

THESE DE DOCTORAT DE

L'UNIVERSITE DE NANTES

ECOLE DOCTORALE N° 605, *Biologie Santé*

Discipline : *Biologie, Médecine, Santé*

Spécialité : « *Immunologie* »

Présentée par

« Dhon Berenger Roméo MAKANGA »

« Contribution à l'étude des fonctions anti-tumorales des cellules Natural Killer (NK) : implication en greffe de cellules souches hématopoïétiques et dans le contexte des immunothérapies »

Thèse présentée et soutenue à « Nantes », le « 17 décembre 2020 »

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

Rapporteurs avant soutenance :

Dr. Laurence Chaperot : Maître de recherche, EFS Auvergne-Rhône-Alpes
Dr. Nicolas Dulphy : MCU-PH, Université de Paris

Composition du Jury :

Président :	Pr. Patrice Chevallier	PU-PH, Université de Nantes
Examineur :	Pr. Gilles Thibault	PU-PH, Université de Tours
Dir. de thèse :	Dr. Christelle Retière	Directeur de recherche, EFS Centre-Pays de la Loire
Encadrante :	Dr. Béatrice Clémenceau	Ingénieur de recherche, PhD, CHU de Nantes

Remerciements

Je tiens tout d'abord à exprimer ma profonde gratitude au Docteur Christelle Retière, ma directrice de Thèse, pour m'avoir accueilli au sein de son équipe de recherche, pour sa confiance, sa disponibilité, son soutien et ses précieux conseils ayant permis la réalisation de ce travail. J'aimerais également remercier le Docteur Béatrice Clémenceau d'avoir accepté d'être co-encadrante de cette Thèse, pour la collaboration et pour la relecture de ce manuscrit de Thèse.

J'adresse mes sincères remerciements :

- Aux Docteurs Frédéric Dehaut et Frédéric Bigey, Directeurs successifs de l'établissement Français du sang Centre-Pays de la Loire (EFS-CPDL) et à Monsieur Emmanuel Rivery, Directeur du site de l'EFS-Nantes Hôtel-Dieu, pour l'accueil au sein de l'EFS.
- A l'Association Nationale de la Recherche Technologique (ANRT) pour le financement CIFRE dont j'ai bénéficié pour la réalisation de ce travail.
- Au Professeur Patrice Chevallier pour avoir accepté de présider mon jury de Thèse et au Professeur Gilles Thibault pour avoir accepté de l'examiner.
- Aux Docteurs Laurence Chaperot et Nicolas Dulphy pour l'honneur que vous me faites en acceptant de juger ce travail et d'en être rapporteurs.
- Au Docteur Katia Gagne, pour sa bonne humeur, ses conseils, ses encouragements et pour la relecture de ce manuscrit de Thèse.
- Aux Docteurs Catherine Pellat et Fabienne Haspot, pour leurs échanges lors de mes comités de Thèse.
- Aux techniciennes de laboratoire Gaëlle David, Catherine Willem et Nolwenn Legrand pour leurs collaborations, le partage du savoir-faire, leurs implications dans ce travail et pour leur soutien amical.
- Au Docteur Bercelin Maniangou, à Léa Dubreuil et Francesca Da Rin de Lorenzo, pour leur soutien amical et les bons moments passés ensemble durant ma thèse à l'EFS Nantes.
- Aux membres de l'équipe 1 INSERM U1232 du CRCINA et en particulier au Docteur Emmanuel Scotet, pour l'accueil au sein de l'équipe, au Docteur Henri Vié et à Jocelyn Ollier pour la collaboration.

- A toute l'équipe du laboratoire HLA et à tous les salariés de l'EFS avec qui j'ai pu avoir des échanges tout au long de ces trois années.
- Au personnel médical et paramédical du service d'Hématologie clinique du CHU de Nantes et en particulier au Docteur Maxime Jullien, pour le travail réalisé ensemble.

A ma petite femme,

Merci de m'avoir épaulé durant toutes ces années. J'arrive au but et c'est aussi grâce à toi. Merci pour ton soutien, ta patience et pour ta compréhension. Je dédie ce travail à notre petite fille, Zoé.

Je ne saurais terminer ces remerciements sans exprimer ma profonde gratitude à mon père et ma mère, pour leur soutien malgré la distance, à ma famille et à tous mes proches.

TABLE DES MATIERES

LISTE DES ABREVIATIONS.....	1
LISTE DES FIGURES.....	4
INTRODUCTION GENERALE.....	5
I. Immunité innée et adaptative.....	6
1. Les effecteurs cellulaires de l'immunité innée et adaptative.....	6
2. Le système HLA (Human Leucocyte Antigen).....	10
II. Les cellules Natural Killer (NK).....	15
1. Les récepteurs NK.....	17
1.1. Les récepteurs KIR (Killer cell Immunoglobulin-like Receptors).....	20
1.1.1. Structure protéique, nomenclature et signalisation des KIR.....	20
1.1.2. Ligands des récepteurs KIR.....	23
1.1.3. Les gènes KIR.....	27
1.1.4. Expression des gènes KIR.....	31
1.2. Les récepteurs de la famille ILT (Immunoglobulin-Like transcript).....	32
1.3. Les hétérodimères CD94/NKG2.....	33
1.4. Le récepteur NKG2D.....	34
1.5. Les récepteurs de cytotoxicité naturelle (NCR)	35
1.5.1. NKp46.....	36
1.5.2. NKp44.....	37
1.5.3. NKp30.....	38
1.6. Le récepteur 2B4.....	39
1.7. Le récepteur DNAM-1 (DNAX-Accessory Molecule 1).....	41
1.8. Le récepteur CD16 (FcγRIIIa).....	43
1.9. Les Toll-Like Receptors (TLR).....	43
1.10. Autres récepteurs inhibiteurs NK non restreints par les molécules HLA	44
1.11. Les récepteurs de co-stimulation et les molécules d'adhésion.....	47
1.12. Les récepteurs de cytokines.....	47
1.13. Les récepteurs impliqués dans la circulation des cellules NK.....	49
2. Le développement des cellules NK.....	50
2.1. Sites et étapes de développement des cellules NK.....	50
2.2. La mémoire des cellules NK.....	56
2.3. Les cellules lymphoïdes innées (ILC).....	57
3. L'éducation des cellules NK et l'acquisition de la tolérance au soi.....	59
4. Les grandes fonctions des cellules NK.....	65
4.1. La cytotoxicité.....	66
4.1.1. La lyse spontanée.....	66
4.1.2. La cytotoxicité dépendante de l'anticorps (ADCC).....	69
4.2. La production de cytokines.....	69
4.3. La prolifération des cellules NK.....	70

III. Rôle des cellules NK dans l'immunité.....	72
1. Cellules NK et immunité anti-tumorale.....	73
1.1. Rôle des cellules NK dans l'immunosurveillance tumorale.....	73
1.2. Mécanismes d'échappement tumoral aux cellules NK.....	77
2. Cellules NK et immunité anti-infectieuse.....	80
2.1. Rôle des cellules NK dans l'immunité antivirale.....	80
2.1.1. Rôle des cellules NK dans l'infection par le CMV (Cytomégalovirus)..	81
2.1.2. Cellules NK et VIH (Virus de l'Immunodéficience Humaine).....	83
2.2. Rôle des cellules NK dans l'immunité antibactérienne.....	85
3. Rôle des cross-talks NK/DC dans les réponses immunitaires.....	86
4. Rôle des cellules NK dans les maladies auto-immunes.....	87
5. Rôle des cellules NK dans la reproduction.....	91
IV. Cellules NK et greffe de cellules souches hématopoïétiques (CSH).....	93
1. Les greffes de CSH.....	93
2. Compatibilité HLA et sélection des donneurs de CSH.....	94
3. Les greffes de CSH haplo-identiques.....	97
4. Rôle des KIR en greffes allogéniques de CSH.....	104
5. Immunothérapies en greffe de CSH.....	108
5.1. Transfert adoptif de cellules NK alloréactives.....	109
5.2. Administration de cytokines pour renforcer l'allo-réactivité des cellules NK.....	110
5.3. Exploitation des cellules NK mémoires en greffe de CSH.....	111
5.4. Infusion des CAR-NK cells.....	112
5.5. Ciblage des points de contrôle inhibiteurs pour améliorer l'effet GvL.....	114
5.6. Exploitation de l'ADCC avec les anticorps monoclonaux, les BiKE et les TriKE.....	116
OBJECTIFS DES TRAVAUX DE THESE.....	119
RESULTATS.....	124
ARTICLE N°1: Impact of KIR/HLA Incompatibilities on NK Cell Reconstitution and Clinical Outcome after T Cell–Replete Haploidentical Hematopoietic Stem Cell Transplantation with Posttransplant Cyclophosphamide.....	125
ARTICLE N°2: Genetic and Molecular Basis of Heterogeneous NK Cell Responses against Acute Leukemia.....	143
ARTICLE N°3: Posttransplant Cyclophosphamide and Antithymocyte Globulin versus Posttransplant Cyclophosphamide as Graft-versus-Host Disease Prophylaxis for Peripheral Blood Stem Cell Haploidentical Transplants: Comparison of T Cell and NK Effector Reconstitution.....	170
ARTICLE N°4: Low number of KIR ligands in lymphoma patients favors a good rituximab-dependent NK cell responses.....	184
DISCUSSION ET PERSPECTIVES.....	245

BIBLIOGRAPHIE.....	262
ANNEXE.....	299

Liste des abréviations

ABM : Agence de la Biomédecine
ADCC : Antibody Dependent Cellular Cytotoxicity
ADN : Acide Desoxyribonucléique
AICL : Activation-Induced C-type Lectin
ATG : Anti-thymoglobuline
B2m : Beta-2 microglobuline
BAT-3 : HLA-B Associated Transcript 3
BCR : B Cell Receptor
BiKE : Bi-specific Killer-cell Engager
CAR: Chimeric Antigen Receptor
CD : Cluster de différenciation
CFP : Complement Factor P
CILP : Common Immune Lymphoid Precursor
CLP : Common Lymphoid Progenitor
CMV : Cytomégalovirus
CMH : Complexe Majeur d'Histocompatibilité
CPA : Cellules Présentatrices d'Antigènes
CSH: Cellules Souches Hématopoiétiques
DAMP : Dammage Associated Molecular Patterns
DC : Dendritic cell
DNAM-1 : DNAX Accessory Molecule 1
G-CSF : Granulocyte Colony-Stimulating Factor
GM-CSF : Granulocyte Monocyte Colony-Stimulating Factor
GvH : Graft-Versus-Host
GvHD : Graft-Versus-Host Disease
GvL: Graft-Versus-Leukemia
GvT : Graft-versus-Tumor
HLA : Human Leukocyte Antigen

HSPC : Proteoglycane héparane sulfate
HSCT : Hematopoietic Stem Cell Transplantation
ICAM : Inter-Cellular Adhesion Molecule
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 : Immune tyrosine-based Inhibitory Motif
ITSM : Immunoreceptor Tyrosine-based Switch Motif
KIR : Killer Cell Immunoglobulin-like Receptor
LTi : Lymphoid tissue inductor
LAL : Leucémie Aigüe Lymphoblastique
LAM : Leucémie Aigüe Myéloïde
LFA-1 : Leucocyte Function-Associated Antigen 1
LLT : Lectin-Like Transcript
LMC : Leucémie Myéloïde Chronique
LRC : Leucocyte Receptor Complex
LLC : Leucémie Lymphoïde Chronique
MAC: Myeloablative conditioning
MAIT : Mucosa Associated Invariant T cells
MIC-A, -B: MHC class I related protein A, B
MDS : Myelodysplastic Syndrom
MDSC: Myeloid-Derived Suppressor Cells
MLL5 : Mixed Lineage Leukemia-5
NCR : Natural Cytotoxicity Receptor
NK : Natural Killer

NKC: Natural Killer Complex
NKG2 : Natural Killer Group 2
NKP : Natural Killer Progenitor
NKT : NK-like T cell
NOD : None Obese Diabetic
NLR : Nucleotide-binding domain and Leucin-rich repeat-containing Receptors
NRM : Non Relapse Mortality
PAMP : Pathogen-associated molecular patterns
PBMC: Peripheral Blood Mononuclear Cell
PBSC: Peripheral Blood Stem Cell
PCR : Polymerase Chain Reaction
PCNA : Proliferating Cell Nuclear Antigen
PRR : Patterns Recognition Receptors
PTCy : Cyclophosphamide Post-transplant
RIC : Reduced Intensity Conditioning
RLR : Retinoic acide-inducible gene I (RIG-I)-Like Receptors
SAP : SLAM Associated Protein
SCID : Severe Combined Immuno-Deficient
SIDA : Syndrome de l'Immunodéficience Acquise
SLAM : Signaling Lymphocyte Activation Molecule
TCR : T Cell Receptor
TGF β : Transforming Growth Factor Beta
TLR : Toll-like Receptor
TNF : Tumor Necrosis Factor
TRAIL : TNF related Apoptosis Inducing Ligand
TriKE : Tri-Specific Killer-cell Engager
TRM : Transplant Related Mortality
ULBP : UL16 Binding Protein
VHC : Virus de l'Hépatite C
VIH : Virus de l'Immunodéficience Humaine

Liste des figures

Figure 1 : Les acteurs cellulaires de l'immunité innée et de l'immunité adaptative.....	8
Figure 2 : Le système HLA.....	11
Figure 3 : Structure des molécules HLA de classe I et de classe II.....	12
Figure 4 : Principaux récepteurs inhibiteurs et activateurs des cellules NK.....	19
Figure 5 : Structure des récepteurs KIR.....	22
Figure 6 : Les récepteurs KIR et leurs ligands.....	26
Figure 7 : Organisation des gènes KIR et haplotypes KIR.....	28
Figure 8 : Expression clonale des récepteurs KIR à la surface des cellules NK.....	32
Figure 9 : Les récepteurs de cytokines associés à la chaîne γ commune (γ_c).....	48
Figure 10 : Modèle de développement linéaire des cellules NK humaines.....	52
Figure 11 : Classification des Cellules Lymphoïdes Innées (ILC).....	58
Figure 12 : Modèles de l'éducation des cellules NK.....	64
Figure 13 : Activation des cellules NK dans différents contextes pathologiques.....	73
Figure 14 : Evolution des greffes alternatives adultes et pédiatriques dans les centres francophones.....	100
Figure 15 : L'alloréactivité des cellules NK en greffe de CSH haplo-identique.....	107
Figure 16 : Impact des incompatibilités KIR/HLA sur la GvHD et la rechute après greffes de CSH haplo-identiques T-déplétées avec PTCy.	129
Figure 17 : Bases génétiques et moléculaires des réponses anti-leucémiques des cellules NK.....	148
Figure 18: Influence du nombre de ligands KIR et de la fréquence des cellules NK sur la dégranulation des cellules NK dépendante du rituximab.....	188

INTRODUCTION GENERALE

I. Immunité innée et adaptative

Le système immunitaire est un ensemble de cellules, de tissus et d'organes qui assurent la défense de l'organisme contre les dommages causés par les antigènes qui peuvent être exogènes ou endogènes (Matzinger, 2002). Ce système comprend le système lymphatique, les cellules de défense et les différentes molécules que ces cellules sont susceptibles de produire. Chez les vertébrés, deux types d'immunités sont utilisés pour protéger l'hôte contre le danger : l'immunité innée et l'immunité adaptative. Les cellules de l'immunité innée et adaptative sont dotées de récepteurs leur permettant de discriminer le soi (antigènes endogènes) du non soi (antigènes exogènes).

1. Les effecteurs cellulaires de l'immunité innée et adaptative

L'immunité innée ou naturelle est considérée comme la première ligne de défense contre les agressions des tissus sains par les microorganismes. Les effecteurs cellulaires mis en place par le système immunitaire inné comprennent les cellules dendritiques (DC), les monocytes/macrophages, les polynucléaires neutrophiles, les polynucléaires éosinophiles, les mastocytes, les lymphocytes Natural Killer (NK), les lymphocytes NKT invariants, les lymphocytes $T\gamma\delta$ et les cellules T invariantes associées aux muqueuses (MAIT) (Iwasaki and Medzhitov, 2010). Le système immunitaire inné est génétiquement programmé pour détecter les motifs conservés des pathogènes qui infectent les tissus sains de l'hôte à travers une famille de récepteurs dont les mieux caractérisés sont connus sous le nom de PRR (Patterns Recognition Receptors). Cette reconnaissance est donc non spécifique et limitée. En effet, les PRR détectent les motifs moléculaires invariants associés aux pathogènes appelés PAMP (Pathogen-Associated Molecular Patterns), qui constituent les signaux de danger exogènes, et les motifs moléculaires associés aux dommages cellulaires et tissulaires appelés DAMP

(Damage-Associated Molecular Patterns), qui constituent les signaux de danger endogènes. Les PRR confèrent aux cellules de l'immunité innée la capacité de reconnaissance et d'élimination rapide des pathogènes. Les PRR constituent une grande famille de récepteurs de l'immunité innée et comprennent les familles de récepteurs suivants : les TLR (Toll-Like Receptors) et les lectines de type C qui sont transmembranaires ; les RLR (Retinoic Acide-Inducible Gene I (RIG-I)-like receptors) et les NLR (Nucleotide-binding domain and Leucine-rich repeat-containing Receptors) qui sont cytosoliques.

La réponse immunitaire innée induit une réponse inflammatoire. En effet, lorsque les cellules de l'immunité innée (monocytes/macrophages, neutrophiles, DC) reconnaissent les cellules infectées par un pathogène, elles répondent en les capturant par phagocytose, endocytose ou pinocytose, ce qui active les voies de signalisation conduisant à la production des cytokines inflammatoires (IL-1, TNF- α , IL-6, IFN- α et IFN- β) et des chimiokines. Ces médiateurs solubles inflammatoires activent et recrutent les autres cellules de l'immunité innée et adaptative sur le site inflammatoire. Les lymphocytes NK sont des cellules cytotoxiques de l'immunité innée qui utilisent un ensemble de récepteurs codés par la lignée germinale pour reconnaître et éliminer les cellules tumorales ou infectées par des pathogènes intracellulaires. Grâce à la production de cytokines (telles que IFN- γ , TNF- α), les cellules NK jouent un rôle central dans la régulation du cross-talk avec les DC et les neutrophiles pour favoriser ou inhiber les réponses immunitaires innées et adaptatives. Par ailleurs, plusieurs types de lymphocytes T fonctionnent comme des cellules innées dans certains tissus. Ces cellules comprennent les cellules NKT, les MAIT et différentes sous-populations de cellules T $\gamma\delta$ (Mueller and Mackay, 2016). Grâce à la production des facteurs solubles dans les réponses immunitaires innées précoces, ces populations lymphocytaires, y compris les cellules NK, sont à l'interface entre l'immunité innée et l'immunité adaptative (Figure 1).

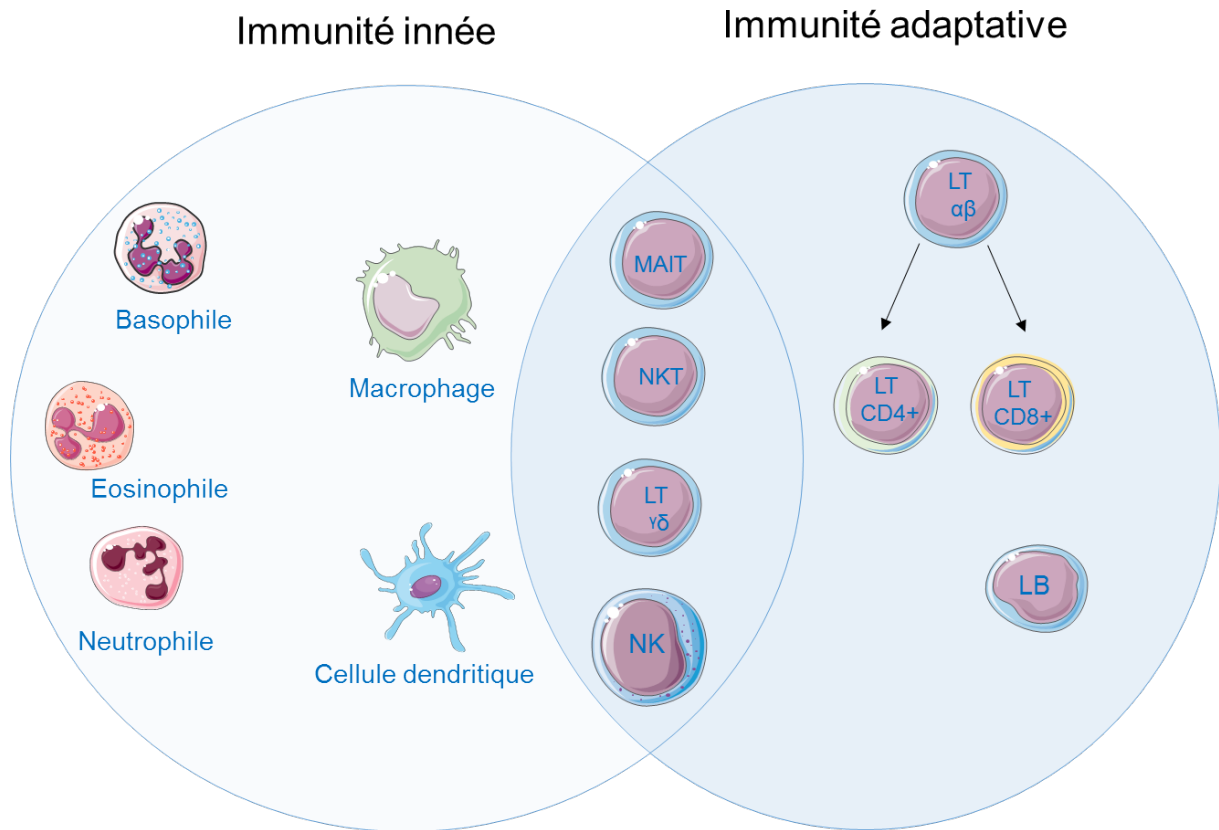


Figure 1 : Les acteurs cellulaires de l'immunité innée et de l'immunité adaptative.

La réponse immunitaire innée est précoce et est assurée par les cellules dendritiques (DC), les macrophages, les granulocytes (neutrophiles, eosinophiles, basophiles), les cellules NK, les lymphocytes $T\gamma\delta$, les cellules NKT et les MAIT. La réponse immune adaptative, qui est tardive et spécifique, est principalement assurée par les lymphocytes $T\alpha\beta$ ($CD4^+$ et $CD8^+$) et par les lymphocytes B qui produisent les anticorps. Les DC peuvent produire les cytokines (IL-12, IL-15 et IL-18) qui activent les fonctions effectrices des cellules NK. En réponse à ces cytokines, les cellules NK peuvent sécréter les cytokines pro-inflammatoires $IFN-\gamma$ et $TNF-\alpha$ qui stimulent les réponses immunes adaptatives médiées par lymphocytes T et B.

L'immunité adaptative est principalement assurée par les lymphocytes T et B. La réponse des lymphocytes T et B prend plusieurs jours avant de se mettre en place car ces cellules doivent subir une expansion clonale pour devenir opérationnelles et développer une mémoire spécifique à l'antigène. Les lymphocytes T se développent dans le thymus et les lymphocytes B se développent au niveau de la moelle osseuse. Les lymphocytes sont très mobiles. Après leur développement dans les organes lymphoïdes primaires (thymus et moelle osseuse), ils migrent vers les organes lymphoïdes secondaires, comprenant les ganglions

lymphatiques et la rate, dans lesquels les lymphocytes peuvent capturer les antigènes circulant à travers la lymphe ou le sang périphérique, respectivement. La réponse immune adaptative commence sur ces sites, souvent sous l'influence des signaux du système immunitaire inné mis en place soit directement par les antigènes circulants, soit indirectement à travers les cellules cutanées activées par les pathogènes ou par les cellules présentatrices d'antigènes (CPA) des muqueuses (DC, macrophages) migrant dans les organes lymphoïdes secondaires. Les lymphocytes peuvent migrer des organes lymphoïdes secondaires vers différents sites de l'organisme pour exercer leur fonction effectrice (Bonilla and Oettgen, 2010). Cette migration des cellules de l'immunité adaptative est régulée par un large panel de molécules d'adhésion et des récepteurs de chimiokines.

Le système immunitaire adaptatif, composé des lymphocytes T et B, utilise les récepteurs d'antigènes qui ne sont pas codés par la lignée germinale, mais qui sont générés de novo dans chaque organisme. En effet, la réponse immune adaptative est hautement spécifique et permet la reconnaissance d'un large panel d'antigènes. Après une première rencontre des antigènes par les lymphocytes T et B, ces récepteurs immunitaires peuvent persister chez l'hôte toute la vie, mettant en place une mémoire immunologique et la capacité de reconnaissance rapide en cas d'une nouvelle exposition aux mêmes antigènes. L'immunité adaptative implique une interaction étroitement régulée entre les cellules CPA et les lymphocytes T et B, qui facilitent les voies effectrices spécifiques aux pathogènes, la génération d'une mémoire immunologique et la régulation de l'homéostasie immunitaire de l'hôte (Bonilla and Oettgen, 2010). Les récepteurs des lymphocytes B (BCR) qui sont des immunoglobulines membranaires, reconnaissent les antigènes circulants et activent leur différenciation en plasmocytes spécialisés dans la production des immunoglobulines solubles, dites anticorps, spécifiques du même type d'antigènes. Les anticorps sont capables de neutraliser les antigènes circulants dans le milieu extracellulaire. Les récepteurs des

lymphocytes T (TCR) reconnaissent les peptides antigéniques présentés via les molécules du CMH (Complexe Majeur d'Histocompatibilité) à la surface des CPA ou des autres cellules de l'organisme transformées ou infectées par des pathogènes. Cette interaction entre le TCR et le complexe CMH/peptide stimule la différenciation des lymphocytes T naïfs en lymphocytes T effecteurs et mémoires.

2. Le système HLA (Human Leucocyte Antigen)

Les loci génétiques impliqués dans le rejet d'organes étrangers sont connus sous le nom de Complexe Majeur d'Histocompatibilité (CMH) et les molécules de surfaces cellulaires hautement polymorphes chez l'homme sont codées par le système HLA (Human Leukocyte Antigen). Les antigènes HLA ont été identifiés et caractérisés pour la première fois en utilisant les alloanticorps dirigés contre les leucocytes humains, issus des femmes multipares ou des patients ayant été transfusés plusieurs fois (Dausset, 1958). Parmi les scientifiques ayant contribué à la découverte des antigènes HLA, Jean Dausset reçut le prix Nobel de Médecine en 1980 pour sa découverte du premier antigène HLA. Le système HLA a bien été initialement considéré comme un ensemble d'antigènes impliqués dans la transplantation d'organes et de cellules souches hématopoïétiques (CSH), mais il intervient aussi dans la régulation des réponses immunes et certaines associations HLA-maladies.

Le système HLA est localisé au niveau du bras court du chromosome 6 (6p21) et s'étend sur approximativement près de 3.600 kilobases. Le système HLA est divisé en 3 régions : la région HLA de classe I, la région HLA de classe II et la région HLA de classe III (Figure 2). La région HLA de classe I contient les gènes HLA-A, HLA-B et HLA-C classiques qui codent les chaînes lourdes des molécules HLA de classe I, et les gènes HLA de

classe I non classiques, HLA-E, HLA-F et HLA-G qui codent les molécules HLA de classe I non classiques.

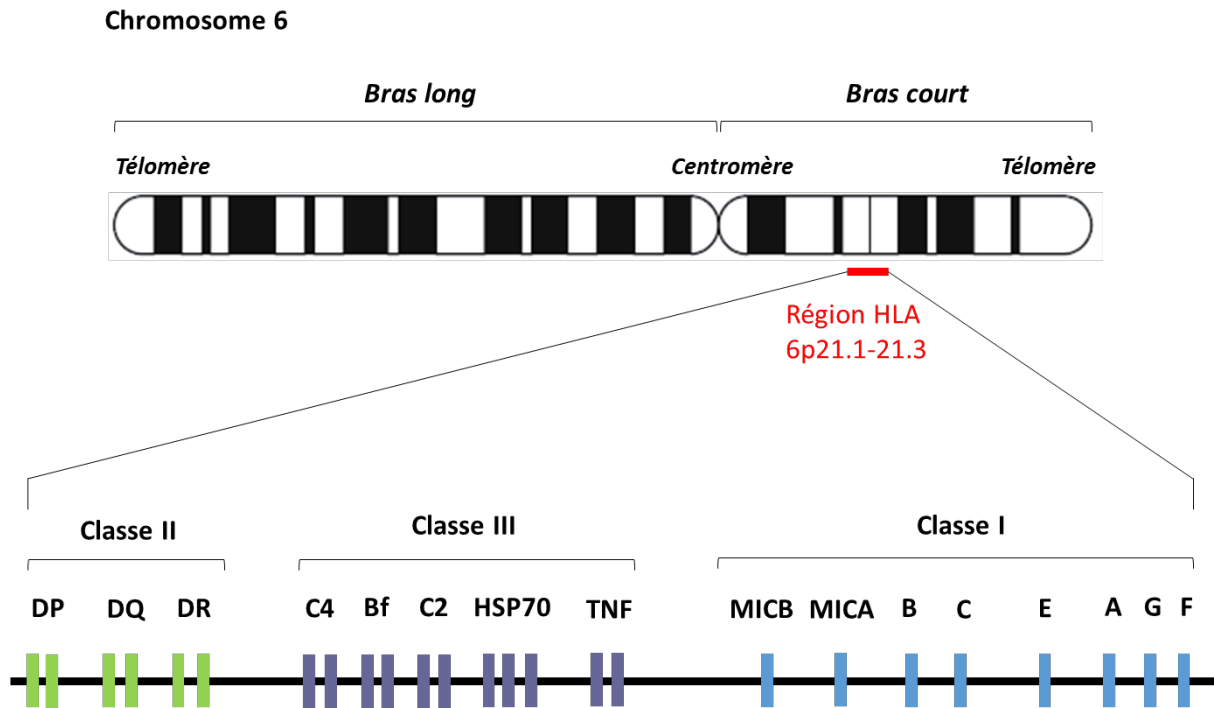


Figure 2 : Le système HLA.

Le complexe HLA est situé sur le bras court du chromosome 6 humain. Il est constitué des gènes HLA de classe I, de classe II et de classe III. La région HLA de classe I comprend les gènes HLA classiques (HLA-A, -B, -C) et non classiques (HLA-E, -F, -G) ainsi que les gènes MICA-A et MIC-B. La région HLA de classe II comprend les gènes HLA classiques (HLA-DP, DQ, DR) et non classiques, non représentés sur cette figure. La région HLA de classe III comprend les gènes codant des protéines du complément (C2, C4), les protéines de choc thermique (HSP70) et les TNF (inspiré de Mehra and Kaur 2003).

Chaque molécule HLA de classe I est composée d'une chaîne lourde α , associée de façon non-covalente à une chaîne légère, la β 2-microglobuline. La chaîne α est constituée de 3 domaines extracellulaires (α 1, α 2, α 3) et d'un domaine transmembranaire (Figure 3). Les domaines α 1 et α 2 constituent la poche de fixation de peptides antigéniques, permettant à la molécule HLA de classe I de se lier à des peptides de 8 à 10 acides aminés.

La région HLA de classe II contient les gènes HLA-DR, HLA-DQ et HLA-DP. Cette région HLA de classe II est constituée d'une série de sous-régions, contenant chacune les gènes A et B qui codent les chaînes α et β , respectivement. Les chaînes α et β des molécules HLA de classe II sont constituées chacune de 2 domaines extracellulaires (α_1/α_2 , β_1/β_2) et d'un domaine transmembranaire. La poche de liaison peptidique est formée de l'association des domaines α_1 et β_1 , permettant la fixation de la molécule HLA de classe II à des peptides de 13 à 18 acides aminés.

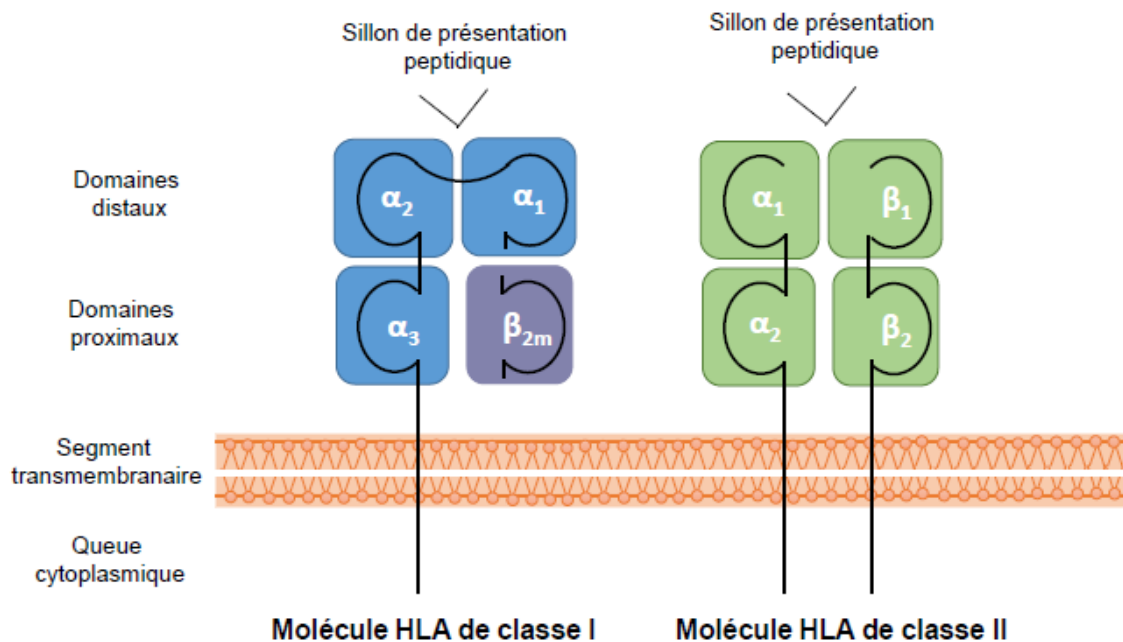


Figure 3 : Structure des molécules HLA de classe I et de classe II.

Une molécule HLA de classe I est une glycoprotéine constituée d'une chaîne α à 3 domaines extracellulaires (α_1 , α_2 , α_3). Le domaine proximal α_3 est associé à la protéine β_2 -microglobuline (β_{2m}) et les domaines distaux α_1 et α_2 délimitent le sillon de présentation peptidique. Une molécule HLA de classe II est une glycoprotéine constituée de deux chaînes α et β comportant chacune deux domaines extracellulaires (α_1/α_2 et β_1/β_2). Le sillon de présentation peptidique est délimité par les deux domaines distaux α_1 et β_1 (inspiré de Owen, Punt et Stranford, Immunologie 2013).

La famille de gènes HLA-DR est constituée d'un seul gène HLA-DRA et jusqu'à 9 gènes HLA-DRB (DRB1 à DRB9). Le gène HLA-DRA code la chaîne invariable α qui se fixe sur différentes chaînes β codées par les gènes HLA-DRB. La spécificité antigénique des gènes HLA-DR est déterminée par les chaînes polymorphiques β 1 codées par les allèles DRB1. Les gènes de la famille de gènes HLA-DP et DQ ont chacun un gène exprimé pour les chaînes α et β et de manière additionnelle des pseudogènes non exprimés. La région HLA de classe III ne code pas les molécules HLA, mais contient les gènes qui codent les composants du système du complément (C2, C4, facteur B), la protéine pro-inflammatoire TNF- α et bien d'autres molécules (Choo, 2007).

Les gènes HLA sont extrêmement polymorphes et étroitement liés, et les gènes HLA dans leur globalité sont codants, co-dominants et hérités sous forme d'un haplotype à partir de chaque parent. Les molécules HLA de classe I sont exprimées à la surface de presque toutes les cellules nucléées de l'organisme. Les molécules HLA de classe II sont exprimées seulement sur les cellules présentatrices d'antigènes (DC, monocytes, macrophages et lymphocytes B) et les lymphocytes T activés.

Les lymphocytes T s'activent lors de l'interaction de leurs TCR avec les peptides antigéniques complexés avec les molécules HLA. Le phénomène selon lequel les peptides sont liés aux molécules HLA et que ces complexes sont reconnus à la surface cellulaire par les récepteurs des lymphocytes T est appelé restriction par le HLA. Ce qui veut dire que l'activation des lymphocytes T nécessite une interaction entre les récepteurs TCR et le complexe HLA/peptide. En effet, les TCR des lymphocytes T CD8⁺ peuvent interagir avec les peptides antigéniques à la surface de presque toutes les cellules exprimant les molécules HLA de classe I (HLA-A, HLA-B et HLA-C). Les peptides restreints aux molécules HLA de classe I proviennent généralement des antigènes endogènes, produits à partir des protéines traduites dans les cellules et qui sont codées soit par le génome de l'hôte, soit par les virus qui infectent

les cellules ou les autres pathogènes à réplication intracellulaire. Au contraire, les TCR des lymphocytes T CD4⁺ engagent les peptides antigéniques portés par les molécules HLA de classe II (HLA-DR, HLA-DQ et HLA-DP). Alors que l'expression des molécules HLA de classe I est constitutive, les molécules HLA de classe II présentes à la surface des CPA sont inductibles par les stimuli de l'immunité innée, qui peuvent être par exemple les ligands pour des TLR. Les CPA sont spécialisées dans la détection d'antigènes environnants et de signaux de danger qui sont des ligands pour les TLR ou des autres systèmes de PRR. Ils sont présents en grand nombre sur la peau et les muqueuses, où la rencontre du pathogène est fort probable. Les antigènes extracellulaires exogènes, c'est-à-dire, issus des pathogènes rencontrés, sont capturés par les CPA par phagocytose ou endocytose et subissent une dégradation dans le compartiment acide de l'endosome. A ce niveau, les molécules HLA de classe II vont se charger en peptides antigéniques et les complexes HLA-peptides formés vont être transportés vers la membrane cellulaire. L'activation de ces cellules conduit non seulement à l'induction de l'expression des molécules HLA de classe II et des molécules de co-stimulation à leur surface, mais aussi à leur migration de la peau ou des muqueuses vers des ganglions lymphatiques situés proches des sites inflammatoires, où l'interaction avec les lymphocytes T peut se produire, conduisant à une initiation des réponses immunes adaptatives (Bonilla and Oettgen, 2010). Durant le processus de reconnaissance entre le TCR et les complexes HLA-peptide, les récepteurs des molécules de co-stimulation, exprimés à la surface des lymphocytes T, renforcent l'interaction entre les lymphocytes T et les CPA en formant la synapse immunologique, ce qui conduit à l'initiation de l'activation des lymphocytes T. Enfin, les cellules NK sont des lymphocytes du système immunitaire inné qui n'expriment pas de TCR, mais reconnaissent certaines molécules HLA de classe I à travers un ensemble de récepteurs que nous allons décrire plus loin.

II. Les cellules Natural Killer (NK)

Le terme « Natural Killer » ou NK a été utilisé pour la première fois par Kiessling et ses collaborateurs (Kiessling et al, 1975) après la découverte, sur des bases fonctionnelles, d'une population lymphocytaire avec des capacités à éliminer naturellement les cellules tumorales. En effet, les expériences ayant menées à la découverte des cellules NK portaient sur l'étude de la capacité anti-tumorale des cellules T chez des souris préalablement immunisées contre les antigènes associés aux tumeurs. Ces travaux ont révélé, chez des souris immunodéficientes en lymphocytes T, la présence de certaines populations lymphocytaires non T et non B, douées des capacités de cytotoxicité « naturelle » contre les cellules tumorales (Kiessling et al., 1975). C'est ainsi que ces populations lymphocytaires préalablement inconnues ont été nommées « Natural Killer » ou NK.

Les cellules NK correspondent aux grands lymphocytes granuleux représentant 5 à 20% des lymphocytes circulants. Plus de 90% des cellules NK sont présentes au niveau du sang périphérique, alors que seulement moins de 10% de cellules NK sont retrouvées dans les tissus sains tels que la peau, les intestins, la rate, le foie, les poumons et l'utérus durant la grossesse (Ribatti, 2017). Les cellules NK migrent rapidement au niveau des tissus inflammatoires ou des organes lymphoïdes secondaires, dans lesquels elles jouent le rôle de défense contre les pathogènes ou les tumeurs. Chez l'homme, les cellules NK sont définies par l'absence d'expression du CD3, marqueur des cellules T, et par la présence d'expression du marqueur CD56 (NCAM, neural cell adhesion molecule) (Robertson et al., 1990). Sur la base de l'intensité d'expression du marqueur CD56, deux sous-populations principales des cellules NK, nommées CD56^{bright} et CD56^{dim}, ont été identifiées (Cooper et al., 2001). Ces deux sous-populations sont distribuées différemment dans le sang périphérique et dans les tissus. Les cellules NK CD56^{dim} sont largement prédominantes dans le sang périphérique et peuvent représenter jusqu'à 90% de cellules NK circulantes, alors que les CD56^{bright} sont

abondamment retrouvées dans les tissus lymphoïdes secondaires (les ganglions lymphatiques et les amygdales) et peuvent représenter seulement 10% des cellules NK circulantes. Les cellules NK CD56^{dim} sont plus matures, disposent d'une forte activité cytotoxique et de fortes capacités de sécrétion rapide de cytokines lorsqu'elles sont activées. Par contre, les cellules NK CD56^{bright} sont relativement immatures, faiblement cytotoxiques, produisent des cytokines (IFN- γ , TNF- α , IL-10, IL-13 et TN-F- α) et peuvent subir une prolifération intensive en réponse à l'IL-2 et l'IL-15 (Cooper et al., 2001). Le NKp46 a été suggéré comme un marqueur spécifique des cellules NK à travers différentes espèces, mais ce récepteur, qui est impliqué dans l'activation de la cytotoxicité naturelle des cellules NK, est également exprimé par les sous-populations des cellules innées lymphoïdes du groupe 3 (ILC3) (Reynders et al., 2011).

A la différence des cellules T et B, les cellules NK ne requièrent pas de réarrangement des gènes codant pour des récepteurs aux antigènes des cellules T et B pour exercer leur fonction effectrice, mais possèdent des récepteurs invariants directement codés par les gènes de la lignée germinale qui leur permettent de reconnaître et de lyser spontanément les cellules cibles sans nécessiter une immunisation ou une pré-activation au préalable. Pour cette raison, les cellules NK sont considérées comme composantes du système immunitaire inné (Abel et al., 2018) (Sivori et al., 2020). Suite à leur activation, les cellules NK produisent une quantité importante de cytokines et de chimiokines qui stimulent et recrutent, respectivement, d'autres cellules immunitaires sur les sites inflammatoires ou sur les sites tumoraux, ce qui amplifie la réponse immune contre les cellules cibles. A noter que les cellules NK peuvent également réguler fortement les réponses immunes en aval, ce qui influence la qualité et la force des réponses immunes adaptatives (Ferlazzo et al., 2002).

Dans la première partie de cette introduction générale sur les cellules NK, nous allons décrire les différents facteurs qui régulent la biologie des cellules NK. Nous parlerons notamment des

récepteurs NK et des facteurs solubles et membranaires qui régulent : les grandes fonctions des NK (cytotoxicité, production de cytokines et prolifération), le développement et le trafic des NK et l'éducation des cellules NK. Nous aborderons également dans cette introduction générale, le rôle des NK dans la réponse immune, notamment dans la réponse anti-tumorale et anti-infectieuse, dans les cross-talks NK/DC et de leur rôle dans les maladies auto-immunes et la reproduction. Enfin, nous décrivons le rôle bénéfique des cellules NK en greffes allogéniques de cellules souches hématopoïétiques (CSH) et de leur utilité en immunothérapies anti-cancéreuses.

1. Les récepteurs NK

L'activation des cellules NK dépend de la balance entre les signaux activateurs et inhibiteurs qui déterminent si la cellule cible va être susceptible ou pas à la lyse médiée par les cellules NK. Contrairement aux lymphocytes T qui reconnaissent les complexes HLA/peptides via le TCR, distribué de façon clonale à la surface des lymphocytes T, généré par des réarrangements géniques, les cellules NK utilisent un large éventail de récepteurs qui ne dérivent pas de ce processus, mais plutôt sont codés directement par la lignée germinale. Cependant, pour discriminer les cellules normales de cellules transformées qui doivent être éliminées, les cellules NK disposent d'un grand nombre de récepteurs membranaires, activateurs et inhibiteurs, qui reconnaissent des ligands à la surface des cellules cibles. Les récepteurs activateurs impliqués dans l'activation des cellules NK reconnaissent essentiellement les ligands exprimés à la surface des cellules tumorales ou infectées par un virus. En général, ces ligands sont absents ou faiblement exprimés sur des cellules normales, particulièrement sur certaines cellules hématopoïétiques, alors qu'ils sont induits ou surexprimés par le stress au niveau des cellules tumorales ou infectées par un virus. De plus, d'autres récepteurs tels que les molécules de co-stimulation et d'adhésion peuvent amplifier et

renforcer l'effet de ces récepteurs activateurs. Des études récentes ont suggéré que dans les cellules NK, il n'y a pas de récepteurs dominants pour l'activation, mais plutôt ces récepteurs induisent l'activation par une synergie combinatoire (Long et al., 2013), notamment par la formation d'une synapse immunologique. Cependant, la cytotoxicité directe et la production de cytokines sont induites seulement quand plusieurs récepteurs activateurs sont engagés simultanément et que le signal activateur qui en résulte surpasse le signal inhibiteur. De plus, la force du signal activateur peut dépendre de la présence ou non des ligands des récepteurs activateurs à la surface des cellules cibles. Enfin, pour protéger les cellules saines d'une lyse spontanée, les cellules NK expriment une grande variété de récepteurs inhibiteurs qui reconnaissent des molécules HLA de classe I à la surface des cellules normales, ce qui inhibe l'activation de la cytotoxicité des cellules NK (Borrego et al., 2002, p. 20) et la production de cytokines inflammatoires telles que l'IFN- γ , le GM-CSF (Granulocyte Macrophage-Colony Stimulating Factor) et le TNF- α (Tumor Necrosis Factor). Les cellules NK peuvent également exprimer certains récepteurs inhibiteurs, non restreints par les molécules HLA de classe I, qui sont souvent impliqués dans l'échappement des cellules tumorales à l'immunité médiée par les cellules NK.

