles KIR de chaque donneur de CSH nécessiterait d'être connu (Alicata et al. *Eur J Immunol* 2016) car ce polymorphisme allélique KIR peut affecter le phénotype et la fonction des cellules NK KIR<sup>+</sup> (Gagne et al. *Eur J Immunol* 2013; Bari R, et al. *Sci Rep* 2016) ainsi que le devenir des greffes de CSH (Boudreau et al. *JCO* 2017). L'arrivée de nouvelles technologies de séquençage à haut débit (NGS) a permis d'aller au-delà des limites des techniques de séquençages conventionnelles, connues pour prendre plus de temps car spécifique d'un seul locus KIR. Récemment, une nouvelle approche NGS de typage allélique de tous les gènes *KIR* en entier a été développée par notre équipe nantaise à partir de 30 ADNs de référence (Manianguou et al. *Front in Immunol* 2017). Cette approche NGS.KIR est simple, rapide, fiable, spécifique et a montré une concordance des résultats alléliques KIR proche de 95 % avec ceux effectués sur les mêmes ADN dans une étude de l'exome aux États-Unis (Norman PJ et al. *Am J Hum Genet* 2016). Cette approche NGS de typage des allèles KIR peut aussi être utilisée en reproduction et pour étudier plus finement l'implication des cellules NK KIR<sup>+</sup> dans le contrôle des infections virales.

© 2017 Elsevier Masson SAS. Tous droits réservés.

**Mots clés** : Typage allélique KIR ; Polymorphisme allélique ; Séquençage nouvelle génération ; Cellules tueuses naturelles NK ; Greffes de cellules souches hématopoïétiques

*Killer cell Immunoglobulin-like Receptor (KIR)* genes are a family of genes located together within the leukocyte receptor cluster on human chromosome 19q13.4. To date, 17 *KIR* genes have been identified including: nine inhibitory genes (*2DL1/IL2/L3/L4/L5A/L5B*, *3DL1/IL2/L3*), six activating genes (*2DS1/S2/S3/S4/S5*, *3DS1*) and two pseudogenes (*2DP1*, *3DP1*) [1]. These genes are further classified into group A (KIR A) and group B (KIR B) haplotypes [2]. KIR A haplotypes consist of a fixed number of genes, whereas the KIR B haplotypes have variable gene content with one or more KIR B-specific genes such as: *KIR2DS1*, *S2*, *S3*, *S5*, *KIR2DL2*, and *KIR2DL5*. *KIR* genes encode for receptors, which are predominantly expressed by Natural Killer (NK) cells. Functionally, these receptors may be inhibitory or activating and have also been identified in subsets of CD4, CD8 and  $\gamma\delta$  T cells [3,4]. NK cells are innate immune components able to kill target cells and produce cytokines without requiring prior sensitization. After allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplantation (HSCT), NK cells are the first lymphocyte population to reconstitute the recipient's immune system before T cell reconstitution [5]. During this period, NK cells are able to kill residual recipient leukemia cells, and thus reduce the likelihood of relapse. The Graft-versus-Leukemia (GvL) effect is thought to be mediated mostly by KIR receptors expressed on NK cells in the early months post-HSCT. In 2002, Ruggeri et al. were the first group to report a greatest beneficial effect of donor-recipient KIR ligand mismatching [6]. Patients with acute myeloid leukemia (AML) were split into two groups and treated with T-cell depleted HLA-haploidentical HSCT. In those grafted with a KIR ligand mismatch, the relapse rate was 0% at 5 years, compared to those grafted with matched donors, who had a relapse rate of 75% over the same time period. Clearly, these results were of great interest to the field. In 2010, Cooley et al. further showed a beneficial effect of HSC donors having centromeric B KIR ligand motifs in terms of relapse prevention after unrelated HSCT in AML patients [7]. On the basis of these results, this group proposed an algorithm, which enables the choice of HSC donors, based on their *KIR* gene content [7]. However, this algorithm has limitations. For example, it cannot reliably predict a better KIR<sup>+</sup> NK cell alloreactivity in all

cases because *KIR* genes are polymorphic at the allelic level. Currently, 907 *KIR* alleles are described in the Immuno Polymorphism Database for *KIR* genes (IPD – KIR). *KIR* allelic variation may affect the NK KIR<sup>+</sup> cell phenotype and function as demonstrated for both *KIR3DL1/S1* [8] and *KIR2DL2/L3* [9] genes. Indeed, the *KIR3DL1/S1* gene is one of the most polymorphic KIR and the allotypes can display high or low cell surface receptor density as well as intracellular retention [10]. Recently, the importance of *KIR3DL1/HLA-B* subtype combinations in AML patients treated with HSCT has also been demonstrated [11]. Alicata et al. have further suggested that *KIR* allele typing should become a standard practice when selecting HSC donors [12]. Clearly, the arguments above provide a basis for continuing research on the impact of *KIR* allele polymorphisms on HSCT outcome. However, tools to study *KIR* allele polymorphisms of all *KIR* genes are currently lacking because most of them are locus specific, targeting only limited polymorphism and are often time consuming. The introduction of the Next Generation Sequencing (NGS) has considerably changed the vision of biologists about the immune system exploration within the field of immunology [13]. This NGS technology has the capacity to increase sequencing throughput by attaching millions of DNA fragments to a solid surface or support, and simultaneously sequencing them. Current NGS platforms generally involve two steps: template preparation and sequencing. In the first step, the DNA sample is fragmented to construct libraries, depending on the platform to be used. The fragment libraries are subsequently ligated to end templates with specific adaptor oligonucleotides. They are then dual-indexed and injected for sequencing either in paired-end or single-end configurations, again depending on the NGS platform used. Post-sequencing, the data is analyzed using bioinformatic pipelines. This step is very important and yet constitutes one of the main limitations in NGS. Bioinformatic pipelines allow alignment of the sequence reads with a reference genome, and subsequent assignment of allelic variants. To date, two NGS.KIR approaches have been developed: the exome capture method [14] and the Nantes NGS.KIR method [15]. The exome capture method developed by the Parham laboratory at the Stanford University School of Medicine is interesting and

resulted in the discovery of thirty-one new KIR alleles from only 15 individuals. However, this exome approach was not specific for investigation of the KIR locus, but also for HLA sequences and other genes. It is also time consuming and cannot easily be implemented routinely. The process generates a large amount of data that requires analysis with performant algorithms that take into account KIR, HLA and other polymorphic genes. In comparison, the Nantes NGS.KIR approach, recently developed is simple, fast, reliable, specific for KIR locus, validated in research and could be routinely employed for KIR allele typing before HSCT with ease [15]. In the long term, the Nantes NGS.KIR approach is planned to be used to evaluate the impact of KIR allele polymorphisms on HSCT outcome. It can also be used to study KIR<sup>+</sup> NK cell involvement in control of viral infections and reproduction.

### Funding

This work was supported by EFS Pays de la Loire and by grants from International Research Group on unrelated Hematopoietic stem cell Transplantation (IRGHET), Établissement Français du Sang (EFS 2016-09), l'Agence de la BioMedecine (ABM), La Ligue contre le Cancer, Association Recherche et Transfusion (ART), Leucémie Espoir Atlantique Famille (LEAF) and Nantes Atlantique Greffe de Moelle Osseuse (NAGMO). BM is a PhD student supported by a CIFRE/EFS Pays de La Loire/Nantes Université No. 481/2015 grant.

### Disclosure of interest

The authors declare that they have no competing interest.

### References

- [1] Trowsdale J. Genetic and functional relationships between MHC and NK receptor genes. *Immunity* 2001;15:363–74.
- [2] Wilson MJ, Torkar M, Haude A, Milne S, Jones T, Sheer D, et al. Plasticity in the organization and sequences of human *KIR/ILT* gene families. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000;97:4778–83.
- [3] Thananchai H, Gillespie G, Martin MP, Bashirova A, Yawata N, Yawata M, et al. Cutting edge: allele-specific and peptide-dependent interactions between KIR3DL1 and HLA-A and HLA-B. *J Immunol Baltim Md* 2007;178:33–7.
- [4] Battistini L, Borsellino G, Sawicki G, Poccia F, Salvetti M, Ristori G, et al. Phenotypic and cytokine analysis of human peripheral blood gamma delta T cells expressing NK cell receptors. *J Immunol* 1997;159:3723–30.
- [5] Triplett BM, Horwitz EM, Iyengar R, Turner V, Holladay MS, Gan K, et al. Effects of activating NK cell receptor expression and NK cell reconstitution on the outcomes of unrelated donor hematopoietic cell transplantation for hematologic malignancies. *Leukemia* 2009;23:1278–87. <http://dx.doi.org/10.1038/leu.2009.21>.
- [6] Ruggeri L, Capanni M, Urbani E, Perruccio K, Shlomchik WD, Tosti A, et al. Effectiveness of donor natural killer cell alloreactivity in mismatched hematopoietic transplants. *Science* 2002;295:2097–100. <http://dx.doi.org/10.1126/science.1068440>.
- [7] Cooley S, Weisdorf DJ, Guethlein LA, Klein JP, Wang T, Le CT, et al. Donor selection for natural killer cell receptor genes leads to superior survival after unrelated transplantation for acute myelogenous leukemia. *Blood* 2010;116:2411–9. <http://dx.doi.org/10.1182/blood-2010-05-283051>.
- [8] Gagne K, Willem C, Legrand N, Djaoud Z, David G, Rettman P, et al. Both the nature of KIR3DL1 alleles and the KIR3DL1/S1 allele combination affect the KIR3DL1 NK-cell repertoire in the French population. *Eur J Immunol* 2013;43:1085–98. <http://dx.doi.org/10.1002/eji.201243007>.
- [9] Bari R, Thapa R, Bao J, Li Y, Zheng J, Leung W. KIR2DL2/2DL3-E(35) alleles are functionally stronger than -Q(35) alleles. *Sci Rep* 2016;6:23689. <http://dx.doi.org/10.1038/srep23689>.
- [10] Gardiner CM, Guethlein LA, Shilling HG, Pando M, Carr WH, Rajalingam R, et al. Cell surface phenotypes defined by the DX9 antibody are due to *KIR3DL1* gene polymorphism. *J Immunol* 2001;166:2992–3001. <http://dx.doi.org/10.4049/jimmunol.166.5.2992>.
- [11] Boudreau JE, Giglio F, Gooley TA, Stevenson PA, Le Ludec J-B, Shaffer BC, et al. KIR3DL1/HLA A-B subtypes govern acute myelogenous leukemia relapse after hematopoietic cell transplantation. *J Clin Oncol* 2017. <http://dx.doi.org/10.1200/JCO.201670.7059>.
- [12] Alicata C, Pende D, Meazza R, Canevali P, Loiacono F, Bertaina A, et al. Hematopoietic stem cell transplantation: improving alloreactive Bw4 donor selection by genotyping codon 86 of KIR3DL1/S1. *Eur J Immunol* 2016;46:1511–7. <http://dx.doi.org/10.1002/eji.201546236>.
- [13] Mori A, Deola S, Xumerle L, Mijatovic V, Malerba G, Monsurro V. Next generation sequencing: new tools in immunology and hematology. *Blood Res* 2013;48:242–9. <http://dx.doi.org/10.5045/br.2013.48.4.242>.
- [14] Kidd JM, Sharpton TJ, Bobo D, Norman PJ, Martin AR, Carpenter ML, et al. Exome capture from saliva produces high quality genomic and metagenomic data. *BMC Genomics* 2014;15:262. <http://dx.doi.org/10.1186/1471-2164-15-262>.
- [15] Maniangou B, Legrand N, Alizadeh M, Guyet U, Willem C, David G, et al. Killer immunoglobulin-like receptor allele determination using next-generation sequencing technology. *Front Immunol* 2017;8:547. <http://dx.doi.org/10.3389/fimmu.2017.00547>.



**Article N°3** : Impact du polymorphisme allélique KIR2DL1/2/3 sur la structuration et la fonction du répertoire des cellules NK KIR2DL<sup>+</sup>

**Impact of KIR2DL1/2/3 allele polymorphism on the structuration and the function of KIR2DL<sup>+</sup> NK cell repertoire**

**Bercelin Maniangou**, Léa Dubreuil, Nolwenn Legrand, Catherine Willem, Gaëlle David, Mehdi Alizadeh, Dhon Roméo Makanga, Anne Cesbron Gautier, David Senitzer, Christelle Retière and Katia Gagne

**(Article en préparation)**

Les gènes KIR sont connus pour être polymorphe en termes de génotypes, de variation du nombre de copies de gène et d'allèles décrits. Ce polymorphisme au niveau allélique peut avoir un impact sur le répertoire des cellules NK KIR, comme décrit pour le gène KIR3DL1. Dans ce 3<sup>ème</sup> article en préparation, nous avons utilisé la technologie NGS.KIR présentée dans l'article N°1 pour étudier la diversité des allèles KIR2DL1 et KIR2DL2/3 sur un panel des donneurs de sang de l'EFS. Cinq allèles KIR2DL1 et onze allèles KIR2DL2/3 ont été identifiés sur 90 donneurs avec une prédominance des allèles KIR2DL1\*003, KIR2DL2\*003, KIR2DL2\*003, KIR2DL3\*001 et KIR2DL3\*002. Connaissant les spécificités de nos anticorps anti-KIR2D publiés en 2009 (David et al., 2009) et de certains anticorps anti-KIR vendus dans le commerce, nous avons développé une stratégie de phénotypage haute résolution des cellules NK KIR2DL<sup>+</sup>. Cette stratégie nous a permis de cibler, en cytométrie en flux huit couleurs, les sous-populations des cellules NK exprimant chaque allèle KIR2DL. La mise en lien des données alléliques KIR avec les données phénotypiques et fonctionnelles, montrent que le polymorphisme allélique des gènes KIR2DL1 et KIR2DL2/3 peut impacter les fréquences des cellules NK KIR2DL<sup>+</sup>. De plus, l'impact du nombre de copies d'allèles sur le niveau d'expression du récepteur KIR2DL (L1/L2/L3) sur les cellules NK est observé. Les donneurs avec deux copies d'allèles KIR2DL1 ou KIR2DL3 ont un récepteur KIR fortement exprimé sur les cellules NK comparés à ceux possédant qu'une seule copie d'allèle KIR2DL1 ou KIR2DL3.

En outre, les données préliminaires suggèrent que le polymorphisme des allèles KIR2DL1/L2/L3 module également la fonction de dégranulation des cellules NK et les interactions des récepteurs KIR correspondants avec les molécules HLA-Cw d'épitopes C1 ou C2 transfectées sur de lignées cellulaires 721.221 B EBV. Une hiérarchie de reconnaissance du panel des molécules HLA-Cw (C1 ou C2) semble être observée.

D'un point de vue fondamental, la connaissance des allèles KIR permet d'avoir une meilleure compréhension de l'impact du polymorphisme allélique KIR sur la structuration et

fonction du répertoire des cellules NK KIR<sup>+</sup>. D'un point de vue clinique, ces données pourront permettre d'affiner la sélection des donneurs de greffes de CSH haplo-identiques non T déplétées pour mieux évaluer le rôle de l'alloréactivité des cellules NK KIR<sup>+</sup> sur l'effet antileucémique. La connaissance des allèles KIR peut aussi constituer un outil diagnostique dans certaines infections virales, associations KIR-maladies ou pathologies liées à la grossesse. L'ensemble de ces résultats sont présentés dans **l'article N°3**.

1 **Impact of KIR2DL1/L2/L3 allele polymorphism on the**  
2 **structuration and the function of KIR2DL<sup>+</sup> NK cell repertoire**

3  
4 Running title: Phenotype and function of KIR2DL1/L2/L3 alleles

5 **Bercelin Maniangou**<sup>1,2,3</sup>, Léa Dubreuil<sup>1,2,3</sup>, Nolwenn Legrand<sup>1,2,3</sup>, Catherine Willem<sup>1,2,3</sup>, Gaëlle  
6 David<sup>1,2,3</sup>, Mehdi Alizadeh<sup>4</sup>, Dhon Roméo Makanga<sup>1,2,3</sup>, Anne Cesbron Gautier<sup>5,6</sup>, David  
7 Senitzer<sup>7</sup>, Christelle Retière<sup>1,2,3 \*</sup>, \*\* and Katia Gagne<sup>1,2,3,6 \*</sup>, \*\*

8 Institutional affiliations :

9 <sup>1</sup>Etablissement Français du Sang (EFS) Centre Pays de la Loire, laboratoire de recherche,  
10 Nantes, France; <sup>2</sup>CRCINA, INSERM U1232 CNRS, Université d'Angers, Université de  
11 Nantes, Nantes, France; <sup>3</sup>LabEx IGO “Immunotherapy, Graft, Oncology”, Nantes, France; <sup>4</sup>EFS  
12 Bretagne, laboratoire de Recherche et Développement, Rennes, France; <sup>5</sup>EFS Centre Pays de  
13 la Loire, laboratoire d’Histocompatibilité, Nantes, France; <sup>6</sup>LabEx Transplantex, Université de  
14 Strasbourg, France; <sup>7</sup>Division of Hematology and Bone Marrow Transplantation, City of Hope,  
15 National Medical Center, Duarte, California, USA.

16 \* These authors have equally contributed to this work.

17 \*\*Corresponding authors: Dr Katia GAGNE, Dr Christelle RETIERE, Etablissement Français  
18 du Sang Centre Pays de la Loire, INSERM U1232 CNRS, Centre de Recherche en  
19 Cancérologie et Immunologie Nantes-Angers, 34 boulevard Jean Monnet, 44011 Nantes cedex  
20 01, France. Tel: +33-2-40-12-34-00; Fax: +33-2-40-12-33-33; Email:  
21 [katia.gagne@efs.sante.fr](mailto:katia.gagne@efs.sante.fr); [christelle.retiere@efs.sante.fr](mailto:christelle.retiere@efs.sante.fr)

22  
23 Keywords: KIR2DL, HLA-C, KIR allele polymorphism, NK cell repertoire

25 **ABSTRACT**

26

27 *Killer-cell Ig-like receptor (KIR) genes are known to be polymorphic in terms of gene*  
28 *content defining KIR genotypes, copy number variation and number of alleles reported so far.*  
29 *Besides HLA class I environment and viral infections, KIR2DL1/L2/L3 allele polymorphism*  
30 *may impact on KIR2DL<sup>+</sup> NK cell repertoire. Here, using a Next-Generation-Sequencing*  
31 *technology, five KIR2DL1 and eleven KIR2DL2/L3 alleles were first identified in ninety*  
32 *French blood donors, KIR2DL1\*003, KIR2DL2\*001, KIR2DL2\*003, KIR2DL3\*001 and*  
33 *KIR2DL3\*002 being predominant. Irrespective of KIR genotypes, HLA-Cw environment and*  
34 *CMV status, we demonstrate using a high-resolutive phenotyping strategy that KIR2DL1 and*  
35 *to a lesser extent KIR2DL2/L3 allele polymorphism impact on mono-specific KIR2DL<sup>+</sup> NK*  
36 *cell frequencies. Furthermore, we report that KIR2DL1/L2/L3 allele polymorphism modulate*  
37 *both the degranulation of each KIR2DL<sup>+</sup> NK cell subset against HLA-class I deficient target*  
38 *cells and its inhibition against a panel of HLA-C1+ and C2+ target cells. Our results also*  
39 *suggest that KIR2DL/HLA-Cw interactions are regulated both by KIR2DL1/L2/L3 and HLA-*  
40 *C allele polymorphism. Altogether the knowledge of KIR alleles permits a better understanding*  
41 *on the structuration and the function of KIR<sup>+</sup> NK cell repertoire and improve the recognition*  
42 *specificities of anti-KIR monoclonal antibodies. Overall, KIR allele assignment may help to*  
43 *refine the role of KIR<sup>+</sup> NK cells in a clinical context such as after Hematopoietic Stem Cell*  
44 *Transplantations (HSCT), or in reproduction, KIR-associated diseases and viral infections.*

45

## 46 INTRODUCTION

47 Novel transplantation protocols based on the post-transplantation immunosuppressive  
48 treatment have sparked a renewed interest toward the clinical implementation of T-repleted  
49 haploidentical Hematopoietic Stem Cell Transplantation (HSCT) with comparable outcomes  
50 with 10/10 HLA matched unrelated HSCT<sup>1</sup>. The recovery of Natural Killer (NK) cells observed  
51 after T repleted haploidentical HSCT<sup>2,3</sup> play a role in controlling relapse due to the frequent  
52 *Killer cell Immunoglobulin like Receptor* (KIR)/KIR ligand incompatibilities encountered  
53 favoring the effectiveness of donor alloreactive KIR<sup>+</sup> NK cells as initially reported in T depleted  
54 haplo-identical HSCT<sup>4</sup>. Indeed, NK cells are able to discriminate between normal cells and  
55 either allogeneic cells that do not express self HLA class I molecules, or cells with a down-  
56 regulation/absence of HLA class I expression such as leukemic or virus-infected cells. This  
57 missing-self recognition by NK cells is mediated through different receptors specific for HLA  
58 class I molecules<sup>5</sup>. Among these receptors, KIR play a major role in the modulation of NK cell  
59 alloreactivity<sup>6</sup>. KIR are expressed stochastically on NK and some T cells. Inhibitory  
60 (KIR2DL/3DL) and activating (KIR2DS/3DS) KIR are specific for HLA class I molecules. In  
61 particular, KIR2DL1 recognizes exclusively HLA-Cw molecules belonging to the group C2  
62 epitope (Lys<sup>80</sup>)<sup>7</sup> whereas KIR2DL2/L3 recognize HLA-Cw molecules belonging to the group  
63 C1 epitope (Asn<sup>80</sup>) and also some HLA-Cw molecules of group C2<sup>8,9,10</sup>. KIR/HLA class I  
64 interactions play a role in the functional education of NK cells<sup>11</sup>. The absence of engagement  
65 of an inhibitory KIR with its ligand results in an alloreactivity of KIR<sup>+</sup> NK cells only if these  
66 cells were "educated" during their development by the interaction of inhibitory KIR with their  
67 specific self-HLA class I ligand<sup>11</sup>. In contrast to inhibitory KIRs, the ligands of activating KIR  
68 are less well defined due to the absence of specific antibodies and their lower affinity for their  
69 ligands. Nevertheless, KIR2DS1 and KIR2DS2 recognize C2 and C1 ligands respectively as  
70 their inhibitory counterpart<sup>12,13</sup>.

71 Genetically, fourteen functional KIR genes, located on chromosome 19, have been  
72 identified <sup>14</sup>. Within a population, genomic diversity of the KIR region is achieved on several  
73 levels. KIR gene content varies between individuals who can exhibit from 7 to 14 inhibitory  
74 and activating KIR genes. Population studies have demonstrated two major KIR haplotypes.  
75 The A KIR haplotype corresponds to 7 KIR genes, including KIR2DS4 as the only activating  
76 KIR gene. In contrast, B haplotypes are more diverse and are characterized by the presence of  
77 more than one activating KIR gene and the absence of the KIR2DS4 gene<sup>15</sup>. In addition, the  
78 same KIR gene such as KIR2DL1 can be found on multiple haplotypes. Overall 605 different  
79 KIR genotypes have been described worldwide (<http://www.allelefrequencies.net/>). KIR gene  
80 copy number impacting on NK cell education has also been reported from some KIR genes <sup>16</sup>.  
81 Finally, KIR allele polymorphism is probably the largest contributor to KIR region diversity  
82 with 907 alleles reported so far in the last IGMT/KIR database with a potential phenotypic and  
83 functional impact observed for some KIR genes, in particular inhibitory KIR such as KIR3DL1  
84 <sup>17</sup>. The expression of KIR on NK cell surface is variegated<sup>18</sup>. This underlies that the KIR<sup>+</sup> NK  
85 cell functional repertoire corresponding to a clonal expression of different KIR receptor  
86 combinations is defined not only by the number/nature of the KIR genes present in an  
87 individual, the HLA class I autologous environment, the immunological history such as viral  
88 infections of the individual but also by KIR allele polymorphism <sup>19</sup>. So far, the impact of KIR  
89 gene polymorphism on HSCT outcome remains mostly based on the analysis of KIR/KIR  
90 ligand genetic combinations without taking into account neither KIR expression nor KIR allele  
91 polymorphism probably due to the lack of specific anti-KIR monoclonal antibodies (mAbs) and  
92 suitable KIR allele typing methods respectively. Nevertheless, recent high resolution KIR allele  
93 typing by Next-Generation Sequencing (NGS), we <sup>20</sup> and others <sup>21</sup> have developed, a sensitive,  
94 specific and robust method allowing the detection of KIR alleles of all KIR genes. Moreover,  
95 the availability of KIR-specific mAbs we produced constitutes a powerful tool to discriminate

96 the main activating and inhibitory KIR2D<sup>+</sup> NK cell subsets <sup>22</sup>. For an easier understanding of  
97 KIR<sup>+</sup> NK cell repertoire formation and the clinical impact of KIR<sup>+</sup> NK cell alloreactivity on  
98 haplo-identical HSCT outcome, a link between KIR allelic polymorphism, phenotype and  
99 function of corresponding KIR seems mandatory.

100 In this study, we focused on KIR2DL1 and KIR2DL2/L3 allele polymorphism since  
101 quite limited alleles have been reported so far (59, 31 and 59 alleles respectively) and because  
102 these genes or particular alleles have been associated with some diseases <sup>23</sup> or HSCT outcome  
103 <sup>24</sup>. Moreover, if all HLA-Cw molecules represent ligands for KIR2DL1/L2/L3, the hierarchy  
104 of HLA-Cw molecule recognition we previously reported <sup>9</sup> was done without taking into  
105 account the nature of KIR2DL1/L2/L3 allele and needs to be elucidated. We hypothesized that  
106 the KIR2DL1/L2/L3 allele polymorphism may affect the structuration and the function of  
107 KIR2DL<sup>+</sup> NK cell repertoire as we previously reported for KIR3DL1 <sup>25</sup>. In this study, we  
108 reported, in a French population of blood donors, the KIR2DL1/L2/L3 allele distribution, the  
109 frequencies of single specific KIR2DL<sup>+</sup> NK cell subset depending on KIR2DL1/L2/L3 allele  
110 expressed, the hierarchy of HLA-Cw epitopes recognition and the functional impact of those  
111 alleles on KIR2DL<sup>+</sup> NK cell repertoire taking into account the CMV status and HLA-Cw  
112 environment.

113



114 **MATERIALS AND METHODS:**

115 **Cells (PBMCs and cell lines)**

116 Peripheral Blood Mononuclear Cells (PBMC) were isolated by density centrifugation  
117 on Ficoll-Hypaque (Biosera, France) from peripheral blood of ninety healthy adult volunteers.  
118 All blood donors were recruited at the Blood Transfusion Center (Etablissement Français du  
119 Sang, Nantes, France), and informed consent was given by all donors (DC-2014-2340).  
120 Cytomegalovirus (CMV) status was available for eighty seven donors.

121 HLA class I-deficient 721.221 lymphoblastoid cells, referred to as 221 cells, were used  
122 as positive control to assess NK cell degranulation. HLA-C\*03:04 (C1), HLA-C\*07:01 (C1),  
123 HLA-C\*08:02 (C1), HLA-C\*02:02 (C2), HLA-C\*04:01 (C2), HLA-C\*06:02 (C2) and HLA-  
124 C\*15:03 (C2) transfected 221 cells were used to evaluate NK cell degranulation of different  
125 KIR2DL1/L2/L3<sup>+</sup> NK cell subsets. HLA-C\*02:02, HLA-C\*03:04, HLA-C\*04:01, and HLA-  
126 C\*07:01 transfected 221 cells were provided by Prof. P. Parham (Stanford University, CA,  
127 USA). HLA-C\*02:02, HLA-C\*06:02, HLA-C\*08:02 and HLA-C\*15:03 transfected 221 cells  
128 were obtained by stable transfection of 221 cell line by electroporation (BioRad) using,  
129 respectively, pcIneo-HLA-C\*08:02, pcIneo-HLA-C\*06:02 both provided by Dr. Agnès  
130 Moreau (CRCINA, INSERM U1232, Nantes, France). The 221 cell line and HLA-Cw-  
131 transfected 221 cell lines were cultured in RPMI 1640 medium (Life Technologies, Paisley,  
132 UK) containing glutamine (Life Technologies) and penicillin-streptomycin (Life  
133 Technologies), and supplemented with 10% FBS (Life Technologies). Mycoplasma tests  
134 performed by PCR were negative for all cell lines.

135

136 ***In vitro* model of NK-cell expansion**

137 NK cell amplification was done using an *in vitro* model based on a protocol previously  
138 described<sup>26</sup>. Briefly, six millions of PBMC from chosen donors were cultured in 6-well flat-

139 bottomed plates with irradiated allogeneic EBV-B-cell lines at a E:T ratio PBMC:221 cells of  
140 10:1. Cells were grown in RPMI 1640 serum-free medium containing 10% of human serum  
141 (Etablissement Français du Sang, Nantes, France), 50 U/mL penicillin, 50 mg/mL streptomycin  
142 and 200 IU/mL IL-2 (Chiron, Suresnes, France). The culture medium was replaced twice a  
143 week with a new RPMI medium containing fresh IL-2. PBMC phenotyping was performed at  
144 days 10 and 12 to check the activation state of NK cells (frequencies of NKG2A<sup>+</sup>  
145 KIR2DL1/L2/L3/S2<sup>-</sup> NK cells). NK cells were considered at rest when the percentage of NK  
146 cells expressing NKG2A become less than or equal to fifty. Cells were maintained for 17 days  
147 and expanded in their culture medium containing IL-2 without re-stimulation with feeders  
148 before functional analysis.

149

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

151 Intensity of HLA class I molecule expression was evaluated on all HLA-C transfected  
152 221 cell lines using the mouse anti-human monoclonal antibody (mAbs) NaM41-1E3 (EFS  
153 Nantes)<sup>27</sup>. The phenotype of NK cells, defined as CD3<sup>-</sup>CD56<sup>+</sup>, was determined by 8-color  
154 multiparameter flow cytometry (MFC) using the following mAbs: anti-KIR2DL1-FITC  
155 (143211; R&D Systems), anti-KIR2DL1/S1-PE (EB6), anti-KIR2DL2/L3/S2-PE (GL183;  
156 Beckman Coulter Immunotech, Marseille, France), anti-KIR2DL3-FITC (clone 180701; R&D  
157 systems), anti-CD3-BV510 (SK7, Sony Biotechnology, San Jose, CA), anti-NKG2A-PC7  
158 (Z199; Beckman Coulter), anti-CD56-APC-Cy7 (HCD56), anti-KIR2DL1/L2/L3/S2-FITC  
159 (8C11), anti-KIR2DL3/S2-AF647 (1F12), and anti-KIR2DL1/L2/L3/S1/S2-FITC (1A6),  
160 generated and characterized in our laboratory<sup>22</sup>. MFC phenotypic data were collected on a  
161 FACSCanto II instrument (BD Biosciences) and analyzed with Flowjo<sup>TM</sup> 10.2 software (LLC,  
162 Ashland, OR, USA).

163

164

165 **CD107a mobilization assay**

166 *Ex-vivo* or *in-vitro* expanded NK cells were pre-incubated with the anti-CD107a-BV421  
167 mAb (H4A3; BD Biosciences) at 37°C. NK cell degranulation was assessed after incubation  
168 for 5h alone, with the 221 target cells (negative control) or different HLA-C transfected 221  
169 target cells (E/T ratio=2:1 or 1:1) with brefeldin A (Sigma) at 10 µg/ml for the last 4h.  
170 Experiments were carried out in duplicate for each condition tested. The cells were surface-  
171 stained using the anti-human KIR mAbs mentioned in the previous section. Degranulation of  
172 NK cells, defined by CD107a positive expression, was studied by MFC, using CD3 absence  
173 and CD56 expression to target NK cells. All functional MFC data were collected on a  
174 FACSCanto II instrument (BD Biosciences) and analyzed with the Flowjo™ 10.2 software  
175 (LLC, Ashland, OR, USA).

176

177 **HLA class I typing**

178 High-resolution typing for HLA-A, -B, and -C loci was carried out for all blood donors  
179 by Next-Generation-Sequencing (NGS) using Omixon Holotype HLA® (Omixon, Budapest,  
180 Hungary)<sup>28</sup>. Briefly, DNA samples were amplified for the three HLA class I loci by long-range  
181 PCR. Amplicons were then cleaned with Exo-SAP® (Affymetrix, Santa Clara, CA, USA),  
182 quantified with the Quantifluor® kit (Promega, Madison, WI, USA), and normalized.  
183 Sequencing libraries were generated for each sample using the Omixon Holotype HLA  
184 Genotyping Kit®. Libraries from individual HLA amplicons were prepared by enzymatic  
185 fragmentation, end repaired, adenylated, and ligated with indexed adaptors. The indexed  
186 libraries were pooled and concentrated with Ampure XP beads (Beckman Coulter, La Brea,  
187 CA, USA) before fragment size selection using PippinPrep® (Sage Science, Beverly, MA,  
188 USA). The size-selected library pool was quantified by qPCR (Kapa Biosystems, Basel,  
189 Switzerland), adjusted to 2 nM, denatured and diluted for optimal cluster density before loading

190 into a MiSeq reagent cartridge (Illumina, San Diego, CA, USA). The reagent cartridge and  
191 corresponding flow cell (500 cycles) were placed on an Illumina MiSeq. Samples were  
192 demultiplexed and the resulting FASTQ files were analyzed using Twin Omixon software  
193 (Omixon, Budapest, Hungary).

194 Blood donors (N=90) were classified into C1C1+, C1C2+ and C2C2+ individuals  
195 depending on KIR2DL1/L2/L3 ligand groups, C1C1, C1C2 and C2C2 being defined based on  
196 allelic HLA-C typing.

197

### 198 **KIR genotyping**

199 KIR generic typing was performed on all individuals using a KIR multiplex PCR-SSP  
200 method as previously described <sup>29</sup>. The presence or absence of KIR2DL1, 2DL2, 2DL3, 2DL5,  
201 3DL1, 2DS1, 2DS2, 2DS3, 2DS4/1D, 2DS5 and 3DS1 genes were assigned. KIR genotypes  
202 were determined based on the presence or the absence of activating KIR. Thus, a KIR AA  
203 genotype was defined by the presence of only KIR2DS4 as activating KIR gene, and a KIR B+  
204 (AB, BB) genotype by the presence of several activating KIR genes <sup>30</sup>.

205

### 206 **KIR allele typing**

207 To assign KIR2DL1/L2/L3/S2 alleles, KIR genes were firstly captured by Long Range  
208 PCR and subjected to sequencing on a MiSeq sequencer after library preparation as previously  
209 described <sup>20</sup>. The quality of raw data was monitored by using the Illumina Sequencing Analysis  
210 viewer software. KIR2DL1/L2/L3/S2 allele assignment was performed by using the Profiler  
211 software version 2.24 developed by Dr M. Alizadeh (Research Laboratory, Blood Bank,  
212 Rennes, France) as described <sup>20</sup>. An updated KIR allele library (February 2018, version 2.7.1)  
213 available on the IPD-KIR database (Pr S. Marsh, Dr J. Robinson, Anthony Nolan, London UK)  
214 was implemented into the Profiler software.

215

216 **Statistical analyses**

217           Categorical data were analyzed by Chi-square test. Statistical differences in  
218 KIR2DL1/L2/L3<sup>+</sup> NK cell frequencies between series of individuals having different  
219 KIR2DL1/L2/L3 alleles were analyzed with unpaired t tests or one-way ANOVA test for  
220 multiple comparisons using the GraphPad Prism v6.0 software (San Diego, CA, USA).  
221 P values<0.05 were considered statistically significant.

222

223

## 224 RESULTS

### 225 *Distribution of KIR2DL1 alleles in a French population*

226 To assess the functional impact of KIR2DL1/L2/L3 allele polymorphism on KIR2DL<sup>+</sup>  
227 NK cell functional repertoire, we first determined corresponding alleles using an NGS.KIR  
228 technology that we recently developed <sup>20</sup> on a cohort of French blood donors. On forty-one  
229 KIR2DL1+ genotyped donors, five KIR2DL1 alleles (\*001, \*002, \*003, \*004 and \*007) were  
230 identified (Fig. 1A). The most common KIR2DL1 allele found in the French population was  
231 the KIR2DL1\*003 with a frequency of 59% followed by KIR2DL1\*002 (17%) and  
232 KIR2DL1\*004 (12%) (Fig. 1B). Interestingly, KIR2DL1\*003 allele was mainly found in a  
233 homozygous state (48.8%) in contrast to KIR2DL1\*002 or KIR2DL1\*004 preferentially  
234 associated with another KIR2DL1 allele (Fig. 1A, 1C). Besides KIR2DL1 allele copy number,  
235 we investigated KIR2DL1 allele distribution depending on KIR gene content since KIR2DL1  
236 gene is present on both AA and B+ KIR genotypes. In AA+ genotyped donors, only  
237 KIR2DL1\*001, \*002 and \*003 alleles were present with a higher frequency of the  
238 KIR2DL1\*003 allele (Fig. 1D). In contrast, B+ genotyped donors were characterized by the  
239 presence of KIR2DL1\*002, \*003, \*004, and \*007 alleles, KIR2DL1\*004 and KIR2DL1\*007  
240 being only found in B+ KIR genotyped donors (Fig. 1D). To evaluate the distribution of  
241 KIR2DL1 alleles depending on HLA-Cw environment, donors were further divided into  
242 C1C1+, C1C2+ and C2C2+ individuals. The KIR2DL1\*003 allele was predominant in C1C2  
243 (78.2%) compared to C1C1 (53.6%) and C2C2 (36.4%) donors (Fig. 1E). In contrast, the  
244 KIR2DL1\*002 allele was less frequent in C1C2 (3%) compared to C1C1 (29%) and C2C2  
245 (23%) donors (Fig. 1E). CMV status did not impact on KIR2DL1 allele distribution (data not  
246 shown).

247

248

249 ***Distribution of KIR2DL2/3 alleles in a French population***

250           Because KIR2DL2 and KIR2DL3 segregate as alleles of one locus, KIR2DL2 and  
251 KIR2DL3 allele distribution was analysed together. On ninety KIR2DL2/L3+ genotyped  
252 donors, eleven KIR2DL2/L3 alleles were identified (i.e L2\*001, L2\*003, L2\*005, L2\*008,  
253 L2\*012, L3\*001, L3\*002, L3\*003, L3\*005, L3\*007 and L3\*015) (Fig. 2A). KIR2DL3\*001  
254 (31.6%), KIR2DL3\*002 (26.1%), KIR2DL2\*001 (15%) and KIR2DL2\*003 (11.6%) were the  
255 most frequent alleles (Fig. 2B). These four KIR2DL2/3 alleles were predominantly found at a  
256 heterozygous state (Fig. 2C). In concordance with KIR gene content, KIR2DL2 alleles were  
257 only found in B+ genotyped donors (Fig. 2D). The KIR2DL3\*001 allele was most frequent in  
258 AA (21.6%) compared to B+ genotyped donors (9.4%) (Fig. 2D). No striking difference was  
259 found on the KIR2DL2/L3 allele distribution in regards to HLA-C environment (Fig. S1). In  
260 addition, we observed no significant KIR2DL2/L3 allele distribution difference in regards to  
261 CMV status (data not shown). Lastly, due to linkage disequilibrium between KIR2DL2 and  
262 KIR2DS2, assignment of KIR2DS2 alleles was also done in fifty KIR2DL2/L3/S2+ genotyped  
263 donors. KIR2DS2\*001 allele was the predominant one (97%) (data not shown). This low  
264 KIR2DS2 allelic polymorphism drive us to focus only on inhibitory KIR2DL2/L3 genes.

265

266 ***KIR2DL1 allelic polymorphism and CNV influence the KIR2DL1<sup>+</sup> NK cell repertoire***

267           Because the KIR2DL1\*003 allele was the most frequent variant found in the  
268 homozygous state (Fig. 1A, 1C), we first evaluated the frequency of KIR2DL1\*003<sup>+</sup> NK cell  
269 subset in KIR2DL1\*003 homozygous donors (N=20) either KIR2DS1<sup>+</sup> or KIR2DS1<sup>-</sup> by using  
270 the combination of anti-KIR2DL1/S1 (EB6) and anti-KIR2DL1 (143211) mAbs to discriminate  
271 KIR2DL1<sup>+/S1<sup>-/+</sup></sup> from KIR2DS1<sup>+/L1<sup>-</sup></sup> NK cell subsets especially in KIR2DL1/S1<sup>+</sup> genotyped  
272 donors (Fig. 3A). All EB6<sup>+</sup>KIR2DL1<sup>+</sup> NK cell subset (Fig. 3A) was considered to establish the

273 frequency of KIR2DL1\*003<sup>+</sup> NK cell subset in KIR2DS1<sup>+</sup> and KIR2DS1<sup>-</sup> donors (Fig. 3A).  
274 Overall, no impact of HLA-C environment (Fig. 3B), KIR genotypes (Fig. 3C) or CMV status  
275 (Fig. 3D) on KIR2DL1\*003<sup>+</sup> NK cell frequency was observed in the KIR2DL1\*003<sup>+</sup>  
276 homozygous donors.

277 To strengthen the impact of KIR2DL1 allele combinations on KIR2DL1<sup>+</sup> NK cell  
278 repertoire excluding other KIR2D subpopulations, we defined another KIR2DL1<sup>+</sup> NK cell  
279 targeting strategy thanks to KIR-specific mAbs we developed which permit the discrimination  
280 of the main activating and inhibitory KIR2D<sup>+</sup> NK cell subsets <sup>22</sup>. For that purpose, we used a  
281 combination of anti-KIR2DL1/S1 (EB6), anti-KIR2DL1 (143211), anti-KIR2DL2/L3/S2  
282 (GL183), anti-KIR2DL1/L2/L3/S1/S2 (1A6) and anti-KIR2DL1/L2/L3/S2 (8C11) mAbs to  
283 evaluate the frequency of KIR2DL1<sup>+</sup>/L2/L3/S1/S2<sup>-</sup> NK cell subset (Fig. 4A). The combination  
284 of *in-house* 8C11 and 1A6 mAbs allowed us to separate NK cell subset expressing the  
285 KIR2DL1 receptor encoded by different KIR2DL1 alleles. Because, the 1A6 mAb cross-reacts  
286 with KIR2DL2/L3/S1/S2 receptors <sup>22</sup>, we started by targeting only the KIR2DL1<sup>+</sup>GL183<sup>-</sup> NK  
287 cell subset either from all CD56<sup>+</sup>CD3<sup>-</sup> NK cells in KIR2DS1<sup>-</sup> donors or from KIR2DL1<sup>+</sup>S1<sup>-</sup>  
288 (2DL1<sup>+</sup>EB6<sup>-</sup>) and KIR2DL1<sup>+</sup>S1<sup>+</sup> (EB6<sup>+</sup>2DL1<sup>+</sup>) NK cells subsets in KIR2DS1<sup>+</sup> genotyped  
289 donors (Fig. 4A). Knowing the potential recognition site for both 8C11 and 1A6 mAbs <sup>22</sup>, the  
290 combination of these mAbs allowed us to discriminate KIR2DL1\*003<sup>+</sup> (8C11<sup>+</sup>1A6<sup>-</sup>),  
291 KIR2DL1\*001/\*002<sup>+</sup> (8C11<sup>+</sup>1A6<sup>+</sup>) and KIR2DL1\*004/\*007<sup>+</sup> NK cell subsets (8C11<sup>-</sup>1A6<sup>+</sup>)  
292 (Fig. 4A).

293 The frequency of KIR2DL1<sup>+</sup>/L2/L3/S1/S2<sup>-</sup> NK cell subset depending on the nature  
294 and/or dose of KIR2DL1 alleles was assessed in both homozygous and heterozygous  
295 KIR2DL1<sup>+</sup> donors. For KIR2DL1\*003 allele, we found that the frequency of  
296 KIR2DL1<sup>+</sup>/L2/L3/S1/S2<sup>-</sup> NK was significantly higher in donors with two allele copies  
297 compared to those having only one allele copy (mean=9.38 ± 1.08, n=18 vs mean=3.46± 0.41,



298  $n=11$ ,  $p<0.001$ ; Fig. 4B). To compare KIR2DL1 receptor expression within all KIR2DL1  
299 alleles encountered in our population, frequencies of KIR2DL1<sup>+</sup>/L2/L3/S1/S2<sup>-</sup> NK cells in  
300 homozygous donors were divided by two to bring it back to one to compare data obtained from  
301 heterozygous donors. The frequency of KIR2DL1\*002<sup>+</sup>/L2/L3/S1/S2<sup>-</sup> NK cell subset was  
302 higher compared to those having either KIR2DL1\*004 (mean=5.50±0.58,  $n=10$  vs mean=2.53±  
303 0.33,  $n=9$ ,  $p<0.001$ ) or KIR2DL1\*007 allele encoded receptor (mean=5.50± 0.58,  $n=10$  vs  
304 mean=1.32±0.52,  $n=3$ ,  $p<0.01$ ; Fig. 4C). In addition, the frequency of  
305 KIR2DL1\*003<sup>+</sup>/L2/L3/S1/S2<sup>-</sup> NK cell was higher compared to KIR2DL1\*004  
306 (mean=4.10±0.42,  $n=28$  vs mean=2.53±0.33,  $n=9$ ,  $p<0.05$ ) and KIR2DL1\*007 allele encoded  
307 receptors (mean=4.10±0.42,  $n=28$  vs mean=1.33±0.52,  $n=3$ ,  $p<0.05$ ; Fig. 4C). Neither the  
308 HLA-Cw environment nor the CMV status did affect the frequency of KIR2DL1<sup>+</sup>/L2/L3/S1/S2<sup>-</sup>  
309 NK cells depending on each KIR2DL1 allele encoded receptor (data not shown).

310 Taken together, these results showed a hierarchy of KIR2DL1<sup>+</sup> NK cell frequencies  
311 depending on the nature of KIR2DL1 alleles, the highest frequency being represented by  
312 KIR2DL1\*002>KIR2DL1\*003>KIR2DL1\*004>KIR2DL1\*007 allele encoded receptor.

313

#### 314 *Less stringent impact of KIR2DL3 allelic polymorphism on the KIR2DL3<sup>+</sup> NK cell repertoire*

315 As previously shown, KIR2DL3\*001, KIR2DL3\*002, KIR2DL2\*001 and  
316 KIR2DL2\*003 alleles were the most frequent in our French cohort (Fig. 2B). To investigate  
317 expression pattern of these KIR2DL2/L3 alleles, NK cell subsets expressing the  
318 KIR2DL2/L3/S2 receptors from CD56<sup>+</sup>CD3<sup>-</sup> NK cells were first identified by using the  
319 combination of anti-KIR2DL3 (180701) and anti-KIR2DL2/L3/S2 (GL183) mAbs (Fig. 5A).  
320 Then, by combining the anti-KIR2DL3 and *in-house* KIR2DL3/S2 (1F12, David et al., 2009)  
321 mAbs, we are able to discriminate KIR2DL2<sup>+</sup>, KIR2DL3<sup>+</sup> and/or KIR2DS2<sup>+</sup> NK cell subsets  
322 in KIR2DL2<sup>+</sup>/L3<sup>+</sup>/S2<sup>+</sup>, KIR2DL2<sup>+</sup>/L3<sup>-</sup>/S2<sup>+</sup> or KIR2DL2<sup>-</sup>/L3<sup>+</sup>/S2<sup>-</sup> genotyped donors (Fig.

323 5A). Because we cannot target all KIR2DL2<sup>+</sup> NK cell subset in the absence of specific anti-  
324 KIR2DL2 mAbs, we focused the study on KIR2DL3<sup>+</sup> NK cell subsets thanks to KIR-specific  
325 mAbs which permit the discrimination of some KIR2DL3 allele encoded receptors. In  
326 particular, thanks to the combination of anti-KIR2DL2/L3/S2 (GL183), anti-KIR2DL3/S2  
327 (1F12, David et al., 2009), and the EB6 (anti-KIR2DL1/S1) mAbs which cross-reacts with  
328 KIR2DL3\*005 allele encoded receptor<sup>31</sup>, we were able to target the KIR2DL3\*005<sup>+</sup> NK cell  
329 subset, as illustrated in Fig. 5B for one representative KIR2DL2/L3/S2<sup>+</sup> genotyped donor. In  
330 contrast to KIR2DL3\*001 and KIR2DL3\*002 allele encoded receptors which cannot be  
331 separated in heterozygous KIR2DL3\*001, \*002<sup>+</sup> genotyped donors with the combinations of  
332 anti-KIR2DL3 and anti-KIR2DL3/S2 (1F12) mAbs, sorting of NK cell subsets expressing  
333 KIR2DL3\*005 was possible in heterozygous donors (Fig. 5C). Interestingly, we should note  
334 that the anti-KIR2DL3 mAbs (clone 180701) do not recognize the KIR2DL3\*005 receptor<sup>31</sup>,  
335 so by combining the anti-KIR2DL3 with anti-KIR2DL3/S2 (1F12) mAbs, we were able to  
336 separate KIR2DL3\*005<sup>+</sup> (1F12+KIR2DL3-) from KIR2DL3\*002<sup>+</sup> (1F12+/KIR2DL3+) NK  
337 cell subset and potentially their co-expression as illustrated for one representative KIR2DL2-  
338 /KIR2DL3+/KIR2DS2- genotyped donor (Fig. 5C). To further analyse the frequencies of  
339 KIR2DL3\*001<sup>+</sup> NK cell subsets, only homozygous KIR2DL3\*001+/L2- and  
340 KIR2DL2+/L3\*001+ genotyped donors were selected. The same strategy was applied to  
341 analyse KIR2DL3\*002<sup>+</sup> NK cell subsets taking into account only homozygous  
342 KIR2DL3\*002+/L2- and KIR2DL2+/L3\*002+ genotyped donors.

343 Thanks to this cell targeting strategy, the frequency of KIR2DL3<sup>+</sup> NK cell subset was  
344 investigated taking into account in particular the nature and dose of KIR2DL3 alleles. In our  
345 cohort, the frequency of KIR2DL3\*001<sup>+</sup> NK cell subset was significantly higher in  
346 KIR2DL3\*001 homozygous donors compared to donors with only one copy of KIR2DL3\*001  
347 ( $25.97 \pm 2.83$ ,  $n=14$  vs  $14.62 \pm 1.53$ ,  $n=17$ ,  $p<0.001$ ; Fig. 6A). The frequency of KIR2DL3\*002<sup>+</sup>

348 NK cell subset was also higher in KIR2DL3\*002 homozygous donors compared to  
349 heterozygous ones ( $25.10 \pm 1.3$ ,  $n=2$  vs  $11.39 \pm 0.92$ ,  $n=26$ ,  $p < 0.001$ ; Fig. 6A). All  
350 KIR2DL3\*005+ genotyped donors were found in a heterozygous state avoiding any  
351 comparison of KIR2DL3\*005+ NK cells between heterozygous and homozygous donors (Fig.  
352 6A). For direct comparisons of KIR2DL3+ NK cell frequencies obtained with the  
353 KIR2DL3\*001, KIR2DL3\*002 and KIR2DL3\*005 allele encoded receptors, we divided by  
354 two the percentage of KIR2DL3+ NK cell obtained in KIR2DL3+ homozygous donors to bring  
355 it back to one allele copy to compare with data obtained from heterozygous donors. In that case,  
356 no significant difference was observed in terms of KIR2DL3+ NK cell expression depending  
357 on the KIR2DL3\*001, KIR2DL3\*002 or KIR2DL3\*005 allele expressed (Fig. 6B). Due to  
358 small sample size of KIR2DL3\*005+ genotyped donors (i.e 5 out of 90 donors), the comparison  
359 of KIR2DL3+ NK cell frequencies according to HLA-Cw environment and CMV status was  
360 only done for KIR2DL3\*001 and KIR2DL3\*002 allele encoded receptors. No significant  
361 difference in terms of KIR2DL3\*001+ or KIR2DL3\*002+ NK cell expression according to  
362 HLA-Cw environment (Fig. 6C) and CMV status (Fig. 6D) was observed.