D'un point de vue structural, les récepteurs des cellules NK peuvent être classés en 2 familles : les récepteurs de la superfamille des immunoglobulines (Ig) et les récepteurs de la superfamille des lectines de type C. La superfamille des Ig comprend les KIR (Killer cell Immunoglobulin-like Receptors), les LIR (Leucocyte Immunoglobulin-like Receptors) et les NCR (Natural Cytotoxic Receptors) (Chen et al., 2020).

Nous allons décrire dans ce chapitre, de façon non-exhaustive, les spécificités des principaux récepteurs impliqués dans les fonctions effectrices, le développement, la prolifération et la circulation des cellules NK. Les principaux récepteurs activateurs et inhibiteurs ainsi que leurs

ligands impliqués dans la régulation des fonctions des cellules NK sont illustrés sur la Figure

4.

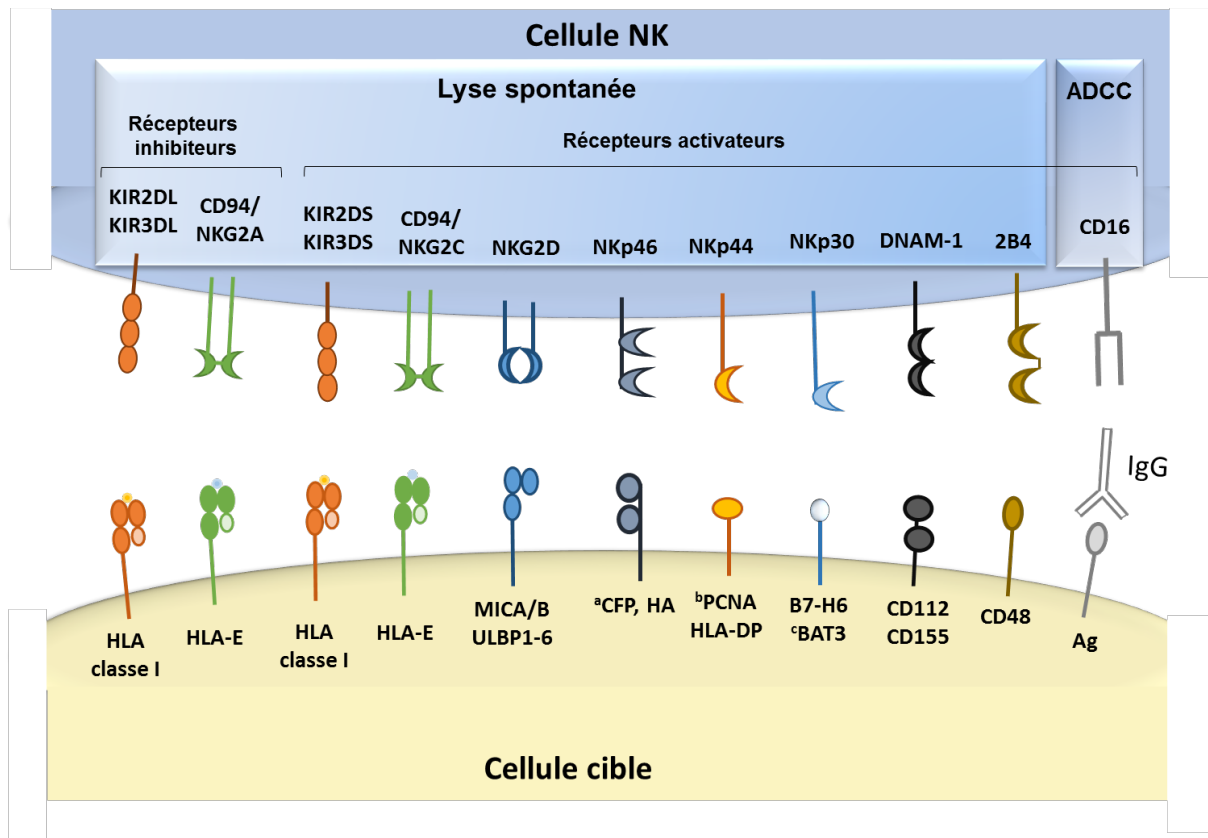


Figure 4 : Principaux récepteurs inhibiteurs et activateurs des cellules NK.

L'activation de la lyse spontanée ou cytotoxicité naturelle des cellules NK dépend de la balance entre les signaux activateurs et inhibiteurs délivrés à leur surface à travers un ensemble de récepteurs activateurs et inhibiteurs. Les récepteurs inhibiteurs KIR2DL/KIR3DL et les hétérodimères CD94/NKG2A reconnaissent respectivement les molécules HLA de classe I classiques et la molécule HLA de classe I non classique HLA-E. Les récepteurs activateurs KIR2DS/KIR3DS, CD94/NKG2C, NKG2D, DNAM-1 et 2B4 reconnaissent respectivement les ligands HLA-E, MIC/ULBP, CD112/CD155 et CD48. Les récepteurs de cytotoxicité naturelle (NCR) NKp46, NKp44 et NKp30 se lient respectivement aux molécules CFP/HA, PCNA/HLA-DP, B7-H6/BAT3. Le récepteur CD16 reconnaît les fragments Fc des immunoglobulines G (IgG) qui opsonisent les cellules cibles et active la voie de la cytotoxicité cellulaire dépendante de l'anticorps (ADCC).^aCFP, Complement factor P. ^bPCNA, Proliferating cell nuclear antigen. ^cBAT3, HLA-B-associated transcript 3.

1.1. Les récepteurs KIR (Killer cell Immunoglobulin-like Receptors)

Les KIR (Killer cell Immunoglobulin-like Receptors) sont des récepteurs majeurs de la superfamille des Immunoglobulines (Ig). A la fin des années 90, l'acronyme KIR (Killer-cell Inhibitory Receptor) a été proposé pour nommer les membres de la famille des récepteurs inhibiteurs spécifiques des molécules HLA de classe I. En effet, sur la base des expériences mettant en évidence que certains KIR pouvaient transduire des signaux activateurs, il a été suggéré que l'acronyme KIR soit préservé, mais en changeant tout simplement la signification de « I » en « immunoglobulin-like », d'où l'appellation « Killer cell Immunoglobulin-like Receptors » (Pende et al., 2019). Les récepteurs KIR sont exprimés principalement à la surface des cellules NK, mais aussi à la surface d'une petite fraction de lymphocytes T CD8⁺ avec un phénotype mémoire (Mingari et al., 1996).

Dans ce chapitre, il sera présenté la structure protéique, la nomenclature et la signalisation des KIR, les ligands des KIR ainsi que la génétique et l'expression des gènes KIR.

1.1.1. Structure protéique, nomenclature et signalisation des KIR

La nomenclature des KIR a été conçue d'une façon qui reflète la structure et la fonction des différents récepteurs codés par la famille des gènes KIR, ainsi que la similitude de différentes séquences de nucléotides entre les gènes KIR (Pende et al., 2019). L'acronyme KIR est suivi d'un suffixe qui décrit la structure de la molécule. En effet, les récepteurs KIR peuvent être divisés en 2 catégories sur la base de leur structure extracellulaire. On distingue les KIR2D qui portent 2 domaines extracellulaires Ig-like et les KIR3D qui portent 3 domaines extracellulaires Ig-like. Les KIR2D et les KIR3D peuvent porter un domaine cytoplasmique long (L) ou un domaine cytoplasmique court (S). Un numéro de code est assigné à la fin pour désigner chaque gène/molécule. Ainsi, les KIR avec un long (L) domaine

cytoplasmique sont nommés KIR2DL ou KIR3DL, et les KIR avec un domaine cytoplasmique court (S) sont nommés KIR2DS ou KIR3DS. De plus, la lettre « P » désigne les 2 pseudogènes qui codent pour les récepteurs KIR nommés KIR2DP1 et KIR3DP1. Enfin, comme les autres protéines de surface cellulaire immunes, un nombre CD a été assigné aux protéines KIR que l'on a désignées par les séries CD158 (Pende et al., 2019) (Moretta et al., 1997).

Les KIR2DL et KIR3DL sont des récepteurs inhibiteurs portant un motif ITIM (Immune Tyrosine-based Inhibitory Motif) au niveau de leur long domaine cytoplasmique (Colonna, 1997). Les récepteurs inhibiteurs KIR2DL1, KIR2DL2, KIR2DL3, KIR2DL5, KIR3DL1 et KIR3DL2 portent 2 motifs ITIM au niveau de leur partie cytoplasmique, alors que les récepteurs inhibiteurs KIR2DL4 et KIR3DL2 ne portent qu'un seul motif ITIM au niveau de la partie cytoplasmique. Ce motif ITIM transduit des signaux inhibiteurs à la cellule NK. En effet, l'activité de cytotoxicité des cellules NK est inhibée suite à l'interaction entre les KIR inhibiteurs avec les molécules HLA de classe I exprimées à la surface des cellules cibles. Cette interaction peut aussi inhiber la production de cytokines par les cellules NK effectrices (D'Andrea et al., 1996). Les KIR inhibiteurs avec 2 domaines extracellulaires Ig (KIR2D) ont une configuration D1-D2, à l'exception du KIR2DL4 (Borrego et al., 2002, p. 200) et du KIR2DL5 (Pende et al., 2019) qui ont une configuration D0-D2. Par contre, les KIR inhibiteurs avec 3 domaines extracellulaires Ig-like (KIR3D) ont une configuration D0-D1-D2 (Borrego et al., 2002). Comme mentionné précédemment, le récepteur KIR2DL4 possède un seul motif ITIM au niveau de son long domaine cytoplasmique, mais ce récepteur porte également un résidu chargé (Arginine) au niveau de sa région transmembranaire qui permet son association avec la chaîne γ du Fc ϵ R. En effet, le KIR2DL4 présente des caractéristiques fonctionnelles inhibitrice et activatrice puisque le motif ITIM permet de transduire des signaux inhibiteurs et le Fc ϵ R γ permet de transduire des signaux activateurs

(Rajagopalan et al., 2001). En général, la voie de signalisation commune générée par l'interaction entre le KIR inhibiteur avec son ligand est caractérisée par la phosphorylation de la tyrosine du motif ITIM qui recrute les phosphatases telles que les protéines kinases Src (SHP-1, Src homology 2 domain-containing phosphatase et SHP-2) qui vont inhiber les voies effectrices de la cytotoxicité des NK (Moretta et al., 2001).

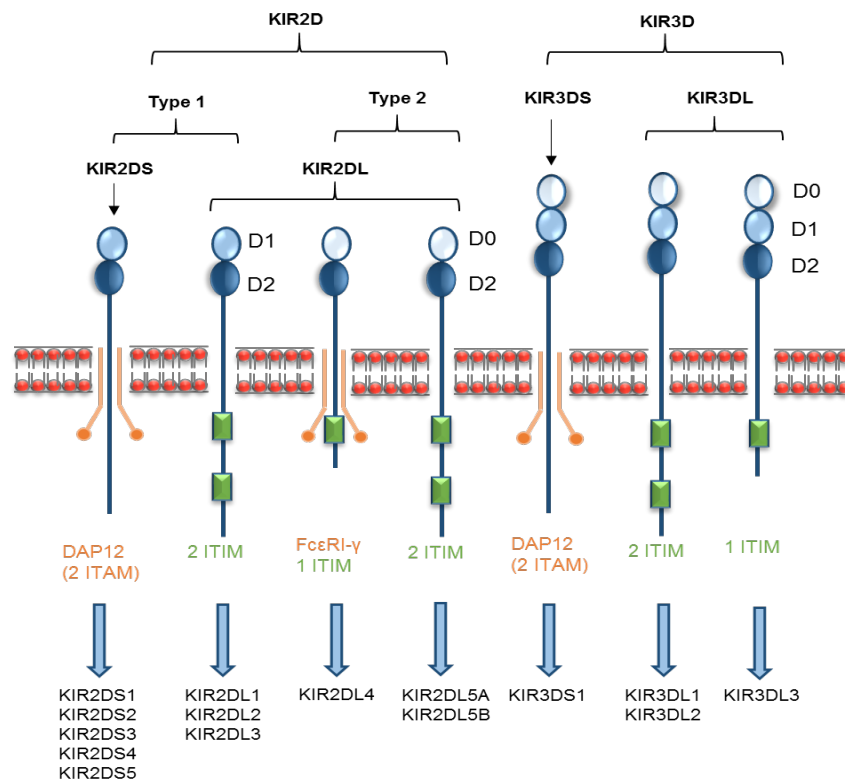


Figure 5 : Structure des récepteurs KIR.

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

Les KIR2DS et KIR3DS sont des récepteurs activateurs qui ne portent pas de motif ITIM au niveau de leur court domaine cytoplasmique (Colonna, 1997) mais leurs portions

transmembranaires portent des résidus chargés (Lysine) qui permettent leur association à la protéine adaptatrice de signalisation DAP12 (DNAX-activation protein of 12kDa) portant un motif ITAM (Lanier, 1998). La molécule adaptatrice DAP12 transduit un signal activateur conduisant à l'activation de la cytotoxicité des cellules NK. Comme les KIR inhibiteurs, tous les KIR activateurs avec 2 domaines extracellulaires Ig-like ont une configuration D1-D2, alors que les KIR activateurs avec 3 domaines extracellulaires ont une configuration D0-D1-D2 (KIR3DS1) (Borrego et al., 2002). La structure des récepteurs KIR est résumée dans la Figure 5.

1.1.2. Ligands des récepteurs KIR

Les ligands des récepteurs KIR sont principalement les molécules HLA de classe I (Borrego et al., 2002). Les récepteurs inhibiteurs KIR2DL1, KIR2DL2 et KIR2DL3 reconnaissent les molécules HLA-Cw dont le polymorphisme repose sur le domaine $\alpha 1$ de la chaîne lourde. Deux groupes de molécules HLA-C existent : les molécules HLA-C du groupe C1 (HLA-C1) avec une Lysine en position 80 et les molécules HLA-C du groupe C2 (HLA-C2) avec une Asparagine en position 80 (Mandelboim et al., 1996). Le KIR2DL1 reconnaît spécifiquement et avec une forte affinité les molécules HLA-C du groupe C2, alors que les KIR2DL2 et KIR2DL3 reconnaissent avec une moins forte affinité les molécules HLA-C du groupe C1 (Pende et al., 2019). Il a été aussi montré que les KIR2DL2 et KIR2DL3 pouvaient reconnaître certains épitopes C1 portés par certaines molécules HLA-B telles que HLA-B46 et HLA-B73 (Hilton et al., 2017). De plus, les KIR2DL2 et KIR2DL3 peuvent reconnaître certaines molécules HLA-C du groupe C2, mais avec une faible affinité. Plusieurs études ont montré que les KIR2DL2/3 et les KIR2DL1, en plus de leur capacité à discriminer les épitopes C1 et C2, reconnaissent différentes combinaisons peptides/HLA-C en conservant un certain degré de sélectivité du peptide (Hilton et al., 2017). En général, les KIR2DL2 et

KIR2DL3 sont caractérisés par une plus forte sélectivité pour les peptides que le KIR2DL1, et cette capacité semble être pertinente pour la reconnaissance des molécules HLA-C du groupe C2. A noter que la capacité du KIR2DL1 à reconnaître la molécule HLA-C8, appartenant au groupe C1 et présentant un nombre restreint de peptides a été récemment rapportée (Sim et al., 2017). Ces études mettent en évidence la capacité des cellules NK à reconnaître non seulement la diminution d'expression des molécules HLA de classe I, mais aussi les altérations de peptidome présenté par les molécules HLA survenant lors d'une infection virale ou d'une transformation maligne.

Parmi les deux récepteurs inhibiteurs à domaines extracellulaires D0-D2 (KIR2DL4, KIR2DL5), le KIR2DL4 est le seul récepteur pour lequel un ligand a été identifié. Le KIR2DL4 reconnaît la molécule HLA-G, une molécule HLA de classe I non classique exprimée à la surface des cellules trophoblastiques au cours de la phase précoce de la grossesse. Le KIR2DL4 est caractérisé par un faible potentiel inhibiteur, mais son engagement avec des ligands solubles résulte à une forte sécrétion de cytokines en l'absence d'une activité cytotoxique des NK (Rajagopalan et al., 2001).

Le KIR3DL1 reconnaît les motifs Bw4 des molécules HLA-B, mais aussi les motifs Bw4 de certaines molécules HLA-A. Il a été rapporté que parmi les molécules HLA-A Bw4⁺, HLA-A24, -A32, -A23, à l'exception de HLA-A25, sont capables non seulement d'inhiber les cellules NK KIR3DL1⁺, mais aussi de participer à leur éducation (Stern et al., 2008).

Les KIR3DL2 reconnaissent deux molécules HLA-A, HLA-A3 et HLA-A11 (Pende et al., 1996) (Döhring et al., 1996). Il a été récemment montré que le KIR3DL2 pouvait aussi reconnaître la molécule HLA de classe I non classique HLA-F (Goodridge et al., 2013). Une autre fonction pertinente de ce KIR inhibiteur est la reconnaissance des PAMP, en particulier la reconnaissance des oligodéoxynucléotides CpG (CpG-ODN) au cours d'une infection par des pathogènes. En effet, l'interaction entre le domaine D0 du KIR3DL2 et le CpG-ODN ne

résulte pas à l'induction d'un signal inhibiteur, mais diminue l'expression du KIR3DL2 à la surface cellulaire et induit la sécrétion de cytokines (Sivori et al., 2010a). Ce mécanisme de reconnaissance des KIR3DL2 met en évidence le rôle des cellules NK dans la défense anti-microbienne (Sivori et al., 2010a). Les ligands des récepteurs KIR2DL5 et KIR3DL3 restent encore inconnus.

La majorité des ligands des KIR activateurs sont inconnus. Le KIR2DS1 reste le KIR activateur le mieux caractérisé (Moretta et al., 1995) (Biassoni et al., 1997) (Stewart et al., 2005). Ce dernier reconnaît les molécules HLA-C du groupe C2, mais avec une affinité plus faible comparée à celle de son homologue inhibiteur KIR2DL1 (Moretta et al., 1995). L'interaction entre le KIR2DS1 avec les molécules C2 active la cytotoxicité des cellules NK seulement quand ces cellules NK KIR2DS1⁺ ont évolué dans un environnement dépourvu du ligand C2 (Morvan et al., 2008) (Chewning et al., 2007). Une récente étude a montré que la modulation des molécules HLA-Cw par certaines souches du Cytomégalo virus (CMV) humain permet une activation puissante des cellules NK médiée par le KIR2DS1, ce qui suggère le rôle de ce récepteur KIR activateur dans une reconnaissance virale (van der Ploeg et al., 2017). Les molécules HLA de classe I reconnues par le KIR2DS2 ont été identifiées et comprennent les molécules HLA-C du groupe C1 et HLA-A11 (Liu et al., 2014) (David et al., 2013). Il faut noter que l'interaction du KIR2DS2 avec son ligand est fortement peptide dépendante. La capacité de KIR2DS2 à reconnaître directement les peptides de l'hélicase du VHC (Virus de l'Hépatite C) présentée par la molécule HLA-C1 (groupe C1) peut expliquer, au moins en partie, l'effet protecteur de ce KIR activateur dans l'infection chronique par l'hépatite C (Naiyer et al., 2017). Les ligands du KIR3DS1 sont représentés par les molécules HLA non classiques HLA-F et par la molécule HLA-B51 Bw4⁺ (Carlomagno et al., 2017).

Le KIR2DS3 ne semble pas s'exprimer à la surface cellulaire (VandenBussche et al., 2009) et il reste un récepteur activateur avec une fonction et un ligand inconnus. Le KIR2DS4

reconnait une minorité des molécules HLA-C portant les épitopes C1 ou C2 et la molécule HLA-A11 (Graef et al., 2009). Certains allèles du KIR2DS5 codent pour les récepteurs KIR2DS5 qui reconnaissent plusieurs molécules HLA-C du groupe C2 (Blokhuis et al., 2017). Les spécificités des récepteurs KIR inhibiteurs et activateurs sont illustrées dans la Figure 6.

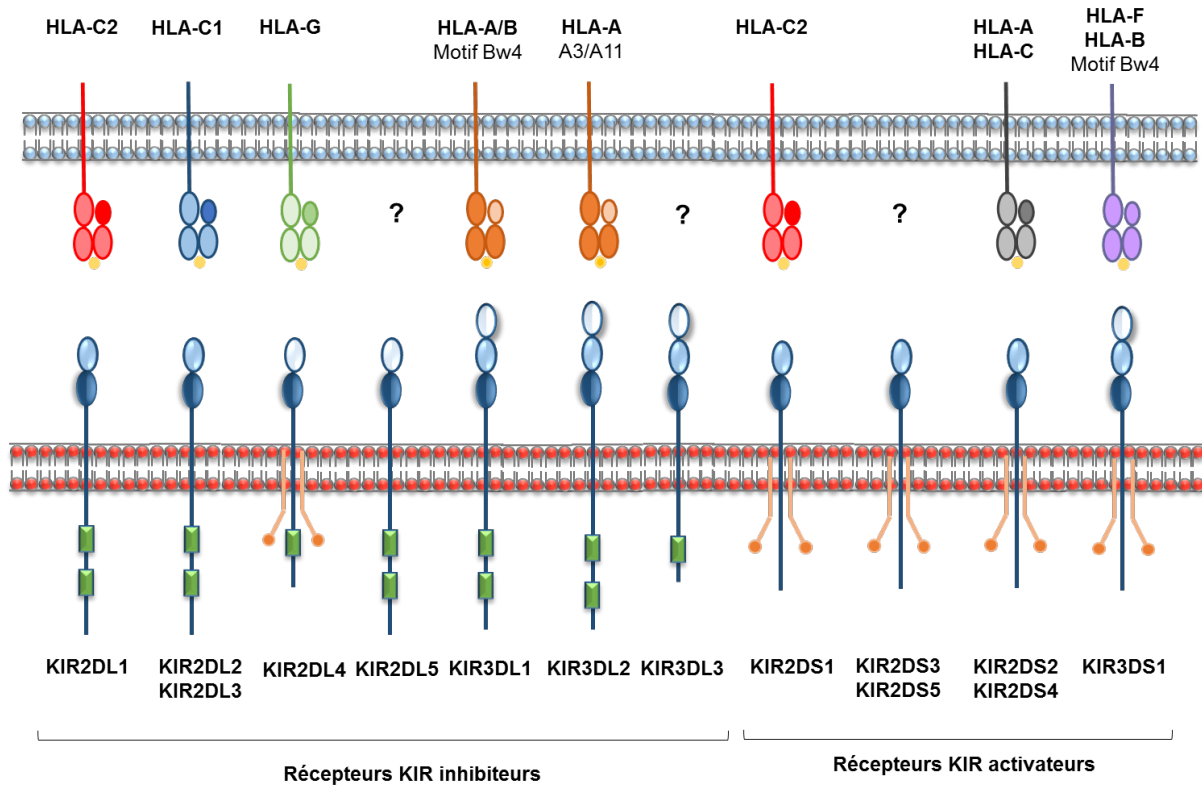


Figure 6 : Les récepteurs KIR et leurs ligands.

Les récepteurs KIR2DL1 et KIR2DS1 reconnaissent les molécules HLA-C du groupe C2. Les récepteurs KIR2DL2 et KIR2DL3 reconnaissent les molécules HLA-C du groupe C1. Le récepteur KIR2DL4 reconnaît la molécule HLA-G. Le récepteur KIR3DL1 reconnaît le motif Bw4 des molécules HLA-A et HLA-B. Le récepteur KIR3DL2 reconnaît les molécules HLA-A3 et HLA-A11. Les KIR2DS2 et KIR2DS4 reconnaissent certaines molécules HLA-A et HLA-C. Le KIR3DS1 reconnaît les molécules HLA-F et HLA-B Bw4. Les ligands des récepteurs KIR2DL5, KIR3DL3, KIR2DS3 et KIR2DS5 ne sont pas encore identifiés.

1.1.3. Les gènes KIR

Les gènes qui codent pour les récepteurs KIR sont localisés sur le chromosome humain 19q13.42 dans la région LRC (Leucocyte Receptor Cluster) (Borrego et al., 2002). Les autres membres retrouvés dans la région LRC sont les ILT, les LAIR (Leukocyte-Associated Inhibitory Receptors), le Fc α R et le NKp46 (Borrego et al., 2002) (Barten et al., 2001). La famille des KIR est constituée de 15 gènes (KIR2DL1, KIR2DS1, KIR2DL2/KIR2DL3, KIR2DL4, KIR2DL5A, KIR2DL5B, KIR2DS2, KIR2DS3, KIR2DS4, KIR2DS5, KIR3DL1, KIR3DS1, KIR3DL2, KIR3DL3) et de 2 pseudogènes (KIR2DP1 et KIR3DP1) (Borrego F, 2001). La structure des gènes KIR est relativement conservée. Chaque gène KIR (excepté KIR3DP1) est composé de 8 à 9 exons (Vilches and Parham, 2002). Les exons 1 et 2 codent pour la séquence leader de la protéine KIR. Les exons 3 à 5 codent respectivement pour les domaines extracellulaires D0, D1 et D2. L'exon 6 correspond au stem, connectant le domaine D2 à la région transmembranaire codée par l'exon 7. Enfin, les exons 8 et 9 codent pour la région intracytoplasmique de la protéine KIR. Les gènes KIR2D de type I (KIR2DL1-3 et KIR2DS1-5) possèdent un pseudoexon 3, résultant à une protéine KIR avec seulement 2 domaines extracellulaires D1 et D2 (Vilches et al., 2000b). Les gènes KIR2D de type II (KIR2DL4 et KIR2DL5) n'ont pas d'exon 4, ce qui résulte à une protéine avec des domaines extracellulaires D0 et D2 (Vilches et al., 2000a).

Les gènes KIR sont transmis en bloc sous forme d'haplotypes des parents vers la progéniture. En effet, un haut niveau de variabilité en termes de contenu et de la nature de gènes KIR existe entre différents individus à l'exception des gènes KIR3DL3, KIR3DL2, KIR2DL4 et du pseudogène KIR3DP1 qui sont présents chez tous les individus. Pour cela, deux catégories d'haplotypes KIR ont été définies chez l'homme : les haplotypes du groupe A et du groupe B. Les haplotypes A sont caractérisés par un contenu en gènes KIR fixe, qui codent principalement 6 récepteurs KIR inhibiteurs (KIR2DL1, KIR2DL3, KIR2DL4,

KIR3DL1, KIR3DL2, KIR3DL3) et d'un seul récepteur KIR activateur, le KIR2DS4, en plus des 2 pseudogènes KIR (KIR2DP1 et KIR3DP1). Certains haplotypes A contiennent les gènes KIR2DS4 qui ne codent pour aucun récepteur de surface (Hsu et al., 2002) et ces gènes KIR2DS4 non exprimés sont nommés 1D. Les haplotypes B sont caractérisés par la présence d'au moins 1 gène KIR activateur suivant : KIR2DS2, KIR2DS3, KIR3DS1, KIR2DS5, et KIR2DS1 et de 2 KIR inhibiteurs, le KIR2DL2 et le KIR2DL5 (KIR2DL5A ou KIR2DL5B) qui sont spécifiques de cet haplotype KIR B (Figure 7).

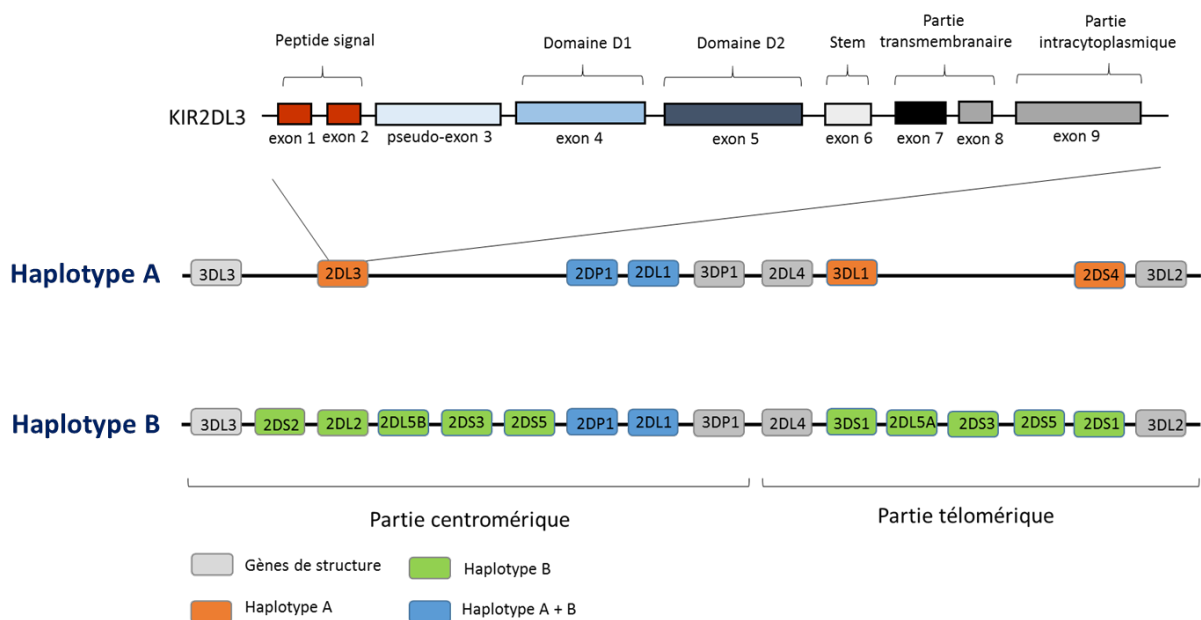


Figure 7 : Organisation des gènes KIR et haplotypes KIR.

Le gène KIR2DL3 illustré ici est constitué de 8 exons qui codent différents domaines de la protéine KIR2DL3 et d'un pseudo-exon, l'exon 3. Les exons 1 et 2 codent le peptide signal. Les exons 4 et 5 codent respectivement les domaines D1 et D2. L'exon 6 code la partie « stem » et l'exon 7 code pour la partie transmembranaire. Les exons 8 et 9 codent la partie intracytoplasmique. Les gènes KIR sont organisés en 2 catégories d'haplotypes, A et B, dont deux exemples sont illustrés ici. Chaque haplotype est divisé en 2 régions, une région centromérique et une région télomérique. Ces régions sont délimitées par les gènes de structure représentés en gris. Les gènes spécifiques de l'haplotype A sont représentés en orange et les gènes spécifiques de l'haplotype B sont représentés en vert. Les gènes communs aux deux haplotypes sont représentés en bleu. L'haplotype A possède un seul KIR activateur, le KIR2DS4 et l'haplotype B est caractérisé par la présence de plusieurs KIR activateurs.

Chaque haplotype KIR peut être divisé en 2 régions, la région centromérique (Cen) et la région télomérique (Tel). Les gènes KIR3DL3, KIR3DL2, KIR2DL4 et le pseudogène KIR3DP1 sont des gènes dits conservés ou « frameworks » puisque le KIR3DL3 et le KIR3DP1 sont situés aux extrémités des régions centromériques et le KIR3DL2 et le KIR2DL4 sont situés aux extrémités des régions télomériques des haplotypes A et B. Sur la base du nombre et de la nature des gènes KIR présents, 3 régions centromériques (CenAA, CenAB et CenBB) et 2 régions télomériques (TelAA, TelAB et TelBB) peuvent être identifiées. Les haplotypes A sont composés d'une région centromérique CenA et d'une région télomérique TelA. Par conséquent, les individus de génotype KIR A/A sont ceux qui sont homozygotes pour l'haplotype A. L'haplotype B, quant à lui, est constitué de 2 types de régions centromériques, CenB1 et CenB2, et d'un seul type de région télomérique, TelB. De ce fait, les individus de génotypes KIR Bx (A/B, B/A, et BB) possèdent les haplotypes résultant des combinaisons entre les régions centromériques et télomériques des haplotypes A et B.

Les haplotypes A diffèrent de chaque autre haplotype principalement sur la base du polymorphisme allélique KIR, alors que la variabilité des haplotypes B est fortement liée à leurs contenus en gènes KIR (Borrego et al., 2002). Les KIR2DL2/KIR2DL3 et KIR3DL1/KIR3DS1 sont des alleles du même gène. La fréquence des gènes KIR varie entre inhibiteurs, activateurs et selon les populations. En 2019, près de 1000 allèles des gènes KIR parmi les individus dans le monde ont été répertoriés dans la base de données IPD/KIR (The Immuno Polymorphism Database) (<https://www.ebi.ac.uk/ipd/kir/>) (Pende et al., 2019, p. 20119). Ce niveau extrêmement élevé de polymorphisme entre différentes populations est le deuxième après celui des gènes HLA. Plusieurs polymorphismes alléliques ont été identifiés comme ayant un impact sur l'expression et la fonction de la protéine KIR. En effet, la présence de résidus d'acides aminés particuliers pouvant entraîner l'absence d'expression des

récepteurs de surface a été identifiée parmi les allotypes KIR3DL1 (Boudreau et al., 2014) (Pando et al., 2003), KIR2DL1 (Guethlein et al., 2015) et KIR2DL2 (VandenBussche et al., 2006). De plus, le polymorphisme allélique peut altérer significativement l'affinité et la spécificité des protéines KIR. Par exemple, le récepteur KIR2DL1 codé par l'allèle KIR2DL1*022 a une spécificité pour l'épitope C1 en raison de la substitution de la méthionine par la lysine à la position 44 (Hilton et al., 2015). De même, les allotypes KIR2DL1 de la région centromérique de l'haplotype A (CenA) présentent une plus forte avidité pour les épitopes C2 que ceux de la région centromérique des haplotypes B (CenB) (Wright, 2020).

La variabilité en termes de contenu en gènes dans les différents haplotypes KIR peut aussi être liée à la variation du nombre de copie de gènes KIR (CNV, Copy Number Variation). En effet, un seul gène KIR peut présenter plusieurs copies au sein d'un même haplotype KIR (Traherne et al., 2010). La présence de plusieurs copies d'un même gène KIR augmente la probabilité que ce gène soit exprimé à la surface cellulaire, ce qui peut conduire à l'augmentation de la fréquence des sous-populations cellulaires NK exprimant ce récepteur (Béziat et al., 2013b). Les gènes KIR3DL1/3DS1 présentent des fréquences élevées de duplication (Vendelbosch et al., 2013).

Ainsi, une grande diversité dans les répertoires KIR est retrouvée entre différents individus, en raison de la variabilité du contenu en gènes KIR (présents ou absents), du nombre de copies de gènes KIR et du polymorphisme allélique (Hsu et al., 2002) (Parham, 2005).

1.1.4. Expression des gènes KIR

L'expression de la majorité des récepteurs KIR est constitutive et la distribution est clonale. Cette distribution clonale est due à une expression stochastique résultant du « silencing » des gènes KIR par méthylation, de telle sorte qu'aucune cellule NK n'exprime à elle seule tous les gènes KIR contenus dans le génome (Manser et al., 2015). De manière exceptionnelle, le KIR2DL4 est exprimé constitutivement à la surface de toutes les cellules NK (Santourlidis et al., 2002). Certains lymphocytes T ($\alpha\beta$, $\gamma\delta$ et NKT) expriment également les KIR, mais les régulations géniques sont différentes et la variabilité est plus faible.

En raison de la variabilité du contenu en gène KIR, du nombre de copie de gènes KIR et du polymorphisme allélique KIR, le phénotype du répertoire des cellules NK en récepteurs KIR varie d'un individu à l'autre. A noter qu'une grande proportion de sous-populations NK n'exprime aucun KIR à leur surface, pouvant représenter en moyenne entre 41% et 72% des cellules NK circulantes (Manser et al., 2015). Parmi les populations NK présentant une expression des récepteurs KIR, la plupart exprime entre un et trois récepteurs KIR inhibiteurs. Les individus avec un contenu en gènes KIR limité (KIR AA par exemple) présentent un répertoire NK moins diversifié et chaque sous-population NK KIR⁺ est représentée en forte fréquence. Par contre, les individus avec un contenu en gènes KIR large (KIR A/B par exemple) présentent un répertoire NK beaucoup plus diversifié avec cependant de faibles fréquences de sous-populations NK KIR⁺ (Parham, 2005). La Figure 8 illustre l'expression clonale des récepteurs KIR à la surface des cellules NK.

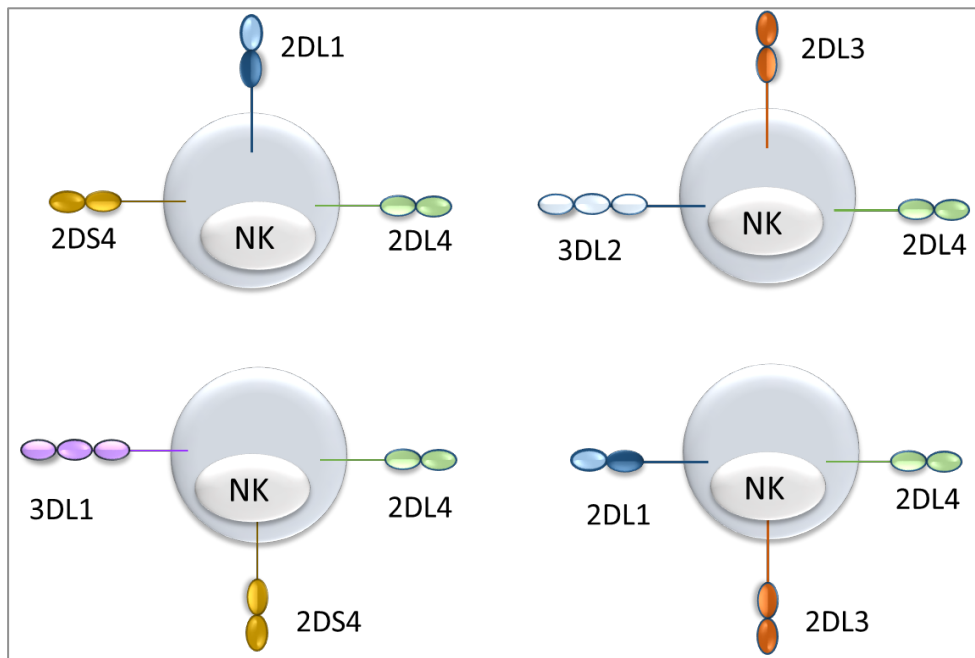


Figure 8 : Expression clonale des récepteurs KIR à la surface des cellules NK.

Les récepteurs KIR sont exprimés de façon clonale à la surface des cellules NK. Ici, 4 clones représentatifs des cellules NK sont illustrés exprimant différentes combinaisons de récepteurs KIR. Le KIR2DL4 est exprimé à la surface de toutes les cellules NK (Inspiré de Parham, 2005).

1.2. Les récepteurs de la famille ILT (Immunoglobulin-Like Transcript)

Les ILT sont des récepteurs inhibiteurs qui appartiennent à la superfamille des Ig. Ils portent des motifs ITIM au niveau intracellulaire qui transduisent des signaux inhibiteurs (Cosman et al., 1997). Les ILT sont constitués de plusieurs membres de récepteurs tels que LIR1/ILT2 et LIR2/ILT4. Les ligands pour LIR1/ILT2 sont des molécules HLA de classe I (HLA-A, HLA-B, et HLA-G) (Gonen-Gross et al., 2003) (Jones et al., 2011) et la glycoprotéine UL18 dérivée du CMV humain (Cosman et al., 1997). Les voies de signalisation des ILT sont similaires à celles des récepteurs KIR inhibiteurs et des récepteurs CD94/NKG2A. Leurs motifs ITIM peuvent recruter les protéines SHP-1 pour bloquer les

signaux activateurs. Le rôle des ILT est de protéger les cellules normales d'une lyse spontanée par les cellules NK.

1.3. Les hétérodimères CD94/NKG2

Les CD94/NKG2 sont des récepteurs hétérodimériques qui combinent le marqueur CD94 avec différents membres de la famille des récepteurs NKG2 via un pont disulfure au niveau extracellulaire (Chang et al., 1995). Les récepteurs NKG2 sont membres de la famille des lectines de type C (Borrego et al., 2002) et sont exprimés à la surface de la majorité des cellules NK. Comme les KIR, cette famille de récepteurs est constituée de récepteurs activateurs et inhibiteurs. Ainsi, l'hétérodimère CD94/NKG2A se comporte comme un récepteur inhibiteur et l'hétérodimère CD94/NKG2C se comporte comme un récepteur activateur. Le segment intracellulaire du NKG2A contient un motif ITIM qui transduit des signaux inhibiteurs (Carretero et al., 1997). Le segment intracellulaire du NKG2C est court et ne contient pas de motifs ITIM, mais sa portion transmembranaire porte des résidus chargés qui permettent son association aux protéines adaptatrices DAP12 portant des motifs ITAM, transduisant des signaux activateurs (Lanier, 1998) (López-Botet and Bellón, 1999). Les récepteurs CD94/NKG2A et CD94/NKG2C ont pour ligand la molécule HLA de classe I non classique HLA-E (Braud et al., 1998). La molécule HLA-E présente à la surface cellulaire des peptides signaux dérivés de la séquence leader (de 14 à 22 acides aminés) des molécules HLA de classe I, HLA-A, HLA-B, HLA-C et HLA-G (Braud et al., 1997). La molécule HLA-E peut également présenter les peptides dérivés du CMV (Hammer et al., 2018). Ainsi, le récepteur CD94/NKG2A reconnaît les complexes HLA-E/peptides, conférant aux cellules NK la capacité de détecter la quantité globale de molécules HLA de classe I exprimées à la surface des cellules cibles. En conditions normales, la molécule HLA-E a une plus grande affinité pour le NKG2A que le NKG2C. Le rôle de l'interaction du CD94/NKG2A avec la

molécule HLA-E est de protéger les cellules saines d'une lyse spontanée par les cellules NK. En revanche, certaines études ont montré que le NKG2A est associé aux mécanismes d'échappement immunitaire. Les fibroblastes dermiques sénescents expriment les molécules HLA-E qui se fixent sur le NKG2A et suppriment la réaction immunitaire des cellules sénescents (Pereira et al., 2019). Le récepteur CD94/NKG2A peut également inhiber l'effet synergique des récepteurs activateurs NKG2D et 2B4 (Kim et al., 2010) (Bryceson et al., 2009). De plus, le complexe CD94/NKG2A peut inhiber l'activation de la voie de signalisation Syk et ERK dépendante du CD16 (Palmieri et al., 1999).

En conditions de stress, les molécules HLA-E des cellules stressées se fixent sur le polypeptide contenant les protéines de choc thermique HSP60, qui réduit l'affinité de HLA-E avec le NKG2A et augmente l'affinité avec le NKG2C, ce qui active les cellules NK (Chen et al., 2020). Le récepteur activateur CD94/NKG2C reconnaît les peptides viraux issus de la protéine UL40 du CMV, présentés par la molécule HLA-E exprimée à la surface des cellules infectées par le CMV humain (Gumá et al., 2006).

1.4. Le récepteur NKG2D

Le récepteur activateur NKG2D est une protéine transmembranaire de type II, membre de la superfamille des lectines de type C (Raulet DH, 2013). Il est exprimé sous forme d'homodimères à la surface de toutes les cellules NK, les cellules T CD8⁺ activées, mais également par certaines sous-populations de cellules T CD4⁺, de cellules T $\gamma\delta$ et de cellules iNKT (Iannello et al., 2016) (Raulet et al., 2013). Sa région transmembranaire est chargée de résidus (Arg) qui permettent son association à la protéine adaptatrice DAP10 et sa stabilisation à la surface cellulaire. Codé par un gène hautement conservé, le KLRK1 (Killer cell Lectin-like Receptor subfamily K, member 1), le récepteur NKG2D reconnaît plusieurs

ligands comme le RAE-1 α - ϵ (Retinoic Acid Early inducible proteins 1 α - ϵ), MULT1 (Mouse UL16-binding protein-like Transcript 1), et H60a-c (Histocompatibility antigen 60) chez la souris, et les molécules MICA/B (Major histocompatibility complex class I Chain-related molecules A and B) (Steinle et al., 2001) et les ULBP1-6 (UL16 binding Protein) (Cosman et al., 2001) chez l'homme. Ces ligands sont faiblement exprimés à la surface des cellules normales, mais sont souvent induits, par le stress, à la surface des cellules tumorales ou infectées par un virus. L'engagement du récepteur NKG2D avec son ligand à la surface d'une cellule cible stimule l'activité de cytotoxicité des cellules NK et la production de cytokines. La protéine DAP10 contient un domaine YINM qui, une fois phosphorylé par les kinases Src, peut fixer la sous-unité p85 de PI3K ou la protéine adaptatrice Grb2 (Upshaw and Leibson, 2006). Le recrutement et l'activation de ces deux éléments permettent le déclenchement des cascades de signalisation aboutissant à une réorganisation de l'actine et à la dégranulation des NK.

1.5. Les récepteurs de cytotoxicité naturelle (NCR)

Les membres du groupe de récepteurs de cytotoxicité naturelle NKp46 (NCR1) (Ponassi et al., 2003), NKp44 (NCR2) (Cantoni et al., 1999) et NKp30 (NCR3) (Pende et al., 1999) sont les premiers récepteurs activateurs identifiés sur les cellules NK dans les années 90 (Moretta et al., 2001). Les membres des NCR sont des protéines de type I appartenant à la superfamille des Ig (Borrego et al., 2002). Les protéines NCR sont couplées à différentes protéines adaptatrices de transduction du signal, dont le CD3 ζ , le Fc ϵ RI γ et la protéine adaptatrice DAP12 (Moretta et al., 2001). Le NKp46 et le NKp30 sont exprimés à la surface des cellules NK au repos, mais aussi à la surface des cellules NK humaines activées et de certains lymphocytes T, alors que le NKp44 est exprimé seulement à la surface des cellules NK humaines activées. Ces récepteurs jouent un rôle important dans la reconnaissance des

cellules tumorales. La reconnaissance des cellules tumorales ou infectées par un virus via ces récepteurs déclenche la lyse médiée par les cellules NK et la production de cytokines telles que l'IFN- γ (Kruse PH, 2014). L'acquisition des récepteurs NCR durant le processus de maturation des NK est corrélée avec l'acquisition de l'activité cytolytique contre les cellules tumorales (Sivori et al., 2003).

1.5.1. Le récepteur NKp46

Le récepteur activateur NKp46 (NCR1, CD335) est une glycoprotéine transmembranaire de type I, avec un poids moléculaire de 46-kDa, appartenant à la superfamille des Ig. Le gène codant pour le récepteur NKp46, nommé NCR1, est localisé sur le chromosome 19 dans la région LRC partagée avec les gènes codant pour les KIR et les ILT (Wilson et al., 2000). Il est exprimé à la surface de toutes les cellules NK, mais aussi à la surface des cellules NK immatures subissant une maturation à partir des précurseurs NK dérivés des cellules CD34⁺ (Moretta et al., 2001). Le NKp46 peut aussi être exprimé à la surface des ILC3 (Reynders et al., 2011). La protéine NKp46 est caractérisée par 2 domaines Ig-like de type C2 au niveau de la portion extracellulaire. La partie transmembranaire contient des résidus d'acides aminés chargés positivement (Arg), qui permettent d'associer le NKp46 avec les protéines adaptatrices CD3 ζ et le Fc ϵ RI γ (Barrow et al., 2019) portant respectivement 2 et 3 motifs ITAM pouvant transduire des signaux activateurs à la cellule NK. Lorsque NKp46 est engagé avec son ligand, les motifs ITAM sont phosphorylés par les kinases de la famille Src telles que Lck et Fyn (Fasbender et al., 2017). A travers les domaines SH2, les ITAM phosphorylés recrutent et activent les tyrosines kinases telles que Syk et/ou ZAP/70 (Brumbaugh et al., 1997), ce qui initie la cascade de signalisation aboutissant à l'activation des voies effectrices des cellules NK dépendantes de NKp46. NKp46 peut agir comme

récepteur de co-activation avec d'autres récepteurs tels que 2B4, CD2, NKG2D et DNAM-1 qui déclenchent la cytotoxicité des cellules NK par effets synergiques (Zamai et al., 2020).

La majorité des ligands associés aux tumeurs pour le NKp46 restent encore inconnus, mais les évidences *in vivo* sur des modèles de souris NKp46 Knock-out suggèrent le rôle de ce récepteur dans l'élimination des métastases tumorales (Glasner et al., 2012) (Halfteck et al., 2009). En effet, les ligands pour le NKp46 peuvent être exprimés par des tumeurs, tels que les mélanomes et les myélomes (Barrow et al., 2019). Le NKp46 peut également reconnaître les ligands viraux, telle que l'hémagglutinine A (HA) et l'hémagglutinine neuraminidase (HN). Le ligand bactérien pour le NKp46 est la vimentine exprimée à la surface des cellules infectées par *Mycobacterium tuberculosis*, et le ligand parasitaire pour NKp46 est la protéine de membrane des érythrocytes infectés par le Plasmodium falciparum (PfEMP1). De plus, NKp46 peut reconnaître le facteur du complément P et des ligands inconnus sur les cellules hépatiques étoilées et les cellules bêta-pancréatiques. De ce fait, NKp46 peut par conséquent inhiber la fibrose hépatique et participer par contre à la pathogénicité du diabète de type I. Il a également été montré que NKp46 peut reconnaître les molécules HS-GAG (Heparan Sulfate Glycosaminoglycans) qui sont souvent surexprimées par les cellules tumorales. Ainsi, la liaison du NKp46 avec ses ligands peut favoriser la cytotoxicité des cellules NK, augmenter la sécrétion de cytokines INF- γ et TNF- α , et participer dans le processus de l'immunité anti-infectieuse et anti-tumorale (Chen et al., 2020).

1.5.2. Le récepteur NKp44

Le récepteur NKp44 (NCR2, CD336) est une glycoprotéine de 44 kDa, membre de la superfamille des Ig caractérisée par un seul domaine extracellulaire de type V. Le gène codant pour NKp44, nommé NCR2, est également situé sur le chromosome 6 (6p21.1) dans la région

CMH de classe III. NKp44 est exprimé seulement à la surface des cellules NK activées et représente un marqueur spécifique d'activation des cellules NK. A noter que l'expression de NKp44 à la surface des cellules NK peut être stimulée par l'IL-2 (Moretta et al., 2001) (Pende et al., 1999). NKp44 ne contient pas de motifs ITAM au niveau de sa portion intracellulaire, mais est caractérisé par une région transmembranaire contenant les résidus Lys permettent son association avec la protéine adaptatrice DAP12 et transmet un signal activateur via le motif ITAM de DAP12 (Cantoni et al., 1999).

Les ligands pour le NKp44 sont les suivants : les ligands tumoraux, tels que le PCNA (Proliferating Cell Nuclear Antigen), le PDGF-DD (Platelet-Derived Growth Factor DD), le nitrogen-1 et le NKp44L, un isomère pour la protéine MLL5 (Mixed-lineage leukemia-5 protein) (Baychelier et al., 2013) ; les ligands viraux tels que HA et HN ; les ligands bactériens, tels que les composants de surface de cellules infectées par *Mycobacterium tuberculosis*. De plus, NKp44 reconnaît certaines molécules HLA-DP (Niehrs et al., 2019). Comme le NKp46, NKp44 peut également reconnaître les molécules HS-GAG.

1.5.3. Le récepteur NKp30

Le récepteur activateur NKp30 (NCR3, CD337) présente les mêmes caractéristiques moléculaires et fonctionnelles que le NKp46 (Moretta et al., 2001). En effet, le NKp30 est une glycoprotéine membranaire de 30kDa, membre de la superfamille des Ig caractérisée par un seul domaine extracellulaire de type V (Pende et al., 1999). Le gène codant pour NKp30, nommé NCR3, est situé sur le chromosome 6 dans le cluster TNF de la région CMH de classe III. Comme le NKp46, NKp30 est exprimé à la surface de toutes les cellules NK au repos et activées (Pende et al., 1999). Il présente une arginine chargée au niveau de sa portion transmembranaire qui lui permet de s'associer à la protéine adaptatrice CD3 ζ et FcR γ portant

des motifs ITAM qui permettent de transduire des signaux activateurs à la cellule NK (Moretta et al., 2001). Les réponses cellulaires NK induites par le NKp30 sont identiques à celles générées par le NKp46.

Les ligands tumoraux pour le NKp30 sont : la molécule B7-H6, la molécule BAG6/BAT3 (BCL2-associated athanogene 6/nuclear HLA-B-Associated Transcrip-3 Protein), et la galectin-3 (Chen et al., 2020). L'expression de B7-H6 peut être induite par le stress à la surface des cellules tumorales. Dans des modèles de lymphomes et de leucémies, il a été montré que la fixation du récepteur NKp30 avec son ligand B7-H6, pouvait activer les cellules NK humaines, déclencher la dégranulation et augmenter la cytotoxicité des NK (Kellner et al., 2012). L'expression de B7-H6 peut aussi être induite dans des situations inflammatoires sur les monocytes activés (CD16⁺CD14⁺) et sur les neutrophiles (après stimulation par les TLR) (Matta et al., 2013). Les ligands viraux pour NKp30 sont des ligands tels que l'hémagglutinine A (HA) du virus de la vaccine et des poxivirus, et la protéine pp65 du CMV humain (Chen et al., 2020). Le ligand parasitaire pour NKp30 est la protéine de membrane des érythrocytes infectés par le Plasmodium falciparum (PfEMP1). Comme tous les NCR, NKp30 peut également reconnaître les molécules HS-GAG.

Par ailleurs, le récepteur activateur NKp30 est considéré comme la cible thérapeutique prometteuse pour plusieurs types de cancers. La diminution d'expression de ce récepteur a été observée chez des patients avec un cancer cervical et chez des patients avec des lésions intra-épithéliales squameuses de haut-grade (Garcia-Iglesias et al., 2009).

1.6. Le récepteur 2B4

Le 2B4 (CD244, SLAMF4) est membre de la sous-famille des molécules CD2 encore appelée SLAM (Signaling Lymphocyte Activation Molecule), qui fait partie de la

superfamille des Ig (Mathew et al., 2009) (Buller et al., 2020). Le gène du 2B4, localisé sur le chromosome 1 dans la région de la sous-famille CD2, code pour une glycoprotéine caractérisée par un domaine extracellulaire distal Ig-like de type V (variable, IgV) et d'un domaine extracellulaire proximal Ig-like de type C2 (constant, IgC2), d'un seul domaine transmembranaire et d'une queue cytoplasmique longue portant 3 motifs à base de tyrosine (2B4 humain) (Mathew et al., 1993). Les motifs à base de tyrosine, correspondant aux motifs ITSM (Immunoreceptor tyrosine-based switch motifs), suivent le modèle TIYxxV/I (T :threonine, I :Isoleucine, Y :tyrosine, x : tout acide aminé, V :valine). Ainsi, la portion cytoplasmique du récepteur 2B4 contient des motifs ITSM qui permettent son association aux protéines adaptatrices SAP (SLAM-Associated Protein) (Veillette and Latour, 2003) qui assurent la transduction d'un signal activateur à la cellule NK. Le 2B4 est exprimé à la surface de toutes les cellules NK, mais également à la surface des cellules T $\gamma\delta$, des basophiles, des monocytes, ainsi qu'à la surface d'une sous-population de lymphocytes T $\alpha\beta$ CD8⁺ mémoires (McNerney et al., 2005). Le CD48, qui est le ligand pour 2B4, est aussi membre de la sous-famille CD2. Ce ligand est lié à l'ancre GPI (glycophosphatidylinositol) et exprimé à la surface de toutes les cellules hématopoïétiques, dont les cellules NK (Mathew et al., 2009). Le CD48 est surexprimé dans les conditions de stress à la surface des cellules tumorales.

Les premières données ayant suggéré le rôle de 2B4 dans la régulation de l'activation des cellules NK, ont montré que la liaison du récepteur 2B4 par des anticorps spécifiques conduisait à la production de l'IFN- γ et à la cytotoxicité médiée par les cellules NK *in vitro* (Garni-Wagner et al., 1993). D'autres études ont montré que le récepteur 2B4 est activateur lorsqu'il est exprimé à la surface des cellules NK matures chez l'homme (Mathew et al., 2005) et inhibiteur lorsqu'il est exprimé à la surface des cellules NK immatures au cours de la phase précoce de différenciation des cellules NK humaines. Les cellules NK immatures avec un 2B4 inhibiteur n'expriment que faiblement la protéine SAP (Sivori et al., 2002), ce qui

indique l'implication de 2B4 dans la tolérance au soi au cours de la maturation des NK. Le rôle inhibiteur de 2B4 à la surface des cellules NK a également été rapporté chez la souris (Vaidya and Mathew, 2006). L'activation des cellules NK médiée par l'interaction 2B4/CD48 nécessite le recrutement des protéines adaptatrices SAP. L'altération de la fonction des protéines SAP a été observée chez des patients atteints de syndrome lymphoprolifératif lié à l'X de type 1 (XLP1), en générant un signal inhibiteur plutôt qu'un signal activateur (Veillette, 2010) (Meazza et al., 2017) En effet, en absence des protéines SAP, les protéines SHP1/SHP2 et EAT2, qui sont des phosphatases, se lient aux motifs ITSM de la portion cytoplasmique de 2B4 et transduisent un signal inhibiteur (Lanier, 2008). Ainsi, la perte de fonction de SAP peut baisser la cytotoxicité des cellules NK et altérer leur capacité à éliminer les cellules tumorales ou les cellules infectées par un virus. Par ailleurs, il a été également montré que l'expression du ligand CD48 était fortement corrélée à la progression de la tumeur, au faible pronostic, une immunosuppression, ainsi qu'à des réponses inflammatoires chez des patients atteints de glioblastome (Du et al., 2014).

1.7. Le récepteur DNAM-1 (DNAX-Accessory Molecule 1)

Le récepteur activateur DNAM-1 (CD226) est une glycoprotéine membre de la superfamille des Ig-like exprimée par la majorité des cellules NK humaines, les monocytes et par les lymphocytes T et B (Chester et al., 2015). La portion extracellulaire de DNAM-1 contient 2 domaines Ig-like et sa portion cytoplasmique contient 3 résidus tyrosines. Le récepteur de poliovirus PVR (CD155) et Nectin-2 (CD122) ont été identifiés comme ligands pour DNAM-1 chez l'homme et chez la souris. Ces ligands sont exprimés, en général, à la surface des tissus sains, et surexprimés par les cellules tumorales (Bottino et al., 2003). La cytotoxicité des cellules NK peut être déclenchée par l'engagement de DNAM-1 avec ses ligands. En effet, l'interaction de DNAM-1 avec ses ligands déclenche la phosphorylation des

sérines de sa portion cytoplasmique par des protéines kinases Src de la famille Fyn (Shibuya et al., 1999), et initie la transduction du signal activateur. Ce signal activateur médié par l'engagement de DNAM-1 déclenche la cytotoxicité des NK et la production des cytokines. Ainsi, la reconnaissance des ligands CD155 et CD122 par DNAM-1 potentialise la cytotoxicité des cellules NK contre un large panel de cellules tumorales. Ce mécanisme de reconnaissance a été reconnu être critique dans l'immunosurveillance des tumeurs par les cellules NK dans plusieurs modèles murins (Iguchi-Manaka et al., 2008) (Lakshmikanth et al., 2009) (Chan et al., 2014). En particulier, sur les cellules NK fraîchement isolées, DNAM-1 nécessite une co-aggrégation avec au moins un autre récepteur activateur pour activer efficacement les fonctions effectrices des cellules NK (Iannello et al., 2016) (Bryceson et al., 2006). En effet, DNAM-1 peut transmettre des signaux activateurs en agissant en synergie avec la molécule d'adhésion LFA-1 (Lymphocyte Function-associated Antigen) ou le récepteur activateur 2B4. Dans certaines circonstances expérimentales, l'effet anti-tumoral de DNAM-1 était significatif seulement quand les réponses anti-tumorales étaient induites par les cytokines (Gao et al., 2017). Les cellules cancéreuses expriment fréquemment les ligands pour DNAM-1 à des niveaux élevés et l'activation des cellules NK médiée par DNAM-1 est impliquée dans l'élimination des cellules cancéreuses (Chan et al., 2012) (Casado et al., 2009). Plusieurs études expérimentales ont apporté des preuves que l'interaction de DNAM-1 avec ses ligands sur les cellules tumorales joue un rôle important dans la défense contre différents types de cancers. Ce point est détaillé plus loin dans la partie « rôle des cellules NK dans l'immunité anti-tumorale ».

1.8. Le récepteur CD16 (FcγRIIIa)

Le récepteur FcγRIIIa/CD16a est un récepteur de faible affinité pour le fragment Fc des IgG ($K_a=2-3 \cdot 10^7 \text{ M}^{-1}$), avec une fixation plus forte des IgG1 et des IgG3 que des IgG2 et IgG4 ($1=3>4>2$) (Koene HR, Kleijer M, 1997). Le FcγRIIIa est exprimé sur les lymphocytes NK, les macrophages, quelques sous-populations de monocytes et des sous-populations de lymphocytes Tγδ (Farrington et al., 2020) (Lafont et al., 2001) (Angelini et al., 2004) et αβ (Jacquemont et al., 2020) (Clémenceau et al., 2008). Le CD16 est associé de façon non covalente au niveau de sa portion transmembranaire soit avec des homodimères de TCRζ (CD247) qui contient 3 ITAM, soit des homodimères de la protéine adaptatrice FcR-γ (FcεRIγ) qui contient un seul motif ITAM, soit avec des hétérodimères TCRζ/FcεRIγ (Ravetch and Bolland, 2001) (Blázquez-Moreno et al., 2017). Suite à l'engagement du CD16 avec les fragments Fc des anticorps, les motifs ITAM sont phosphorylés et recrutent les protéines kinases de la famille Src pour initier la cascade de signalisation intracellulaire aboutissant à l'activation de la cytotoxicité des cellules NK dépendante de l'anticorps (ADCC) (Sánchez-Mejorada and Rosales, 1998). Cette activité ADCC est fortement exploitée en clinique, notamment dans le contexte des immunothérapies anti-cancéreuses à base d'anticorps monoclonaux. Les stratégies thérapeutiques basées sur le mécanisme de l'ADCC des NK sont détaillées plus loin.

1.9. Les Toll-like Receptors (TLR)

Initialement décrits sur d'autres cellules de l'immunité innée telles que les DC et les monocytes/macrophages, certains TLR comme les TLR2, TLR3, TLR4, TLR5, TLR7, TLR8 et TLR9 ont été décrits sur les cellules NK humaines (Adib-Conquy et al., 2014) (Becker et al., 2003) (Pisegna et al., 2004) (Sivori et al., 2007) (Hart et al., 2005) (Chalifour et al., 2004)

(Sivori et al., 2004). Les TLR permettent aux cellules NK de détecter et répondre aux motifs viraux et bactériens. En particulier, il a été montré que la reconnaissance des PAMP par les TLR pouvait induire l'activation des cellules NK, notamment en termes de cytotoxicité et de sécrétion de cytokines. L'activation des cellules NK médiée par les PAMP peut se produire grâce à d'autres cellules de l'immunité, telles que les DC, qui mettent en place un microenvironnement cytokinique nécessaire pour l'induction de la réponse NK. De plus, dans le contexte des interactions (cross-talk) NK/DC, les TLR peuvent permettre aux cellules NK d'initier l'édification et la maturation des DC, un processus de « contrôle qualité » utilisé par les cellules NK pour sélectionner uniquement les DC qui ont subi une maturation de façon appropriée, et comme conséquence, pourront être capables d'induire un déclenchement optimal des fonctions effectrices des lymphocytes T après leur migration aux organes lymphoïdes secondaires. Une coopération particulière entre les TLR et les KIR a été mise en évidence dans les cellules NK (Sivori et al., 2010b). En effet, le KIR3DL2 peut se fixer sur les CpG-ODN (ligands du TLR9) à la surface des cellules NK par son domaine extracellulaire DO et adresse les CpG-ODN vers les endosomes où le TLR9 est localisé, ce qui permet par conséquent d'induire l'activation des fonctions NK. Il a été également montré que d'autres KIR portant un domaine DO sont capables de reconnaître le CpG-DNA. Ces données montrent que la coopération entre les TLR et les KIR confère aux cellules NK les capacités de défenses anti-microbiennes (Sivori et al., 2020).

1.10. Autres récepteurs inhibiteurs NK non retenus par les molécules HLA

En dehors des récepteurs décrits ci-dessus, les cellules NK expriment à leur surface beaucoup d'autres récepteurs inhibiteurs portant des motifs ITIM au niveau intracellulaire (Chen et al., 2020), mais qui ne sont pas spécifiques des molécules HLA de classe I. C'est le cas par exemple des récepteurs CD161 (NKR-P1), CD96 (TACTILE), TIGIT, TIM-3 et PD-1

qui fonctionnent comme des points de contrôle inhibiteurs de l'activation des cellules NK (Sivori et al., 2019). Certains de ces récepteurs peuvent être induits ou surexprimés dans des conditions pathologiques suite à la rencontre d'une tumeur primaire ou d'une cellule infectée par un virus.

Le CD161 (NKR-P1) est un récepteur inhibiteur appartenant à la superfamille des lectines de type C, exprimé sur la majorité des cellules NK et sur les sous-populations de lymphocytes T. La molécule LLT1 a été identifiée comme ligand spécifique pour le récepteur inhibiteur CD161 (Braud et al., 2018). Le ligand LLT1 est exprimé par différentes tumeurs dont les lymphomes non Hodgkiniens (NHL) (Bialoszewska and Malejczyk, 2018). Bien que le CD161 fonctionne comme un récepteur inhibiteur sur les cellules NK matures, son rôle activateur a été mis en évidence durant la phase précoce de différenciation des cellules NK ou des ILC (Montaldo et al., 2012).

TIGIT, encore appelé VSig9, Vstm3, ou WUCAM, a été identifié pour la première fois en 2009 comme nouveau membre de la superfamille des Ig (Stanietsky et al., 2009) (Sanchez-Correa et al., 2019). TIGIT est un récepteur inhibiteur exprimé à la surface des cellules NK, des lymphocytes T régulateurs, des lymphocytes T folliculaires et des lymphocytes T mémoires (Stanietsky et al., 2009) (Levin et al., 2011). La portion cytoplasmique contient un motif ITIM et un motif ITT (Immunoglobulin Tail Tyrosine-like motif), qui est très conservé entre la souris et l'homme (Stanietsky et al., 2009) (Yu et al., 2009). Bien que portant un motif ITIM au niveau de sa portion cytoplasmique, la signalisation de ce récepteur n'est pas dépendante des molécules HLA de classe I. En effet, comme DNAM-1, TIGIT reconnaît Nectin-2 (CD112) et PVR (CD155) comme ligands. TIGIT reconnaît également CD113, un autre membre de la famille Nectin (Martinet and Smyth, 2015) (Yu et al., 2009). Il a été suggéré que l'effet combiné de TIGIT à travers ces voies de signalisation inhibe la cytotoxicité des NK, la polarisation des granules et la sécrétion des cytokines par les NK

(Stanietsky et al., 2009). Les études ont montré que TIGIT peut inhiber l'activation des lymphocytes T, leur prolifération et l'acquisition des fonctions effectrices en ciblant les voies de signalisation du TCR tels que le CD3 ϵ et PLC γ (Levin et al., 2011) (Joller et al., 2011). Il a été également montré que le blocage de TIGIT pouvait prévenir l'altération des fonctions effectrices des cellules NK et améliorer l'immunité anti-tumorale médiée par les cellules NK et les lymphocytes T (Zhang et al., 2018).

Comme TIGIT, le CD96 (TACTILE) peut exercer son effet inhibiteur par compétition avec les récepteurs activateurs DNAM-1 pour les ligands CD155 (PVR) et CD112 (Nectin-2), souvent surexprimés par les cellules tumorales (Sivori et al., 2020).

PD-1, un membre de la superfamille des Ig, reconnaît PDL-1, et avec une forte affinité PD-L2. Les ligands PD-L1 et PD-L2 peuvent être surexprimés sur certaines tumeurs (Pesce et al., 2019). Dans le cancer, la liaison du PD-1 avec ses ligands exprimés à la surface des cellules tumorales peut altérer la fonction de cytotoxicité de la cellule NK, favorisant ainsi l'échappement immunitaire de la tumeur. À noter que l'expression du PD-1 peut être induite par le microenvironnement tumoral à travers les signaux délivrés par les facteurs solubles ou des cellules. Les cellules NK PD1^{bright} ont été détectées chez les patients atteints d'une infection à CMV et de tumeurs (Pesce et al., 2017) (Della Chiesa et al., 2016, p. 22016). Dans le cas de tumeurs, les cellules NK PD1⁺ ont été détectées chez des patients atteints de carcinome ovarien, de sarcome de Kaposi et de lymphome de Hodgkin (Beldi-Ferchiou et al., 2016) (Vari et al., 2018).

Plusieurs ligands pour TIM-3 ont été identifiés, parmi lesquels la galectine-9, la phosphatidylserine (PtdSer), l'HMGB1 (Joller and Kuchroo, 2017) et le CEACAM1 (Carcinoembryonic Antigen-related Cell Adhesion Molecule 1) (Huang et al., 2015). Il a été suggéré que TIM-3 nécessitait une interaction en cis ou en trans avec le CEACAM-1 pour exercer une fonction inhibitrice (Joller and Kuchroo, 2017).

1.11. Les récepteurs de co-stimulation et les molécules d'adhésion

Les cellules NK expriment également plusieurs récepteurs activateurs qui fonctionnent le plus souvent comme des co-récepteurs. Parmi ces récepteurs, on peut citer le NTB-A (Bottino et al., 2001), le NKp80 (Vitale et al., 2001) et le CD59 (Marcenaro et al., 2003). Le rôle de ces récepteurs est de renforcer et d'amplifier l'activation des cellules NK induite par d'autres récepteurs NK comme les NCR ou le NKG2D. Le NKp80 est spécifique de la molécule AICL (Activation-Induced C-type Lectin). NTB-A (NK-T-B Antigen), quant à lui, est membre de la famille SLAM et peut être détecté à la surface de toutes les cellules NK, des lymphocytes T et B (Chen et al., 2020). Le mécanisme d'action de NTB-A est similaire à celui du récepteur 2B4 (Katz et al., 2014). Il exerce aussi un effet synergique avec les autres récepteurs activateurs pour renforcer l'activation des cellules NK. Les études ont montré que 2B4 et NTB-A peuvent reconnaître les molécules HA du virus influenza via une sialylation et induire la fonction cytotoxique des cellules NK par co-stimulation (Duev-Cohen et al., 2016).

Les cellules NK peuvent également exprimer d'autres molécules de co-stimulation et d'adhésion telles que CD2 spécifique de CD48 et CD58 (LFA-3), CD28 spécifique de CD80 (B7-1) et CD86 (B7-2), OX40 qui a pour ligand OX40L, CD27 qui est spécifique de CD70 et LFA-1 qui reconnaît la molécule ICAM-1. CD137 (ou 4-1BB) est exprimé sur les NK que lorsque le récepteur CD16 est engagé (Chester et al., 2015).

1.12. Les récepteurs de cytokines

La famille des récepteurs de cytokines portant une chaîne γ commune (γ_c) comprend six membres, les récepteurs des interleukines IL-2R, IL-4R, IL-7R, IL9R, IL-15R et l'IL-21R (Figure 9). Chacun d'entre eux se distingue des autres par leurs chaînes α uniques. Les complexes IL-2R et IL-15R partagent la même chaîne β , l'IL-2R β (CD122). La chaîne γ_c

(CD132) est une glycoprotéine transmembranaire de type I de 40kDa qui sert de sous-unité de signalisation pour les cytokines IL-2, IL-4, IL-7, IL-9, IL-15 et IL-21 (Boulanger and Garcia, 2004).

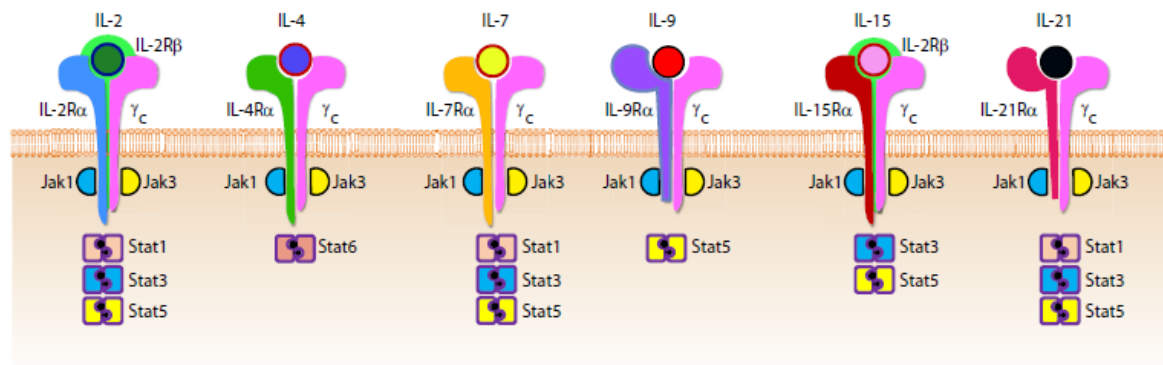


Figure 9 : Les récepteurs de cytokines associés à la chaîne γ commune (γ_c). La famille des récepteurs portant un domaine γ_c est composée de 6 membres : les récepteurs l'IL-2R, l'IL-4R, l'IL-7R, l'IL-9R, l'IL-15R et l'IL-21R. Chacun d'entre eux se distingue des autres par sa chaîne α unique. L'IL-2R β est partagée par les complexes IL-2R et IL-15R. La signalisation via la chaîne γ_c en réponse à une cytokine spécifique est initiée au niveau intracellulaire par des kinases associées aux récepteurs de cytokines JAK qui phosphorylent différentes molécules STAT. Ces récepteurs permettent de réguler le développement, la prolifération et la survie, et les fonctions de production de cytokines des cellules (D'après Abel AM et al., 2018).

Les cellules NK expriment des récepteurs de cytokines dès la phase précoce de leur développement (Rosmaraki et al., 2001) et la signalisation par la chaîne γ_c est nécessaire pour leur développement, leur homéostasie et leur fonction (Meazza et al., 2011). Bien que ces cytokines présentent une certaine redondance fonctionnelle, leurs fonctions spécifiques au niveau de la cellule NK lors d'une réponse immunitaire sont déterminées par l'expression de complexes de récepteurs distincts. L'IL-4, l'IL-7, l'IL-9 et l'IL-21 se lient à des complexes de récepteurs de cytokines de haute affinité constitués d'une chaîne α spécifique aux cytokines et de la chaîne γ_c (Meazza et al., 2011). La signalisation via la chaîne γ_c en réponse à une

cytokine spécifique est initiée au niveau intracellulaire par des kinases associées aux récepteurs JAK (Janus Kinase) qui phosphorylent différentes molécules STAT (Signal Transducers and Activators of Signaling) (Ghoreschi et al., 2009). Les récepteurs de cytokines IL-15R et l'IL-21R sont nécessaires pour initier et maintenir la prolifération des cellules NK. L'IL-2, principalement produite par les cellules T CD4⁺, est largement utilisée pour développer les cellules NK humaines et de souris *ex vivo*. L'IL-7 joue un rôle dans le développement précoce des cellules NK, mais régule également la survie et l'expansion des cellules NK CD56^{bright}. Le rôle de l'IL-4 et de l'IL-9 dans le développement des cellules NK est moins bien exploré.

1.13. Les récepteurs impliqués dans la circulation des cellules NK

La circulation et la distribution des sous-populations NK dans différents tissus est déterminée par les récepteurs de chimiokines exprimés à la surface des cellules NK et les chimiokines secrétées dans ces tissus. Les cellules NK du sang périphérique expriment les récepteurs de chimiokine CXCR1, CXCR2, CXCR3, CXCR4, CX3CR1, CCR5 et CCR7 (Bernardini et al., 2012). L'expression de ces récepteurs de chimiokine est différentielle à la surface des cellules NK CD56^{bright} et des NK CD56^{dim} (Campbell et al., 2001). Les cellules NK CD56^{dim} expriment fortement le CXCR1, CXCR4, ChemR23 et le CX3CR1, et faiblement le CXCR2 et le CXCR3. Par contre, les cellules NK CD56^{bright} expriment fortement les CXCR3, CXCR4, CCR5 et CCR7, et faiblement le CX3CR1. Elles n'expriment pas les récepteurs de chimiokines CXCR1 et CXCR2. Le CXCR4, récepteur de la chimiokine CXCL12, assure la rétention des cellules souches hématopoïétiques dans la moelle osseuse et la diminution d'expression du CXCR4 au cours de la maturation des cellules NK favorise leur migration vers le sang périphérique (Dar et al., 2006). Le récepteur S1P5 (sphingosine-1

phosphate receptor 5) est une molécule également impliquée dans la libération des cellules NK dans le sang périphérique et dans leur maintien dans la circulation sanguine. Les récepteurs de chimiokine CXCR1, CXCR2 et ChemR23 permettent aux cellules NK CD56^{dim} de migrer de préférence vers les tissus inflammatoires (Poggi and Zocchi, 2014). Le CCR7, récepteur de la chimiokine CCL21, et la L-sélectine CD62L favorisent l'entrée des cellules NK CD56^{bright} dans les organes lymphoïdes secondaires (Abel et al., 2018). A noter que le microenvironnement inflammatoire riche en IL-18, par exemple, peut favoriser l'induction de l'expression du CCR7 à la surface des NK CD56^{dim}, conférant ainsi aux cellules NK CD56^{dim} la capacité de migrer vers les ganglions lymphatiques dans lesquels le cross-talk entre les cellules NK CD56^{dim} et les DC peut s'effectuer, ce qui peut influencer la polarisation et la fonction des cellules T adaptatives (Pesce et al., 2016). Le CXCR3 et son ligand CXCL10 sont impliqués dans la migration des cellules NK dans les sites tumoraux et dans l'induction de l'immunité anti-tumorale médiée par les cellules NK (Wendel et al., 2008). Enfin, le maintien de certaines populations des cellules NK dans le foie dépend du CXCR6, récepteur de la chimiokine CXCL16 qui est constitutivement exprimée par les cellules endothéliales hépatiques (Paust et al., 2010).

2. Le développement des cellules NK

2.1. Sites et étapes de développement des cellules NK

Les cellules NK dérivent des cellules souches hématopoïétiques (CSH) qui donnent naissance à toutes les cellules du sang périphérique (Del Zotto et al., 2017). Chez l'homme, la moelle osseuse a longtemps été considérée comme le site principal de développement et de différenciation des cellules NK après la naissance, mais la mise en évidence des populations dont le phénotype ressemble aux CSH CD34⁺ dans les tissus périphériques tels que les tissus lymphoïdes secondaires, le sang périphérique, le foie, les tissus lymphoïdes associés aux

muqueuses (MALT) et l'utérus (Freud and Caligiuri, 2006) (Freud and Caligiuri, 2006) (Male et al., 2010) suggère que le développement des cellules NK pourraient avoir lieu dans d'autres sites anatomiques que la moelle osseuse. Les amygdales, la rate et les ganglions lymphatiques sont des tissus lymphoïdes secondaires considérés comme les sites extra-médullaires majeurs de différenciation et de maturation des cellules NK (Di Vito et al., 2019).

La moelle osseuse humaine est une niche immunologique fortement enrichie en CSH $CD34^+$, en progéniteurs hématopoïétiques et même en cellules NK matures. Dans cette dernière, les CSH $CD34^+$ se développent d'abord en progéniteurs communs lymphoïdes (CLP) capables de donner naissance à tous les sous-types de lymphocytes (Di Vito et al., 2019). Des études ont suggéré que les CSH $CD34^+$ et les CLP, qui constituent le pool de cellules hématopoïétiques progénitrices de cellules NK, pourraient migrer de la moelle osseuse vers les tissus périphériques où elles vont subir une différenciation en cellules NK matures (Caligiuri, 2008). Dans la moelle osseuse, le développement des cellules NK est sous l'influence des interactions avec les cellules stromales, des cytokines, des facteurs de croissance, et les autres facteurs solubles. Les progéniteurs et les différents stades de différenciation qui concourent à la maturation des cellules NK peuvent être identifiés sur la base des différents marqueurs de surface spécifiques de lignées. Les CSH de phénotype $CD34^+CD133^+CD244^+CD45RA^-$ vont acquérir l'expression du CD45RA pour devenir CLP avec un phénotype $CD34^+CD133^+CD244^+CD45RA^+$. Le CLP est un progéniteur hématopoïétique capable de générer les lymphocytes T et B, et les cellules innées lymphoïdes (ILC) (Scoville et al., 2019). Dans la moelle osseuse humaine, le processus de différenciation de la CSH en CLP nécessite une interaction avec les cellules stromales dans un microenvironnement caractérisé par la présence du facteur de croissance SCF (Stem Cell Factor), de l'IL-7 et du ligand pour le facteur de transcription FLT3L (fms-like tyrosine kinase 3 ligand) (Di Santo, 2006). Sur la base des données *in vitro* et *in vivo* chez l'homme et

chez la souris, un modèle de développement des cellules NK a été proposé (Freud and Caligiuri, 2006) (Di Vito et al., 2019). Ainsi, comme illustrées dans la Figure 10, 6 étapes de développement des cellules NK à partir des CLP peuvent être identifiées :

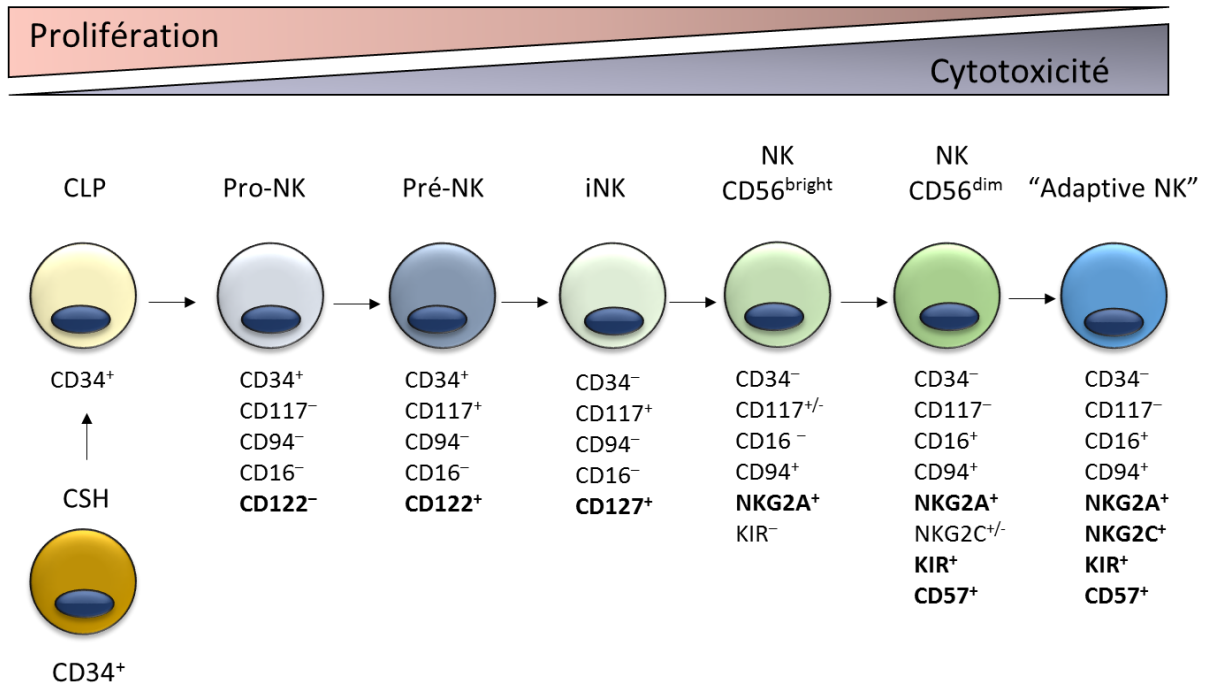


Figure 10: Modèle de développement linéaire des cellules NK humaines.

Dans ce modèle de développement linéaire des cellules NK humaines, les cellules souches hématopoïétiques (CSH) CD34⁺ se différencient en progéniteurs communs lymphoïdes (CLP). L'engagement dans la lignée commence au stade Pro-NK. Les Pro-NK se différencient en Pré-NK qui deviennent ensuite des cellules NK immatures (iNK). La maturation des cellules NK est marquée par les stades NK CD56^{bright} et NK CD56^{dim}. Les cellules NK CD56^{bright} sont caractérisées par leur capacité de cytotoxicité faible et d'une capacité de prolifération et de production de cytokines augmentée. Les cellules NK CD56^{dim} sont caractérisées par leur capacité de cytotoxicité élevée et d'une faible capacité de prolifération et de production de cytokines. La différenciation en cellules NK "adaptative" ou "memory-like NK" se produit en réponse à une infection par le CMV, caractérisée par une expansion clonale des sous-populations NK NKG2C⁺ éduquées et plus différenciées KIR2DL⁺ CD57⁺ (Inspiré de Cichocki et al., 2019).

- Stade 1 : les progéniteurs des cellules NK ou pro-NK :

L'engagement des CLP en Pro-NK est caractérisé par l'acquisition d'expression de l'IL-7R α (CD127). A ce stade, aucun marqueur spécifique de lignée tel que le CD3, le CD14 ou le

CD19, n'est exprimé à la surface des Pro-NK. Ces cellules présentent un phénotype $CD34^+CD10^+CD127^+CD45RA^+$. Elles n'expriment pas le CD122 et ne répondent donc pas à l'IL2 et à l'IL-15. Le CD122 (IL-2R β) est la sous-unité β du récepteur de l'IL-2 et de l'IL-15 (Rosmaraki et al., 2001) (Becknell and Caligiuri, 2005). L'IL-15 est une cytokine essentielle pour la différenciation et la maturation des cellules NK. Des études expérimentales ont montré que les souris déficientes pour le CD122, composante du récepteur trimérique de l'IL-15, présentent une absence de cellules NK matures (Kennedy et al., 2000) (Williams et al., 1998). En revanche, l'IL-7 est une cytokine clé pour la survie et la différenciation des Pro-NK en Pré-NK (von Freeden-Jeffry et al., 1995).

- Stade 2 : les précurseurs NK ou pré-NK :

La transition des Pro-NK en pré-NK est marquée par l'acquisition d'expression du CD122 et du CD117 (c-kit). Plus récemment, 2 stades de maturation des pré-NK ont été décrits sur la base de l'expression des récepteurs de l'IL-1 β et de l'IL-2 β (IL-1R). Les Pré-NK IL-1R $^+$ sont prédominantes dans certains tissus comme les tissus lymphoïdes secondaires et le sang périphérique et gardent la capacité de donner naissance aux lymphocytes T et aux DC. A l'inverse, les Pré-NK IL-1R $^-$ représentent les progéniteurs communs de cellules lymphoïdes innées (CILP), capables de générer les ILC et les cellules NK (Scoville et al., 2019). Les cellules du stade 2 sont capables de se différencier en cellules NK immatures (iNK) en réponse à l'IL-15 grâce à l'expression du CD122. Enfin, les pré-NK sont caractérisées par le phénotype $CD34^+CD10^+CD127^+CD45RA^+IL-1\beta^{+/-}CD117^+CD122^+$.

- Stade 3 : les cellules NK immatures (iNK) :

La transition des pré-NK en cellules NK immatures (iNK) est marquée par la perte d'expression du CD34. Ces iNK vont acquérir de manière progressive l'acquisition d'expression des récepteurs activateurs NK comme le NKG2D, le NKp30 et le NKp46 pour

devenir NK matures. Elles sont capables de répondre à l'IL-15 pour donner naissance aux cellules NK matures. Par ailleurs, la transition des iNK en cellules NK matures est également associée à l'acquisition séquentielle de l'expression du CD56, du CD94 et du CD161 (Montaldo et al., 2013). L'acquisition du CD94 est essentielle pour la formation des récepteurs hétérodimériques de la superfamille des lectines de type C, notamment le NKG2A et le NKG2C. Ainsi, les cellules NK immatures ont un phénotype $CD34^-CD45RA^+CD117^+CD122^+CD161^{+/-}CD56^{-/low}CD94^-$.

Le phénotype $CD34^-CD117^{+/-}CD122^+CD161^+CD94^+NKp44^{low}NKG2D^+$ définit les cellules NK matures qui peuvent être distinguées en 2 stades (stade 4 et stade 5) majeurs de développement final sur la base de l'expression du CD56 et du CD16.

- **Stade 4 : les cellules NK $CD56^{bright}$:**

Les cellules NK $CD56^{bright}$ marquent le début de la phase de maturation et ont un phénotype $CD34^-CD117^{low}CD94^+CD16^-$. Cette phase de développement des cellules NK est caractérisée par l'acquisition séquentielle des marqueurs spécifiques des cellules NK sur les iNK qui est accompagnée de l'acquisition des capacités fonctionnelles effectrices et des capacités de tolérance au soi. En effet, ces cellules sont caractérisées par une forte expression constitutive des récepteurs activateurs NK comme le NKG2D, le NKp30 et le NKp46 et par l'expression du CD94/NKG2A comme seul récepteur inhibiteur spécifique des molécules HLA de classe I à ce stade. Elles n'expriment pas le marqueur CD16 et les KIR. Les cellules $CD56^{bright}$ sont dites immunorégulatrices puisqu'elles sont caractérisées par leur capacité à produire de fortes quantités de cytokines telles que l'IFN- γ et par leur faible capacité à médier une cytotoxicité dépendante de la perforine *in vitro* (Abel et al., 2018). Elles sont capables de proliférer de manière intensive en réponse à l'IL-2 et l'IL-15, et ont encore un phénotype immature comme confirmé par la taille de leurs télomères qui est longue (Romagnani et al., 2007). Une autre molécule jouant un rôle important dans le processus de développement des cellules NK est le

NKp80 (Vitale et al., 2001). En effet, deux populations distinctes de cellules NK CD56^{bright} peuvent être distinguées sur la base de l'expression du récepteur NKp80 (Freud et al., 2016) (Vitale et al., 2001): les cellules NKp80⁻ qui marquent les cellules NK CD56^{bright} localisées dans les organes lymphoïdes secondaires et les populations NKp80⁺ qui ressemblent aux cellules NK CD56^{bright} circulantes.