363 Taken together, these data highlighted that KIR2DL2/L3 allele polymorphism impact  
364 less on KIR2DL2/L3+ NK cell phenotype compare to KIR2DL1.

365

### 366 ***Impact of KIR2DL1 allele polymorphism on KIR2DL1+ NK cell degranulation and HLA-Cw*** 367 ***specificity recognition***

368 Since we showed that KIR2DL1 allele polymorphism impacts on KIR2DL1+ NK cell  
369 phenotype, we further investigate whether this polymorphism may impact on KIR2DL1+ NK  
370 cell function. For that purpose, we tested the *ex-vivo* potential degranulation of NK cells  
371 expressing only the KIR2DL1 receptor encoded by different KIR2DL1 alleles against the HLA  
372 class I negative 721.221 B-EBV cell line (221 cell line) in educated C2+ donors. To target each

373 KIR2DL1 allele encoded receptor for CD107a<sup>+</sup> KIR2DL1<sup>+</sup>/L2/L3/S1/S2<sup>-</sup> NK cell  
374 degranulation assay, we used the combinations of anti-KIR2DL1/S1 (EB6), anti-KIR2DL1  
375 (143211), anti-KIR2DL2/L3/S2 (GL183), *in-house* anti-KIR2DL1/L2/L3/S2 (8C11) and anti-  
376 KIR2DL1/L2/L3/S1/S2 (1A6) mAbs (Fig. 7A). As previously described, we gated each  
377 KIR2DL1 allele encoded receptor with the combination of 8C11 and 1A6 mAbs by targeting  
378 first KIR2DL1<sup>+</sup>GL183<sup>-</sup> NK cell subset from all CD56<sup>+</sup>CD3<sup>-</sup> NK cells in KIR2DS1<sup>-</sup> genotyped  
379 donors (Fig. 7A). In KIR2DS1<sup>+</sup> genotyped donors, the combination of EB6 and anti-KIR2DL1  
380 mAbs was also used to remove the KIR2DS1<sup>+</sup> and KIR2DL1<sup>+</sup>/S1<sup>+</sup> NK cell subsets (Fig. 7A).  
381 Due to the small sample size of C2<sup>+</sup> donors, only the *ex-vivo* potential of  
382 KIR2DL1<sup>+</sup>/L2/L3/S1/S2<sup>-</sup> NK cell degranulation expressing either the KIR2DL1\*003 or  
383 KIR2DL1\*004 allele encoded receptor was compared. In our cohort, we did not observe a  
384 significant difference in terms of CD107a<sup>+</sup> KIR2DL1<sup>+</sup>/L2/L3/S1/S2<sup>-</sup> NK cell degranulation for  
385 these both encoded KIR2DL1 alleles (Fig. 7B).

386         To decipher KIR2DL1-HLA-Cw interactions depending on both KIR2DL1 and HLA-  
387 C allele polymorphism, we used expanded NK cells after *in vitro* amplification to test the  
388 inhibition of KIR2DL1<sup>+</sup> NK cell degranulation against a panel of C2<sup>+</sup> vs C2<sup>-</sup> (C1<sup>+</sup>) transfected  
389 221 cell lines since any inhibition of KIR2DL1<sup>+</sup> NK cell degranulation was observed from *ex-*  
390 *vivo* KIR2DL1<sup>+</sup> NK cells (data not shown). After amplification, KIR2DL1\*002<sup>+</sup> or  
391 KIR2DL1\*003<sup>+</sup> NK cell subsets were selected by using a combination of anti-  
392 KIR2DL1/L2/L3/S2 (8C11) and anti-KIR2DL1/L2/L3/S1/S2 (1A6) mAbs from sorted  
393 KIR2DL1<sup>+</sup>L2/L3/S2/NKG2A<sup>-</sup> NK cells in KIR2DS1<sup>-</sup> genotyped donors (Fig. 8). In KIR2DS1<sup>+</sup>  
394 genotyped donors, a combination of anti-KIR2DL1/S1 (EB6) and anti-KIR2DL1 (143211)  
395 mAbs was used before to remove the KIR2DS1<sup>+</sup> and KIR2DL1/S1<sup>+</sup> NK cell subsets from  
396 amplified CD56<sup>+</sup>CD3<sup>-</sup> NK cells (Fig. 8). In parallel, the expression of HLA class I molecules  
397 was checked on the panel of C1 and C2 transfected 221 cell lines confirming that all HLA-Cw

398 transfected 221 cell lines tested expressed HLA class I molecules in contrast to the HLA class  
399 I negative 221 cell line (Fig. 9A). The C2 specificity of KIR2DL1\*002<sup>+</sup> and KIR2DL1\*003<sup>+</sup>  
400 NK cells was confirmed with a hierarchy of recognition toward different HLA-C allele encoded  
401 molecules belonging to the C2 KIR ligand group i.e HLA-C\*02:02>HLA-C\*04:01>HLA-  
402 C\*06:02>HLA-C\*15:03 (Fig. 9B). Indeed, for both KIR2DL1 alleles tested, 221-HLA-  
403 C\*02:02 and 221-HLA-C\*04:01 cell lines inhibited more efficiently  
404 KIR2DL1<sup>+</sup>/S1/L2/L3/S2/NKG2A<sup>-</sup> NK cell degranulation than the 221-HLA-C\*06:02 cell line.  
405 Interestingly, the 221-HLA-C\*15:03 cell line inhibited better the degranulation of  
406 KIR2DL1\*003<sup>+</sup>/S1/L2/L3/S2/NKG2A<sup>-</sup> NK cell subset than KIR2DL1\*002<sup>+</sup> NK cells  
407 (p<0.05). As expected as C1 positive 221 cell lines, 221-HLA-C\*03:04, -C\*07:01 and -  
408 C\*08:02 cell lines did not inhibit the degranulation of KIR2DL1\*002<sup>+</sup> and  
409 KIR2DL1\*003<sup>+</sup>/S1/L2/L3/S2/NKG2A<sup>-</sup> NK cell subset suggesting no interaction between these  
410 HLA-Cw molecules and KIR2DL1 allele encoded receptors although a partial inhibition of  
411 KIR2DL1\*003<sup>+</sup> NK cell degranulation against the 221-C\*08:02 cell line was observed (Fig.  
412 9B).

413

414 ***Impact of KIR2DL2/L3 allele polymorphism on KIR2DL2/L3<sup>+</sup> NK cell degranulation and***  
415 ***HLA-Cw specificity recognition***

416 Although we showed a less stringent impact of KIR2DL3 allele polymorphism on  
417 KIR2DL3<sup>+</sup> NK cell phenotype compared to KIR2DL1, we further investigate whether  
418 KIR2DL2/L3 alleles and/or HLA-Cw ligand specificities modulate KIR2DL2/L3<sup>+</sup> NK cell  
419 degranulation. For that purpose, we tested the inhibition of degranulation of NK cells  
420 expressing either the KIR2DL2 or the KIR2DL3 receptor encoded by different alleles against  
421 the panel of C1<sup>+</sup> vs C1<sup>-</sup> (C2<sup>+</sup>) transfected 221 cell lines. As previously described, NK cells  
422 were first *in vitro* amplified (Fig. 10A). To evaluate the recognition capacity of KIR2DL2 and

423 KIR2DL3 allele encoded receptors toward the panel of HLA-Cw ligands, we targeted either  
424 KIR2DL2<sup>+</sup> or KIR2DL3<sup>+</sup> NK cell subsets for each KIR2DL2/3 allele encoded receptor by using  
425 a combination of anti-KIR2DL3/S2 (1F12) and anti-KIR2DL3 (clone 180701) mAbs (Fig.  
426 10A). KIR2DL2/L3<sup>+</sup> NK cell subsets were initially gated from GL183<sup>+</sup>KIR2DL1/S1/NKG2A<sup>-</sup>  
427 cells after NK cell amplification (Fig. 10A). Because, as previously reported, KIR2DL3\*005  
428 was not recognized by the anti-KIR2DL3 (clone 180701) mAb used, another strategy to target  
429 the KIR2DL3\*005<sup>+</sup>KIR2DL1/S1/S2/NKG2A<sup>-</sup> NK cell subset was developed as illustrated for  
430 one KIR2DL3\*002, \*005 genotyped donor in Fig. 10B.

431 In accordance with the C1 specificity of recognition of KIR2DL2/L3 receptors, the 221-  
432 HLA-C\*03:04 cell line strongly inhibited KIR2DL2/L3<sup>+</sup>/L1/S1/S2/NKG2A<sup>-</sup> NK cell  
433 degranulation for all KIR2DL2/L3 allele encoded receptors studied except for the  
434 KIR2DL2\*008 which significantly inhibited less NK cell degranulation compared to  
435 KIR2DL3\*005<sup>+</sup> donors (p<0.005, Fig. 11A, 11B). In addition, the 221-HLA-C\*07:01 cell line  
436 inhibited KIR2DL2/L3<sup>+</sup> NK cell degranulation at an intermediate level for the six KIR2DL2/L3  
437 allele encoded receptors studied (Fig. 11A, 11B). In contrast, although HLA-C\*08:02 was  
438 defined as C1 positive, poor inhibition of KIR2DL2/L3<sup>+</sup>/L1/S1/S2/NKG2A<sup>-</sup> NK cell  
439 degranulation against the 221-HLA-C\*08:02 cell line was observed for all KIR2DL2/L3 allele  
440 encoded receptors (Figure 11A and 11B). This effect was even more pronounced for  
441 KIR2DL3\*002<sup>+</sup> and KIR2DL3\*005<sup>+</sup> compared to KIR2DL2\*001<sup>+</sup> donors (p<0.05, Fig. 11A  
442 and 11B) suggesting no recognition of the HLA-C\*08:02 allele-encoded molecule by all  
443 KIR2DL2/L3 allele encoded receptors tested except for KIR2DL2\*001.

444 As expected as C2 positive 221 cell lines, 221-HLA-C\*02:02 and -HLA-C\*06:02 cell  
445 lines did not inhibit KIR2DL2/L3<sup>+</sup> NK cell degranulation for all KIR2DL2/L3 allele encoded  
446 receptors studied (Fig. 11A, B). However, a low inhibition of KIR2DL2/L3<sup>+</sup> NK cell  
447 degranulation was observed against the 221-HLA-C\*02:02 cell line for KIR2DL2\*001<sup>+</sup> and

448 KIR2DL2\*008+ compared to KIR2DL3\*001 and KIR2DL3\*005 donors ( $p < 0.05$ , Fig. 11A,  
449 11B), suggesting a possible recognition of the HLA-C\*02:02 allele encoded molecule by  
450 KIR2DL2\*001 and KIR2DL2\*008 receptors. In the same line, a low inhibition of  
451 KIR2DL2/L3<sup>+</sup> NK cell degranulation was observed against the 221-HLA-C\*06:02 cell line for  
452 KIR2DL2\*001+ compared to KIR2DL2\*003+, KIR2DL3\*002+ and KIR2DL3\*005+ donors  
453 ( $p < 0.005$ , Fig. 11A, 11B), suggesting again a possible recognition of the HLA-C\*06:02 allele  
454 encoded molecule by KIR2DL2\*001. Otherwise, an intermediate inhibition level of  
455 KIR2DL2/L3<sup>+</sup> NK cell degranulation was observed against the 221-HLA-C\*15:03 for all  
456 KIR2DL2/L3 allele encoded receptors, except for KIR2DL2\*001+ who more inhibited  
457 KIR2DL2/L3 NK cell degranulation compared to KIR2DL2\*008+ donors ( $p < 0.05$ , Fig. 11A,  
458 11B). Finally, as we already reported <sup>9</sup>, the 221-HLA-C\*04:01 cell line strongly inhibit  
459 KIR2DL2/L3<sup>+</sup> NK cell degranulation for all of the six KIR2DL2/L3 allele encoded receptors  
460 studied reinforcing that the HLA-C\*04:01 molecule classified as C2+ behaves as a C1+ ligand  
461 (Fig. 11A, B).

462 Taken together, these results suggest that the recognition of HLA-Cw molecules by  
463 KIR2DL1 and KIR2DL2/L3 receptors is impacted by both the nature of KIR2DL and HLA-C  
464 allele polymorphism.

465

## 466 DISCUSSION

467

468 In this study, we evaluated the impact of KIR2DL1/L2/L3 allele polymorphism on  
469 KIR2DL<sup>+</sup> NK cell functional repertoire. For a genetic view, fifty-nine KIR2DL1, thirty one  
470 KIR2DL2 and fifty-nine KIR2DL3 alleles have been described worldwide up to now. Here, we  
471 reported for the first time the KIR2DL1/L2/L3 allele polymorphism on a panel of French  
472 healthy blood donors using a high resolutive NGS.KIR technology we developed <sup>20</sup>. In our  
473 cohort, this KIR2DL allelic polymorphism was limited with only five KIR2DL1, eleven  
474 KIR2DL2/L3 alleles encountered. Of note, as previously described <sup>20</sup>, initially long range KIR  
475 PCR were performed to amplify all coding and non-coding regions of each KIR gene including  
476 introns and regulatory regions. Since Profiler software permits KIR allele assignment until the  
477 last 7<sup>th</sup> digit, only the 3<sup>rd</sup> ones were considered in this study corresponding to the potential  
478 KIR2DL1/L2/L3 expressed receptor. KIR2DL1/L2/L3 allele diversity observed in our cohort  
479 was concordant with previous studies conducted in a Northern Ireland population with six  
480 KIR2DL1 (\*001, \*002, \*003, \*004, \*007 and \*008) <sup>32</sup>, two KIR2DL2 (\*001 and \*003) <sup>33</sup>, and  
481 three KIR2DL3 (\*001, \*002 and \*005) <sup>34</sup> alleles identified using specific PCR-SSOP so a lesser  
482 resolutive KIR allele typing method compared to NGS.

483 In our French cohort, KIR2DL1\*003 was predominant (59%) followed by  
484 KIR2DL1\*002 (17%) and KIR2DL1\*004 (12%) alleles. These KIR2DL1 allele frequencies  
485 were concordant with those reported in a Northern Ireland population <sup>32 33 34</sup>. Moreover,  
486 KIR2DL3\*001 allele was predominant (31.6%) followed by KIR2DL3\*002 (26.1%),  
487 KIR2DL2\*001 (15%) and KIR2DL3\*003 (11.6%) in our French population. Once again, same  
488 conclusive results were obtained in the Ireland population <sup>32 33 34</sup>. Interestingly, assignment of  
489 KIR2DL1/L2/L3 alleles helps to refine KIR genotypes as we showed in particular that  
490 KIR2DL1\*004 and \*007 alleles were specifically linked to B+ KIR individuals. Overall, it



491 would be of interest, especially in the context of HSC unrelated donor registries, to investigate  
492 KIR2DL1/L2/L3 allele polymorphism in larger European and non-European cohorts to assess  
493 the extent of frequent vs rare KIR2DL1/L2/L3 alleles.

494 Because of our expertise in deciphering KIR<sup>+</sup> NK cell repertoire<sup>35, 9, 25</sup> and thanks to the  
495 anti-KIR2D mAbs we produced<sup>22</sup>, the study of KIR2DL1/L2/L3 allele polymorphism was  
496 reinforced taking into account their phenotypic and functional impact on KIR2DL<sup>+</sup> NK cell  
497 repertoire. As we previously reported for the KIR3DL1 gene<sup>25</sup>, KIR2DL1 and KIR2DL2/3  
498 allelic variation have been shown to have a phenotypic impact on NK cells<sup>36</sup>. In support with  
499 this study, our results confirmed a significant impact of KIR2DL1 alleles and to a lesser extent  
500 KIR2DL3 alleles on KIR2DL<sup>+</sup> NK cell phenotype. In particular, the KIR2DL1\*002 was  
501 associated with the highest frequency of KIR2DL1<sup>+</sup> NK cells compared to the other KIR2DL1  
502 (\*001, \*003, \*004, \*007) alleles studied in our cohort (Fig. 4C) in contrast to Dunphy *et al*<sup>36</sup>  
503 who reported the highest frequency for KIR2DL1\*001<sup>+</sup> NK cells. Although, Dunphy *et al.*<sup>36</sup>  
504 used single-KIR specific mAbs, only homozygous donors for a particular KIR2DL1 allele were  
505 selected in their cohort probably underlying this difference. In agreement with Babor *et al.*<sup>37</sup>  
506 and Dunphy *et al.*<sup>36</sup>, we observed lower frequencies of KIR2DL1<sup>+</sup> NK cells with  
507 KIR2DL1\*004<sup>+</sup> and KIR2DL1\*007<sup>+</sup> genotyped donors compared to other KIR2DL1 allotypes  
508 (Fig. 4C). Overall, the frequencies and the magnitude of KIR2DL1\*003<sup>+</sup>, \*004<sup>+</sup>, and \*007<sup>+</sup> NK  
509 cell subsets remained, however, concordant between our French and the Irish<sup>36</sup> cohorts.  
510 KIR2DL3 alleles had no impact on KIR2DL3<sup>+</sup> NK cell phenotype when pooling both  
511 homozygous and heterozygous donors since no difference was observed between  
512 KIR2DL3\*001, \*002 and \*005<sup>+</sup> NK cell subsets (Fig. 6B). However, the impact of both  
513 KIR2DL3\*001 and \*002 alleles was underlined only comparing donors with one and two allele  
514 copies (Fig. 6A). Finally, one key advantage of linking KIR2DL allele polymorphism with  
515 KIR2DL<sup>+</sup> NK cell phenotype was to better characterize the specificities of commercial and *in*

516 *house* anti-KIR2D mAbs<sup>22</sup> arguing that KIR2DL allele polymorphism should be included.

517           Although KIR and HLA class I genes are located on different chromosomes, HLA class  
518 I environment modulates KIR<sup>+</sup> NK cell phenotype although discordant results were reported.  
519 In particular, some studies showed that HLA class I environment plays a role on KIR<sup>+</sup> NK cell  
520 phenotype<sup>38, 13, 36</sup> in contrast to others<sup>39</sup>. KIR2DL<sup>+</sup> NK cell phenotype could also be modulated  
521 by some viral infections as reported for KIR2DL1/L3 expression on NK cells which varies  
522 depending on the donor CMV status<sup>40, 16</sup>. Surprisingly, we observed no statistical significance  
523 impact of both HLA-C environment and CMV status on KIR2DL1/L3<sup>+</sup> NK cell frequencies  
524 probably linked to the sample size studied.

525           Allelic variation of KIR2DL1 has been shown to have a functional impact on NK cells  
526<sup>41, 24</sup>. In the current study, no significant difference in KIR2DL1<sup>+</sup> NK cell degranulation was  
527 found between KIR2DL1 studied alleles (\*001, \*002, \*003, \*004) although a trend of a lower  
528 NK cell degranulation in KIR2DL1\*001<sup>+</sup> donors compared to KIR2DL1\*002<sup>+</sup>, \*003<sup>+</sup> or  
529 \*004<sup>+</sup> donors due probably to the low sample size (Fig. 7B). Impact of KIR2DL1 allele  
530 polymorphism on KIR2DL1<sup>+</sup> NK cell degranulation needs therefore to be further investigated  
531 on a larger cohort.

532           Taking into account both KIR2DL and HLA-C allele polymorphism allowed us to refine  
533 the specificity of KIR2DL1/L2/L3 receptors toward HLA-Cw molecules<sup>9</sup>. Indeed, some  
534 KIR/HLA-binding assay studies have shown different affinities and avidities for HLA-C  
535 ligands for different KIR2DL2/3 allotypes<sup>42, 12</sup>. In this current study, inhibition of  
536 KIR2DL1/L3<sup>+</sup> NK cell degranulation assays confirmed a hierarchy of HLA-Cw recognition by  
537 KIR2DL1 and KIR2DL2/3 allele encoded receptors. According to Bari et al.<sup>41</sup>, the presence of  
538 either an arginine (A) or a cysteine (C) at position 245 in the transmembrane domain of the  
539 KIR2DL1 receptor plays a critical role in the inhibition of KIR2DL1<sup>+</sup> NK cell degranulation.  
540 Indeed, they reported that the inhibition of KIR<sup>+</sup> NK cell degranulation was stronger with A<sup>245</sup>

541 compared to C<sup>245</sup> KIR2DL1 allotypes. In our study, no significant difference in the level of  
542 inhibition of KIR2DL1<sup>+</sup> NK cell degranulation against the 221 cell lines transfected with  
543 different HLA-Cw molecules was found between KIR2DL1\*002<sup>+</sup> and KIR2DL1\*003<sup>+</sup> donors  
544 since both having an A at position 245, except for KIR2DL1\*002 which showed a lower  
545 inhibition against the 221-C\*15:03 cell line (Fig. 9B). In addition, we observed a lower  
546 inhibition of KIR2DL1\*002<sup>+</sup> NK cell subset degranulation compared to KIR2DL1\*003<sup>+</sup> NK  
547 cells against the HLA-C\*08:02 (C1)-221 cell line but the difference was not statistically  
548 significant.

549         Based on the amino acid nature at the position 35 (E or Q) of KIR2DL2/3 receptors, the  
550 functionality of KIR2DL2/L3<sup>+</sup> NK cells could be divided into three groups i.e EE, EQ and  
551 QQ<sup>43</sup>. KIR2DL2/L3<sup>+</sup> NK cells with an E<sup>35</sup> were reported to inhibit NK cell degranulation  
552 stronger than KIR2DL2/L3<sup>+</sup> NK cells with a Q<sup>35</sup> against the HLA-C\*07-221 cell line. In our  
553 study, no significant difference in the inhibition level of KIR2DL2/L3<sup>+</sup> NK cell degranulation  
554 was found against the 221-HLA-C\*07 target for all KIR2DL2/L3 allele encoded receptors  
555 tested due probably to the low sample size (Fig. 11). Functional data suggested an absence of  
556 recognition of HLA-C\*08:02 (C1) allele encoded molecule by all KIR2DL2/L3 allele encoded  
557 receptors, except for the KIR2DL2\*001 with an intermediate level of recognition. However,  
558 the HLA-C\*04:01 (C2) encoded molecule was strongly recognized by all of the six KIR2DL2/3  
559 allele encoded receptors tested having either an E or a Q amino acid at the position 35.

560         The initial classification of C1 and C2 KIR ligand groups depending on the amino acid  
561 specificity of the residue 80 of the HLA class I heavy chain <sup>44</sup> need to be refined to better  
562 underline the recognition specificities of KIR2DL1 and KIR2DL2/L3 receptors. In parallel,  
563 analysis of HLA-Cw level expression on targets needs to be investigated since this level of  
564 expression depends on HLA-C allele specificity or haplotype<sup>45, 46</sup> and seems involved in the  
565 development and function of NK cells <sup>47</sup>.

566 Overall, this deep KIR2DL repertoire investigation has to improve our fundamental  
567 knowledge on the impact of KIR allele polymorphism on the structuration and the function of  
568 KIR<sup>+</sup> NK repertoire. A better knowledge of KIR/HLA class I interactions depending on both  
569 KIR and HLA class I allele polymorphism can help to refine the HSC donor selection based as  
570 illustrated for KIR2DL1<sup>24</sup> or KIR3DL1<sup>48</sup> alleles which impact on HSCT outcome. More  
571 broadly, these findings have also substantial implications to unravel the role of alloreactive  
572 KIR<sup>+</sup> NK cells in T repleted haplo-identical HSCT<sup>2</sup>, pregnancy disorders<sup>49</sup> or viral infections  
573 <sup>50</sup>.

574 **AUTHORS CONTRIBUTIONS**

575 BM performed KIR allele typing by NGS, KIR allele assignment, KIR<sup>+</sup> NK cell phenotyping,  
576 degranulation tests, data interpretation and wrote the manuscript.

577 LD performed KIR allele assignment, KIR<sup>+</sup> NK cell phenotyping, degranulation tests and data  
578 interpretation.

579 NL performed DNA extractions from blood samples, KIR genotyping and KIR allele  
580 assignment.

581 CW performed KIR<sup>+</sup> NK cell phenotyping and degranulation tests.

582 GD performed KIR<sup>+</sup> NK cell phenotyping.

583 MA upgraded Profiler software integrating a KIR module, analyzed data and commented on  
584 the manuscript.

585 DRM contributed to the sample collection and DNA extractions.

586 ACG contributed in the HLA class I typing.

587 DS contributed to KIR genotyping.

588 CR designed the study, analyzed and interpreted data, commented on the manuscript and  
589 reviewed the manuscript.

590 KG designed the study, analyzed and interpreted data, commented on the manuscript and  
591 reviewed the manuscript.

592

593 All the authors have approved the manuscript for publication.

594

595 **ACKNOWLEDGEMENTS**

596

597 We are grateful to all the blood donors for participating in this study. We thank Pr Steven  
598 GE Marsh, Dr James Robinson (Anthony Nolan Research Institute, London, UK), Tanguy  
599 Regnault (EFS, Rennes, France) for their help in updating the IPD-KIR allele database (Release  
600 2.7.1, February 2018) into the Profiler software. We also thank Dr Alexandre Walencik (HLA  
601 laboratory, EFS Nantes, France) for his advices and the access of the MiSeq platform.

602 This work was supported by EFS Centre-Pays de la Loire and by grants from  
603 International Research Group on unrelated Hematopoietic stem cell Transplantation (IRGHET  
604 2015-2017), Etablissement Français du Sang (EFS 2016-09), Leucémie Espoir Atlantique  
605 Famille (LEAF), La Ligue contre le Cancer, DHU Oncogreffe, and Agence de la Biomédecine  
606 (ABM). BM is a PhD student supported by a CIFRE/EFS Centre Pays de la Loire/Nantes  
607 Université n°481/2015 grant. LD is a PhD student supported by La Region Pays de la Loire/EFS  
608 Nantes. DRM is a PhD student supported by a CIFRE/EFS Centre Pays de la Loire/Nantes  
609 Université n°0850/2017 grant.

610

611 **DISCLOSURES**

612 The authors declare no financial or commercial conflict of interest.

613

614 **REFERENCES**

615

- 616 1. Lorentino, F. *et al.* Comparable outcomes of haploidentical, 10/10 and 9/10 unrelated donor  
617 transplantation in adverse karyotype AML in first complete remission. *Am. J. Hematol.*  
618 (2018). doi:10.1002/ajh.25231
- 619 2. Retière, C. *et al.* Impact on early outcomes and immune reconstitution of high-dose post-  
620 transplant cyclophosphamide vs anti-thymocyte globulin after reduced intensity  
621 conditioning peripheral blood stem cell allogeneic transplantation. *Oncotarget* **9**, 11451–  
622 11464 (2018).
- 623 3. Russo, A. *et al.* NK cell recovery after haploidentical HSCT with posttransplant  
624 cyclophosphamide: dynamics and clinical implications. *Blood* **131**, 247–262 (2018).
- 625 4. Ruggeri, L. *et al.* Effectiveness of donor natural killer cell alloreactivity in mismatched  
626 hematopoietic transplants. *Science* **295**, 2097–2100 (2002).
- 627 5. Hilton, H. G. & Parham, P. Missing or altered self: human NK cell receptors that recognize  
628 HLA-C. *Immunogenetics* 1–13 (2017). doi:10.1007/s00251-017-1001-y
- 629 6. Thielens, A., Vivier, E. & Romagné, F. NK cell MHC class I specific receptors (KIR): from  
630 biology to clinical intervention. *Curr. Opin. Immunol.* **24**, 239–245 (2012).
- 631 7. Fan, Q. R., Long, E. O. & Wiley, D. C. Crystal structure of the human natural killer cell  
632 inhibitory receptor KIR2DL1-HLA-Cw4 complex. *Nat. Immunol.* **2**, 452–460 (2001).
- 633 8. Boyington, J. C., Motyka, S. A., Schuck, P., Brooks, A. G. & Sun, P. D. Crystal structure  
634 of an NK cell immunoglobulin-like receptor in complex with its class I MHC ligand. *Nature*  
635 **405**, 537–543 (2000).
- 636 9. David, G. *et al.* Large spectrum of HLA-C recognition by killer Ig-like receptor (KIR)2DL2  
637 and KIR2DL3 and restricted C1 SPECIFICITY of KIR2DS2: dominant impact of  
638 KIR2DL2/KIR2DS2 on KIR2D NK cell repertoire formation. *J. Immunol. Baltim. Md 1950*  
639 **191**, 4778–4788 (2013).

- 640 10. Moesta, A. K. & Parham, P. Diverse functionality among human NK cell receptors for the  
641 C1 epitope of HLA-C: KIR2DS2, KIR2DL2, and KIR2DL3. *Front. Immunol.* **3**, 336  
642 (2012).
- 643 11. Anfossi, N. *et al.* Human NK cell education by inhibitory receptors for MHC class I.  
644 *Immunity* **25**, 331–342 (2006).
- 645 12. Moesta, A. K. *et al.* Synergistic polymorphism at two positions distal to the ligand-binding  
646 site makes KIR2DL2 a stronger receptor for HLA-C than KIR2DL3. *J. Immunol. Baltim.*  
647 *Md 1950* **180**, 3969–3979 (2008).
- 648 13. Schönberg, K., Sribar, M., Enczmann, J., Fischer, J. C. & Uhrberg, M. Analyses of HLA-  
649 C-specific KIR repertoires in donors with group A and B haplotypes suggest a ligand-  
650 instructed model of NK cell receptor acquisition. *Blood* **117**, 98–107 (2011).
- 651 14. Trowsdale, J. Genetic and functional relationships between MHC and NK receptor genes.  
652 *Immunity* **15**, 363–374 (2001).
- 653 15. Uhrberg, M. *et al.* Human diversity in killer cell inhibitory receptor genes. *Immunity* **7**,  
654 753–763 (1997).
- 655 16. Beziat, V. *et al.* NK cell responses to cytomegalovirus infection lead to stable imprints in  
656 the human KIR repertoire and involve activating KIRs. *Blood* **121**, 2678–2688 (2013).
- 657 17. Pando, M. J., Gardiner, C. M., Gleimer, M., McQueen, K. L. & Parham, P. The protein  
658 made from a common allele of KIR3DL1 (3DL1\*004) is poorly expressed at cell surfaces  
659 due to substitution at positions 86 in Ig domain 0 and 182 in Ig domain 1. *J. Immunol.*  
660 *Baltim. Md 1950* **171**, 6640–6649 (2003).
- 661 18. Li, H., Pascal, V., Martin, M. P., Carrington, M. & Anderson, S. K. Genetic control of  
662 variegated KIR gene expression: polymorphisms of the bi-directional KIR3DL1 promoter  
663 are associated with distinct frequencies of gene expression. *PLoS Genet.* **4**, e1000254  
664 (2008).



- 665 19. Béziat, V., Hilton, H. G., Norman, P. J. & Traherne, J. A. Deciphering the killer-cell  
666 immunoglobulin-like receptor system at super-resolution for natural killer and T-cell  
667 biology. *Immunology* **150**, 248–264 (2017).
- 668 20. Manianguou, B. *et al.* Killer Immunoglobulin-Like Receptor Allele Determination Using  
669 Next-Generation Sequencing Technology. *Front. Immunol.* **8**, 547 (2017).
- 670 21. Kidd, J. M. *et al.* Exome capture from saliva produces high quality genomic and  
671 metagenomic data. *BMC Genomics* **15**, 262 (2014).
- 672 22. David, G. *et al.* Discrimination between the main activating and inhibitory killer cell  
673 immunoglobulin-like receptor positive natural killer cell subsets using newly characterized  
674 monoclonal antibodies. *Immunology* **128**, 172–184 (2009).
- 675 23. Sun, H. S., Liu, D. X., Bai, Y. Y. & Hu, N. W. Disease-association of different killer cell  
676 immunoglobulin-like receptors (KIR) and HLA-C gene combinations in reactive arthritis.  
677 *Mod. Rheumatol.* 1–7 (2018). doi:10.1080/14397595.2018.1483292
- 678 24. Bari, R. *et al.* Effect of donor KIR2DL1 allelic polymorphism on the outcome of pediatric  
679 allogeneic hematopoietic stem-cell transplantation. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin.*  
680 *Oncol.* **31**, 3782–3790 (2013).
- 681 25. Gagne, K. *et al.* Both the nature of KIR3DL1 alleles and the KIR3DL1/S1 allele  
682 combination affect the KIR3DL1 NK-cell repertoire in the French population. *Eur. J.*  
683 *Immunol.* **43**, 1085–1098 (2013).
- 684 26. Clémenceau, B. *et al.* Long-term preservation of antibody-dependent cellular cytotoxicity  
685 (ADCC) of natural killer cells amplified in vitro from the peripheral blood of breast cancer  
686 patients after chemotherapy. *J. Immunother. Hagerstown Md 1997* **29**, 53–60 (2006).
- 687 27. Djaoud, Z. *et al.* Cytomegalovirus-Infected Primary Endothelial Cells Trigger NKG2C+  
688 Natural Killer Cells. *J. Innate Immun.* **8**, 374–385 (2016).

- 689 28. Duke, J. L. *et al.* Determining performance characteristics of an NGS-based HLA typing  
690 method for clinical applications. *HLA* **87**, 141–152 (2016).
- 691 29. Sun, J. Y. *et al.* Development of a multiplex PCR-SSP method for Killer-cell  
692 immunoglobulin-like receptor genotyping. *Tissue Antigens* **64**, 462–468 (2004).
- 693 30. Hsu, K. C., Chida, S., Geraghty, D. E. & Dupont, B. The killer cell immunoglobulin-like  
694 receptor (KIR) genomic region: gene-order, haplotypes and allelic polymorphism.  
695 *Immunol. Rev.* **190**, 40–52
- 696 31. Falco, M. *et al.* Combined genotypic and phenotypic killer cell Ig-like receptor analyses  
697 reveal KIR2DL3 alleles displaying unexpected monoclonal antibody reactivity:  
698 identification of the amino acid residues critical for staining. *J. Immunol. Baltim. Md 1950*  
699 **185**, 433–441 (2010).
- 700 32. Meenagh, A., Gonzalez, A., Sleator, C., McQuaid, S. & Middleton, D. Investigation of  
701 killer cell immunoglobulin-like receptor gene diversity, KIR2DL1 and KIR2DS1. *Tissue*  
702 *Antigens* **72**, 383–391 (2008).
- 703 33. Gonzalez, A., Meenagh, A., Sleator, C. & Middleton, D. Investigation of killer cell  
704 immunoglobulin-like receptor (KIR) gene diversity: KIR2DL2, KIR2DL5 and KIR2DS5.  
705 *Tissue Antigens* **72**, 11–20 (2008).
- 706 34. Keaney, L., Williams, F., Meenagh, A., Sleator, C. & Middleton, D. Investigation of killer  
707 cell immunoglobulin-like receptor gene diversity III. KIR2DL3. *Tissue Antigens* **64**, 188–  
708 194 (2004).
- 709 35. Rettman, P. *et al.* New insights on the natural killer cell repertoire from a thorough analysis  
710 of cord blood cells. *J. Leukoc. Biol.* **100**, 471–479 (2016).
- 711 36. Dunphy, S. E. *et al.* 2DL1, 2DL2 and 2DL3 all contribute to KIR phenotype variability on  
712 human NK cells. *Genes Immun.* **16**, 301–310 (2015).

- 713 37. Babor, F. *et al.* KIR ligand C2 is associated with increased susceptibility to childhood ALL  
714 and confers an elevated risk for late relapse. *Blood* **124**, 2248–2251 (2014).
- 715 38. Yawata, M. *et al.* Roles for HLA and KIR polymorphisms in natural killer cell repertoire  
716 selection and modulation of effector function. *J. Exp. Med.* **203**, 633–645 (2006).
- 717 39. Andersson, S., Fauriat, C., Malmberg, J.-A., Ljunggren, H.-G. & Malmberg, K.-J. KIR  
718 acquisition probabilities are independent of self-HLA class I ligands and increase with  
719 cellular KIR expression. *Blood* **114**, 95–104 (2009).
- 720 40. Charoudeh, H. N. *et al.* Modulation of the natural killer cell KIR repertoire by  
721 cytomegalovirus infection. *Eur. J. Immunol.* **43**, 480–487 (2013).
- 722 41. Bari, R. *et al.* Significant functional heterogeneity among KIR2DL1 alleles and a pivotal  
723 role of arginine 245. *Blood* **114**, 5182–5190 (2009).
- 724 42. Gendzekhadze, K. *et al.* Co-evolution of KIR2DL3 with HLA-C in a human population  
725 retaining minimal essential diversity of KIR and HLA class I ligands. *Proc. Natl. Acad. Sci.*  
726 *U. S. A.* **106**, 18692–18697 (2009).
- 727 43. Bari, R. *et al.* KIR2DL2/2DL3-E(35) alleles are functionally stronger than -Q(35) alleles.  
728 *Sci. Rep.* **6**, 23689 (2016).
- 729 44. Mandelboim, O. *et al.* Protection from lysis by natural killer cells of group 1 and 2  
730 specificity is mediated by residue 80 in human histocompatibility leukocyte antigen C  
731 alleles and also occurs with empty major histocompatibility complex molecules. *J. Exp.*  
732 *Med.* **184**, 913–922 (1996).
- 733 45. Bettens, F., Brunet, L. & Tiercy, J.-M. High-allelic variability in HLA-C mRNA  
734 expression: association with HLA-extended haplotypes. *Genes Immun.* **15**, 176–181  
735 (2014).
- 736 46. Petersdorf, E. W. *et al.* HLA-C expression levels define permissible mismatches in  
737 hematopoietic cell transplantation. *Blood* **124**, 3996–4003 (2014).

- 738 47. Li, H. *et al.* Identification of an elaborate NK-specific system regulating HLA-C  
739 expression. *PLoS Genet.* **14**, e1007163 (2018).
- 740 48. Boudreau, J. E. *et al.* KIR3DL1/ HL A-B Subtypes Govern Acute Myelogenous Leukemia  
741 Relapse After Hematopoietic Cell Transplantation. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin.*  
742 *Oncol.* **35**, 2268–2278 (2017).
- 743 49. Moffett, A., Regan, L. & Braude, P. Natural killer cells, miscarriage, and infertility. *BMJ*  
744 **329**, 1283–1285 (2004).
- 745 50. Knapp, S. *et al.* Consistent Beneficial Effects of Killer Cell Immunoglobulin-Like Receptor  
746 2DL3 and Group 1 Human Leukocyte Antigen-C Following Exposure to Hepatitis C Virus.  
747 *Hepatology. Baltim. Md* **51**, 1168–1175 (2010).
- 748
- 749

750 **Figure legends**

751 **Figure 1: Diversity of KIR2DL1 alleles.** A) Number of KIR2DL1 allele combinations  
752 encountered from 41 French blood donors. In grey are no found combinations. Bars illustrating  
753 KIR2DL1 allele distribution (%) in all donors (B, N=41), in homozygous (2 copies of the same  
754 allele, clear bars, N=25) vs heterozygous (1 copy, filled bars, N=16) donors (C) and in donors  
755 with either an AA (clear bars, N=19) or B+ (AB, BB, filled bars, N=22) KIR genotypes (D). E) Pie charts representing the frequencies of KIR2DL1 alleles in C1C1 (n=14), C1C2 (n=16) and  
756 C2C2 (n=11) donors. HLA-C environment was determined depending on HLA-Cw typing.  
757 KIR2DL1 alleles were assigned by Next-Generation-Sequencing technology using Profiler  
758 software as described in the *Material and Method* section. Specific colors were used to  
759 discriminate KIR2DL1\*001, \*002, \*003, \*004 and \*007 alleles.  
760

761 **Figure 2: Diversity of KIR2DL2/3 alleles.** A) Number of KIR2DL2/3 allele combinations  
762 encountered from 90 blood donors. In grey are no found combinations. Bars illustrating  
763 KIR2DL2/3 allele distribution (%) in all donors (B, N=90), in homozygous (2 copies of the  
764 same allele, clear bars, N=22) vs heterozygous (1 copy, filled bars, N=68) donors (C) and in  
765 donors with either an AA (clear bars, N=39) or B+ (AB, BB, filled bars, N=51) KIR genotypes  
766 (D). KIR2DL2/3 alleles were assigned by Next-Generation-Sequencing technology using  
767 Profiler software as described in the *Material and Method* section. Specific colors were used to  
768 discriminate KIR2DL2\*001, \*003, \*005, \*008, \*012, KIR2DL3\*001, \*002, \*003, \*005, \*007  
769 and \*015 alleles.

770 **Figure 3: Frequencies of KIR2DL1\*003<sup>+</sup> NK cells in KIR2DL3\*003 homozygous donors.**  
771 A) Density plots illustrating the overall cell targeting strategy used by multi-colour flow  
772 cytometry to phenotype KIR2DL1\*003<sup>+</sup> NK cells in KIR2DS1+ (right) and KIR2DS1- (left)  
773 genotyped and KIR2DL1\*003 homozygous donors combining commercial anti-KIR2DL1/S1

774 (EB6) and anti-KIR2DL1 mAbs. Frequencies of KIR2DL1\*003<sup>+</sup> NK cells in C2<sup>-</sup> (clear circles,  
775 N=7) vs C2<sup>+</sup> (filled circles, N=14) KIR2DL3\*003<sup>+</sup> homozygous donors (B), in  
776 KIR2DL3\*003<sup>+</sup> homozygous donors with either an AA (clear bars, N=12) or B<sup>+</sup> (AB, BB  
777 filled bars, N=9) KIR genotypes (C) and in CMV<sup>-</sup> (clear bars, N=12) vs CMV<sup>+</sup> (filled bars,  
778 N=7) donors (D). A specific color was used for the KIR2DL1\*003<sup>+</sup> NK cell subset.

779 **Figure 4: Frequencies of KIR2DL1 allele-encoded receptors on NK cells.** A) Density plots  
780 illustrating the overall cell targeting strategy used by multi-color flow cytometry to target  
781 KIR2DL1 allele-encoded receptors encoded by different KIR2DL1 alleles in KIR2DS1<sup>-</sup> and  
782 KIR2DS1<sup>+</sup> genotyped donors in combining commercial anti-KIR2DL1/S1 (EB6), anti-  
783 KIR2DL1 and *in-house* anti-KIR2DL1/L2/L3/S2 (8C11) and anti-KIR2DL1/L2/L3/S1/S2  
784 (1A6) (David *et al.* 2009) mAbs. Scatter plots showing the frequencies of  
785 KIR2DL1<sup>+</sup>/L2/L3/S1/S2<sup>-</sup> NK cells depending on KIR2DL1 allele encoded receptors according  
786 to allele copy number (1 copy, filled circles, N=32; 2 copies, clear circles, N=22) (B) and  
787 adjusted to only one allele copy (C, N=54). In the latter case, the frequencies of KIR2DL1 allele  
788 encoded receptors on NK cells from homozygous donors was divided by two to bring it back  
789 to one to compare with heterozygous donors. Specific colors were used to discriminate  
790 KIR2DL1\*001<sup>+</sup>, KIR2DL1\*002<sup>+</sup>, KIR2DL1\*003<sup>+</sup>, KIR2DL1\*004<sup>+</sup> and KIR2DL1\*007<sup>+</sup> NK  
791 cell subsets. Statistical differences in KIR2DL1<sup>+</sup>/L2/L3/S1/S2<sup>-</sup> NK cell frequencies between  
792 donors having different KIR2DL1 allele products were analyzed using unpaired t-tests or one-  
793 way ANOVA followed by Turkey's multiple comparison test. \*\*\* p<0.001; \*\*p< 0.05; \*  
794 p<0.05.

795 **Figure 5: Cell targeting strategy to phenotype KIR2DL2/L3 allele-encoded receptors**  
796 **expressed on NK cells.** A) Density plots illustrating the overall strategy used to target  
797 KIR2DL2/L3 allele encoded receptors on NK (CD3-CD56<sup>+</sup>) cells in three representative  
798 donors (KIR2DL2<sup>+</sup>/L3<sup>+</sup>/S2<sup>+</sup>, KIR2DL2<sup>+</sup>/L3<sup>+</sup>/S2<sup>+</sup> and KIR2DL3<sup>+</sup>/L2<sup>-</sup>/S2<sup>-</sup>) by using a

799 combination of commercial anti-KIR2DL3, anti-KIR2DL2/L3/S2 (GL183) and *in-house* anti-  
800 KIR2DL3/S2 (1F12) (*David et al Immunol. 2009*) mAbs. KIR2DL3<sup>+</sup> NK cells are labelled in  
801 purple. Density plots illustrating the overall strategy used to sort KIR2DL3\*005<sup>+</sup> NK cell subset  
802 in KIR2DL2+/L3\*005+/S2+ (B) or KIR2DL2-/L3\*002,\*005/S2- genotyped donors (C) by  
803 using a combination of commercial anti-KIR2DL2/L3/S2 (GL183), anti-KIR2DL1/S1 (EB6),  
804 anti-KIR2DL3 and *in-house* anti-KIR2DL3/S2 (1F12) (*David et al Immunol. 2009*) mAbs. NK  
805 cell subsets expressing only KIR2DL3\*002, KIR2DL3\*005 and co-expressing both  
806 KIR2DL3\*002 and KIR2DL3\*005 allele products are highlighted.

807 **Figure 6: Frequencies of KIR2DL3 allele encoded receptors on NK cells.** KIR2DL3<sup>+</sup> NK  
808 cell frequencies according to the number of KIR2DL3\*001, \*002, \*005 copies (1 copy, filled  
809 circles, N=50; 2 copies, clear circles, N=16) (A) and adjusted to only one allele copy (B, N=66).  
810 In the latter case, the frequencies of KIR2DL3 allele encoded receptors on NK cells from  
811 homozygous donors was divided by two to bring it back to one to compare with heterozygous  
812 donors. C) Frequencies of KIR2DL3 allele encoded receptors on NK cells in C1C1 (N=32),  
813 C1C2 (N=18), C2C2 (N=9) donors and in CMV- (N=34) vs CMV+ (N=22) (D). Specific colors  
814 were used to discriminate KIR2DL3\*001<sup>+</sup>, KIR2DL3\*002<sup>+</sup> and KIR2DL3\*005<sup>+</sup> NK cell  
815 subsets. Statistical differences in KIR2DL3<sup>+</sup> NK cell frequencies between donors having  
816 different KIR2DL3 allele encoded receptors were analyzed using unpaired t-tests or one-way  
817 ANOVA followed by Turkey's multiple comparison test. \*\*\* indicates p<0.0001

818 **Figure 7: *Ex-vivo* potential of KIR2DL1<sup>+</sup> NK cell degranulation according to KIR2DL1**  
819 **allele encoded receptors.** A) Density plots illustrating the overall cell targeting strategy used  
820 by multicolor flow cytometry to identify KIR2DL1 allele encoded receptors on  
821 KIR2DL1<sup>+</sup>/L2/L3/S1/S2<sup>-</sup> NK cells in KIR2DS1<sup>-</sup> and KIR2DS1<sup>+</sup> genotyped donors in  
822 combining commercial anti-KIR2DL1/S1 (EB6), anti-KIR2DL1, anti-KIR2DL2/L3/S2  
823 (GL183), *in-house* anti-KIR2DL1/L2/L3/S2 (8C11) and anti-KIR2DL1/L2/L3/S1/S2 (1A6)

824 (*David et al. 2009*) mAbs. B) Scatter plots showing *ex-vivo* potential of  
825 KIR2DL1<sup>+</sup>/L2/L3/S1/S2<sup>-</sup> NK cell degranulation (CD107a<sup>+</sup>) according to KIR2DL1 allele  
826 expressed against the HLA class I negative 721.221 B-EBV cell line in an E:T ratio of 10:1 in  
827 C2<sup>+</sup> donors (N=12). Specific colors were used to discriminate KIR2DL1\*001<sup>+</sup>,  
828 KIR2DL1\*002<sup>+</sup>, KIR2DL1\*003<sup>+</sup> and KIR2DL1\*004<sup>+</sup>/L2/L3/S1/S2<sup>-</sup> NK cell subsets.

829 **Figure 8: Cell targeting strategy to investigate the inhibition of KIR2DL1<sup>+</sup> NK cell**  
830 **degranulation according to KIR2DL1 allele encoded receptors.** Density plots illustrating  
831 the overall strategy used by multicolor flow cytometry to target KIR2DL1 allele encoded  
832 receptors on KIR2DL1<sup>+</sup>/L2/L3/S1-/S2<sup>-</sup>/NKG2A<sup>-</sup> NK cells after *in vitro* amplification in  
833 KIR2DS1<sup>-</sup> and KIR2DS1<sup>+</sup> genotyped donors in combining commercial anti-KIR2DL1/S1  
834 (EB6), anti-KIR2DL1, anti-KIR2DL2/L3/S2 (GL183), anti-NKG2A, *in-house* anti-  
835 KIR2DL1/L2/L3/S2 (8C11) and anti-KIR2DL1/L2/L3/S1/S2 (1A6) (*David et al. 2009*) mAbs.  
836 Degranulation (CD107a<sup>+</sup>) of KIR2DL1<sup>+</sup>/L2/L3/S1/S2/NKG2A<sup>-</sup> NK cell was evaluated against  
837 a panel of HLA-Cw transfected 721.221 B-EBV cell lines.

838 **Figure 9: Impact of KIR2DL1 allele polymorphism on the inhibition of KIR2DL1<sup>+</sup> NK**  
839 **cell degranulation.** A) Histograms represent the mean fluorescent intensity of HLA class I  
840 molecules expressed on different HLA-Cw transfected 721.221 EBV B cell cell lines (grey  
841 filled) compared to the HLA class I negative 721.221 EBV B cell line as a negative control. B)  
842 Bars represent the mean of CD107a<sup>+</sup> KIR2DL1<sup>+</sup>/L2/L3/S1/S2/NKG2A<sup>-</sup> NK cell (% , ± SD)  
843 evaluated for 3 KIR2DL1\*002<sup>+</sup> and 9 KIR2DL1\*003<sup>+</sup> genotyped donors against a panel of  
844 C2<sup>+</sup> (HLA-C\*02:02, -C\*04:01, -C\*06:02, and -C\*15:03) and C1<sup>+</sup> (HLA-C\*03:04, -C\*07:01  
845 and -C\*08:02) transfected 721.221 EBV B cell lines. To homogenize the data obtained from  
846 independent experiments, we present the data as the degranulation obtained with HLA-C  
847 transfected 721.221 cell lines relative to the degranulation obtained with the 721.221 cell line  
848 at an E:T ratio of 1:1.



849 Specific colors were used to discriminate KIR2DL1\*002<sup>+</sup> and  
850 KIR2DL1\*003<sup>+</sup>/L2/L3/S1/S2/NKG2A<sup>-</sup> NK cell subsets. Statistical differences were analyzed  
851 using unpaired t-tests or one-way ANOVA followed by Turkey's multiple comparison test. \*  
852 p < 0.05.