- **Stade 5 et stade 6 : les cellules NK CD56^{dim} :**

La diminution d'expression du CD56^{bright} des cellules NK du stade 4 donne naissance aux cellules NK CD56^{dim}. Les cellules NK CD56^{dim} sont donc plus matures que les NK CD56^{bright} et marquent le dernier stade de développement des cellules NK dans la moelle osseuse et dans les tissus périphériques. Plus de 90% des cellules NK CD56^{dim} sont retrouvées dans le sang périphérique (Cooper et al., 2001). Durant la phase de transition des cellules NK CD56^{bright} en cellules NK CD56^{dim}, les cellules NK CD56^{bright} perdent leur expression en CD117 et CD127. Cette phase est également marquée par l'acquisition du CD16, des récepteurs KIR et du CD94/NKG2C. Les cellules NK CD56^{dim} peuvent également migrer vers les sites inflammatoires périphériques par l'expression des CXCR1, CXCR3 et ChemR23 et produisent de quantités plus élevées de granules lytiques (Flórez-Álvarez et al., 2018). Enfin, durant la phase tardive de différenciation (stade 6), les cellules NK CD56^{dim} CD16⁺KIR⁺CD94/NKG2A⁺ peuvent aussi exprimer le récepteur CD57 à des niveaux élevés, en perdant l'expression du NKG2A et leur capacité proliférative (Del Zotto et al., 2017). Le CD57 est un marqueur de la sénescence répliquative qui caractérise les cellules NK en phase terminale de leur différenciation dans le sang périphérique (Björkström et al., 2010). L'acquisition de ce marqueur est accompagnée d'une capacité de cytotoxicité naturelle élevée des cellules NK et d'une faible capacité proliférative en réponse à l'IL-2 ou l'IL-15 (Di Vito et al., 2019). Un stade additionnel de différenciation terminale, dit "cellules NK mémoires", peut être défini sur la base d'expression du NKG2C. Ces cellules NK mémoires sont

identifiées chez des individus atteints des infections par le CMV (Béziat et al., 2013a) (Della Chiesa et al., 2012) (Foley et al., 2012). Les caractéristiques de cette sous-population NK sont présentées dans le chapitre suivant.

2.2. La mémoire des cellules NK

La génération des cellules NK « adaptatives » ou « mémoires » se produit suite à une stimulation prolongée ou continue à une infection par le CMV. Il a été montré que les cellules NK, en plus de leur capacité à tuer les cellules transformées, peuvent détecter les pathogènes et adapter leurs réponses à l'environnement local, laissant suggérer la capacité des cellules NK à générer une forme de mémoire immunologique. Bien que les cellules NK CD56^{dim} soient faiblement répondeuses à une stimulation par les cytokines (IL-2 et IL-15), elles gardent leur forte capacité de cytotoxicité et peuvent subir une expansion clonale en réponse à une infection virale (Lopez-Vergès et al., 2010). Dans le cas de l'infection par le CMV humain par exemple, les cellules NK reconnaissent via le récepteur activateur NKG2C les peptides antigéniques viraux présentés par les molécules HLA-E à la surface des cellules cibles. Cette reconnaissance induit l'activation des cellules NK et stimule la prolifération importante des sous-populations NK NKG2C⁺. De plus, la stimulation des cellules NK par le CMV humain est accompagnée de la production de l'IFN- γ (Schlums et al., 2015). Par conséquent, cette infection par le CMV est caractérisée par une expansion clonale des populations NK NKG2C⁺ CD57⁺ qui expriment préférentiellement les récepteurs inhibiteurs KIR2D pour lesquels les ligands HLA de classe I sont exprimés chez l'individu infecté par le CMV (Djaoud et al., 2013). Ces populations cellulaires sont alors définies comme “memory-like NK” puisqu'elles présentent de fortes fonctions effectrices lorsqu'elles rencontrent pour la deuxième fois le même type de virus (Della Chiesa et al., 2015) (Lugli et al., 2016). Ainsi, les cellules NK “mémoires” et “adaptatives” spécifiques du CMV humain sont caractérisées

par le phénotype $CD56^{\text{dim}} KIR^+CD57^+CD94/NKG2C^+$ et par l'absence d'expression des marqueurs NKG2A, CD161, NKp30 et CD7 (Gumá et al., 2004) (Béziat et al., 2012). Il est également important de noter que l'expansion des cellules NK mémoires $NKG2C^+$ est dépendante des cytokines IL-12 et IL-18 (Hammer et al., 2018) (Rölle et al., 2014). Par ailleurs, les cellules NK mémoires ont également été décrites dans les tissus périphériques. En effet, une sous-population NK $CXCR6^+$ avec des propriétés adaptatives contre les haptènes et les antigènes viraux a été mise en évidence dans le foie. Ces cellules NK résidentes du foie expriment le CD49a et le DX5 (Paust et al., 2010b) (Peng et al., 2013).

2.3. Les Cellules Lymphoïdes Innées (ILC)

Durant la dernière décennie, les cellules appartenant aux cellules lymphoïdes innées (ILC) ont été identifiées. Récemment, les ILC ont été classifiées en 5 sous-populations (NK, ILC1, ILC2, ILC3 et LTi) sur la base de leurs fonctions et des facteurs de transcription qu'elles utilisent au cours de leur développement (Figure 11) (Vivier et al., 2018). Comme décrit plus haut, les ILC partagent avec les cellules NK un précurseur lymphoïde commun (CILP) $ID2^+$ (Scoville et al., 2019). Alors que les cellules NK reflètent les fonctions des cellules T cytotoxiques $CD8^+$, les ILC1, ILC2 et ILC3 sont dites "ILC helper" (hILC) car elles sont non cytolytiques et reflètent les fonctions des cellules T "helper" $CD4^+$ Th1, Th2 et Th17, respectivement (Vivier et al., 2018).

Les cellules NK et les ILC1 produisent en commun l'IFN- γ et sont toutes les deux dépendantes du facteur de transcription T-bet. Alors que les facteurs de transcription Eomes sont nécessaires pour le développement des cellules NK, les ILC1 peuvent se développer en l'absence de ce facteur de transcription. Les ILC2 sont définies par leur capacité à produire les cytokines de type 2, l'IL-4, l'IL-5 et l'IL-13 (Sivori et al., 2020) et contiennent de plus

grandes quantités du facteur de transcription GATA3 que les autres sous-populations d'ILC (Klein Wolterink and Hendriks, 2013). Les ILC3 dépendent du facteur de transcription ROR γ t pour leur développement et leur fonction, et la cytokine prédominante qu'elles produisent est l'IL-22 (Sato-Takayama et al., 2008) (Buonocore et al., 2010). La cinquième sous-population d'ILC est représentée par les cellules LTi (Lymphoid Tissue inducer), importantes pour la formation des ganglions lymphatiques et des plaques de Peyer pendant le développement embryonnaire, principalement par l'action de la lymphotoxine qu'elles produisent (Mebius et al., 1997).

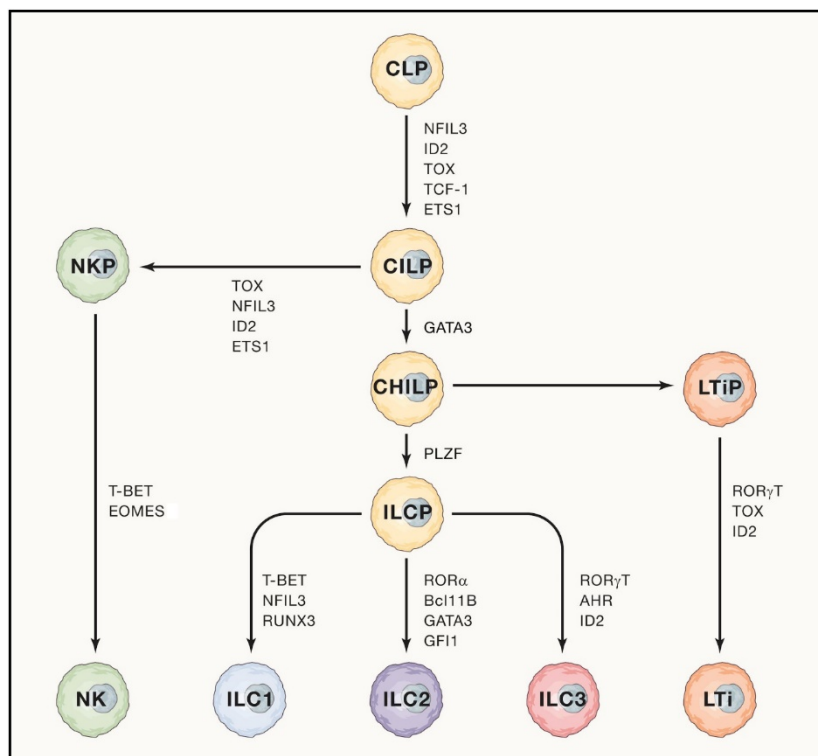


Figure 11 : Classification des Cellules Lymphoïdes Innées (ILC). La classification des ILC illustrée ici est basée sur le développement des ILC de souris. Les ILC se développent à partir des CILP (progéniteurs lymphoïdes innés communs) qui se différencient eux-mêmes à partir des CLP (progéniteurs lymphoïdes communs). Les CILP peuvent se différencier en cellules précurseurs des cellules NK (NKP) ou en CHILP (progéniteurs lymphoïdes innés auxiliaires communs), qui donnent eux-mêmes naissance à des LTiP (progéniteurs inducteurs de tissu lymphoïde) et des ILCP (précurseurs de cellules lymphoïdes innées). Les LTiP se différencient en LTi et les ILCP sont capables de se différencier en ILC1, ILC2 ou ILC3. Chaque étape de différenciation est dépendante des facteurs de transcription indiqués. La différenciation des NKP en cellules NK et celle des ILCP en ILC1 sont dépendantes du facteur de transcription T-bet. En revanche, la différenciation des ILCP en ILC2, ILC3 et LTi est dépendante du facteur de transcription ROR α (D'après Vivier E et al., Cell 2018).

Les ILC sont absentes ou peu fréquentes dans le sang périphérique chez les individus sains. Au contraire, elles résident principalement dans les tissus muqueux, la peau et les organes lymphoïdes, où elles participent à la défense innée contre les agents pathogènes et à la réparation/régénération des tissus (Artis and Spits, 2015).

3. L'éducation des cellules NK et l'acquisition de la tolérance au soi

Pour assurer une réponse anti-tumorale ou antivirale efficace, mais aussi la tolérance au soi, les cellules NK doivent subir un processus dit "licencing" ou "éducation" au cours de leur développement (Anfossi et al., 2006) (Elliott and Yokoyama, 2011). Durant leur développement, les cellules NK vont acquérir certains marqueurs qui vont leur conférer les capacités fonctionnelles pouvant leur permettre de distinguer le soi du non soi. Ce processus d'acquisition fonctionnelle permettra aux cellules NK d'être tolérantes au soi et non auto-réactives. Bien que le développement des cellules NK et l'éducation représentent deux processus séparés, il existe de nombreuses interconnexions entre ces deux mécanismes clés de l'homéostasie des cellules NK.

L'acquisition des récepteurs inhibiteurs NK et la liaison de ces récepteurs aux molécules HLA de classe I exprimées à la surface des cellules du "soi" se fait en même temps dans la moelle osseuse au cours du développement des cellules NK. L'interaction entre les récepteurs inhibiteurs NK avec les molécules HLA de classe I du soi est un mécanisme qui va générer les cellules NK tolérantes au soi avec des capacités fonctionnelles (Boudreau et al., 2016b). En effet, cette interaction directe par contact cellulaire entre les récepteurs inhibiteurs NK avec les molécules HLA de classe I du "soi" éduque les cellules NK à être capables de détecter la diminution d'expression ou l'absence d'expression des molécules HLA de classe I à la surface des cellules cibles dans le but de générer une réponse immune efficace dans le

contexte d'une tumeur ou d'une infection virale (Boudreau et al., 2016b) (Boudreau and Hsu, 2018).

Le phénomène de l'éducation fonctionnelle des cellules NK est régulée principalement par les récepteurs KIR inhibiteurs qui reconnaissent les molécules HLA-A, HLA-B et HLA-C, mais aussi par le récepteur inhibiteur CD94/NKG2A qui reconnaît la molécule HLA-E. En effet, le répertoire des cellules NK matures est constitué d'au moins une sous-population cellulaire NK exprimant un récepteur inhibiteur NK spécifique d'une molécule HLA de classe I du soi (Orr and Lanier, 2010). Le CD94/NKG2A est le premier récepteur inhibiteur NK spécifique des molécules HLA de classe I exprimé à la surface des cellules NK en cours de différenciation. Il est notamment exprimé à la surface des cellules NK immatures CD56^{bright} et sur les cellules NK matures CD56^{dim}. En effet, durant la différenciation des cellules NK, l'expression du NKG2A diminue, tandis que l'expression des KIR augmente uniquement à la surface des cellules NK CD56^{dim} en phase terminale de différenciation. Ainsi, l'éducation des cellules NK immatures est assurée par le NKG2A en interagissant avec la molécule HLA-E avant l'apparition des KIR à la surface des cellules NK matures, alors que l'éducation des cellules NK matures est principalement assurée par les récepteurs KIR qui reconnaissent les molécules HLA-A, HLA-B et HLA-C. La base moléculaire de l'éducation des cellules NK reste encore à débattre. En effet, sur la base de l'hypothèse de "missing-self" ou du "soi-manquant" (Kärre et al., 1986) portant sur l'activation des cellules NK, on avait initialement considéré que la tolérance au soi était exclusivement associée à la signalisation des récepteurs inhibiteurs lors de l'engagement avec les molécules HLA de classe I exprimées à la surface des cellules normales (Valiante et al., 1997). Il existe une petite fraction de cellules NK qui n'exprime pas des récepteurs inhibiteurs KIR spécifiques des molécules HLA de classe I du soi dans les conditions physiologiques, et ces cellules sont hypo-fonctionnelles une fois stimulées, mais tolérantes au soi et donc non auto-réactives (Fernandez et al., 2005). Les

récepteurs KIR sont exprimés de façon clonale à la surface des cellules NK. Chaque individu peut donc présenter un répertoire NK constitué des sous-populations cellulaires exprimant aucun récepteur KIR, un seul récepteur KIR ou la combinaison de deux ou plusieurs récepteurs KIR. La diversité structurale du répertoire NK est associée au contenu des gènes KIR et au polymorphisme allélique de ces gènes KIR (Hsu et al., 2002) (Vilches and Parham, 2002).

Les gènes KIR et HLA sont localisés sur des chromosomes différents et hérités indépendamment. Ce phénomène peut affecter l'orientation fonctionnelle du répertoire des cellules NK, puisqu'il est possible que certains gènes KIR soient hérités en absence de leurs ligands HLA spécifiques. Par conséquent, à la fin du processus "d'éducation", seules les cellules NK matures exprimant au moins un récepteur KIR spécifique des molécules HLA de classe I du soi seront complètement "éduquées", et les cellules NK n'ayant pas de ligands KIR seront considérées comme "non éduquées" (Anfossi et al., 2006) (Kim et al., 2005).

Le modèle de l'éducation ou "licencing" des cellules NK, introduite pour la première fois en 2005 par l'équipe de Yokoyama, propose que l'activation de la voie de signalisation des récepteurs inhibiteurs portant des motifs ITIM au niveau intracellulaire, constitue un mécanisme qui régule l'éducation fonctionnelle des cellules NK (Kim et al., 2005). Ainsi, les cellules NK dites "éduquées" sont celles qui sont fonctionnellement compétentes et tolérantes au soi en raison des interactions entre les récepteurs inhibiteurs avec les molécules HLA de classe I, alors que les cellules NK dites "non-éduquées" sont représentées par celles qui n'expriment pas de récepteurs inhibiteurs spécifiques pour les molécules HLA classe I du soi présents chez l'individu et qui sont également tolérantes puisqu'elles sont fonctionnellement incompetentes (Elliott and Yokoyama, 2011). Pour expliquer de manière détaillée comment les cellules NK deviennent éduquées, Raulet et Vance ont proposé deux modèles d'éducation des cellules NK : le modèle "d'armement" ou "arming model" des cellules NK et le modèle

de “désarmement” ou “desarming” model des cellules NK (Raulet and Vance, 2006). En plus de ces modèles, deux autres modèles complémentaires aux deux premiers ont été également proposés, notamment le modèle des interactions en *cis* et le modèle du rhéostat. Le modèle “d’armement” ou “licencing” des cellules NK propose que, les cellules NK sont considérées comme fonctionnellement matures après les interactions entre les récepteurs inhibiteurs KIR avec leurs ligands HLA de classe I (Joncker et al., 2009). Dans ce modèle, seules les cellules NK ayant interagi à travers leurs récepteurs inhibiteurs avec les molécules HLA de classe I du soi au cours de leur développement seront fonctionnelles et donc capables de répondre à une tumeur ou à une infection virale. A l’inverse, le modèle de “désarmement” des cellules NK repose sur l’idée que les cellules NK qui expriment les récepteurs KIR inhibiteurs n’ayant pas de ligands HLA de classe I ne sont pas éliminées de façon clonale suite à une absence d’interaction entre ces KIR et les molécules HLA de classe I, mais restent non éduquées c’est-à-dire fonctionnellement incompétentes et hypo-réactives en terme de cytotoxicité et de sécrétion de cytokines, et sont localisées dans le sang périphérique et dans les tissus pour assurer la tolérance au soi (Kim et al., 2005, p. 20) (Joncker et al., 2009). Cette théorie stipule qu’en l’absence d’interaction entre les KIR inhibiteurs avec leurs ligands HLA de classe I, la stimulation chronique des cellules NK via des récepteurs activateurs conduirait à un état d’épuisement, rendant ces cellules “désarmées” et donc hypo-répondeuses à une stimulation à travers un processus similaire à l’anergie exercé par les lymphocytes T et B (Raulet and Vance, 2006) (Elliott and Yokoyama, 2011).

En plus de la reconnaissance en *trans* des molécules HLA de classe I du soi sur les cellules normales voisines, il a été démontré que l’expression des molécules HLA de classe I à la surface de la cellule NK elle-même joue un rôle important dans la régulation des réponses NK et dans l’éducation fonctionnelle des cellules NK chez la souris. En effet, les études *in vivo* sur la souris ont montré que les cellules NK sont capables de reconnaître, à travers leurs

récepteurs inhibiteurs Ly49, les molécules CMH de classe I exprimées sur les cellules NK elles-mêmes (Boudreau et al., 2016a). C'est le modèle de l'éducation par des interactions en *cis*. D'autres études ont confirmé que, les interactions KIR/HLA en *trans* et en *cis* pourraient également se produire chez l'homme (Boudreau et al., 2016a). En fait, la *trans*-présentation des molécules HLA de classe I semble être principalement impliquée dans l'éducation des cellules NK au cours du développement des cellules NK, alors que la présentation des molécules HLA de classe I en *cis* chez l'homme semble jouer un rôle important dans le maintien du potentiel effecteur des cellules NK (Boudreau et al., 2016a). Des données récentes ont proposé que les interactions en *cis* entre les KIR2DL et les molécules HLA-C chez l'homme se produiraient dans les endosomes au niveau intracellulaire plutôt qu'à la surface cellulaire (Di Vito et al., 2019).

Le modèle du rhéostat est basé sur l'idée que l'éducation des cellules NK via les molécules HLA de classe I se fait selon un processus dynamique et quantitatif. Le terme quantitatif signifie que la force des signaux délivrés par les ligands HLA de classe I durant le processus d'éducation est directement proportionnelle au seuil d'activation de ces cellules NK, ce qui détermine ensuite l'efficacité par laquelle les cellules NK répondent fonctionnellement à un stimulus (Brodin and Höglund, 2008). A cet effet, une sous-population NK exprimant plus d'un récepteur inhibiteur KIR recevrait un signal inhibiteur fort, ce qui pourrait permettre à cette cellule NK d'induire une forte alloréactivité potentielle lorsqu'elle rencontre une cellule cible du non soi. Le terme dynamique signifie que, ce seuil d'activation des cellules NK peut ne pas être statique tout au long de la vie de la cellule NK, mais peut être sujet à des changements en fonction de la manière dont ce signal est intégré et interprété par la cellule NK. En effet, cette théorie du rhéostat basée sur le dynamisme de l'éducation des cellules NK stipule que la tolérance et la spécificité des cellules NK peuvent être régulées en continu par les interactions répétées entre les cellules NK avec les autres cellules normales

dans un environnement HLA de classe I donné (Brodin and Höglund, 2008). Les différents modèles de l'éducation des cellules NK sont illustrés dans la Figure 12.

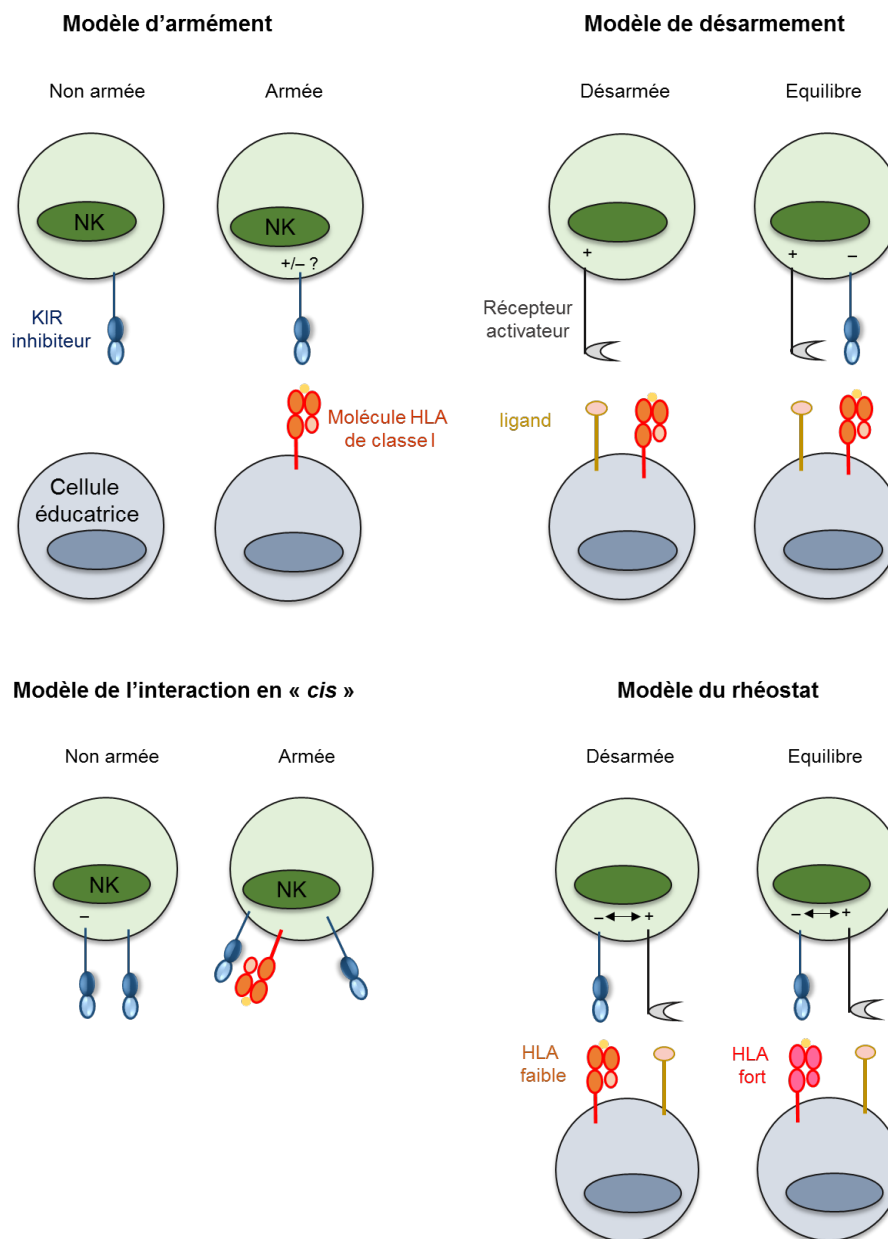


Figure 12 : Modèles de l'éducation des cellules NK

Dans le modèle d'« Armement », l'interaction entre les récepteurs KIR inhibiteurs avec leurs ligands HLA correspondant confèrent aux cellules NK les compétences fonctionnelles. Dans le modèle de « Désarmement », l'interaction prolongée des récepteurs activateurs avec leurs ligands en l'absence d'interaction des récepteurs KIR inhibiteurs avec leurs ligands HLA de classe I conduit à un état d'épuisement des cellules NK qui deviennent anergiques. Le modèle de l'interaction en « cis » est basé sur la capacité des récepteurs inhibiteurs de se lier aux molécules HLA de classe I exprimées à la surface de la cellule NK elle-même. Le modèle du « Rhéostat » propose que les capacités fonctionnelles des cellules NK dépendent de la force des signaux inhibiteurs délivrés à leurs surfaces (Inspiré de Höglund and Brodin 2010).

D'autres mécanismes d'éducation et de tolérance ont également été identifiés pour les cellules NK. Le KIR2DS1 est le mieux décrit comme KIR activateur participant au mécanisme de tolérance des cellules NK. Les cellules NK KIR2DS1⁺ sont alloréactives vis-à-vis des cellules C2⁺ seulement lorsqu'elles sont issues des individus C2⁻. En effet, les cellules NK KIR2DS1⁺ sont rendues anergiques chez les individus C2⁺ en raison de l'exposition forte et prolongée du KIR2DS1 avec le ligand C2 exprimé à la surface des cellules autologues (Pittari et al., 2013) (Fauriat et al., 2010a) (Morvan et al., 2008). Ce mécanisme de tolérance au soi permet de limiter toutes les réponses immunitaires autoréactives pouvant être médiées par les cellules NK KIR2DS1⁺ évoluant dans un environnement dans lequel le ligand C2 est présent. De la même façon, une alloréactivité des cellules NK KIR3DS1⁺ issues de donneurs Bw4-I80⁻ a pu être détectée vis-à-vis de cibles exprimant la molécule HLA-B51 (Bw4-I80), mais pas à partir des cellules NK KIR3DS1⁺ issues de donneurs Bw4-I80⁺ (Carlomagno et al., 2017) (Morvan et al., 2009).

4. Les grandes fonctions des cellules NK

La fonction effectrice des cellules NK ressemble étroitement à celle des lymphocytes T cytotoxiques, mais les cellules NK ne requièrent pas une exposition préalable à un antigène pour exercer leurs fonctions effectrices (Freud et al., 2017). Les cellules NK peuvent exercer leurs fonctions effectrices dans le contexte d'une réponse immunitaire de 2 façons : la première est la cytotoxicité et la deuxième est la production de cytokines et chimiokines (Paolini et al., 2015). On distingue 2 mécanismes de cytotoxicité induite par les cellules NK : la lyse spontanée ou cytotoxicité naturelle et la cytotoxicité cellulaire dépendante de l'anticorps (ADCC). Il est important de noter que ces fonctions effectrices sont régulées par des cytokines. En effet, les cellules NK doivent être activées par les cytokines pour exercer pleinement leurs fonctions effectrices. Ainsi, les cytokines principalement impliquées dans la

régulation des fonctions effectrices des cellules NK sont les Interférons de type 1 (INF- α et INF- β) et les cytokines pro-inflammatoires telles que l'IL-12, l'IL-15 et l'IL18 (Paolini et al., 2015). Une troisième fonction exercée par les cellules NK est la prolifération qui est régulée par un certain nombre de cytokines impliquées dans le maintien de l'homéostasie des cellules NK.

4.1. La cytotoxicité des cellules NK

4.1.1. Lyse spontanée

La cytotoxicité naturelle ou lyse spontanée fait référence à la capacité des cellules NK d'induire une réponse anti-tumorale ou antivirale sans sensibilisation préalable et en absence d'anticorps (Leibson, 1997). L'hypothèse initiale concernant le mécanisme de lyse médiée par les cellules NK avait stipulée que l'absence d'expression ou l'expression altérée des molécules HLA de classe I pouvait rendre les cellules cibles susceptibles à une attaque par les cellules NK (Borrego, 2006). C'est la théorie du "missing self" ou du "soi manquant" proposée par Kärre et ses collègues dans les années 80 (Kärre et al., 1986). Cette hypothèse résultait des observations qui montraient que les cellules NK pouvaient directement éliminer les cellules tumorales avec une expression déficiente en molécules du CMH-I (Kärre et al., 2005). Plus tard, plusieurs expériences *in vivo* chez la souris et chez l'homme ont confirmé que la cytotoxicité des cellules NK était directement associée à l'absence d'expression des molécules du CMH-I à la surface des cellules cibles (Ljunggren and Kärre, 1990). En effet, les études sur la biologie des cellules NK ont permis de faire évoluer les connaissances sur les mécanismes d'activation des cellules NK. La compréhension actuelle des mécanismes d'activation des cellules NK suggère que la transition de la cellule NK de l'état quiescent, c'est-à-dire au repos, à l'état activé est gouvernée par un réseau de récepteurs activateurs et inhibiteurs exprimés, pour la plupart naturellement, à la surface des cellules NK (Long et al.,

2013). Bien que la cellule NK exprime les récepteurs inhibiteurs qui détectent l'expression des molécules du CMH-I à la surface des cellules cibles, il est important de noter que c'est l'intégration de multiples signaux inhibiteurs et activateurs qui détermine si la cellule NK deviendra cytotoxique ou pas.

La fonction de cytotoxicité des cellules NK se produit via des mécanismes cellulaires complexes qui peuvent être divisés en 3 processus majeurs : la reconnaissance de la cible cellulaire, le contact avec la cible cellulaire et la formation de la synapse immunologique, et la lyse de la cible médiée par la cellule NK. Une fois reconnue, les cellules NK interagissent directement avec la cellule cible d'intérêt en formant une synapse immunologique lytique qui facilite l'activation des voies de l'apoptose induites par les cellules NK conduisant à la lyse spontanée de la cellule cible. Cette cytotoxicité naturelle ou lyse spontanée des cellules NK peut être médiée de 2 manières : le relargage par dégranulation des granules lytiques perforine/granzyme et l'induction de la voie extrinsèque de l'apoptose déclenchée par l'engagement des récepteurs de mort cellulaire (Smyth et al., 2005) (Stabile et al., 2017).

La voie de la perforine/granzyme représente le mécanisme primaire exercé par les cellules NK pour éliminer une cellule tumorale ou une cellule infectée par un virus. Cette voie est induite par l'activation des voies de signalisation des récepteurs activateurs NK qui reconnaissent les ligands induits ou surexprimés à la surface des cellules cibles. En l'absence d'interaction entre les récepteurs inhibiteurs et les molécules HLA de classe I, l'engagement des récepteurs activateurs avec leurs ligands favorise la formation de la synapse immunologique qui active par la suite les voies de signalisation aboutissant à la dégranulation de la perforine et des granzymes (Clark and Griffiths, 2003). La perforine est une protéine de rupture de membrane qui perce les membranes des cellules cibles, tandis que les granzymes sont une famille de sérines protéases qui déclenchent l'apoptose cellulaire (Lieberman and Fan, 2003). Une fois activées, les cellules NK vont polariser rapidement les granules et

repositionner le centre d'organisation des microtubules vers la synapse au niveau de la cellule cible (Mentlik et al., 2010). Ensuite, la membrane des granules va fusionner avec la membrane plasmique, externaliser et relarguer les contenus de granules cytotoxiques, et déclencher par conséquent l'apoptose de la cellule cible (Afonina et al., 2010).

La lyse des cellules cibles déclenchée par apoptose induite via les récepteurs de mort cellulaire exprimés à la surface des cellules cibles est un autre mécanisme de cytotoxicité utilisé par les cellules NK pour éliminer une cible cellulaire (Berke, 1994). Cette voie de cytotoxicité cellulaire implique des récepteurs de la superfamille des TNF-R (Tumor Necrosis Factor) exprimés à la surface des cellules cibles. Les deux principaux récepteurs TNF utilisés pour induire l'apoptose sont le récepteur Fas (CD95) et le récepteur TRAIL-R (TNF-Related Apoptosis Inducing Ligand Receptor) (Zamai et al., 1998). Fas (CD95) et TRAIL-R sont activés, respectivement, par les ligands FasL (CD95L) et TRAIL exprimés à la surface des cellules NK (Smyth et al., 2005). L'expression de ces récepteurs à la surface des cellules cibles peut être induite par l'INF- γ relargué par les cellules NK activées (Screpanti et al., 2001). En effet, Fas (CD95) est exprimé au niveau de plusieurs tissus différents, alors que l'expression de FasL (CD95L) est restreinte à la surface des cellules NK activées et sur les cellules T cytotoxiques (CTL) (Smyth et al., 2005). Cette voie effectrice des cellules NK est rarement utilisée pour contrôler le développement des tumeurs puisque la majorité des cellules tumorales diminuent leur expression en récepteur Fas (Reichmann, 2002). La protéine TRAIL est exprimée de manière constitutive à la surface de certaines populations cellulaires NK et la signalisation médiée par TRAIL peut induire la lyse spontanée médiée contre les cellules tumorales exprimant les récepteurs de TRAIL, TRAILR1 et TRAILR2 (Yagita et al., 2004). L'engagement de TRAIL avec ses ligands entraîne une oligomérisation de ces récepteurs au niveau des membranes cellulaires et l'activation du signal pro-apoptotique via l'activation des caspases (Falschlehner et al., 2007). Néanmoins, l'utilisation des thérapies à

base de récepteurs TRAIL recombinants ou des anticorps agonistes dirigés contre les récepteurs TRAIL dans des modèles précliniques et cliniques de tumeurs s'est révélée peu efficace (Dimberg et al., 2013).

4.1.2. La cytotoxicité cellulaire dépendante de l'anticorps (ADCC)

L'activité cytotoxique des cellules NK peut également être déclenchée après l'engagement de CD16 qui est un récepteur de faible affinité des fragments Fc des immunoglobulines G (IgG). Son engagement active plusieurs voies de signalisation dont celle induisant la sécrétion de la perforine et des granzymes qui vont provoquer la lyse des cellules cibles opsonisées par les anticorps. L'engagement de CD16 peut aussi induire la sécrétion des cytokines pro-inflammatoires telles que l'IFN- γ qui accélère la maturation des cellules dendritiques, ce qui peut conduire à la stimulation des effecteurs de l'immunité adaptative. Après son engagement, le CD16 subit un clivage au niveau extracellulaire par la métalloprotéinase ADAM17. Ce clivage du CD16 à la surface des cellules NK conduit à la diminution de l'expression du CD16 et par conséquent à la diminution de l'activité ADCC (Romee et al., 2013) (Lajoie et al., 2014). L'inhibition sélective de l'enzyme ADAM17 peut empêcher la perte d'expression du CD16 et améliorer la réponse ADCC des cellules NK (Pham et al., 2017).

4.2. La production de cytokines par les cellules NK

Les cellules NK activées peuvent contribuer indirectement à la lyse des cellules cibles en sécrétant les cytokines pro-inflammatoires telles que l'IFN- γ , le TNF- α et le facteur de croissance GM-CSF (van den Bosch et al., 1995) qui facilitent l'activation des cellules T ainsi que d'autres médiateurs de l'immunité innée tels que les cellules dendritiques, les

macrophages et les neutrophiles (Chester et al., 2015). Elles produisent également des cytokines immunorégulatrices telles que les interleukines IL-5, IL-10 et IL-13 (Zitti and Bryceson, 2018). L'IFN- γ est un interféron de type II qui joue un rôle dans le développement des résistances des infections microbiennes à l'hôte et dans la protection contre le développement des tumeurs (Cooper et al., 2001). Dans le microenvironnement tumoral, l'IFN- γ secrété par les cellules NK stimule les lymphocytes T CD4⁺ à se polariser en sous-population Th1 et accélère le développement des macrophages activés et des lymphocytes T CD8⁺ cytotoxiques spécifiques des tumeurs (Ikeda et al., 2002). Le TNF- α est une cytokine multifonctionnelle qui peut causer une nécrose directe des cellules tumorales en s'attaquant aux lésions capillaires associées aux tumeurs, mais aussi générer une réponse adaptative (Balkwill, 2009). Le TNF- α peut activer la prolifération des lymphocytes B et activer la différenciation des monocytes et des macrophages (Higuchi et al., 1997). Les cytokines IFN- γ et TNF- α aident à activer les cellules de l'immunité innée et adaptative dans le microenvironnement tumoral et à générer une réponse anti-tumorale soutenue (Chester et al., 2015).

Les cellules NK produisent également les cytokines chimiotactiques (chimiokines) telles que le CCL3 (MIP-1 α), le CCL4 (MIP-1 β), le CCL5 (RANTES), le XCL1 (lymphotoxine), et le CXCL8 (IL-8) qui peuvent attirer les lymphocytes effecteurs et les cellules dendritiques dans les tissus inflammatoires (Walzer et al., 2005) (Fauriat et al., 2010).

4.3. La prolifération des cellules NK

Les cytokines IL-2, IL-15 et IL-12 peuvent réguler la prolifération des cellules NK. L'IL-15 est une cytokine homéostatique impliquée dans la maturation, la survie et la prolifération des cellules NK (Robinson and Schluns, 2017). Son rôle critique dans le

maintien de l'homéostasie des cellules NK a été mis en évidence chez la souris (Fehniger et al., 2001). En effet, il a été montré que les souris déficientes en IL-15 présentent une réduction significative en cellules NK matures, et la surexpression transgénique de l'IL-15 chez les souris conduit à une augmentation de la génération des cellules NK (Fehniger et al., 2001). Les cellules dendritiques représentent la source principale de l'IL-15 et jouent un rôle essentiel dans la prolifération des cellules NK (Degli-Esposti and Smyth, 2005). L'IL-12 produite par les macrophages et les cellules dendritiques activées par les pathogènes, joue également un rôle clé dans la prolifération des cellules NK (Vignali and Kuchroo, 2012). L'IL-12 peut également agir en synergie avec l'IL-2, l'IL-15 et l'IL-18 pour induire une forte production de l'IFN- γ (Lusty et al., 2017). Les cellules NK activées expriment le CD25 (IL-2R α), ce qui augmente leur affinité pour l'IL-2 qui stimule la prolifération des cellules NK et la production des granules cytotoxiques telles que la perforine et la granzyme B (Gasteiger et al., 2013). L'IL-21, une cytokine de la famille IL-2, peut potentialiser l'expansion et l'activité anti-tumorale des cellules NK stimulées par l'IL-2 (Granzin et al., 2017).

Plusieurs protocoles sont utilisés pour l'expansion *in vitro* des cellules NK. L'IL-2 est le plus souvent utilisée pour la culture, l'activation et l'expansion *in vitro* des cellules NK (Granzin et al., 2017). D'autres protocoles d'expansion de cellules NK utilisent les PBMC allogéniques irradiées comme cellules nourricières (Luhm et al., 2002). Par ailleurs, les lignées cellulaires telles que la K562, Daudi ou des lignées lymphoblastoïdes transformées (EBV-LCL) peuvent également stimuler fortement la prolifération *ex vivo* des cellules NK (Bae and Lee, 2014). L'avantage de l'utilisation des lignées cellulaires est qu'il est relativement simple de les modifier génétiquement en intégrant des facteurs additionnels pour la stimulation des cellules NK. Les lignées K562 exprimant l'IL-15 et le 4-1BBL ont été utilisées pour l'expansion des cellules NK (Bae and Lee, 2014). Cependant, il a été récemment montré que les lignées K562 exprimant le 4-1BBL et l'IL-21 à la place de l'IL-15

étaient plus efficaces pour la stimulation de l'expansion *ex vivo* des cellules NK (Denman et al., 2012).

III. Rôle des cellules NK dans l'immunité

Les réponses des cellules NK aux pathogènes et aux tumeurs sont régulées par l'intégration des signaux de plusieurs récepteurs exprimés à leur surface, qui peuvent initier, renforcer ou supprimer leurs fonctions effectrices. Les différentes conditions d'activation des cellules NK dans le contexte des réponses immunes sont : (1) la reconnaissance du soi manquant ou altéré ; (2) la reconnaissance du soi induit ; et (3) la reconnaissance du non soi infectieux (Figure 13). L'hypothèse du "soi manquant" est basée sur la découverte que les cellules NK ciblent les cellules avec une faible ou une absence d'expression des molécules du CMH de classe I (Kärre et al., 1986). En conséquence, les cellules NK sont impliquées dans les réponses immunes contre les cellules tumorales ou infectées par un virus, particulièrement lorsque ces cellules tumorales diminuent à leur surface l'expression des molécules du CMH de classe I. Dans le cas du "soi induit", les cellules NK sont capables de reconnaître, grâce à leurs récepteurs activateurs, des ligands induits par le stress cellulaire dans le contexte d'une tumeur ou d'une infection par un virus (Steinle et al., 2001) (Cosman et al., 2001). Enfin, dans la situation du "non soi" infectieux, les cellules NK peuvent reconnaître via le récepteur activateur NKG2C les peptides antigéniques présentés par la molécule HLA de classe I non classique HLA-E à la surface des cellules tumorales ou des cellules infectées par un virus (Gumá et al., 2006). Ce mécanisme de reconnaissance a pour conséquence la stimulation de la réponse des cellules NK contre les virus.

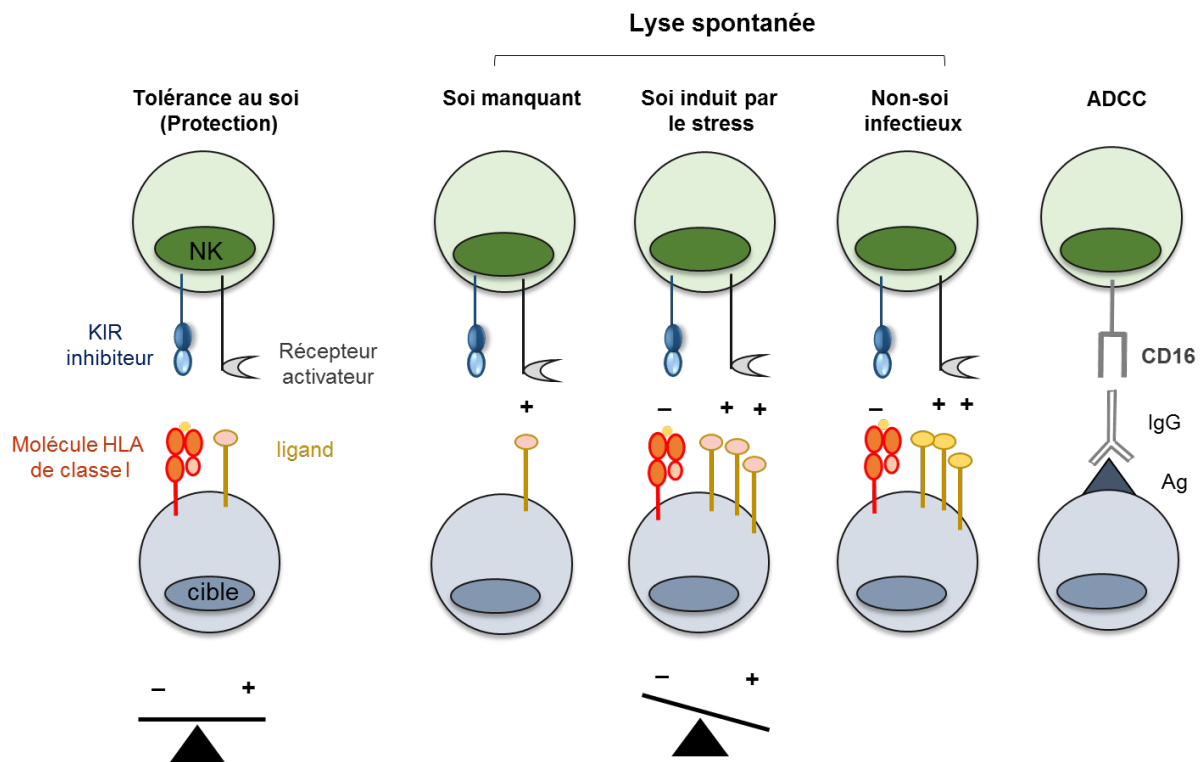


Figure 13 : Activation des cellules NK dans différents contextes pathologiques.

Dans les conditions physiologiques, l'interaction des récepteurs inhibiteurs avec les ligands HLA de classe I, inhibent les signaux d'activation pouvant être générés par l'interaction entre les récepteurs activateurs et leurs ligands, assurant la protection de la cellule saine. Dans le contexte de tumeurs ou d'infections virales, l'absence d'expression des molécules HLA de classe I du soi ou « soi manquant » conduit à l'activation des cellules NK qui vont lyser les cellules cibles. La reconnaissance par les récepteurs activateurs des ligands induits par le stress cellulaire ou surexprimés par les cellules cibles activent les fonctions de cytotoxicité naturelle des cellules NK. Dans le cas d'une infection virale, les protéines virales exprimées à la surface des cellules infectées peuvent être reconnues par les récepteurs activateurs NK, ce qui aboutit à la lyse spontanée des cellules cibles. Le CD16 est un récepteur de faible affinité des fragments Fc des IgG. Il est capable de stimuler la fonction ADCC des cellules NK en interagissant avec les IgG qui opsonisent les cellules tumorales ou infectées par un virus.

1. Cellules NK et immunité anti-tumorale

1.1. Rôle des cellules NK dans l'immunosurveillance tumorale

La théorie de l'immunosurveillance suggère que les cellules NK sont impliquées dans le contrôle précoce du développement des tumeurs, avant les phases successives d'équilibre et d'échappement (Dunn et al., 2002). La phase d'échappement au contrôle par les cellules NK

est déclenchée par l'immunosuppression induite par la tumeur, entraînant ainsi l'émergence de tumeurs immunorésistantes. Pendant la phase d'élimination, les cellules NK détectent et tuent les cellules transformées émergentes. En effet, la reconnaissance des tumeurs par des cellules NK est dépendante des récepteurs inhibiteurs comme les KIR et le NKG2A qui reconnaissent la diminution d'expression des molécules du CMH de classe I à la surface des cellules tumorales (Moretta and Moretta, 2004) (Ljunggren and Kärre, 1990). En l'absence d'interaction entre les récepteurs inhibiteurs NK avec les molécules HLA de classe I, l'immunosurveillance des cancers par les cellules NK est régulée par l'expression des récepteurs activateurs comme le NKG2D, DNAM-1, 2B4 et les NCR (NKp30, NKp44 et NKp46), qui reconnaissent des ligands induits ou surexprimés à la surface des cellules tumorales (Moretta et al., 2001) (Lanier, 2005). L'activation des fonctions anti-tumorales des cellules NK dépend donc de la balance entre les signaux activateurs et inhibiteurs délivrés à la surface des cellules NK suite à leur interaction avec les cellules tumorales. Dans les conditions physiologiques, les récepteurs inhibiteurs (KIR et NKG2A) jouent un rôle dans la protection des cellules normales d'une lyse spontanée par les cellules NK. Ainsi, quand l'expression des molécules du CMH de classe I à la surface des cellules cibles est absente ou diminuée, ou que les ligands spécifiques sont directement reconnus par les récepteurs activateurs, le signal inhibiteur est atténué et le signal activateur est déclenché, conduisant à l'activation des fonctions effectrices des cellules NK. Les récepteurs activateurs ne peuvent pas activer individuellement les cellules NK, à l'exception du CD16 qui peut activer seul le mécanisme de l'ADCC des cellules NK. Ainsi, l'activation de la lyse spontanée induite par les cellules NK nécessite une synergie de plusieurs récepteurs activateurs. Les cellules NK activées suite à la reconnaissance des cellules tumorales produisent des granules cytotoxiques (perforine et granzymes) et des cytokines pro-inflammatoires (IFN- γ et TNF- α), ce qui aboutit à la lyse de la cellule cible.

Parmi les récepteurs activateurs exprimés par les cellules NK, NKG2D est un récepteur activateur majeur des cellules NK. NKG2D a initialement été identifié à la surface des cellules NK comme récepteur de l'immunosurveillance tumorale induite par les NK. Les ligands du NKG2D sont représentés par les protéines MICA/B et les ULBP1-6. Leur expression à la membrane cellulaire est induite par le stress et au cours de la transformation maligne. L'implication du NKG2D dans la reconnaissance des cibles tumorales exprimant les ligands du NKG2D a été documentée dans plusieurs types de tumeurs solides et hématologiques (Raulet et al., 2013) (Torelli et al., 2014) (Hilpert et al., 2012). Les études cliniques ont attribué un rôle majeur aux polymorphismes NKG2D dans l'immunosurveillance du cancer et dans la prévention de la formation du cancer (Frazao et al., 2019). Une étude de suivi sur 11 ans d'une cohorte comprenant plus de 3500 patients a indiqué qu'une activité cytotoxique naturelle moyenne et élevée des lymphocytes du sang périphérique était associée à un risque réduit de cancer, tandis qu'une faible cytotoxicité naturelle était corrélée à une incidence plus élevée de cancer. Ces résultats suggèrent que l'immunité médiée par les NK joue un rôle dans le contrôle du cancer. Les deux blocs d'haplotypes NKG2D (NKG2Dhb1 et NKG2Dhb2) situés dans le locus NKG2D (KLRK1) étaient fréquemment identifiés chez ces patients. Chacun de ces haplotypes NKG2D peut générer deux allèles majeurs liés à une activité cytotoxique faible (LNK) ou élevée (HNK). Les patients présentant l'haplotype NKG2Dhb1 HNK1/HNK1 avaient une incidence de cancer plus faible que ceux présentant l'haplotype LNK1/LNK1. Dans une population japonaise, le génotype HNK1/HNK1 a été associé à une diminution du cancer colorectal et du cancer de l'appareil aérodigestif. Une autre étude a indiqué que les polymorphismes du gène NKG2D étaient également corrélés avec le contrôle de la leucémie myéloïde chronique (LMC) par le dasatinib. Ces données suggèrent que l'haplotype NKG2D HNK1/HNK1 peut influencer le développement du cancer et moduler la réponse au traitement (Frazao et al., 2019).

DNAM-1 est un récepteur activateur également impliqué dans l'immunosurveillance tumorale induite par les NK. Les ligands pour le récepteur DNAM-1 sont représentés par les protéines CD155 (PVR) et CD112 (Nectin-2) (Bottino et al., 2003). Le rôle de la reconnaissance de CD155 par DNAM-1 a été mis en évidence dans l'immunosurveillance des cancers sur plusieurs modèles murins (Molfetta et al., 2020). Dans le modèle génétique du développement spontané du lymphome de Burkitt, l'expression de CD155 aux stades précoces de la tumeur conduit à une élimination des cellules tumorales médiée par DNAM-1 (Croxford et al., 2013). Chez l'homme, les niveaux élevés de CD155 à la surface des tumeurs solides et hématologiques les rendent plus susceptibles à l'élimination médiée par les cellules NK dépendante de DNAM-1 (Lakshmikanth et al., 2009) (Carlsten et al., 2007) (El-Sherbiny et al., 2007). L'expression de CD155 et CD112 a été observée sur les cellules tumorales de patients atteints de neuroblastome, et leurs niveaux d'expression corrélaient fortement avec la sensibilité de ces cellules d'être lysées par les cellules NK (Pende et al., 2005) (Castriconi et al., 2004). Le rôle anti-tumoral dominant du récepteur DNAM-1 a également été rapporté dans les tumeurs hématologiques. En effet, les ligands CD155 et CD112 sont préférentiellement exprimés par les cellules leucémiques myéloïdes et lymphoïdes (Bottino et al., 2003) (Molfetta et al., 2020).

Bien que la majorité des ligands tumoraux pour le récepteur NKp46 soient encore inconnus, des études fonctionnelles ont mis en évidence le rôle primordial du NKp46 dans la reconnaissance et l'élimination des leucémies induite par les cellules NK (Sivori et al., 2019). Enfin, la reconnaissance des ligands tumoraux B7-H6 et MLL5 respectivement par les récepteurs NKp30 et NKp44 met en évidence l'implication de ces récepteurs activateurs dans la surveillance tumorale médiée par les cellules NK (Brandt et al., 2009) (Baychelier et al., 2013).

1.2. Mécanismes d'échappement tumoral aux cellules NK

Malgré les diverses stratégies d'élimination utilisées par les cellules NK, les cellules tumorales développent souvent des mécanismes d'échappement direct ou indirect à l'immunité médiée par les cellules NK. Le mécanisme direct est caractérisé par la déficience de la synapse immunologique entre les cellules NK et les cibles tumorales, la libération des ligands solubles pour les récepteurs activateurs (sBAT3, sB7-H6) (Sivori et al., 2020) des cellules NK, la surexpression des molécules HLA de classe I, la libération des molécules HLA-G solubles, l'expression des points de contrôle inhibiteurs (PDL-1, B7-H3), la sécrétion des cytokines inhibitrices (TGF- β , IL-10) (Dulphy et al., 2016) (Chester et al., 2015) et des facteurs solubles tels que IDO (Indoleamine 2,3 dioxigénase) (Della Chiesa et al., 2006) et la Prostaglandine E2 (PGE2) (Pietra et al., 2012). Le mécanisme indirect est caractérisé par l'activation des lymphocytes T régulateurs inhibiteurs (Treg), la destruction des DC et la présence de cytokines inhibitrices dérivées de phagocytes. Ces mécanismes immunosuppresseurs créent un microenvironnement tumoral dans lequel les cellules NK peuvent être inhibées (Kim et al., 2006). L'évasion des cellules tumorales à l'immunosurveillance médiée par les cellules NK résulte à la progression et au développement de la tumeur. Les stratégies thérapeutiques actuelles sont basées sur la restauration et l'augmentation des fonctions cytotoxiques des cellules NK dans le microenvironnement tumoral pour surmonter l'immunosuppression induite par les cellules tumorales.

Les cellules NK isolées de patients atteints d'hémopathies malignes présentent souvent des altérations de leur phénotype. En effet, la diminution d'expression de certains récepteurs activateurs tels que DNAM-1 et des NCR tels que NKp30 et NKp46 a été mise en évidence à la surface des cellules NK autologues des patients atteints de LAM (Leucémie Aigüe Myéloïde), ce qui suggère que les interactions entre les cellules NK avec les LAM sont

déficientes chez ces patients (Costello et al., 2002) (Khaznadar et al., 2015) . De la même façon, les cellules NK isolées de patients atteints de LMC, de LAL (Leucémie Aigüe Lymphoblastique), de MDS (Myélodysplasie) et de LLC (Leucémie Lymphoïde Chronique) présentent une diminution du nombre de cellules NK, d'expression de récepteurs activateurs et de cytokines (Carlsten and Järås, 2019). Il a été suggéré que l'altération du phénotype et des fonctions de cellules NK isolées de ces patients était associée à la déficience de la synapse immunologique conduisant à une réduction des réponses anti-tumorales des cellules NK (Khaznadar et al., 2014) (Farnault et al., 2012). L'augmentation d'expression des récepteurs inhibiteurs CD94/NKG2A, PD-1 et des KIR observée à la surface des cellules NK de patients est également associée à la réduction des réponses anti-tumorales des cellules NK (Stringaris et al., 2014) (Giuliani et al., 2017). Chez les patients atteints d'un cancer colorectal, l'expression de la molécule HLA-E par les cellules tumorales est associée à une durée de survie sans maladie plus courte (Levy et al., 2008) . En revanche, il a été récemment rapporté que les patients atteints de LLC présentant une perte d'expression du NKp30 à la surface de leurs cellules NK acquièrent l'expression de TIM-3, ce qui est corrélé avec un mauvais pronostic (Hadadi et al., 2019).

Les LAM peuvent inhiber les fonctions effectrices des cellules NK en libérant des ligands solubles pour les récepteurs activateurs NKG2D, DNAM-1 et NKp30 dans le milieu extracellulaire. Le NKG2D est reconnu comme récepteur activateur majeur dans la détection et l'élimination des cellules transformées ou infectées par un virus (Lanier, 2015). Les tumeurs peuvent développer les mécanismes d'échappement aux cellules NK malgré l'expression du NKG2D. Il a été montré que les ligands solubles (ULBP1-6, MICA/B) pour le NKG2D sécrétés par les cellules tumorales, entraînaient une diminution d'expression du NKG2D à la surface des cellules NK, ce qui empêche la transduction du signal activateur par le NKG2D et facilite ainsi l'échappement de la tumeur aux cellules NK (Groh et al., 2002)

(Kaiser et al., 2007). Les formes solubles des ligands pour le NKG2D, MICA/B ou ULBP2 avaient été retrouvées chez des patients atteints d'une LAM et la présence de ces ligands solubles étaient associée à une diminution d'expression du NKG2D conduisant à une réduction de l'activité cytotoxique des cellules NK dépendante du NKG2D (Hilpert et al., 2012). Récemment, des études ont mis en évidence le rôle activateur des ligands solubles pour le NKG2D. C'est le cas du ligand murin de forte affinité MULT1 qui a montré des capacités à stimuler les cellules NK et à induire une réponse anti-tumorale (Deng et al., 2015). Ces études montrent l'importance des voies de régulation du NKG2D dans l'immunosurveillance des cancers. Ainsi, le NKG2D représente un marqueur des cellules NK largement ciblé en immunothérapie anti-cancéreuse. La diminution d'expression de DNAM-1 à la surface des NK induite par les tumeurs a également été décrite (Carlsten et al., 2009). En effet, plusieurs études ont rapporté que l'exposition prolongée au ligand CD155 provoque la diminution d'expression de DNAM-1 conduisant à l'altération de la fonction de cytotoxicité des cellules NK (El-Sherbiny et al., 2007) (Molfetta et al., 2020). Par exemple, chez des patients atteints de LAM, il a été rapporté que l'expression de CD155 par les blastes leucémiques induisait la diminution d'expression de DNAM-1 conduisant à la réduction des fonctions anti-tumorales médiées par les cellules NK (Molfetta et al., 2020). La libération de B7-H6 par les tumeurs solides dans l'environnement extracellulaire semble induire la réduction des capacités de reconnaissance des cellules tumorales via le récepteur NKp30. Il a été suggéré que ce mécanisme d'échappement à la reconnaissance par les cellules NK peut être dû à la diminution d'expression de B7-H6 à la surface des cellules tumorales induite par un clivage par les métalloprotéinases plutôt qu'à la diminution d'expression de NKp30 (Schlecker et al., 2014). Enfin, l'inhibition des fonctions anti-tumorales des cellules NK peut être causée par la libération de la cytokine suppressive TGF- β qui induit la diminution d'expression de NKG2D et de NKp30 (Castriconi et al., 2003). Par ailleurs, une étude rapporte que les blastes de LAM

pourraient activer la voie du récepteur AHR (Aryl Hydrocarbon Receptor) qui induit l'expression de miR-29b dans les précurseurs des cellules NK, ce qui entraîne l'altération de leur maturation et leurs fonctions (Scoville et al., 2018) (Dulphy, 2018).

2. Cellules NK et immunité anti-infectieuse

Les cellules NK jouent un rôle important dans la défense contre les infections induites par tous les types de pathogènes intracellulaires (virus, bactéries et parasites) et extracellulaires (Horowitz et al., 2011).

2.1. Rôle des cellules NK dans l'immunité antivirale

La contribution des cellules NK dans l'immunité antivirale est bien documentée aussi bien dans des modèles murins que chez l'homme. Les individus présentant une déficience pour les cellules NK peuvent souffrir d'infections virales, le plus souvent causées par les virus de la famille des herpès et les papillomavirus ainsi que d'une sensibilité accrue aux tumeurs (Orange, 2013) (Biron et al., 1989) (Etzioni et al., 2005). Les virus développent des mécanismes d'échappement à l'immunosurveillance par les lymphocytes T CD8⁺ en diminuant l'expression des molécules HLA de classe I à la surface des cellules qu'ils infectent (Antoniou and Powis, 2008) (Jonjić et al., 2008). Cette diminution d'expression des molécules HLA de classe I à la surface des cellules infectées peut être détectée par les cellules NK et activer leur cytotoxicité en l'absence des signaux inhibiteurs des récepteurs KIR. Les cellules NK sont capables de reconnaître via les récepteurs activateurs les protéines de stress de l'hôte surexprimées au cours des infections virales (Jamieson et al., 2002). Les cellules NK peuvent également produire des cytokines pro-inflammatoires telles que l'IFN- γ qui peut activer d'autres effecteurs de l'immunité innée tels que les macrophages et de l'immunité

adaptative comme les lymphocytes T pour éliminer les cellules infectées par le virus (Tay and Welsh, 1997) (Ge et al., 2012).

Dans ce chapitre, nous décrivons le rôle des cellules NK dans les infections virales en prenant l'exemple de l'infection par le CMV et le VIH (Virus de l'Immunodéficience Humaine).

2.1.1. Rôle des cellules NK dans l'infection par le CMV (Cytomégalovirus)

Le cytomégalovirus humain (HCMV) est un bêta-herpesvirus qui provoque une infection chronique chez les individus. Après une infection aiguë, le virus entre dans un état de latence au cours duquel très peu de gènes sont transcrits et aucun nouveau virion n'est généré. La latence persiste toute la vie et peut être interrompue par des réactivations occasionnelles du virus (Goodier et al., 2018). La réactivation virale est caractérisée par l'expression de gènes associés au cycle de vie lytique du virus et représente un état dans lequel le virus peut être éliminé par les sécrétions corporelles et être ainsi transmis à d'autres individus. Le CMV humain est distribué dans le monde avec des taux de séroprévalence compris entre 45 et 100% (Cannon et al., 2010). Les stratégies d'évasion au système immunitaire développées par le CMV humain permettent sa propagation dans la population et établissent une infection chronique sans conséquence clinique majeure chez les individus immunocompétents (Manicklal et al., 2013). L'expression des molécules HLA de classe I est diminuée durant l'infection par le CMV, ce qui empêche les lymphocytes T CD8⁺ de reconnaître les cellules infectées par le CMV. En raison de la diminution d'expression des molécules HLA de classe I qui présentent les peptides viraux aux lymphocytes T CD8⁺, les cellules NK peuvent reconnaître et éliminer les cellules infectées par le CMV. Pour échapper à la reconnaissance par les cellules NK, les CMV peuvent sélectivement maintenir

l'expression des molécules HLA de classe I, notamment les molécules HLA-C, qui engagent les récepteurs inhibiteurs KIR2D (Manicklal et al., 2013). De plus, le CMV humain stabilise l'expression de la molécule HLA-E, en présentant un peptide mimétique au récepteur inhibiteur CD94/NKG2A, ce qui inhibe l'activation des cellules NK (Halenius et al., 2015) (Adams et al., 2007). De la même façon, il a été montré que le CMV humain code pour une protéine mimétique des molécules HLA de classe I, l'UL-18, qui induit l'inhibition des cellules NK en interagissant avec le récepteur inhibiteur conservé de leucocytes LIR-1, mais ne présente pas d'antigène aux cellules T (Chen et al., 2016) (Cerboni et al., 2006) (Boudreau and Hsu, 2018).

L'infection par le CMV humain est caractérisée par une expansion clonale des sous-populations NK différenciées de phénotype CD94/NKG2C⁺CD57⁺, encore appelées cellules NK mémoires. Ces cellules NKG2C⁺ amplifiées co-expriment préférentiellement les KIR2D dans un environnement où les ligands HLA-C pour ces KIR inhibiteurs sont présents (Djaoud et al., 2013) (Béziat et al., 2012). Au cours de l'infection par le CMV humain, le récepteur activateur NKG2C reconnaît les peptides UL40 présentés par la molécule HLA-E à la surface des cellules infectées par le CMV, ce qui conduit à l'activation des cellules NK et à l'amplification clonale des cellules NK exprimant le NKG2C spécifique de la souche virale du CMV. Des données récentes ont montré que l'expansion et la différenciation de ces cellules NK NKG2C⁺ adaptatives pouvaient être déterminées par la reconnaissance différentielle de souches distinctes de CMV humain codant pour des peptides UL40 variables (Hammer et al., 2018). En raison de la reconnaissance différentielle des souches du CMV, tous les individus CMV⁺ ne présentent pas une expansion clonale des sous-populations NK NKG2C⁺. L'activation des cellules NK médiée par l'interaction entre le CD94/NKG2C avec la molécule HLA-E (Heatley et al., 2013) suggère que ce récepteur est impliqué dans le rôle protecteur médié par les cellules NK contre l'infection par le CMV et dans le maintien de la

latence du virus. L'expansion des cellules NK qui expriment le NKG2C a été observée au cours de la réactivation du CMV humain chez les individus ayant subi une greffe de cellules souches hématopoïétiques (Lopez-Verges et al., 2011), mais également chez les individus sains présentant une infection par le CMV humain (Monsiváis-Urendá et al., 2010).

Le rôle protecteur des cellules NK contre l'infection par le CMV médié par d'autres récepteurs activateurs a également été mis en évidence chez l'homme et chez la souris. Le cytomégalovirus murin (MCMV) code une glycoprotéine de membrane, la protéine m157, qui est reconnue par le récepteur Ly49H exprimé par les cellules NK dérivées des souris C57BL/6 (Adams et al., 2007). De plus, les souris BALB/c n'exprimant pas le récepteur activateur Ly49H sont sensibles à une infection par le MCMV puisque les cellules NK issues de ces souris sont incapables d'induire une réponse immunitaire contre les cellules infectées par ce virus via ce récepteur (Bubić et al., 2004) (Fodil-Cornu et al., 2008). L'altération des fonctions de cytotoxicité antivirale des cellules NK causée par la diminution d'expression des ligands de stress cellulaires induite par le CMV murin et humain démontre que le NKG2D est également impliqué dans l'activation de la réponse antivirale induite par les cellules NK (Bahram et al., 2005).

2.1.2. Cellules NK et VIH (Virus de l'Immunodéficience Humaine)

Les réponses des cellules NK contre le VIH ont été mises en évidence dans différentes cohortes, notamment chez des contrôleurs du VIH qui maintiennent des faibles niveaux de réplication du VIH en l'absence d'une thérapie antirétrovirale, les individus avec une faible progression de l'infection (les non-progresseurs) et des individus séronégatifs exposés au VIH-1 qui restent non infectés malgré une exposition répétée au virus (Horton et al., 2010) (Johansson et al., 2011).

L'augmentation de la cytotoxicité des cellules NK en réponse à une diminution des molécules HLA de classe I à la surface des cellules infectées par le VIH a été associée avec une meilleure protection contre l'infection par le VIH (Flórez-Álvarez et al., 2018). L'expression différentielle du NKG2A à la surface des cellules NK a également été associée avec une meilleure réponse contre les cellules infectées par le VIH. Il a été rapporté que les cellules NK NKG2A⁺ présentaient une forte réponse NK dirigée contre les cibles n'exprimant pas les HLA et les lymphocytes T CD4⁺ par rapport aux cellules NK NKG2A⁻. De plus, la forte dégranulation (CD107a⁺) de ces cellules avec une production de l'IFN- γ et d'une expression du CCL4 indiquent que le NKG2A peut avoir un rôle dans les réponses anti-VIH médiées par les cellules NK (Lisovsky et al., 2015).

La présence du KIR3DS1 au niveau des cellules NK chez des individus portant le motif Bw4-I80 (avec l'isoleucine en position 80) est l'un des phénotypes les plus rapportés dans les infections à VIH-1. Ce phénotype est associé à une progression retardée de l'infection vers le SIDA (Syndrome de l'Immunodéficience Humaine) et à une résistance à l'infection au VIH-1. La reconnaissance du ligand Bw4 conduisant à une forte cytotoxicité des cellules NK et à la production d'IFN- γ semble dépendre du peptide présenté par les molécules Bw4⁺ (Carr et al., 2007). Cependant, l'expression du KIR3DS1 en l'absence du ligand Bw4-I80 a été associée avec une progression rapide vers le SIDA (Martin et al., 2002). Le VIH induit une surexpression des ligands spécifiques du NKG2D telles que les ULBP-1, ULBP-2 et ULBP-3 par la protéine accessoire Vpr, ce qui augmente la sensibilité des cellules infectées par le VIH-1 à la destruction médiée par les cellules NK (Richard et al., 2010). Des études ont rapporté que les anticorps non neutralisants spécifiques du VIH qui activent l'ADCC peuvent jouer un rôle protecteur contre l'infection à VIH (Flórez-Álvarez et al., 2018). Plusieurs altérations du phénotype des cellules NK peuvent être observées au cours de l'infection par le VIH. Une expansion des sous-populations de cellules NK avec un phénotype

CD56⁻CD16⁺ a été rapportée durant la phase chronique de l'infection à VIH (Alter et al., 2005). Ces populations cellulaires NK CD56⁻ aberrantes expriment faiblement le NKp30 et le NKp46, présentent une réduction de la production d'IFN- γ , une faible activité cytotoxique avec des faibles réponses ADCC (Milush et al., 2013). Par ailleurs, il a été rapporté que l'élimination des cellules Tfh (lymphocytes T folliculaires, follicular helper T cells) pendant l'infection par le VIH pourrait être bénéfique, car ces cellules soutiennent la réplication du VIH-1 chez les individus présentant une forte virémie (Perreau et al., 2013).

2.2. Rôle des cellules NK dans l'immunité antibactérienne

Les cellules NK expriment les TLR comme les TLR2, TLR3, TLR4, TLR7 et TLR9 (Adib-Conquy et al., 2014), et les expériences *in vitro* ont montré que les agonistes des TLR (motifs bactériens) peuvent les activer, ce qui met en évidence le rôle des cellules NK dans la défense précoce contre les bactéries (Sivori et al., 2004). Les cellules NK peuvent également reconnaître directement les bactéries ou les produits dérivés de bactéries exposés à la surface des cellules infectées et des cellules présentatrices d'antigènes professionnelles (Horowitz et al., 2011). Les études récentes ont montré que les cellules NK peuvent directement reconnaître et détruire les bactéries extracellulaires en libérant les protéases granzymes qui initient la perturbation du transport d'électrons, générer un anion superoxyde et inactiver les défenses oxydatives bactériennes. Ce mécanisme d'action des cellules NK dans la défense antibactérienne a été observé dans les infections par le *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* et par *Mycobacterium tuberculosis* (Chowdhury and Lieberman, 2008) (Walch et al., 2015) (Jacquemin et al., 2015). Les cytokines inflammatoires IL-12 et IL-18 produites par les cellules dendritiques et les monocytes peuvent permettre aux cellules NK d'induire l'élimination des bactéries de façon indirecte (Humann and Lenz, 2010) (Klezovich-Bénard et al., 2012).

3. Rôle des cross-talks NK/DC dans les réponses immunitaires

Les cross-talks NK/DC peuvent se produire lorsque les DC et les cellules NK sont stimulées par des produits microbiens agissant sur leurs TLR. Cette interaction bidirectionnelle entre les NK et les DC aboutit au développement d'une réponse innée efficace par l'activation des NK médiée par les DC et d'une puissante réponse immune adaptative par l'édition et la maturation des DC induites par les NK. Les DC présentent des antigènes aux lymphocytes T, ce qui initie la réponse immune adaptative induite par les cellules T contre la plupart des infections et des tumeurs. Deux populations principales de DC ont été décrites chez l'homme : les DC plasmacytoïdes BDCA2⁺ CD303/CD123⁺ (pDC) et les DC myéloïdes (mDC). Les mDC comprennent plusieurs sous-populations identifiées dans des tissus distincts. Le sang périphérique contient deux principales sous-populations de mDC : les DC BDCA1⁺ (CD1c) et les DC CLEC9A⁺/BDCA3⁺ (CD141). Elles sont également toutes les deux présentes dans les ganglions lymphatiques et les amygdales et sont décrites comme des DC résidant dans les organes lymphoïdes dérivées du sang périphériques. Les DC CLEC9A⁺/BDCA3⁺ ont également été identifiées dans les intestins, le foie et dans les poumons. De manière intéressante, il a été montré que les cellules NK sont également présentes dans ces compartiments tissulaires, suggérant que le cross-talk NK/DC pourrait avoir lieu dans ces tissus (Ferlazzo and Morandi, 2014). L'activation des NK induite par les DC peut se produire suite à la production de cytokines par les DC et par les interactions entre NK et DC par contact cellulaire. En effet, suite à l'engagement des TLR par les produits microbiens, les DC matures sécrètent l'IL-12 qui favorise à la fois l'augmentation de la cytotoxicité des cellules NK et la libération d'IFN- γ (Sivori et al., 2004) (Borg et al., 2004). L'IL-12 est principalement sécrétée par les DC myéloïdes, en particulier par les sous-populations DC BDCA1⁺. L'IL-18 peut potentialiser l'effet de l'IL-12 en induisant l'expression du récepteur IL-12R sur les cellules NK (Ferlazzo and Morandi, 2014). De plus,

l'IL-18 peut agir en synergie avec l'IL-12 pour renforcer l'activité cytolytique des cellules NK. Il a été montré que lors de l'engagement de TLR3 par des poly:IC, les cellules NK subissent une activation en présence d'IL-12 et acquièrent la capacité d'éliminer les DC immatures, mais pas les DC matures, mettant ainsi en évidence le rôle des NK dans le contrôle qualité des DC (Sivori et al., 2004). La maturation des DC dépendante des cellules NK est induite par des cytokines pro-inflammatoires TNF- α et IFN- γ libérées suite à l'engagement du récepteur activateur NKp30 (Vitale et al., 2005). Les récepteurs activateurs NKp30 et DNAM-1 sont impliqués dans la lyse des DC immatures dépendante des NK (Ferlazzo et al., 2002) (Pende et al., 2006), alors que la résistance des DC matures à la lyse médiée par les cellules NK est régulée par la surexpression des molécules CMH de classe I. Les DC immatures expriment faiblement les molécules CMH de classe I, ce qui augmente leur sensibilité à la lyse médiée par les cellules NK (Moretta, 2002). Par ailleurs, il a été montré que l'activation des NK suite à la reconnaissance des DC infectées par le virus influenza est déclenchée via l'engagement des récepteurs activateurs NKp46 et NKG2D (Draghi et al., 2007).

Dans un modèle expérimental de vaccination contre le cancer, les NK étaient nécessaires pour éliminer les DC moins immunogènes par un mécanisme dépendant de la perforine, ce qui a permis d'améliorer la capacité des DC résiduelles à induire une réponse anti-tumorale efficace induite par les lymphocytes T cytotoxiques et la survie des souris (Morandi et al., 2012). De même, dans un modèle de transplantation chez la souris, il a été montré que les cellules NK pouvaient inhiber les lymphocytes T alloréactifs responsables de la maladie du greffon contre l'hôte (GvHD) par l'élimination des DC dépendante de la voie de la perforine (Laffont et al., 2008).

Les DC CLEC9A⁺/BDCA3⁺ peuvent sécréter de grandes quantités d'INF- α , ce qui suggère que, lors d'une infection virale, elles peuvent jouer un rôle clé dans la promotion de

la cytotoxicité des cellules NK dans les tissus périphériques tels que la peau, le foie, le poumon et les intestins. Les pDC pourraient également activer les cellules NK, très probablement par la libération d'IFN de type I, capables de stimuler la cytotoxicité des cellules NK (Ferlazzo and Morandi, 2014). Une autre étude a montré que les cellules NK humaines favorisent la cross-présentation des antigènes dérivés des cellules tumorales par les DC, ce qui entraîne l'activation des cellules T CD8⁺ spécifiques de l'antigène présenté. Dans cette étude, l'activation des NK, aboutissant à la production de l'IFN- γ et du TNF- α , était induite par les anticorps monoclonaux dirigés contre ces antigènes tumoraux sans activer la cytotoxicité des cellules NK, ce qui a conduit à une cross-présentation efficace des antigènes tumoraux par les DC (Deauvieu et al., 2015). Cette étude a donc mis en évidence un autre mécanisme utilisé par les NK pour interagir avec les DC, permettant aux DC d'assurer la présentation efficace des antigènes aux cellules T. Enfin, toutes ces études montrent que les cross-talks NK/DC jouent un rôle important dans l'amplification des réponses immunes innées et adaptatives contre les infections et les tumeurs.

4. Rôle des cellules NK dans les maladies auto-immunes

Bien que les cellules NK soient bien connues pour leur capacité à éliminer les cellules tumorales et les cellules infectées par les pathogènes intracellulaires, elles peuvent également jouer un rôle protecteur ou promoteur dans les maladies auto-immunes. La pathogénèse des maladies auto-immunes et inflammatoires est associée à l'activation des lymphocytes T et B qui sont dirigés contre les protéines du soi, conduisant à une inflammation persistante. L'implication des cellules NK dans les maladies auto-immunes peut être directe par l'élimination des cellules immunes adaptatives autoréactives ou indirecte par la production de cytokines immunorégulatrices ou suppressives, qui stimulent ou suppriment les fonctions des cellules immunes innées et adaptatives. L'élimination des cellules immunes adaptatives

autoréactives par les cellules NK met en évidence le rôle protecteur des cellules NK contre les réactions auto-immunes.

La sclérose en plaques est une maladie auto-immune inflammatoire du système nerveux central (SNC). Les cellules T CD4⁺ auto-réactives jouent un rôle crucial dans l'induction du processus inflammatoire en ciblant la myéline associée aux axones neuronaux. On suppose que les cellules NK humaines jouent un rôle immunorégulateur dans la sclérose en plaques en éliminant les cellules T auto-réactives activées. Il a été démontré que les cellules NK migrent vers le SNC enflammé, d'une manière dépendante du VLA-4 et inhibent l'activation des cellules T auto-réactives (Zhang and Tian, 2017), ce qui suggère un rôle protecteur des cellules NK. Les études *in vitro* ont montré que l'élimination des cellules T CD4⁺ auto-réactives médiée par les cellules NK est induite par les récepteurs activateurs DNAM-1 et 2B4 (Gross et al., 2016) (Zitti and Bryceson, 2018). La diminution significative d'expression des récepteurs activateurs DNAM-1 et 2B4 à la surface des cellules NK circulantes des patients atteints de sclérose en plaques est associée à la progression de la maladie. Cependant, d'autres études montrent que les cellules NK peuvent également lyser directement les oligodendrocytes, les astrocytes et les microglies en reconnaissant les ligands du NKG2D, ce qui a une influence pathogénique ou délétère sur le développement de la sclérose en plaque (Fogel et al., 2013). Chez les patients atteints de sclérose en plaque active, la fréquence et le nombre de cellules NK CD56^{dim} du sang périphérique sont augmentés, tandis que la fréquence des cellules NK CD56^{bright} productrices d'IFN- γ est fortement réduite, ce qui suggère un rôle possible des cellules NK CD56^{dim} et l'effet régulateur des cellules NK CD56^{bright} dans la pathogenèse de la sclérose en plaque. Il a été rapporté que les cellules NK CD56^{bright} induisent une apoptose indépendante de la caspase des cellules T activées par la libération de la granzyme K, exerçant ainsi un effet régulateur (Jiang et al., 2011).

Dans la polyarthrite rhumatoïde, une maladie dans laquelle le processus inflammatoire chronique conduit à la destruction du cartilage et des os (Palm et al., 2015), il semble que les cellules NK CD56^{bright} soient pathogéniques en jouant un rôle actif dans le maintien de l'inflammation. Les cellules NK dans le liquide synovial sont presque exclusivement des CD56^{bright} et expriment des niveaux plus élevés de molécules d'activation et sécrètent de l'IFN- γ lors de la stimulation par des cytokines. Il a été proposé que les cellules NK CD56^{bright} favorisent la différenciation des monocytes en cellules dendritiques, ce qui amplifie la réponse inflammatoire et contribue à la pathogenèse de l'inflammation chronique. Les cellules NK CD56^{bright} sont représentées en fréquence élevée dans le tissu synovial. Elles expriment des niveaux élevés de CCR5 et de CXCR3 et sont recrutées par les chimiokines sécrétées par les macrophages dans les liquides synoviaux (Zitti and Bryceson, 2018).

Le rôle des cellules NK dans la pathogenèse du diabète de type 1 a été mis en évidence chez les souris NOD (Brauner et al., 2010). Le début de la pathologie du diabète de type 1 est caractérisé par une fréquence plus faible des cellules NK dans le sang périphérique avec des fonctions altérées (Tobin et al., 2017). Les cellules NK sont impliquées dans l'élimination des cellules β -pancréatiques via la signalisation médiée par le NKp46, favorisant ainsi la destruction des îlots de Langerhans (Gur et al., 2010). De plus, au cours de l'inflammation, les cellules NK du pancréas produisent spontanément de l'IFN- γ qui favorise les effets pro-inflammatoires, ce qui contribue potentiellement à l'auto-immunité spécifique à l'organe (Brauner et al., 2010). La déplétion des cellules NK par un traitement avec un anticorps anti-asialo GM1 pourrait prévenir l'apparition du diabète de type 1 et réduire l'inflammation des îlots de Langerhans (Dotta et al., 2008).

Certaines combinaisons KIR et HLA ont été associées à la pathogenèse des maladies auto-immunes. L'expression du récepteur KIR2DL2/3 avec son ligand C1 est associée à une susceptibilité génétique plus élevée à la maladie de Crohn (Hollenbach et al., 2009) (Jones et

al., 2006). En revanche, plusieurs études ont rapporté un rôle protecteur du récepteur activateur KIR2DS1 contre la sclérose en plaques renforcé par la présence de son ligand C2 (Shahsavari et al., 2016).

5. Rôle des cellules NK dans la reproduction

Les cellules NK contribuent à la réussite de la grossesse en facilitant notamment l'invasion du trophoblaste fœtal et la formation d'artères spirales. Ces processus doivent être soigneusement équilibrés. En effet, une invasion extensive peut être associée à un poids de naissance élevé et à un accouchement à haut risque, alors qu'une invasion faible peut être associée à une pré-éclampsie, un faible poids de naissance et des fausses couches récurrentes (Hiby et al., 2010). Les cellules NK utérines sont les lymphocytes les plus abondants du tissu décidual et jouent un rôle clé dans la réussite de la grossesse (Colucci, 2017). Les cellules NK utérines sont des régulateurs actifs à l'interface mère/fœtus (Moffett and Colucci, 2014). Elles sont recrutées préférentiellement à l'interface mère/fœtus en début de grossesse et jouent un rôle essentiel dans le développement de la grossesse et protègent également l'utérus des femmes non enceintes contre les infections et le développement des tumeurs malignes (Moffett and Colucci, 2014). Les cellules NK utérines sécrètent les chimiokines IP-10 et IL-8, qui régulent l'invasion des trophoblastes dans l'utérus et produisent également des facteurs de remodelage tissulaire puissants, tels que le VEGF, le facteur de croissance placentaire (PLGF), le TGF- β , l'IFN- γ et les angiopoïétines, favorisant le remodelage vasculaire pendant l'implantation (Robson et al., 2012). Bien que les cellules utérines contiennent un grand nombre de granules cytolytiques (granzyme A et B), elles répondent faiblement à une stimulation par les cellules cibles à l'état basal (Melsen et al., 2016). De plus, les ligands MIC-A et MIC-B solubles (Mincheva-Nilsson et al., 2006) et liés aux exosomes (Hedlund et al., 2009) produits par le placenta inhibent l'expression du NKG2D au cours de la vie

embryonnaire, ce qui contribue à empêcher l'activation des cellules NK maternelles contre le fœtus.

Grâce à leurs interactions avec les molécules HLA de classe I exprimées sur les cellules trophoblastiques, les cellules NK utérines facilitent l'invasion des trophoblastes et la placentation (Colucci, 2017). Les cellules trophoblastiques n'expriment pas les molécules HLA-B et HLA-A, mais expriment les molécules HLA-E et HLA-C (King et al., 2000) dont les récepteurs apparentés CD94/NKG2A et KIR2D sont surexprimés au niveau des cellules NK utérines (Xiong et al., 2013) (Moffett and Colucci, 2015). Par conséquent, les cellules NK utérines sont enrichies en populations NK éduquées. Les mères C1⁺ et C2⁺ présentent une fréquence accrue de cellules NK utérines exprimant les récepteurs KIR2DL3 et KIR2DL1, respectivement (Sharkey et al., 2015). De cette façon, les cellules NK maternelles sont équipées pour permettre le remodelage des tissus tout en restant sensibles à l'inhibition, créant ainsi un environnement moléculaire optimal pour l'invasion des trophoblastes.

Les ligands C2 fœtaux d'origine paternelle chez les mères KIR2DS1⁺ et C2⁻ sont associés à un poids de naissance élevé et une placentation réussie (Hiby et al., 2010). En revanche, le KIR2DS1 est faiblement représenté et le ligand C2 est fortement représenté chez les femmes qui font de fausses couches à répétition (Wang et al., 2007). De même, le ligand C2 et l'haplotype KIR-A, qui est dépourvu de KIR2DS1, sont représentés en forte fréquence chez les femmes qui font de fausses couches à répétition et chez leurs partenaires (Hiby et al., 2008). Les haplotypes KIR-A et les ligands C2 fœtaux d'origine paternelle sont également représentés en forte fréquence chez les patientes souffrant de pré-éclampsie, où le développement placentaire et la croissance fœtale sont compromis en raison d'une mauvaise invasion des trophoblastes (Hiby et al., 2010). Ensemble, ces études suggèrent que l'éducation des cellules NK utérines qui favorisent la réactivité des cellules NK maternelles plutôt que l'inhibition pourrait permettre une placentation réussie et la formation d'une artère en spirale.

IV. Les cellules NK en greffe de cellules souches hématopoïétiques (CSH)

1. Les greffes de CSH

La greffe de cellules souches hématopoïétiques (CSH) est une thérapie cellulaire qui consiste à administrer les cellules souches hématopoïétiques saines, prélevées chez un donneur, à des patients présentant un dysfonctionnement ou une déplétion de la moelle osseuse. Cela aide à augmenter la fonction de la moelle osseuse et permet, en fonction de la maladie traitée, soit de détruire les cellules tumorales pour des patients présentant une tumeur maligne, soit de générer des cellules fonctionnelles qui peuvent remplacer les cellules anormales dans des cas tels que les syndromes d'immunodéficience, les hémoglobinopathies et d'autres maladies (Khaddour et al., 2020).

La greffe de cellules souches hématopoïétiques fut explorée pour la première fois chez l'homme dans les années 1950 et fut basée sur des études observationnelles dans des modèles murins qui montraient que l'infusion des composants de la moelle osseuse saine dans une moelle osseuse myélosupprimée pouvait induire la reconstitution de ses fonctions chez le receveur (Barnes et al., 1956). Ces études basées sur des animaux trouvèrent rapidement leurs applications cliniques chez l'homme lorsque la première greffe syngénique de moelle osseuse réussie fut été réalisée entre deux jumeaux monozygotes à New York en 1957 pour le traitement de l'un des jumeaux atteint d'une leucémie (Thomas et al., 1957). En conséquence, le médecin Dr Thomas qui a pratiqué la procédure a poursuivi ses recherches sur le développement de la greffe de moelle osseuse et a reçu en 1990 le prix Nobel de physiologie et de médecine en reconnaissance pour son travail.

Les greffes de CSH sont indiquées pour le traitement des hémopathies malignes comme les leucémies aiguës et chroniques myéloïdes et lymphoblastiques (Othus et al., 2015) (Yanada et al., 2006), les lymphomes de Hodgkin (HL) et Non-Hodgkiniens (NHL) (Schmitz et al., 2002) et le syndrome myélodysplasique (MDS). Elles sont également indiquées pour le

traitement des hémopathies non malignes telles que l'aplasie médullaire (Bacigalupo et al., 2012), le syndrome d'immunodéficience sévère combinée (SCID) (Pai et al., 2014), la thalassémie (Caocci et al., 2017), la drépanocytose (Angelucci et al., 2014) et bien d'autres. Aux USA, la première greffe allogénique de moelle osseuse réussie a été rapportée au Minnesota en 1968 pour un patient pédiatrique atteint d'un syndrome d'immunodéficience combinée sévère (SCID) (Gatti et al., 1968). Depuis lors, les greffes de CSH allogéniques ont augmenté aux USA et dans le monde. Les cellules souches hématopoïétiques peuvent provenir de la moelle osseuse, du sang périphérique (PBSC, Peripheral Blood Stem Cells) ou du sang de cordon ombilical (sang placentaire). La sélection d'un donneur de CSH est une étape importante pour garantir l'efficacité d'une greffe. Elle dépend en particulier des caractéristiques génétiques et cliniques du donneur. En France, 1964 greffes de CSH allogéniques (moelle osseuse, sang périphérique ou sang placentaire) ont été réalisées chez 1924 patients en 2019, selon le dernier rapport de l'ABM (Agence de la Biomédecine).

2. Compatibilité HLA et sélection des donneurs de CSH

Les gènes HLA jouent un rôle déterminant sur le devenir clinique des greffes de CSH et représentent de ce fait l'un des critères les plus décisifs pour le choix des donneurs de CSH. En effet, avant l'indication de greffe de CSH, le typage HLA est une étape importante pour la détermination du meilleur donneur compatible. Les molécules HLA jouent un rôle important dans l'alloimmunité et sont codées par les gènes HLA de classe I et HLA de classe II présents au niveau du chromosome 6p21. Les gènes HLA de classe I codent pour les molécules HLA-A, HLA-B et HLA-C qui sont exprimées à la surface de presque toutes les cellules nucléées de l'organisme et présentent les peptides antigéniques dérivés du cytoplasme qui sont reconnus par les récepteurs TCR des lymphocytes T CD8⁺. Les gènes HLA de classe II codent pour les molécules HLA-DP, HLA-DQ et HLA-DR qui sont exprimées à la surface

des cellules présentatrices d'antigènes (APC) et reconnues par les TCR des lymphocytes T CD4⁺. Les typages HLA des patients et des potentiels donneurs de CSH sont déterminés, en haute résolution par biologie moléculaire ou plus récemment par NGS (Next-Sequencing Generation) pour déterminer les allèles spécifiques HLA-A, -B, -C, -DRB1 et -DQB1. Les résultats sont rapportés sous forme de score en corrélation avec un appariement des deux allèles pour chaque locus HLA (Khaddour et al., 2020). En théorie, le meilleur donneur est un donneur apparenté/non-apparenté HLA identique avec le receveur. Pour la greffe de CSH provenant de la moelle osseuse ou du sang périphérique, une compatibilité HLA 10/10 entre le donneur et le receveur est recherchée pour prévenir des réactions immunologiques qui peuvent être induites par des lymphocytes T matures présents dans les greffons. On parle de compatibilité HLA 10/10 lorsque les allèles HLA-A, HLA-B, HLA-C, HLA-DRB1 et HLA-DQB1 du donneur sont compatibles à ceux du receveur.

En cas de disparités des antigènes HLA entre le donneur et le receveur, les réactions immunologiques peuvent se produire dans les deux sens : le sens hôte versus greffon (HvG) et le sens greffon versus hôte (GvH). Dans le sens HvG, les cellules immunitaires de l'hôte peuvent reconnaître et éliminer les cellules du greffon, ce qui peut conduire au rejet du greffon de CSH par le système immunitaire du receveur. Pour cette raison, une destruction de la moelle osseuse du receveur par chimiothérapie et/ou radiothérapie est réalisée avant la greffe pour induire la tolérance du greffon par le receveur. Dans le sens GvH, deux réactions immunologiques peuvent se produire : l'effet GvHD (Graft-versus-Host-Disease) et l'effet GvL (Graft-versus-Leukemia) ou GvT (Graft-versus-Tumor). L'effet GvHD ou la maladie du greffon contre l'hôte est induit par les lymphocytes T matures du greffon qui reconnaissent les molécules HLA incompatibles du patient, pouvant conduire aux lésions des tissus sains des patients tels que la peau, le foie et les intestins. Pour cela, des traitements d'immunosuppression ont été utilisés pour induire la tolérance de l'hôte par le greffon. En

revanche, pour la greffe de sang de cordon, une compatibilité HLA moindre entre le donneur et le receveur est suffisante puisque les CSH du sang de cordon ne contiennent pas de lymphocytes T matures et le risque de développer une GvHD est moindre. L'effet GvL ou GvT est induit par les cellules immunitaires matures effectrices du greffon telles que les lymphocytes T $\alpha\beta$, les T $\gamma\delta$ et les cellules NK qui reconnaissent et éliminent les cellules tumorales du receveur atteint d'une tumeur maligne. L'effet GvL constitue l'effet thérapeutique recherché pour permettre la rémission complète du patient.