853 **Figure 10: Cell targeting strategy to investigate the inhibition of KIR2DL2/3<sup>+</sup> NK cell**  
854 **degranulation according to KIR2DL2/3 allele encoded receptors.** A) Density plots  
855 illustrating the overall strategy used by multicolor flow cytometry to target KIR2DL2/L3 allele  
856 encoded receptors expressed on KIR2DL2/L3<sup>+</sup>/L1/S1/S2/NKG2A<sup>-</sup> NK cells after *in vitro*  
857 amplification in three representative donors in combining commercial anti-KIR2DL1/S1  
858 (EB6), anti-KIR2DL3, anti-KIR2DL2/L3/S2 (GL183), anti-NKG2A, and *in-house* anti-  
859 KIR2DL3/S2 (1F12) (David et al. 2009) mAbs. Degranulation (CD107a<sup>+</sup>) of  
860 KIR2DL2/L3<sup>+</sup>/L1/S1/S2/NKG2A<sup>-</sup> NK cell subset was evaluated against a panel of HLA-Cw  
861 transfected 721.221 B-EBV cell lines as illustrated with the 721.221 EBV B cell line transfected  
862 with the HLA-C\*03:04 allele encoded molecule. B) Density plots illustrating the overall  
863 strategy used by multicolor flow cytometry to target KIR2DL3\*005 allele encoded receptor  
864 expressed on NK cells (CD3-CD56<sup>+</sup>) after *in vitro* amplification in one KIR2DL2-/L3\*002,  
865 \*005<sup>+</sup>/S2- genotyped donor in combining commercial anti-KIR2DL1/S1 (EB6), anti-NKG2A  
866 and *in-house* anti-KIR2DL3/S2 (1F12) (David et al. 2009) mAbs. Degranulation (CD107a<sup>+</sup>)  
867 of KIR2DL3\*005<sup>+</sup>/L1/L2/S1/S2/NKG2A<sup>-</sup> NK cell subset was evaluated against a panel of  
868 HLA-Cw transfected 721.221 B-EBV cell lines as illustrated with the 721.221 EBV B cell line  
869 transfected with the HLA-C\*03:04 allele encoded molecule.

870 **Figure 11: Impact of KIR2DL2/L3 allele polymorphism on the inhibition of KIR2DL2/3<sup>+</sup>**  
871 **NK cell degranulation.** A) Bars represent the mean of CD107a<sup>+</sup>KIR2DL2<sup>+</sup>  
872 /L1/S1/S2/NKG2A<sup>-</sup> NK cells (% , ± SD) and CD107a<sup>+</sup> KIR2DL3<sup>+</sup>/L1/S1/S2/NKG2A<sup>-</sup> NK cells  
873 (% , ± SD) evaluated for 18 donors against a panel of C1<sup>+</sup> (HLA-C\*03:04, -C\*07:01 and -

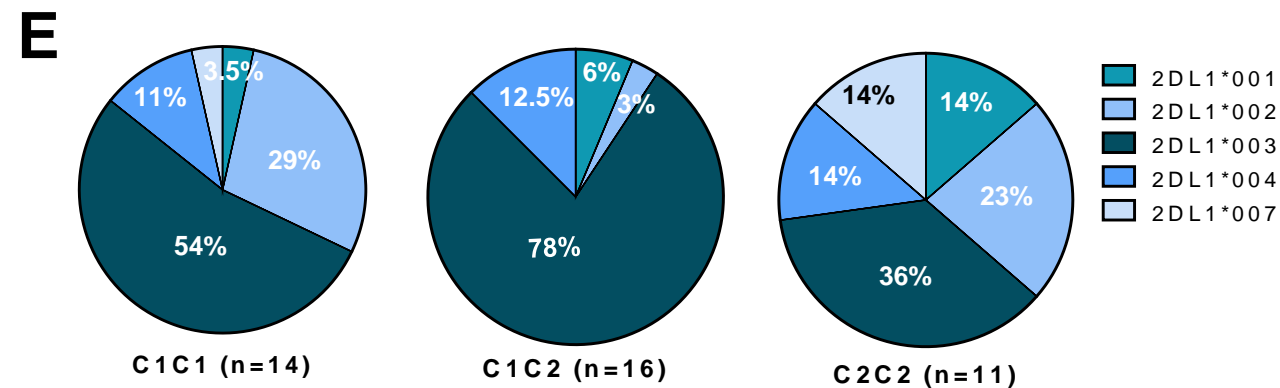
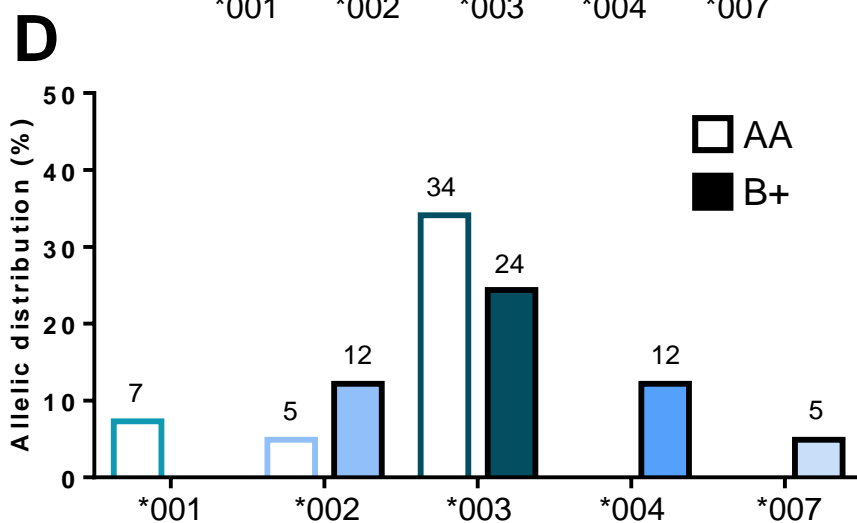
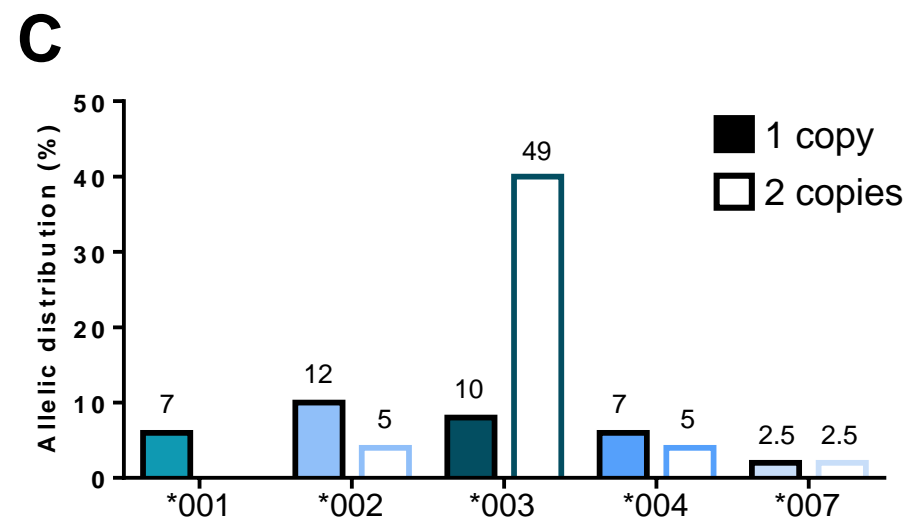
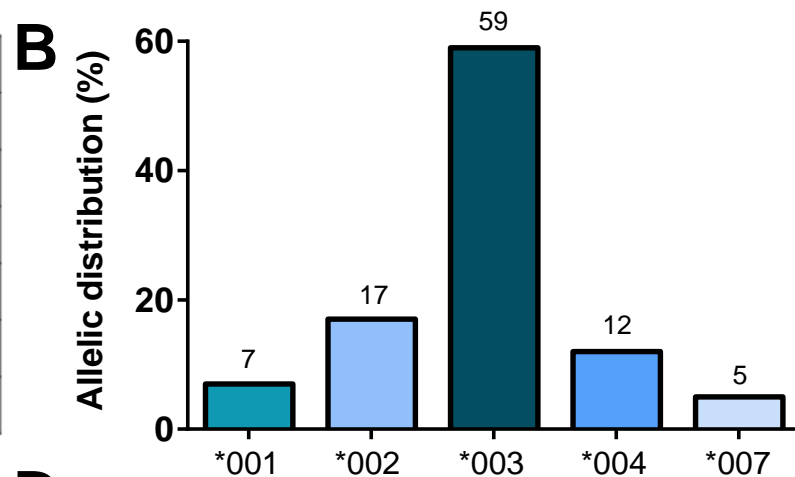
874 C\*08:02) and C2+ (HLA-C\*02:02, -C\*04:01, -C\*06:02, and -C\*15:03) transfected 721.221  
875 EBV B cell lines. To homogenize the data obtained from three independent experiments, we  
876 present the data as the degranulation obtained with HLA-C transfected 221 cells relative to the  
877 degranulation obtained with the 721.221 B cell lines at an E:T ratio of 2:1. B) Scatter plots  
878 represent the frequency of CD107a<sup>+</sup> KIR2DL2/3<sup>+</sup>/L1/S1/S2/NKG2A<sup>-</sup> NK cell evaluated for 18  
879 donors against a panel of C1+ (HLA-C\*03:04, -C\*07:01 and -C\*08:02) and C2+ (HLA-  
880 C\*02:02, -C\*04:01, -C\*06:02, and -C\*15:03) transfected 721.221 EBV B cell lines. Specific  
881 colors were used to discriminate KIR2DL2\*001<sup>+</sup>, KIR2DL2\*003<sup>+</sup>, KIR2DL2\*008<sup>+</sup>,  
882 KIR2DL3\*001<sup>+</sup>, KIR2DL3\*002<sup>+</sup> and KIR2DL3\*005<sup>+</sup> NK cell subsets. Statistical differences  
883 were analyzed using unpaired t-tests or one-way ANOVA followed by Turkey's multiple  
884 comparison test.\*\* p < 0.05.

885 **Figure S1: KIR2DL2/3 allele distribution according to HLA-C environment.** Pie charts  
886 representing the frequencies of KIR2DL2/3 alleles in C1C1 (N=39), C1C2 (N=31) and C2C2  
887 (N=20) donors. HLA-C environment was determined depending on HLA-Cw typing.  
888 KIR2DL2/3 alleles were assigned by Next-Generation-Sequencing technology using Profiler  
889 software as described in the *Material and Method* section. Specific colors were used to  
890 discriminate KIR2DL2\*001, \*003, \*005, \*008, \*012, KIR2DL3\*001, \*002, \*003, \*005, \*007  
891 and \*015 alleles.

892

**A**

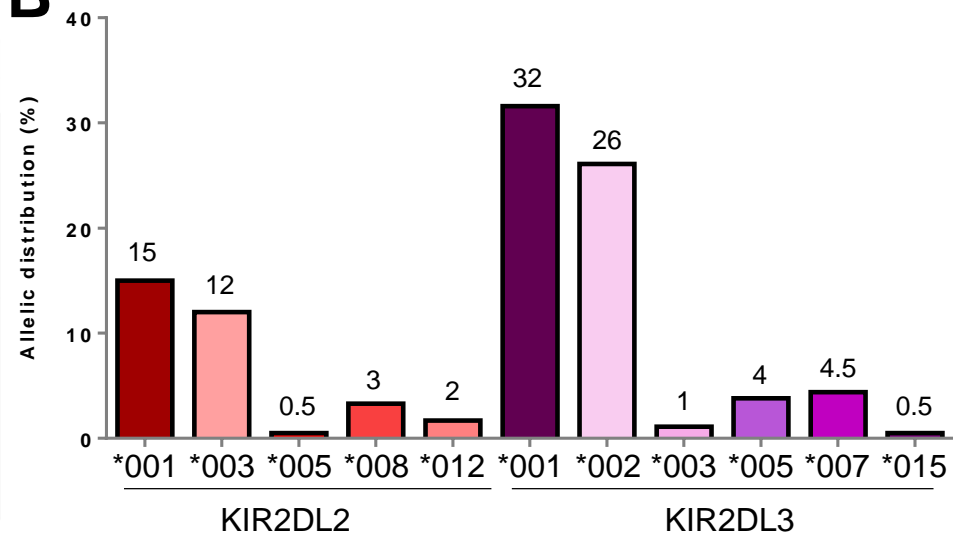
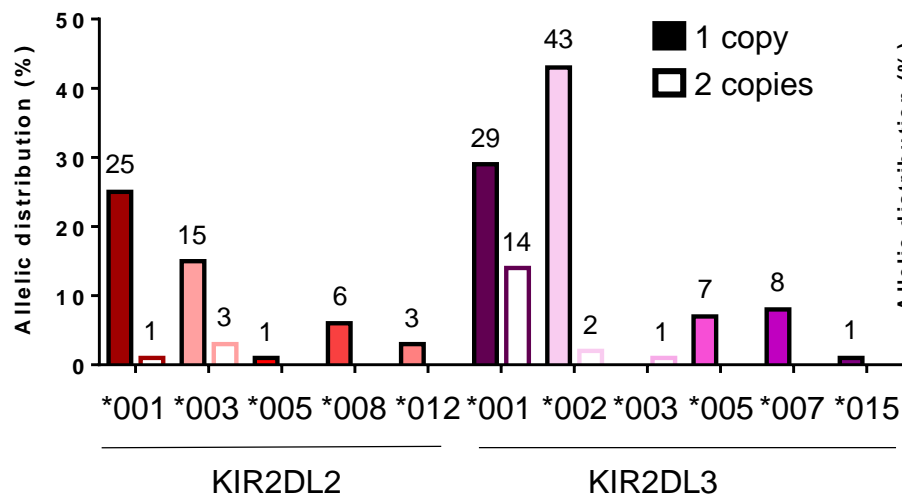
Allelic combinations		KIR2DL1				
		*001	*002	*003	*004	*007
KIR2DL1	*001		2	4		
	*002		2	2	4	2
	*003			20	2	
	*004				2	
	*007					1

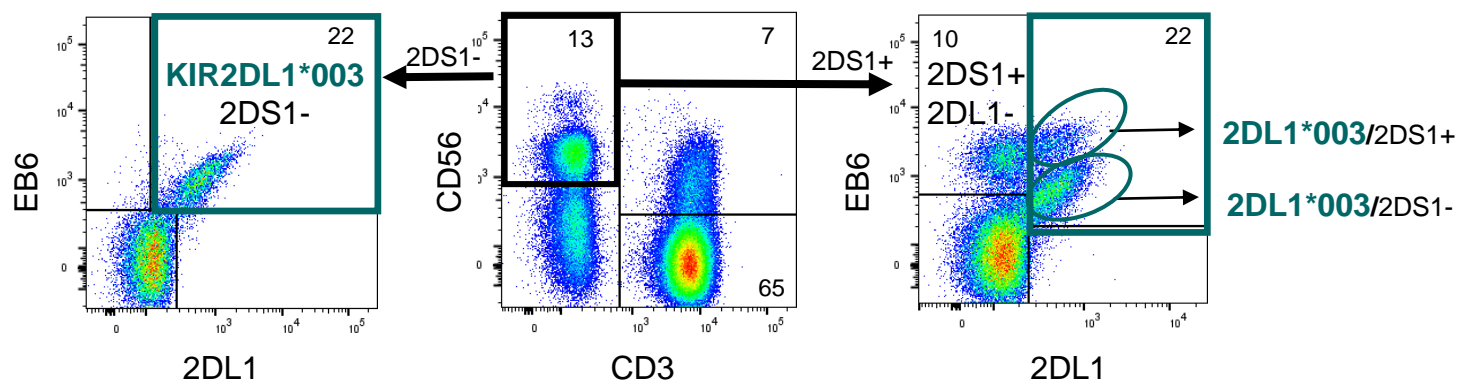
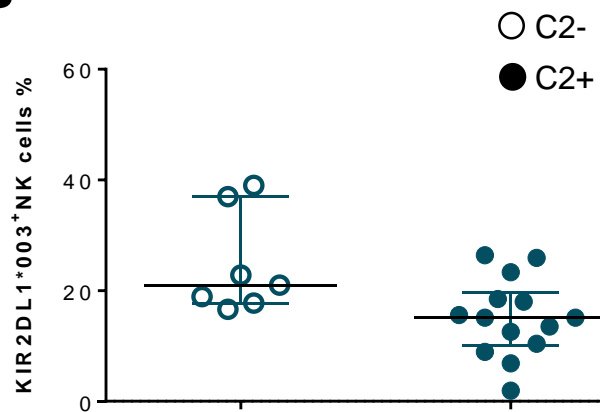
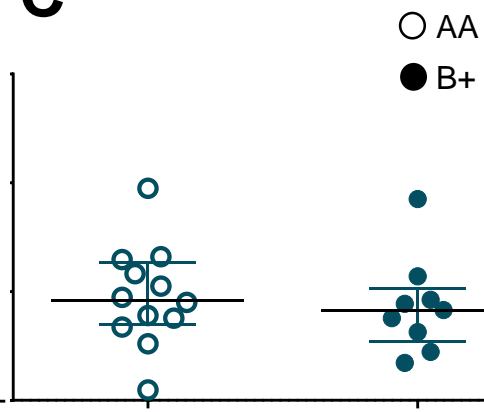
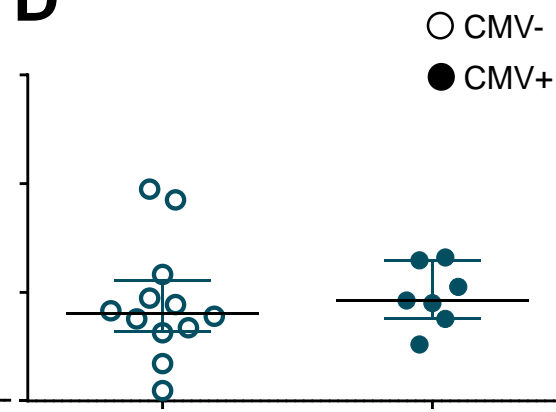


**Figure 1**

**A**

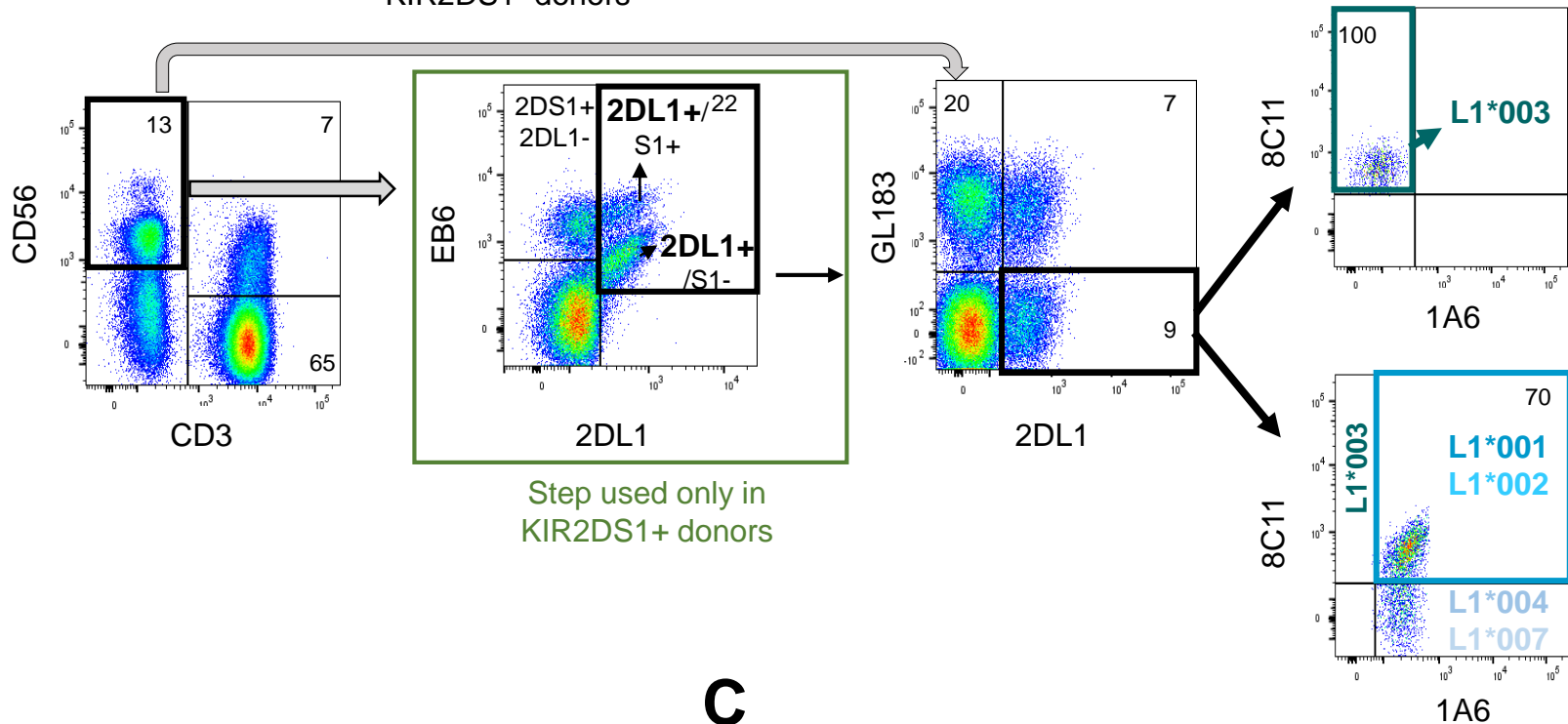
Allelic combinations		KIR2DL2					KIR2DL3					
		*001	*003	*005	*008	*012	*001	*002	*003	*005	*007	*015
KIR2DL2	*001	1					12	12		1		
	*003		3		1	2	3	9				
	*005				1							
	*008				1			3				
	*012						1					
KIR2DL3	*001						14	10		2		
	*002							2		2	6	1
	*003								1			
	*005										2	
	*007											
	*015											

**B****C****D****Figure 2**

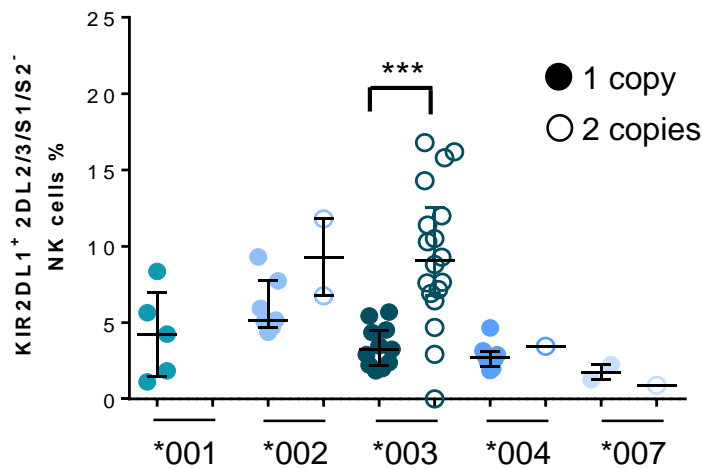
**A****B****C****D****Figure 3**

KIR2DS1- donors

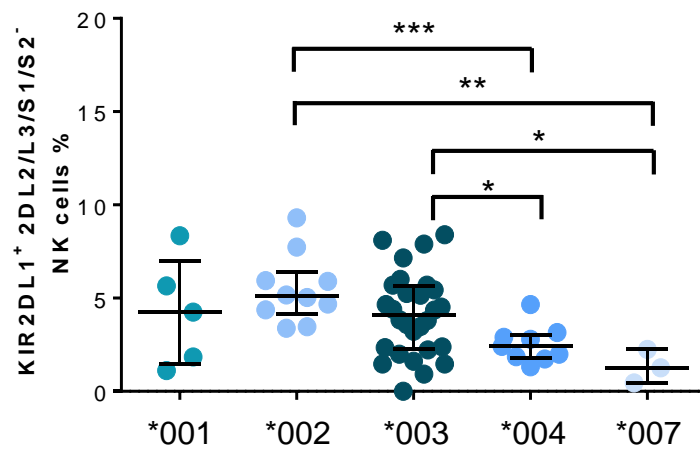
**A**



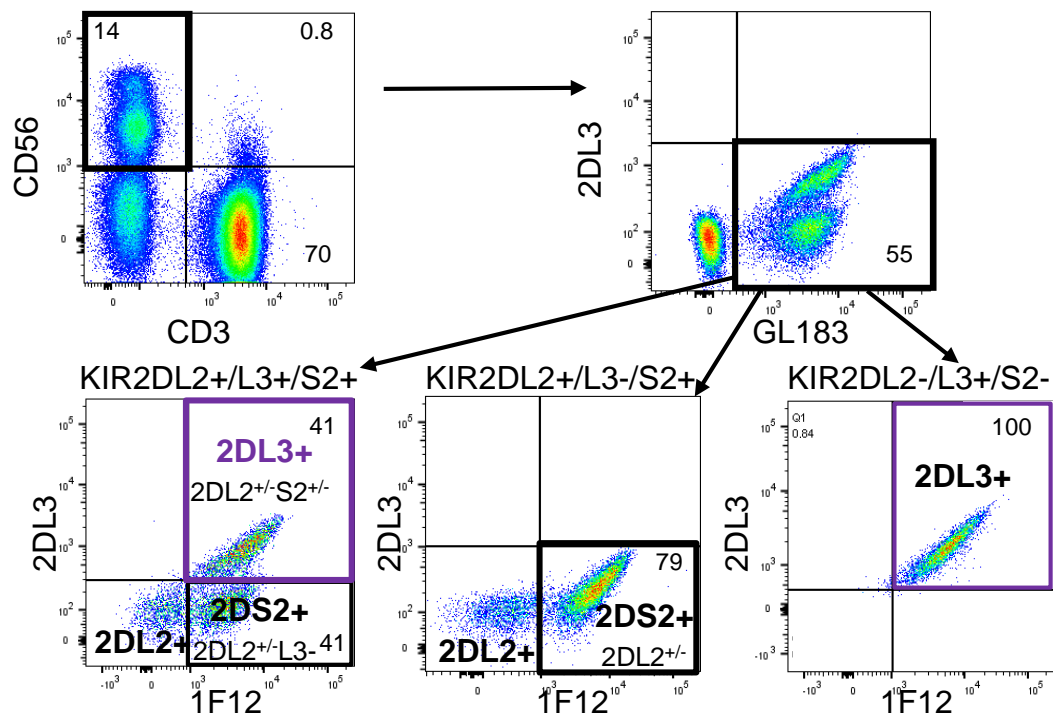
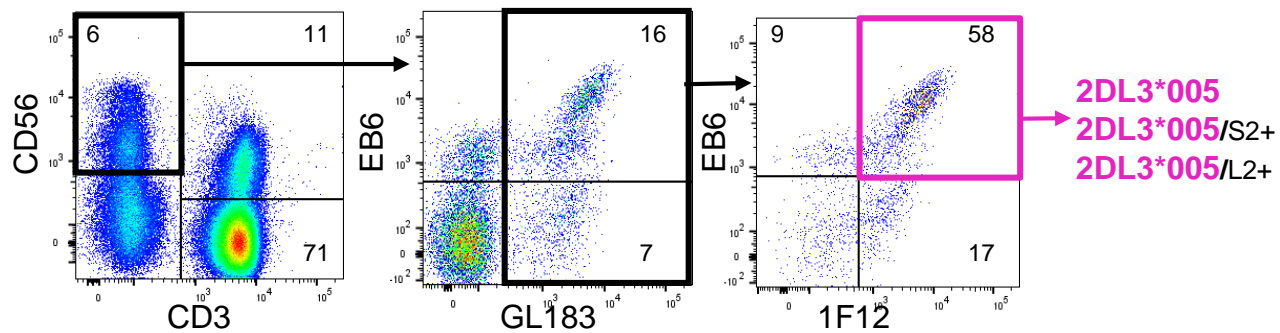
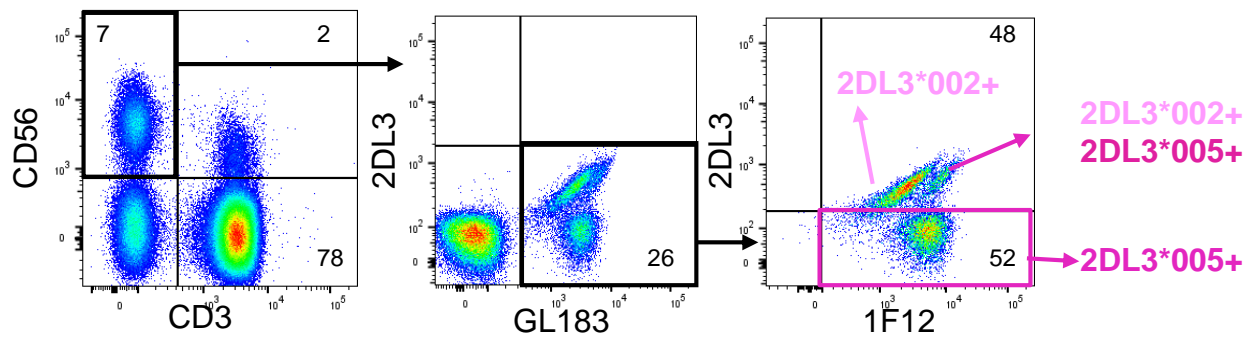
**B**

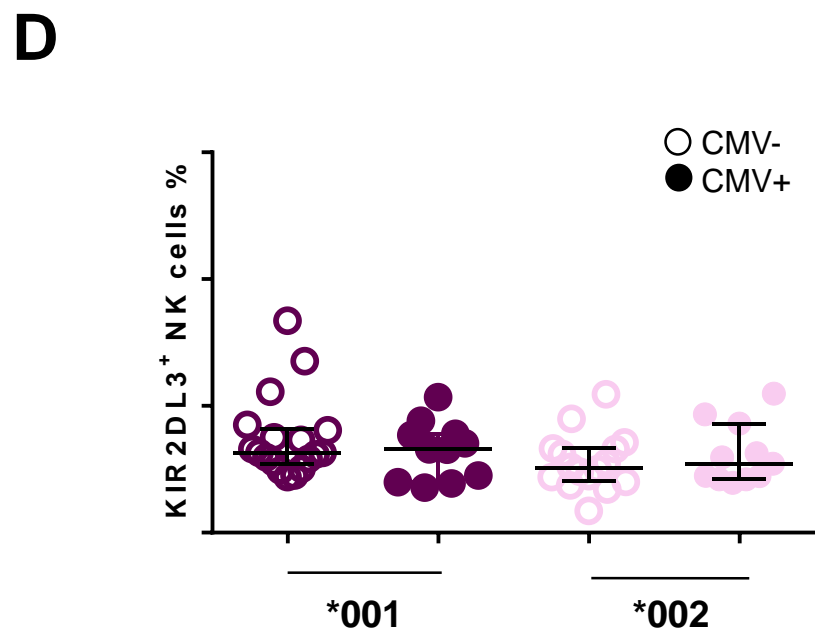
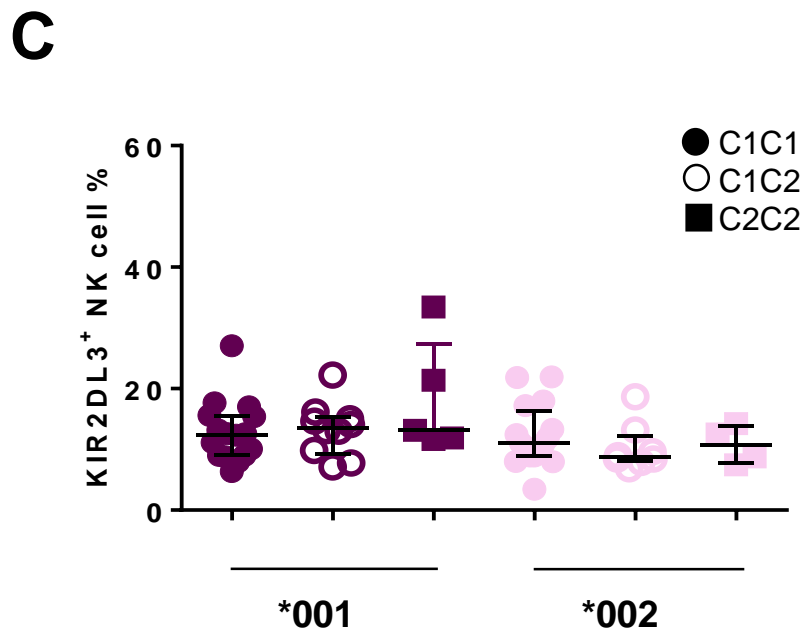
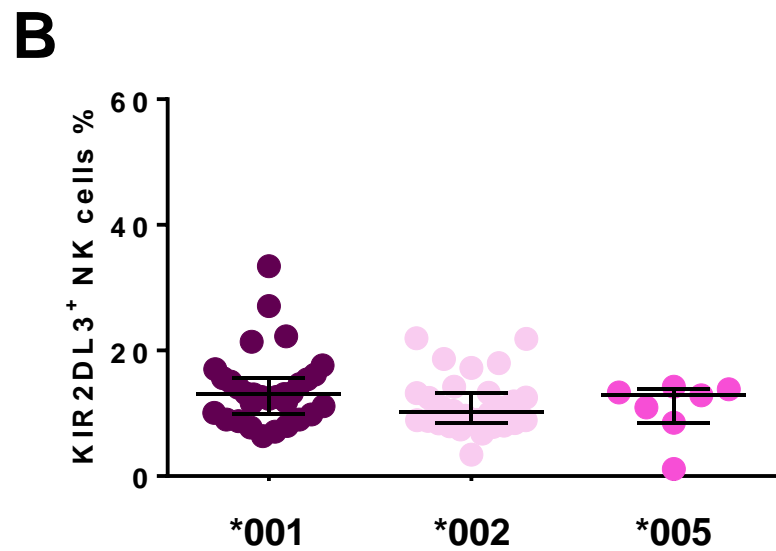
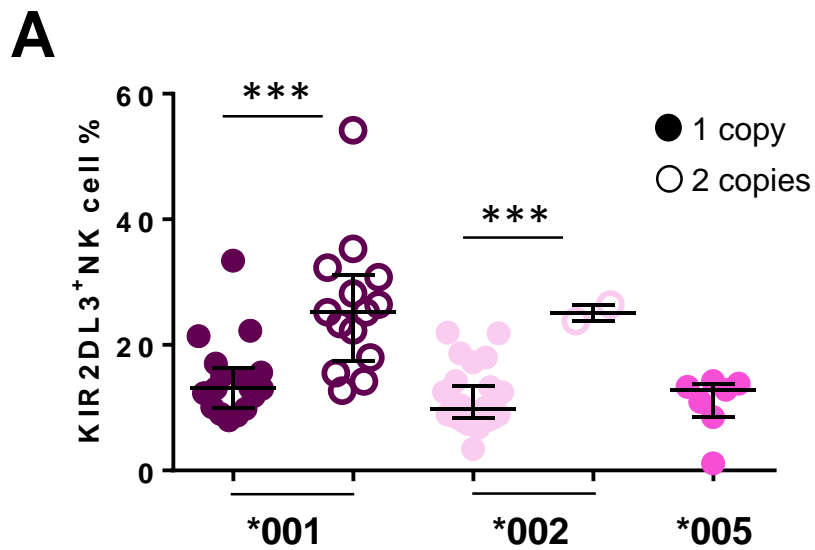


**C**



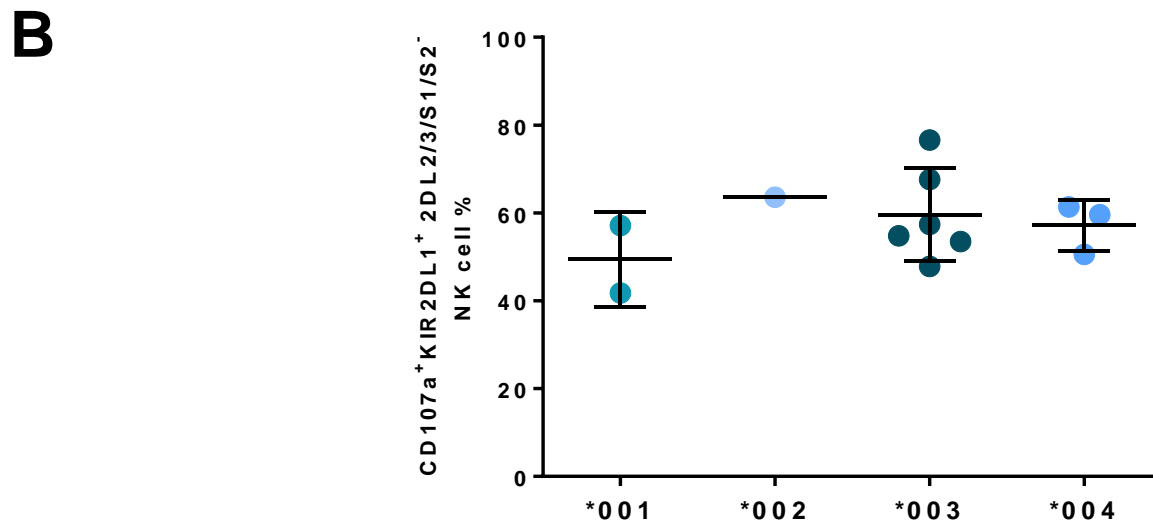
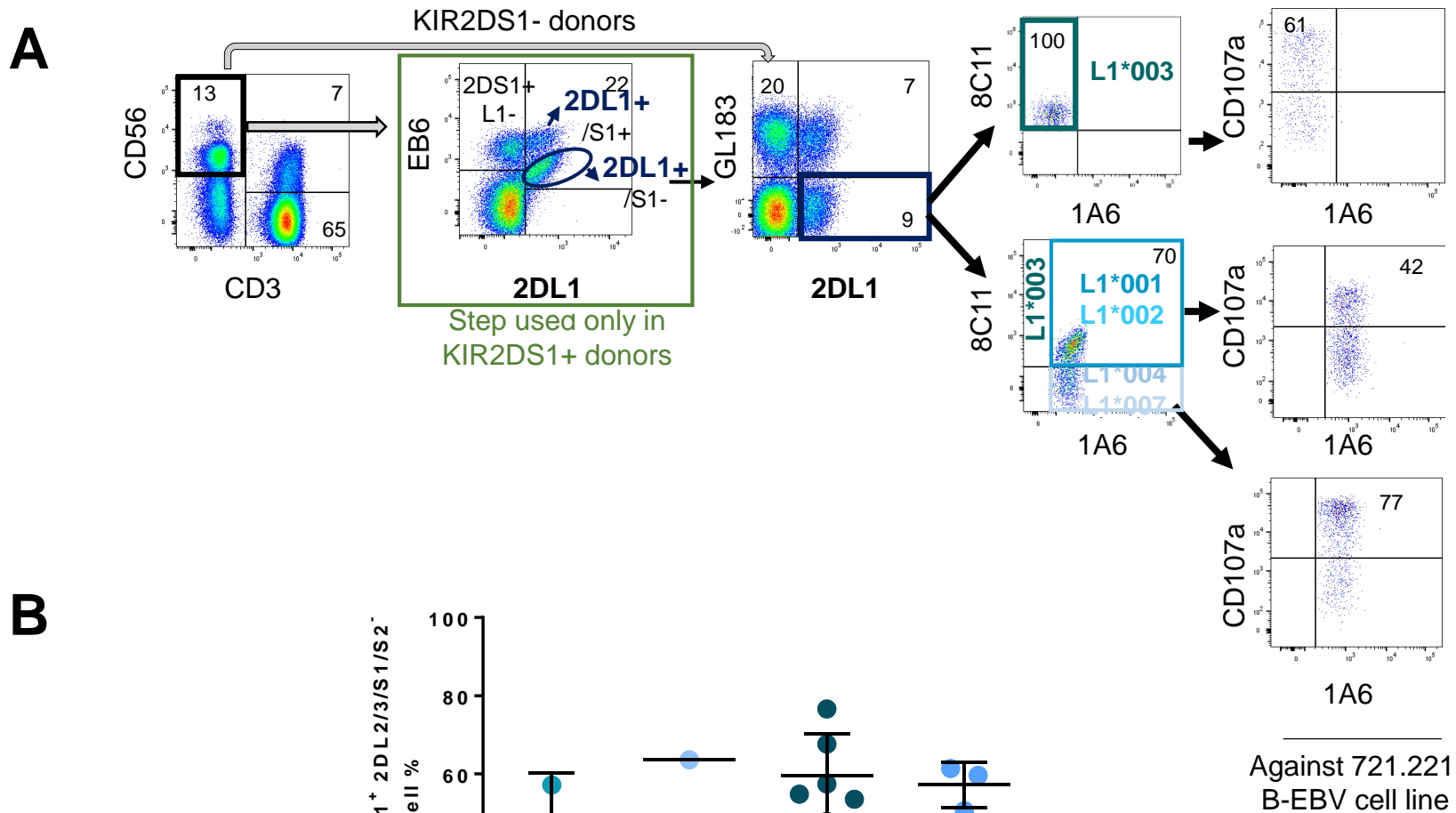
**Figure 4**

**A****B****C****Figure 5**

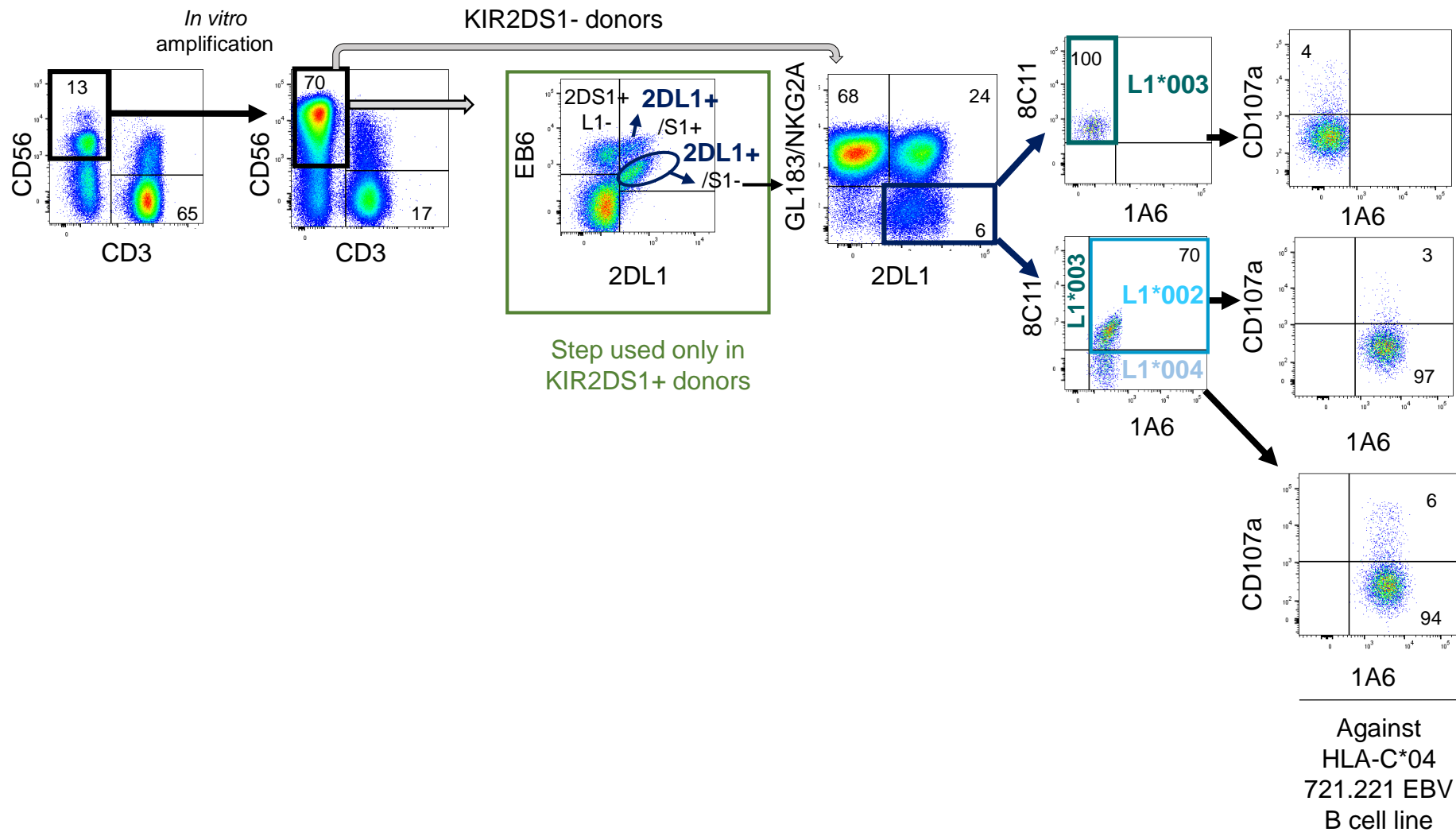


**Figure 6**

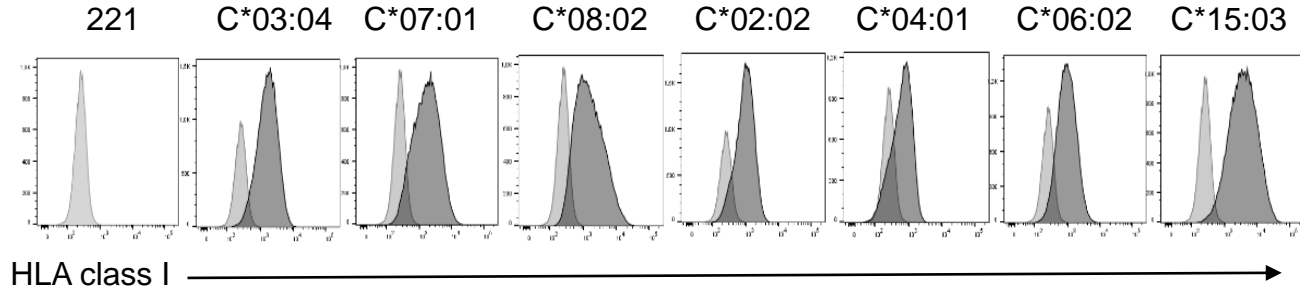
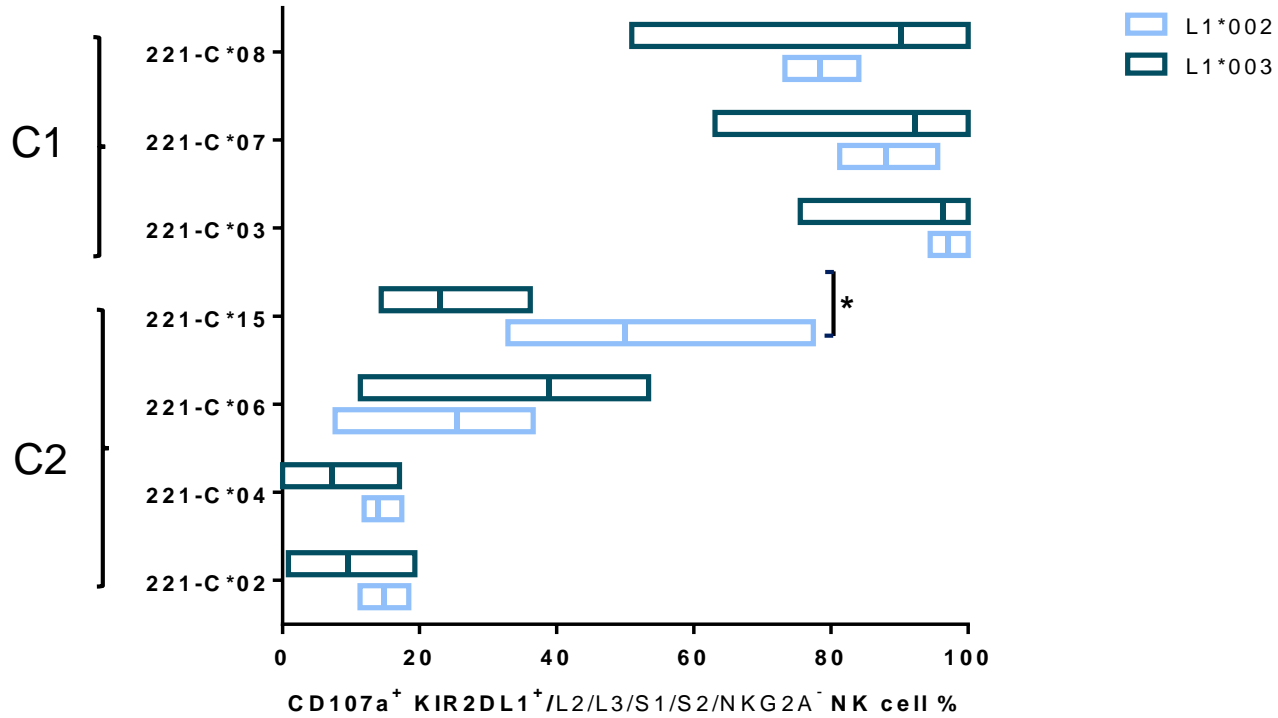


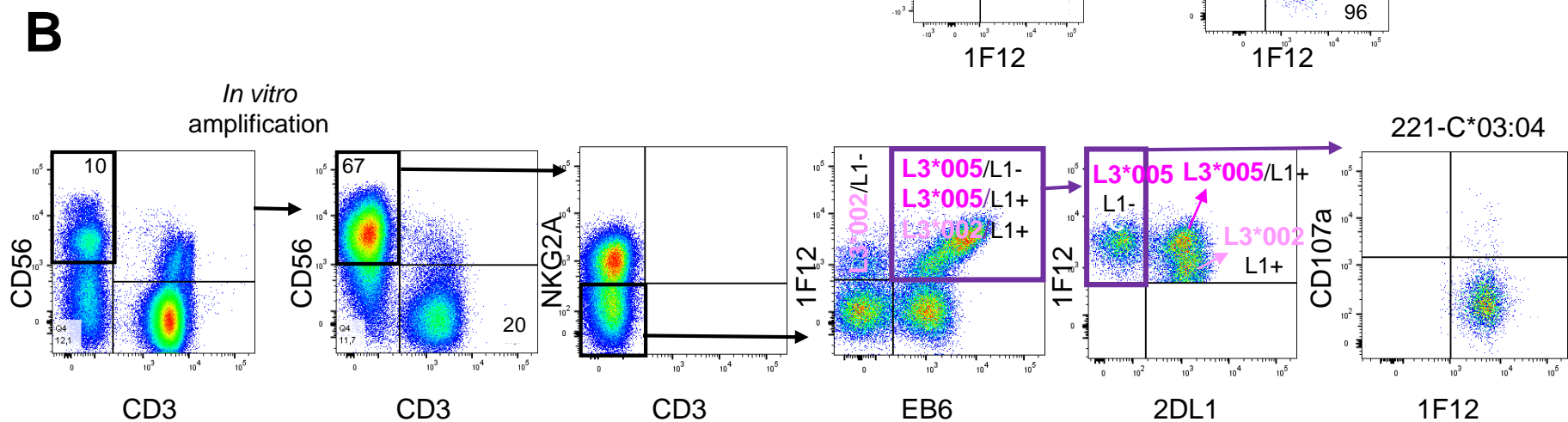
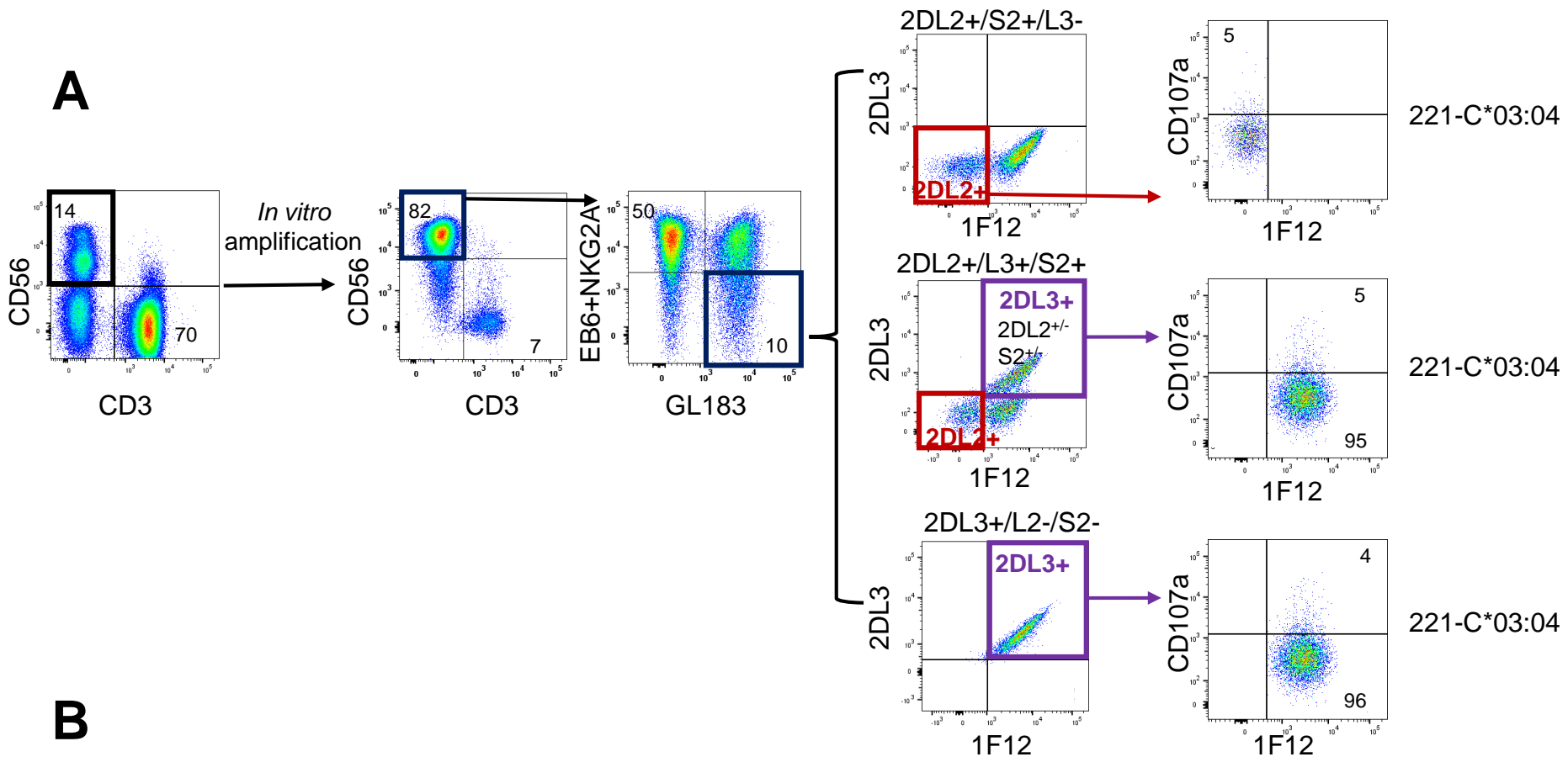