Selon l'origine du greffon de CSH et sur la base des typages HLA, on peut distinguer plusieurs types de greffe de CSH, à savoir : les greffes syngéniques, les greffes autologues et les greffes allogéniques de CSH. Dans les greffes syngéniques de CSH, le donneur et le receveur sont des frères jumeaux ou sœurs jumelles HLA identiques. L'avantage de cette approche de greffe de CSH est qu'il n'y a pas de GvHD, ni d'échec de greffe, et l'inconvénient est qu'il y a peu d'effet GvL. Dans les greffes autologues, les greffons de CSH sont collectés à partir du patient lui-même et sont ré-infusés chez le patient. L'avantage de cette méthode de greffe est qu'il n'y a pas de GvHD, mais l'inconvénient est que la moelle osseuse peut contenir des cellules anormales qui peuvent provoquer une rechute dans le cas d'une tumeur. Cette méthode présente en effet des limites puisqu'elle ne peut pas être utilisée dans les cas des maladies de la moelle osseuse (Khaddour et al., 2020). Les greffes autologues sont indiquées majoritairement dans le contexte de lymphomes et de myélomes (ABM, 2019). Dans les greffes allogéniques de CSH, le donneur idéal est un membre de la famille HLA 10/10 compatible, dit géno-identique. Il peut également être non apparenté HLA 10/10 compatible. On parle de greffe phéno-identique. Au sein d'une fratrie, les frères et sœurs ont 25% de chance d'être HLA identiques et la probabilité de trouver un donneur non-apparenté HLA identique sur les fichiers nationaux et internationaux des donneurs volontaires de moelle osseuse est d'une chance sur 1 million dans la population caucasienne. En effet, la

probabilité de trouver un donneur volontaire de moelle osseuse compatible HLA10/10 non-apparenté est de plus de 75% dans la population caucasienne contre seulement moins de 20% dans certaines ethnies minoritaires (Gragert et al., 2014). La greffe de sang de cordon et plus récemment la greffe haplo-identique sont deux alternatives en l'absence de donneur HLA identique. La greffe de sang de cordon est encore utilisée en pédiatrie, mais beaucoup moins chez l'adulte. Le donneur haplo-identique est un donneur apparenté qui partage en commun un haplotype HLA avec le receveur. C'est un membre de la famille partiellement compatible (HLA 5/10) avec le receveur, qui peut être un parent de premier degré, un enfant, un frère ou une sœur, ou même un membre de la famille éloigné.

Dans ce chapitre, nous discuterons des paramètres qui influencent le devenir clinique des greffes de CSH.

3. Les greffes de CSH haplo-identiques

La greffe de CSH HLA haplo-identiques est devenue de nos jours une alternative de traitement curatif pour la plupart des hémopathies malignes en particulier pour les leucémies aiguës (Shem-Tov et al., 2020) (Sengsayadeth et al., 2018) (Deteix et al., 2020). C'est une approche de thérapie cellulaire qui consiste à administrer chez un patient, les CSH de la moelle osseuse ou du sang périphérique provenant d'un donneur apparenté qui partage un haplotype HLA commun avec celui du receveur. Pour des patients n'ayant pas de donneurs HLA compatibles apparentés ou non-apparentés, cette alternative de greffe est une option thérapeutique intéressante puisqu'il est possible d'identifier un ou plusieurs donneurs haplo-identiques dans la fratrie, les parents et les enfants, mais également les parents collatéraux (cousins, oncles, etc...) (Nguyen et al., 2016). Ces donneurs sont disponibles dans plus de 95% des cas et sont généralement motivés à donner leur greffon de CSH le plus rapidement

possible à un membre de la famille malade (Fuchs, 2012). De plus, cette approche est peu coûteuse. Les greffes de CSH à partir d'un donneur haplo-identique sont indiquées pour le traitement des LAM et des LAL chez des patients en complète rémission. En 2019, les greffes allogéniques (apparentées et non-apparentées) de CSH étaient indiquées dans 41,2% des LAM et 14,3% des LAL en France. Les greffes haplo-identiques ont représenté 51,3% des greffes allogéniques apparentées réalisées (ABM, 2019).

Les greffes de CSH haplo-identiques donnent la possibilité d'avoir le choix parmi plusieurs donneurs familiaux pour un même patient. Cependant, plusieurs questions se posent actuellement sur le choix du meilleur donneur. En effet, les critères de choix du donneur haplo-identique sont variés et peuvent être basés sur l'absence chez le receveur des anticorps anti-HLA dirigés contre le donneur (DSA, Donor Specific Antibodies), le sexe, l'âge, le poids, le statut CMV, le groupe sanguin ABO, les incompatibilités KIR/HLA et la source et la richesse du greffon. Chacun de ces paramètres peut influencer positivement ou négativement le devenir clinique de la greffe.

Suite à une greffe de CSH, plusieurs paramètres cliniques sont évalués pour déterminer son efficacité : la prise de greffe (reconstitution immunitaire, chimérisme), l'effet GvL, la survie globale (OS), la survenue de la GvHD, la rechute, la mortalité liée à la greffe (TRM) et la survenue d'infections virales.

Deux protocoles de greffes de CSH à partir de donneurs haplo-identiques sont actuellement utilisés : (i) la greffe de CSH haplo-identiques avec un greffon non-T déplété qui utilise le Cyclophosphamide post-greffe (PTCy) à forte dose ou l'ATG (anti-thymoglobuline) pour la déplétion *in vivo* des lymphocytes T et (ii) la greffe de CSH haplo-identique avec un greffon T-déplété dans lequel le greffon est manipulé *ex vivo* par une sélection positive de cellules CD34⁺ avec une sélection négative des lymphocytes T (Baumeister et al., 2020). Chaque stratégie présente des avantages et des inconvénients en ce qui concerne le devenir

clinique des greffes de CSH en particulier sur la reconstitution immunitaire, la prévention de la GvHD et sur la prévention des rechutes.

Les premières tentatives de greffes allogéniques avec incompatibilités HLA, non-T déplétées, ont montré que celles-ci étaient associées à des incidences élevées de rejets de greffe et de GvHD aigües sévères liées aux lymphocytes T du donneur reconnaissant les molécules HLA du receveur non compatibles, conduisant à une mortalité rédhibitoire (Beatty et al., 1985) (Anasetti et al., 1989). Au cours des années 90, d'autres stratégies de greffes ont été développées et ces greffes étaient basées sur l'utilisation des conditionnements hautement myéloablatifs et immunosuppresseurs avec une profonde T-déplétion *ex vivo* des greffons et la réinjection des "méga" doses de cellules CD34⁺ (Aversa et al., 1998). Cette approche a conduit à des prises de greffe satisfaisantes, à peu de GvHD et à la rémission complète (RC) de certains patients atteints de LAM. C'est dans ce contexte de greffe de CSH haplo-identiques T-déplétées que Ruggieri et ses collègues avaient mis en évidence pour la première fois le rôle bénéfique des cellules NK alloréactives dans la réduction de la rechute sans GvHD chez des patients atteints de LAM (Ruggeri et al., 2002). Cette alloréactivité NK était liée aux incompatibilités HLA entre le donneur et le receveur dans le sens GvH. Cependant, la stratégie de prévention de la GvHD basée sur la déplétion *ex vivo* des lymphocytes T a conduit à la survenue de l'immunodéficience profonde et prolongée des patients liée à l'absence des lymphocytes T, à la reconstitution immune tardive et la mortalité liée aux infections. Enfin, ce protocole de greffe très sophistiquée et coûteuse a été abandonné au profit des stratégies d'immunosuppression qui utilisent des drogues T-déplétantes *in vivo*. Actuellement, une nouvelle approche, développée à Baltimore, utilisant des doses élevées de PTCy comme traitement immunosuppresseur en association avec l'injection d'un greffon non-T déplété a montré des résultats encourageants en ce qui concerne l'amélioration de la prise de greffe et la prévention efficace de la GvHD dans les greffes de CSH haplo-identiques

chez l'adulte (Luznik et al., 2008). Le Cyclophosphamide permet une déplétion sélective *in vivo* des lymphocytes T alloréactifs activés du donneur lorsqu'il est administré à J3 et J4 ou J3 et J5 post-greffe.

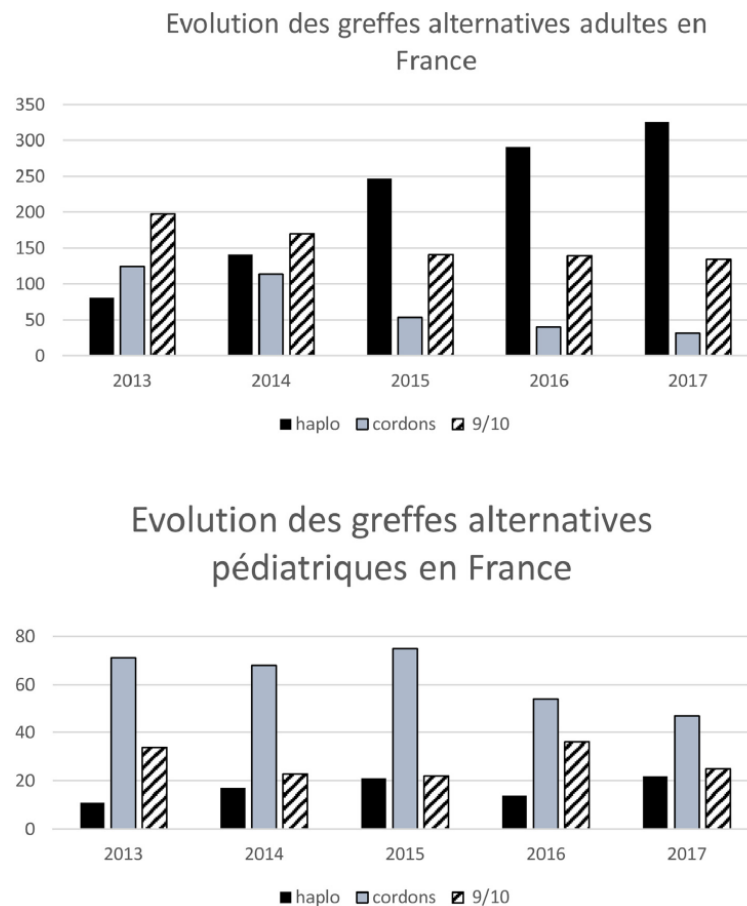


Figure 14 : Evolution des greffes alternatives adultes et pédiatriques dans les centres francophones.

Atelier de la Société francophone de greffe de moelle et de thérapie cellulaire (SFGM-TC) (Dubois V, 2019).

En raison de l'utilisation de PTCy, les greffes de CSH haplo-identiques sont en constante augmentation depuis 2012 en France chez l'adulte et dépassent, en nombre, les greffes de sang de cordon ombilical et les greffes à partir de donneurs non-apparentés HLA 9/10 incompatibles depuis 2015 (Dubois et al., 2020). En revanche, chez l'enfant, le sang

placentaire ou sang de cordon ombilical reste la source principale de greffon alternatif en l'absence de donneur HLA identique (Figure 14).

La procédure de greffe de CSH se déroule en 3 grandes étapes : la collecte du greffon, la préparation ou conditionnement pré-greffe et l'infusion du greffon. L'infusion de greffon de CSH est suivie de traitements immunosuppresseurs post-greffes. Le greffon de CSH dans le contexte des greffes haplo-identiques peut provenir de la moelle osseuse ou du sang périphérique. Les CSH de la moelle osseuse sont généralement prélevées au niveau de la crête iliaque postérieure. Pour la collecte des CSH du sang périphérique (PBSC), les donneurs sont traités 4 à 5 jours avant la greffe au G-CSF (Granulocyte Colony-Stimulating Factor) pour mobiliser les CSH de la moelle osseuse vers le sang périphérique. Le mécanisme d'action du G-CSF est de stimuler les neutrophiles à libérer les sérines protéases qui provoquent la dégradation des molécules d'adhésion vasculaires, ce qui conduit à la libération des CSH de la moelle osseuse (Cashen et al., 2008). Le sang périphérique enrichi en CSH CD34⁺ est alors collecté et infusé chez le patient. Dans le contexte des greffes haplo-identiques, la capacité d'un greffon de CSH non-T déplété, de moelle osseuse ou du sang périphérique, à générer un effet thérapeutique bénéfique chez le patient dépend des facteurs comme le conditionnement pré-greffe ou de PTCy. En effet, ces facteurs peuvent influencer la prise de greffe, la survenue de la GvHD et la reconstitution des effecteurs cellulaires de l'immunité tels que les cellules NK et les lymphocytes T. En raison de l'absence d'études prospectives comparant les effets des CSH de la moelle osseuse versus PBSC, il n'y a donc pas à l'heure actuelle de consensus concernant le choix de la source de greffon de CSH à partir d'un donneur haplo-identique. A noter que, pour des raisons pratiques, la source principale de greffons allogéniques, en France, reste le sang périphérique depuis 10 ans : 72,9% en 2019 contre 56,4% en 2010 (ABM, 2019).

Avant la greffe de CSH, les patients sont soumis à un conditionnement qui consiste à administrer chez le patient, des doses de chimiothérapie et/ou de radiothérapie (irradiation

corporelle totale) dans le but de permettre l'immunosuppression chez le patient pour que la prise de greffe se fasse efficacement. Le conditionnement pré-greffe est divisé en conditionnement myéloablatif (MAC, myeloablative conditioning) et en conditionnement d'intensité réduite (RIC, reduced intensity conditioning). Le MAC est généralement réalisé chez les patients jeunes sans co-morbidité et n'ayant pas été exposés aux radiations, alors que le conditionnement RIC est appliqué aux patients âgés ou à ceux ayant des co-morbidités dans le but de les prévenir de la toxicité liée à la chimiothérapie ou aux irradiations qu'ils ne pourraient pas supporter. Par exemple, le conditionnement utilisé à l'hôpital Northside, à Atlanta, aux USA, se présentent de la manière suivante : le conditionnement myéloablatif dans les greffes de CSH haplo-identiques avec un greffon de PBSC non-T déplété peut consister en une administration de chimiothérapie intensive à base de Busulfan à 110 mg/m²/j (entre J-7 à J-4), de Fludarabine à 25 mg/m²/j (entre J-5 et J-2) et de Cyclophosphamide à faible dose à raison de 14,5 mg/Kg/j (entre J-3 et J-2) ou une administration de chimiothérapie à base de Fludarabine à 30 mg/m²/j (entre J-7 et J-5) suivie d'une irradiation à 150cGy bid/j (entre J-4 et J-1). Le conditionnement RIC ou non-myéloablatif dans les greffes de CSH haplo-identiques utilisant un greffon de moelle osseuse non-T déplété peut consister en une administration de chimiothérapie à base de Cyclophosphamide à 14,5 mg/Kg/j pendant 2 jours, suivie de Fludarabine à 30 mg/m²/j (entre J-5 et J-2) et d'une irradiation corporelle totale (TBI, Total Body Irradiation) à 200cGy à J-1. Dans tous les cas, le PTCy à forte dose est injecté à raison de 50 mg/Kg/j (à J+3 et J+4), suivi d'une administration de MMF (Mofetil Mycofenolate) (entre J+5 et J+30) et d'une administration de Tacrolimus (entre J+5 et J+180) à faible dose (Bashey and Solomon, 2014). Bien que le PTCy soit devenu le traitement standard pour la prévention des GvHD aiguës dans le contexte des greffes de CSH haplo-identiques non-T déplétées en France, les études récentes ont recommandé l'utilisation de l'ATG en plus de PTCy pour diminuer l'incidence des GvHD (El-Cheikh et al., 2020).

La rechute reste l'une des causes majeures de l'échec de la greffe allogénique de CSH. L'incidence de rechutes pour les patients atteints de LAM est d'environ 30 à 40% dans la première année après la greffe de CSH (Cornelissen and Blaise, 2016) et celle des patients allogreffés pour une LAL est d'environ 30% (Mohty et al., 2010). Par conséquent, la réduction des taux de rechute reste dans le cadre des greffes de CSH encore un enjeu majeur pour la plupart des acteurs impliqués dans les activités de recherche sur les greffes. Pour cette raison, un accent particulier est mis sur l'utilisation des cellules NK pour exploiter l'immunité innée et l'immunité adaptative dans le contexte des greffes de CSH haplo-identiques. Il y a eu beaucoup d'études sur l'alloréactivité des cellules NK en greffes de CSH HLA identiques, HLA non-identiques et en greffes de sang de cordon, mais les résultats sont contradictoires en raison de la diversité du répertoire NK et/ou des marqueurs KIR/HLA impliqués. Les protocoles de greffe entre les centres greffeurs varient en fonction des analyses faites (prises en compte des KIR ou seulement HLA, étude phénotypique NK), des pathologies, des conditionnements et de la source de greffon. L'absence de standardisation des protocoles de greffes n'offre pas la possibilité d'optimiser les modèles cliniques qui exploitent l'alloréactivité des cellules NK.

Notre équipe de recherche est très impliquée, depuis de nombreuses années, dans les études des marqueurs génétiques et phénotypiques qui peuvent prédire l'alloréactivité des cellules NK responsables de l'effet GvL et de la diminution de la rechute dans le contexte des greffes à partir du sang de cordon ombilical, et plus récemment dans les greffes de CSH haplo-identiques (Retière et al., 2018) (Rettman et al., 2015). Toutes ces études montrent qu'il est possible d'améliorer l'effet GvL en sélectionnant des donneurs de CSH sur la base de la génétique KIR et du phénotype des cellules NK du donneur. La détermination des génotypes KIR par biologie moléculaire, du polymorphisme allélique KIR par NGS (Next-Generation Sequencing) (Maniangou et al., 2017) et du phénotype du répertoire NK par cytométrie en

flux avant la greffe, peuvent contribuer à l'optimisation de la sélection de donneurs de CSH avec des sous-populations NK alloréactives à forte potentialité anti-tumorale.

4. Rôle des KIR en greffes allogéniques de CSH

Les cellules NK matures présentes dans le greffon peuvent aider à la prévention de la rechute de la leucémie et contribuer à la protection des patients contre l'infection ou la réactivation virale. Elles sont fortement impliquées dans l'élimination des cellules leucémiques résiduelles ayant échappé au conditionnement pré-greffe (Sivori et al., 2020). Suite à une greffe de CSH, les cellules NK sont les premiers effecteurs cellulaires à réapparaître et une partie du système immunitaire chez le receveur. Elles contribuent de ce fait au maintien de l'état de rémission complète des patients greffés et à la protection contre les infections virales tout en facilitant la prise de greffe (Cooley et al., 2018).

Les greffes de CSH haplo-identiques représentent un contexte propice pour évaluer l'alloréactivité des cellules NK puisque les cellules NK du donneur peuvent exprimer certains récepteurs KIR inhibiteurs pour lesquels les ligands HLA de classe I sont absents chez le receveur. C'est le modèle prédictif de l'alloréactivité des cellules NK basée sur les incompatibilités KIR/HLA dans le sens de la GvH, qui est exploité dans plusieurs protocoles de greffe de CSH pour induire l'alloréactivité des cellules NK et prévenir les rechutes. En effet, les incompatibilités KIR/HLA dans le sens GvH conduit à l'activation des cellules NK, ce qui peut favoriser l'effet GvL dans le contexte des leucémies. Pour cette raison, l'analyse de la génétique KIR avant la greffe peut constituer un critère important pour prédire l'alloréactivité des cellules NK en greffe de CSH haplo-identique. L'alloréactivité des cellules NK peut être induite en sélectionnant par exemple un donneur dont les cellules NK expriment le récepteur inhibiteur KIR2DL1 spécifique du ligand C2 et qui sont éduquées à reconnaître

l'absence ou la diminution d'expression du ligand C2 chez le donneur. Si le receveur est homozygote pour les ligands C1, il n'y a donc pas de ligand C2 pour inhiber les cellules NK du donneur et les cellules tumorales peuvent être éliminées. A l'inverse, si le receveur est homozygote pour les ligands C2, les cellules NK du donneur peuvent être inhibées via les interactions entre les KIR2DL1 et les ligands C2 (Cooley et al., 2018). Ainsi l'absence d'au moins un ligand HLA de classe I chez le receveur pour lequel un récepteur inhibiteur KIR spécifique est présent chez le donneur est potentiellement favorable à un effet GvL médié par les cellules NK KIR après la greffe. Par contre, la présence de plusieurs ligands HLA reconnus par les KIR inhibiteurs (C1, C2, Bw4, A3/A11) n'est pas favorable à l'activation de l'alloréactivité des cellules NK. Les études ont montré que l'alloréactivité des cellules NK induite par les incompatibilités KIR/HLA est associée à de faibles rechutes et une meilleure survie des patients transplantés pour une LAM (Ruggeri et al., 2002) (Ruggeri et al., 2008). Toutefois, d'autres études ayant utilisé cette même stratégie basée sur les incompatibilités KIR/HLA ont rapporté des résultats contradictoires en termes d'effet GvL. Ces observations peuvent s'expliquer par l'influence d'autres facteurs tels que la source de greffon de CSH, le conditionnement, la T-déplétion et l'immunosuppression post-greffe qui peuvent varier d'un protocole à un autre. Les protocoles de greffe peuvent être différents selon les pays ou selon les centres greffeurs. L'impact de l'alloréactivité des cellules NK sur la survie des patients allogreffés doit être évalué sur des protocoles de greffe de CSH homogènes afin de définir les modèles prédictifs de l'alloréactivité des cellules NK les plus pertinents et adaptés à chaque protocole de greffe de CSH haplo-identique.

Le modèle prédictif de l'alloréactivité des cellules NK basé sur les incompatibilités KIR/HLA dans le sens de la GvH est utilisé dans le contexte des greffes de CSH haplo-identiques non-T déplétées avec PTCy. Certaines équipes ont utilisé ce modèle sur la base du typage allélique HLA de classe I seul, alors que d'autres l'ont utilisé en prenant en compte le

génotype KIR en plus du typage HLA pour déterminer le degré d'incompatibilités KIR/HLA. Les études ont rapporté un impact favorable d'une incompatibilité KIR/HLA sur la survie globale et la rechute (Solomon et al., 2018) (Wanquet et al., 2018) (Symons et al., 2010a). Toutefois, ce modèle des incompatibilités KIR/HLA dans les greffes haplo-identiques non-T déplétées avec PTCy est controversé en raison des incidences élevées de GvHD. Il a été rapporté que le PTCy pouvait avoir un effet déplétant sur des cellules NK alloréactives (Russo et al., 2018), ce qui peut expliquer l'absence d'effet GvL (Bastos-Oreiro et al., 2016) voire même une augmentation des rechutes et une diminution de la survie globale (Shimoni et al., 2019a) dans certaines greffes de CSH haplo-identiques non-T déplétées avec PTCy. Plusieurs stratégies d'immunosuppression post-greffes dans le cadre des greffes de CSH haplo-identiques sont en cours d'évaluation dans le but de réduire les incidences de GvHD aiguë (El-Cheikh et al., 2020).

Les données de la littérature sur l'impact des incompatibilités KIR/HLA sur le devenir clinique des greffes de CSH haplo-identiques sont encourageantes (Nguyen et al., 2011), mais restent encore insuffisantes pour considérer le génotypage KIR comme critère décisionnel pour la sélection d'un donneur de CSH haplo-identiques. Dans tous les cas, le génotypage KIR avec le phénotype KIR sont des éléments supplémentaires qui peuvent être considérés pour sélectionner un donneur de CSH haplo-identique. D'autres facteurs sont également à considérer, tels que le conditionnement pré-greffe, l'immunosuppression post-greffe, la T-déplétion et la source de greffon qui ont une influence sur la reconstitution, le phénotype et les capacités fonctionnelles des cellules NK après la greffe de CSH. La Figure 15 illustre l'alloréactivité des cellules NK des donneurs de génotype HLA-C1C2 en greffe de CSH haplo-identiques.

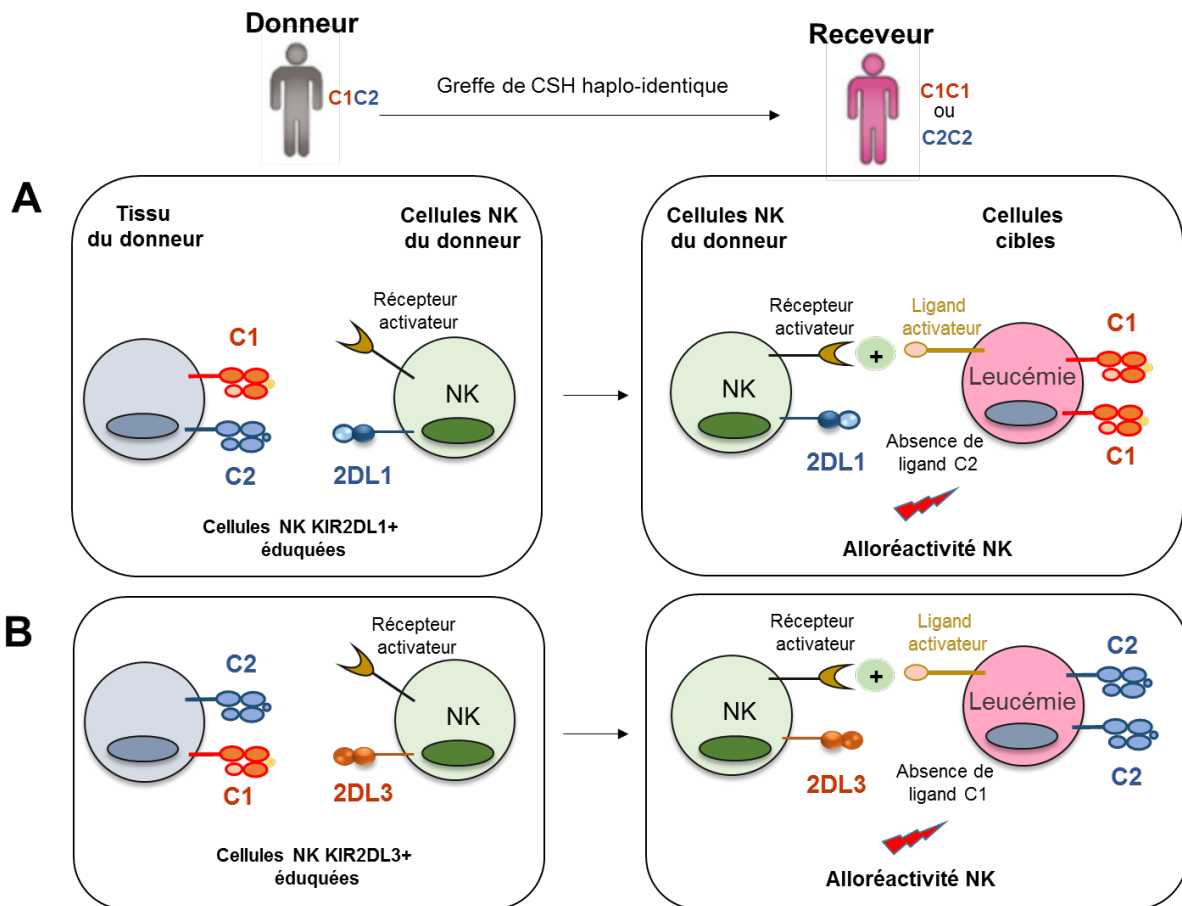


Figure 15 : L'alloréactivité des cellules NK en greffe de CSH haplo-identiques.

Illustration de l'alloréactivité des cellules NK KIR⁺ issues d'un donneur C1C2 dans le contexte de la greffe de CSH haplo-identique. **(A)** La cellule NK KIR2DL1⁺ éduquée dans un environnement HLA-C2⁺ chez le donneur est alloreactive vis-à-vis des cellules leucémiques n'exprimant pas ce ligand HLA, ce qui conduit à un effet GvL chez le patient. **(B)** De la même façon, chez un receveur HLA C2C2, la cellule NK KIR2DL3⁺ éduquée, issue d'un donneur HLA C1C2, devient alloreactive vis-à-vis des cellules leucémiques HLA-C1⁻ (C2C2) du receveur.

Les gènes KIR sont regroupés en 2 haplotypes : l'haplotype A et l'haplotype B. L'haplotype A ne contient qu'un seul KIR activateur, le KIR2DS4. Les haplotypes B contiennent plus de combinaisons de gènes KIR activateurs. Un modèle prédictif de l'alloréactivité de cellules NK basé sur le génotypage KIR a été utilisé dans la sélection des donneurs de CSH (Weisdorf et al., 2019). C'est le modèle du scoring du contenu de l'haplotype B en gènes KIR basé sur le principe que, plus le donneur de CSH a de gènes KIR

activateurs, plus le potentiel alloréactif des cellules NK du donneur peut être important. Dans ce modèle, le génotypage KIR est pris en compte pour déterminer la présence des gènes KIR activateurs du donneur. Les études rétrospectives ont évalué l'impact du génotype KIR du donneur et du receveur sur l'évolution clinique des greffes de CSH. Dans un protocole de greffes de CSH haplo-identiques non-T déplétées avec PTCy, il a été rapporté que la présence d'au moins un haplotype B (Bx) chez le donneur semble être un facteur favorable sur la survie globale comparé à un haplotype A (Torío et al., 2018). De même, dans des protocoles de greffe de CSH non-apparentés HLA identiques, la présence d'un haplotype B était associée à une meilleure survie. En effet, la présence du gène KIR2DS1 et du KIR2DS2 dans ces haplotypes B et leurs ligands correspondant ont conféré une protection contre la rechute des LAM (Cooley et al., 2009). De plus, la présence du gène KIR3DS1 chez le donneur était associé à une incidence réduite de la GvHD dans le contexte des greffes de CSH non-apparentés HLA identiques (Venstrom et al., 2010) (Gagne et al., 2009). Sur la base de ces études, il est possible d'admettre que la présence des gènes KIR2DS1, KIR2DS2 et KIR3DS1 dans les haplotypes B du donneur sont bénéfiques pour le devenir clinique des greffes de CSH.

5. Immunothérapies en greffe de CSH

Bien que les cellules NK soient les premiers lymphocytes qui reconstituent le système immunitaire après la greffe de CSH, leurs fonctions effectrices de cytotoxicité et de sécrétion de cytokines peuvent être altérées par le microenvironnement tumoral chez le patient (Foley et al., 2011). Pour cette raison, plusieurs stratégies permettant d'améliorer la fonction effectrice des cellules NK sont utilisées en greffes de CSH. Ces stratégies sont développées dans le but de permettre l'activation des cellules NK pour prévenir la rechute ou induire une rémission en greffe de CSH.

5.1. Transfert adoptif des cellules NK alloréactives

Le transfert adoptif des cellules NK matures éduquées dans l'environnement HLA de classe I du donneur est une stratégie qui exploite les propriétés anti-leucémiques des cellules NK dans le contexte des greffes de CSH. Les infusions de cellules NK autologues ou allogéniques peuvent être utilisées dans le but de générer de façon additionnelle les effets GvL en prophylaxie ou en cas de rechute après greffe de CSH (Cooley et al., 2018). La génération des proportions adéquates de cellules NK pour les thérapies cellulaires post-greffes peut être difficile en raison de la fréquence relativement faible des cellules NK dans le sang périphérique, mais peut être surmontée par une expansion préalable *in vitro*. Actuellement, plusieurs stratégies permettent de réaliser l'expansion de cellules NK *in vitro* à base de cytokines ou de cellules nourricières. Les sources de cellules NK sont diverses. Elles peuvent provenir du sang de cordon, du sang périphérique, des cellules souches pluripotentes humaines (iPSC, Induced Pluripotent Stem Cells) ou de lignées NK-92. La plupart des protocoles utilisent les cytokines telles que l'IL-2, l'IL-12, l'IL-15, l'IL-18 et l'IL-21 seules ou des cocktails de ces cytokines pour l'activation et l'expansion des cellules NK (Bachiller et al., 2020). Chaque cytokine a un impact sur la maturation, la prolifération, la survie et la fréquence des cellules NK. Il est également possible de présélectionner les cellules NK exprimant les marqueurs KIR ou le NKG2C. Il a été montré que les cellules nourricières exprimant l'IL-21 (mbIL21) pouvaient induire l'expansion *in vitro* des cellules NK. Une étude clinique de phase 1 a évalué l'effet prophylactique sur la rechute de l'infusion de ces cellules NK après une greffe de CSH haplo-identiques avec PTCy. Les cellules NK ont été infusées chez le patient à J-2, J+7 et J+28. Sur les 11 patients ayant reçu les 3 doses planifiées de cellules NK, 54% d'entre eux ont développé une GvHD aigüe de grade I et grade II, et aucun n'a développé de GvHD aigüe de grades III et IV, ni de GvHD chronique. Seulement 1

patient a rechuté. Tous les autres patients ont présenté une survie et une rémission à une période médiane de 14,7 mois au cours de leur suivi (Ciurea et al., 2018).

L'infusion de cellules NK peut être suivie de l'administration de cytokines qui peuvent faciliter l'expansion *in vivo* des cellules NK. L'utilisation de l'IL-2 a présenté des limites en raison de sa capacité à faciliter l'expansion des Treg qui expriment de façon constitutive le récepteur de forte affinité IL-2R (CD25). Ces Treg peuvent inhiber en conséquence la prolifération des cellules NK (Moon et al., 2015). L'expansion *in vivo* des cellules NK avec l'IL-2 dans le contexte de greffes de CSH haplo-identiques avec Cyclophosphamide a été améliorée en administrant une protéine de fusion à base d'IL-2 et de toxine diphtérique pour induire la déplétion des Treg (Bachanova et al., 2014). Cette restauration de l'expansion des cellules NK *in vivo* était également associée à une amélioration de la survie des patients atteints de LAM (Bachanova et al., 2014). Une étude récente a réalisé le transfert adoptif de cellules NK haplo-identiques avec l'administration d'IL-15 recombinante humaine (rhIL-15), dans sa forme monomérique, chez des patients ayant développé une rechute à de LAM et après une déplétion des lymphocytes T par chimiothérapie, montrant des meilleurs taux d'expansion *in vivo* des cellules NK associés à une rémission des patients comparée aux études précédentes ayant utilisé l'IL-2 (Cooley et al., 2019).

5.2. Administration de cytokines pour renforcer l'alloréactivité des cellules NK

La greffe de CSH haplo-identiques peut être suivie d'une administration de cytokines dans le but d'augmenter la fonction anti-leucémique des cellules NK et prévenir en conséquence la rechute après greffe. L'une des approches utilise l'ALT-803, un complexe superagoniste conçu pour augmenter la demi-vie de l'IL-15 *in vivo* et mimer la trans-présentation physiologique de l'IL-15 (Romee et al., 2018). L'IL-15 induit préférentiellement

l'expansion des cellules NK et des lymphocytes T CD8⁺ via la trans-présentation par le récepteur IL-2/IL-15Rβγc tout en évitant la stimulation des Treg (Romee et al., 2018). Récemment, un essai clinique de phase 1 utilisant l'ALT-803 a montré une induction de réponses dans 19% des patients ayant développé une rechute suite à une greffe de CSH (Romee et al., 2018).

5.3. Exploitation des cellules NK mémoires en greffe de CSH

Au cours de l'infection à CMV humain, il y a une expansion clonale du pool des cellules NK CD56^{dim}CD57⁺NKG2C⁺. Chez des patients ayant reçu une greffe de CSH, la réactivation du CMV humain induit l'activation et la prolifération de cette sous-population cellulaire NK (Lopez-Vergès et al., 2011) (Foley et al., 2012). Ces cellules NK sont appelées cellules NK mémoires ou adaptatives car elles s'adaptent au pathogène viral et produisent une réponse plus puissante suite à une seconde exposition au même type de pathogène. Cette population NK mémoire est fortement cytotoxique et peut produire plus d'IFN-γ et de TNF-α suite à la reconnaissance des cellules cibles. Les études ont rapporté que la réactivation du virus CMV suite à une greffe allogénique de CSH était associée à une meilleure protection contre la rechute chez des patients atteints de leucémie (Green et al., 2013) (Cichocki et al., 2016). Cet effet protecteur était fortement corrélé avec une expansion des cellules NK mémoires (Cichocki et al., 2016). Ces sous-populations NK adaptatives présentent une survie plus longue, une résistance aux cellules suppressives d'origine myéloïdes (MDSC, Myeloid-Derived Suppressor Cells) et aux Treg, une expression plus faible des récepteurs de points de contrôle inhibiteurs et peuvent subir une expansion en réponse à une stimulation par l'IL-15 (Cichocki et al., 2017).

Les cytokines peuvent être utilisées pour induire le phénotype mémoire des cellules NK *in vitro*. La différenciation des cellules NK CD56^{dim} en cellules NK mémoires est induite avec l'IL-15, l'IL-12 et l'IL-18, et ces cellules NK mémoires présentent une augmentation des capacités de production de l'IFN- γ , de cytotoxicité et de prolifération. Ces cellules NK mémoires induites par des cytokines (CIML NK cells) étaient capables d'induire la rémission complète, sans toxicité, chez des patients atteints de LAM en rechute et réfractaires, lorsqu'elles étaient utilisées dans un protocole de transfert adoptif de cellules NK (Romee et al., 2016).

5.4. Infusion des CAR-NK cells

Les récepteurs d'antigènes chimériques (CAR, Chimeric Antigen Receptors) ont été transduits pour la première fois aux lymphocytes T effecteurs issus de patients atteints de tumeur dans le but d'améliorer leur réponse anti-tumorale. Les récepteurs CAR sont composés d'un domaine extracellulaire capable de reconnaître un antigène tumoral et d'un domaine intracellulaire capable d'induire un signal d'activation aux lymphocytes T effecteurs. Les récentes générations de CAR peuvent contenir plusieurs domaines de co-stimulation intracellulaires. Certains CAR peuvent contenir des domaines de co-stimulation, composés de CD28 et de CD137/4-1BB capables d'induire une activation persistante des lymphocytes T et sont utilisés dans plusieurs essais cliniques. Pour interagir avec un antigène associé à une tumeur (TAA), les CAR disposent d'un domaine extracellulaire composé d'une chaîne unique variable dérivée d'un anticorps (ScFv, single-chain variable) spécifique de l'antigène ciblé. Les CAR-CD19 des cellules T (CAR-T CD19) par exemple sont composés de la chaîne unique variable dérivée de l'anticorps anti-CD19 et sont utilisés pour traiter les patients atteints de lymphomes B ou de LAL (Giuliani and Poggi, 2020). Ces cellules CAR-T sont des cellules effectrices équipées pour migrer sur le site tumoral, capable de résister à

l'immunosuppression du microenvironnement tumoral et sont prêtes à tuer les cellules tumorales (Batlevi et al., 2016) (Dai et al., 2016) (Maude et al., 2015) (Rezvani et al., 2017) (Weber et al., 2020).

L'approche de transduction des CAR a été également appliquée aux cellules NK pour augmenter leur potentiel de cytotoxicité contre les cellules tumorales. Les CAR-NK représentent une stratégie intéressante dans l'immunothérapie basée sur les cellules NK. En effet, les CAR-NK ne requièrent pas la présence d'une compatibilité HLA pour générer une réponse cytotoxique efficace et peuvent être utilisées dans des contextes allogéniques sans provoquer de GvHD, représentant un système valable pour la génération de produits en masse pour un usage clinique. Les cellules NK expriment les récepteurs activateurs tels que les NCR, NKG2D, DNAM-1 et 2B4, qui peuvent être engagés de manière synergique indépendamment du récepteur CAR, favorisant ainsi une forte activité cytotoxique des cellules NK. De plus, grâce à l'expression du récepteur CD16, l'induction de l'ADCC par des anticorps monoclonaux représente un mécanisme additionnel de l'activité cytotoxique des NK pouvant être utilisé en synergie avec l'activité anti-tumorale médiée par les récepteurs CAR. Les sources des CAR-NK comprennent les lignées cellulaires NK telles que NK-92, les cellules NK issues du sang de cordon ombilical, du sang périphérique et plus récemment des iPSC. Une étude réalisée en 2013 par Laurent Boissel et ses collègues (Boissel et al., 2013) a montré que les lignées NK-92 exprimant les CAR présentaient des réponses cytotoxiques significativement élevées contre les cellules primaires de LLC résistantes par rapport à l'ADCC induite par des anticorps monoclonaux (rituximab ou ofatumumab) montrant le bénéfice d'une stratégie CAR-NK par rapport à une stratégie NK associée à des anticorps monoclonaux induisant l'ADCC.

Les donneurs haplo-identiques de CSH représentent une source de cellules post-transplantation rapidement disponibles pour les cellules CAR-NK. Elles sont utilisées en cas

de rechute de la leucémie après la greffe. L'utilisation des CAR-NK peut être bénéfique lorsqu'il y a un degré élevé d'incompatibilités HLA (Tang et al., 2018). Les études précliniques ont montré que les CAR-NK spécifiques du CD19 et du CD20 présentaient une activité cytotoxique élevée avec une forte production de cytokines conduisant à une activité anti-tumorale élevée dans le contexte des lymphomes et des LLC (Boissel et al., 2013). Le développement des CAR-NK surexprimant le NKG2D combiné avec une expression de plusieurs récepteurs de co-stimulation comme DNAM-1, 4-1BB et CD28 ont été développés pour augmenter les capacités anti-tumorales dans le contexte de tumeurs ayant induit la diminution du NKG2D pour échapper au contrôle par les cellules NK (Rezvani et al., 2017) (Demoulin et al., 2017) (Glienke et al., 2015).

5.5. Ciblage des points de contrôle inhibiteurs pour améliorer l'effet GvL

Les cellules NK peuvent présenter un état « exhausted » ou altéré de leurs fonctions effectrices dans le contexte tumoral ou infectieux. Le phénotype « exhausted » des cellules NK est caractérisé par l'expression des points de contrôle inhibiteurs (NKG2A, PD-1, TIM-3) et la diminution de l'expression des récepteurs activateurs NK (NKG2D, NKp46, NKp30, DNAM-1, 2B4 et CD16) induite par les facteurs solubles relargés dans le microenvironnement tumoral par les cellules tumorales, les Treg, les MDSC, les macrophages et les fibroblastes. Ce phénotype altéré des cellules NK est associé à une altération de l'activité cytotoxique anti-tumorale des NK et à une diminution de la production d'IFN- γ . Les cellules NK infiltrant les tumeurs, isolées des patients atteints de différents types de cancers, produisaient faiblement l'IFN- γ , le CD107a, les granzymes B et la perforine, et présentaient une activité cytolytique altérée par rapport aux cellules NK de la région péri-tumorale ou du sang périphérique. Les fonctions effectrices anti-tumorales des cellules NK peuvent être

restaurées par les anticorps monoclonaux qui ciblent des points de contrôle inhibiteurs (Bi and Tian, 2017).

Dans les hémopathies malignes, les cellules tumorales peuvent développer des mécanismes d'échappement à la reconnaissance par les cellules NK. Certains de ces mécanismes décrits dans le contexte de greffes de CSH haplo-identiques chez des patients atteints de LAM en rechute (Zeiser and Vago, 2019) sont représentés par l'expression des ligands des points de contrôle inhibiteurs à la surface des cellules tumorales (PDL-1, B7-H3 ou CTLA-4, et HLA-E) et la perte d'hétérozygotie génomique pour l'haplotype HLA de classe I du receveur incompatible avec celui du donneur. L'interaction des récepteurs inhibiteurs NK avec ces ligands peut affecter les réponses anti-tumorales des cellules NK. Les immunothérapies à base d'anticorps monoclonaux sont des approches qui permettent de bloquer l'engagement de ces ligands avec leurs récepteurs NK, dans le but de cibler le microenvironnement tumoral et de restaurer les fonctions des cellules NK (Chiossone et al., 2017) (Dempke et al., 2017). La perte d'hétérozygotie de l'haplotype HLA de classe I du receveur a pour conséquence le maintien de l'expression des ligands HLA du receveur compatibles avec ceux du donneur à la surface des cellules leucémiques, ce qui conduit à l'inhibition des fonctions effectrices des cellules NK via la reconnaissance de ces ligands HLA par les KIR inhibiteurs (Vago et al., 2009). Pour améliorer les fonctions anti-leucémiques des cellules NK, plusieurs stratégies à base d'anticorps monoclonaux ont été développées pour bloquer les récepteurs KIR. Le blocage des KIR avec le 1-7F9 (IPH2101), un anticorps anti-pan-KIR qui interagit avec les KIR2DL1, KIR2DL2 et KIR2DL3 exprimés par les cellules NK, augmente fortement la cytotoxicité des cellules NK contre les cellules tumorales chez des patients atteints de LAM, de lymphomes et de myélomes multiples (MM) (Benson et al., 2011) (Benson et al., 2015) (Carlsten et al., 2016) (Romagné et al., 2009). D'autres anticorps monoclonaux anti-KIR représentés par le Lirilumab (IPH2102) et

l'IPH4102 qui reconnaissent respectivement les KIR2DL1 et KIR2DL2/3, et le KIR3DL2 permettent une augmentation des fonctions de cytotoxicité de cellules NK contre les tumeurs malignes (Kohrt et al., 2014). La molécule HLA-E, ligand du NKG2A, est fortement exprimée par les cellules tumorales chez des patients atteints de myélomes multiples (Sarkar et al., 2015). Le Monalizumab, spécifique du NKG2A, a été développé pour bloquer les interactions entre le NKG2A et son ligand HLA-E dans le but de restaurer les fonctions anti-tumorales des cellules NK (Sandoval-Borrego et al., 2016) (Fang et al., 2017) (Mahaweni et al., 2018) (McWilliams et al., 2016) (van Hall et al., 2019). Les anticorps monoclonaux initialement développés pour bloquer PD-1 et son ligand PDL-1 afin d'augmenter les fonctions des lymphocytes T, sont également utilisés pour améliorer les capacités anti-tumorales des cellules NK. Les récepteurs NK comme TIGIT, LAG3 et TIM-3 sont des points de contrôle inhibiteurs également ciblés en immunothérapie anti-cancéreuse (Anderson et al., 2016).