**Figure 7**

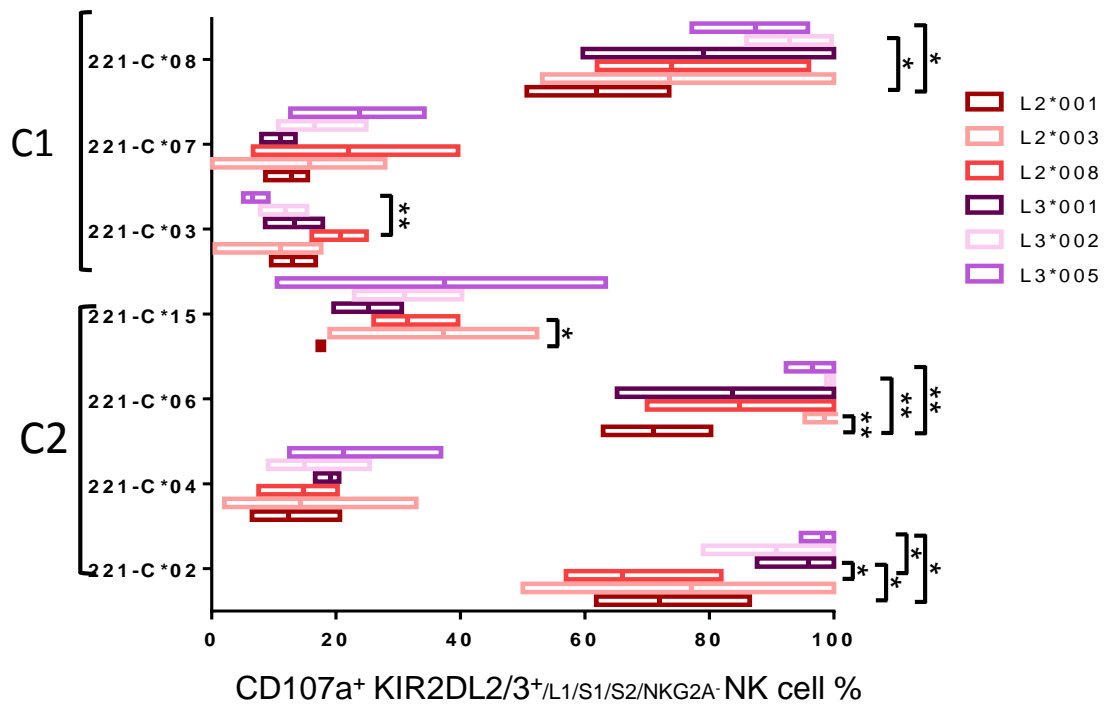
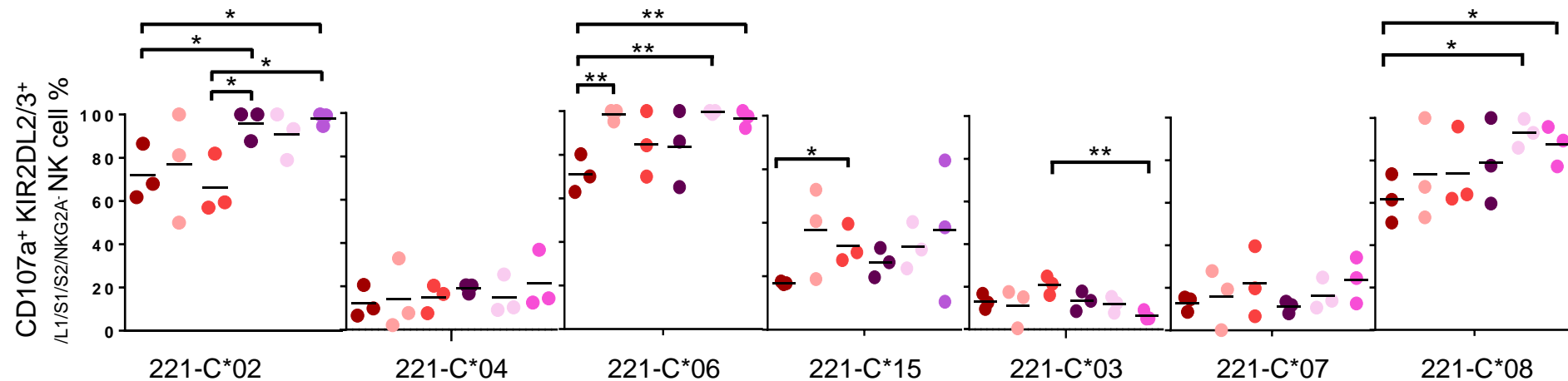


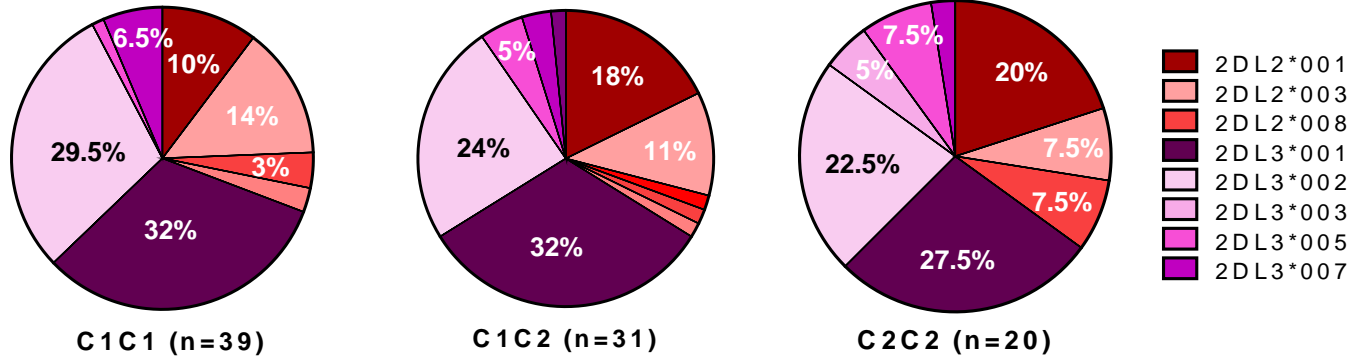
**Figure 8**

**A****B****Figure 9**



**Figure 10**

**A****B****Figure 11**



**Figure S1**

# **DISCUSSION ET PERSPECTIVES**

Dans ce projet de thèse, nous avons pu développer une approche NGS appliquée à l'étude du polymorphisme des allèles KIR. Contrairement au séquençage de l'exome, cette approche robuste et spécifique du locus KIR permet d'étudier le polymorphisme des allèles KIR sur l'ensemble du gène (régions codantes et non codantes) (Kidd et al., 2014). Pour valider cette méthode de typage NGS KIR, nous avons utilisé un panel d'ADN de références du 10<sup>ème</sup> Workshop International HLA et Immunogénétique <http://www.ihwg.org/> généralement disponible à tous les chercheurs. Nos résultats ont montré une précision de typage de 100% pour tous les gènes KIR présents dans chaque échantillon d'ADN testé. Sur les 30 ADN de référence testés, cette technique a permis d'identifier 422 allèles KIR sur les 233 allèles KIR connus dans la base des données IPD-KIR [https://www.ebi.ac.uk/cgi-bin/ipd/kir/get\\_all.cgi](https://www.ebi.ac.uk/cgi-bin/ipd/kir/get_all.cgi). La connaissance de ces allèles KIR pourrait apporter une contribution dans la mise à jour des allèles manquants de ces 30 ADN workshop dans la base des données IPD-KIR. Par exemple, le nombre d'allèles KIR3DL3 connus dans la base des données IPD-KIR sur ces 30 ADN de référence testés était de 5 sur les 60 identifiés dans notre étude. L'ensemble des résultats obtenus avec notre approche NGS KIR, démontre la capacité de la méthode à détecter toutes les variations alléliques des gènes KIR de la région 5'-UTR à la région 3'-UTR. Dans la mise en place de cette méthode NGS, nous avons utilisé la technologie NGS d'Illumina pour sa capacité à générer moins d'erreurs (< 0,4%) pendant le séquençage comparée aux autres plateformes technologiques NGS (Ion Torrent 1.78% et 13% pour Pacific Biosciences) (Quail et al., 2012). L'utilisation des combinaisons d'anticorps anti-KIR développés dans notre laboratoire, spécifique de certains produits d'allèles KIR, permet de confirmer les résultats alléliques KIR obtenus par NGS. Dans ce projet, nous avons mis en évidence des nouveaux allèles KIR sur le panel des donneurs de sang de l'EFS. Ces nouveaux allèles diffèrent de ceux connus au niveau des introns. Ils doivent être validés en utilisant un deuxième logiciel d'analyse.



Pour une application en routine, une technologie NGS.KIR à partir des ADNc pour cibler uniquement les exons pourrait être développée, ce qui faciliterait les amplifications et les analyses sur le logiciel *Profiler*. Cette méthode technologique pourrait être appliquée à l'étude de la diversité des allèles KIR dans les études de génétique des populations (Frassati et al., 2006), d'association d'allèles KIR aux infections virales (Boudreau et al., 2016) et à la grossesse (Hiby et al., 2010). La caractérisation des allèles de tous les gènes KIR doit être étendue sur un panel de 200 donneurs de sang permettant d'affiner les haplotypes KIR. La connaissance d'allèles KIR sur diverses populations pourrait permettre mieux affiner les haplotypes et connaître la fréquence des allèles KIR au sein de la population. De plus, elle pourrait permettre d'identifier leur origine, leur évolution, les relations qui existent entre différents allèles KIR, comme connu pour certains allèles KIR3DL1 (Thomas et al., 2008). Elle pourrait aussi permettre de mettre en place une carte, sur la distribution géographique des allèles KIR à travers le monde. Ce qui pourrait par exemple, aider dans la sélection des donneurs en greffes de CSH.

Des études ont montré l'association des génotypes KIR AA maternel et HLA-C2C2 fœtal sur le risque de fausse couche et de prééclampsie (Esplin et al., 2001), (Hiby et al., 2004), (Alecsandru et al., 2014). Le gène KIR2DL1 est l'unique gène polymorphe de l'haplotype A dont le récepteur est capable d'interagir fortement avec les molécules HLA-Cw d'épitope C2, ce qui empêche l'invasion du trophoblaste en l'absence d'un signal d'activation (Hiby et al., 2004). Le gène KIR2DL1 étant polymorphe au niveau allélique avec un impact fonctionnel, l'application de cette approche NGS de typage KIR pourrait permettre d'identifier les combinaisons d'allèles KIR2DL1/HLA-C2 ainsi que d'autres combinaisons impliquées dans certains troubles obstétricaux, tels que la prééclampsie et les fausses couches récurrentes. Une étude a récemment montré que les allèles inhibiteurs KIR2DL1\*001, KIR2DL1\*002 et KIR2DL1\*003 confèrent un gros risque de prééclampsie lorsque le gène activateur KIR2DS1

est absent (Huhn et al., 2018). La connaissance des allèles KIR2DL1 impliquées dans les fausses couches spontanées, pourrait aider dans la sélection des donneurs de spermatozoïdes et d'ovocytes pour les fécondations *in vitro* en prenant en compte l'environnement HLA-C de la patiente et du donneur. Des études ont montré que les gènes KIR maternels KIR2DL2, KIR2DL5, KIR2DS5 et KIR2DS2 sont associés à une diminution de la transmission du VIH-1 de la mère au fœtus (Omosun et al., 2018). L'application du NGS aux infections virales pourrait permettre d'identifier les allèles KIR impliqués dans la réduction de cette transmission et dans la diminution de la charge virale chez les patients chroniquement infectés par le VIH ayant les combinaisons KIR2DL2/S2 et HLA-C\*12:02 ou KIR2DL2/S2 et HLA-C\*14:02 (Lin et al., 2016). Elle pourrait aussi permettre d'identifier des combinaisons d'allèles KIR/HLA classe I protectrices contre une infection (virales ou bactériennes).

Des études ont montré l'association de certains gènes KIR avec l'arthrite psoriasique, tels que les gènes KIR2DS1, KIR2DS2 et KIR2DL2 (Williams et al., 2005), (Chandran et al., 2014). L'étude du polymorphisme des allèles KIR associés aux maladies autoimmunes, pourrait permettre l'identification des allèles KIR associés au développement de l'arthrite psoriasique et constituer un outil de diagnostic.

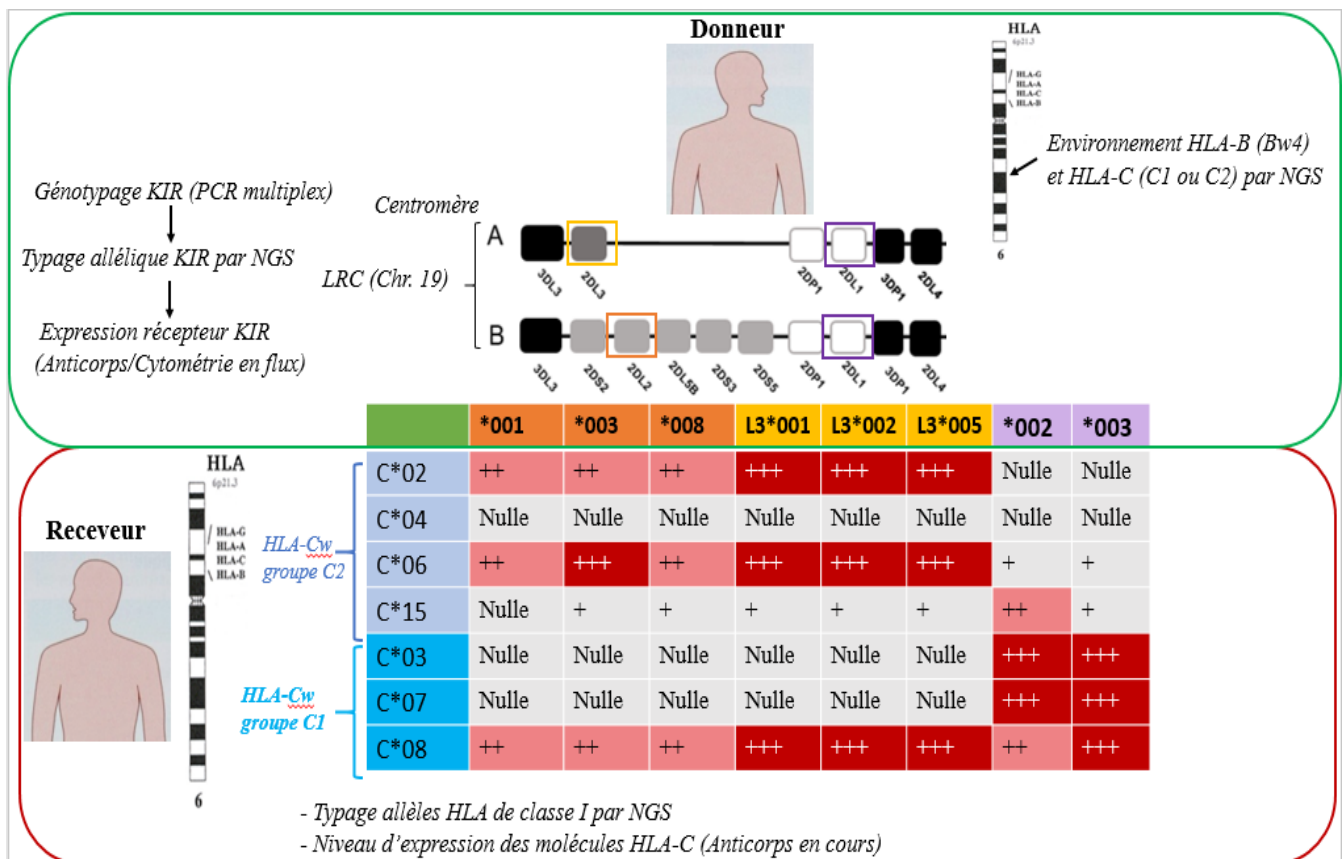
Cette méthode NGS de typage des allèles KIR pourrait aussi être utilisée en routine pour typer les allèles KIR des donneurs en greffes haploidentiques de CSH. A ce niveau, plusieurs questions demeurent, telles que les différentes combinaisons alléliques KIR/HLA à considérer. Récemment, l'étude de Boudreau JE et collaborateurs ont montré en 2017 que les combinaisons alléliques KIR3DL1/HLA-B prédisant une faible ou une absence d'inhibition des cellules NK sont associées à une forte diminution de la rechute et de la mortalité post-greffe de CSH HLA 9/10 ou 10/10 non apparentées T déplétées, chez les patients atteints d'une leucémie aigüe myéloïde (Boudreau et al., 2017). Dans une étude menée en 2013, Bari et collaborateurs ont montré que les patients atteints de LAM greffés avec les CSH de donneurs possédant des allèles

KIR2DL1 avec une arginine (R) en position 245 (*KIR2DL1 fortement exprimé sur les cellules NK*), ont une meilleure survie comparées à ceux ayant des allèles KIR2DL1 avec une cystéine (C) en position 245 (*faiblement exprimé sur les cellules NK*) (Bari et al., 2013). L'étude de Bari et collaborateurs, ont montré l'effet bénéfique des incompatibilités des allèles KIR2DL1/HLA-C associées au polymorphisme allélique KIR2DL1 du donneur en greffes de CSH allogéniques. Cependant, dans cette étude plusieurs types de greffes de CSH (haploidentiques T déplétées ou non, HLA compatibles apparentées ou non) ont été évalués ensemble, ce qui ne permet pas de ressortir les résultats obtenus en greffes haploidentiques. L'environnement HLA du donneur n'a pas été pris en compte dans leurs analyses. Des études supplémentaires nécessitent d'être réalisées en greffes de CSH allogéniques, par exemple en greffe de CSH haploidentiques non T déplétées avec conditionnement d'intensité réduite, en considérant les incompatibilités alléliques KIR/HLA pour tous les gènes KIR fonctionnels. Bien avant, des études fondamentales nécessitent d'être complétées visant à évaluer l'impact phénotypique et fonctionnel du polymorphisme allélique de tous les gènes KIR fonctionnels vis-à-vis de différentes lignées cellulaires leucémiques, ce qui permettra de définir les meilleures combinaisons d'allèles KIR/HLA pour chaque gène KIR. Le développement d'anticorps spécifiques anti-HLA-Cw permettrait aussi de connaître le niveau d'expression des molécules HLA-Cw sur les cellules des patients, étant donné que ces molécules sont reconnues par les récepteurs KIR et que leur expression est allèle spécifique. Dans ce projet de thèse, nous avons observé une différence de fonction des cellules NK KIR2DL2/L3<sup>+</sup> selon la nature de l'allèle KIR2DL2/3 et HLA-C. Des différences fonctionnelles des cellules NK KIR2DL2/L3<sup>+</sup> ont été observées vis-à-vis de lignées B EBV transfectées avec les molécules HLA-Cw du même groupe (C1 ou C2) (**Article N°3 en préparation**).

Dans notre laboratoire, nous avons montré que les incompatibilités KIR2DL (KIR2DL1 et KIR2DL2/3) /HLA-C sont associées à une diminution significative de l'incidence de la

rechute chez les patients atteints de pathologies d'origines myéloïdes en greffes haploidentiques non T déplétées avec ajout de cyclophosphamide post-greffe (**Article soumis, voir annexe**). Cet effet bénéfique des incompatibilités KIR/HLA en greffes haploidentiques non T déplétées a aussi été démontrée dans d'autres études (Wanquet et al., 2018). Wanquet et al. ont montré chez 63 patients en non rémission, que les incompatibilités KIR ligand entre le donneur et le receveur sont associées à une diminution significative de l'incidence de la rechute sur 2 ans. Cependant, dans ces travaux, aucune précision n'est apportée sur les gènes KIR investigués (KIR2D ou KIR3D) et sur l'environnement HLA classe I des donneurs. Symons et collaborateurs ont montré dans une série de 86 patients après greffes haploidentiques non T déplétées avec ajout de cyclophosphamide que les incompatibilités des gènes KIR inhibiteurs entre donneurs et receveurs sont associées à une diminution de la rechute et à une amélioration de la survie des patients (Symons et al., 2010). Sauf quelques exceptions, la plupart des études investiguant l'effet des gènes KIR en greffes de CSH analysent uniquement le contenu en gènes KIR des donneurs ou des ligands HLA-B et HLA-C, mais non pas la présence d'allèles KIR (Cooley et al., 2010), (Mancusi et al., 2015). Le polymorphisme allélique touche tous les gènes KIR avec un potentiel impact fonctionnel sur l'alloréactivité des cellules NK. La connaissance de l'impact fonctionnel des allèles KIR en greffes de CSH, permettra de mieux affiner les critères de sélection des donneurs en greffe de CSH (**Figure 14**) pour favoriser l'alloréactivité des cellules NK comme suggéré par Alicata pour le gène KIR3DL1/S1 (Alicata et al., 2016). La fréquence des gènes KIR2DL1 et KIR2DL2/3 est respectivement de 97% et de 100% dans la population. Comme déjà décrit pour le gène KIR3DL1 en greffes de CSH HLA identique (Boudreau et al., 2017), ces critères de sélection pourraient être simplifiés en greffes de CSH haploidentiques, car plusieurs donneurs potentiels possibles, en se limitant par exemple sur certains gènes KIR inhibiteurs (KIR2DL1, KIR2DL2/3). Cependant, d'autres études doivent être effectuées pour connaître le niveau d'expression et la fonction des allèles KIR dans les

populations. Etant donné, la capacité intrinsèque des cellules NK à reconnaître et à cibler les cellules tumorales via leurs récepteurs natifs. La connaissance fonctionnelle, des allèles KIR pourrait par exemple permettre aux laboratoires de thérapies cellulaires, de développer les CAR au niveau des cellules NK des donneurs ayant des allèles KIR, dont la fonction est connue. L'infusion des cellules NK des donneurs ayant certains allèles KIR d'expressions et de fonctions connues pourrait peut-être améliorer le potentiel antileucémique.



**Figure 14 : Proposition d'un arbre décisionnel pour la sélection des donneurs de CSH sur des bases alléliques KIR en greffes HLA haploidentiques.** Sélection des donneurs de CSH suivant i) leur contenu en gènes KIR déterminés par génotypage et en allèles KIR2DL1/L2/L3 déterminés par NGS, ii) l'environnement HLA de classe I du donneur et iii) typages HLA-Cw du receveur déterminés par NGS. En rouge +++ : forte dégranulation des cellules NK KIR2DL<sup>+</sup> du donneur selon les allèles KIR2DL1/L2/L3; rouge clair ++ : dégranulation intermédiaire des cellules NK KIR2DL<sup>+</sup> du donneur selon les allèles KIR2DL1/L2/L3; gris + : faible dégranulation des cellules NK KIR2DL<sup>+</sup> du donneur selon les allèles KIR2DL1/L2/L3 et Nulle : très faible dégranulation des cellules NK KIR2DL<sup>+</sup> selon les allèles KIR2DL1/L2/L3 vis-à-vis des cellules cibles. Selon les allèles KIR2DL1/L2/L3 présents chez le donneur, une forte dégranulation des cellules NK KIR2DL<sup>+</sup> sera recherchée en fonction des molécules HLA-Cw présentes chez le receveur.

# **REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES**

- Abdul-Careem, M.F., Lee, A.J., Pek, E.A., Gill, N., Gillgrass, A.E., Chew, M.V., Reid, S., and Ashkar, A.A. (2012). Genital HSV-2 infection induces short-term NK cell memory. *PloS One* 7, e32821.
- Abraham, J.P., Barker, D.J., Robinson, J., Maccari, G., and Marsh, S.G.E. (2018). The IPD Databases: Cataloguing and Understanding Allele Variants. In *HLA Typing*, (Humana Press, New York, NY), pp. 31–48.
- Abt, M.C., Lewis, B.B., Caballero, S., Xiong, H., Carter, R.A., Sušac, B., Ling, L., Leiner, I., and Pamer, E.G. (2015). Innate Immune Defenses Mediated by Two ILC Subsets Are Critical for Protection against Acute *Clostridium difficile* Infection. *Cell Host Microbe* 18, 27–37.
- Aldemir, H., Prod'homme, V., Dumaurier, M.-J., Retiere, C., Poupon, G., Cazareth, J., Bihl, F., and Braud, V.M. (2005). Cutting edge: lectin-like transcript 1 is a ligand for the CD161 receptor. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 175, 7791–7795.
- Alecsandru, D., Garrido, N., Vicario, J.L., Barrio, A., Aparicio, P., Requena, A., and García-Velasco, J.A. (2014). Maternal KIR haplotype influences live birth rate after double embryo transfer in IVF cycles in patients with recurrent miscarriages and implantation failure. *Hum. Reprod.* 29, 2637–2643.
- Alicata, C., Pende, D., Meazza, R., Canevali, P., Loiacono, F., Bertaina, A., Locatelli, F., Nemat-Gorgani, N., Guethlein, L.A., Parham, P., et al. (2016). Hematopoietic stem cell transplantation: Improving alloreactive Bw4 donor selection by genotyping codon 86 of KIR3DL1/S1. *Eur. J. Immunol.* 46, 1511–1517.
- Allan, D.S.J., Lepin, E.J.M., Braud, V.M., O'Callaghan, C.A., and McMichael, A.J. (2002). Tetrameric complexes of HLA-E, HLA-F, and HLA-G. *J. Immunol. Methods* 268, 43–50.
- Allen, R.L., Raine, T., Haude, A., Trowsdale, J., and Wilson, M.J. (2001). Leukocyte receptor complex-encoded immunomodulatory receptors show differing specificity for alternative HLA-B27 structures. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 167, 5543–5547.
- Alter, G., Malenfant, J.M., Delabre, R.M., Burgett, N.C., Yu, X.G., Lichterfeld, M., Zaunders, J., and Altfeld, M. (2004a). Increased natural killer cell activity in viremic HIV-1 infection. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 173, 5305–5311.
- Alter, G., Malenfant, J.M., and Altfeld, M. (2004b). CD107a as a functional marker for the identification of natural killer cell activity. *J. Immunol. Methods* 294, 15–22.
- Alves, L.G.T., Rajalingam, R., and Canavez, F. (2009). A novel real-time PCR method for KIR genotyping. *Tissue Antigens* 73, 188–191.
- Ambardar, S., Gupta, R., Trakroo, D., Lal, R., and Vakhlu, J. (2016). High Throughput Sequencing: An Overview of Sequencing Chemistry. *Indian J. Microbiol.* 56, 394–404.
- Anasetti, C., Amos, D., Beatty, P.G., Appelbaum, F.R., Bensinger, W., Buckner, C.D., Clift, R., Doney, K., Martin, P.J., and Mickelson, E. (1989). Effect of HLA compatibility on engraftment of bone marrow transplants in patients with leukemia or lymphoma. *N. Engl. J. Med.* 320, 197–204.

- Anderson, S.K. (2014). Probabilistic Bidirectional Promoter Switches: Noncoding RNA Takes Control. *Mol. Ther. Nucleic Acids* 3, e191.
- Andersson, S., Fauriat, C., Malmberg, J.-A., Ljunggren, H.-G., and Malmberg, K.-J. (2009). KIR acquisition probabilities are independent of self-HLA class I ligands and increase with cellular KIR expression. *Blood* 114, 95–104.
- Anfossi, N., André, P., Guia, S., Falk, C.S., Roetynck, S., Stewart, C.A., Bresó, V., Frassati, C., Reviron, D., Middleton, D., et al. (2006). Human NK cell education by inhibitory receptors for MHC class I. *Immunity* 25, 331–342.
- Anthony, D.A., Andrews, D.M., Watt, S.V., Trapani, J.A., and Smyth, M.J. (2010). Functional dissection of the granzyme family: cell death and inflammation. *Immunol. Rev.* 235, 73–92.
- Appelbaum, F.R. (2007). Hematopoietic-cell transplantation at 50. *N. Engl. J. Med.* 357, 1472–1475.
- Apps, R., Meng, Z., Del Prete, G.Q., Lifson, J.D., Zhou, M., and Carrington, M. (2015). Relative expression levels of the HLA class-I proteins in normal and HIV-infected cells. *J. Immunol. Baltim. Md* 1950 194, 3594–3600.
- Aramburu, J., Balboa, M.A., Ramírez, A., Silva, A., Acevedo, A., Sánchez-Madrid, F., De Landázuri, M.O., and López-Botet, M. (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. Baltim. Md* 1950 144, 3238–3247.
- Arnon, T.I., Lev, M., Katz, G., Chernobrov, Y., Porgador, A., and Mandelboim, O. (2001). Recognition of viral hemagglutinins by NKp44 but not by NKp30. *Eur. J. Immunol.* 31, 2680–2689.
- Arnon, T.I., Achdout, H., Lieberman, N., Gazit, R., Gonen-Gross, T., Katz, G., Bar-Ilan, A., Bloushtain, N., Lev, M., Joseph, A., et al. (2004). The mechanisms controlling the recognition of tumor- and virus-infected cells by NKp46. *Blood* 103, 664–672.
- Arnon, T.I., Achdout, H., Levi, O., Markel, G., Saleh, N., Katz, G., Gazit, R., Gonen-Gross, T., Hanna, J., Nahari, E., et al. (2005). Inhibition of the NKp30 activating receptor by pp65 of human cytomegalovirus. *Nat. Immunol.* 6, 515–523.
- Aversa, F., Tabilio, A., Terenzi, A., Velardi, A., Falzetti, F., Giannoni, C., Iacucci, R., Zei, T., Martelli, M.P., and Gambelunghé, C. (1994). Successful engraftment of T-cell-depleted haploidentical “three-loci” incompatible transplants in leukemia patients by addition of recombinant human granulocyte colony-stimulating factor-mobilized peripheral blood progenitor cells to bone marrow inoculum. *Blood* 84, 3948–3955.
- Bacigalupo, A., Ballen, K., Rizzo, D., Giralto, S., Lazarus, H., Ho, V., Apperley, J., Slavin, S., Pasquini, M., Sandmaier, B.M., et al. (2009). Defining the intensity of conditioning regimens: working definitions. *Biol. Blood Marrow Transplant. J. Am. Soc. Blood Marrow Transplant.* 15, 1628–1633.



- Ballen, K.K., Colvin, G., Porter, D., and Quesenberry, P.J. (2004). Low dose total body irradiation followed by allogeneic lymphocyte infusion for refractory hematologic malignancy—an updated review. *Leuk. Lymphoma* *45*, 905–910.
- Bao, X., Hou, L., Sun, A., Chen, M., Chen, Z., and He, J. (2010). An allelic typing method for 2DS4 variant used in study of haplotypes of killer cell immunoglobulin-like receptor gene. *Int. J. Lab. Hematol.* *32*, 625–632.
- Bari, R., Rujkijyanont, P., Sullivan, E., Kang, G., Turner, V., Gan, K., and Leung, W. (2013). Effect of donor KIR2DL1 allelic polymorphism on the outcome of pediatric allogeneic hematopoietic stem-cell transplantation. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* *31*, 3782–3790.
- Bari, R., Schell, S., Tuggle, M., and Leung, W. (2015). An Improved Method With High Specificity for KIR2DL1 Functional Allele Typing. *Lab. Med.* *46*, 207–213.
- Barker, J.N., Weisdorf, D.J., DeFor, T.E., Blazar, B.R., McGlave, P.B., Miller, J.S., Verfaillie, C.M., and Wagner, J.E. (2005). Transplantation of 2 partially HLA-matched umbilical cord blood units to enhance engraftment in adults with hematologic malignancy. *Blood* *105*, 1343–1347.
- Barnes, D.W., Corp, M.J., Loutit, J.F., and Neal, F.E. (1956). Treatment of murine leukaemia with X rays and homologous bone marrow; preliminary communication. *Br. Med. J.* *2*, 626–627.
- Baychelier, F., Sennepin, A., Ermonval, M., Dorgham, K., Debré, P., and Vieillard, V. (2013). Identification of a cellular ligand for the natural cytotoxicity receptor NKp44. *Blood* *122*, 2935–2942.
- Beck, S., and Barrell, B.G. (1988). Human cytomegalovirus encodes a glycoprotein homologous to MHC class-I antigens. *Nature* *331*, 269–272.
- Beck, S., and Trowsdale, J. (2000). The human major histocompatibility complex: lessons from the DNA sequence. *Annu. Rev. Genomics Hum. Genet.* *1*, 117–137.
- Bejanyan, N., Haddad, H., and Brunstein, C. (2015). Alternative Donor Transplantation for Acute Myeloid Leukemia. *J. Clin. Med.* *4*, 1240–1268.
- Bellón, T., Heredia, A.B., Llano, M., Minguela, A., Rodriguez, A., López-Botet, M., and Aparicio, P. (1999). Triggering of effector functions on a CD8+ T cell clone upon the aggregation of an activatory CD94/kp39 heterodimer. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *162*, 3996–4002.
- Bennett, I.M., Zatsepina, O., Zamai, L., Azzoni, L., Mikheeva, T., and Perussia, B. (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*, 1845–1856.
- Benson, D.M., Padmanabhan, S., Hofmeister, C.C., Bakan, C.E., Abonour, R., Suvannasankha, A., Efebera, Y.A., Squiban, P.J., Caligiuri, M.A., and Farag, S. (2010a). A phase I study of IPH2101, a novel anti-inhibitory KIR monoclonal antibody, in patients with multiple myeloma. *J. Clin. Oncol.* *28*, 8139–8139.

- Benson, D.M., Bakan, C.E., Mishra, A., Hofmeister, C.C., Efebera, Y., Becknell, B., Baiocchi, R.A., Zhang, J., Yu, J., Smith, M.K., et al. (2010b). The PD-1/PD-L1 axis modulates the natural killer cell versus multiple myeloma effect: a therapeutic target for CT-011, a novel monoclonal anti-PD-1 antibody. *Blood* *116*, 2286–2294.
- Benson, D.M., Cohen, A.D., Jagannath, S., Munshi, N.C., Spitzer, G., Hofmeister, C.C., Efebera, Y.A., Andre, P., Zerbib, R., and Caligiuri, M.A. (2015). A Phase I Trial of the Anti-KIR Antibody IPH2101 and Lenalidomide in Patients with Relapsed/Refractory Multiple Myeloma. *Clin. Cancer Res.* *21*, 4055–4061.
- Berg, L., Riise, G.C., Cosman, D., Bergström, T., Olofsson, S., Kärre, K., and Carbone, E. (2003). LIR-1 expression on lymphocytes, and cytomegalovirus disease in lung-transplant recipients. *Lancet Lond. Engl.* *361*, 1099–1101.
- Berrien-Elliott, M.M., Wagner, J.A., and Fehniger, T.A. (2015). Human Cytokine-Induced Memory-Like Natural Killer Cells. *J. Innate Immun.* *7*, 563–571.
- Bettens, F., Brunet, L., and Tiercy, J.-M. (2014). High-allelic variability in HLA-C mRNA expression: association with HLA-extended haplotypes. *Genes Immun.* *15*, 176–181.
- Beyar-Katz, O., and Gill, S. (2018). Novel approaches to acute myeloid leukemia immunotherapy. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.*
- Beziat, V., Traherne, J.A., Liu, L.L., Jayaraman, J., Enqvist, M., Larsson, S., Trowsdale, J., and Malmberg, K.-J. (2013). Influence of KIR gene copy number on natural killer cell education. *Blood* *121*, 4703–4707.
- Béziat, V., Liu, L.L., Malmberg, J.-A., Ivarsson, M.A., Sohlberg, E., Björklund, A.T., Retière, C., Sverremark-Ekström, E., Traherne, J., Ljungman, P., et al. (2013). NK cell responses to cytomegalovirus infection lead to stable imprints in the human KIR repertoire and involve activating KIRs. *Blood* *121*, 2678–2688.
- Biassoni, R., Fogli, M., Cantoni, C., Costa, P., Conte, R., Koopman, G., Cafaro, A., Ensoli, B., Moretta, A., Moretta, L., et al. (2005). Molecular and functional characterization of NKG2D, NKp80, and NKG2C triggering NK cell receptors in rhesus and cynomolgus macaques: monitoring of NK cell function during simian HIV infection. *J. Immunol. Baltim. Md* *1950* *174*, 5695–5705.
- Bignon, J.-D., and Gagne, K. (2005). KIR matching in hematopoietic stem cell transplantation. *Curr. Opin. Immunol.* *17*, 553–559.
- Biron, C.A., Byron, K.S., and Sullivan, J.L. (1989). Severe Herpesvirus Infections in an Adolescent without Natural Killer Cells. *N. Engl. J. Med.* *320*, 1731–1735.
- Björkström, N.K., Riese, P., Heuts, F., Andersson, S., Fauriat, C., Ivarsson, M.A., Björklund, A.T., Flodström-Tullberg, M., Michaëlsson, J., Rottenberg, M.E., et al. (2010). Expression patterns of NKG2A, KIR, and CD57 define a process of CD56dim NK-cell differentiation uncoupled from NK-cell education. *Blood* *116*, 3853–3864.
- Bleharski, J.R., Li, H., Meinken, C., Graeber, T.G., Ochoa, M.-T., Yamamura, M., Burdick, A., Sarno, E.N., Wagner, M., Röllinghoff, M., et al. (2003). Use of genetic profiling in leprosy to discriminate clinical forms of the disease. *Science* *301*, 1527–1530.

- Bloushtain, N., Qimron, U., Bar-Ilan, A., Hershkovitz, O., Gazit, R., Fima, E., Korc, M., Vlodaysky, I., Bovin, N.V., and Porgador, A. (2004). Membrane-associated heparan sulfate proteoglycans are involved in the recognition of cellular targets by NKp30 and NKp46. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *173*, 2392–2401.
- Bonavida, B., Katz, J., and Hoshino, T. (1986). Mechanism of NK activation by OK-432 (*Streptococcus pyogenes*). I. Spontaneous release of NKCF and augmentation of NKCF production following stimulation with NK target cells. *Cell. Immunol.* *102*, 126–135.
- Bonilla, F.A., and Oettgen, H.C. (2010). Adaptive immunity. *J. Allergy Clin. Immunol.* *125*, S33–S40.
- Bonorino, P., Ramzan, M., Camous, X., Dufeu-Duchesne, T., Thélu, M.-A., Sturm, N., Dariz, A., Guillermet, C., Pernollet, M., Zarski, J.-P., et al. (2009). Fine characterization of intrahepatic NK cells expressing natural killer receptors in chronic hepatitis B and C. *J. Hepatol.* *51*, 458–467.
- Borges, L., Hsu, M.L., Fanger, N., Kubin, M., and Cosman, D. (1997). A family of human lymphoid and myeloid Ig-like receptors, some of which bind to MHC class I molecules. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *159*, 5192–5196.
- Borrego, F., Ulbrecht, M., Weiss, E.H., Coligan, J.E., and Brooks, A.G. (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*, 813–818.
- Borrego, F., Kabat, J., Kim, D.-K., Lieto, L., Maasho, K., Peña, J., Solana, R., and Coligan, J.E. (2002). Structure and function of major histocompatibility complex (MHC) class I specific receptors expressed on human natural killer (NK) cells. *Mol. Immunol.* *38*, 637–660.
- Borrego, F., Masilamani, M., Marusina, A.I., Tang, X., and Coligan, J.E. (2006). The CD94/NKG2 family of receptors. *Immunol. Res.* *35*, 263–277.
- Bottino, C., Castriconi, R., Pende, D., Rivera, P., Nanni, M., Carnemolla, B., Cantoni, C., Grassi, J., Marcenaro, S., Reymond, N., et al. (2003). Identification of PVR (CD155) and Nectin-2 (CD112) as cell surface ligands for the human DNAM-1 (CD226) activating molecule. *J. Exp. Med.* *198*, 557–567.
- Bottino, C., Dondero, A., Bellora, F., Moretta, L., Locatelli, F., Pistoia, V., Moretta, A., and Castriconi, R. (2014). Natural Killer Cells and Neuroblastoma: Tumor Recognition, Escape Mechanisms, and Possible Novel Immunotherapeutic Approaches. *Front. Immunol.* *5*.
- Boudreau, J.E., Mulrooney, T.J., Le Luduec, J.-B., Barker, E., and Hsu, K.C. (2016). KIR3DL1 and HLA-B Density and Binding Calibrate NK Education and Response to HIV. *J. Immunol.* *196*, 3398–3410.
- Boudreau, J.E., Giglio, F., Gooley, T.A., Stevenson, P.A., Le Luduec, J.-B., Shaffer, B.C., Rajalingam, R., Hou, L., Hurley, C.K., Noreen, H., et al. (2017). KIR3DL1/HLA-B Subtypes Govern Acute Myelogenous Leukemia Relapse After Hematopoietic Cell Transplantation. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* *JCO2016707059*.

- Boulet, S., Kleyman, M., Kim, J.Y., Kanya, P., Sharafi, S., Simic, N., Bruneau, J., Routy, J.-P., Tsoukas, C.M., and Bernard, N.F. (2008a). A combined genotype of KIR3DL1 high expressing alleles and HLA-B\*57 is associated with a reduced risk of HIV infection. *AIDS Lond. Engl.* *22*, 1487–1491.
- Boulet, S., Sharafi, S., Simic, N., Bruneau, J., Routy, J.-P., Tsoukas, C.M., and Bernard, N.F. (2008b). Increased proportion of KIR3DS1 homozygotes in HIV-exposed uninfected individuals. *AIDS Lond. Engl.* *22*, 595–599.
- Boyington, J.C., Motyka, S.A., Schuck, P., Brooks, A.G., and Sun, P.D. (2000). Crystal structure of an NK cell immunoglobulin-like receptor in complex with its class I MHC ligand. *Nature* *405*, 537–543.
- Boyington, J.C., Brooks, A.G., and Sun, P.D. (2001). Structure of killer cell immunoglobulin-like receptors and their recognition of the class I MHC molecules. *Immunol. Rev.* *181*, 66–78.
- Brandstadter, J.D., and Yang, Y. (2011). Natural killer cell responses to viral infection. *J. Innate Immun.* *3*, 274–279.
- Brandt, C.S., Baratin, M., Yi, E.C., Kennedy, J., Gao, Z., Fox, B., Haldeman, B., Ostrander, C.D., Kaifu, T., Chabannon, C., et al. (2009). The B7 family member B7-H6 is a tumor cell ligand for the activating natural killer cell receptor NKp30 in humans. *J. Exp. Med.* *206*, 1495–1503.
- Braud, V.M., Allan, D.S.J., O’Callaghan, C.A., Söderström, K., D’Andrea, A., Ogg, G.S., Lazetic, S., Young, N.T., Bell, J.I., Phillips, J.H., et al. (1998). HLA-E binds to natural killer cell receptors CD94/NKG2A, B and C. *Nature* *391*, 795–799.
- Brodin, P., Kärre, K., and Höglund, P. (2009a). NK cell education: not an on-off switch but a tunable rheostat. *Trends Immunol.* *30*, 143–149.
- Brodin, P., Lakshmikanth, T., Johansson, S., Karre, K., and Hoglund, P. (2009b). The strength of inhibitory input during education quantitatively tunes the functional responsiveness of individual natural killer cells. *Blood* *113*, 2434–2441.
- Brooks, A.G., Posch, P.E., Scorzelli, C.J., Borrego, F., and Coligan, J.E. (1997). NKG2A complexed with CD94 defines a novel inhibitory natural killer cell receptor. *J. Exp. Med.* *185*, 795–800.
- Brown, M.H., Boles, K., van der Merwe, P.A., Kumar, V., Mathew, P.A., and Barclay, A.N. (1998). 2B4, the natural killer and T cell immunoglobulin superfamily surface protein, is a ligand for CD48. *J. Exp. Med.* *188*, 2083–2090.
- Bruijnesteijn, J., Wiel, M.K.H. van der, Swelsen, W.T.N., Otting, N., Vos-Rouweler, A.J.M. de, Elferink, D., Doxiadis, G.G., Claas, F.H.J., Lardy, N.M., Groot, N.G. de, et al. (2018). Human and Rhesus Macaque KIR Haplotypes Defined by Their Transcriptomes. *J. Immunol.* *ji1701480*.
- Brunstein, C.G., Wagner, J.E., Weisdorf, D.J., Cooley, S., Noreen, H., Barker, J.N., DeFor, T., Verneris, M.R., Blazar, B.R., and Miller, J.S. (2009). Negative effect of KIR alloreactivity in recipients of umbilical cord blood transplant depends on transplantation conditioning intensity. *Blood* *113*, 5628–5634.

- Bryceson, Y.T., Ljunggren, H.-G., and Long, E.O. (2009). Minimal requirement for induction of natural cytotoxicity and intersection of activation signals by inhibitory receptors. *Blood* *114*, 2657–2666.
- Buhler, S., Di Cristofaro, J., Frassati, C., Basire, A., Galicher, V., Chiaroni, J., and Picard, C. (2009). High levels of molecular polymorphism at the KIR2DL4 locus in French and Congolese populations: impact for anthropology and clinical studies. *Hum. Immunol.* *70*, 953–959.
- Bultitude, W.P., Gymer, A.W., Robinson, J., Mayor, N.P., and Marsh, S.G.E. KIR2DL1 allele sequence extensions and discovery of 2DL1\*0010102 and 2DL1\*0010103 alleles by DNA sequencing. *HLA* *91*, 546–547.
- Bunce, M., and Passey, B. (2013). HLA typing by sequence-specific primers. *Methods Mol. Biol. Clifton NJ* *1034*, 147–159.
- Caligiuri, M.A. (2008). Human natural killer cells. *Blood* *112*, 461–469.
- Carapito, R., Aouadi, I., Ilias, W., and Bahram, S. (2017). Natural Killer Group 2, Member D/NKG2D Ligands in Hematopoietic Cell Transplantation. *Front. Immunol.* *8*.
- Carotta, S. (2016). Targeting NK Cells for Anticancer Immunotherapy: Clinical and Preclinical Approaches. *Front. Immunol.* *7*.
- Carr, W.H., Pando, M.J., and Parham, P. (2005). KIR3DL1 polymorphisms that affect NK cell inhibition by HLA-Bw4 ligand. *J. Immunol. Baltim. Md* *175*, 5222–5229.
- Carrega, P., Pezzino, G., Queirolo, P., Bonaccorsi, I., Falco, M., Vita, G., Pende, D., Misefari, A., Moretta, A., Mingari, M.C., et al. (2009). Susceptibility of human melanoma cells to autologous natural killer (NK) cell killing: HLA-related effector mechanisms and role of unlicensed NK cells. *PloS One* *4*, e8132.
- Carson, W.E., Fehniger, T.A., Haldar, S., Eckhert, K., Lindemann, M.J., Lai, C.F., Croce, C.M., Baumann, H., and Caligiuri, M.A. (1997). A potential role for interleukin-15 in the regulation of human natural killer cell survival. *J. Clin. Invest.* *99*, 937–943.
- Cella, M., Longo, A., Ferrara, G.B., Strominger, J.L., and Colonna, M. (1994). NK3-specific natural killer cells are selectively inhibited by Bw4-positive HLA alleles with isoleucine 80. *J. Exp. Med.* *180*, 1235–1242.
- Cerboni, C., Neri, F., Casartelli, N., Zingoni, A., Cosman, D., Rossi, P., Santoni, A., and Doria, M. (2007). Human immunodeficiency virus 1 Nef protein downmodulates the ligands of the activating receptor NKG2D and inhibits natural killer cell-mediated cytotoxicity. *J. Gen. Virol.* *88*, 242–250.
- Cerwenka, A., and Lanier, L.L. (2016). Natural killer cell memory in infection, inflammation and cancer. *Nat. Rev. Immunol.* *16*, 112–123.
- Chabannon, C., Mfarrej, B., Guia, S., Ugolini, S., Devillier, R., Blaise, D., Vivier, E., and Calmels, B. (2016). Manufacturing Natural Killer Cells as Medicinal Products. *Front. Immunol.* *7*, 504.