5.6. Exploitation de l'ADCC avec les anticorps monoclonaux, les BiKE et les TriKE

Plusieurs anticorps monoclonaux spécifiques des antigènes associés aux tumeurs, capables d'induire la fonction ADCC des cellules NK, sont utilisés comme traitements standards dans le contexte des tumeurs solides et des hémopathies malignes (Kohrt et al., 2012) (Chester et al., 2015). L'ADCC induite par les cellules NK avait été rapportée dans les études cliniques utilisant le rituximab, un anticorps monoclonal anti-CD20, pour le traitement des lymphomes Non-Hodgkiniens (Alderson and Sondel, 2011) (Becker et al., 2016). Par ailleurs, il avait également été montré, par des expériences *in vitro*, que l'élimination des cellules tumorales de lymphome B induite par le rituximab pouvait dépendre d'autres mécanismes d'action tels que la phagocytose dépendante de l'anticorps, le mécanisme de

CDC (Complement-Dependent Cytotoxicity) et l'apoptose induite par le CD20 (Manches et al., 2003). L'efficacité des réponses ADCC induites par le rituximab dépend du polymorphisme du récepteur CD16. Les cellules NK expriment deux allotypes du récepteur CD16 dont le polymorphisme réside au niveau de l'acide aminé situé en position 158 de la protéine. Cet acide aminé peut être une valine, ce qui correspond à l'allèle V ou une Phénylalanine, ce qui correspond à l'allèle F.

Ce polymorphisme définit donc 3 groupes d'individus de phénotype homozygotes FcγRIIIa-158F/F ou V/V et hétérozygote V/F, dont la répartition dans la population caucasienne est respectivement de 35 %, 15 % et 55% (Congy-Jolivet et al., 2008). Les allotypes CD16 158VV et 158VF présentent une meilleure affinité pour le fragment Fc du rituximab comparée aux allotypes CD16 158FF (Congy-Jolivet et al., 2008). Pour les lymphomes Non-Hodgkiniens, la démonstration de l'influence du polymorphisme de CD16 dans le traitement en monothérapie du lymphome folliculaire a constitué le premier argument en faveur d'un rôle possible de l'ADCC dans l'efficacité des anticorps thérapeutiques (Cartron et al., 2002). Afin d'optimiser l'activité ADCC, des anticorps avec une partie Fc modifiée en particulier faiblement fucosylée ont été développés pour augmenter leur affinité avec le CD16. Ainsi, l'Obinutuzumab est un anti-CD20 dont le Fc est non fucosylé et pour lequel son utilisation en clinique a montré des meilleures réponses chez des patients atteints de LLC et de lymphome folliculaire (Hoster and Pott, 2016) (Ochoa et al., 2017a) (Mössner et al., 2010). La fonction ADCC a été également exploitée en clinique pour le traitement des myélomes multiples (MM) avec le daratumumab (anti-CD38), des métastases dans les cancers du sein avec le trastuzumab (l'herceptin, anti-HER2) (Daldrup-Link et al., 2005) (Becker et al., 2016) et du cancer colorectal métastatique ou du carcinome épidermoïde de la tête et du cou avec le cetuximab, un anti-EGFR (Monteverde et al., 2015) (Becker et al., 2016). Les

réponses ADCC peuvent également être renforcées par les cytokines IL-2, IL-12, IL-15 et IL-21 (Ochoa et al., 2017).

Les anticorps bi-spécifiques ou BiKE (Bi-Specific Killer Engagers) sont des protéines génétiquement modifiées qui reconnaissent simultanément deux antigènes différents : l'un est antigène cible exprimé à la surface des cellules tumorales et l'autre est un récepteur activateur exprimé à la surface des cellules NK tel que le CD16 conduisant à l'ADCC (Felices et al., 2016) (Tay et al., 2016). Les études *in vitro* ont montré que les BiKE CD16xCD33 augmentent la cytotoxicité des cellules NK et la production de cytokines en présence des cellules tumorales de LAM (Gleason et al., 2012) et de MDS (Syndrome Myélodysplasique) (Gleason et al., 2012) (Gleason et al., 2014). D'autres BiKE sont représentés par les CD16xCD19 et CD16xCD133 dont l'engagement avec les antigènes cibles stimule l'activation des cellules NK, respectivement, contre les cellules tumorales CD19⁺ et CD133⁺ (Giuliani and Poggi, 2020). Récemment, plusieurs TriKE (Tri-Specific Killer Engagers) ont été également développés pour booster la fonction des cellules NK (Felices et al., 2016) (Tay et al., 2016) (Gleason et al., 2014). Les TriKE fonctionnent de la même façon que les BiKE. En effet, les TriKE sont des anticorps tri-spécifiques qui se fixent sur le CD16 à la surface des cellules NK et reconnaissent deux antigènes différents exprimés à la surface des cellules cibles. Cette interaction peut conduire à la génération d'une synapse immunologique puissante entre la cellule effectrice et la cellule tumorale. Il a été montré que les TriKE CD16xCD19xCD22 ou CD16xCD33xIL-15 pouvaient stimuler l'activation des cellules NK, l'ADCC et la production de cytokines conduisant à l'activation de la voie perforine/granzyme dirigée contre les LAL-B et les LAM (Carlsten and Childs, 2015) (Vallera et al., 2016). Les TriKE CD16xCD20xCD20 peuvent déclencher une activation puissante de l'ADCC des cellules NK contre les cellules de tumeurs malignes à cellules B (Glorius et al., 2013).

OBJECTIFS DES TRAVAUX DE THESE

Dans le cadre de cette thèse, nous avons mené des études expérimentales et cliniques qui exploitent la fonction de cytotoxicité naturelle des cellules NK en greffe de cellules souches hématopoïétiques (CSH) et la fonction de cytotoxicité cellulaire dépendante de l'anticorps (ADCC) dans le contexte des immunothérapies à base d'anticorps monoclonaux.

Dans le premier volet de cette thèse, nous avons étudié, d'une part, la reconstitution des cellules NK après greffe de CSH haplo-identiques non-T déplétées et leur rôle dans l'effet GvL après greffe. D'autre part, nous avons réalisé des études *in vitro* du potentiel anti-leucémique des cellules NK à partir de cellules NK issues d'individus sains, de lignées leucémiques et de cellules primaires issues de patients atteints de leucémies myéloïdes et lymphoïdes aiguës.

La greffe de CSH haplo-identiques est devenue de nos jours un des traitements curatifs pour des hémopathies malignes, en particulier contre les LAM et les LAL en l'absence de donneur apparenté ou non-apparenté HLA identique. C'est une approche de thérapie cellulaire qui consiste à administrer chez un patient, les CSH de la moelle osseuse ou du sang périphérique (PBSC, Peripheral Blood Stem Cells) provenant d'un donneur apparenté qui partage un haplotype HLA commun avec celui du receveur (Khaddour et al., 2020). Pour des patients n'ayant pas de donneurs HLA compatibles apparentés ou non-apparentés, cette alternative est une option thérapeutique intéressante puisqu'il est possible d'identifier un ou plusieurs donneurs haplo-identiques dans la fratrie, les parents et les enfants, mais également les parents collatéraux (Nguyen et al., 2016). Ces donneurs sont disponibles dans plus de 95% des cas et sont généralement motivés à donner leur greffon de CSH le plus rapidement possible à un membre de la famille malade (Fuchs, 2012). De plus, cette approche est moins coûteuse. En raison de l'utilisation d'un greffon non-T déplété et de l'administration de PTCy à forte dose comme traitement immunosuppresseur prophylactique de la GvHD aiguë, les greffes de CSH haplo-identiques sont en augmentation depuis 2012 en France. Si les réactions

du greffon contre l'hôte (GvH) restent de grade limité, les rechutes constituent un problème majeur post-greffes de CSH haplo-identiques non-T déplétées avec PTCy à forte dose. Ces greffes présentent des incompatibilités HLA de classe I entre le donneur et le receveur, propices aux alloréactivités des cellules NK dont le rôle anti-leucémique est important. La fonction effectrice des cellules NK est régulée par les récepteurs inhibiteurs spécifiques des molécules HLA de classe I comme les récepteurs KIR. La reconnaissance de ces ligands HLA par les récepteurs inhibiteurs KIR inhibe l'activité cytotoxique des cellules NK dans les conditions physiologiques. L'absence d'expression des molécules HLA de classe I à la surface des cellules leucémiques conduit à l'activation de la cytotoxicité des cellules NK et à l'élimination de ces cellules leucémiques. Dans le contexte des greffes de CSH haplo-identiques, les cellules NK du donneur peuvent exprimer des récepteurs KIR pour lesquels les ligands HLA sont absents chez le receveur. Ce modèle prédictif de l'alloréactivité des cellules NK basé sur les incompatibilités KIR/HLA entre le donneur et le receveur est de plus en plus utilisé en greffes allogéniques de CSH. Ainsi, les incompatibilités KIR/HLA contribuent à l'effet GvL, réduisant le risque de rechute dans le contexte des greffes allogéniques de CSH (Glass et al., 1996). Les cellules NK sont les premiers effecteurs cellulaires à reconstituer le système immunitaire après greffe de CSH et peuvent contribuer à l'effet GvL dans le contexte des greffes de CSH haplo-identiques non-T déplétées avec PTCy. Jusqu'à présent, peu d'études ont montré l'effet bénéfique des incompatibilités KIR/HLA dans le cadre des greffes de CSH haplo-identiques non-T déplétées à conditionnement myéloablatif (MAC) avec l'utilisation ou non de CSH provenant de la moelle osseuse comme source de greffon (Symons et al., 2010) (Shimoni et al., 2019) (Russo et al., 2018).

Le conditionnement MAC ou d'intensité réduite (RIC) ainsi que la source de greffon (moelle osseuse et cellules souches périphériques) sont des paramètres qui peuvent impacter la reconstitution immunitaire NK, le phénotype et la fonction des cellules NK après greffe de

CSH. L'hétérogénéité des protocoles de greffe de CSH ne permet pas dans certaines circonstances de mettre en évidence l'effet bénéfique des incompatibilités KIR/HLA sur l'effet GvL après greffe de CSH haplo-identiques non-T déplétées. C'est dans ce contexte que nous avons évalué, de manière rétrospective, l'impact des incompatibilités KIR/HLA sur le devenir clinique des greffes de CSH haplo-identiques à partir d'une cohorte homogène de 51 paires donneurs/receveurs en collaboration avec le service d'Hématologie clinique du CHU de Nantes (Pr. Patrice Chevallier, Dr. Thierry Guillaume) (**Article n°1**).

La perte de cellules NK KIR⁺ alloréactives avec le Cyclophosphamide observée dans cette première étude a soulevé la question de la nature des sous-populations cellulaires NK impliquées dans l'effet GvL après greffe de CSH haplo-identiques non-T déplétées. Ainsi, nous avons réalisé une étude *in vitro* du rôle anti-leucémique des sous-populations NK à partir d'une cohorte de donneurs de sang de l'EFS (n=68) au regard des paramètres immunogénétiques KIR/HLA et du statut CMV de ces donneurs qui concourent à la formation structurelle et fonctionnelle du répertoire des cellules NK (**Article n°2**). Dans le but d'identifier les sous-populations NK à forte potentialité anti-leucémique, nous avons défini 9 sous-populations NK sur la base des marqueurs de différenciation NKG2A, KIR, CD57 et NKG2C. Le potentiel fonctionnel de ces 9 sous-populations NK issues des PBMC de donneurs sains a été évalué *in vitro* contre un panel de lignées de LAL et de LAM et de cellules leucémiques primaires en prenant en compte les paramètres immunogénétiques KIR, l'environnement HLA de classe I et le statut CMV. Nous avons également évalué l'implication des récepteurs activateurs NKG2D, DNAM-1, 2B4, NKp46 et NKp30 sur la fonction anti-leucémique des cellules NK.

Afin de réduire les incidences élevées de GvHD aigüe, observées dans le cadre des greffes de CSH haplo-identiques à conditionnement RIC, réalisées à partir des greffons de PBSC non-T déplétés avec PTCy à fortes doses (**Article n°1**), nous avons évalué, en

collaboration étroite avec les cliniciens du CHU de Nantes, l'influence de la combinaison PTCy + ATG (anti-thymoglobuline) versus PTCy seul sur le devenir clinique des greffes de CSH haplo-identiques en termes d'incidence de GvHD et de rechute (**Article n°3**). Sur le plan immunologique, nous avons évalué l'impact de la combinaison PTCy + ATG sur la reconstitution immunitaire des lymphocytes T et des cellules NK. Le répertoire des cellules NK a été défini sur la base des marqueurs de maturation NKG2A, KIR, CD57 et NKG2C. Enfin, nous avons étudié la distribution des 9 sous-populations NK établies sur la base des marqueurs sélectionnés au cours de la reconstitution immunitaire.

De nombreux patients sont suivis au service d'hématologie adulte du CHU de Nantes pour le traitement de lymphome B souvent diagnostiqué après une greffe de CSH. La thérapie privilégiée est l'administration de rituximab en combinaison avec des chimiothérapies. La fonction d'ADCC des cellules NK est largement exploitée en clinique comme l'un des mécanismes d'action pour l'immunothérapie anti-cancéreuse induite par le rituximab, anticorps monoclonal qui cible le CD20 exprimé par les lymphocytes B. L'inhibition des réponses ADCC des cellules NK via les interactions entre les récepteurs KIR inhibiteurs avec leurs ligands HLA de classe I est associée à la résistance de cancers au rituximab. Le but de ce deuxième volet de ma thèse a donc été d'explorer la fonction ADCC des cellules NK, en prenant en compte l'influence des différents polymorphismes KIR, HLA de classe I et CD16. Pour ce faire, nous avons évalué l'impact des interactions KIR/HLA et du polymorphisme CD16 sur la dégranulation de cellules NK dépendante du rituximab sur un modèle cellulaire *in vitro* de cellules B-EBV CD20⁺, HLA de classe I homozygotes. Pour conforter et confronter nos données obtenues *in vitro*, nous avons étudié en parallèle l'influence de l'environnement HLA de classe I, des génotypes KIR et CD16 sur les réponses au rituximab à partir d'une cohorte de 74 patients atteints de lymphomes Non-Hodgkiniens (NHL) (**Article n°4**).

RESULTATS

RESULTATS

ARTICLE N°1: Impact of KIR/HLA Incompatibilities on NK Cell Reconstitution and Clinical Outcome after T Cell–Replete Haploidentical Hematopoietic Stem Cell Transplantation with Posttransplant Cyclophosphamide

Catherine Willem, **Dhon Roméo Makanga**, Thierry Guillaume, Bercelin Maniangou, Nolwenn Legrand, Katia Gagne, Pierre Peterlin, Alice Garnier, Marie C. Béné, Anne Cesbron, Amandine Le Bourgeois, Patrice Chevallier and Christelle Retière.

The Journal of Immunology, **2019**, 202 : 2141 – 2152.

La greffe allogénique de cellules souches hématopoiétiques (HSCT) constitue un traitement curatif potentiel pour de nombreuses hémopathies malignes. En l'absence d'un donneur apparenté HLA 10/10 identique, l'une des difficultés les plus importantes liées à cette thérapie est de trouver un donneur non-apparenté HLA identique 10/10 en raison d'un polymorphisme large des gènes d'histocompatibilité. Dans ce contexte, un donneur familial HLA haplo-identique peut être le candidat le plus facile à identifier et rapidement disponible parmi les parents, les descendants, les frères et sœurs. Cependant, la principale limitation de cette modalité de greffe a toujours été le risque élevé d'échec de greffe et de la survenue de la maladie du greffon contre l'hôte (GvHD) en raison des lymphocytes T alloréactifs du donneur qui reconnaissent les complexes HLA/peptides chez le receveur comme étrangers au soi (Anasetti et al., 1989). Depuis quelques années, les médecins greffeurs ont réalisé avec succès des greffes de CSH haplo-identiques à partir de donneurs familiaux en utilisant le PTCy comme traitement immunosuppresseur pour la prévention de la survenue de la GvHD aigüe après greffe (Luznik et al., 2008). Le rôle bénéfique de l'alloréactivité des cellules NK, en terme de réduction de rechute chez des patients atteints de LAM, a été mis en évidence initialement dans le contexte des greffes de CSH haplo-identiques fortement T-déplétées (Ruggeri et al., 2002). Les incompatibilités KIR/HLA entre le donneur et le receveur, dans le cadre des greffes de CSH haplo-identiques, favorisent l'alloréactivité des cellules NK et peuvent contribuer à l'effet GvL après greffe (Glass et al., 1996). Cependant, peu d'études ont rapporté jusqu'à présent l'effet bénéfique des incompatibilités KIR/HLA sur le devenir clinique des greffes de CSH haplo-identiques non-T déplétées avec le PTCy. Dans ces études, le conditionnement était myéloablatif (MAC) avec l'utilisation ou non des cellules souches de la moelle osseuse comme sources de greffons (Symons et al., 2010a) (Shimoni et al., 2019) (Russo et al., 2018).

Dans notre étude rétrospective, l'impact des incompatibilités KIR/HLA sur le devenir clinique et sur la reconstitution des cellules NK a été évalué sur une cohorte de 51 patients consécutifs recevant une greffe de CSH haplo-identiques non-T déplétées après un conditionnement d'intensité réduite (RIC) avec l'utilisation des cellules souches du sang périphérique (PBSC) comme sources de greffon et le PTCy comme traitement prophylactique de la GvHD. Des échantillons sanguins de tous les patients ont été prélevés trois fois par semaine de J0 à J30, puis à J60 et J90/J100 afin d'analyser la reconstitution des cellules NK par cytométrie en flux multicolore chez 34 de ces 51 patients après greffe.

Pour étudier l'impact des incompatibilités KIR/HLA sur le devenir clinique après greffe de CSH haplo-identiques de PBSC non-T déplétées avec PTCy, nous avons déterminé les profils génétiques KIR et HLA des 51 paires donneurs/receveurs inclus dans cette étude. Les incompatibilités étaient définies par la présence des gènes KIR inhibiteurs (KIR2DL1, KIR2DL2/3 et KIR3DL1) chez le donneur et par l'absence des ligands HLA de classe I correspondants chez le receveur (C1, C2 et Bw4). Le groupe de patients avec des incompatibilités KIR/HLA présentait de fortes incidences de GvHD aigüe comparées à celles observées dans le groupe de patients n'ayant pas ces incompatibilités KIR/HLA (72,7% versus 45%, $p=0,04$). Les fortes incidences de GvHD observées en présence des incompatibilités KIR/HLA étaient accompagnées de plus faibles taux de rechute qu'en absence de ces incompatibilités (13,6% versus 45%, $p=0,04$). En se focalisant spécifiquement sur les incompatibilités génétiques KIR2DL (KIR2DL1 et KIR2DL2/3)/HLA-C, nous avons montré que ces incompatibilités KIR2DL/HLA étaient significativement associées à plus de GvHD aigüe (81,2% versus 45,7%, $p=0,01$) et moins de rechute (6,2% versus 42,8%, $p=0,008$) dans ce contexte.

L'expression des marqueurs NK (KIR, NKG2A, CD57, NKp46, 2B4, NKG2D et DNAM-1) a été analysée par cytométrie en flux multiparamétrique au cours de la

reconstitution immunitaire du répertoire des cellules NK post-greffe. Le profil immature des cellules NK est défini par le phénotype NKp46⁻ 2B4⁺ et le profil mature des cellules NK est défini par le phénotype NKG2A⁺ et CD57⁺. Le phénotype activé des cellules NK est défini par l'expression des marqueurs activateurs 2B4, NKG2D et DNAM-1 à la surface des cellules NK NKp46⁺. L'analyse de la reconstitution du répertoire des cellules NK a montré que les incompatibilités KIR/HLA sont associées à des fréquences élevées de cellules NK différenciées et activées, accompagnées d'incidence élevée de GvHD aiguë et moins de rechute (Figure 16). Par ailleurs, nous avons observé une perte significative des cellules NK KIR2DL2/3⁺ à J30 chez des patients avec des incompatibilités KIR/HLA, suggérant que les cellules NK alloréactives étaient particulièrement ciblées par le traitement immunosuppresseur à base de PTCy. Cependant, ces travaux ne nous ont pas permis d'identifier les sous-populations NK les plus efficaces contre les leucémies aiguës myéloïdes ou lymphoïdes. Une meilleure connaissance de ces sous-populations NK est nécessaire pour une meilleure sélection des donneurs de CSH.

Au regard de ces résultats, cette étude doit être poursuivie à partir d'une plus grande cohorte avec une approche clinique identique pour consolider ou non ces résultats et identifier les sous-populations de cellules NK qui peuvent être bénéfiques dans l'effet GvL observé. Etant donné que plusieurs donneurs haplo-identiques peuvent être identifiés dans une même famille, la prédiction de l'alloréactivité des cellules NK KIR⁺ pourrait être d'une importance cruciale pour la sélection des donneurs de CSH et le devenir clinique des patients.

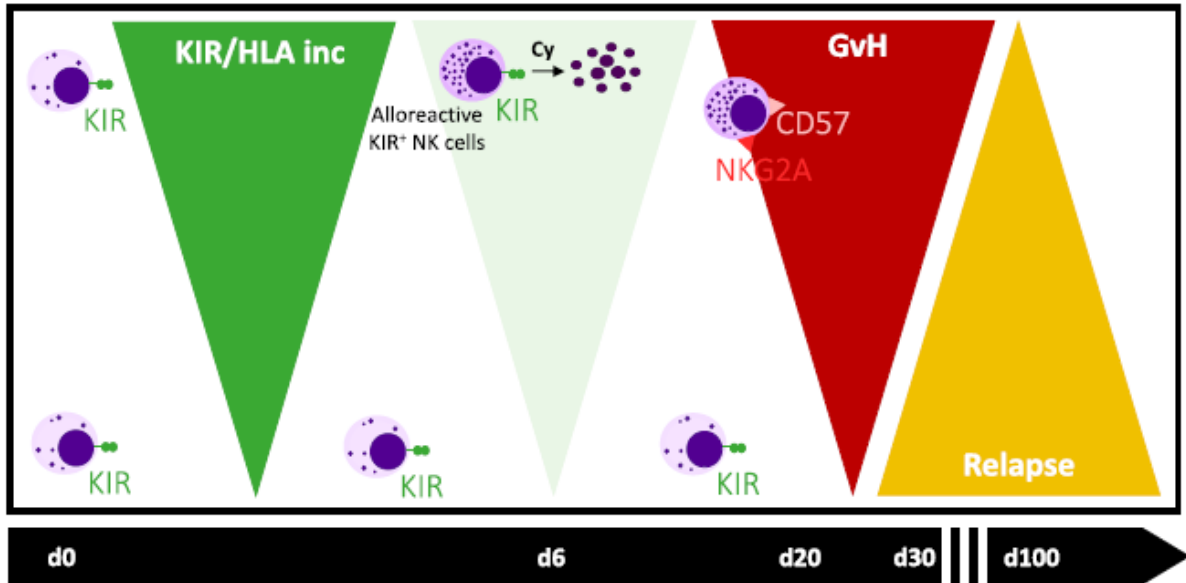


Figure 16 : Impact des incompatibilités KIR/HLA sur la GvHD et la rechute après greffes de CSH haplo-identiques non T-déplétées avec PTCy.

Les incompatibilités KIR/HLA favorisent l'activation et la prolifération des cellules NK alloréactives, qui sont rapidement ciblées par le PTCy. Ce contexte activé semble favoriser la différenciation et l'activation des cellules NK qui sont associées à la GvHD avec les rechutes limitées. En parallèle, en l'absence d'incompatibilités KIR/HLA, les cellules NK KIR quiescentes ne sont pas éliminées par le PTCy et ne sont pas efficaces pour limiter la rechute.

BULK ANTIBODIES
for *in vivo*
RESEARCH

α-PD-1 **α-PD-L1** **α-4-1BB** **α-CTLA4** **α-LAG3**

Discover More

BioCell



Impact of KIR/HLA Incompatibilities on NK Cell Reconstitution and Clinical Outcome after T Cell-Replete Haploidentical Hematopoietic Stem Cell Transplantation with Posttransplant Cyclophosphamide

This information is current as of February 28, 2020.

Catherine Willem, Dhon Roméo Makanga, Thierry Guillaume, Bercein Maniangou, Nolwenn Legrand, Katia Gagne, Pierre Peterlin, Alice Garnier, Marie C. Béné, Anne Cesbron, Amandine Le Bourgeois, Patrice Chevallier and Christelle Retière

J Immunol 2019; 202:2141-2152; Prepublished online 20 February 2019;
doi: 10.4049/jimmunol.1801489
<http://www.jimmunol.org/content/202/7/2141>

References This article **cites 38 articles**, 17 of which you can access for free at:
<http://www.jimmunol.org/content/202/7/2141.full#ref-list-1>

Why *The JI*? [Submit online.](#)

- **Rapid Reviews! 30 days*** from submission to initial decision
- **No Triage!** Every submission reviewed by practicing scientists
- **Fast Publication!** 4 weeks from acceptance to publication

**average*

Subscription Information about subscribing to *The Journal of Immunology* is online at:
<http://jimmunol.org/subscription>

Permissions Submit copyright permission requests at:
<http://www.aai.org/About/Publications/JI/copyright.html>

Email Alerts Receive free email-alerts when new articles cite this article. Sign up at:
<http://jimmunol.org/alerts>



Impact of KIR/HLA Incompatibilities on NK Cell Reconstitution and Clinical Outcome after T Cell–Replete Haploidentical Hematopoietic Stem Cell Transplantation with Posttransplant Cyclophosphamide

Catherine Willem,^{*,†,‡} Dhon Roméo Makanga,^{*,†,‡} Thierry Guillaume,^{†,‡,§} Bercein Maniangou,^{*,†,‡} Nolwenn Legrand,^{*,†,‡} Katia Gagne,^{*,†,‡,¶} Pierre Peterlin,[§] Alice Garnier,[§] Marie C. Béné,^{†,‡,||} Anne Cesbron,^{*,¶} Amandine Le Bourgeois,[§] Patrice Chevallier,^{†,‡,§,1} and Christelle Retière^{*,†,‡,1}

Little is known regarding the effect of KIR/HLA incompatibilities (inc.) in the setting of T-replete haploidentical allogeneic hematopoietic stem cell transplantation using posttransplant cyclophosphamide (PTCy). In this retrospective study, the impact of KIR/HLA inc. on clinical outcomes and NK cell reconstitution was studied in a cohort of 51 consecutive patients receiving a T cell–replete haploidentical allogeneic hematopoietic stem cell transplantation after a reduced-intensity conditioning using peripheral blood stem cells as the source of the graft and PTCy as graft-versus-host disease (GvHD) prophylaxis. The NK cell repertoire reconstitution was examined by multiparameter flow cytometry in 34 of these 51 patients from day 0 to day 100 post-transplant. Genetic KIR2DL/HLA inc. were found to be significantly associated with more GvHD (81.2 versus 45.7%, $p = 0.01$) and less relapse (6.2 versus 42.8%, $p = 0.008$) in this context. GvHD is associated with increased levels of differentiated and activated NK cells. A significant loss of KIR2DL2/3⁺ NK cells was observed at day 30 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. *The Journal of Immunology*, 2019, 202: 2141–2152.

Allogeneic hematopoietic stem cell transplantation (HSCT) constitutes a potential curative treatment for many hematologic malignancies. In the absence of a matched sibling donor, one of the most important difficulties linked to this therapy is to find a suitable 10/10, unrelated, HLA-identical donor, because of the broad polymorphism of histocompatibility genes. In this context, an HLA-haploidentical family donor is thus the easiest candidate to identify and can be promptly available among parents, offspring, and nonidentical 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

(1). In the 1990s, complete T cell depletion by in vitro selection of CD34⁺ cells from the graft was proved to be effective to prevent GvHD (2). However, this came at the price of an unacceptably high incidence of relapse. Moreover, T cell depletion led to a profound and prolonged posttransplant immunodeficiency and high mortality due to infections (3). It was also in this context of T cell–depleted haploidentical HSCT that Ruggeri et al. (4) showed for the first time the benefit, in terms of less relapse, of NK cell alloreactivity. The killer cell Ig-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 cells. Failure to establish the KIR/HLA link provides NK cells with the ability to destroy damaged

*Etablissement Français du Sang, 44011 Nantes Cedex 01, France; †Centre de Recherche en Cancérologie et Immunologie Nantes-Angers, INSERM, CNRS, Université d'Angers, Université de Nantes, 44000 Nantes, France; ‡LabEX IGO, 44000 Nantes, France; §Hematology Clinic, Centre Hospitalier Universitaire, 44000 Nantes, France; ¶LabEX Transplant, Université de Strasbourg, 67000 Strasbourg, France; and ||Hematology Biology, Centre Hospitalier Universitaire, 44000 Nantes, France

¹P.C. and C.R. have equally contributed to this work.

ORCID: 0000-0001-5482-8565 (T.G.); 0000-0002-8081-0462 (B.M.); 0000-0002-6569-7414 (M.C.B.); 0000-0002-1201-3429 (A.C.); 0000-0001-5943-6990 (C.R.).

Received for publication November 6, 2018. Accepted for publication January 18, 2019.

This work was supported by the Etablissement Français du Sang/Centre Pays de la Loire and by grants from the International Research Group on Unrelated Hematopoietic Stem Cell Transplantation, la Ligue contre le Cancer, le DHU Oncogreff, Leucémie Espoir Atlantique Famille, l'Agence de Biomédecine, and Nantes Atlantique Greffe de Moelle Osseuse. D.R.M. and B.M. are Ph.D. students supported by Industrial Agreement

for Training through Research Grants 481/2015 and 2017/0850, respectively. This work was realized in the context of the LabEX IGO program (Grant ANR-11-LABX-0016-01) funded by the Investissements d'Avenir, French Government program, managed by the French National Research Agency (ANR).

Address correspondence and reprint requests to Dr. Christelle Retière, Etablissement Français du Sang-Pays de la Loire, 34 Boulevard Jean Monnet, 44011 Nantes Cedex 01, France. E-mail address: christelle.retiere@efs.sante.fr

Abbreviations used in this article: 221, HLA class I-deficient 721.221; CD56^{int}, CD56 intermediate; CI, confidence interval; DFS, disease-free survival; D/R, donor/recipient; GvHD, graft-versus-host disease; GvL, graft-versus-leukemia; HSCT, hematopoietic stem cell transplantation; inc., incompatibility; inh., inhibitory; KIR, killer cell Ig-like receptor; MAC, myeloablative conditioning; MFC, multiparameter flow cytometry; OS, overall survival; PBSC, peripheral blood stem cell; PTCy, posttransplant cyclophosphamide; RIC, reduced-intensity conditioning.

Copyright © 2019 by The American Association of Immunologists, Inc. 0022-1767/19/\$37.50

or allogeneic nucleated cells (5). Thus, KIR/HLA incompatibilities (inc.) can contribute to the so-called graft-versus-leukemia (GvL) effect, reducing the risk of relapse after HSCT (6).

For the last few years, transplant physicians have been performing successful HSCT from haploidentical family donors using high doses of posttransplant cyclophosphamide (PTCy) to eliminate in vivo donor effector T cells, which are liable to attack host tissues (7). This approach is very promising, as it provides the opportunity to perform HSCT, when needed, for patients without a 10/10 HLA-identical donor (8).

However, many issues remain to be clarified, among which is the impact of KIR/HLA inc. in this particular setting. Only a few studies have reported such data, especially in the context of a myeloablative conditioning (MAC) regimen and/or using bone marrow as source of graft (9–11). Moreover, reconstitution of the NK repertoire remains largely unknown after haploidentical HSCT.

In this study, the impact of genetic KIR/HLA inc. on clinical outcomes was retrospectively analyzed in a homogeneous cohort of 51 donor/recipient (D/R) 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 D/R pairs, the reconstitution kinetics of the NK cell repertoire was thoroughly investigated posttransplant.

Materials and Methods

Study population

This prospective study, conducted between November 2013 and May 2017, enrolled 51 consecutive patients (males: $n = 31$, median age = 57 y [range: 29–70 y]) allografted in the Hematology Department of Nantes University Hospital (Table I). There was a majority of patients with myeloid diseases ($n = 31$) and in complete remission at transplant ($n = 31$). The disease risk index (12) was low, intermediate, and high in 8, 30, and 13 cases, respectively. Nine patients had been previously allografted. A Baltimore conditioning regimen (7) was applied for 25 patients (19 cases with lymphoid diseases, 1 myelofibrosis, 3 acute myeloid leukemias, 1 myelodysplastic syndrome, and 1 blastic plasmacytoid dendritic cells neoplasm). For the remaining 26 patients, conditioning was performed with a Clo-Baltimore regimen (13), in which 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/d) on days +3 and +4, then cyclosporine A and mycophenolate mofetyl from day +5. Acute and chronic GvHD were classified according to standard criteria (14, 15). The study's involvement with human subjects complies with the Declaration of Helsinki. Healthy volunteers were recruited at the Blood Transfusion Center (Etablissement Français du Sang, Nantes, France), and they gave informed written consent in accordance with the Declaration of Helsinki.

All patients provided informed consent for collecting their own data from the PROMISE database 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 the Institutional Review Board (2015- DC-1) in 2015 to study NK cell reconstitution posttransplant. This biologic study was approved by the Ethics Review Board of the Nantes University Hospital, and all patients and donors included provided informed consent. The outcomes of some patients have been already reported previously (16).

HLA and KIR genotyping

High-resolution typing for HLA-A, -B, and -C loci was carried out for all donor and recipient samples by next-generation sequencing using Omixon Hologtype HLA (Omixon, Budapest, Hungary) (17). Briefly, DNA samples were amplified for the three HLA class I 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 Hologtype HLA Genotyping Kit. Libraries from individual HLA amplicons were prepared by enzymatic fragmentation, end-repaired, adenylated, and ligated with 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 quantitative PCR (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 corresponding flow cell (500 cycles) were placed on an Illumina MiSeq. Samples were demultiplexed, and the resulting FASTQ files were analyzed using Twin Omixon software (Omixon). Besides HLA class I typing, KIR generic typing was performed on all donor samples using a KIR multiplex PCR–Sequence Specific Primer method as previously described (18), using primers provided by Prof. D. Senitzer (City of Hope, Duarte, CA). The presence or absence of KIR2DL1, 2DL2, 2DL3, 2DL5, 3DL1, 2DS1, 2DS2, 2DS3, 2DS4/1D, 2DS5, and 3DS1 genes was assigned. Donor KIR genotypes were then determined based on the presence or the absence of activating KIR. Thus, a KIR AA genotype was defined by the presence of only KIR2DS4 as an activating KIR gene and a KIR B+ genotype by the presence of several activating KIR genes (19). KIR ligands such as C1, C2, and Bw4 were defined based on allelic HLA class I typing.

Immunophenotypic analysis by flow cytometry

The immunophenotype of NK cells was determined by eight-color multiparameter flow cytometry (MFC) on graft aliquots and patient samples using the following mAbs: anti-CD56-allophycocyanin-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, San Jose, CA), 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-KIR2DL2/3/2DS2 (GL183), anti-KIR2DL1/2DS1 (EB6), anti-KIR2DS4 (FES172), anti-KIR3DL1/3DS1 (Z27; Beckman Coulter Immunotech, Marseilles, France), and 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 (Ashland, OR).

CD107a mobilization assay

The cytolytic potential of NK cells was evaluated at the median time of 25 d (range: 20–33 d) posttransplant for patients developing GvHD ($n = 9$), on day 30 for patients without GvHD ($n = 18$), and on day 100 for 18 patients. This was achieved by a CD107a mobilization assay after stimulation with the HLA class I-deficient 721.221 (221), acute leukemia H9, and acute myeloid KG1 cell lines, kindly provided by Dr. N. Dulphy (INSERM U1160, Paris, France). Briefly, NK cells were preincubated with CD107-BV421 Ab (H4A3; BD Biosciences) and then incubated with 221 target cells for 5 h at an E:T ratio of 1:1, together with brefeldin A (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO) at 10 µg/ml for the last 4 h to block secretion and allow anti-CD107 binding. 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-allophycocyanin-Cy7 (HCD56), and anti-CD3-BV510 (SK7; Sony Biotechnology). Degranulation of NK cells, defined by CD107a⁺ expression, was studied by MFC, using CD3 absence and CD56 expression to target NK cells (CD3⁻CD56⁺). All functional MFC data were collected on a FACSCanto II instrument (BD Biosciences) and analyzed with FlowJo 10.2 software.

Statistical analyses

Overall survival (OS) was defined as the time from day 0 of allogeneic HSCT to death or last follow-up for survivors. Disease-free survival (DFS) was defined as the time from day 0 of allogeneic HSCT 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 recurrence of the disease. Categorical data were analyzed by χ^2 test, and univariate comparisons were performed by Student *t* test. Comparisons of multiple groups were performed by one-way ANOVA using GraphPad Prism v6.0 software (San Diego, CA). The *p* values <0.05 were considered statistically significant.

Results

Clinical outcomes

All patients were engrafted (Table I). Twenty-nine (57%) and eight (16%) patients developed grade 2–4 and 3–4 acute GvHD, respectively, at a median time of 29 d (range: 17–121 d) posttransplant (Table II). Ten patients (20%) developed moderate or severe chronic

Table I. Characteristics of patients

	All Patients (n = 51)	inh. KIR2D/HLA inc. (n = 22)	No inh. KIR/HLA inc. (n = 29)	p Value
Gender: male	31 (61%)	16 (72.7%)	15 (51.7%)	0.12
Median age, y (range)	57 (29–70)	57.5 (33–70)	55 (29–70)	0.45
Disease				
AML/MDS	18/9	9/1	9/8	
ALL	4	2	2	
HD	3	3	0	
NHL	10	4	6	
CLL	2	2	2	
Myelofibrosis	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
Status at treatment				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%)	
Disease risk index				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%)	
Previous allograft	9 (18%)	5 (22.7%)	4 (13.8%)	0.47
Conditioning				0.4
Baltimore	25 (49%)	9 (44%)	16 (51%)	
Clo-Baltimore	26 (51%)	13 (56%)	13 (49%)	
Haplo donors				
Median age, y	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 (4.52%)	3 (10.3%)	
D/R CMV status				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%)	
ABO compatibility				
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%)	
Donor KIR genotype				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	
Graft composition				
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

ALL, acute lymphoblastic leukemia; AML, acute myeloid leukemia; CLL, chronic lymphocytic leukemia; CML, chronic myeloid leukemia; CR, complete remission; HD, Hodgkin disease; MDS, myelodysplastic syndrome; NHL, non-Hodgkin lymphoma; pDC, plasmacytoid dendritic cell; PR, partial remission.

GvHD. At last updating (April 2018), and with a median follow-up of 29.1 mo (range: 12.4–50 mo; one patient alive at 7 mo was lost to follow-up afterward) for alive patients, 16 (31%) have relapsed and 19 (37%) died. The causes of death were relapse in 11 cases, infection in 4, GvHD in 3, and dermatomyositis in 1. Two-year OS and DFS for the whole cohort are 61.6 (95% confidence interval [CI]: 49–76%) and 50.3% (95% CI: 38–66%), respectively.

Comparing Baltimore (fludarabine, $n = 25$) versus Clo-Baltimore (clofarabine, $n = 26$) subgroups, no differences were observed in terms of grade 2–4 acute (64 versus 50%, $p = 0.46$) or moderate/severe chronic (24 versus 15%, $p = 0.67$) GvHD incidence, relapses (32 versus 31%, $p = 1$), or deaths (36 versus 38%, $p = 1$). Similarly, there was no difference in 2-y DFS (68.1 [95% CI: 48–95%] versus 42.6% [95% CI: 29–62%], $p = 0.09$) or 2-y OS (74.4 [95% CI: 55–99%] versus 56% [95% CI: 47–75%], $p = 0.16$). Patients with lymphoid or myeloid malignancies also had similar grade 2–4 acute (65 versus 52%, $p = 0.51$) or moderate/severe chronic (25 versus 16%, $p = 0.67$) GvHD incidences, relapses (35 versus 29%, $p = 0.88$),

deaths (30 versus 42%, $p = 0.57$), and 2-y DFS (54.5 [95% CI: 36–81%] versus 45.4% [95% CI: 27–74%], $p = 0.93$) and OS (68.7 [95% CI: 50–93%] versus 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 with other patients (21 versus 45%, $p = 0.059$). As Baltimore versus Clo-Baltimore patients had similar outcomes (Fig. 1A), they were pooled to study the impact of NK cell alloreactivity posttransplant.

Inhibitory KIR_D/HLA-C_R inc. favors GvHD and protects against relapse in haploidentical RIC PBSC HSCT with PTCy

To investigate the impact of KIR/HLA inc. on clinical outcome after T cell–replete haploidentical RIC PBSC HSCT with PTCy, we determined the HLA and KIR genetic profiles of the 51 D/R pairs included in the study. The C1, C2, and Bw4 KIR ligands, defined from donor and recipient HLA class I typings, are shown in Table III. Inhibitory (inh.) KIR/HLA inc. were defined by the presence of inh. KIR genes (KIR2DL1, KIR2DL2/3, and KIR3DL1)

Table II. Patient outcomes

	All Patients (<i>n</i> = 51)	inh. KIR/HLA inc. (<i>n</i> = 22)	No inh. KIR/HLA inc. (<i>n</i> = 29)	<i>p</i> Value
Follow-up, mo (range)	29.1 (12.4–50)	29.1 (12.4–50)	28.1 (16.7–49)	0.81
Median neutrophils recovery >0.5 Giga/l, d (range)	18 (13–30)	18 (13–30)	20 (13–27)	0.25
Median platelets recovery >50 Giga/l, d (range)	27 (9–104)	26 (9–104)	27.5 (16–99)	0.29
Acute GvHD	29 (57%)	13 (59%)	13 (44.8%)	0.04
Grade 2	21 (41%)	1 (4.5%)	8 (25.6%)	0.02
Grade 3	4 (8%)	2 (9%)	3 (10.3%)	
Grade 4	4 (8%)	4 (8%)	2 (6.9%)	
Median time of occurrence, d (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-y DFS	50.3% (95% CI: 38–66%)	67.8% (95% CI: 50–90%)	37.6% (95% CI: 23–60%)	0.03
2-y OS	61.6% (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%) ^a	3 (21.4%) ^b	
GvHD	3 (16%)	2 (40%)	1 (7%)	
Dermatomyositis	1 (5%)		1 (7%)	

^aRespiratory syncytial virus.

^bMucomycosis, *n* = 1; *Toxoplasma gondii*, *n* = 1; adenovirus plus *Escherichia coli*, *n* = 1.

in the donor concomitant with the absence of the respective cognate HLA ligands in the recipient. KIR2DL1_D/C2⁻_R inc. was found in 10 D/R pairs, KIR2DL2/3_D/C1⁻_R inc. in 6, and KIR3DL1_D/Bw4⁻_R inc. in another 6 (Table III). Similarly, activating KIR/HLA inc. were defined by the presence of activating KIR genes (KIR2DS1 and KIR2DS2) in the donor concomitant with 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_D/C2⁺_R inc., and another two a KIR2DS2_D/C1⁺_R inc. According to clofarabine versus fludarabine treatment, both subgroups of patients presented a similar distribution of inh. KIR/HLA inc. (Fig. 1A).

Characteristics of patients, donors, and outcomes are displayed in Tables I and II 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 with those without (*n* = 29) at 72.7 versus 45% (*p* = 0.04), whereas significantly fewer relapses were observed in the former group (13.6 versus 45%, *p* = 0.01) (Fig. 1B). Moreover, these patients have better 2-y DFS and OS at 67.8 (95% CI: 50–90%) versus 37.6% (95% CI: 23–60%, *p* = 0.03) and 76.2 (95% CI: 60–96%) versus 51.2% (95% CI: 35–73%, *p* = 0.04), respectively (Table II).

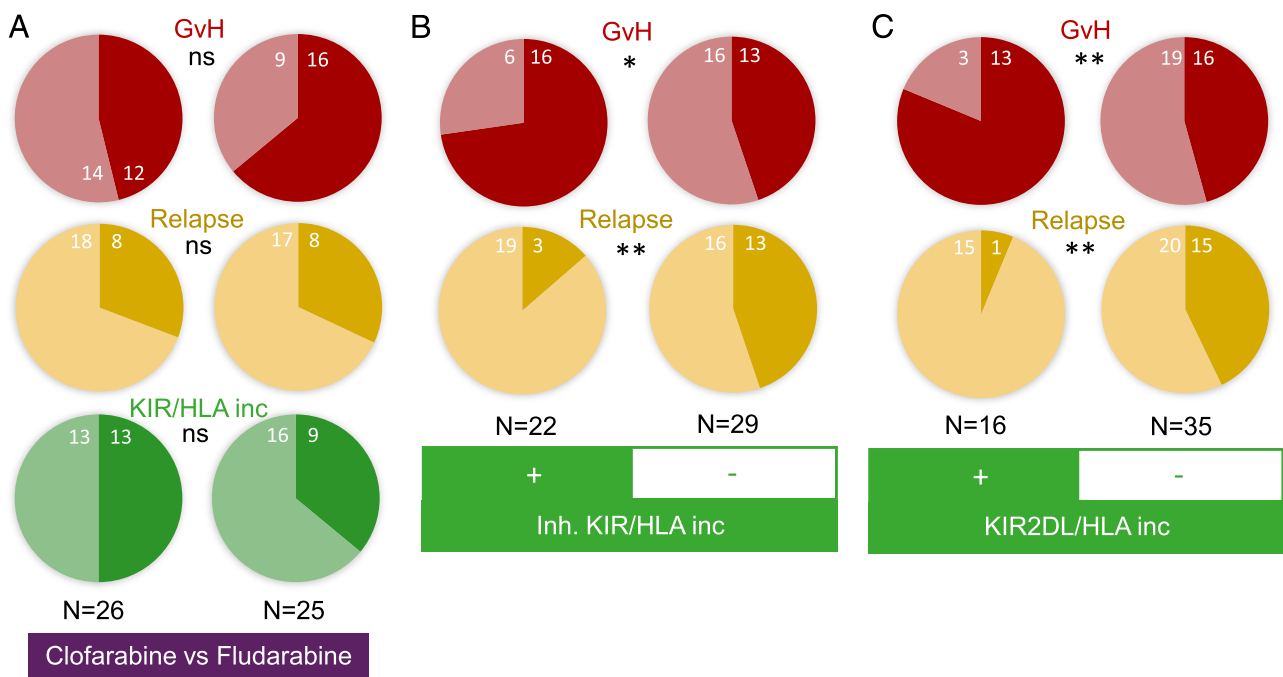


FIGURE 1. Factors influencing graft outcome. (A) Comparison of groups of patients treated with clofarabine (*n* = 26) or fludarabine (*n* = 25) according to GvHD (no GvHD in light red versus GvHD in dark red), relapse occurrence (no relapse in light yellow versus relapse in dark yellow), and KIR/HLA inc. (no inc. in light green versus inc. in dark green). (B) Comparison of groups of patients with (*n* = 22) or without inh. KIR (KIR2DL and KIR3DL1)/HLA inc. (*n* = 29) and (C) with (*n* = 16) or without KIR2DL/HLA inc. (*n* = 35) according to GvHD and relapse occurrence. **p* < 0.05, ***p* < 0.01, χ^2 test.