- Chalupny, N.J., Rein-Weston, A., Dosch, S., and Cosman, D. (2006). Down-regulation of the NKG2D ligand MICA by the human cytomegalovirus glycoprotein UL142. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *346*, 175–181.
- Champsaur, M., and Lanier, L.L. (2010). Effect of NKG2D ligand expression on host immune responses. *Immunol. Rev.* *235*, 267–285.
- Chan, H.-W., Kurago, Z.B., Stewart, C.A., Wilson, M.J., Martin, M.P., Mace, B.E., Carrington, M., Trowsdale, J., and Lutz, C.T. (2003). DNA methylation maintains allele-specific KIR gene expression in human natural killer cells. *J. Exp. Med.* *197*, 245–255.
- Chan, H.-W., Miller, J.S., Moore, M.B., and Lutz, C.T. (2005). Epigenetic control of highly homologous killer Ig-like receptor gene alleles. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *175*, 5966–5974.
- Chandran, V., Bull, S.B., Pellett, F.J., Ayearst, R., Pollock, R.A., and Gladman, D.D. (2014). Killer-cell immunoglobulin-like receptor gene polymorphisms and susceptibility to psoriatic arthritis. *Rheumatol. Oxf. Engl.* *53*, 233–239.
- Chantakru, S., Miller, C., Roach, L.E., Kuziel, W.A., Maeda, N., Wang, W.-C., Evans, S.S., and Croy, B.A. (2002). Contributions from self-renewal and trafficking to the uterine NK cell population of early pregnancy. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *168*, 22–28.
- Chao, K.H., Wu, M.Y., Chen, C.D., Yang, J.H., Yang, Y.S., and Ho, H.N. (1999). The expression of killer cell inhibitory receptors on natural killer cells and activation status of CD4+ and CD8+ T cells in the decidua of normal and abnormal early pregnancies. *Hum. Immunol.* *60*, 791–797.
- Charles A Janeway, J., Travers, P., Walport, M., and Shlomchik, M.J. (2001). The major histocompatibility complex and its functions. *Immunobiol. Immune Syst. Health Dis.* 5th Ed.
- Chen, S., Li, J., Li, Q., and Wang, Z. (2016). Bispecific antibodies in cancer immunotherapy. *Hum. Vaccines Immunother.* *12*, 2491–2500.
- Cheng, M., Chen, Y., Xiao, W., Sun, R., and Tian, Z. (2013). NK cell-based immunotherapy for malignant diseases. *Cell. Mol. Immunol.* *10*, 230–252.
- Chevaliez, S., and Pawlotsky, J.-M. (2012). Virology of hepatitis C virus infection. *Best Pract. Res. Clin. Gastroenterol.* *26*, 381–389.
- Chevallier, P., Peterlin, P., Garnier, A., Mahe, B., Dubruille, V., Blin, N., Voltaire, M., Gastinne, T., Touzeau, C., Gouill, S.L., et al. (2015). Second-Generation Relative Donor for T-Replete Haplo-Identical Allogeneic Stem Cell Transplantation with High-Dose Post-Transplant Cyclophosphamide: Towards Disappearance of the HLA Barrier. *Blood* *126*, 5519–5519.
- Chewning, J.H., Gudme, C.N., Hsu, K.C., Selvakumar, A., and Dupont, B. (2007). KIR2DS1-positive NK cells mediate alloresponse against the C2 HLA-KIR ligand group in vitro. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *179*, 854–868.
- Childs, R.W., and Carlsten, M. (2015). Therapeutic approaches to enhance natural killer cell cytotoxicity against cancer: the force awakens. *Nat. Rev. Drug Discov.* *14*, 487–498.

- Cho, D., Shook, D.R., Shimasaki, N., Chang, Y.-H., Fujisaki, H., and Campana, D. (2010). Cytotoxicity of activated natural killer cells against pediatric solid tumors. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* *16*, 3901–3909.
- Cicone, E., Pende, D., Viale, O., Donato, C.D., Tripodi, G., Orengo, A.M., Guardiola, J., Moretta, A., and Moretta, L. (1992). Evidence of a natural killer (NK) cell repertoire for (allo) antigen recognition: definition of five distinct NK-determined allospecificities in humans. *J. Exp. Med.* *175*, 709–718.
- Cichocki, F., Hanson, R.J., Lenvik, T., Pitt, M., McCullar, V., Li, H., Anderson, S.K., and Miller, J.S. (2009). The transcription factor c-Myc enhances KIR gene transcription through direct binding to an upstream distal promoter element. *Blood* *113*, 3245–3253.
- Cichocki, F., Miller, J.S., and Anderson, S.K. (2011). Killer immunoglobulin-like receptor transcriptional regulation: a fascinating dance of multiple promoters. *J. Innate Immun.* *3*, 242–248.
- Clynes, R.A., Towers, T.L., Presta, L.G., and Ravetch, J.V. (2000). Inhibitory Fc receptors modulate in vivo cytotoxicity against tumor targets. *Nat. Med.* *6*, 443–446.
- Colonna, M., and Samaridis, J. (1995). Cloning of immunoglobulin-superfamily members associated with HLA-C and HLA-B recognition by human natural killer cells. *Science* *268*, 405–408.
- Colonna, M., Borsellino, G., Falco, M., Ferrara, G.B., and Strominger, J.L. (1993). HLA-C is the inhibitory ligand that determines dominant resistance to lysis by NK1- and NK2-specific natural killer cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *90*, 12000–12004.
- Colonna, M., Navarro, F., Bellón, T., Llano, M., García, P., Samaridis, J., Angman, L., Cella, M., and López-Botet, M. (1997). A common inhibitory receptor for major histocompatibility complex class I molecules on human lymphoid and myelomonocytic cells. *J. Exp. Med.* *186*, 1809–1818.
- Colonna, M., Nakajima, H., Navarro, F., and López-Botet, M. (1999). A novel family of Ig-like receptors for HLA class I molecules that modulate function of lymphoid and myeloid cells. *J. Leukoc. Biol.* *66*, 375–381.
- Colucci, F., Caligiuri, M.A., and Di Santo, J.P. (2003). What does it take to make a natural killer? *Nat. Rev. Immunol.* *3*, 413–425.
- Conlon, K.C., Lugli, E., Welles, H.C., Rosenberg, S.A., Fojo, A.T., Morris, J.C., Fleisher, T.A., Dubois, S.P., Perera, L.P., Stewart, D.M., et al. (2015). Redistribution, hyperproliferation, activation of natural killer cells and CD8 T cells, and cytokine production during first-in-human clinical trial of recombinant human interleukin-15 in patients with cancer. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* *33*, 74–82.
- Cooley, S., Weisdorf, D.J., Guethlein, L.A., Klein, J.P., Wang, T., Le, C.T., Marsh, S.G.E., Geraghty, D., Spellman, S., Haagenson, M.D., et al. (2010). Donor selection for natural killer cell receptor genes leads to superior survival after unrelated transplantation for acute myelogenous leukemia. *Blood* *116*, 2411–2419.

- Cooley, S., Verneris, M.R., Curtsinger, J., McKenna, D., Weisdorf, D.J., Blazar, B.R., Waldmann, T.A., and Miller, J.S. (2012). Recombinant Human IL-15 Promotes in Vivo Expansion of Adoptively Transferred NK Cells in a First-in-Human Phase I Dose Escalation Study in Patients with AML. *Blood* 120, 894–894.
- Cooper, M.A., Fehniger, T.A., Turner, S.C., Chen, K.S., Ghaheri, B.A., Ghayur, T., Carson, W.E., and Caligiuri, M.A. (2001). Human natural killer cells: a unique innate immunoregulatory role for the CD56(bright) subset. *Blood* 97, 3146–3151.
- Cosgrove, C., Berger, C.T., Kroy, D.C., Cheney, P.C., Ghebremichael, M., Aneja, J., Tomlinson, M., Kim, A.Y., Lauer, G.M., and Alter, G. (2014). Chronic HCV infection affects the NK cell phenotype in the blood more than in the liver. *PloS One* 9, e105950.
- Crum, K.A., Logue, S.E., Curran, M.D., and Middleton, D. (2000). Development of a PCR-SSOP approach capable of defining the natural killer cell inhibitory receptor (KIR) gene sequence repertoires. *Tissue Antigens* 56, 313–326.
- Curti, A., Ruggeri, L., D’Addio, A., Bontadini, A., Dan, E., Motta, M.R., Trabanelli, S., Giudice, V., Urbani, E., Martinelli, G., et al. (2011). Successful transfer of alloreactive haploidentical KIR ligand-mismatched natural killer cells after infusion in elderly high risk acute myeloid leukemia patients. *Blood* 118, 3273–3279.
- Cuturi, M.C. (1989). Production of hematopoietic colony-stimulating factors by human natural killer cells. *J. Exp. Med.* 169, 569–583.
- Dausset, J., and Brecy, H. (1957). Identical Nature of the Leucocyte Antigens detectable in Monozygotic Twins by means of Immune Iso-Leuco-agglutinins. *Nature* 180, 1430.
- David, G., Morvan, M., Gagne, K., Kerdudou, N., Willem, C., Devys, A., Bonneville, M., Folléa, G., Bignon, J.-D., and Retière, C. (2009). Discrimination between the main activating and inhibitory killer cell immunoglobulin-like receptor positive natural killer cell subsets using newly characterized monoclonal antibodies. *Immunology* 128, 172–184.
- David, G., Djaoud, Z., Willem, C., Legrand, N., Rettman, P., Gagne, K., Cesbron, A., and Retière, C. (2013). Large spectrum of HLA-C recognition by killer Ig-like receptor (KIR)2DL2 and KIR2DL3 and restricted C1 SPECIFICITY of KIR2DS2: dominant impact of KIR2DL2/KIR2DS2 on KIR2D NK cell repertoire formation. *J. Immunol. Baltim. Md* 1950 191, 4778–4788.
- Davies, G.E., Locke, S.M., Wright, P.W., Li, H., Hanson, R.J., Miller, J.S., and Anderson, S.K. (2007). Identification of bidirectional promoters in the human KIR genes. *Genes Immun.* 8, 245–253.
- Davies, J.O.J., Stringaris, K., Barrett, A.J., and Rezvani, K. (2014). Opportunities and limitations of natural killer cells as adoptive therapy for malignant disease. *Cytotherapy* 16, 1453–1466.
- Davies, S.M., Ruggieri, L., DeFor, T., Wagner, J.E., Weisdorf, D.J., Miller, J.S., Velardi, A., and Blazar, B.R. (2002). Evaluation of KIR ligand incompatibility in mismatched unrelated donor hematopoietic transplants. Killer immunoglobulin-like receptor. *Blood* 100, 3825–3827.



Davis, Z.B., Felices, M., Verneris, M.R., and Miller, J.S. (2015). Natural Killer Cell Adoptive Transfer Therapy: Exploiting the First Line of Defense Against Cancer. *Cancer J. Sudbury Mass* 21, 486–491.

Delahaye, N.F., Rusakiewicz, S., Martins, I., Ménard, C., Roux, S., Lyonnet, L., Paul, P., Sarabi, M., Chaput, N., Semeraro, M., et al. (2011). Alternatively spliced NKp30 isoforms affect the prognosis of gastrointestinal stromal tumors. *Nat. Med.* 17, 700–707.

Delaney, M., and Ballen, K.K. (2010). The role of HLA in umbilical cord blood transplantation. *Best Pract. Res. Clin. Haematol.* 23, 179–187.

Della Chiesa, M., Falco, M., Podestà, M., Locatelli, F., Moretta, L., Frassoni, F., and Moretta, A. (2012). Phenotypic and functional heterogeneity of human NK cells developing after umbilical cord blood transplantation: a role for human cytomegalovirus? *Blood* 119, 399–410.

Della Chiesa, M., Falco, M., Muccio, L., Bertaina, A., Locatelli, F., and Moretta, A. (2013). Impact of HCMV Infection on NK Cell Development and Function after HSCT. *Front. Immunol.* 4.

Deng, X., Terunuma, H., Nieda, M., Xiao, W., and Nicol, A. (2012). Synergistic cytotoxicity of ex vivo expanded natural killer cells in combination with monoclonal antibody drugs against cancer cells. *Int. Immunopharmacol.* 14, 593–605.

Denis, L., Sivula, J., Gourraud, P.-A., Kerdudou, N., Chout, R., Ricard, C., Moisan, J.-P., Gagne, K., Partanen, J., and Bignon, J.-D. (2005). Genetic diversity of KIR natural killer cell markers in populations from France, Guadeloupe, Finland, Senegal and Réunion. *Tissue Antigens* 66, 267–276.

Dennehy, K.M., Klimosch, S.N., and Steinle, A. (2011). Cutting edge: NKp80 uses an atypical hemi-ITAM to trigger NK cytotoxicity. *J. Immunol. Baltim. Md* 1950 186, 657–661.

Djaoud, Z., David, G., Bressollette, C., Willem, C., Rettman, P., Gagne, K., Legrand, N., Mehlal, S., Cesbron, A., Imbert-Marcille, B.-M., et al. (2013). Amplified NKG2C+ NK cells in cytomegalovirus (CMV) infection preferentially express killer cell Ig-like receptor 2DL: functional impact in controlling CMV-infected dendritic cells. *J. Immunol. Baltim. Md* 1950 191, 2708–2716.

Döhning, C., Samaridis, J., and Colonna, M. (1996). Alternatively spliced forms of human killer inhibitory receptors. *Immunogenetics* 44, 227–230.

Dolstra, H., Roeven, M.W.H., Spanholtz, J., Hangalapura, B.N., Tordoir, M., Maas, F., Leenders, M., Bohme, F., Kok, N., Trilsbeek, C., et al. (2017). Successful Transfer of Umbilical Cord Blood CD34+ Hematopoietic Stem and Progenitor-derived NK Cells in Older Acute Myeloid Leukemia Patients. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* 23, 4107–4118.

Dourmashkin, R.R., Deteix, P., Simone, C.B., and Henkart, P. (1980). Electron microscopic demonstration of lesions in target cell membranes associated with antibody-dependent cellular cytotoxicity. *Clin. Exp. Immunol.* 42, 554–560.

Dubois, V., Brignier, A., Elsermans, V., Gagne, K., Kennel, A., Pedron, B., Picard, C., Ravinet, A., Varlet, P., Cesbron, A., et al. (2016). [Polymorphism in HLA and KIR genes and the impact on hematopoietic stem cell transplantation outcomes and unrelated donor selection: Guidelines

from the Francophone Society of Bone Marrow Transplantation and Cellular Therapy (SFGM-TC)]. *Bull. Cancer (Paris)* 103, S243–S247.

Dunphy, S.E., Guinan, K.J., Chorcora, C.N., Jayaraman, J., Traherne, J.A., Trowsdale, J., Pende, D., Middleton, D., and Gardiner, C.M. (2015). 2DL1, 2DL2 and 2DL3 all contribute to KIR phenotype variability on human NK cells. *Genes Immun.* 16, 301–310.

Eagle, R.A., and Trowsdale, J. (2007). Promiscuity and the single receptor: NKG2D. *Nat. Rev. Immunol.* 7, 737–744.

Elliott, J.M., and Yokoyama, W.M. (2011). Unifying concepts of MHC-dependent natural killer cell education. *Trends Immunol.* 32, 364–372.

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

Esin, S., Counoupas, C., Aulicino, A., Brancatisano, F.L., Maisetta, G., Bottai, D., Di Luca, M., Florio, W., Campa, M., and Batoni, G. (2013). Interaction of Mycobacterium tuberculosis cell wall components with the human natural killer cell receptors NKp44 and Toll-like receptor 2. *Scand. J. Immunol.* 77, 460–469.

Esplin, M.S., Fausett, M.B., Fraser, A., Kerber, R., Mineau, G., Carrillo, J., and Varner, M.W. (2001). Paternal and maternal components of the predisposition to preeclampsia. *N. Engl. J. Med.* 344, 867–872.

Falco, M., Romeo, E., Marcenaro, S., Martini, S., Vitale, M., Bottino, C., Mingari, M.C., Moretta, L., Moretta, A., and Pende, D. (2010). Combined genotypic and phenotypic killer cell Ig-like receptor analyses reveal KIR2DL3 alleles displaying unexpected monoclonal antibody reactivity: identification of the amino acid residues critical for staining. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 185, 433–441.

Fan, Q.R., Long, E.O., and Wiley, D.C. (2001). Crystal structure of the human natural killer cell inhibitory receptor KIR2DL1-HLA-Cw4 complex. *Nat. Immunol.* 2, 452–460.

Fanger, N.A., Cosman, D., Peterson, L., Braddy, S.C., Maliszewski, C.R., and Borges, L. (1998). The MHC class I binding proteins LIR-1 and LIR-2 inhibit Fc receptor-mediated signaling in monocytes. *Eur. J. Immunol.* 28, 3423–3434.

Farag, S.S., Bacigalupo, A., Eapen, M., Hurley, C., Dupont, B., Caligiuri, M.A., Boudreau, C., Nelson, G., Oudshoorn, M., van Rood, J., et al. (2006). The effect of KIR ligand incompatibility on the outcome of unrelated donor transplantation: a report from the center for international blood and marrow transplant research, the European blood and marrow transplant registry, and the Dutch registry. *Biol. Blood Marrow Transplant. J. Am. Soc. Blood Marrow Transplant.* 12, 876–884.

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

- Fauriat, C., Long, E.O., Ljunggren, H.-G., and Bryceson, Y.T. (2010b). Regulation of human NK-cell cytokine and chemokine production by target cell recognition. *Blood* *115*, 2167–2176.
- Felices, M., Ankarlo, D.E.M., Lenvik, T.R., Nelson, H.H., Blazar, B.R., Verneris, M.R., and Miller, J.S. (2014). Notch signaling at later stages of Natural Killer cell development enhances KIR expression and functional maturation. *J. Immunol. Baltim. Md* *193*, 3344–3354.
- Feng, M.-L., Ji, Y., Ma, J., Lu, Q., Ji, Y.-H., Zhang, G.-L., and Yang, Y. (2001). [Typing of HLA-AB by Reverse PCR-SSOP and Clinical Application]. *Zhongguo Shi Yan Xue Ye Xue Za Zhi* *9*, 359–362.
- Ferlazzo, G., Thomas, D., Lin, S.-L., Goodman, K., Morandi, B., Muller, W.A., Moretta, A., and Münz, C. (2004a). The abundant NK cells in human secondary lymphoid tissues require activation to express killer cell Ig-like receptors and become cytolytic. *J. Immunol. Baltim. Md* *172*, 1455–1462.
- Ferlazzo, G., Pack, M., Thomas, D., Paludan, C., Schmid, D., Strowig, T., Bougras, G., Muller, W.A., Moretta, L., and Münz, C. (2004b). Distinct roles of IL-12 and IL-15 in human natural killer cell activation by dendritic cells from secondary lymphoid organs. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *101*, 16606–16611.
- Ferrini, S., Miescher, S., Zocchi, M.R., von Fliedner, V., and Moretta, A. (1987). Phenotypic and functional characterization of recombinant interleukin 2 (rIL 2)-induced activated killer cells: analysis at the population and clonal levels. *J. Immunol. Baltim. Md* *138*, 1297–1302.
- Flores, A.C., Marcos, C.Y., Paladino, N., Arruvito, L., Williams, F., Middleton, D., and Fainboim, L. (2007). KIR receptors and HLA-C in the maintenance of pregnancy. *Tissue Antigens* *69 Suppl 1*, 112–113.
- Floros, T., and Tarhini, A.A. (2015). Anticancer Cytokines: Biology and Clinical Effects of Interferon- $\alpha$ 2, Interleukin (IL)-2, IL-15, IL-21, and IL-12. *Semin. Oncol.* *42*, 539–548.
- Foley, B., Cooley, S., Verneris, M.R., Pitt, M., Curtsinger, J., Luo, X., Lopez-Vergès, S., Lanier, L.L., Weisdorf, D., and Miller, J.S. (2012). Cytomegalovirus reactivation after allogeneic transplantation promotes a lasting increase in educated NKG2C<sup>+</sup> natural killer cells with potent function. *Blood* *119*, 2665–2674.
- Foley, B.A., De Santis, D., Van Beelen, E., Lathbury, L.J., Christiansen, F.T., and Witt, C.S. (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.
- Frassati, C., Touinssi, M., Picard, C., Segura, M., Galicher, V., Papa, K., Gagne, K., Vivier, E., Degioanni, A., Böetsch, G., et al. (2006). Distribution of killer-cell immunoglobulin-like receptor (KIR) in Comoros and Southeast France. *Tissue Antigens* *67*, 356–367.
- Freud, A.G., and Caligiuri, M.A. (2006). Human natural killer cell development. *Immunol. Rev.* *214*, 56–72.
- Freud, A.G., Yokohama, A., Becknell, B., Lee, M.T., Mao, H.C., Ferketich, A.K., and Caligiuri, M.A. (2006). Evidence for discrete stages of human natural killer cell differentiation in vivo. *J. Exp. Med.* *203*, 1033–1043.

Freud, A.G., Keller, K.A., Scoville, S.D., Mundy-Bosse, B.L., Cheng, S., Youssef, Y., Hughes, T., Zhang, X., Mo, X., Porcu, P., et al. (2016). NKp80 Defines a Critical Step during Human Natural Killer Cell Development. *Cell Rep.* *16*, 379–391.

Fuchs, A., and Colonna, M. (2006). The role of NK cell recognition of nectin and nectin-like proteins in tumor immunosurveillance. *Semin. Cancer Biol.* *16*, 359–366.

Gagne, K., Brizard, G., Gueglio, B., Milpied, N., Herry, P., Bonneville, F., Chéneau, M.-L., Schleinitz, N., Cesbron, A., Folléa, G., et al. (2002). Relevance of KIR gene polymorphisms in bone marrow transplantation outcome. *Hum. Immunol.* *63*, 271–280.

Gagne, K., Busson, M., Balere-Appert, M.L., Absi, L., Jollet, I., Bignon, J.-D., Bois, M., Dormoy, A., Dubois, V., Gebuhrer, L., et al. (2007). Relevance of KIR gene matching in unrelated hematopoietic stem cell transplantations. *Tissue Antigens* *69 Suppl 1*, 118–122.

Gagne, K., Busson, M., Bignon, J.-D., Balère-Appert, M.-L., Loiseau, P., Dormoy, A., Dubois, V., Perrier, P., Jollet, I., Bois, M., et al. (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. J. Am. Soc. Blood Marrow Transplant.* *15*, 1366–1375.

Gagne, K., Willem, C., Legrand, N., Djaoud, Z., David, G., Rettman, P., Bressollette-Bodin, C., Senitzer, D., Esbelin, J., Cesbron-Gautier, A., et al. (2013). Both the nature of KIR3DL1 alleles and the KIR3DL1/S1 allele combination affect the KIR3DL1 NK-cell repertoire in the French population. *Eur. J. Immunol.* *43*, 1085–1098.

Garcia-Beltran, W.F., Hölzemer, A., Martrus, G., Chung, A.W., Pacheco, Y., Simoneau, C.R., Rucevic, M., Lamothe-Molina, P.A., Pertel, T., Kim, T.-E., et al. (2016). Open conformers of HLA-F are high-affinity ligands of the activating NK-cell receptor KIR3DS1. *Nat. Immunol.* *17*, 1067–1074.

Garcia-Sanz, J.A., MacDonald, H.R., Jenne, D.E., Tschopp, J., and Nabholz, M. (1990). Cell specificity of granzyme gene expression. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *145*, 3111–3118.

Gardiner, C.M., Guethlein, L.A., Shilling, H.G., Pando, M., Carr, W.H., Rajalingam, R., Vilches, C., and Parham, P. (2001). Different NK Cell Surface Phenotypes Defined by the DX9 Antibody Are Due to KIR3DL1 Gene Polymorphism. *J. Immunol.* *166*, 2992–3001.

Gasteiger, G., Fan, X., Dikiy, S., Lee, S.Y., and Rudensky, A.Y. (2015). Tissue residency of innate lymphoid cells in lymphoid and nonlymphoid organs. *Science* *350*, 981–985.

Gendzekhadze, K., Norman, P.J., Abi-Rached, L., Graef, T., Moesta, A.K., Layrisse, Z., and Parham, P. (2009). Co-evolution of KIR2DL3 with HLA-C in a human population retaining minimal essential diversity of KIR and HLA class I ligands. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *106*, 18692–18697.

Gergely, J., Pecht, I., and Sármay, G. (1999). Immunoreceptor tyrosine-based inhibition motif-bearing receptors regulate the immunoreceptor tyrosine-based activation motif-induced activation of immune competent cells. *Immunol. Lett.* *68*, 3–15.

Germain, C., Meier, A., Jensen, T., Knapnougél, P., Poupon, G., Lazzari, A., Neisig, A., Håkansson, K., Dong, T., Wagtman, N., et al. (2011). Induction of lectin-like transcript 1

(LLT1) protein cell surface expression by pathogens and interferon- $\gamma$  contributes to modulate immune responses. *J. Biol. Chem.* 286, 37964–37975.

Ghadially, H., Ohana, M., Elboim, M., Gazit, R., Gur, C., Nagler, A., and Mandelboim, O. (2014). NK Cell Receptor NKp46 Regulates Graft-versus-Host Disease. *Cell Rep.* 7, 1809–1814.

Giebel, S., Locatelli, F., Lamparelli, T., Velardi, A., Davies, S., Frumento, G., Maccario, R., Bonetti, F., Wojnar, J., Martinetti, M., et al. (2003). Survival advantage with KIR ligand incompatibility in hematopoietic stem cell transplantation from unrelated donors. *Blood* 102, 814–819.

Gleason, M.K., Verneris, M.R., Todhunter, D.A., Zhang, B., McCullar, V., Zhou, S.X., Panoskaltis-Mortari, A., Weiner, L.M., Vallera, D.A., and Miller, J.S. (2012). Bispecific and trisppecific killer cell engagers directly activate human NK cells through CD16 signaling and induce cytotoxicity and cytokine production. *Mol. Cancer Ther.* 11, 2674–2684.

Godal, R., Bachanova, V., Gleason, M., McCullar, V., Yun, G.H., Cooley, S., Verneris, M.R., McGlave, P.B., and Miller, J.S. (2010). Natural killer cell killing of acute myelogenous leukemia and acute lymphoblastic leukemia blasts by killer cell immunoglobulin-like receptor-negative natural killer cells after NKG2A and LIR-1 blockade. *Biol. Blood Marrow Transplant. J. Am. Soc. Blood Marrow Transplant.* 16, 612–621.

Golden-Mason, L., and Rosen, H.R. (2013). Natural killer cells: multifaceted players with key roles in hepatitis C immunity. *Immunol. Rev.* 255, 68–81.

Golden-Mason, L., Madrigal-Estebas, L., McGrath, E., Conroy, M.J., Ryan, E.J., Hegarty, J.E., O’Farrelly, C., and Doherty, D.G. (2008). Altered natural killer cell subset distributions in resolved and persistent hepatitis C virus infection following single source exposure. *Gut* 57, 1121–1128.

Gollob, J.A., Mier, J.W., Veenstra, K., McDermott, D.F., Clancy, D., Clancy, M., and Atkins, M.B. (2000). Phase I trial of twice-weekly intravenous interleukin 12 in patients with metastatic renal cell cancer or malignant melanoma: ability to maintain IFN-gamma induction is associated with clinical response. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* 6, 1678–1692.

Gómez-Lozano, N., Gardiner, C.M., Parham, P., and Vilches, C. (2002). Some human KIR haplotypes contain two KIR2DL5 genes: KIR2DL5A and KIR2DL5B. *Immunogenetics* 54, 314–319.

Gonzalez-Galarza, F.F., McCabe, A., Melo Dos Santos, E.J., Takeshita, L., Ghattaoraya, G., Jones, A.R., and Middleton, D. (2018). Allele Frequency Net Database. *Methods Mol. Biol. Clifton NJ* 1802, 49–62.

Graef, T., Moesta, A.K., Norman, P.J., Abi-Rached, L., Vago, L., Older Aguilar, A.M., Gleimer, M., Hammond, J.A., Guethlein, L.A., Bushnell, D.A., et al. (2009). KIR2DS4 is a product of gene conversion with KIR3DL2 that introduced specificity for HLA-A\*11 while diminishing avidity for HLA-C. *J. Exp. Med.* 206, 2557–2572.

- Granucci, F., Vizzardelli, C., Pavelka, N., Feau, S., Persico, M., Virzi, E., Rescigno, M., Moro, G., and Ricciardi-Castagnoli, P. (2001). Inducible IL-2 production by dendritic cells revealed by global gene expression analysis. *Nat. Immunol.* 2, 882–888.
- Granzin, M., Stojanovic, A., Miller, M., Childs, R., Huppert, V., and Cerwenka, A. (2016). Highly efficient IL-21 and feeder cell-driven ex vivo expansion of human NK cells with therapeutic activity in a xenograft mouse model of melanoma. *Oncoimmunology* 5, e1219007.
- Grewal, S.S., Barker, J.N., Davies, S.M., and Wagner, J.E. (2003). Unrelated donor hematopoietic cell transplantation: marrow or umbilical cord blood? *Blood* 101, 4233–4244.
- Gruen, J.R., and Weissman, S.M. (2001). Human MHC class III and IV genes and disease associations. *Front. Biosci. J. Virtual Libr.* 6, D960–972.
- Grzywacz, B., Kataria, N., Sikora, M., Oostendorp, R.A., Dzierzak, E.A., Blazar, B.R., Miller, J.S., and Verneris, M.R. (2006). Coordinated acquisition of inhibitory and activating receptors and functional properties by developing human natural killer cells. *Blood* 108, 3824–3833.
- Guma, M. (2006). Expansion of CD94/NKG2C<sup>+</sup> NK cells in response to human cytomegalovirus-infected fibroblasts. *Blood* 107, 3624–3631.
- Gumá, M., Angulo, A., Vilches, C., Gómez-Lozano, N., Malats, N., and López-Botet, M. (2004). Imprint of human cytomegalovirus infection on the NK cell receptor repertoire. *Blood* 104, 3664–3671.
- Gumperz, J.E., Litwin, V., Phillips, J.H., Lanier, L.L., and Parham, P. (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.
- Gur, C., Ibrahim, Y., Isaacson, B., Yamin, R., Abed, J., Gamliel, M., Enk, J., Bar-On, Y., Stanietsky-Kaynan, N., Copenhagen-Glazer, S., et al. (2015). Binding of the Fap2 Protein of *Fusobacterium nucleatum* to Human Inhibitory Receptor TIGIT Protects Tumors from Immune Cell Attack. *Immunity* 42, 344–355.
- Hamann, J., Montgomery, K.T., Lau, S., Kucherlapati, R., and van Lier, R.A. (1997). AICL: a new activation-induced antigen encoded by the human NK gene complex. *Immunogenetics* 45, 295–300.
- Hanash, A.M., Dudakov, J.A., Hua, G., O'Connor, M.H., Young, L.F., Singer, N.V., West, M.L., Jenq, R.R., Holland, A.M., Kappel, L.W., et al. (2012). Interleukin-22 protects intestinal stem cells from immune-mediated tissue damage and regulates sensitivity to graft versus host disease. *Immunity* 37, 339–350.
- Hanke, T., Takizawa, H., McMahon, C.W., Busch, D.H., Pamer, E.G., Miller, J.D., Altman, J.D., Liu, Y., Cado, D., Lemonnier, F.A., et al. (1999). Direct assessment of MHC class I binding by seven Ly49 inhibitory NK cell receptors. *Immunity* 11, 67–77.
- Hatzimichael, E., and Tuthill, M. (2010). Hematopoietic stem cell transplantation. *Stem Cells Cloning Adv. Appl.* 3, 105–117.
- He, Y., and Tian, Z. (2017). NK cell education via nonclassical MHC and non-MHC ligands. *Cell. Mol. Immunol.* 14, 321–330.

- He, Y., Peng, H., Sun, R., Wei, H., Ljunggren, H.-G., Yokoyama, W.M., and Tian, Z. (2017). Contribution of inhibitory receptor TIGIT to NK cell education. *J. Autoimmun.* *81*, 1–12.
- Held, W. (2012). Nonclassical NK cell education. *Nat. Immunol.* *13*, 1135–1137.
- Henkart, P.A., Millard, P.J., Reynolds, C.W., and Henkart, M.P. (1984). Cytolytic activity of purified cytoplasmic granules from cytotoxic rat large granular lymphocyte tumors. *J. Exp. Med.* *160*, 75–93.
- Herberman, R.B., Nunn, M.E., Holden, H.T., and Lavrin, D.H. Natural cytotoxic reactivity of mouse lymphoid cells against syngeneic and allogeneic tumors. II. Characterization of effector cells. *Int. J. Cancer* *16*, 230–239.
- Hiby, S.E., Walker, J.J., O’shaughnessy, K.M., Redman, C.W.G., Carrington, M., Trowsdale, J., and Moffett, A. (2004). Combinations of maternal KIR and fetal HLA-C genes influence the risk of preeclampsia and reproductive success. *J. Exp. Med.* *200*, 957–965.
- Hiby, S.E., Apps, R., Sharkey, A.M., Farrell, L.E., Gardner, L., Mulder, A., Claas, F.H., Walker, J.J., Redman, C.W., Redman, C.C., et al. (2010). Maternal activating KIRs protect against human reproductive failure mediated by fetal HLA-C2. *J. Clin. Invest.* *120*, 4102–4110.
- Hilton, H.G., Norman, P.J., Nemat-Gorgani, N., Goyos, A., Hollenbach, J.A., Henn, B.M., Gignoux, C.R., Guethlein, L.A., and Parham, P. (2015). Loss and Gain of Natural Killer Cell Receptor Function in an African Hunter-Gatherer Population. *PLoS Genet.* *11*, e1005439.
- Hirayasu, K., and Arase, H. (2015). Functional and genetic diversity of leukocyte immunoglobulin-like receptor and implication for disease associations. *J. Hum. Genet.* *60*, 703–708.
- Ho, M. (1990). Epidemiology of cytomegalovirus infections. *Rev. Infect. Dis.* *12 Suppl 7*, S701–710.
- Hoofnagle, J.H. (2002). Course and outcome of hepatitis C. *Hepatology* *36*, S21–29.
- Hornig, T., Bezbradica, J.S., and Medzhitov, R. (2007). NKG2D signaling is coupled to the interleukin 15 receptor signaling pathway. *Nat. Immunol.* *8*, 1345–1352.
- Horowitz, A., Djaoud, Z., Nemat-Gorgani, N., Blokhuis, J., Hilton, H.G., Béziat, V., Malmberg, K.-J., Norman, P.J., Guethlein, L.A., and Parham, P. (2016). Class I HLA haplotypes form two schools that educate NK cells in different ways. *Sci. Immunol.* *1*, eaag1672–eaag1672.
- Horton, R., Wilming, L., Rand, V., Lovering, R.C., Bruford, E.A., Khodiyar, V.K., Lush, M.J., Povey, S., Talbot, C.C., Wright, M.W., et al. (2004). Gene map of the extended human MHC. *Nat. Rev. Genet.* *5*, 889–899.
- Hosomichi, K., Shiina, T., Tajima, A., and Inoue, I. (2015). The impact of next-generation sequencing technologies on HLA research. *J. Hum. Genet.* *60*, 665–673.
- Hou, L., Chen, M., Steiner, N., Kariyawasam, K., Ng, J., and Hurley, C.K. (2012). Killer cell immunoglobulin-like receptors (KIR) typing by DNA sequencing. *Methods Mol. Biol.* Clifton NJ *882*, 431–468.

- Hou, L., Chen, M., Jiang, B., Kariyawasam, K., Ng, J., and Hurley, C.K. (2009). In contrast to other stimulatory natural killer cell immunoglobulin-like receptor loci, several KIR2DS5 alleles predominate in African Americans. *Hum. Immunol.* *70*, 733–737.
- Houchins, J.P., Yabe, T., McSherry, C., and Bach, F.H. (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*, 1017–1020.
- Hough, R., Danby, R., Russell, N., Marks, D., Veys, P., Shaw, B., Wynn, R., Vora, A., Mackinnon, S., Peggs, K.S., et al. (2016). Recommendations for a standard UK approach to incorporating umbilical cord blood into clinical transplantation practice: an update on cord blood unit selection, donor selection algorithms and conditioning protocols. *Br. J. Haematol.* *172*, 360–370.
- Hsu, K.C., Chida, S., Geraghty, D.E., and Dupont, B. (2002). The killer cell immunoglobulin-like receptor (KIR) genomic region: gene-order, haplotypes and allelic polymorphism. *Immunol. Rev.* *190*, 40–52.
- Hsu, K.C., Gooley, T., Malkki, M., Pinto-Agnello, C., Dupont, B., Bignon, J.-D., Bornhäuser, M., Christiansen, F., Gratwohl, A., Morishima, Y., et al. (2006). KIR ligands and prediction of relapse after unrelated donor hematopoietic cell transplantation for hematologic malignancy. *Biol. Blood Marrow Transplant. J. Am. Soc. Blood Marrow Transplant.* *12*, 828–836.
- Huang, Q.-S., Li, Q., Huang, Y., Shang, P., and Zhang, M.-J. (2008). [Expansion of human natural killer cells ex vivo]. *Xi Bao Yu Fen Zi Mian Yi Xue Za Zhi Chin. J. Cell. Mol. Immunol.* *24*, 1167–1169.
- Hudspeth, K., Silva-Santos, B., and Mavilio, D. (2013). Natural cytotoxicity receptors: broader expression patterns and functions in innate and adaptive immune cells. *Front. Immunol.* *4*, 69.
- Huhn, O., Chazara, O., Ivarsson, M.A., Retière, C., Venkatesan, T.C., Norman, P.J., Hilton, H.G., Jayaraman, J., Traherne, J.A., Trowsdale, J., et al. (2018). High-Resolution Genetic and Phenotypic Analysis of KIR2DL1 Alleles and Their Association with Pre-Eclampsia. *J. Immunol. Baltim. Md 1950.*
- Isernhagen, A., Malzahn, D., Viktorova, E., Elsner, L., Monecke, S., von Bonin, F., Kilisch, M., Wermuth, J.M., Walther, N., Balavarca, Y., et al. (2015). The MICA-129 dimorphism affects NKG2D signaling and outcome of hematopoietic stem cell transplantation. *EMBO Mol. Med.* *7*, 1480–1502.
- Ivarsson, M.A., Loh, L., Marquardt, N., Kekäläinen, E., Berglin, L., Björkström, N.K., Westgren, M., Nixon, D.F., and Michaëlsson, J. (2013). Differentiation and functional regulation of human fetal NK cells. *J. Clin. Invest.* *123*, 3889–3901.
- Jethava, Y.S., Sica, S., Savani, B., Socola, F., Jagasia, M., Mohty, M., Nagler, A., and Bacigalupo, A. (2017). Conditioning regimens for allogeneic hematopoietic stem cell transplants in acute myeloid leukemia. *Bone Marrow Transplant.* *52*, 1504–1511.
- Jiang, W., Johnson, C., Simecek, N., López-Álvarez, M.R., Di, D., Trowsdale, J., and Traherne, J.A. (2016). qKAT: a high-throughput qPCR method for KIR gene copy number and haplotype determination. *Genome Med.* *8*.



- Jochems, C., Hodge, J.W., Fantini, M., Fujii, R., Morillon, Y.M., Greiner, J.W., Padgett, M.R., Tritsch, S.R., Tsang, K.Y., Campbell, K.S., et al. (2016). An NK cell line (haNK) expressing high levels of granzyme and engineered to express the high affinity CD16 allele. *Oncotarget* 7, 86359–86373.
- Johansson, S., Johansson, M., Rosmaraki, E., Vahlne, G., Mehr, R., Salmon-Divon, M., Lemonnier, F., Kärre, K., and Höglund, P. (2005). Natural killer cell education in mice with single or multiple major histocompatibility complex class I molecules. *J. Exp. Med.* 201, 1145–1155.
- Johnson, D.R. (2000). Differential expression of human major histocompatibility class I loci: HLA-A, -B, and -C. *Hum. Immunol.* 61, 389–396.
- Joncker, N.T., Fernandez, N.C., Treiner, E., Vivier, E., and Raullet, D.H. (2009). NK Cell Responsiveness Is Tuned Commensurate with the Number of Inhibitory Receptors for Self-MHC Class I: The Rheostat Model. *J. Immunol.* 182, 4572–4580.
- Joyce, M.G., and Sun, P.D. (2011). The structural basis of ligand recognition by natural killer cell receptors. *J. Biomed. Biotechnol.* 2011, 203628.
- Kanakry, C.G., de Lima, M.J., and Luznik, L. (2015). Alternative Donor Allogeneic Hematopoietic Cell Transplantation for Acute Myeloid Leukemia. *Semin. Hematol.* 52, 232–242.
- Keir, M.E., Butte, M.J., Freeman, G.J., and Sharpe, A.H. (2008). PD-1 and its ligands in tolerance and immunity. *Annu. Rev. Immunol.* 26, 677–704.
- Kellner, C., Günther, A., Humpe, A., Repp, R., Klausz, K., Derer, S., Valerius, T., Ritgen, M., Brüggemann, M., van de Winkel, J.G., et al. (2016). Enhancing natural killer cell-mediated lysis of lymphoma cells by combining therapeutic antibodies with CD20-specific immunoligands engaging NKG2D or NKp30. *Oncoimmunology* 5, e1058459.
- Kessinger, A., Smith, D.M., Strandjord, S.E., Landmark, J.D., Dooley, D.C., Law, P., Coccia, P.F., Warkentin, P.I., Weisenburger, D.D., and Armitage, J.O. (1989). Allogeneic transplantation of blood-derived, T cell-depleted hemopoietic stem cells after myeloablative treatment in a patient with acute lymphoblastic leukemia. *Bone Marrow Transplant.* 4, 643–646.
- Khakoo, S.I., Thio, C.L., Martin, M.P., Brooks, C.R., Gao, X., Astemborski, J., Cheng, J., Goedert, J.J., Vlahov, D., Hilgartner, M., et al. (2004). HLA and NK cell inhibitory receptor genes in resolving hepatitis C virus infection. *Science* 305, 872–874.
- Khoury, I.F., Keating, M., Körbling, M., Przepiorka, D., Anderlini, P., O'Brien, S., Giralt, S., Ippoliti, C., von Wolff, B., Gajewski, J., et al. (1998). Transplant-lite: induction of graft-versus-malignancy using fludarabine-based nonablative chemotherapy and allogeneic blood progenitor-cell transplantation as treatment for lymphoid malignancies. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* 16, 2817–2824.
- Kidd, J.M., Sharpton, T.J., Bobo, D., Norman, P.J., Martin, A.R., Carpenter, M.L., Sikora, M., Gignoux, C.R., Nemat-Gorgani, N., Adams, A., et al. (2014). Exome capture from saliva produces high quality genomic and metagenomic data. *BMC Genomics* 15, 262.

- Kiessling, R., Klein, E., Pross, H., and Wigzell, H. (1975). "Natural" killer cells in the mouse. II. Cytotoxic cells with specificity for mouse Moloney leukemia cells. Characteristics of the killer cell. *Eur. J. Immunol.* *5*, 117–121.
- Kikuchi-Maki, A., Catina, T.L., and Campbell, K.S. (2005). Cutting edge: KIR2DL4 transduces signals into human NK cells through association with the Fc receptor gamma protein. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *174*, 3859–3863.
- Kim, S., Poursine-Laurent, J., Truscott, S.M., Lybarger, L., Song, Y.-J., Yang, L., French, A.R., Sunwoo, J.B., Lemieux, S., Hansen, T.H., et al. (2005). Licensing of natural killer cells by host major histocompatibility complex class I molecules. *Nature* *436*, 709–713.
- King, A., Burrows, T., and Loke, Y.W. (1996). Human uterine natural killer cells. *Nat. Immun.* *15*, 41–52.
- King, A., Allan, D.S., Bowen, M., Powis, S.J., Joseph, S., Verma, S., Hiby, S.E., McMichael, A.J., Loke, Y.W., and Braud, V.M. (2000a). HLA-E is expressed on trophoblast and interacts with CD94/NKG2 receptors on decidual NK cells. *Eur. J. Immunol.* *30*, 1623–1631.
- King, A., Burrows, T.D., Hiby, S.E., Bowen, J.M., Joseph, S., Verma, S., Lim, P.B., Gardner, L., Le Bouteiller, P., Ziegler, A., et al. (2000b). Surface expression of HLA-C antigen by human extravillous trophoblast. *Placenta* *21*, 376–387.
- Klimosch, S.N., Bartel, Y., Wiemann, S., and Steinle, A. (2013). Genetically coupled receptor-ligand pair NKp80-AICL enables autonomous control of human NK cell responses. *Blood* *122*, 2380–2389.
- Klingemann, H. (2014). Are natural killer cells superior CAR drivers? *Oncoimmunology* *3*, e28147.
- Knapp, S., Warshow, U., Hegazy, D., Brackenbury, L., Guha, I.N., Fowell, A., Little, A.-M., Alexander, G.J., Rosenberg, W.M.C., Cramp, M.E., et al. (2010). Consistent beneficial effects of killer cell immunoglobulin-like receptor 2DL3 and group 1 human leukocyte antigen-C following exposure to hepatitis C virus. *Hepatology* *51*, 1168–1175.
- Kobayashi, M., Fitz, L., Ryan, M., Hewick, R.M., Clark, S.C., Chan, S., Loudon, R., Sherman, F., Perussia, B., and Trinchieri, G. (1989). Identification and purification of natural killer cell stimulatory factor (NKSF), a cytokine with multiple biologic effects on human lymphocytes. *J. Exp. Med.* *170*, 827–845.
- Konjević, G., Mirjacić Martinović, K., Vuletić, A., Jurisić, V., and Spuzić, I. (2009). Distribution of several activating and inhibitory receptors on CD3-CD16+ NK cells and their correlation with NK cell function in healthy individuals. *J. Membr. Biol.* *230*, 113–123.
- Korde, N., Carlsten, M., Lee, M.-J., Minter, A., Tan, E., Kwok, M., Manasanch, E., Bhutani, M., Tagueja, N., Roschewski, M., et al. (2014). A phase II trial of pan-KIR2D blockade with IPH2101 in smoldering multiple myeloma. *Haematologica* *99*, e81–83.
- Krenger, W., Hill, G.R., and Ferrara, J.L. (1997). Cytokine cascades in acute graft-versus-host disease. *Transplantation* *64*, 553–558.

- Krueger, P.D., Lassen, M.G., Qiao, H., and Hahn, Y.S. (2011). Regulation of NK cell repertoire and function in the liver. *Crit. Rev. Immunol.* *31*, 43–52.
- Kruse, P.H., Matta, J., Ugolini, S., and Vivier, E. (2014). Natural cytotoxicity receptors and their ligands. *Immunol. Cell Biol.* *92*, 221–229.
- Krzewski, K., Gil-Krzewska, A., Nguyen, V., Peruzzi, G., and Coligan, J.E. (2013). LAMP1/CD107a is required for efficient perforin delivery to lytic granules and NK-cell cytotoxicity. *Blood* *121*, 4672–4683.
- Kulkarni, S., Martin, M.P., and Carrington, M. (2010). KIR genotyping by multiplex PCR-SSP. *Methods Mol. Biol. Clifton NJ* *612*, 365–375.
- Kulkarni, S., Savan, R., Qi, Y., Gao, X., Yuki, Y., Bass, S.E., Martin, M.P., Hunt, P., Deeks, S.G., Telenti, A., et al. (2011). Differential microRNA regulation of HLA-C expression and its association with HIV control. *Nature* *472*, 495–498.
- Kumar, A., Abbas, W., and Herbein, G. (2013). TNF and TNF receptor superfamily members in HIV infection: new cellular targets for therapy? *Mediators Inflamm.* *2013*, 484378.
- Kwon, D., Chwae, Y.J., Choi, I.H., Park, J.H., Kim, S.J., and Kim, J. (2000). Diversity of the p70 killer cell inhibitory receptor (KIR3DL) family members in a single individual. *Mol. Cells* *10*, 54–60.
- Lamm, L.U., Friedrich, U., Petersen, B., Jørgensen, J., Nielsen, J., Therkelsen, A.J., and Kissmeyer-Nielsen, F. (1974). Assignment of the Major Histocompatibility Complex to Chromosome No. 6 in a Family with a Pericentric Inversion. *Hum. Hered.* *24*, 273–284.
- Lanier, L.L. (2005). NK cell recognition. *Annu. Rev. Immunol.* *23*, 225–274.
- Lanier, L.L., Le, A.M., Civin, C.I., Loken, M.R., and Phillips, J.H. (1986). The relationship of CD16 (Leu-11) and Leu-19 (NKH-1) antigen expression on human peripheral blood NK cells and cytotoxic T lymphocytes. *J. Immunol. Baltim. Md* *1950* *136*, 4480–4486.
- Lanier, L.L., Testi, R., Bindl, J., and Phillips, J.H. (1989a). Identity of Leu-19 (CD56) leukocyte differentiation antigen and neural cell adhesion molecule. *J. Exp. Med.* *169*, 2233–2238.
- Lanier, L.L., Yu, G., and Phillips, J.H. (1989b). Co-association of CD3 zeta with a receptor (CD16) for IgG Fc on human natural killer cells. *Nature* *342*, 803–805.
- Lanier, L.L., Yu, G., and Phillips, J.H. (1991). Analysis of Fc gamma RIII (CD16) membrane expression and association with CD3 zeta and Fc epsilon RI-gamma by site-directed mutation. *J. Immunol. Baltim. Md* *1950* *146*, 1571–1576.
- Lanier, L.L., Corliss, B.C., Wu, J., Leong, C., and Phillips, J.H. (1998a). Immunoreceptor DAP12 bearing a tyrosine-based activation motif is involved in activating NK cells. *Nature* *391*, 703–707.
- Lanier, L.L., Corliss, B., Wu, J., and Phillips, J.H. (1998b). Association of DAP12 with activating CD94/NKG2C NK cell receptors. *Immunity* *8*, 693–701.

- Lapteva, N., Duret, A.G., Sun, J., Rollins, L.A., Huye, L.L., Fang, J., Dandekar, V., Mei, Z., Jackson, K., Vera, J., et al. (2012). Large-scale ex vivo expansion and characterization of natural killer cells for clinical applications. *Cytherapy* 14, 1131–1143.
- Lazetic, S., Chang, C., Houchins, J.P., Lanier, L.L., and Phillips, J.H. (1996). Human natural killer cell receptors involved in MHC class I recognition are disulfide-linked heterodimers of CD94 and NKG2 subunits. *J. Immunol. Baltim. Md* 157, 4741–4745.
- Lee, N., Llano, M., Carretero, M., Ishitani, A., Navarro, F., López-Botet, M., and Geraghty, D.E. (1998). HLA-E is a major ligand for the natural killer inhibitory receptor CD94/NKG2A. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 95, 5199–5204.
- LeMaout, J., Zafaranloo, K., Le Danff, C., and Carosella, E.D. (2005). HLA-G up-regulates ILT2, ILT3, ILT4, and KIR2DL4 in antigen presenting cells, NK cells, and T cells. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* 19, 662–664.
- Levin, A.M., Bates, D.L., Ring, A.M., Krieg, C., Lin, J.T., Su, L., Moraga, I., Raeber, M.E., Bowman, G.R., Novick, P., et al. (2012). Exploiting a natural conformational switch to engineer an interleukin-2 “superkine.” *Nature* 484, 529–533.
- Li, G.Y., Liu, Y.Y., Wu, K.L., and Tang, Z.H. (2018). A novel HLA-A\*24 allele, A\*24:231, was identified by sequence-based typing. *HLA*.
- Li, H., Pascal, V., Martin, M.P., Carrington, M., and Anderson, S.K. (2008). Genetic control of variegated KIR gene expression: polymorphisms of the bi-directional KIR3DL1 promoter are associated with distinct frequencies of gene expression. *PLoS Genet.* 4, e1000254.
- Li, H., Wright, P.W., McCullen, M., and Anderson, S.K. (2016). Characterization of KIR intermediate promoters reveals four promoter types associated with distinct expression patterns of KIR subtypes. *Genes Immun.* 17, 66–74.
- Li, Q., Ye, L.-J., Ren, H.-L., Huyan, T., Li, J., Shi, J.-L., and Huang, Q.-S. (2015a). Multiple effects of IL-21 on human NK cells in ex vivo expansion. *Immunobiology* 220, 876–888.
- Li, X., He, C., Liu, C., Ma, J., Ma, P., Cui, H., Tao, H., and Gao, B. (2015b). Expansion of NK cells from PBMCs using immobilized 4-1BBL and interleukin-21. *Int. J. Oncol.* 47, 335–342.
- Lieberman, J. (2003). The ABCs of granule-mediated cytotoxicity: new weapons in the arsenal. *Nat. Rev. Immunol.* 3, 361–370.
- Lin, Z., Kuroki, K., Kuse, N., Sun, X., Akahoshi, T., Qi, Y., Chikata, T., Naruto, T., Koyanagi, M., Murakoshi, H., et al. (2016). HIV-1 Control by NK Cells via Reduced Interaction between KIR2DL2 and HLA-C\*12:02/C\*14:03. *Cell Rep.* 17, 2210–2220.
- Litwin, V., Gumperz, J., Parham, P., Phillips, J.H., and Lanier, L.L. (1994). NKB1: a natural killer cell receptor involved in the recognition of polymorphic HLA-B molecules. *J. Exp. Med.* 180, 537–543.
- Liu, J., Xiao, Z., Ko, H.L., Shen, M., and Ren, E.C. (2014). Activating killer cell immunoglobulin-like receptor 2DS2 binds to HLA-A\*11. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 111, 2662–2667.

- Liu, L., Li, Y., Li, S., Hu, N., He, Y., Pong, R., Lin, D., Lu, L., and Law, M. (2012). Comparison of Next-Generation Sequencing Systems. *J. Biomed. Biotechnol.* 2012.
- Liu, S., Zhang, H., Li, M., Hu, D., Li, C., Ge, B., Jin, B., and Fan, Z. (2013). Recruitment of Grb2 and SHIP1 by the ITT-like motif of TIGIT suppresses granule polarization and cytotoxicity of NK cells. *Cell Death Differ.* 20, 456–464.
- Ljunggren, H.-G., and Kärre, K. (1990). In search of the “missing self”: MHC molecules and NK cell recognition. *Immunol. Today* 11, 237–244.
- Llibre, A., Garner, L., Partridge, A., Freeman, G.J., Klenerman, P., and Willberg, C.B. (2016). Expression of lectin-like transcript-1 in human tissues. *F1000Research* 5, 2929.
- Logan, T.F., and Robertson, M.J. (2006). Interleukins 18 and 21: biology, mechanisms of action, toxicity, and clinical activity. *Curr. Oncol. Rep.* 8, 114–119.
- Loman, N.J., Misra, R.V., Dallman, T.J., Constantinidou, C., Gharbia, S.E., Wain, J., and Pallen, M.J. (2012). Performance comparison of benchtop high-throughput sequencing platforms. *Nat. Biotechnol.* 30, 434–439.
- Long, E.O., Burshtyn, D.N., Clark, W.P., Peruzzi, M., Rajagopalan, S., Rojo, S., Wagtmann, N., and Winter, C.C. (1997). Killer cell inhibitory receptors: diversity, specificity, and function. *Immunol. Rev.* 155, 135–144.
- Long, E.O., Barber, D.F., Burshtyn, D.N., Faure, M., Peterson, M., Rajagopalan, S., Renard, V., Sandusky, M., Stebbins, C.C., Wagtmann, N., et al. (2001). Inhibition of natural killer cell activation signals by killer cell immunoglobulin-like receptors (CD158). *Immunol. Rev.* 181, 223–233.
- Lopez-Vergès, S., Milush, J.M., Schwartz, B.S., Pando, M.J., Jarjoura, J., York, V.A., Houchins, J.P., Miller, S., Kang, S.-M., Norris, P.J., et al. (2011). Expansion of a unique CD57<sup>+</sup>NKG2Chi natural killer cell subset during acute human cytomegalovirus infection. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 108, 14725–14732.
- Lowsky, R., Takahashi, T., Liu, Y.P., Dejbakhsh-Jones, S., Grumet, F.C., Shizuru, J.A., Laport, G.G., Stockerl-Goldstein, K.E., Johnston, L.J., Hoppe, R.T., et al. (2005). Protective conditioning for acute graft-versus-host disease. *N. Engl. J. Med.* 353, 1321–1331.
- Lu, H.K., Mitchell, A., Endoh, Y., Hampartzoumian, T., Huynh, O., Borges, L., Geczy, C., Bryant, K., and Tedla, N. (2012). LILRA2 selectively modulates LPS-mediated cytokine production and inhibits phagocytosis by monocytes. *PloS One* 7, e33478.
- Lunemann, S., Schöbel, A., Kah, J., Fittje, P., Hölzemer, A., Langeneckert, A.E., Hess, L., Poch, T., Martrus, G., Garcia-Beltran, W.F., et al. (2018). Interactions Between KIR3DS1 and HLA-F Activate Natural Killer Cells to Control HCV Replication in Cell Culture. *Gastroenterology*.
- Luteijn, R., Sciaranghella, G., van Lunzen, J., Nolting, A., Dugast, A.-S., Ghebremichael, M.S., Altfeld, M., and Alter, G. (2011). Early viral replication in lymph nodes provides HIV with a means by which to escape NK-cell-mediated control. *Eur. J. Immunol.* 41, 2729–2740.

- Lutz, C.T., Moore, M.B., Bradley, S., Shelton, B.J., and Lutgendorf, S.K. (2005). Reciprocal age related change in natural killer cell receptors for MHC class I. *Mech. Ageing Dev.* *126*, 722–731.
- Luznik, L., O'Donnell, P.V., Symons, H.J., Chen, A.R., Leffell, M.S., Zahurak, M., Gooley, T.A., Piantadosi, S., Kaup, M., Ambinder, R.F., et al. (2008). HLA-haploidentical bone marrow transplantation for hematologic malignancies using nonmyeloablative conditioning and high-dose, posttransplantation cyclophosphamide. *Biol. Blood Marrow Transplant. J. Am. Soc. Blood Marrow Transplant.* *14*, 641–650.
- Ma, J.K., Platt, M.Y., Eastham-Anderson, J., Shin, J.-S., and Mellman, I. (2012). MHC class II distribution in dendritic cells and B cells is determined by ubiquitin chain length. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *109*, 8820–8827.
- MacFarlane, A.W., Jillab, M., Plimack, E.R., Hudes, G.R., Uzzo, R.G., Litwin, S., Dulaimi, E., Al-Saleem, T., and Campbell, K.S. (2014). PD-1 expression on peripheral blood cells increases with stage in renal cell carcinoma patients and is rapidly reduced after surgical tumor resection. *Cancer Immunol. Res.* *2*, 320–331.
- Maggi, L., Santarlasci, V., Capone, M., Peired, A., Frosali, F., Crome, S.Q., Querci, V., Fambrini, M., Liotta, F., Levings, M.K., et al. (2010). CD161 is a marker of all human IL-17-producing T-cell subsets and is induced by RORC. *Eur. J. Immunol.* *40*, 2174–2181.
- Male, V., Hughes, T., McClory, S., Colucci, F., Caligiuri, M.A., and Moffett, A. (2010). Immature NK cells, capable of producing IL-22, are present in human uterine mucosa. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *185*, 3913–3918.
- Malmberg, K.-J., Beziat, V., and Ljunggren, H.-G. (2012). Spotlight on NKG2C and the human NK-cell response to CMV infection. *Eur. J. Immunol.* *42*, 3141–3145.
- Mancusi, A., Ruggeri, L., Urbani, E., Pierini, A., Massei, M.S., Carotti, A., Terenzi, A., Falzetti, F., Tosti, A., Topini, F., et al. (2015). Haploidentical hematopoietic transplantation from KIR ligand-mismatched donors with activating KIRs reduces nonrelapse mortality. *Blood* *125*, 3173–3182.
- Mandelboim, O., Reyburn, H.T., Valés-Gómez, M., Pazmany, L., Colonna, M., Borsellino, G., and Strominger, J.L. (1996). Protection from lysis by natural killer cells of group 1 and 2 specificity is mediated by residue 80 in human histocompatibility leukocyte antigen C alleles and also occurs with empty major histocompatibility complex molecules. *J. Exp. Med.* *184*, 913–922.
- Mandelboim, O., Lieberman, N., Lev, M., Paul, L., Arnon, T.I., Bushkin, Y., Davis, D.M., Strominger, J.L., Yewdell, J.W., and Porgador, A. (2001). Recognition of haemagglutinins on virus-infected cells by NKp46 activates lysis by human NK cells. *Nature* *409*, 1055–1060.
- Manianguou, B., Retière, C., and Gagne, K. (2018). Next-generation sequencing technology a new tool for killer cell immunoglobulin-like receptor allele typing in hematopoietic stem cell transplantation. *Transfus. Clin. Biol. J. Soc. Francaise Transfus. Sang.* *25*, 87–89.
- Mariani, E., Pulsatelli, L., Meneghetti, A., Dolzani, P., Mazzetti, I., Neri, S., Ravaglia, G., Forti, P., and Facchini, A. (2001). Different IL-8 production by T and NK lymphocytes in elderly subjects. *Mech. Ageing Dev.* *122*, 1383–1395.

- Marsh, S.G.E., Parham, P., Dupont, B., Geraghty, D.E., Trowsdale, J., Middleton, D., Vilches, C., Carrington, M., Witt, C., Guethlein, L.A., et al. (2003). Killer-cell immunoglobulin-like receptor (KIR) nomenclature report, 2002. *Tissue Antigens* *62*, 79–86.
- Martelli, M.F., Di Ianni, M., Ruggeri, L., Falzetti, F., Carotti, A., Terenzi, A., Pierini, A., Massei, M.S., Amico, L., Urbani, E., et al. (2014). HLA-haploidentical transplantation with regulatory and conventional T-cell adoptive immunotherapy prevents acute leukemia relapse. *Blood* *124*, 638–644.
- Martin, M.P., and Carrington, M. (2008). KIR locus polymorphisms: genotyping and disease association analysis. *Methods Mol. Biol. Clifton NJ* *415*, 49–64.
- Martin, A.M., Freitas, E.M., Witt, C.S., and Christiansen, F.T. (2000). The genomic organization and evolution of the natural killer immunoglobulin-like receptor (KIR) gene cluster. *Immunogenetics* *51*, 268–280.
- Martin, A.M., Kulski, J.K., Gaudieri, S., Witt, C.S., Freitas, E.M., Trowsdale, J., and Christiansen, F.T. (2004). Comparative genomic analysis, diversity and evolution of two KIR haplotypes A and B. *Gene* *335*, 121–131.
- Martin, M.P., Gao, X., Lee, J.-H., Nelson, G.W., Detels, R., Goedert, J.J., Buchbinder, S., Hoots, K., Vlahov, D., Trowsdale, J., et al. (2002). Epistatic interaction between KIR3DS1 and HLA-B delays the progression to AIDS. *Nat. Genet.* *31*, 429–434.
- Martin, M.P., Qi, Y., Gao, X., Yamada, E., Martin, J.N., Pereyra, F., Colombo, S., Brown, E.E., Shupert, W.L., Phair, J., et al. (2007). Innate partnership of HLA-B and KIR3DL1 subtypes against HIV-1. *Nat. Genet.* *39*, 733–740.
- Martinet, L., and Smyth, M.J. (2015). Balancing natural killer cell activation through paired receptors. *Nat. Rev. Immunol.* *15*, 243–254.
- Mason, L.H., Anderson, S.K., Yokoyama, W.M., Smith, H.R., Winkler-Pickett, R., and Ortaldo, J.R. (1996). The Ly-49D receptor activates murine natural killer cells. *J. Exp. Med.* *184*, 2119–2128.
- Mattiola, I., Pesant, M., Tentorio, P.F., Molgora, M., Marcenaro, E., Lugli, E., Locati, M., and Mavilio, D. (2015). Priming of Human Resting NK Cells by Autologous M1 Macrophages via the Engagement of IL-1 $\beta$ , IFN- $\beta$ , and IL-15 Pathways. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *195*, 2818–2828.
- Mavilio, D., Benjamin, J., Kim, D., Lombardo, G., Daucher, M., Kinter, A., Nies-Kraske, E., Marcenaro, E., Moretta, A., and Fauci, A.S. (2005). Identification of NKG2A and NKp80 as specific natural killer cell markers in rhesus and pigtailed monkeys. *Blood* *106*, 1718–1725.
- Mavoungou, E., Held, J., Mewono, L., and Kremsner, P.G. (2007). A Duffy binding-like domain is involved in the NKp30-mediated recognition of *Plasmodium falciparum*-parasitized erythrocytes by natural killer cells. *J. Infect. Dis.* *195*, 1521–1531.
- Maxam, A.M., and Gilbert, W. (1977). A new method for sequencing DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *74*, 560–564.

- McNerney, M.E., Lee, K.-M., and Kumar, V. (2005). 2B4 (CD244) is a non-MHC binding receptor with multiple functions on natural killer cells and CD8<sup>+</sup> T cells. *Mol. Immunol.* *42*, 489–494.
- Mebius, R.E., Rennert, P., and Weissman, I.L. (1997). Developing lymph nodes collect CD4<sup>+</sup>CD3<sup>-</sup>LTbeta<sup>+</sup> cells that can differentiate to APC, NK cells, and follicular cells but not T or B cells. *Immunity* *7*, 493–504.
- Medzhitov, R., and Janeway, C.A. (1997a). Innate Immunity: The Virtues of a Nonclonal System of Recognition. *Cell* *91*, 295–298.
- Medzhitov, R., and Janeway, C.A. (1997b). Innate immunity: impact on the adaptive immune response. *Curr. Opin. Immunol.* *9*, 4–9.
- Mehta, R.S., and Rezvani, K. (2018). Chimeric Antigen Receptor Expressing Natural Killer Cells for the Immunotherapy of Cancer. *Front. Immunol.* *9*.
- Metzker, M.L. (2010). Sequencing technologies - the next generation. *Nat. Rev. Genet.* *11*, 31–46.
- Middleton, D., and Gonzelez, F. (2010). The extensive polymorphism of KIR genes. *Immunology* *129*, 8–19.
- Mignon, A., Rouquet, N., and Joulin, V. (1998). Les caspases, les protéases à cystéine de l'apoptose : un enjeu thérapeutique pour demain ? *médecine/sciences* *14*, 9.
- Miller, J.S. (2013). Therapeutic applications: natural killer cells in the clinic. *Hematol. Am. Soc. Hematol. Educ. Program 2013*, 247–253.
- Miller, J.S., Soignier, Y., Panoskaltsis-Mortari, A., McNearney, S.A., Yun, G.H., Fautsch, S.K., McKenna, D., Le, C., Defor, T.E., Burns, L.J., et al. (2005). Successful adoptive transfer and in vivo expansion of human haploidentical NK cells in patients with cancer. *Blood* *105*, 3051–3057.
- Moesta, A.K., Norman, P.J., Yawata, M., Yawata, N., Gleimer, M., and Parham, P. (2008). Synergistic polymorphism at two positions distal to the ligand-binding site makes KIR2DL2 a stronger receptor for HLA-C than KIR2DL3. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *180*, 3969–3979.
- Moffett, A., Regan, L., and Braude, P. (2004). Natural killer cells, miscarriage, and infertility. *BMJ* *329*, 1283–1285.
- Moffett-King, A. (2002). Natural killer cells and pregnancy. *Nat. Rev. Immunol.* *2*, 656–663.
- Monaco, J.J. (1993). Structure and function of genes in the MHC class II region. *Curr. Opin. Immunol.* *5*, 17–20.
- Montaldo, E., Zotto, G.D., Chiesa, M.D., Mingari, M.C., Moretta, A., Maria, A.D., and Moretta, L. (2013). Human NK cell receptors/markers: A tool to analyze NK cell development, subsets and function: Human NK Cell Receptors/Markers. *Cytometry A* *83A*, 702–713.
- Monticelli, L.A., Sonnenberg, G.F., Abt, M.C., Alenghat, T., Ziegler, C.G.K., Doering, T.A., Angelosanto, J.M., Laidlaw, B.J., Yang, C.Y., Sathaliyawala, T., et al. (2011). Innate lymphoid



- cells promote lung-tissue homeostasis after infection with influenza virus. *Nat. Immunol.* *12*, 1045–1054.
- Moorthie, S., Mattocks, C.J., and Wright, C.F. (2011). Review of massively parallel DNA sequencing technologies. *HUGO J.* *5*, 1–12.
- Moretta, A., Tambussi, G., Bottino, C., Tripodi, G., Merli, A., Ciccone, E., Pantaleo, G., and Moretta, L. (1990). A novel surface antigen expressed by a subset of human CD3<sup>-</sup> CD16<sup>+</sup> natural killer cells. Role in cell activation and regulation of cytolytic function. *J. Exp. Med.* *171*, 695–714.
- Moretta, A., Bottino, C., Vitale, M., Pende, D., Cantoni, C., Mingari, M.C., Biassoni, R., and Moretta, L. (2001). Activating receptors and coreceptors involved in human natural killer cell-mediated cytotoxicity. *Annu. Rev. Immunol.* *19*, 197–223.
- Moretta, L., Bottino, C., Pende, D., Castriconi, R., Mingari, M.C., and Moretta, A. (2006). Surface NK receptors and their ligands on tumor cells. *Semin. Immunol.* *18*, 151–158.
- Morishima, Y., Kashiwase, K., Matsuo, K., Azuma, F., Morishima, S., Onizuka, M., Yabe, T., Murata, M., Doki, N., Eto, T., et al. (2015). Biological significance of HLA locus matching in unrelated donor bone marrow transplantation. *Blood* *125*, 1189–1197.
- Moro, K., Yamada, T., Tanabe, M., Takeuchi, T., Ikawa, T., Kawamoto, H., Furusawa, J.-I., Ohtani, M., Fujii, H., and Koyasu, S. (2010). Innate production of T(H)2 cytokines by adipose tissue-associated c-Kit(+)Sca-1(+) lymphoid cells. *Nature* *463*, 540–544.
- Morvan, M., David, G., Sébille, V., Perrin, A., Gagne, K., Willem, C., Kerdudou, N., Denis, L., Clémenceau, B., Folléa, G., et al. (2008). Autologous and allogeneic HLA KIR ligand environments and activating KIR control KIR NK-cell functions. *Eur. J. Immunol.* *38*, 3474–3486.
- Morvan, M., Willem, C., Gagne, K., Kerdudou, N., David, G., Sébille, V., Folléa, G., Bignon, J.-D., and Retière, C. (2009). Phenotypic and functional analyses of KIR3DL1<sup>+</sup> and KIR3DS1<sup>+</sup> NK cell subsets demonstrate differential regulation by Bw4 molecules and induced KIR3DS1 expression on stimulated NK cells. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *182*, 6727–6735.
- Mosaad, Y.M. Clinical Role of Human Leukocyte Antigen in Health and Disease. *Scand. J. Immunol.* *82*, 283–306.
- Mrozek, E., Anderson, P., and Caligiuri, M.A. (1996). Role of interleukin-15 in the development of human CD56<sup>+</sup> natural killer cells from CD34<sup>+</sup> hematopoietic progenitor cells. *Blood* *87*, 2632–2640.
- Mu, J., Tai, X., Iyer, S.S., Weissman, J.D., Singer, A., and Singer, D.S. (2014). Regulation of MHC class I expression by Foxp3 and its effect on regulatory T cell function. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *192*, 2892–2903.
- Mulrooney, T.J., Hou, L., Steiner, N.K., Chen, M., Belle, I., Ng, J., and Hurley, C.K. (2008). Promoter variants of KIR2DL5 add to diversity and may impact gene expression. *Immunogenetics* *60*, 287–294.

- Mulrooney, T.J., Zhang, A.C., Goldgur, Y., Boudreau, J.E., and Hsu, K.C. (2015). KIR3DS1-Specific D0 Domain Polymorphisms Disrupt KIR3DL1 Surface Expression and HLA Binding. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *195*, 1242–1250.
- Mundy-Bosse, B., Kathleen, M., Mao, C., Ahmed, E., Chen, L., Scoville, S.D., Freud, A.G., Yu, J., and Caligiuri, M.A. (2014). Acute Myeloid Leukemia Alters Natural Killer Cell Maturation and Functional Activation. *Blood* *124*, 754–754.
- Munneke, J.M., Björklund, A.T., Mjösberg, J.M., Garming-Legert, K., Bernink, J.H., Blom, B., Huisman, C., van Oers, M.H.J., Spits, H., Malmberg, K.-J., et al. (2014). Activated innate lymphoid cells are associated with a reduced susceptibility to graft-versus-host disease. *Blood* *124*, 812–821.
- Nagler, A., Lanier, L.L., Cwirla, S., and Phillips, J.H. (1989). Comparative studies of human FcRIII-positive and negative natural killer cells. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *143*, 3183–3191.
- Nakajima, H., and Colonna, M. (2000). 2B4: an NK cell activating receptor with unique specificity and signal transduction mechanism. *Hum. Immunol.* *61*, 39–43.
- Nash, W.T., Teoh, J., Wei, H., Gamache, A., and Brown, M.G. (2014). Know Thyself: NK-Cell Inhibitory Receptors Prompt Self-Tolerance, Education, and Viral Control. *Front. Immunol.* *5*.
- Navarro, F., Llano, M., Bellón, T., Colonna, M., Geraghty, D.E., and López-Botet, M. (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*, 277–283.
- Ndhlovu, L.C., Lopez-Verges, S., Barbour, J.D., Jones, R.B., Jha, A.R., Long, B.R., Schoeffler, E.C., Fujita, T., Nixon, D.F., and Lanier, L.L. (2012). Tim-3 marks human natural killer cell maturation and suppresses cell-mediated cytotoxicity. *Blood* *119*, 3734–3743.
- Neville, M.J., and Campbell, R.D. (1999). A new member of the Ig superfamily and a V-ATPase G subunit are among the predicted products of novel genes close to the TNF locus in the human MHC. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *162*, 4745–4754.
- Norman, P.J., Carrington, C.V.F., Byng, M., Maxwell, L.D., Curran, M.D., Stephens, H. a. F., Chandanayingyong, D., Verity, D.H., Hameed, K., Ramdath, D.D., et al. (2002). Natural killer cell immunoglobulin-like receptor (KIR) locus profiles in African and South Asian populations. *Genes Immun.* *3*, 86–95.
- Norman, P.J., Abi-Rached, L., Gendzekhadze, K., Korbel, D., Gleimer, M., Rowley, D., Bruno, D., Carrington, C.V.F., Chandanayingyong, D., Chang, Y.-H., et al. (2007). Unusual selection on the KIR3DL1/S1 natural killer cell receptor in Africans. *Nat. Genet.* *39*, 1092–1099.
- Norman, P.J., Hollenbach, J.A., Nemat-Gorgani, N., Marin, W.M., Norberg, S.J., Ashouri, E., Jayaraman, J., Wroblewski, E.E., Trowsdale, J., Rajalingam, R., et al. (2016). Defining KIR and HLA Class I Genotypes at Highest Resolution via High-Throughput Sequencing. *Am. J. Hum. Genet.* *99*, 375–391.
- Nunes, E., Heslop, H., Fernandez-Vina, M., Taves, C., Wagenknecht, D.R., Eisenbrey, A.B., Fischer, G., Poulton, K., Wacker, K., Hurley, C.K., et al. (2011). Definitions of histocompatibility typing terms. *Blood* *118*, e180–e183.

- O'Connor, G.M., Guinan, K.J., Cunningham, R.T., Middleton, D., Parham, P., and Gardiner, C.M. (2007). Functional polymorphism of the KIR3DL1/S1 receptor on human NK cells. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *178*, 235–241.
- O'Leary, J.G., Goodarzi, M., Drayton, D.L., and von Andrian, U.H. (2006). T cell- and B cell-independent adaptive immunity mediated by natural killer cells. *Nat. Immunol.* *7*, 507–516.
- Oberoi, P., and Wels, W.S. (2013). Arming NK cells with enhanced antitumor activity: CARs and beyond. *Oncoimmunology* *2*, e25220.
- Ochoa, M.C., Minute, L., Rodriguez, I., Garasa, S., Perez-Ruiz, E., Inogés, S., Melero, I., and Berraondo, P. (2017). Antibody-dependent cell cytotoxicity: immunotherapy strategies enhancing effector NK cells. *Immunol. Cell Biol.* *95*, 347–355.
- Omosun, Y.O., Blackstock, A.J., Williamson, J., van Eijk, A.M., Ayisi, J., Otieno, J., Lal, R.B., ter Kuile, F.O., Slutsker, L., and Shi, Y.P. (2018). Association of maternal KIR gene content polymorphisms with reduction in perinatal transmission of HIV-1. *PLoS ONE* *13*.
- Oppenheim, D.E., Roberts, S.J., Clarke, S.L., Filler, R., Lewis, J.M., Tigelaar, R.E., Girardi, M., and Hayday, A.C. (2005). Sustained localized expression of ligand for the activating NKG2D receptor impairs natural cytotoxicity in vivo and reduces tumor immunosurveillance. *Nat. Immunol.* *6*, 928–937.
- Pahl, J.H.W., Koch, J., Götz, J.-J., Arnold, A., Reusch, U., Gantke, T., Rajkovic, E., Treder, M., and Cerwenka, A. (2018). CD16A Activation of NK Cells Promotes NK Cell Proliferation and Memory-Like Cytotoxicity against Cancer Cells. *Cancer Immunol. Res.* *6*, 517–527.
- Pareek, C.S., Smoczynski, R., and Tretyn, A. (2011). Sequencing technologies and genome sequencing. *J. Appl. Genet.* *52*, 413–435.
- Parham, P. (2018). Molecular definition of the transplantation antigens. *FEBS J.* *285*, 2728–2745.
- Parham, P., Norman, P.J., Abi-Rached, L., and Guethlein, L.A. (2011). Variable NK cell Receptors Exemplified by Human KIR3DL1/S1. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *187*, 11–19.
- Park, M.-J., Bae, J.-H., Chung, J.S., Kim, S.-H., and Kang, C.-D. (2011). Induction of NKG2D ligands and increased sensitivity of tumor cells to NK cell-mediated cytotoxicity by hematoporphyrin-based photodynamic therapy. *Immunol. Invest.* *40*, 367–382.
- Pascal, V., Stulberg, M.J., and Anderson, S.K. (2006). Regulation of class I major histocompatibility complex receptor expression in natural killer cells: one promoter is not enough! *Immunol. Rev.* *214*, 9–21.
- Paust, S., Gill, H.S., Wang, B.-Z., Flynn, M.P., Moseman, E.A., Senman, B., Szczepanik, M., Telenti, A., Askenase, P.W., Compans, R.W., et al. (2010). Critical role for the chemokine receptor CXCR6 in NK cell-mediated antigen-specific memory of haptens and viruses. *Nat. Immunol.* *11*, 1127–1135.
- Pelak, K., Need, A.C., Fellay, J., Shianna, K.V., Feng, S., Urban, T.J., Ge, D., De Luca, A., Martinez-Picado, J., Wolinsky, S.M., et al. (2011). Copy number variation of KIR genes influences HIV-1 control. *PLoS Biol.* *9*, e1001208.

- Pende, D., Biassoni, R., Cantoni, C., Verdiani, S., Falco, M., di Donato, C., Accame, L., Bottino, C., Moretta, A., and Moretta, L. (1996). The natural killer cell receptor specific for HLA-A allotypes: a novel member of the p58/p70 family of inhibitory receptors that is characterized by three immunoglobulin-like domains and is expressed as a 140-kD disulphide-linked dimer. *J. Exp. Med.* *184*, 505–518.
- Pende, D., Parolini, S., Pessino, A., Sivori, S., Augugliaro, R., Morelli, L., Marcenaro, E., Accame, L., Malaspina, A., Biassoni, R., et al. (1999). Identification and molecular characterization of NKp30, a novel triggering receptor involved in natural cytotoxicity mediated by human natural killer cells. *J. Exp. Med.* *190*, 1505–1516.
- Pende, D., Bottino, C., Castriconi, R., Cantoni, C., Marcenaro, S., Rivera, P., Spaggiari, G.M., Dondero, A., Carnemolla, B., Reymond, N., et al. (2005). PVR (CD155) and Nectin-2 (CD112) as ligands of the human DNAM-1 (CD226) activating receptor: involvement in tumor cell lysis. *Mol. Immunol.* *42*, 463–469.
- Petersdorf, E.W., Gooley, T.A., Malkki, M., Bacigalupo, A.P., Cesbron, A., Du Toit, E., Ehninger, G., Egeland, T., Fischer, G.F., Gervais, T., et al. (2014). HLA-C expression levels define permissible mismatches in hematopoietic cell transplantation. *Blood* *124*, 3996–4003.
- Phillips, J.H., Gumperz, J.E., Parham, P., and Lanier, L.L. (1995). Superantigen-dependent, cell-mediated cytotoxicity inhibited by MHC class I receptors on T lymphocytes. *Science* *268*, 403–405.
- Pillai, S., Gopalan, V., and Lam, A.K.-Y. (2017). Review of sequencing platforms and their applications in pheochromocytoma and paragangliomas. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* *116*, 58–67.
- Pillet, A.-H., Thèze, J., and Rose, T. (2011). Interleukin (IL)-2 and IL-15 have different effects on human natural killer lymphocytes. *Hum. Immunol.* *72*, 1013–1017.
- Pittari, G., Filippini, P., Gentilcore, G., Grivel, J.-C., and Rutella, S. (2015). Revving up Natural Killer Cells and Cytokine-Induced Killer Cells Against Hematological Malignancies. *Front. Immunol.* *6*, 230.
- Pogge von Strandmann, E., Simhadri, V.R., von Tresckow, B., Sasse, S., Reiners, K.S., Hansen, H.P., Rothe, A., Böll, B., Simhadri, V.L., Borchmann, P., et al. (2007). Human leukocyte antigen-B-associated transcript 3 is released from tumor cells and engages the NKp30 receptor on natural killer cells. *Immunity* *27*, 965–974.
- Ponte, M., Cantoni, C., Biassoni, R., Tradori-Cappai, A., Bentivoglio, G., Vitale, C., Bertone, S., Moretta, A., Moretta, L., and Mingari, M.C. (1999). Inhibitory receptors sensing HLA-G1 molecules in pregnancy: decidua-associated natural killer cells express LIR-1 and CD94/NKG2A and acquire p49, an HLA-G1-specific receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *96*, 5674–5679.
- Quail, M.A., Smith, M., Coupland, P., Otto, T.D., Harris, S.R., Connor, T.R., Bertoni, A., Swerdlow, H.P., and Gu, Y. (2012). A tale of three next generation sequencing platforms: comparison of Ion Torrent, Pacific Biosciences and Illumina MiSeq sequencers. *BMC Genomics* *13*, 341.

- Rahman, K., and Iyer, S.S. (2015). Costimulatory molecules as vaccine adjuvants: to 4-1BB or not to 4-1BB? *Cell. Mol. Immunol.* *12*, 508–509.
- Rajagopalan, S., and Long, E.O. (1999). A human histocompatibility leukocyte antigen (HLA)-G-specific receptor expressed on all natural killer cells. *J. Exp. Med.* *189*, 1093–1100.
- Rajagopalan, S., and Long, E.O. (2005). Understanding how combinations of HLA and KIR genes influence disease. *J. Exp. Med.* *201*, 1025–1029.
- Rajalingam, R., Krausa, P., Shilling, H.G., Stein, J.B., Balamurugan, A., McGinnis, M.D., Cheng, N.W., Mehra, N.K., and Parham, P. (2002). Distinctive KIR and HLA diversity in a panel of north Indian Hindus. *Immunogenetics* *53*, 1009–1019.
- Rajagopalan, S., Fu, J., and Long, E.O. (2001). Cutting Edge: Induction of IFN- Production but Not Cytotoxicity by the Killer Cell Ig-Like Receptor KIR2DL4 (CD158d) in Resting NK Cells. *J. Immunol.* *167*, 1877–1881.
- Raulet, D.H. (2003). Roles of the NKG2D immunoreceptor and its ligands. *Nat. Rev. Immunol.* *3*, 781–790.
- Raulet, D.H., Gasser, S., Gowen, B.G., Deng, W., and Jung, H. (2013). Regulation of Ligands for the NKG2D Activating Receptor. *Annu. Rev. Immunol.* *31*, 413–441.
- Reeves, R.K., Li, H., Jost, S., Blass, E., Li, H., Schafer, J.L., Varner, V., Manickam, C., Eslamizar, L., Altfeld, M., et al. (2015). Antigen-specific NK cell memory in rhesus macaques. *Nat. Immunol.* *16*, 927–932.
- Rekers, P.E., Coulter, M.P., and Warren, S.L. (1950). EFFECT OF TRANSPLANTATION OF BONE MARROW INTO IRRADIATED ANIMALS. *Arch. Surg.* *60*, 635–667.
- Retière, C., Willem, C., Guillaume, T., Vié, H., Gautreau-Rolland, L., Scotet, E., Saulquin, X., Gagne, K., Béné, M.C., Imbert, B.-M., et al. (2018). Impact on early outcomes and immune reconstitution of high-dose post-transplant cyclophosphamide vs anti-thymocyte globulin after reduced intensity conditioning peripheral blood stem cell allogeneic transplantation. *Oncotarget* *9*, 11451–11464.
- Rettman, P., Legrand, N., Willem, C., Lodé, L., Chevallier, P., Cesbron, A., Senitzer, D., Retière, C., and Gagne, K. (2015). Use of killer cell immunoglobulin-like receptor genes as early markers of hematopoietic chimerism after double-umbilical cord blood transplantation. *Haematologica* *100*, e475–479.
- Rettman, P., Willem, C., Volteau, C., Legrand, N., Chevallier, P., Lodé, L., Esbelin, J., Cesbron, A., Bonneville, M., Moreau, P., et al. (2017). Impact of Graft-Versus-Graft Natural Killer Cell Alloreactivity on Single Unit Dominance After Double Umbilical Cord Blood Transplantation. *Transplantation* *101*, 2092–2101.
- Rezvani, K., Rouse, R., Liu, E., and Shpall, E. (2017). Engineering Natural Killer Cells for Cancer Immunotherapy. *Mol. Ther. J. Am. Soc. Gene Ther.* *25*, 1769–1781.
- Ritz, J., Schmidt, R.E., Michon, J., Hercend, T., and Schlossman, S.F. (1988). Characterization of functional surface structures on human natural killer cells. *Adv. Immunol.* *42*, 181–211.

- Rizzo, J.M., and Buck, M.J. (2012). Key principles and clinical applications of “next-generation” DNA sequencing. *Cancer Prev. Res. Phila. Pa* 5, 887–900.
- Robertson, M.J., Pelloso, D., Abonour, R., Hromas, R.A., Nelson, R.P., Wood, L., and Cornetta, K. (2002). Interleukin 12 immunotherapy after autologous stem cell transplantation for hematological malignancies. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* 8, 3383–3393.
- Romagne, F., Andre, P., Spee, P., Zahn, S., Anfossi, N., Gauthier, L., Capanni, M., Ruggeri, L., Benson, D.M., Blaser, B.W., et al. (2009). Preclinical characterization of 1-7F9, a novel human anti-KIR receptor therapeutic antibody that augments natural killer-mediated killing of tumor cells. *Blood* 114, 2667–2677.
- Romee, R., Foley, B., Lenvik, T., Wang, Y., Zhang, B., Ankarlo, D., Luo, X., Cooley, S., Verneris, M., Walcheck, B., et al. (2013). NK cell CD16 surface expression and function is regulated by a disintegrin and metalloprotease-17 (ADAM17). *Blood* 121, 3599–3608.
- Romee, R., Rosario, M., Berrien-Elliott, M.M., Wagner, J.A., Jewell, B.A., Schappe, T., Leong, J.W., Abdel-Latif, S., Schneider, S.E., Willey, S., et al. (2016). Cytokine-induced memory-like natural killer cells exhibit enhanced responses against myeloid leukemia. *Sci. Transl. Med.* 8, 357ra123.
- Romero, V., Azocar, J., Zúñiga, J., Clavijo, O.P., Terreros, D., Gu, X., Husain, Z., Chung, R.T., Amos, C., and Yunis, E.J. (2008). Interaction of NK inhibitory receptor genes with HLA-C and MHC class II alleles in Hepatitis C Virus infection outcome. *Mol. Immunol.* 45, 2429–2436.
- Van Rood, J.J. (1968). The detection of transplantation antigens in leukocytes. *Semin. Hematol.* 5, 187–214.
- La Rosa, C., and Diamond, D.J. (2012). The immune response to human CMV. *Future Virol.* 7, 279–293.
- Rosario, M., Liu, B., Kong, L., Collins, L.I., Schneider, S.E., Chen, X., Han, K., Jeng, E.K., Rhode, P.R., Leong, J.W., et al. (2016). The IL-15-Based ALT-803 Complex Enhances Fc RIIIa-Triggered NK Cell Responses and In Vivo Clearance of B Cell Lymphomas. *Clin. Cancer Res.* 22, 596–608.
- Rosenberg, S.A., and Lotze, M.T. (1986). Cancer Immunotherapy Using Interleukin-2 and Interleukin-2-Activated Lymphocytes. *Annu. Rev. Immunol.* 4, 681–709.
- Rosental, B., Brusilovsky, M., Hadad, U., Oz, D., Appel, M.Y., Afergan, F., Yossef, R., Rosenberg, L.A., Aharoni, A., Cerwenka, A., et al. (2011). Proliferating cell nuclear antigen is a novel inhibitory ligand for the natural cytotoxicity receptor NKp44. *J. Immunol. Baltim. Md* 1950 187, 5693–5702.
- Rouas-Freiss, N., Gonçalves, R.M.-B., Menier, C., Dausset, J., and Carosella, E.D. (1997). Direct evidence to support the role of HLA-G in protecting the fetus from maternal uterine natural killer cytotoxicity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 94, 11520–11525.
- Rouse, R.V., Parham, P., Carl Grumet, F., and Weissman, I.L. (1982). Expression of HLA antigens by human thymic epithelial cells. *Hum. Immunol.* 5, 21–34.

- Ruggeri, L., Capanni, M., Urbani, E., Perruccio, K., Shlomchik, W.D., Tosti, A., Posati, S., Rogaia, D., Frassoni, F., Aversa, F., et al. (2002a). Effectiveness of donor natural killer cell alloreactivity in mismatched hematopoietic transplants. *Science* 295, 2097–2100.
- Ruggeri, L., Capanni, M., Urbani, E., Perruccio, K., Shlomchik, W.D., Tosti, A., Posati, S., Rogaia, D., Frassoni, F., Aversa, F., et al. (2002b). Effectiveness of donor natural killer cell alloreactivity in mismatched hematopoietic transplants. *Science* 295, 2097–2100.
- Ruggeri, L., Urbani, E., André, P., Mancusi, A., Tosti, A., Topini, F., Bléry, M., Animobono, L., Romagné, F., Wagtmann, N., et al. (2016). Effects of anti-NKG2A antibody administration on leukemia and normal hematopoietic cells. *Haematologica* 101, 626–633.
- Rusakiewicz, S., Perier, A., Semeraro, M., Pitt, J.M., Pogge von Strandmann, E., Reiners, K.S., Aspeslagh, S., Pipérolou, C., Vély, F., Ivagnes, A., et al. (2017). NKp30 isoforms and NKp30 ligands are predictive biomarkers of response to imatinib mesylate in metastatic GIST patients. *Oncoimmunology* 6, e1137418.
- Saito, H., Umemura, T., Joshita, S., Yamazaki, T., Fujimori, N., Kimura, T., Komatsu, M., Matsumoto, A., Tanaka, E., and Ota, M. (2018). KIR2DL2 combined with HLA-C1 confers risk of hepatitis C virus-related hepatocellular carcinoma in younger patients. *Oncotarget* 9, 19650–19661.
- Sakamoto, N., Ishikawa, T., Kokura, S., Okayama, T., Oka, K., Ideno, M., Sakai, F., Kato, A., Tanabe, M., Enoki, T., et al. (2015). Phase I clinical trial of autologous NK cell therapy using novel expansion method in patients with advanced digestive cancer. *J. Transl. Med.* 13, 277.
- Sakisaka, T., and Takai, Y. (2004). Biology and pathology of nectins and nectin-like molecules. *Curr. Opin. Cell Biol.* 16, 513–521.
- Sanger, F., Nicklen, S., and Coulson, A.R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 74, 5463–5467.
- Santourlidis, S., Trompeter, H.-I., Weinhold, S., Eisermann, B., Meyer, K.L., Wernet, P., and Uhrberg, M. (2002). Crucial role of DNA methylation in determination of clonally distributed killer cell Ig-like receptor expression patterns in NK cells. *J. Immunol. Baltim. Md* 169, 4253–4261.
- Schneider, C.L., and Hudson, A.W. (2011). The human herpesvirus-7 (HHV-7) U21 immunoevasin subverts NK-mediated cytotoxicity through modulation of MICA and MICB. *PLoS Pathog.* 7, e1002362.
- Schellekens, J., Gagne, K., and Marsh, S.G.E. (2014). Natural killer cells and killer-cell immunoglobulin-like receptor polymorphisms: their role in hematopoietic stem cell transplantation. *Methods Mol. Biol. Clifton NJ* 1109, 139–158.
- Schmid, C., Schleuning, M., Schwerdtfeger, R., Hertenstein, B., Mischak-Weissinger, E., Bunjes, D., Harsdorf, S.V., Scheid, C., Holtick, U., Greinix, H., et al. (2006). Long-term survival in refractory acute myeloid leukemia after sequential treatment with chemotherapy and reduced-intensity conditioning for allogeneic stem cell transplantation. *Blood* 108, 1092–1099.

Schönberg, K., Sribar, M., Enczmann, J., Fischer, J.C., and Uhrberg, M. (2011). Analyses of HLA-C-specific KIR repertoires in donors with group A and B haplotypes suggest a ligand-instructed model of NK cell receptor acquisition. *Blood* 117, 98–107.

Scoville, S.D., Mundy-Bosse, B.L., Zhang, M.H., Chen, L., Zhang, X., Keller, K.A., Hughes, T., Chen, L., Cheng, S., Bergin, S.M., et al. (2016). A Progenitor Cell Expressing Transcription Factor ROR $\gamma$ t Generates All Human Innate Lymphoid Cell Subsets. *Immunity* 44, 1140–1150.

Scoville, S.D., Freud, A.G., and Caligiuri, M.A. (2017). Modeling Human Natural Killer Cell Development in the Era of Innate Lymphoid Cells. *Front. Immunol.* 8, 360.

Selvakumar, A., Steffens, U., and Dupont, B. (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, 285–294.

Selvakumar, A., Steffens, U., and Dupont, B. (1997). Polymorphism and domain variability of human killer cell inhibitory receptors. *Immunol. Rev.* 155, 183–196.

Shemesh, A., Brusilovsky, M., Kundu, K., Ottolenghi, A., Campbell, K.S., and Porgador, A. (2017). Splice variants of human natural cytotoxicity receptors: novel innate immune checkpoints. *Cancer Immunol. Immunother.* 1–13.

Shibuya, A., Campbell, D., Hannum, C., Yssel, H., Franz-Bacon, K., McClanahan, T., Kitamura, T., Nicholl, J., Sutherland, G.R., Lanier, L.L., et al. (1996). DNAM-1, a novel adhesion molecule involved in the cytolytic function of T lymphocytes. *Immunity* 4, 573–581.

Shilling, H.G., Guethlein, L.A., Cheng, N.W., Gardiner, C.M., Rodriguez, R., Tyan, D., and Parham, P. (2002). Allelic Polymorphism Synergizes with Variable Gene Content to Individualize Human KIR Genotype. *J. Immunol.* 168, 2307–2315.

Shimasaki, N., Fujisaki, H., Cho, D., Masselli, M., Lockey, T., Eldridge, P., Leung, W., and Campana, D. (2012). A clinically adaptable method to enhance the cytotoxicity of natural killer cells against B-cell malignancies. *Cytotherapy* 14, 830–840.

Shiroishi, M., Tsumoto, K., Amano, K., Shirakihara, Y., Colonna, M., Braud, V.M., Allan, D.S.J., Makadzange, A., Rowland-Jones, S., Willcox, B., et al. (2003). Human inhibitory receptors Ig-like transcript 2 (ILT2) and ILT4 compete with CD8 for MHC class I binding and bind preferentially to HLA-G. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 100, 8856–8861.

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

Sivori, S., Pende, D., Bottino, C., Marcenaro, E., Pessino, A., Biassoni, R., Moretta, L., and Moretta, A. (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, 1656–1666.

Sivori, S., Falco, M., Marcenaro, E., Parolini, S., Biassoni, R., Bottino, C., Moretta, L., and Moretta, A. (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*, 4526–4531.

Socinski, M.A., Cannistra, S.A., Elias, A., Antman, K.H., Schnipper, L., and Griffin, J.D. (1988). Granulocyte-macrophage colony stimulating factor expands the circulating haemopoietic progenitor cell compartment in man. *Lancet Lond. Engl.* *1*, 1194–1198.

Solomon, S.R., Sizemore, C.A., Sanacore, M., Zhang, X., Brown, S., Holland, H.K., Morris, L.E., and Bashey, A. (2012). Haploidentical transplantation using T cell replete peripheral blood stem cells and myeloablative conditioning in patients with high-risk hematologic malignancies who lack conventional donors is well tolerated and produces excellent relapse-free survival: results of a prospective phase II trial. *Biol. Blood Marrow Transplant. J. Am. Soc. Blood Marrow Transplant.* *18*, 1859–1866.

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

Steinbacher, J., Baltz-Ghahremanpour, K., Schmiedel, B.J., Steinle, A., Jung, G., Kübler, A., André, M.C., Grosse-Hovest, L., and Salih, H.R. (2015). An Fc-optimized NKG2D-immunoglobulin G fusion protein for induction of natural killer cell reactivity against leukemia: NKG2D-Ig for Treatment of Leukemia. *Int. J. Cancer* *136*, 1073–1084.

Stewart, C.A., Van Bergen, J., and Trowsdale, J. (2003). Different and divergent regulation of the KIR2DL4 and KIR3DL1 promoters. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *170*, 6073–6081.

Stringaris, K., Adams, S., Uribe, M., Eniafe, R., Wu, C.O., Savani, B.N., and Barrett, A.J. (2010). Donor KIR Genes 2DL5A, 2DS1 and 3DS1 are associated with a reduced rate of leukemia relapse after HLA-identical sibling stem cell transplantation for acute myeloid leukemia but not other hematologic malignancies. *Biol. Blood Marrow Transplant. J. Am. Soc. Blood Marrow Transplant.* *16*, 1257–1264.

Stulberg, M.J., Wright, P.W., Dang, H., Hanson, R.J., Miller, J.S., and Anderson, S.K. (2007). Identification of distal KIR promoters and transcripts. *Genes Immun.* *8*, 124–130.

Su, Z., Ning, B., Fang, H., Hong, H., Perkins, R., Tong, W., and Shi, L. (2011). Next-generation sequencing and its applications in molecular diagnostics. *Expert Rev. Mol. Diagn.* *11*, 333–343.

Suck, G., Odendahl, M., Nowakowska, P., Seidl, C., Wels, W.S., Klingemann, H.G., and Tonn, T. (2016). NK-92: an “off-the-shelf therapeutic” for adoptive natural killer cell-based cancer immunotherapy. *Cancer Immunol. Immunother. CII* *65*, 485–492.

Sun, J. y., Gaidulis, L., Miller, M. m., Goto, R. m., Rodriguez, R., Forman, S. j., and Senitzer, D. (2004). Development of a multiplex PCR-SSP method for Killer-cell immunoglobulin-like receptor genotyping. *Tissue Antigens* *64*, 462–468.

Sun, J.C., Beilke, J.N., and Lanier, L.L. (2009). Adaptive immune features of natural killer cells. *Nature* *457*, 557–561.

Sutherland, C.L., Chalupny, N.J., and Cosman, D. (2001). The UL16-binding proteins, a novel family of MHC class I-related ligands for NKG2D, activate natural killer cell functions. *Immunol. Rev.* 181, 185–192.

Sutlu, T., Stellan, B., Gilljam, M., Quezada, H.C., Nahi, H., Gahrton, G., and Alici, E. (2010). Clinical-grade, large-scale, feeder-free expansion of highly active human natural killer cells for adoptive immunotherapy using an automated bioreactor. *Cytotherapy* 12, 1044–1055.

Sutlu, T., Nyström, S., Gilljam, M., Stellan, B., Applequist, S.E., and Alici, E. (2012). Inhibition of intracellular antiviral defense mechanisms augments lentiviral transduction of human natural killer cells: implications for gene therapy. *Hum. Gene Ther.* 23, 1090–1100.

Symons, H.J., Leffell, M.S., Rossiter, N.D., Zahurak, M., Jones, R.J., and Fuchs, E.J. (2010). Improved survival with inhibitory Killer Immunoglobulin Receptor (KIR) gene mismatches and KIR haplotype B donors after nonmyeloablative, HLA-haploidentical bone marrow transplantation. *Biol. Blood Marrow Transplant. J. Am. Soc. Blood Marrow Transplant.* 16, 533–542.

Tedla, N., Lee, C.-W., Borges, L., Geczy, C.L., and Arm, J.P. (2008). Differential expression of leukocyte immunoglobulin-like receptors on cord-blood-derived human mast cell progenitors and mature mast cells. *J. Leukoc. Biol.* 83, 334–343.

Tedla, N., An, H., Borges, L., Vollmer-Conna, U., Bryant, K., Geczy, C., and McNeil, H.P. (2011). Expression of activating and inhibitory leukocyte immunoglobulin-like receptors in rheumatoid synovium: correlations to disease activity. *Tissue Antigens* 77, 305–316.

Van Tendeloo, V.F., Ponsaerts, P., Lardon, F., Nijs, G., Lenjou, M., Van Broeckhoven, C., Van Bockstaele, D.R., and Berneman, Z.N. (2001). Highly efficient gene delivery by mRNA electroporation in human hematopoietic cells: superiority to lipofection and passive pulsing of mRNA and to electroporation of plasmid cDNA for tumor antigen loading of dendritic cells. *Blood* 98, 49–56.

Teschner, D., Distler, E., Wehler, D., Frey, M., Marandiuc, D., Langeveld, K., Theobald, M., Thomas, S., and Herr, W. (2014). Depletion of naive T cells using clinical grade magnetic CD45RA beads: a new approach for GVHD prophylaxis. *Bone Marrow Transplant.* 49, 138–144.

Thaysen-Andersen, M., Chertova, E., Bergamaschi, C., Moh, E.S.X., Chertov, O., Roser, J., Sowder, R., Bear, J., Lifson, J., Packer, N.H., et al. (2016). Recombinant human heterodimeric IL-15 complex displays extensive and reproducible N- and O-linked glycosylation. *Glycoconj. J.* 33, 417–433.

Thomas, E.D., Lochte, H.L., Lu, W.C., and Ferrebee, J.W. (1957). Intravenous Infusion of Bone Marrow in Patients Receiving Radiation and Chemotherapy. *N. Engl. J. Med.* 257, 491–496.

Thomas, E.D., Buckner, C.D., Banaji, M., Clift, R.A., Fefer, A., Flournoy, N., Goodell, B.W., Hickman, R.O., Lerner, K.G., Neiman, P.E., et al. (1977). One hundred patients with acute leukemia treated by chemotherapy, total body irradiation, and allogeneic marrow transplantation. *Blood* 49, 511–533.

Thomas, E.D., Clift, R.A., Hersman, J., Sanders, J.E., Stewart, P., Buckner, C.D., Fefer, A., McGuffin, R., Smith, J.W., and Storb, R. (1982). Marrow transplantation for acute

nonlymphoblastic leukemic in first remission using fractionated or single-dose irradiation. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 8, 817–821.

Thomas, E.D., Clift, R.A., Fefer, A., Appelbaum, F.R., Beatty, P., Bensinger, W.I., Buckner, C.D., Cheever, M.A., Deeg, H.J., and Doney, K. (1986). Marrow transplantation for the treatment of chronic myelogenous leukemia. *Ann. Intern. Med.* 104, 155–163.

Tiercy, J.-M. (2016). How to select the best available related or unrelated donor of hematopoietic stem cells? *Haematologica* 101, 680–687.

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

Tonn, T., Schwabe, D., Klingemann, H.G., Becker, S., Esser, R., Koehl, U., Suttorp, M., Seifried, E., Ottmann, O.G., and Bug, G. (2013). Treatment of patients with advanced cancer with the natural killer cell line NK-92. *Cytotherapy* 15, 1563–1570.

Torkar, M., Norgate, Z., Colonna, M., Trowsdale, J., and Wilson, M.J. (1998). Isotypic variation of novel immunoglobulin-like transcript/killer cell inhibitory receptor loci in the leukocyte receptor complex. *Eur. J. Immunol.* 28, 3959–3967.

Trabanelli, S., Curti, A., Lecciso, M., Salomé, B., Riether, C., Ochsenbein, A., Romero, P., and Jandus, C. (2015). CD127+ innate lymphoid cells are dysregulated in treatment naïve acute myeloid leukemia patients at diagnosis. *Haematologica* 100, e257–e260.

Traherne, J.A., Martin, M., Ward, R., Ohashi, M., Pellett, F., Gladman, D., Middleton, D., Carrington, M., and Trowsdale, J. (2010). Mechanisms of copy number variation and hybrid gene formation in the KIR immune gene complex. *Hum. Mol. Genet.* 19, 737–751.

Trapani, J.A., and Smyth, M.J. (2002). Functional significance of the perforin/granzyme cell death pathway. *Nat. Rev. Immunol.* 2, 735–747.

Trinchieri, G. (1989). Biology of Natural Killer Cells. In *Advances in Immunology*, F.J. Dixon, ed. (Academic Press), pp. 187–376.

Trinchieri, G., Matsumoto-Kobayashi, M., Clark, S.C., Seehra, J., London, L., and Perussia, B. (1984). Response of resting human peripheral blood natural killer cells to interleukin 2. *J. Exp. Med.* 160, 1147–1169.

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

Trowsdale, J., Ragoussis, J., and Duncan Campbell, R. (1991). Map of the human MHC. *Immunol. Today* 12, 443–446.

Truitt, R.L., and Atasoylu, A.A. (1991). Contribution of CD4+ and CD8+ T cells to graft-versus-host disease and graft-versus-leukemia reactivity after transplantation of MHC-compatible bone marrow. *Bone Marrow Transplant.* 8, 51–58.

- Trundley, A., Frebel, H., Jones, D., Chang, C., and Trowsdale, J. (2007). Allelic expression patterns of KIR3DS1 and 3DL1 using the Z27 and DX9 antibodies. *Eur. J. Immunol.* *37*, 780–787.
- Turvey, S.E., and Broide, D.H. (2010). Innate immunity. *J. Allergy Clin. Immunol.* *125*, S24–S32.
- Tutschka, P.J., Copelan, E.A., and Klein, J.P. (1987). Bone marrow transplantation for leukemia following a new busulfan and cyclophosphamide regimen. *Blood* *70*, 1382–1388.
- Uhrberg, M., Valiante, N.M., Shum, B.P., Shilling, H.G., Lienert-Weidenbach, K., Corliss, B., Tyán, D., Lanier, L.L., and Parham, P. (1997). Human Diversity in Killer Cell Inhibitory Receptor Genes. *Immunity* *7*, 753–763.
- Valiante, N.M., Uhrberg, M., Shilling, H.G., Lienert-Weidenbach, K., Arnett, K.L., D’Andrea, A., Phillips, J.H., Lanier, L.L., and Parham, P. (1997). Functionally and structurally distinct NK cell receptor repertoires in the peripheral blood of two human donors. *Immunity* *7*, 739–751.
- Varla-Leftherioti, M., Spyropoulou-Vlachou, M., Niokou, D., Keramitsoglou, T., Darlamitsou, A., Tsekoura, C., Papadimitropoulos, M., Lepage, V., Balafoutas, C., and Stavropoulos-Giokas, C. (2003). Natural killer (NK) cell receptors’ repertoire in couples with recurrent spontaneous abortions. *Am. J. Reprod. Immunol. N. Y. N* *1989* *49*, 183–191.
- Vasu, S., He, S., Cheney, C., Gopalakrishnan, B., Mani, R., Lozanski, G., Mo, X., Groh, V., Whitman, S.P., Konopitzky, R., et al. (2016). Decitabine enhances anti-CD33 monoclonal antibody BI 836858-mediated natural killer ADCC against AML blasts. *Blood* *127*, 2879–2889.
- Veluchamy, J.P., Heeren, A.M., Spanholtz, J., van Eendenburg, J.D.H., Heideman, D.A.M., Kenter, G.G., Verheul, H.M., van der Vliet, H.J., Jordanova, E.S., and de Gruijl, T.D. (2017). High-efficiency lysis of cervical cancer by allogeneic NK cells derived from umbilical cord progenitors is independent of HLA status. *Cancer Immunol. Immunother. CII* *66*, 51–61.
- Vendelbosch, S., de Boer, M., Gouw, R.A.T.W., Ho, C.K.Y., Geissler, J., Swelsen, W.T.N., Moorhouse, M.J., Lardy, N.M., Roos, D., van den Berg, T.K., et al. (2013). Extensive variation in gene copy number at the killer immunoglobulin-like receptor locus in humans. *PloS One* *8*, e67619.
- Vendelbosch, S., de Boer, M., van Leeuwen, K., Pourfarzad, F., Geissler, J., van den Berg, T.K., and Kuijpers, T.W. (2014). Novel insights in the genomic organization and hotspots of recombination in the human KIR locus through analysis of intergenic regions. *Genes Immun.*
- Venstrom, J.M., Pittari, G., Gooley, T.A., Chewning, J.H., Spellman, S., Haagenson, M., Gallagher, M.M., Malkki, M., Petersdorf, E., Dupont, B., et al. (2012). HLA-C-dependent prevention of leukemia relapse by donor activating KIR2DS1. *N. Engl. J. Med.* *367*, 805–816.
- Vidal, S.M., Khakoo, S.I., and Biron, C.A. (2011). Natural killer cell responses during viral infections: flexibility and conditioning of innate immunity by experience. *Curr. Opin. Virol.* *1*, 497–512.
- Vieillard, V., Strominger, J.L., and Debré, P. (2005). NK cytotoxicity against CD4+ T cells during HIV-1 infection: a gp41 peptide induces the expression of an NKp44 ligand. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *102*, 10981–10986.

- Vilches, C., and Parham, P. (2002). KIR: Diverse, Rapidly Evolving Receptors of Innate and Adaptive Immunity. *Annu. Rev. Immunol.* *20*, 217–251.
- Vilches, C., Castaño, J., Gómez-Lozano, N., and Estefanía, E. Facilitation of KIR genotyping by a PCR-SSP method that amplifies short DNA fragments. *Tissue Antigens* *70*, 415–422.
- Vince, N., Li, H., Ramsuran, V., Naranbhai, V., Duh, F.-M., Fairfax, B.P., Saleh, B., Knight, J.C., Anderson, S.K., and Carrington, M. (2016). HLA-C Level Is Regulated by a Polymorphic Oct1 Binding Site in the HLA-C Promoter Region. *Am. J. Hum. Genet.* *99*, 1353–1358.
- Vitale, M., Bottino, C., Sivori, S., Sanseverino, L., Castriconi, R., Marcenaro, E., Augugliaro, R., Moretta, L., and Moretta, A. (1998). NKp44, a novel triggering surface molecule specifically expressed by activated natural killer cells, is involved in non-major histocompatibility complex-restricted tumor cell lysis. *J. Exp. Med.* *187*, 2065–2072.
- Vitale, M., Falco, M., Castriconi, R., Parolini, S., Zambello, R., Semenzato, G., Biassoni, R., Bottino, C., Moretta, L., and Moretta, A. (2001). Identification of NKp80, a novel triggering molecule expressed by human NK cells. *Eur. J. Immunol.* *31*, 233–242.
- Vitale, M., Carlomagno, S., Falco, M., Pende, D., Romeo, E., Rivera, P., Della Chiesa, M., Mavilio, D., and Moretta, A. (2004). Isolation of a novel KIR2DL3-specific mAb: comparative analysis of the surface distribution and function of KIR2DL2, KIR2DL3 and KIR2DS2. *Int. Immunol.* *16*, 1459–1466.
- Vivier, E., Tomasello, E., Baratin, M., Walzer, T., and Ugolini, S. (2008). Functions of natural killer cells. *Nat. Immunol.* *9*, 503–510.
- Vivier, E., Artis, D., Colonna, M., Diefenbach, A., Di Santo, J.P., Eberl, G., Koyasu, S., Locksley, R.M., McKenzie, A.N.J., Mebius, R.E., et al. (2018). Innate Lymphoid Cells: 10 Years On. *Cell* *174*, 1054–1066.
- Vogler, I., and Steinle, A. (2011). Vis-à-vis in the NKC: genetically linked natural killer cell receptor/ligand pairs in the natural killer gene complex (NKC). *J. Innate Immun.* *3*, 227–235.
- Voskoboinik, I., Whisstock, J.C., and Trapani, J.A. (2015). Perforin and granzymes: function, dysfunction and human pathology. *Nat. Rev. Immunol.* *15*, 388–400.
- Wagtmann, N., Biassoni, R., Cantoni, C., Verdiani, S., Malnati, M.S., Vitale, M., Bottino, C., Moretta, L., Moretta, A., and Long, E.O. (1995). Molecular clones of the p58 NK cell receptor reveal immunoglobulin-related molecules with diversity in both the extra- and intracellular domains. *Immunity* *2*, 439–449.
- Wagtmann, N., Andre, P., Zahn, S., Spee, P., Anfossi, N., Gauthier, L., Blaser, B.W., Caligiuri, M.A., Capanni, M., Ruggeri, L., et al. (2007). Anti-KIR (1-7F9): A Fully Human Monoclonal Antibody (mAb) That Blocks KIR2DL1, -2 and -3, Promoting Natural Killer (NK) Cell-Mediated Lysis of Tumor Cells In Vitro and In Vivo. *Blood* *110*, 582–582.
- Walker, J.A., Barlow, J.L., and McKenzie, A.N.J. (2013). Innate lymphoid cells--how did we miss them? *Nat. Rev. Immunol.* *13*, 75–87.
- Walzer, T. (2010). NK-cell education: KIR-S come into play. *Blood* *115*, 1110–1111.

- Walzer, T., Jaeger, S., Chaix, J., and Vivier, E. (2007). Natural killer cells: from CD3–NKp46+ to post-genomics meta-analyses. *Curr. Opin. Immunol.* *19*, 365–372.
- Wang, F., Hou, H., Wu, S., Tang, Q., Liu, W., Huang, M., Yin, B., Huang, J., Mao, L., Lu, Y., et al. (2015). TIGIT expression levels on human NK cells correlate with functional heterogeneity among healthy individuals. *Eur. J. Immunol.* *45*, 2886–2897.
- Wanquet, A., Bramanti, S., Harbi, S., Fürst, S., Legrand, F., Faucher, C., Granata, A., Calmels, B., Lemarie, C., Picard, C., et al. (2018). Killer Cell Immunoglobulin-Like Receptor–Ligand Mismatch in Donor versus Recipient Direction Provides Better Graft-versus-Tumor Effect in Patients with Hematologic Malignancies Undergoing Allogeneic T Cell–Replete Haploidentical Transplantation Followed by Post-Transplant Cyclophosphamide. *Biol. Blood Marrow Transplant.* *24*, 549–554.
- Warren, H.S., Kinnear, B.F., Phillips, J.H., and Lanier, L.L. (1995). Production of IL-5 by human NK cells and regulation of IL-5 secretion by IL-4, IL-10, and IL-12. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *154*, 5144–5152.
- Watzl, C., and Long, E.O. (2010). Signal transduction during activation and inhibition of natural killer cells. *Curr. Protoc. Immunol. Chapter 11*, Unit 11.9B.
- Wensveen, F.M., Jelenčić, V., and Polić, B. (2018). NKG2D: A Master Regulator of Immune Cell Responsiveness. *Front. Immunol.* *9*.
- Wiernik, A., Foley, B., Zhang, B., Verneris, M.R., Warlick, E., Gleason, M.K., Ross, J.A., Luo, X., Weisdorf, D.J., Walcheck, B., et al. (2013). Targeting natural killer cells to acute myeloid leukemia in vitro with a CD16 x 33 bispecific killer cell engager and ADAM17 inhibition. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* *19*, 3844–3855.
- Wiesmayr, S., Webber, S.A., Macedo, C., Popescu, I., Smith, L., Luce, J., and Metes, D. (2012). Decreased NKp46 and NKG2D and elevated PD-1 are associated with altered NK-cell function in pediatric transplant patients with PTLT. *Eur. J. Immunol.* *42*, 541–550.
- Willcox, B.E., Thomas, L.M., and Bjorkman, P.J. (2003). Crystal structure of HLA-A2 bound to LIR-1, a host and viral major histocompatibility complex receptor. *Nat. Immunol.* *4*, 913–919.
- Willemze, R., Rodrigues, C.A., Labopin, M., Sanz, G., Michel, G., Socié, G., Rio, B., Sirvent, A., Renaud, M., Madero, L., et al. (2009). KIR-ligand incompatibility in the graft-versus-host direction improves outcomes after umbilical cord blood transplantation for acute leukemia. *Leukemia* *23*, 492–500.
- Williams, F., Meenagh, A., Sleator, C., Cook, D., Fernandez-Vina, M., Bowcock, A.M., and Middleton, D. (2005). Activating killer cell immunoglobulin-like receptor gene KIR2DS1 is associated with psoriatic arthritis. *Hum. Immunol.* *66*, 836–841.
- Wright, P.W., Huehn, A., Cichocki, F., Li, H., Sharma, N., Dang, H., Lenvik, T.R., Woll, P., Kaufman, D., Miller, J.S., et al. (2013). Identification of a KIR antisense lncRNA expressed by progenitor cells. *Genes Immun.* *14*, 427–433.

- Wright, P.W., Li, H., Huehn, A., O'Connor, G.M., Cooley, S., Miller, J.S., and Anderson, S.K. (2014). Characterization of a weakly expressed KIR2DL1 variant reveals a novel upstream promoter that controls KIR expression. *Genes Immun.* *15*, 440–448.
- Wu, Z., and Xu, Y. (2010). IL-15R alpha-IgG1-Fc enhances IL-2 and IL-15 anti-tumor action through NK and CD8+ T cells proliferation and activation. *J. Mol. Cell Biol.* *2*, 217–222.
- Xaus, J., Comalada, M., Barrachina, M., Herrero, C., Gonalons, E., Soler, C., Lloberas, J., and Celada, A. (2000). The Expression of MHC Class II Genes in Macrophages Is Cell Cycle Dependent. *J. Immunol.* *165*, 6364–6371.
- Xiong, S., Sharkey, A.M., Kennedy, P.R., Gardner, L., Farrell, L.E., Chazara, O., Bauer, J., Hiby, S.E., Colucci, F., and Moffett, A. (2013). Maternal uterine NK cell-activating receptor KIR2DS1 enhances placentation. *J. Clin. Invest.* *123*, 4264–4272.
- Yamada, A., Arakaki, R., Saito, M., Kudo, Y., and Ishimaru, N. (2017). Dual Role of Fas/FasL-Mediated Signal in Peripheral Immune Tolerance. *Front. Immunol.* *8*.
- Yawata, M., Yawata, N., Draghi, M., Little, A.-M., Partheniou, F., and Parham, P. (2006). Roles for HLA and KIR polymorphisms in natural killer cell repertoire selection and modulation of effector function. *J. Exp. Med.* *203*, 633–645.
- Young, J.D., Hengartner, H., Podack, E.R., and Cohn, Z.A. (1986). Purification and characterization of a cytolytic pore-forming protein from granules of cloned lymphocytes with natural killer activity. *Cell* *44*, 849–859.
- Yu, X., Harden, K., C Gonzalez, L., Francesco, M., Chiang, E., Irving, B., Tom, I., Ivelja, S., Refino, C.J., Clark, H., et al. (2009). The surface protein TIGIT suppresses T cell activation by promoting the generation of mature immunoregulatory dendritic cells. *Nat. Immunol.* *10*, 48–57.
- Zaia, J.A., Sun, J.Y., Gallez-Hawkins, G.M., Thao, L., Oki, A., Lacey, S.F., Dagus, A., Palmer, J., Diamond, D.J., Forman, S.J., et al. (2009). The effect of single and combined activating killer immunoglobulin-like receptor genotypes on cytomegalovirus infection and immunity after hematopoietic cell transplantation. *Biol. Blood Marrow Transplant. J. Am. Soc. Blood Marrow Transplant.* *15*, 315–325.
- Zeis, M., Uharek, L., Glass, B., Steinmann, J., Dreger, P., Gassmann, W., and Schmitz, N. (1997). Allogeneic MHC-mismatched activated natural killer cells administered after bone marrow transplantation provide a strong graft-versus-leukaemia effect in mice. *Br. J. Haematol.* *96*, 757–761.
- Zhang, G., and Deng, Z. (2017). [Allelic diversity of KIR2DL4 gene and identification of five novel alleles among southern Han Chinese population]. *Zhonghua Yi Xue Yi Chuan Xue Za Zhi Zhonghua Yixue Yichuanxue Zazhi Chin. J. Med. Genet.* *34*, 270–274.
- Zhen, J., He, L., Xu, Y., Zhao, J., Yu, Q., Zou, H., Sun, G., and Deng, Z. (2015). Allelic polymorphism of KIR2DL2/2DL3 in a southern Chinese population. *Tissue Antigens* *86*, 362–367.

# **ANNEXES**



## Original Article

# **KIR/HLA incompatibilities are associated with less relapse after T-cell replete haplotransplant with post-transplant cyclophosphamide**

Catherine Willem,<sup>1,2,6</sup> Dhon Roméo Makanga,<sup>1,2,6</sup> Thierry Guillaume,<sup>2,3,6</sup> Bercelin Maniangou<sup>1,2,6</sup>, Nolwenn Legrand,<sup>1,2,6</sup> Katia Gagne,<sup>1,2,4,6</sup> Pierre Peterlin,<sup>3</sup> Alice Garnier,<sup>3</sup> Marie C Béné,<sup>2,5,6</sup> Anne Cesbron<sup>1,4</sup>, Amandine Le Bourgeois,<sup>3</sup> Patrice Chevallier,<sup>2,3,6+</sup> Christelle Retiere<sup>1,2,6+\*</sup>

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

<sup>2</sup>CRCINA, INSERM, CNRS, Université d'Angers, Université de Nantes, Nantes, France.

<sup>3</sup>Hematology Clinic, CHU, Nantes, France.

<sup>4</sup>LabEx Transplantex, Université de Strasbourg, France.

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

<sup>6</sup>LabEx IGO “Immunotherapy, Graft, Oncology”, Nantes, F-44000, France

+These authors have equally contributed to this work.

**Running title:** Beneficial impact of KIR/HLA incompatibilities in haploidentical HSCT with PTCy.

**Key Words:** Allogeneic, haplo-identical, post-transplant cyclophosphamide, NK, KIR, HLA, alloreactivity, GVHD, relapse, PBSC, RIC.

**Words count:** Abstract, 246 words; Main text, 3812 words

**Number of figures:** 6; **Number of Tables:** 3; **Number of references:** 38

This study has been previously presented in part as a poster at the 59th Blood ASH Annual Meeting in Atlanta, USA, in December 2017.

**\*Corresponding author:**

Christelle Retière, Ph.D.

Etablissement Français du Sang-Pays de la Loire, CRCINA, INSERM, CNRS, Université d'Angers, Université de Nantes, 34 boulevard Jean Monnet, 44011 Nantes cedex 01, France.

christelle.retiere@efs.sante.fr

## **Key points**

- Inhibitory KIR/HLA incompatibilities are significantly associated with more GvHD and less relapse after T replete PBSC RIC haplo-HSCT using PTCy.
- More differentiated and activated NK cells are documented at the time of GvHD after T replete PBSC RIC haplo-HSCT using PTCy.

## **Abstract**

Little is known regarding the effect of KIR/HLA incompatibilities (inc) in the setting of T-replete haploidentical allogeneic hematopoietic stem cells transplantation (hHSCT) using post-transplant cyclophosphamide (PTCy). In this retrospective study, the impact of KIR/HLA inc on clinical outcomes was studied in a homogenous cohort of 51 consecutive patients receiving a T-cell replete hHSCT after a reduced-intensity conditioning using peripheral blood stem cells (PBSC) as source of graft and PTCy as graft versus host disease (GvHD) prophylaxis. Genetic KIR2DL/HLA inc were found to be significantly associated with more GvHD (81.2% vs 45.7%,  $p=0.01$ ) and less relapse (6.2% vs 42.8%,  $p=0.008$ ) in this context. In parallel, the NK cell repertoire reconstitution was examined by multiparameter flow cytometry in 34 of these 51 patients from day 0 to day100 post-transplant. More differentiated and activated NK cells were documented at the time of GvHD (median day 29) compared to cases with no GvHD at day 30. A significant loss of KIR2DL3<sup>+</sup> NK cells at day 30 was observed in patients with inhibitory KIR/HLA inc, suggesting that responsive KIR NK cells are particularly targeted by the immunosuppressive PTCy treatment. Further investigations are needed from a larger cohort with an identical clinical approach to consolidate these results and to identify the NK cell subsets that may be beneficial for the graft versus leukemia effect observed. Because many haploidentical donors can be identified in a family, the prediction of KIR NK cell alloreactivity could be of crucial importance for donor selection and patient outcome.

## Introduction

Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplantation (HSCT) constitutes a potential curative treatment for many hematologic malignancies. In the absence of matched sibling donor, one of the most important difficulties linked to this therapy is to find a suitable 10/10 unrelated HLA-identical donor, due to the broad polymorphism of histocompatibility genes. Thus, in this context, an HLA-haploidentical family donor is the easiest candidate to identify and can be promptly available among parents, offspring and non-identical siblings. However, the major limitation of this transplant modality has traditionally been the high risk of graft failure and of severe acute Graft versus Host Disease (GvHD) due to alloreactive donor T-cells recognizing the mismatched recipient's HLA haplotype<sup>1</sup>. In the 90's, complete T-cell depletion by *in vitro* CD34<sup>+</sup> selection of the graft was proved to be effective for preventing GvHD<sup>2</sup>. However, this came at the price of an unacceptably high incidence of relapses. Moreover, T-cell depletion led to a profound and prolonged post-transplant immunodeficiency and a high mortality due to infections<sup>3</sup>. It was also in this context of T-cell depleted haploidentical HSCT that Ruggeri et al. showed for the first time the benefit, in terms of less relapses, of Natural Killer (NK) cell alloreactivity<sup>4</sup>. The Killer cell Immunoglobulin-like Receptors (KIR) are mainly expressed on NK cells. These receptors are specific for given HLA allotypes and this recognition regulates the cytotoxic activity of NK cell. Failure to establish the KIR/HLA link provides NK cells with the ability to destroy damaged or allogeneic nucleated cells<sup>5</sup>. Thus, KIR/HLA incompatibilities (inc.) can contribute to the so-called Graft versus Leukemia (GvL) effect, reducing the risk of relapse after HSCT<sup>5, 6</sup>.

Since a few years, transplant physicians have been performing successful HSCT from haploidentical family donors, using high doses of post-transplant cyclophosphamide (PTCy), to eliminate *in vivo* donor effector T-cells liable to attack host tissues<sup>7</sup>. This approach is very

promising as it provides the opportunity to perform HSCT, when needed, for patients without a 10/10 HLA-identical donor<sup>8</sup>.

However, many issues remain to be clarified, among which the impact of KIR/HLA inc in this particular setting. Only a few studies have reported such data, collected in very heterogeneous cohorts of patients<sup>9,10,11</sup>. Moreover, reconstitution of the NK repertoire remains largely unknown after haploidentical HSCT.

Here, the impact of genetic KIR/HLA inc. was retrospectively analyzed on clinical outcomes in a homogeneous cohort of 51 donor/recipient pairs. HSCT was performed for all patients after reduced-intensity conditioning (RIC), with T-cell replete haploidentical peripheral blood stem cells (PBSC). PTCy was administered as GVHD prophylaxis. For 34 of these donor/recipient pairs, the reconstitution kinetics of the NK cell repertoire was thoroughly investigated post-transplant.

## Methods

### Study population

This prospective study was conducted between November 2013 and May 2017, and enrolled 51 consecutive patients (males n=31, median age: 57 years [range: 29-70]) allografted in the Hematology Department of Nantes University Hospital. There was a majority of patients with myeloid diseases (n=31) and in complete remission at transplant (n=31). The disease risk index<sup>12</sup> was low, intermediate and high in 8, 30 and 13 cases respectively. Nine patients had been previously allografted. A Baltimore conditioning regimen<sup>7</sup> was applied for 25 patients (19 cases with lymphoid diseases, 1 myelofibrosis, 3 acute myeloid leukemias (AML), 1 myelodysplastic syndrome (MDS) and 1 blastic plasmacytoid dendritic cells neoplasm). For the remaining 26 patients, conditioning was performed with a Clo-Baltimore regimen<sup>13</sup>, where fludarabine, part of the Baltimore regimen, is replaced by clofarabine. All these patients but one had a myeloid disease, the exception being one case of T-acute lymphoblastic leukemia. The source of graft was PBSC for all cases. As GVHD prophylaxis, and according to the Baltimore regimen, all patients received PTCy 50 mg/kg/day on days +3 and +4, then cyclosporine A and mycophenolate mofetyl from day+5. Acute and chronic GVHD were classified according to standard criteria.<sup>14,15</sup> All patients gave informed consent for collecting their own data from the PROMISE data base of the EBMT. In addition, declaration of the preparation and conservation of a biocollection (DC-2014-2340) had been submitted to the French Ministry of Research and had received agreement from IRB (2015- DC-1) in 2015 to study NK cell reconstitution after transplant. This biologic study was approved by the Ethic Review Board of the Nantes University Hospital and all 34 patients and 34 donors included provided informed consent. The outcomes of some patients have been already reported previously<sup>16</sup>.

## **Immunophenotypic analysis by flow cytometry**

The immunophenotype of NK cells was determined by 8-color multiparameter flow cytometry (MFS) for graft and patient samples using the following monoclonal antibodies (mAbs): anti-CD56-APC-Cy7 (HCD56), anti-CD3-BV510 (SK7, Sony Biotechnology, San Jose, CA), anti-CD57-FITC (HNK-1), anti-2B4-FITC (2-69), anti-NKp46 (9E2, BD Biosciences, Le Pont de Claix, France), anti-NKG2C-PE (134591, R&D Systems, Minneapolis, MN), anti-NKG2D-PerCP-Cy5.5 (1D11), anti-NKp44-PC7 (P44-8, Sony Biotechnology), anti-NKG2A-PC7 (Z199), anti-NKp30-PE (Z25), anti-KIR2DL2/3/2DS3 (GL183), anti-KIR2DL1/2DS1 (EB6), anti-KIR2DS4 (FES172), anti-KIR3DL1/3DS1 (Z27, Beckman Coulter Immunotech, Marseilles, France) anti-DNAM-1-PerCP-Cy5.5 (11A8, Biolegend, San Diego, CA). MFC data were collected on a FACSCanto II instrument (BD Biosciences) and analyzed with Flowjo™ 10.2 software (LLC, Ashland, OR).

## **KIR and HLA genotyping**

High-resolution typing for HLA-A, -B, and -C loci was carried out for all donor and recipient samples by Next-Generation-Sequencing (NGS) using Omixon Holotype HLA® (Omixon, Budapest, Hungary)<sup>17</sup>. Briefly, DNA samples were amplified for the 3 loci (*HLA-A*, *HLA-B*, and *HLA-C*) by long-range PCR. Amplicons were then cleaned with Exo-SAP® (Affymetrix, Santa Clara, CA), quantified with the Quantifluor® kit (Promega, Madison, WI), and normalized. Sequencing libraries were generated for each sample using the Omixon Holotype HLA Genotyping Kit®. Libraries from individual HLA amplicons were prepared by enzymatic fragmentation, end repair, adenylation, and ligation of indexed adaptors. The indexed libraries were pooled and concentrated with Ampure XP beads (Beckman Coulter, La Brea, CA) before fragment size selection using PippinPrep® (Sage Science, Beverly, MA).

The size-selected library pool was quantified by qPCR (Kapa Biosystems, Basel, Switzerland), adjusted to 2 nM, denatured and diluted for optimal cluster density before loading into a MiSeq reagent cartridge (Illumina, San Diego, CA). The reagent cartridge and flow cell were placed on the Illumina MiSeq for 2×250 bp paired-end sequencing. Samples were demultiplexed and the resulting FASTQ files were analyzed using Twin Omixon software (Omixon, Budapest, Hungary). Besides HLA class I typing, KIR generic typing was performed on all donor samples using a KIR multiplex PCR-SSP method as previously described<sup>18</sup>. The presence or absence of KIR2DL1, 2DL2, 2DL3, 2DL5, 3DL1, 2DS1, 2DS2, 2DS3, 2DS4/1D, 2DS5 and 3DS1 genes were assigned. Donor KIR genotypes were then determined following the presence or the absence of activating KIR. Thus, a KIR AA genotype was defined by the presence of only KIR2DS4 as activating KIR gene, and a KIR B+ genotype by the presence of several activating KIR genes<sup>19</sup>. KIR ligands such as C1, C2 and Bw4 were defined based on allelic HLA class I typing.

### **CD107a mobilization assay**

The cytolytic potential of NK cells was evaluated at the median time of 25 days (range: 20-33) post-transplant for patients developing GvHD and on day 30 for patients without GvHD and at day 100. This was achieved by the CD107a mobilization assay after stimulation with the HLA class I deficient 721.221 (221) cell line, the acute leukemia H9 cell line and the acute myeloid KG1 cell line kindly provided by Dr N. Dulphy ((INSERM U1160, Paris, France). Briefly, NK cells were pre-incubated with CD107-BV421 antibody (H4A3; BD Biosciences), then incubated with 221 target cells for 5 hours at an effector: target (E: T) ratio of 1:1, together with brefeldin A (Sigma-Aldrich, Saint-Louis, MO) at 10 µg/mL for the last 4 hours to block secretion. The cells were surface-stained with the following mouse anti-human



mAbs: anti-KIR2DL1/S1-FITC (EB6), anti-KIR2DL2/3/2DS2-PE (GL183), anti-DNAM-1-PerCP-Cy5.5 (11A8, Biolegend), anti-NKG2A-PC7 (Z199), anti-KIR3DL1/3DS1 (Z27, Beckman Coulter Immunotech), CD56-APC-Cy7 (HCD56) and anti-CD3-BV510 (SK7, Sony Biotechnology). Degranulation (defined by CD107a positive expression) of NK cells was studied by MFC, using CD3 absence and CD56 expression to target NK cells (CD3<sup>-</sup> CD56<sup>+</sup>). All functional MFC data were collected on a FACSCanto II instrument (BD Biosciences), and analyzed with the Flowjo™ 10.2 software (LLC).

### **Statistical analyses**

Overall survival (OS) was defined as the time from day 0 of allo-HSCT to death or last follow-up for survivors. Disease-free survival (DFS) was defined as time from day 0 of allo-SCT to time without evidence of relapse or disease progression censored at the date of death or last follow-up. Relapse was defined as any event related to re-occurrence of the disease. Categorical data were analyzed by Chi-square test and univariate comparisons were performed by the Student's t-test. Comparisons of multiple groups were performed by one-way ANOVA using the GraphPad Prism v6.0 software (San Diego, CA). P values <0.05 were considered statistically significant.

## Results

### Clinical outcomes

All patients engrafted. Twenty-nine (57%) and 8 (16%) patients developed grade 2-4 and 3-4 acute GVHD, respectively, at a median time of 29 days (range: 17-121) post-transplant. Ten patients (20%) developed moderate or severe chronic GVHD. At last updating (April 2018) and with a median follow-up of 21 months (range: 3.3-53.9, one patient alive at 7 months was lost to follow-up afterwards) for alive patients, 16 (31%) have relapsed and 19 died. The causes of death were relapse in 11 cases, infection in 4, GVHD in 3 and dermatomyositis in 1. Two-year overall (OS) and disease-free (DFS) survivals for the whole cohort are 61.6.0% (95%CI: 49-76) and 50.3% (95%CI 38-66) respectively.

Comparing Baltimore (n=25) vs Clo-Baltimore (n=26) sub-groups, no differences were observed in terms of grade 2-4 acute (64% vs 50%, p=0.46) or moderate /severe chronic (24% vs 15%, p=0.67) GVHD incidence, relapses (32% vs 31%, p=1) or deaths (36% vs 38%, p=1). Similarly, there was no difference in 2-year DFS (68.1% [95%CI: 48-95] vs 42.6% [95%CI: 29-62], p=0.09) nor 2-year OS (74.4% [95%CI: 55-99] vs 56% [95%CI: 47-75], p=0.16). Patients with lymphoid or myeloid malignancies had also similar grade 2-4 acute (65% vs 52%, p=0.51) or moderate/severe chronic (25% vs 16%, p=0.67) GVHD incidences, relapses (35% vs 29%, p=0.88), deaths (30% vs 42%, p=0.57), 2-year DFS (54.5% [95%CI: 36-81] vs 45.4% [95%CI: 27-74], p=0.93) and OS (68.7% [95%CI: 50-93] vs 46.5% [95%CI: 28-75], p=0.31). However, patients developing grade 2-4 acute GVHD (n=29) had a lower incidence of relapse compared to other patients (21% vs 45%, p=0.059). As Baltimore vs Clo-Baltimore patients had similar outcomes (**Figure 1A**), they were pooled to study the impact of NK cells alloreactivity after transplant.

## **Inhibitory KIR<sub>D</sub>/HLA-C<sub>R</sub> inc. favors GVHD and protects against relapse in haploidentical RIC PBSC HSCT with PTCy**

The C1, C2 and Bw4 KIR ligands, defined from donor and recipient HLA typings are shown in **Table 1**. Inhibitory (inh) KIR/HLA inc. were defined by the presence of inhibitory KIR genes (KIR2DL1, KIR2DL2/3 and KIR3DL1) in the donor concomitantly with the absence of the respective cognate HLA ligands in the recipient. KIR2DL1<sub>D</sub>/C2<sub>R</sub><sup>-</sup> inc. was found in 10 D/R pairs, KIR2DL2/3<sub>D</sub>/C1<sub>R</sub><sup>-</sup> inc. in 6 and KIR3DL1<sub>D</sub>/Bw4<sub>R</sub><sup>-</sup> inc. in another 6 (**Table 1**). Similarly, activating KIR/HLA inc. were defined by the presence of activating KIR genes (KIR2DS1 and KIR2DS2) in the donor concomitantly to the presence of the respective cognate HLA ligands in the recipient, absent in the donor. From the 51 D/R pairs, only two cases showed a KIR2DS1<sub>D</sub>/C2<sub>R</sub><sup>+</sup> inc. and another two a KIR2DS2<sub>D</sub>/C1<sub>R</sub><sup>+</sup> inc. Both subgroups of patients (Flu vs. Clo) presented a similar distribution of KIR/HLA inc. (**Figure 1A**). Characteristics of patients, donors and outcomes are displayed in **Table 2** and **Table 3** according to the D/R pair distribution of inh KIR/HLA inc.

There was a higher incidence of acute GVHD for patients with inh KIR/HLA inc. (n=22) compared to those without (n=29) at 72.7% vs 45% (p=0.08) while significantly less relapses were observed in the former group (13.6% vs 45%, p=0.03) (**Figure 1C**). Moreover, these patients have better 2-year OS and DFS at 67.8% (95%CI: 50-90) vs. 37.6% (95%CI: 23-60; p=0.03) and 76.2% (95%CI: 60-96) vs. 51.2% (95%CI: 35-73, p=0.04) respectively).

Focusing on specific KIR2DL (KIR2DL1 and KIR2DL2/3)/HLA-C inc. (n=16) it was observed that patients with those inc. presented a significantly higher incidence of acute GVHD (81.2% vs 45.7%, p=0.01) and again a significant lower incidence of relapse (6.2% vs 42.8%, p=0.008) (**Figure 1B**), a better 2-year DFS (68.1% [95%CI: 48-95] vs 42.6% [95%CI: 29-62], p=0.09) and a better 2-year OS (74.4% [95%CI: 55-99] vs 56% [95%CI: 41-75],

p=0.16). Chronic GVHD was not associated with inh KIR: HLA inc., relapse, DFS nor OS in this series. Of note, donor AA and B+ genotypes were not associated with GvHD nor relapse (data not shown).

**KIR2DL2/3<sup>+</sup> and KIR3DL1<sup>+</sup> NK cell recoveries at day 30 post-graft are inversely impacted by KIR/HLA incompatibilities.**

The kinetics of NK cell repertoire reconstitution was analyzed for 34 donor/patient pairs by immunophenotyping in MFC from day 0 to day 30, 3 times per week, then at day 60 and day 90/100 post-transplant. Nineteen patients developed acute GVHD at a median time of 34 days (range: 21-119) post-transplant. Proliferative NK cells in the graft were particularly targeted by the early administration of PTCy, as shown by the profound depletion in NK cells from day 5 to day 20, confirming previous data from our group<sup>16</sup>. Although GvHD, relapse or inh KIR/HLA inc. did not impact NK cell frequency during the first 30 days, the fludarabine-based regimen was associated with higher NK cells recovery compared to the clofarabine-based regimen at day 25 (p=0.0001) (**Figure 2A**). Because of the significant impact of genetic KIR/HLA inc. on GvHD and relapse, investigations were pursued focusing on KIR2DL2/3/2DS2<sup>+</sup>, KIR3DL1<sup>+</sup> and KIR2DL1/S1<sup>+</sup> NK cell subsets. Interestingly, only inh KIR/HLA inc. modulated KIR NK cell reconstitution after transplant (**Figure 2B**). Indeed, inh KIR/HLA inc. was associated with a significant decrease of KIR2DL2/3/2DS2<sup>+</sup> NK cell recovery (p=0.004) but conversely fostered KIR3DL1<sup>+</sup> NK cell recovery at day 30 (p=0.01). Neither inh KIR/HLA inc., type of conditioning, relapse nor GVHD had any impact on KIR2DL1/S1<sup>+</sup> (**Figure 2B**) and KIR2DS4<sup>+</sup> NK cell recoveries (data not shown).

### **Patients developing GvHD harbor more differentiated and activated NK cells.**

Different membrane markers inform about the differentiated and activated status of NK cells<sup>20</sup>. NKp46 is a marker of NK cells<sup>21,22</sup> and 2B4 is a receptor corresponding to an activating marker at the early stage of NK cells differentiation. Conversely, it becomes an inhibitory receptor on differentiated NK cells<sup>23</sup>. Moreover, naïve NKG2A<sup>+</sup> KIR<sup>-</sup> CD57<sup>-</sup> NK cells will acquire KIR and CD57 expression when they become differentiated NK cells and their activated status is marked by a higher frequency of NKG2A<sup>+</sup> NK cells<sup>24,20</sup>. Expression of these markers was examined in MFC during reconstitution of the NK cell repertoire (**Figure 3A**). In the grafts, NK cells displayed a differentiated phenotype and expressed essentially NKp46 and 2B4. In patients, between day 20 and day 30, NK cells were NKp46<sup>-</sup> and 2B4<sup>+</sup>, then lost progressively 2B4 expression to acquire NKp46 expression. At day 60, NK cells displayed a similar phenotype than that of grafted NK cells. Patients developing GVHD showed a differentiated profile of NK cells characterized by less frequent undifferentiated 2B4<sup>+</sup> NKp46<sup>-</sup> NK cells (p=0.04).

Naïve NKG2A<sup>+</sup> KIR<sup>-</sup> CD57<sup>-</sup> NK cells will acquire KIR and CD57 expression to become differentiated NK cells and their activated status is marked by a higher frequency of NKG2A<sup>+</sup> NK cells<sup>24,20</sup>. Thus, a significant increase of CD57<sup>+</sup> (p=0.02) and NKG2A<sup>+</sup> NK cell frequencies (p=0.01) was also observed at day 20 post-transplant in patients who developed GvHD (**Figure 3B**).

The expression of different activating receptors such as DNAM-1<sup>25</sup>, NKG2D<sup>26,27</sup>, NKp30<sup>28</sup> and NKp44<sup>29,30</sup>, potentially implicated in the graft versus leukemia effect induced by NK cells<sup>31</sup>, was also investigated during immune reconstitution after transplant. Around day 20 and day 30, even though not statistically significant, NKG2D and DNAM-1 were more

expressed on NK cells in patients developing GvHD, highlighting an activated status of these NK cells (**Figure 4A**).

Significant differences in expression were also observed for DNAM-1 at day 20 ( $p=0.02$ ) and for NKG2D at day 25 ( $p=0.02$ ) considering patients with or without KIR/HLA inc. Conversely, DNAM-1 expression was significantly lower at day 100 on NK cells from patients developing GvHD compared to controls ( $p=0.01$ ). Interestingly, NKG2D expression but not that of DNAM-1 was significantly higher on NK cells at day 30 for patients who relapsed ( $p=0.03$ ). No difference was observed for NKp30 and NKp44 expression considering the type of conditioning, GvHD, relapse or inh KIR/HLA inc. (data not shown).

### **NK cells from patients developing GvHD have a lower *ex vivo* degranulation activity**

The degranulation potential of NK cells was assessed by testing *ex vivo* the spontaneous lysis<sup>32</sup> exerted by patient NK cells collected around day 30 and day 100. The two patients who developed a late GvHD (day 112 and 122) were excluded from the functional study performed at day 30. Neither the type of conditioning, GvH occurrence, relapse and inh KIR/HLA inc. had any impact on NK cells degranulation at day 30 (**Figure 5A**). However, NK cells from patients developing GvHD displayed a significant lower degranulation rate compared those of patients without GvHD at day 100 ( $p=0.01$ ) (**Figures 5B**).

Similarly, at day 100 the degranulation potential of patient NK cells was investigated in the presence of the acute leukemia H9 cell line and the acute myeloid KG1 cell line, in order to evaluate their potential alloreactivity and anti-leukemia effect at this later point (**Figure 5B**). Lower degranulation of NK cells from patients with GvHD was observed in the presence of H9 cells ( $p=0.01$ ) but not KG1 cells, which are basically less recognized by NK cells<sup>33 34</sup>. No

difference in terms of Gzm and perforin expression in recipient NK cells was observed at days 30 and 100 between patients developing GvHD or not (data not shown).

## Discussion

Haploidentical HSCT have been increasingly used in recent years in patients with no suitable donors. Indeed, the PTCy administration following donor cells infusion is able to kill donor alloreactive T-cells without deteriorating the graft itself, allowing for a normal rate of engraftment and low incidence of severe acute or chronic GVHD<sup>35</sup>. These results are also currently associated with relatively good survivals, as reported here, which represents a new step and revolution in the long history of allogeneic HSCT. However, relapse remains a major concern in the setting of haploidentical HSCT. Because many haplodonors can be identified in the patient's family and because of the HLA disparity between donors and recipients, the prediction of NK cell alloreactivity could be of crucial importance for patient outcome and donor selection. The results reported here show that, in the context of RIC PBSC haplotransplant using PTCy, genetic inh KIR/HLA inc. are associated with an improvement of the clinical outcome and particularly with a lower relapse incidence and better survivals for patients presenting this profile. KIR2DL/HLA-C inc. were observed to be more frequently associated with GVHD occurrence and lower relapse rates. Moreover, KIR2DL3<sup>+</sup> and KIR3DL1<sup>+</sup> NK cell recoveries at day 30 post-graft were inversely impacted by KIR/HLA inc., suggesting that inh KIR2DL/HLA-C inc. is the most beneficial and may improve patient outcome in terms of relapse and survival. Thus, it seems possible to propose a new model highlighting the impact of inh KIR/HLA inc. on GvHD and relapse after RIC PBSC haplotransplant using PTCy (**Figure 6**).

So far, data regarding the impact of alloreactive NK cells after T-replete haploidentical transplantation are very scarce<sup>9,10,11,36</sup>. Using high doses of antithymoglobulin instead of PTCy as GVHD prophylaxis, Huang and co-workers have shown a deleterious effect of KIR ligand incompatibility on clinical outcomes after haploidentical HSCT as more acute GVHD



and relapse and inferior survival were observed in association with this profile<sup>36</sup>. However, the authors suggested that the large dose of T-cells contained in the graft and infused in patients may have affected NK cell function and KIR expression *in vivo* with the consequence of inhibiting the beneficial role of alloreactive NK cells in terms of GvL effect.

Two previous studies have reported the impact of KIR/HLA inc. after haplotransplant using PTCy but with contradictory data<sup>9,10</sup>. Symons et al showed in a series of 86 patients, with bone marrow as source of graft, that inhibitory KIR gene mismatches between donor and recipient or KIR haplotype AA recipients from KIR Bx donors were associated with lower relapse and improved OS and EFS<sup>9</sup>. Conversely, a recent retrospective multicenter analysis, including 444 acute leukemia patients having received a T-cell replete haplotransplant with PTCy, using either bone marrow or PBSC as stem cell source, reported a deleterious impact of KIR ligand mismatches (defined according to HLA typing)<sup>10</sup>. Different points can explain these discordant results compared to ours. Indeed, donor KIR genotyping was not available in this series to analyze properly KIR/HLA inc. Also, in this missing self/KIR-ligand mismatch model, the presence of respective inhibitory KIR in the donor was assumed but not verified. This is problematic as KIR genes harbor a broad allelic polymorphism which leads to unexpressed membrane KIR as documented for KIR3DL1<sup>37</sup>. In addition, bone marrow and PBSC were both considered here while we only included patients receiving PBSC.

One of the major interest of our study was also that we were able to thoroughly study NK cell recovery. Inh KIR/HLA inc. were associated with a loss of KIR2DL3<sup>+</sup> NK cells at day 30. Moreover, a significant proportion of patients with inh KIR/HLA inc. developed acute GVHD around day 30 with a more differentiated phenotype of NK cells. Thus, in accordance with the recent results of Russo et al.<sup>11</sup>, we observed that PTCy seems to eliminate early alloreactive KIR2DL NK cells for D/R pairs with genetic inh KIR/HLA inc. This was particularly

compelling for KIR2DL3<sup>+</sup> NK cells. It has been shown that the high levels of serum IL-15 observed early after HSCT are associated with a more differentiated status of NK cells in recipients developing GvHD<sup>11</sup>. It can be hypothesized that the alloreactive context promotes a strong activation of responsive NK cells that are subsequently targeted by the immunosuppressive Cy treatment. This activation appears to emphasize efficient anti-leukemic responses. However, further investigations are needed to determine the nature of cell effectors directly engaged in the anti-leukemic responses.

Immunophenotypic NK cells investigation throughout the kinetics of immune reconstitution in this series led us to highlight different statuses of NK cell differentiation based on NKp46 and 2B4 expression as recently described by Roberto et al.<sup>38</sup>. At an early stage, immature NK cells are NKp46<sup>-</sup> 2B4<sup>+</sup> and acquire progressively NKp46 around day 30, then lose 2B4 to finally co-express both markers around day 6 on infused NK cells. Patients developing GVHD harbored more differentiated NK cells (2B4<sup>-</sup>, NKp46<sup>+</sup>, CD57<sup>+</sup> and NKG2A<sup>+</sup>) with a trend to express higher level of activating DNAM-1 and NKG2D receptors. Functionally, it can be suggested that the lower degranulation of NK cells observed *ex vivo* at day 100 from patients with GvHD can be explained by stronger *in vivo* activation of NK cells due to the high cell booster of the GvDH context.

In conclusion, inh KIR/HLA inc. could be of crucial importance for donor selection and patient outcome after T-replete haplotransplant using PTCy. Also, further investigations are needed to identify the NK cell subsets that are beneficial for triggering the GvL effect in T-repleted haploidentical HSCT using PTCy.

## **Acknowledgments**

We thank all donors and recipients who accepted to participate to this study. This work was financially supported by the Etablissement Français du Sang (EFS)/Centre Pays de la Loire and by grants from International Research Group on unrelated hematopoietic stem cell Transplantation (IRGHET), la Ligue contre le Cancer, le DHU Oncogreffe, Leucémie Espoir Atlantique Famille (LEAF), l'Agence de biomédecine (ABM) and Nantes Atlantique Greffe de Moelle Osseuse (NAGMO).

## **Authorship contributions**

Study design: CR for NK cell repertoire and PC for clinical input

Acquisition of data: CW, DRM, BM, NL and KG

Donor and recipient sample collection: CW, PC, TG, PP, AG, MCB and ALB

Biological patient data: PC

Data analysis: CW, KG and CR

Data interpretation: CR

Statistical analyses: CR

Figure production: CR

Manuscript writing: CR, PC, MCB

## **Conflict of interest statement**

The authors declared no conflict of interest.

## References

1. Anasetti C, Amos D, Beatty PG, et al. Effect of HLA compatibility on engraftment of bone marrow transplants in patients with leukemia or lymphoma. *N. Engl. J. Med.* 1989;320(4):197–204.
2. Aversa F, Tabilio A, Velardi A, et al. Treatment of high-risk acute leukemia with T-cell-depleted stem cells from related donors with one fully mismatched HLA haplotype. *N. Engl. J. Med.* 1998;339(17):1186–1193.
3. Ciceri F, Bonini C, Stanghellini MTL, et al. Infusion of suicide-gene-engineered donor lymphocytes after family haploidentical haemopoietic stem-cell transplantation for leukaemia (the TK007 trial): a non-randomised phase I-II study. *Lancet Oncol.* 2009;10(5):489–500.
4. Ruggeri L, Capanni M, Urbani E, et al. Effectiveness of donor natural killer cell alloreactivity in mismatched hematopoietic transplants. *Science.* 2002;295(5562):2097–2100.
5. Ljunggren HG, Kärre K. Host resistance directed selectively against H-2-deficient lymphoma variants. Analysis of the mechanism. *J. Exp. Med.* 1985;162(6):1745–1759.
6. Glass B, Uharek L, Zeis M, et al. Graft-versus-leukaemia activity can be predicted by natural cytotoxicity against leukaemia cells. *Br. J. Haematol.* 1996;93(2):412–420.
7. Luznik L, O'Donnell PV, Symons HJ, et al. HLA-haploidentical bone marrow transplantation for hematologic malignancies using nonmyeloablative conditioning and high-dose, posttransplantation cyclophosphamide. *Biol. Blood Marrow Transplant. J. Am. Soc. Blood Marrow Transplant.* 2008;14(6):641–650.
8. Bashey A, Solomon SR. T-cell replete haploidentical donor transplantation using post-transplant CY: an emerging standard-of-care option for patients who lack an HLA-identical sibling donor. *Bone Marrow Transplant.* 2014;49(8):999–1008.
9. Symons HJ, Leffell MS, Rossiter ND, et al. Improved survival with inhibitory killer immunoglobulin receptor (KIR) gene mismatches and KIR haplotype B donors after nonmyeloablative, HLA-haploidentical bone marrow transplantation. *Biol. Blood Marrow Transplant. J. Am. Soc. Blood Marrow Transplant.* 2010;16(4):533–542.
10. Shimoni A, Labopin M, Lorentino F, et al. Killer cell immunoglobulin-like receptor ligand mismatching and outcome after haploidentical transplantation with post-transplant cyclophosphamide. *Leukemia.* 2018;
11. Russo A, Oliveira G, Berglund S, et al. NK cell recovery after haploidentical HSCT with posttransplant cyclophosphamide: dynamics and clinical implications. *Blood.* 2018;131(2):247–262.
12. Armand P, Kim HT, Logan BR, et al. Validation and refinement of the Disease Risk Index for allogeneic stem cell transplantation. *Blood.* 2014;123(23):3664–3671.
13. Retiere C, Willem C, Legrand N, et al. NK-Cell Alloreactivity Is Associated with Acute Gvhd and Decreased Relapse Incidence after T-Replete Haplo-Identical Allotransplant with High-Dose Post-Transplant Cyclophosphamide. *Blood.* 2017;130(Suppl 1):3262–3262.
14. Harris AC, Young R, Devine S, et al. International, Multicenter Standardization of Acute Graft-versus-Host Disease Clinical Data Collection: A Report from the Mount Sinai Acute GVHD International Consortium. *Biol. Blood Marrow Transplant. J. Am. Soc. Blood Marrow Transplant.* 2016;22(1):4–10.

15. Filipovich AH, Weisdorf D, Pavletic S, et al. National Institutes of Health consensus development project on criteria for clinical trials in chronic graft-versus-host disease: I. Diagnosis and staging working group report. *Biol. Blood Marrow Transplant. J. Am. Soc. Blood Marrow Transplant.* 2005;11(12):945–956.
16. Retière C, Willem C, Guillaume T, et al. Impact on early outcomes and immune reconstitution of high-dose post-transplant cyclophosphamide vs anti-thymocyte globulin after reduced intensity conditioning peripheral blood stem cell allogeneic transplantation. *Oncotarget.* 2018;9(14):11451–11464.
17. Duke JL, Lind C, Mackiewicz K, et al. Determining performance characteristics of an NGS-based HLA typing method for clinical applications. *HLA.* 2016;87(3):141–152.
18. Sun JY, Gaidulis L, Miller MM, et al. Development of a multiplex PCR-SSP method for Killer-cell immunoglobulin-like receptor genotyping. *Tissue Antigens.* 2004;64(4):462–468.
19. Hsu KC, Chida S, Geraghty DE, Dupont B. The killer cell immunoglobulin-like receptor (KIR) genomic region: gene-order, haplotypes and allelic polymorphism. *Immunol. Rev.* 2002;190:40–52.
20. Montaldo E, Del Zotto G, Della Chiesa M, et al. Human NK cell receptors/markers: a tool to analyze NK cell development, subsets and function. *Cytom. Part J. Int. Soc. Anal. Cytol.* 2013;83(8):702–713.
21. Sivori S, Vitale M, Morelli L, et al. p46, a novel natural killer cell-specific surface molecule that mediates cell activation. *J. Exp. Med.* 1997;186(7):1129–1136.
22. Pessino A, Sivori S, Bottino C, et al. Molecular cloning of NKp46: a novel member of the immunoglobulin superfamily involved in triggering of natural cytotoxicity. *J. Exp. Med.* 1998;188(5):953–960.
23. Sivori S, Falco M, Marcenaro E, et al. 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.* 2002;99(7):4526–4531.
24. Björkström NK, Riese P, Heuts F, et al. Expression patterns of NKG2A, KIR, and CD57 define a process of CD56dim NK-cell differentiation uncoupled from NK-cell education. *Blood.* 2010;116(19):3853–3864.
25. Pende D, Spaggiari GM, Marcenaro S, et al. Analysis of the receptor-ligand interactions in the natural killer-mediated lysis of freshly isolated myeloid or lymphoblastic leukemias: evidence for the involvement of the Poliovirus receptor (CD155) and Nectin-2 (CD112). *Blood.* 2005;105(5):2066–2073.
26. Bauer S, Groh V, Wu J, et al. Activation of NK cells and T cells by NKG2D, a receptor for stress-inducible MICA. *Science.* 1999;285(5428):727–729.
27. Salih HR, Antropius H, Gieseke F, et al. Functional expression and release of ligands for the activating immunoreceptor NKG2D in leukemia. *Blood.* 2003;102(4):1389–1396.
28. Pende D, Parolini S, Pessino A, et al. Identification and molecular characterization of NKp30, a novel triggering receptor involved in natural cytotoxicity mediated by human natural killer cells. *J. Exp. Med.* 1999;190(10):1505–1516.
29. Vitale M, Bottino C, Sivori S, et al. 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.* 1998;187(12):2065–2072.
30. Cantoni C, Bottino C, Vitale M, et al. NKp44, a triggering receptor involved in tumor cell lysis by activated human natural killer cells, is a novel member of the immunoglobulin superfamily. *J. Exp. Med.* 1999;189(5):787–796.

31. Muntasell A, Ochoa MC, Cordeiro L, et al. Targeting NK-cell checkpoints for cancer immunotherapy. *Curr. Opin. Immunol.* 2017;45:73–81.
32. Jondal M, Spine C, Targan S. Human spontaneous killer cells selective for tumour-derived target cells. *Nature.* 1978;272(5648):62–64.
33. Yan Y, Steinherz P, Klingemann HG, et al. Antileukemia activity of a natural killer cell line against human leukemias. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* 1998;4(11):2859–2868.
34. Nanbakhsh A, Pochon C, Mallavialle A, et al. c-Myc regulates expression of NKG2D ligands ULBP1/2/3 in AML and modulates their susceptibility to NK-mediated lysis. *Blood.* 2014;123(23):3585–3595.
35. Robinson TM, O'Donnell PV, Fuchs EJ, Luznik L. Haploidentical bone marrow and stem cell transplantation: experience with post-transplantation cyclophosphamide. *Semin. Hematol.* 2016;53(2):90–97.
36. Huang X-J, Zhao X-Y, Liu D-H, Liu K-Y, Xu L-P. Deleterious effects of KIR ligand incompatibility on clinical outcomes in haploidentical hematopoietic stem cell transplantation without in vitro T-cell depletion. *Leukemia.* 2007;21(4):848–851.
37. Gagne K, Willem C, Legrand N, et al. Both the nature of KIR3DL1 alleles and the KIR3DL1/S1 allele combination affect the KIR3DL1 NK-cell repertoire in the French population. *Eur. J. Immunol.* 2013;43(4):1085–1098.
38. Roberto A, Di Vito C, Zaghi E, et al. The early expansion of anergic NKG2Apos/CD56dim/CD16neg natural killer cells represents a therapeutic target in haploidentical haematopoietic stem cell transplantation. *Haematologica.* 2018;



**Table 2:** Characteristics of patients

	All patients N=51	inhKIR2D/HLA inc N=22	No inh KIR/HLA inc N=29	P value
<b>Gender: male</b>	31 (61%)	16 (72.7%)	15 (51.7%)	0.12
<b>Median age: years (range)</b>	57 (29-70)	57.5 (33-70)	55 (29-70)	0.45
<b>Disease</b>				
AML/MDS	18/9	9/1	9/8	
ALL	4	2	2	
HD	3	3	0	
NHL	10	4	6	
CLL	2		2	
Meyelofibrosis	2		2	
pDCs neoplasm	1		1	
CML	1		1	
Mycosis fungoides	1			
Myeloid/lymphoid	31 (61%)/20 (39%)	12 (54.5%)/10 (45.5%)	19 (65.5%)/10 (34.5%)	0.56
<b>Status at transplant</b>				0.71
CR1/CR2/CR3	19/10/2 (61%)	8/4/1 (58%)	13/6/1 (66%)	
PR1/PR2/PR3	4/2/4 (19.5%)	0/2/3 (22.7%)	4/0/1 (17.2%)	
Active	10 (19.5%)	4 (6%)	6 (26%)	
<b>Disease risk index</b>				0.23
Low	8 (16%)	4 (18.1%)	4 (13.8%)	
Intermediate	30 (59%)	15 (68.2%)	15 (51.7%)	
High	13 (25%)	3 (13.6%)	10 (34.5%)	
<b>Previous allograft</b>	9 (18%)	5 (22.7%)	4 (13.8%)	0.47
<b>Conditioning</b>				0.4
Baltimore	25 (49%)	9 (44%)	16 (51%)	
Clo-Baltimore	26 (51%)	13 (56%)	13 (49%)	
<b>Haplo-donors</b>				
Median age	42 (19-71)	42.5 (19-71)	41 (22-71)	0.95
Sister/brother	9/13 (43%)	5/4 (40.9%)	4/9 (44.8%)	0.84
Father/Mother	4/2 (12%)	2/1 (13.6%)	2/1 (10.3%)	
Son/Daughter	14/5 (37%)	7/2 (40.9%)	7/3 (34.5%)	
Nephew	4 (8%)	1 (4.5%)	3 (10.3%)	
<b>Donor/recipient CMV status</b>				0.2
-/-	32 (63%)	12 (54.5%)	14 (48.27%)	
-/+	8 (15%)	4 (18.2%)	4 (13.8%)	
+/-	6 (12%)	5 (22.7%)	1 (3.4%)	
+/+	5 (10%)	1 (4.52%)	4 (13.8%)	
<b>ABO compatibility</b>				
Compatibility	34 (66%)	13 (59.1%)	21 (72.4%)	
Minor inc	11(22%)	6 (27.3%)	5 (17.2%)	
Major inc	6 (12%)	3 (13.6%)	3 (10.3%)	
<b>Donor KIR genotype</b>				0.01
AA	17 (33%)	10 (45.4%)	7 (24.1%)	
AB	31 (61%)	9 (40.9%)	22 (75.8%)	
BB	3 (6%)	3 (13.6%)	0	
<b>Graft composition</b>				
Median CD34+ cells: 10*6/kg	7.88 (2.88-14.16)	7.79 (3.91-14.16)	7.89 (2.88-12.11)	0.86
Median CD3+ T cells: 10*7/kg	24.27 (7.71-66.75)	24.27 (7.71-31.8)	22.87 (13.14-66.75)	0.13
Median CD45+ cells: 10*8/kg	8.76 (4.64-25.36)	8.15 (5.04-16.06)	9.07 (4.64-25.36)	0.33

Abbreviations: AML: acute myeloid leukemia; MDS: myelodysplastic syndrome; ALL: acute lymphoblastic leukemia; HD: Hodgkin disease; NHL: non-Hodgkin lymphoma; CLL: chronic lymphocytic leukemia; pDCs: plasmacytoid dendritic cells; CML: chronic myeloid leukemia; CR: complete remission; PR: partial remission; CMV: cytomegalovirus; inc: incompatibility.



**Table 3: Patient outcomes**

	All patients N=51	inhKIR/HLA inc N=22	No inh KIR/HLA inc N=29	P value
Follow-up: months (range)	21 (3.3-53.9)	23.6 (4.7-52.87)	19.37 (3.3-51.27)	
Median neutrophils recovery >0.5 Giga/L: days (range)	18 (13-30)	18 (13-30)	20 (13-27)	0.25
Median platelets recovery >50 Giga/L: days (range)	27 (9-104)	26 (9-104)	27.5 (16-99)	0.29
Acute GVHD	29 (57%)	16 (72.7%)	13 (44.8%)	0.04
Grade 2	21 (41%)	13 (59%)	8 (25.6%)	0.02
Grade 3	4 (8%)	1 (4.5%)	3 (10.3%)	
Grade 4	4 (8%)	2 (9%)	2 (6.9%)	
Median time of occurrence: days (range)	29 (5.7-121)	30 (5.7-121)	28 (17-59)	0.88
Chronic GVHD			1	
extensive	8 (15.7%)	4 (18.18%)	4 (13.8%)	
Relapse	16 (31%)	3 (13.3%)	13 (44.8%)	0.01
2-year DFS	50.3% (95%CI 38-66)	67.8% (95%CI: 50-90)	37.6% (95%CI: 23-60)	0.03
2-year OS	61.6.0% (95%CI: 49-76)	76.2% (95%CI: 60-96)	51.2% (95%CI: 35-73)	0.04
Deaths	19 (37%)	5 (22.7%)	14 (48.3%)	0.12
Causes of death				0.35
Relapse	11 (58%)	2 (40%)	9 (64.3%)	
Infection	4 (21%)	1 (20%)*	3 (21.4%)**	
GHVD	3 (16%)	2 (40%)	1 (7%)	
dermatomyositis	1 (5%)	1 (5%)	1 (7%)	

\*respiratory syncytial virus

\*\*mucormycosis n=1; toxoplasma gondii n=1; adenovirus+escherichia coli n=1.

Abbreviations: GVHD: graft-versus-host disease, DFS: disease free survival; OS: overall survival.

## Figure legends

**Figure 1: Factors influencing graft outcome.** (A) Comparison of groups of patients treated with clofarabine ( $n=26$ ) or fludarabine ( $n=25$ ) according to GvHD, relapse occurrence and KIR/HLA inc. (B) Comparison of groups of patients with ( $n=16$ ) or without KIR2DL/HLA inc ( $n=35$ ) and (C) with ( $n=22$ ) or without KIR2DL/HLA inc ( $n=29$ ) according to GvHD and relapse occurrence, \* and \*\* indicates respectively  $P<0.05$  and  $P>0.01$ , Student's  $t$  test.

**Figure 2: Reconstitution of KIR NK cell repertoire.** (A) NK cell ( $n=34$ ) and (B) KIR2DL2/3/2DS3<sup>+</sup> ( $n=34$ ), KIR3DL1<sup>+</sup> ( $n=27$ ) and KIR2DL1/S1<sup>+</sup> ( $n=27$ ) NK cell frequencies determined by flow cytometry from graft and recipients following the post transplantation kinetic (days 5, 20, 25, 30, 60 and 100) according to clofarabine versus fludarabine treatment, GvHD, relapse occurrence and KIR/HLA inc. \*, \*\* and \*\*\*\* indicate respectively  $P<0.05$ ,  $P<0.01$  and  $P<0.0001$ , Student's  $t$  test.

**Figure 3: Differentiated status of NK cells from patients developing GvHD.** (A) Both NKp46 and 2B4 NK cell receptors have been investigated during NK cell recovery by flow cytometry. Representative density plots illustrating different stages of NKp46/2B4 NK cell subset from graft to recipient at day 100 through days 19, 24, 26, 28, 32 and 60. (B) Immature 2B4<sup>+</sup> NKp46<sup>-</sup> NK cell subset frequencies and mature CD57<sup>+</sup> and NKG2A<sup>+</sup> NK cell subset frequencies were represented following the post transplantation kinetic (days 5, 20, 25, 30, 60 and 100) according to clofarabine versus fludarabine treatment, GvHD, relapse occurrence and KIR/HLA inc. \* indicates  $P<0.05$ , Student's  $t$  test.

**Figure 4: High expression of activating DNAM-1 and NKG2D receptors around GvHD time point.** (A) The Mean Fluorescent Intensity (MFI) of DNAM-1 and NKG2D expressed on all NK cells were represented following the post transplantation kinetic (days 5, 20, 25, 30,

60 and 100) according to clofarabine versus fludarabine treatment, GvHD, relapse occurrence and KIR/HLA inc. \* indicates respectively  $P < 0.05$ , Student's  $t$  test.

**Figure 5: Lower *ex vivo* degranulation of NK cells from patients developing GvHD. (A)**

The degranulation of recipient NK cells at day 30 (n=27) was assessed against HLA class I deficient 221 cells and compared according to clofarabine versus fludarabine treatment, GvHD, relapse occurrence and KIR/HLA inc. (B) The degranulation of recipient NK cells at day 100 (n=18) was assessed against HLA class I deficient 221 cells, lymphoid acute leukemia H9 cell line and myeloid acute leukemia KG1 cell line and compared according to clofarabine versus fludarabine treatment, GvHD, relapse occurrence and KIR/HLA inc. \* indicates  $P < 0.05$ , Student's  $t$  test. (D).

**Figure 6: Scheme illustrating the impact of KIR/HLA inc. on GvHD and relapse.**

KIR/HLA inc promote activation and proliferation of alloreactive NK cells which are quickly targeted by PTCy. This activated context seems to promote the differentiation and activation of NK cells associated with GvHD and limiting relapse. In parallel, in absence of KIR/HLA inc, quiescent KIR NK cells are not eliminated by PTCy and are not efficient to limit relapse.

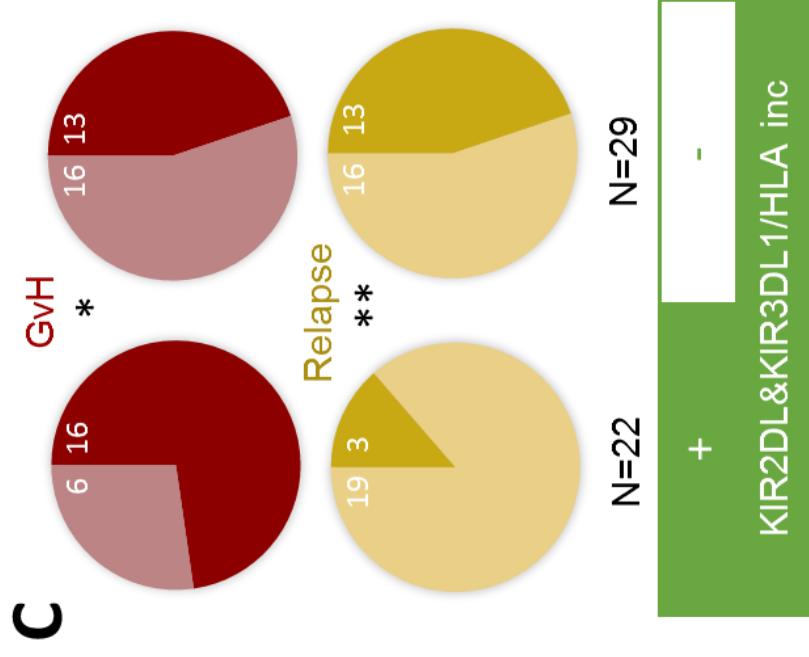
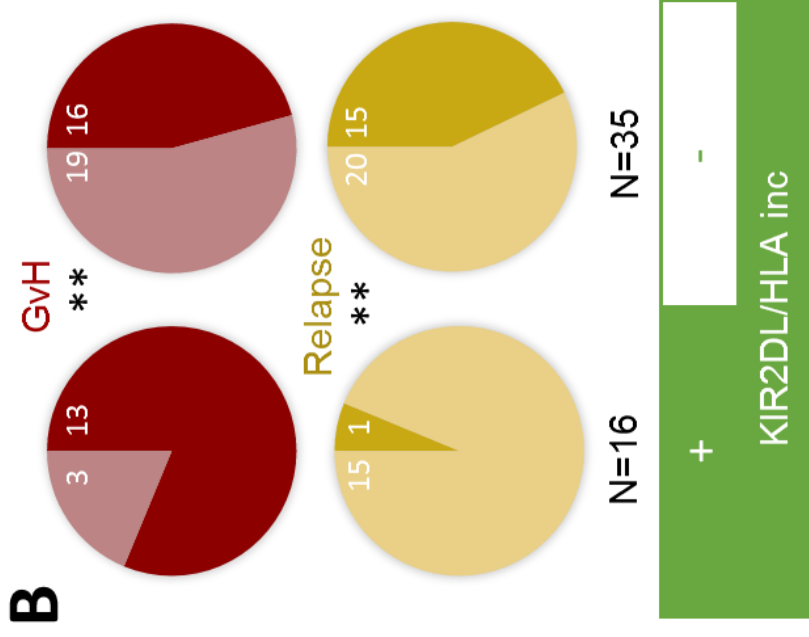
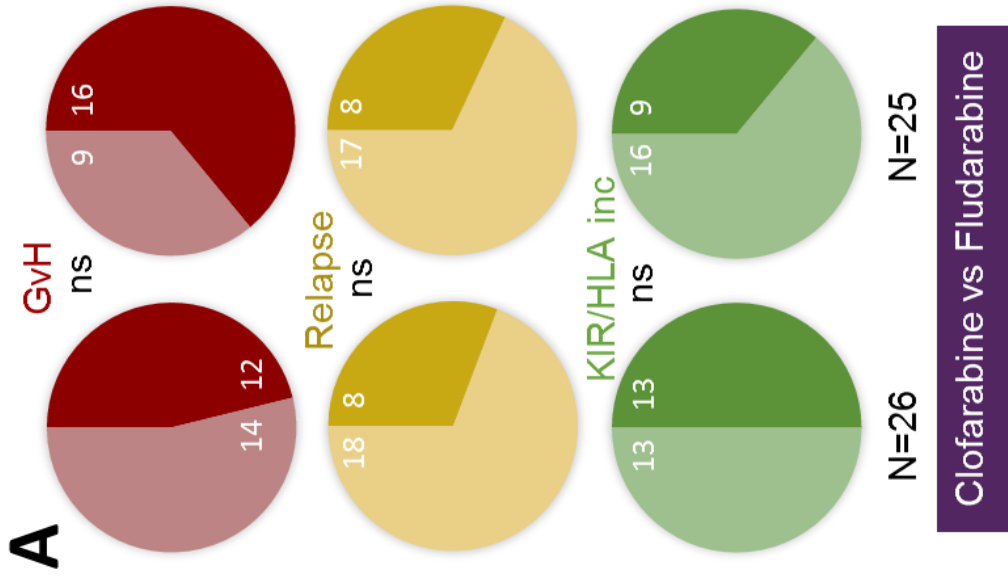


Figure 1

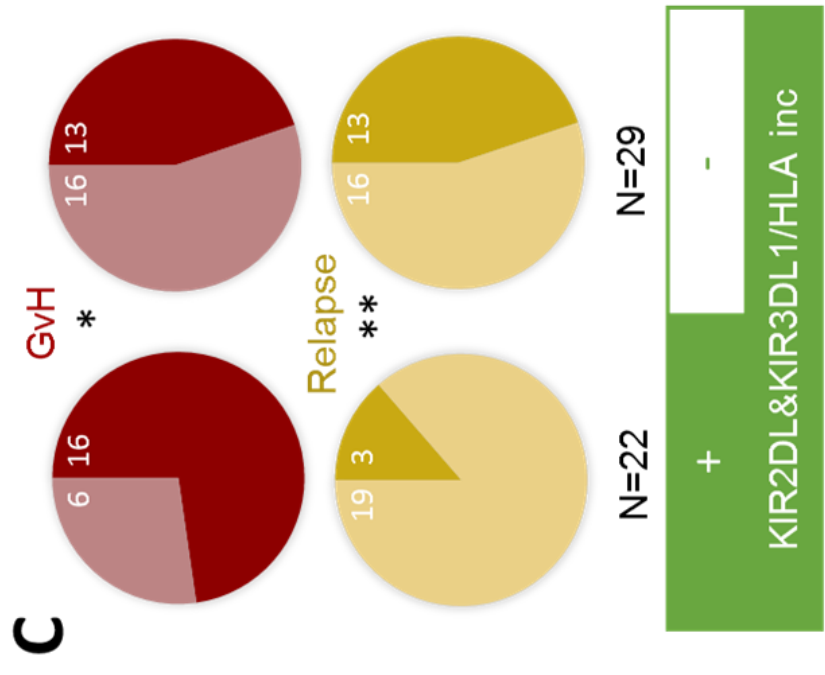
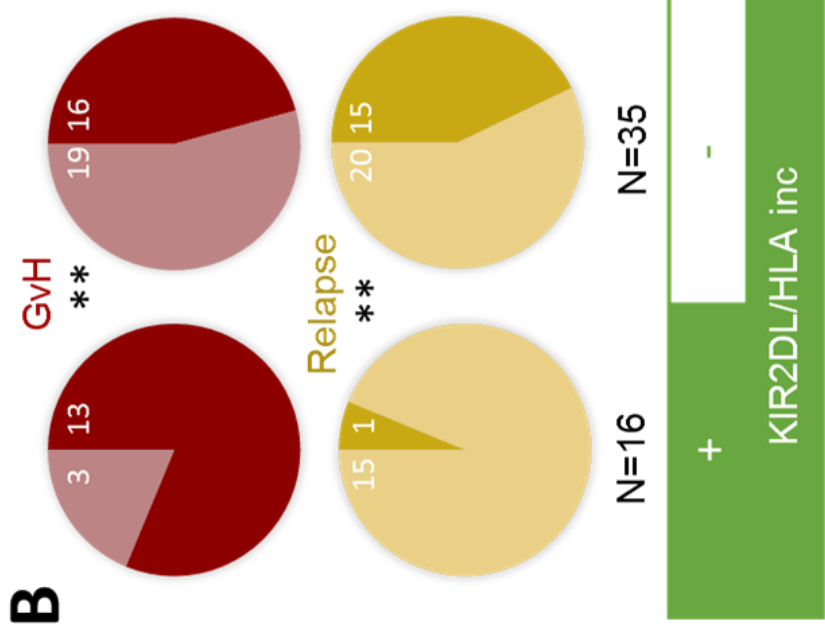
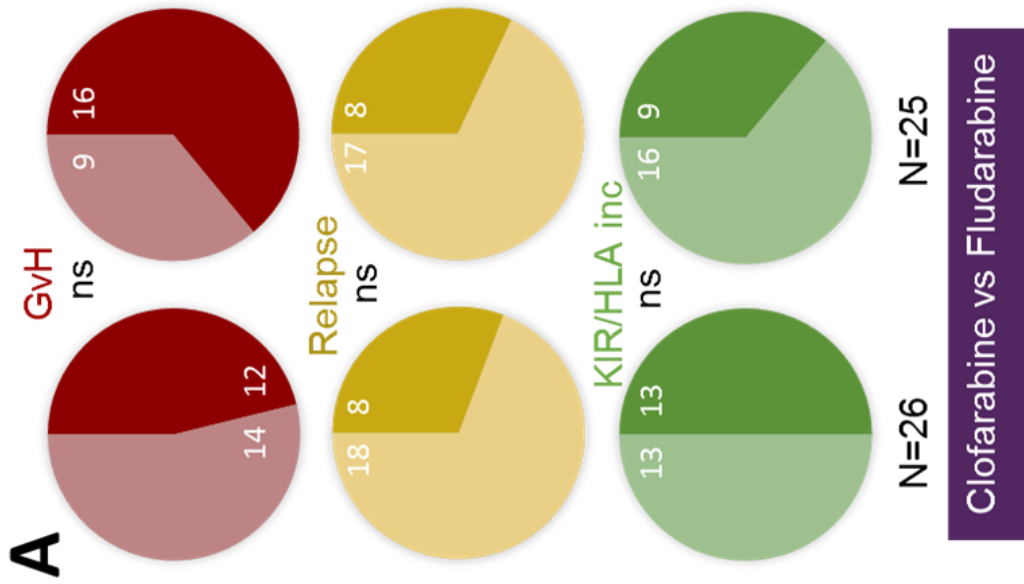


Figure 1

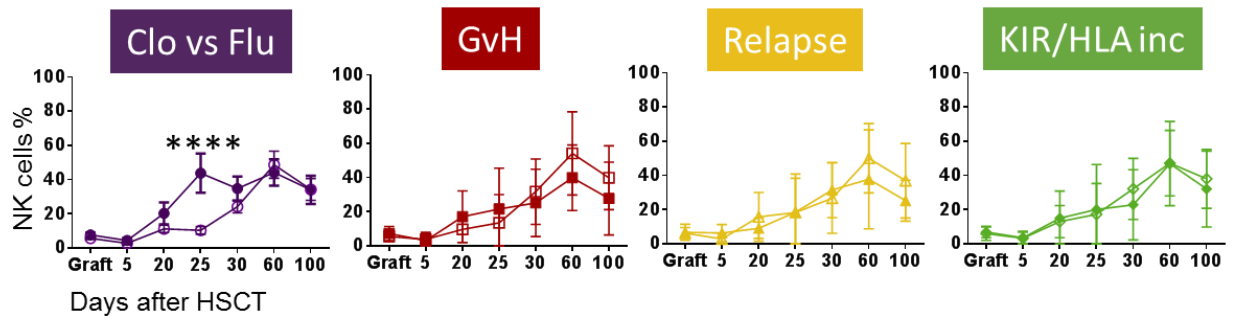
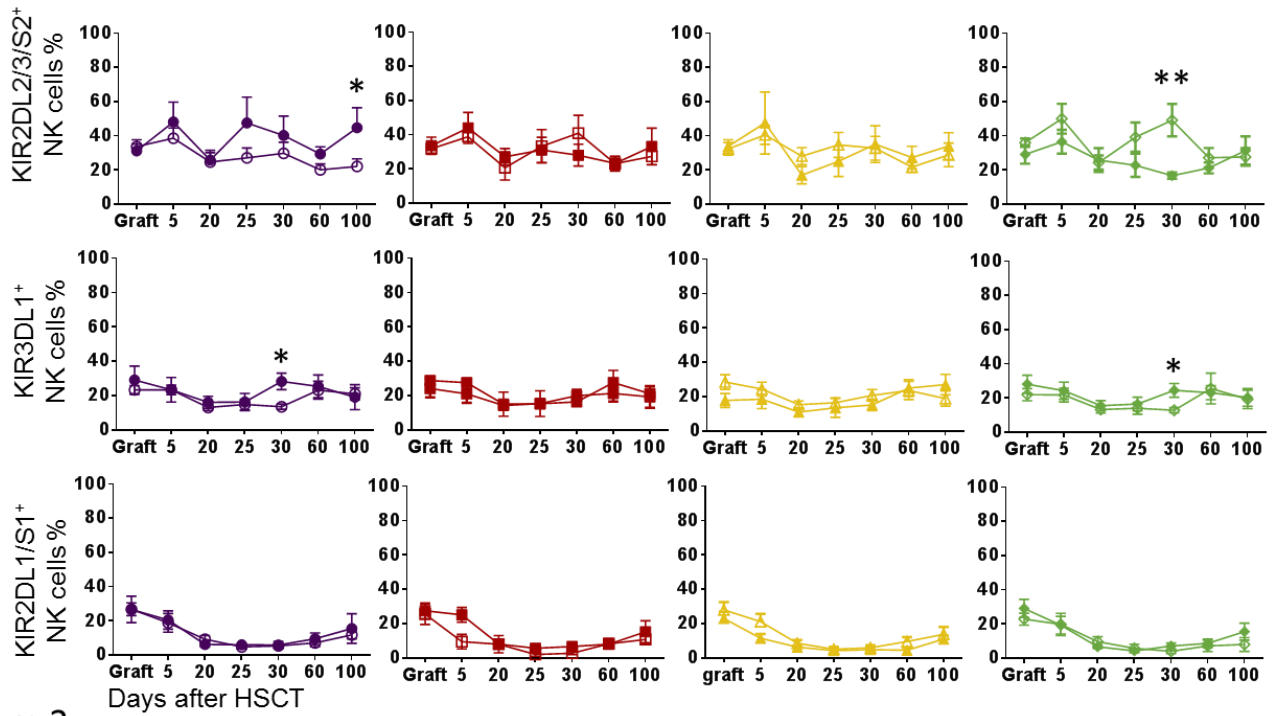
**A****B**

Figure 2

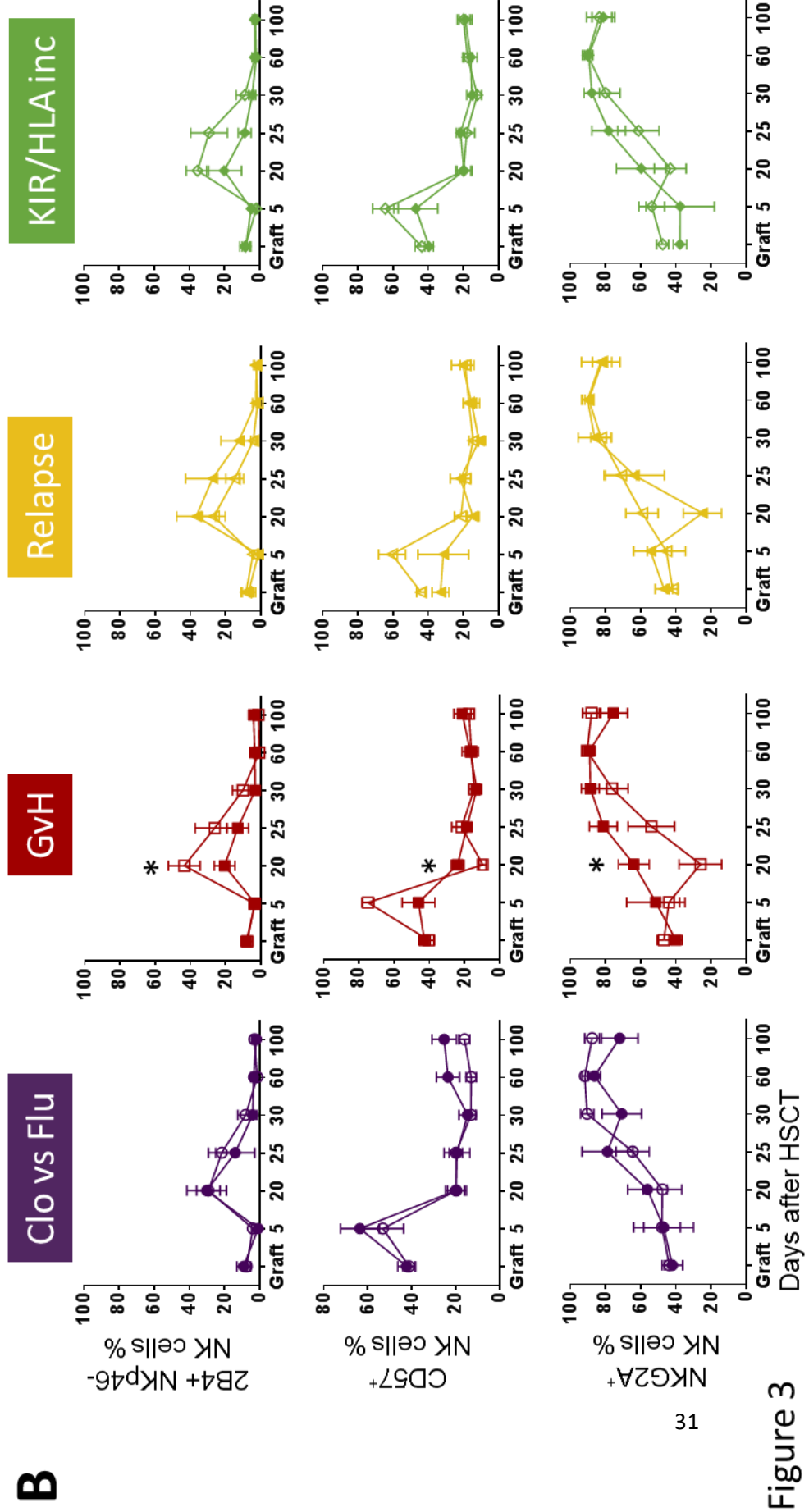
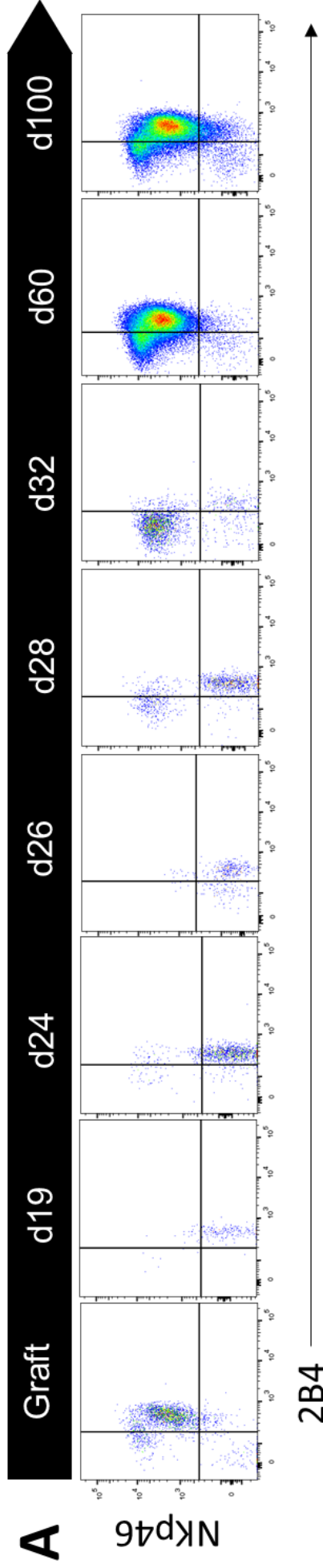


Figure 3

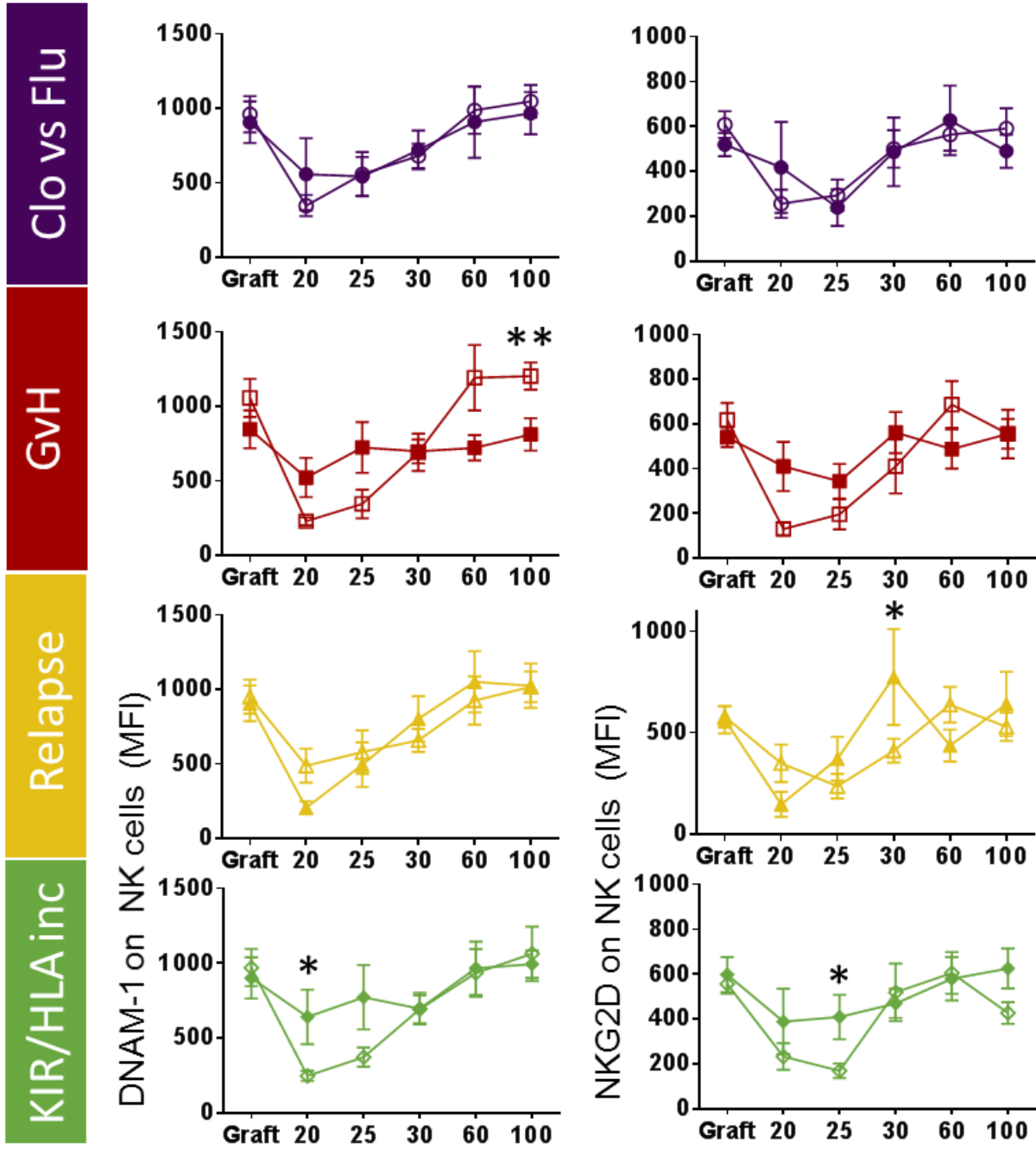
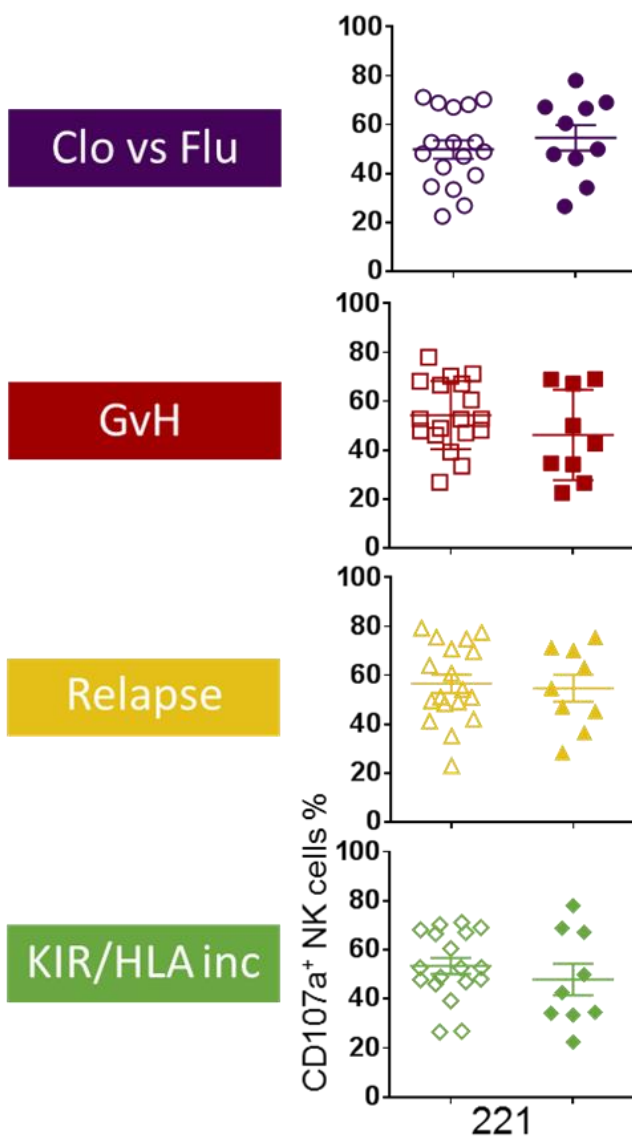
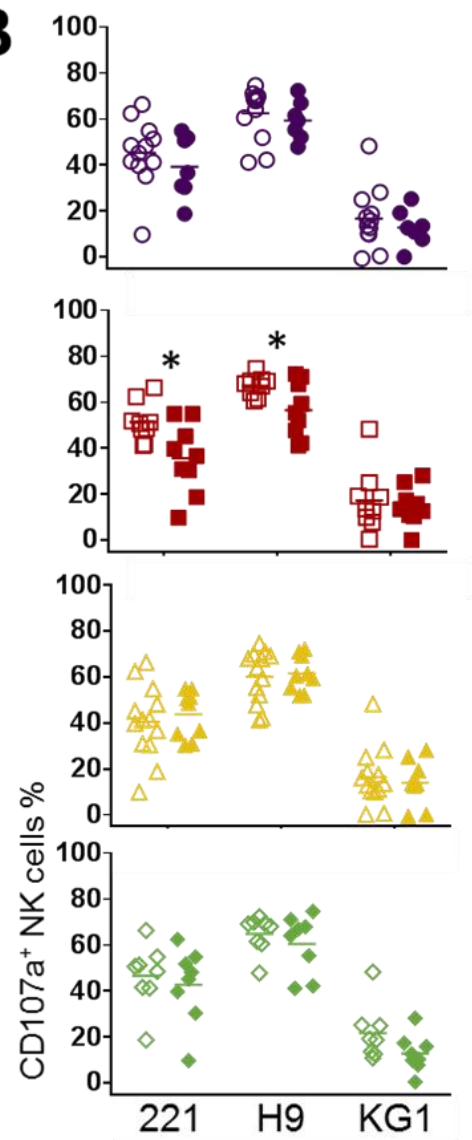
**A**

Figure 4

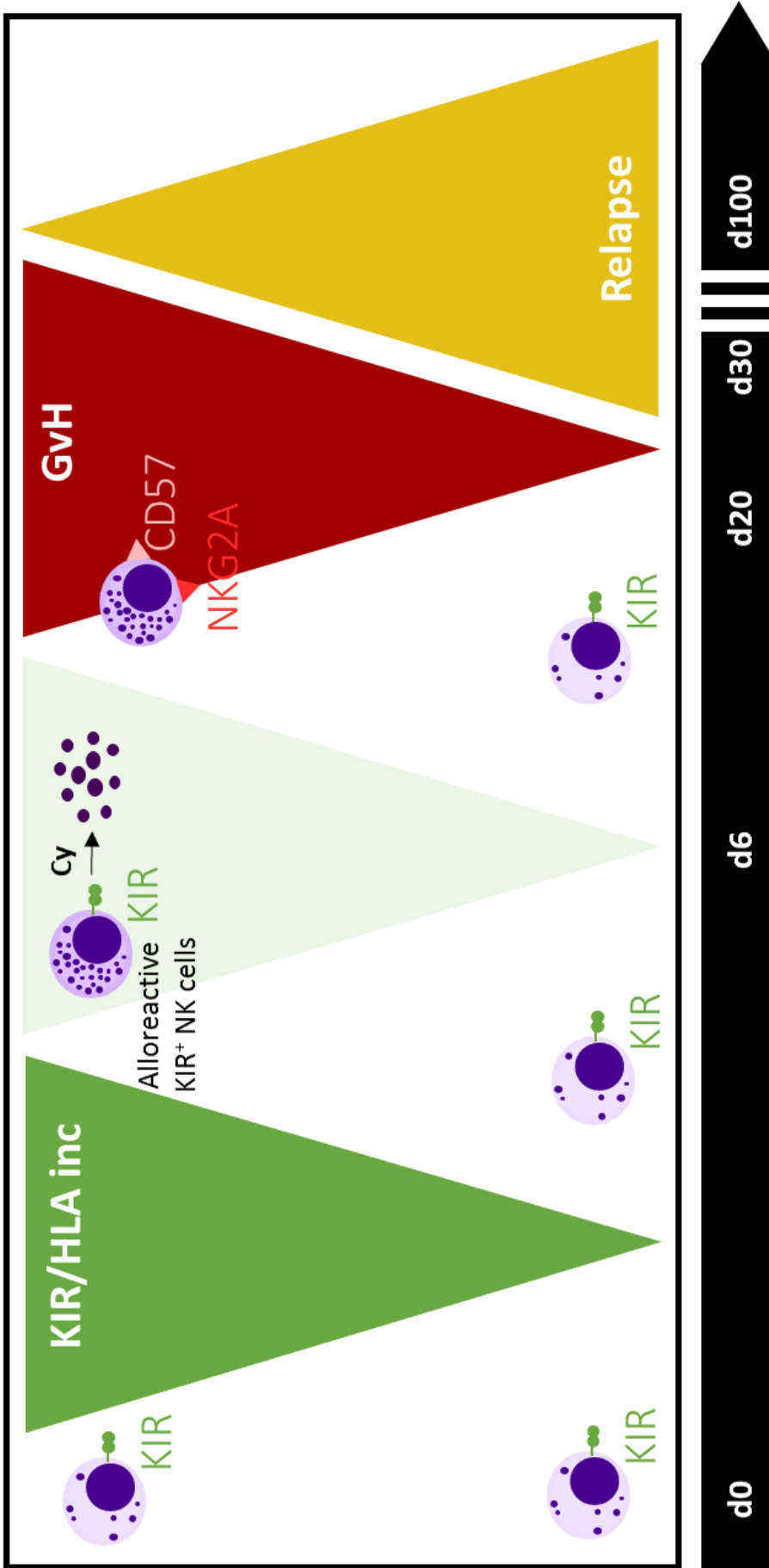


**A****B**

GvH point / d30
d100

Figure 5

Figure 6





## Thèse de Doctorat

**Résumé :** Les cellules Natural Killer (NK) jouent un rôle important en greffes de CSH par leur rôle antileucémique. Les fonctions cytotoxiques des cellules NK sont gouvernées principalement par les récepteurs KIR spécifiques des molécules HLA de classe I. Ces récepteurs inhibiteurs ou activateurs sont codés par 15 gènes KIR connus pour être polymorphes au niveau allélique. Ce polymorphisme allélique peut affecter le phénotype et la fonction des cellules NK mais reste difficile à évaluer. Dans ce projet, nous avons développé une approche de séquençage-nouvelle-génération (NGS) pour déterminer les allèles de tous les gènes KIR de donneurs de sang. Les résultats ont montré la fiabilité de notre approche NGS.KIR pour le typage allélique KIR. Le polymorphisme des allèles KIR2DL1/2/3 a été mis en lien avec le phénotype et la fonction des cellules NK. Nos résultats montrent une diversité limitée d'allèles KIR2DL1, KIR2DL2/L3 qui impactent sur le phénotype et la fonction des sous-populations NK KIR2DL<sup>+</sup>. Le polymorphisme des allèles KIR2DL1/2/3 module également les interactions des récepteurs KIR correspondants avec les molécules HLA-Cw. Ce projet de Thèse contribue à une meilleure connaissance de l'impact du polymorphisme allélique KIR sur la structuration et fonction du répertoire des cellules NK KIR<sup>+</sup>. Ces données permettront d'affiner la sélection des donneurs de greffes de CSH haplo-identiques non T déplétées pour mieux évaluer le rôle de l'alloréactivité des cellules NK KIR<sup>+</sup> sur l'effet antileucémique. La connaissance des allèles KIR peut aussi constituer un outil diagnostique dans certaines infections virales, associations KIR-maladies ou pathologies liées à la grossesse.

**Mots clés :** Cellules NK, récepteurs KIR, Polymorphisme allélique KIR, Séquençage Nouvelle Génération, Intérazions KIR/HLA

**Abstract:**

Natural Killer (NK) cells are large granular lymphocytes able to kill leukemic cells after Hematopoietic Stem Cell Transplantation (HSCT). Their cytotoxic functions are governed by many receptors, especially by the KIR receptors that recognize HLA class I molecules. These inhibitory (KIR2DL, KIR3DL) and activating (KIR2DS, KIR3DS) receptors are encoded by a family of 15 genes known to be polymorphic at allelic level. This allelic polymorphism may impact on NK cell phenotype and function, but remains difficult to evaluate by lack of appropriate methods. In this thesis project, we developed a Next-Generation-Sequencing approach to investigate the KIR allele polymorphism in volunteer blood donors. The results showed the reliability of our NGS approach for KIR allele typing. Then, we correlated the KIR2DL1/2/3 allele polymorphism with the phenotype and function of KIR<sup>+</sup> NK cells. We found a limited diversity of KIR2DL1 and KIR2DL2/3 alleles that impact the phenotype and function of KIR2DL<sup>+</sup> NK cell subsets. This KIR2DL1/2/3 allele polymorphism modulates also the corresponding KIR-HLA-Cw interactions. At the fundamental level, this thesis project improves our knowledge on the impact of KIR allele polymorphism on the structuration and the function of KIR<sup>+</sup> NK cell repertoire. Overall these data can help to refine the HSCT donor selection in the context of T replete haploidentical HSCT to unravel the role of alloreactive KIR<sup>+</sup> NK cells mediating an antileukemic effect. More broadly, the knowledge of KIR alleles may also constitute a diagnostic tool in some viral infections, KIR associated diseases and pregnancy disorders.

**Keywords :** NK cells, KIR receptors, KIR allele polymorphism, Next-Generation-Sequencing, KIR/HLA interactions

**Title :** Etude du polymorphisme allélique KIR pour optimiser la sélection des donneurs en greffes de Cellules Souches Hématopoïétiques (CSH)