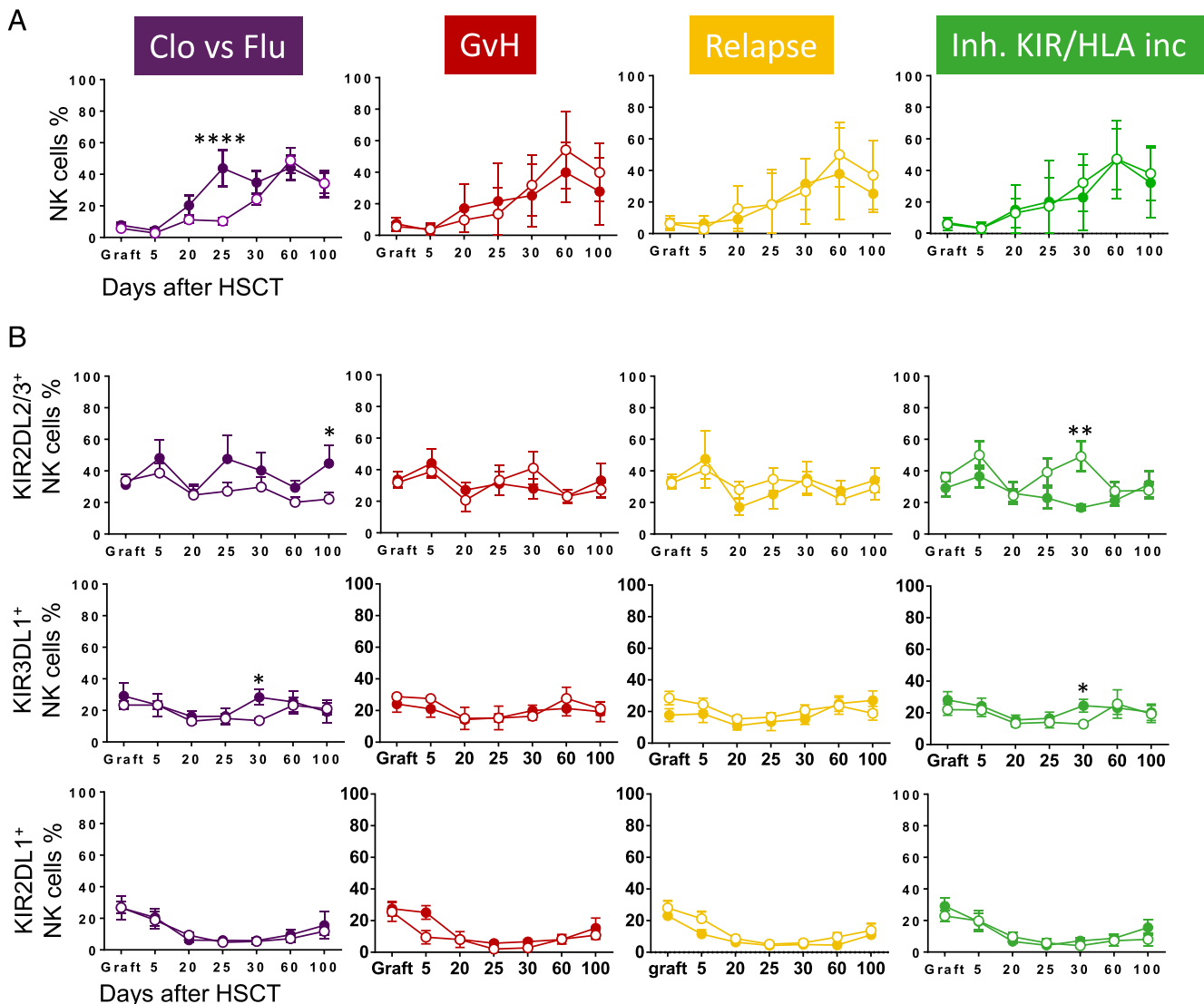


FIGURE 2. Reconstitution of the KIR NK cell repertoire. **(A)** NK cell ($n = 34$) and **(B)** KIR2DL2/3⁺ ($n = 34$), KIR3DL1⁺ ($n = 27$), and KIR2DL1⁺ ($n = 27$) NK cell frequencies determined by flow cytometry from graft and recipients following the posttransplantation kinetics (days 5, 20, 25, 30, 60, and 100) according to clofarabine (open purple circle) versus fludarabine (filled purple circle) treatment, GvHD (open red circle for no GvHD and filled red circle for GvHD), relapse occurrence (open yellow circle for no relapse and filled yellow circle for relapse), and inh. KIR/HLA inc. (open green circle for no inc. and full green circle for inc.). * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, **** $p < 0.0001$, Student t test.

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 versus 45.7%, $p = 0.01$) and again a significantly lower incidence of relapse (6.2 versus 42.8%, $p = 0.008$) (Fig. 1C), a better 2-y DFS (68.1 [95% CI: 48–95%] versus 42.6% [95% CI: 29–62%], $p = 0.09$) and a better 2-y OS (74.4 [95% CI: 55–99%] versus 56% [95% CI: 41–75%], $p = 0.16$). Chronic GvHD was not associated with inh. KIR/HLA inc., relapse, DFS, or OS in this series. Of note, donor AA and B+ genotypes were not associated with GvHD or relapse (data not shown). Thus, our results showed that inh. KIR/HLA inc. impact GvHD and relapse after RIC PBSC HSCT with PTCy and confer better survivals.

KIR2DL2/3⁺ and KIR3DL1⁺ NK cell recoveries at day 30 postgraft are inversely impacted by KIR/HLA inc.

The kinetics of NK cell repertoire reconstitution was analyzed afterward for 34 donor/patient pairs by immunophenotyping in MFC from day 0 to day 30, three times per week, and then at day 60 and day 90/100 posttransplant. Nineteen of these patients developed acute GvHD at a median time of 34 d (range: 21–119 d)

posttransplant. 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 (16). Although GvHD, relapse, or inh. KIR/HLA inc. did not impact NK cell frequency during the first 30 d, the fludarabine-based regimen was associated with higher NK cell recovery compared with the clofarabine-based regimen at day 25 ($p = 0.0001$) (Fig. 2A). Because of the significant impact of genetic KIR/HLA inc. on GvHD and relapse, investigations were pursued focusing on KIR2DL2/3⁺, KIR3DL1⁺, and KIR2DL1/S1⁺ NK cell subsets, based on the positivity for the KIR of interest. Interestingly, only inh. KIR/HLA inc. modulated KIR NK cell reconstitution posttransplant (Fig. 2B). Indeed, inh. KIR/HLA inc. were associated with a significant decrease in KIR2DL2/3⁺ NK cell recovery ($p = 0.004$) but conversely fostered KIR3DL1⁺ NK cell recovery at day 30 ($p = 0.01$). Neither inh. KIR/HLA inc. nor type of conditioning nor relapse nor GvHD had any impact on KIR2DL1/S1⁺ (Fig. 2B) and KIR2DS4⁺ NK cell recoveries (data not shown). Our results suggest that KIR/HLA inc. impact the KIR NK repertoire recovery after RIC PBSC

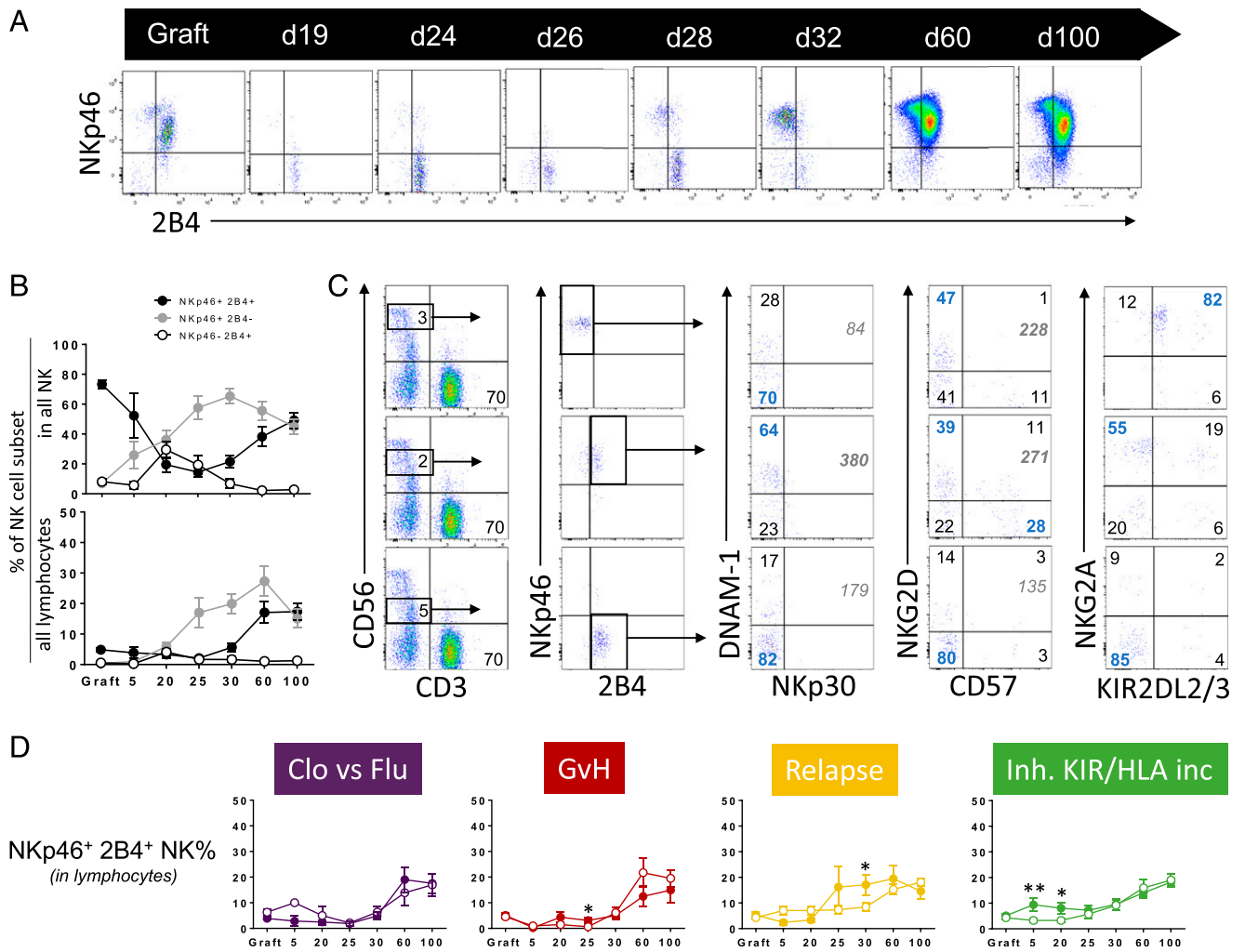


FIGURE 3. Identification of three NK cell subsets according to NKp46 and 2B4 expression posttransplantation. **(A)** Both NKp46 and 2B4 NK cell receptors were investigated during NK cell recovery by flow cytometry. Representative density plots illustrating different stages of the NKp46/2B4 NK cell subset from graft to recipient at day 100, moving through days 19, 24, 26, 28, 32, and 60. **(B)** Evolution of NKp46⁺ 2B4⁺, NKp46⁺ 2B4⁻, and NKp46⁻ 2B4⁺ NK cell subsets in the NK cell compartment and in all lymphocytes following the posttransplantation kinetics (days 5, 20, 25, 30, 60, and 100). **(C)** Representative density plots illustrating the phenotype of all NKp46⁺ 2B4⁺, NKp46⁺ 2B4⁻, and NKp46⁻ 2B4⁺ NK cell subsets, taking into account CD3, CD56, DNAM-1, NKp30, NKG2D, CD57, NKG2A, and KIR2DL2/3 expression. The frequency of cells in each gate is indicated. The mean fluorescence intensity for DNAM-1 and NKG2D is indicated in italics. **(D)** NKp46⁺ 2B4⁺ NK cell subset frequencies in all lymphocytes were represented following the posttransplantation kinetics (days 5, 20, 25, 30, 60, and 100) according to clofarabine (open purple circle) versus fludarabine (filled purple circle) treatment, GvHD (open red circle for no GvHD and filled red circle for GvHD), relapse occurrence (open yellow circle for no relapse and filled yellow circle for relapse), and inh. KIR/HLA inc. (open green circle for no inc. and filled green circle for inc.). **p* < 0.05, ***p* < 0.01, Student *t* test.

HSCT with PTCy with opposite effects on KIR2DL2/3⁺ and KIR3DL1⁺ NK cell subsets.

Patients developing GvHD harbor more differentiated and activated NK cells

Different membrane markers inform about the differentiated and activated status of NK cells (20). Thus, NKp46 is a marker of NK cells (21, 22), and 2B4 is a receptor corresponding to an activating marker at the early stage of NK cell differentiation. Conversely, it becomes an inh. receptor on differentiated NK cells (23). Expression of these markers was examined in MFC on graft aliquots and during reconstitution of the NK cell repertoire (Fig. 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⁻ and 2B4⁺ and then lost progressively 2B4 expression to acquire NKp46 expression. At day 60, NK cells displayed a similar phenotype to that of grafted NK cells. The evolution of all three NK cell subsets (NKp46⁻

2B4⁺, NKp46⁺ 2B4⁻, and NKp46⁺ 2B4⁺) during immune reconstitution in the NK cell compartment showed that the frequency of NKp46⁺ 2B4⁺ decreased until day 20 but increased at day 30 (Fig. 3B). Inversely, the NKp46⁺ 2B4⁻ NK cell subset increased until day 30 only to progressively decrease. In the first part of the immune reconstitution, until day 20, donor NK cells were still present, and in the second part, from day 20, new recipient NK cells appeared from donor hematopoietic stem cells. Taking into account all lymphocytes, NKp46⁺ 2B4⁻ NK cell frequency increased from day 20 to day 60 (Fig. 3B). However, the NKp46⁺ 2B4⁺ NK cell subset appeared later, from day 30, in accordance with the profile shown for a representative patient in Fig. 3A. Interestingly, all three subsets based on NKp46 and 2B4 expression match NK cell subsets identified by the level of CD56 expression (Fig. 3C). Indeed, NKp46⁺ 2B4⁻ are CD56^{high}, NKp46⁺ 2B4⁺ are CD56^{int}, and NKp46⁻ 2B4⁺ are CD56^{low}. Different phenotypes are associated with these three NK subsets. NKp46⁺ 2B4⁻ (CD56^{high}) NK cells express high levels of

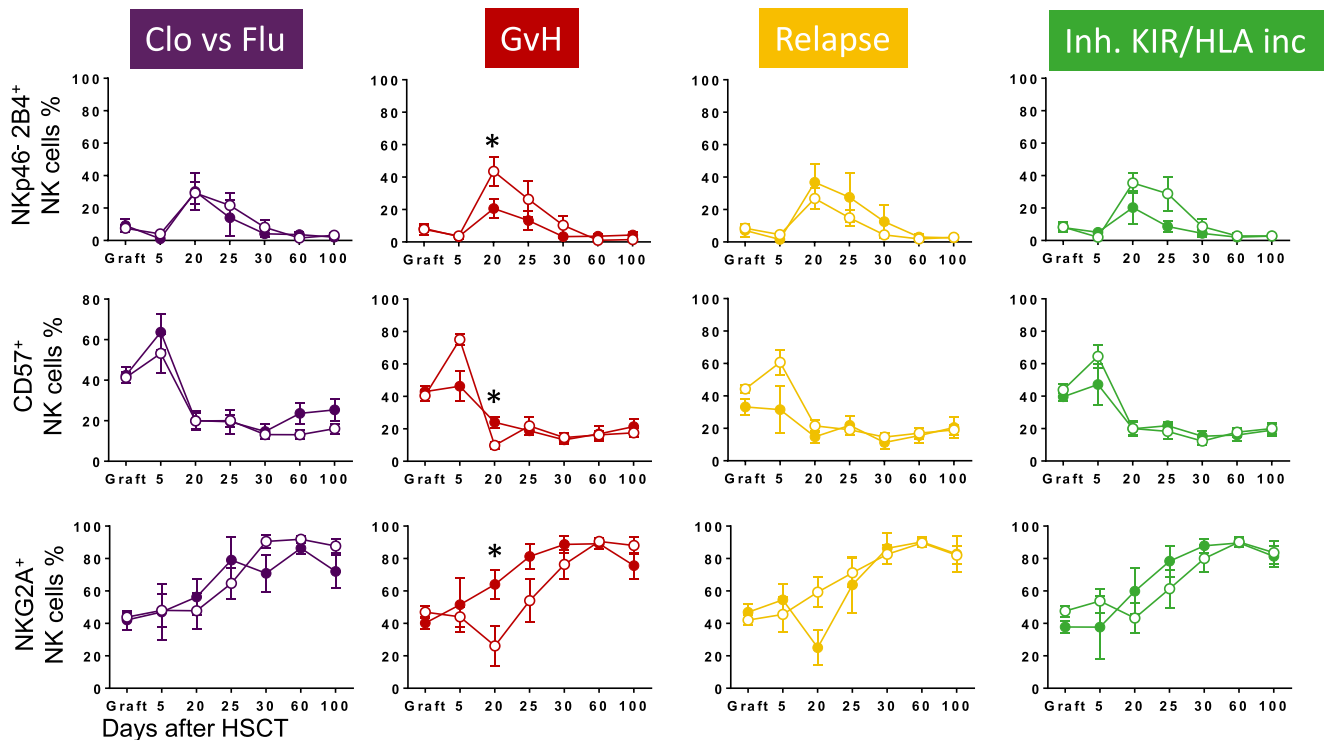


FIGURE 4. Differentiated status of NK cells from patients developing GvHD. Immature NKp46⁻ 2B4⁺ NK cell subset frequencies and mature CD57⁺ and NKG2A⁺ NK cell subset frequencies were represented following the posttransplantation kinetics (days 5, 20, 25, 30, 60, and 100) according to clofarabine (open purple circle) versus fludarabine (filled purple circle) treatment, GvHD (open red circle for no GvHD and filled red circle for GvHD), relapse occurrence (open yellow circle for no relapse and filled yellow circle for relapse), and inh. KIR/HLA inc. (open green circle for no inc. and filled green circle for inc.). * $p < 0.05$, Student t test.

NKG2A and intermediate levels of NKG2D and KIR. They do not express CD57. NKp46⁻ 2B4⁺ (CD56^{low}) NK cells do not express DNAM-1, NKG2D, NKp30, CD57, NKG2A, and KIR. In contrast, NKp46⁺ 2B4⁺ (CD56^{int}) NK cells associated with the late stage of differentiation express all these receptors. The NKp46⁺ 2B4⁺ NK cell subset was significantly more represented early in patients developing GvHD at day 25 ($p = 0.03$) and in those with KIR/HLA inc. at days 5 ($p = 0.01$) and 20 ($p = 0.04$) before the median time of GvHD occurrence (day 29). In contrast, the NKp46⁺ 2B4⁺ NK cell subset was low until day 25 in patients with relapse occurrence but became significantly higher at day 30 ($p = 0.03$) (Fig. 3D).

Patients developing GvHD showed a differentiated profile of NK cells characterized by less frequent undifferentiated 2B4⁺ NKp46⁻ NK cells at day 20 ($p = 0.04$) (Fig. 4). Naive NKG2A⁺ KIR⁻ CD57⁻ NK cells will acquire KIR and CD57 expression to become differentiated. NK cell activation will translate in increased numbers of NKG2A⁺ NK cells (20, 24). A significant increase of CD57⁺ ($p = 0.02$) and NKG2A⁺ NK cell frequencies ($p = 0.01$) was observed at day 20 posttransplant in patients who developed GvHD (Fig. 4). NKG2A⁺ KIR2DL2/3⁻ NK cells were predominant in patients developing GvHD at day 20 ($p = 0.03$) and also in patients with KIR/HLA inc. at days 25 ($p = 0.004$) and 30 ($p = 0.007$) (Fig. 5A, 5B). In accordance with these results, NKG2A⁺ KIR2DL2/3⁺ NK cells were observed mainly in patients with no KIR/HLA inc. at day 25 ($p = 0.05$) and day 30 ($p = 0.01$) (Fig. 5B).

The expression of different activating receptors, such as DNAM-1 (25), NKG2D (26, 27), NKp30 (28), and NKp44 (29, 30), potentially implicated in the GvL effect induced by NK cells (31) was also investigated during immune reconstitution posttransplant. At days 20 and 25, even though the difference was not statistically

significant, DNAM-1 and NKG2D were more expressed on NK cells in patients developing GvHD and those with KIR/HLA inc., highlighting an activated status of these NK cells (Fig. 5C, 5D).

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. (Fig. 5C, 5D). Conversely, DNAM-1 expression was significantly lower at day 100 on NK cells from patients developing GvHD compared with controls ($p = 0.01$). As the NKp46⁺ 2B4⁺ NK cell subset expresses DNAM-1 and NKG2D, these different profiles are in accordance with the profile of NKp46⁺ 2B4⁺ NK cells presented in Fig. 3D during immune reconstitution. Interestingly, NKG2D expression, but not that of DNAM-1, was significantly higher on NK cells at day 30 for patients who relapsed ($p = 0.03$). Of note, we cannot associate NKG2D expression with KIR, as all NKp46⁺ 2B4⁺ NK cells express NKG2D independently of KIR expression (data not shown). No difference was observed for NKp30 and NKp44 expression considering the type of conditioning, GvHD, relapse, or inh. KIR/HLA inc. (data not shown). Overall, NK cells from patients developing GvHD featured a differentiated and activated status in haploidentical RIC PBSC HSCT with PTCy.

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

To evaluate the cytotoxic function of NK cells, we assessed the cell-surface mobilization of CD107a on NK cells. The degranulation potential of NK cells was assessed by testing ex vivo the spontaneous lysis (32) exerted by patient NK cells collected around day 30 and day 100. The two patients who developed a late GvHD (days 112 and 122) were excluded from the functional study performed at day 30. Neither the type of conditioning nor GvH

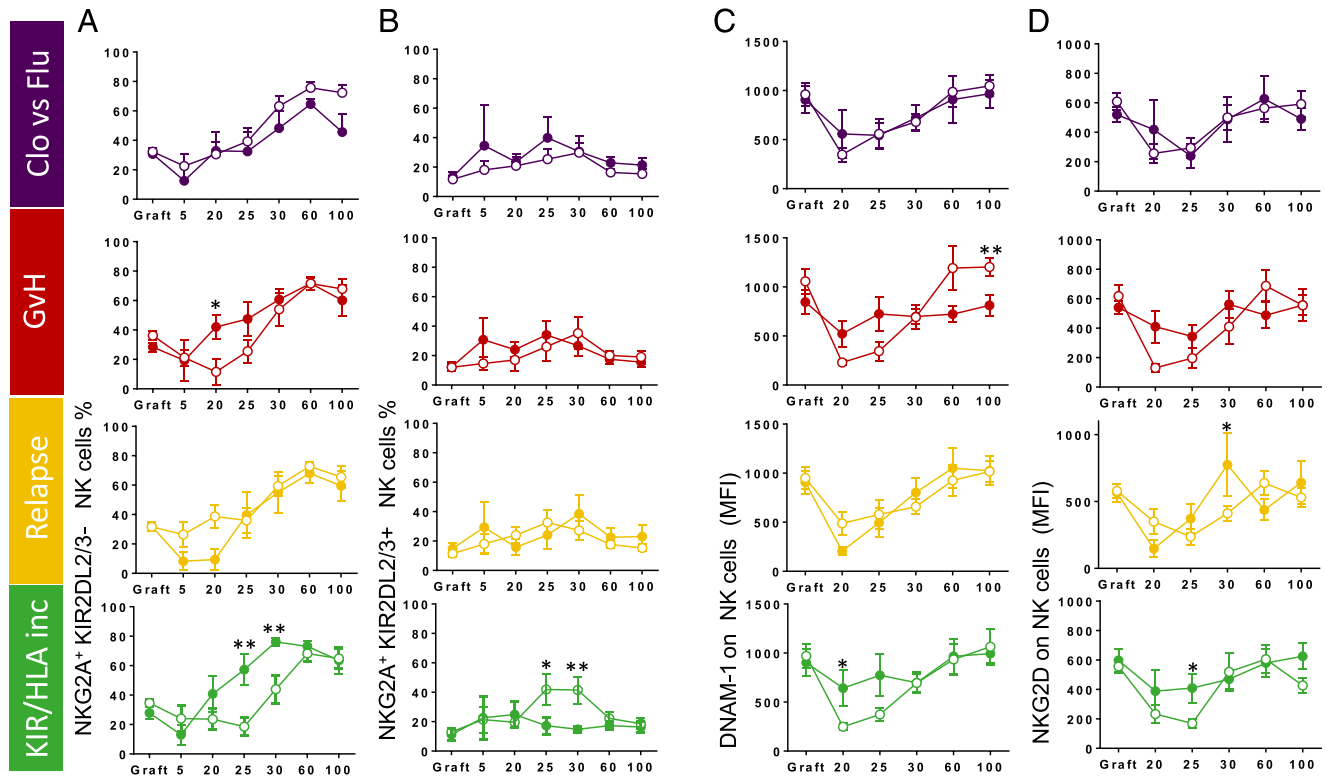


FIGURE 5. High expression of NKG2A in the absence of KIR2DL2/3 and the evolution of activating DNAM-1 and NKG2D expression reflect the evolution of NKp46⁺ 2B4⁺ NK cells. **(A)** NKG2A⁺ KIR2DL2/3⁻ NK cell subset frequencies and **(B)** NKG2A⁺ KIR2DL2/3⁺ NK cell subset frequencies were represented following the posttransplantation kinetics (days 5, 20, 25, 30, 60, and 100) according to clofarabine (open purple circle) versus fludarabine (filled purple circle) treatment, GvHD (open red circle for no GvHD and filled red circle for GvHD), relapse occurrence (open yellow circle for no relapse and filled yellow circle for relapse), and inh. KIR/HLA inc. (open green circle for no inc. and filled green circle for inc.). Mean fluorescence intensity (MFI) of **(C)** DNAM-1 and **(D)** NKG2D expressed on all NK cells following posttransplantation kinetics (days 5, 20, 25, 30, 60, and 100) according to clofarabine (open purple circle) versus fludarabine (filled purple circle) treatment, GvHD (open red circle for no GvHD and filled red circle for GvHD), relapse occurrence (open yellow circle for no relapse and filled yellow circle for relapse), and inh. KIR/HLA inc. (open green circle for no inc. and filled green circle for inc.). **p* < 0.05, ***p* < 0.01, Student *t* test.

occurrence nor relapse nor inh. KIR/HLA inc. had any impact on NK cell degranulation at day 30 (Fig. 6A). However, NK cells from patients developing GvHD displayed a significantly lower degranulation rate compared to those of patients without GvHD at day 100 (*p* = 0.01) (Fig. 6B).

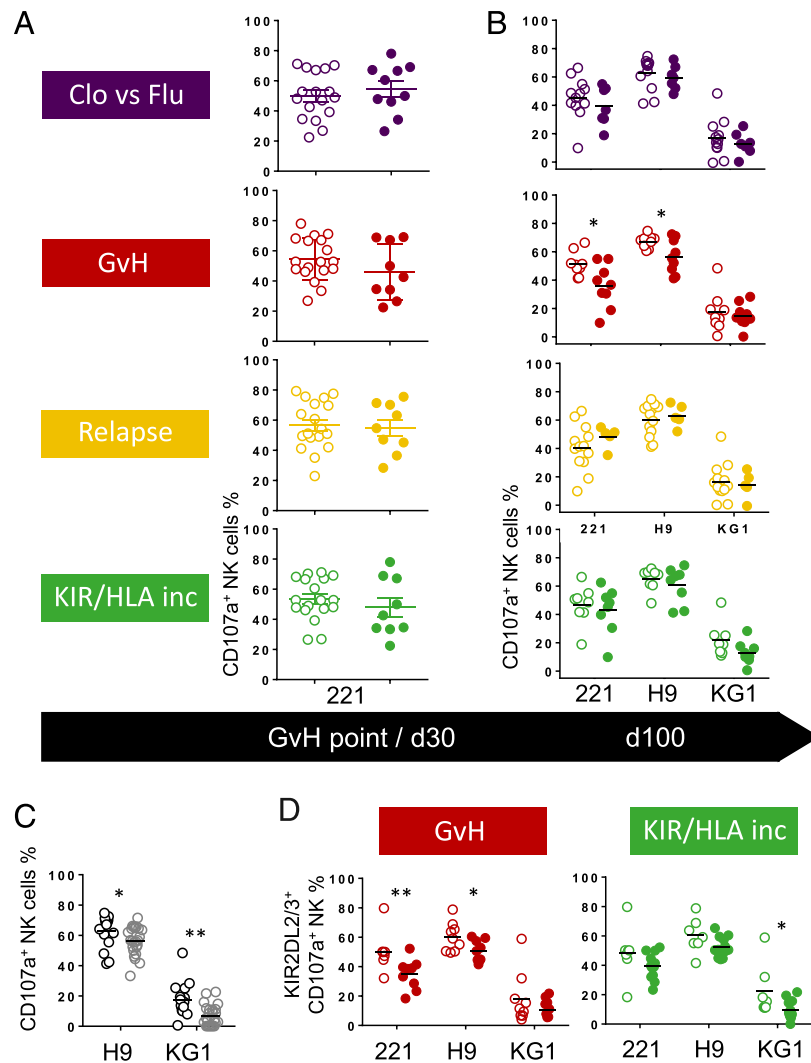
Similarly, at day 100 the degranulation potential of patient NK cells was investigated in the presence of the acute leukemia H9 cell line and the acute myeloid KG1 cell line to evaluate their potential alloreactivity and antileukemia effect at this later point (Fig. 6B). Lower degranulation of NK cells 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 (33, 34). However, the degranulation potential of recipient NK cells was significantly higher than that of healthy donor NK cells against H9 (*p* = 0.04) and KG1 (*p* = 0.0006) (Fig. 6C), suggesting that recipient NK cells present an efficient potential of degranulation. No difference in terms of granzyme and perforin expression in recipient NK cells was observed at days 30 and 100 between patients developing GvHD or not (data not shown). However, at day 100, KIR2DL2/3⁺ NK cells from patients developing GvHD presented a lower degranulation against 221 (*p* = 0.01) and H9 (*p* = 0.03), and KIR2DL2/3⁺ NK cells from patients with KIR/HLA inc. presented a lower degranulation against KG1 (*p* = 0.03) (Figs. 6D, 7).

Discussion

Haploidentical HSCT has been increasingly used in recent years in patients with no suitable donors. Indeed, the PTCy administration

following donor cell 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 (35). These results are also currently associated with relatively good survivals, as reported in this article, 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, KIR2DL2/3⁺ and KIR3DL1⁺ NK cell recoveries at day 30 postgraft 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. A deep investigation of KIR expression should be important to document mono-KIR⁺ NK cells, excluding NK cells coexpressing other inh. KIR. 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, as illustrated in Fig. 7.

FIGURE 6. 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 221 cells and compared according to clofarabine (open purple circle) versus fludarabine (filled purple circle) treatment, GvHD (open red circle for no GvHD and filled red circle for GvHD), relapse occurrence (open yellow circle for no relapse and filled yellow circle for relapse), and inh. KIR/HLA inc. (open green circle for no inc. and filled green circle for inc.). **(B)** The degranulation of recipient NK cells at day 100 ($n = 18$) was assessed against 221 cells, the lymphoid acute leukemia H9 cell line, and the myeloid acute leukemia KG1 cell line and compared according to clofarabine versus fludarabine treatment, GvHD, relapse occurrence and KIR/HLA inc. **(C)** The degranulation of recipient NK cells at day 100 was assessed against H9 and KG1 cell lines in comparison with healthy blood donor NK cells ($n = 24$). **(D)** The degranulation of recipient KIR2DL2/3⁺ NK cells at day 100 was assessed against H9 and KG1 cell lines and compared according to GvHD (open red circle for no GvHD, $n = 9$; and filled red circle for GvHD $n = 9$) and KIR/HLA inc. (open green circle for no KIR/HLA inc., $n = 8$; and filled green circle for KIR/HLA inc., $n = 12$). * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, Student t test.



So far, data regarding the impact of alloreactive NK cells after T-replete haploidentical transplantation are very scarce (9–11, 36). Using high doses of thymoglobulin instead of PTCy as GvHD prophylaxis, Huang and coworkers (36) have shown a deleterious effect of KIR ligand inc. on clinical outcomes after haploidentical HSCT, characterized by more acute GvHD and relapse and shorter survival. However, these 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.

Three previous studies have reported the impact of KIR/HLA inc. after haplotransplant using PTCy but with contradictory data (9–11). Symons et al. (9) showed in a series of 86 patients with bone marrow as the source of graft that inh. KIR gene mismatches between donor and recipient, or KIR haplotype AA recipients from KIR B+ donors, were associated with fewer relapses and improved OS and DFS. 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 and MAC or RIC as the conditioning regimen, reported a deleterious impact of KIR ligand

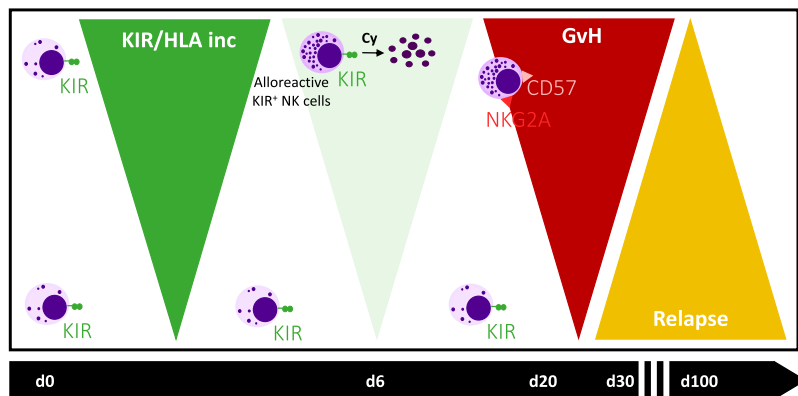


FIGURE 7. Cartoon illustrating the impact of KIR/HLA inc. on GvHD and relapse. KIR/HLA inc. promote activation and proliferation of alloreactive NK cells, which are quickly targeted by PTCy. This activated context seems to promote the differentiation and activation of NK cells associated with GvHD and limiting relapse. In parallel, in the absence of KIR/HLA inc., quiescent KIR NK cells are not eliminated by PTCy and are not efficient to limit relapse.

mismatches (defined according to HLA typing) (10). Different points can explain these discordant results compared with ours. Indeed, donor KIR genotyping was not available in this series (10) to analyze properly KIR/HLA inc. Also, in this missing self/KIR-ligand mismatch model, the presence of respective inh. KIR in the donor was assumed but not verified. This is problematic, as KIR genes harbor a broad allelic polymorphism that leads to unexpressed membrane KIR, as documented for KIR3DL1 (37). In addition, bone marrow and PBSC were both considered in this study, whereas we only included patients receiving PBSC. Finally, Russo et al. (11) showed no impact of NK cell alloreactivity after haplotransplant with PTCy but in a context of MAC regimen using bone marrow as the stem cell source.

One of the major interests 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 KIR2DL2/3⁺ 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. (11), 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 KIR2DL2/3⁺ 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 (11). It can be hypothesized that the alloreactive context promotes a strong activation of responsive NK cells that are subsequently targeted by the immunosuppressive PTCy treatment. This activation appears to emphasize efficient antileukemic responses. However, further investigations are needed to determine the nature of cell effectors directly engaged in the antileukemic responses.

Immunophenotypic NK cell 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. (38). At an early stage, immature NK cells are NKp46⁻ 2B4⁺ and acquire progressively NKp46 around day 30, then lose 2B4 to finally coexpress both markers around day 6 on infused NK cells. Interestingly, these three NK cell subsets defined on NKp46 and 2B4 expression match NK cell subsets identified by the level of CD56 expression (high, intermediate, and low). Moreover, these three NK cell subsets harbor a different phenotype, and NKp46⁺ 2B4⁺ (CD56^{int}) NK cells express differentiation-associated NK receptors such as NKG2A, KIR, DNAM-1, and NKG2D. The evolution of this population is significantly different in patients with relapse occurrence and patients developing GvHD, who share a similar profile with those with KIR/HLA inc. This NKp46⁺ 2B4⁺ NK subset appears earlier in patients developing GvHD or those with KIR/HLA inc., whereas this NK subset appears later in patients with relapse occurrence. It is possible that the kinetics of appearance of this NK cell subset matches the beneficial GvL effect early during immune reconstitution. Patients developing GvHD harbored more differentiated NK cells (2B4⁻, NKp46⁺, CD57⁺, and NKG2A⁺). Functionally, it can be suggested that the lower degranulation of NK cells observed ex vivo at day 100 from patients with GvHD could reflect stronger in vivo activation of NK cells due to the high cell booster of the GvHD context.

The results reported in this study show that 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 in the context of RIC PBSC haplotransplant using PTCy. We propose a model in which 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 contrast, in the absence of KIR/HLA inc., quiescent KIR NK cells are not eliminated by PTCy and are not efficient to limit relapse. 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 based on KIR/HLA inc. could be of crucial importance for patient outcome and donor selection. Also, further investigations are needed to identify the NK cell subsets that are beneficial for triggering the GvL effect in this context.

Acknowledgments

We thank all donors and recipients who agreed to participate in this study.

Disclosures

The authors have no financial conflicts of interest.

References

- Anasetti, C., D. Amos, P. G. Beatty, F. R. Appelbaum, W. Bensinger, C. D. Buckner, R. Clift, K. Doney, P. J. Martin, E. Mickelson, et al. 1989. Effect of HLA compatibility on engraftment of bone marrow transplants in patients with leukemia or lymphoma. *N. Engl. J. Med.* 320: 197–204.
- Aversa, F., A. Tabilio, A. Velardi, I. Cunningham, A. Terenzi, F. Falzetti, L. Ruggeri, G. Barbabietola, C. Aristei, P. Latini, et al. 1998. 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.* 339: 1186–1193.
- Ciceri, F., C. Bonini, M. T. L. Stanghellini, A. Bondanza, C. Traversari, M. Salomoni, L. Turchetto, S. Colombi, M. Bernardi, J. Peccatori, et al. 2009. 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.* 10: 489–500.
- Ruggeri, L., M. Capanni, E. Urbani, K. Perruccio, W. D. Shlomchik, A. Tosti, S. Posati, D. Rogaia, F. Frasson, F. Aversa, et al. 2002. Effectiveness of donor natural killer cell alloreactivity in mismatched hematopoietic transplants. *Science* 295: 2097–2100.
- Ljunggren, H. G., and K. Kärre. 1985. Host resistance directed selectively against H-2-deficient lymphoma variants. Analysis of the mechanism. *J. Exp. Med.* 162: 1745–1759.
- Glass, B., L. Uharek, M. Zeis, H. Loeffler, V. Mueller-Ruchholtz, and W. Gassmann. 1996. Graft-versus-leukaemia activity can be predicted by natural cytotoxicity against leukaemia cells. *Br. J. Haematol.* 93: 412–420.
- Luznik, L., P. V. O'Donnell, H. J. Symons, A. R. Chen, M. S. Leffell, M. Zahurak, T. A. Gooley, S. Piantadosi, M. Kaup, R. F. Ambinder, et al. 2008. HLA-haploidentical bone marrow transplantation for hematologic malignancies using nonmyeloablative conditioning and high-dose, posttransplantation cyclophosphamide. *Biol. Blood Marrow Transplant.* 14: 641–650.
- Bashey, A., and S. R. Solomon. 2014. 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.* 49: 999–1008.
- Symons, H. J., M. S. Leffell, N. D. Rossiter, M. Zahurak, R. J. Jones, and E. J. Fuchs. 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.* 16: 533–542.
- Shimoni, A., M. Labopin, F. Lorentino, M. T. Van Lint, Y. Koc, Z. Gülbas, J. Tischer, B. Bruno, D. Blaise, P. Piontelli, et al. 2019. Killer cell immunoglobulin-like receptor ligand mismatching and outcome after haploidentical transplantation with post-transplant cyclophosphamide. *Leukemia* 33: 230–239.
- Russo, A., G. Oliveira, S. Berglund, R. Greco, V. Gambacorta, N. Cieri, C. Toffalori, L. Zito, F. Lorentino, S. Piemontese, et al. 2018. NK cell recovery after haploidentical HSCT with posttransplant cyclophosphamide: dynamics and clinical implications. *Blood* 131: 247–262.
- Armand, P., H. T. Kim, B. R. Logan, Z. Wang, E. P. Alyea, M. E. Kalaycio, R. T. Maziarz, J. H. Antin, R. J. Soiffer, D. J. Weisdorf, et al. 2014. Validation and refinement of the disease risk index for allogeneic stem cell transplantation. *Blood* 123: 3664–3671.
- Retiere, C., C. Willem, N. Legrand, T. Guillaume, K. Gagne, P. Peterlin, A. Garnier, M. C. Bene, A. L. Bourgeois, and P. Chevallier. 2017. 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* 130: 3262.
- Harris, A. C., R. Young, S. Devine, W. J. Hogan, F. Ayuk, U. Bunworasate, C. Chanswangphuwana, Y. A. Efebera, E. Holler, M. Litow, et al. 2016. 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.* 22: 4–10.
- Filipovich, A. H., D. Weisdorf, S. Pavletic, G. Socie, J. R. Wingard, S. J. Lee, P. Martin, J. Chien, D. Przepiorka, D. Couriel, et al. 2005. National institutes of health consensus development project on criteria for clinical trials in chronic

- graft-versus-host disease: I. Diagnosis and staging working group report. *Biol. Blood Marrow Transplant.* 11: 945–956.
16. Retière, C., C. Willem, T. Guillaume, H. Vié, L. Gautreau-Rolland, E. Scotet, X. Saulquin, K. Gagne, M. C. Béné, B.-M. Imbert, 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.
 17. Duke, J. L., C. Lind, K. Mackiewicz, D. Ferriola, A. Papazoglou, A. Gasiewski, S. Heron, A. Huynh, L. McLaughlin, M. Rogers, et al. 2016. Determining performance characteristics of an NGS-based HLA typing method for clinical applications. *HLA* 87: 141–152.
 18. Sun, J. Y., L. Gaidulis, M. M. Miller, R. M. Goto, R. Rodriguez, S. J. Forman, and D. Senitzer. 2004. Development of a multiplex PCR-SSP method for killer-cell immunoglobulin-like receptor genotyping. *Tissue Antigens* 64: 462–468.
 19. Hsu, K. C., S. Chida, D. E. Geraghty, and B. Dupont. 2002. The killer cell immunoglobulin-like receptor (KIR) genomic region: gene-order, haplotypes and allelic polymorphism. *Immunol. Rev.* 190: 40–52.
 20. Montaldo, E., G. Del Zotto, M. Della Chiesa, M. C. Mingari, A. Moretta, A. De Maria, and L. Moretta. 2013. Human NK cell receptors/markers: a tool to analyze NK cell development, subsets and function. *Cytometry A*. 83: 702–713.
 21. Sivori, S., M. Vitale, L. Morelli, L. Sanseverino, R. Augugliaro, C. Bottino, L. Moretta, and A. Moretta. 1997. p46, a novel natural killer cell-specific surface molecule that mediates cell activation. *J. Exp. Med.* 186: 1129–1136.
 22. Pessino, A., S. Sivori, C. Bottino, A. Malaspina, L. Morelli, L. Moretta, R. Biassoni, and A. Moretta. 1998. Molecular cloning of NKp46: a novel member of the immunoglobulin superfamily involved in triggering of natural cytotoxicity. *J. Exp. Med.* 188: 953–960.
 23. Sivori, S., M. Falco, E. Marcenaro, S. Parolini, R. Biassoni, C. Bottino, L. Moretta, and A. Moretta. 2002. Early expression of triggering receptors and regulatory role of 2B4 in human natural killer cell precursors undergoing in vitro differentiation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99: 4526–4531.
 24. Björkström, N. K., P. Riese, F. Heuts, S. Andersson, C. Fauriat, M. A. Ivarsson, A. T. Björklund, M. Flodström-Tullberg, J. Michaëlsson, M. E. Rottenberg, 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.
 25. Pende, D., G. M. Spaggiari, S. Marcenaro, S. Martini, P. Rivera, A. Capobianco, M. Falco, E. Lanino, I. Pierri, R. Zambello, et al. 2005. 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* 105: 2066–2073.
 26. Bauer, S., V. Groh, J. Wu, A. Steinle, J. H. Phillips, L. L. Lanier, and T. Spies. 1999. Activation of NK cells and T cells by NKG2D, a receptor for stress-inducible MICA. *Science* 285: 727–729.
 27. Salih, H. R., H. Antropius, F. Gieseke, S. Z. Lutz, L. Kanz, H.-G. Rammensee, and A. Steinle. 2003. Functional expression and release of ligands for the activating immunoreceptor NKG2D in leukemia. *Blood* 102: 1389–1396.
 28. Pende, D., S. Parolini, A. Pessino, S. Sivori, R. Augugliaro, L. Morelli, E. Marcenaro, L. Accame, A. Malaspina, R. Biassoni, 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.
 29. Vitale, M., C. Bottino, S. Sivori, L. Sanseverino, R. Castriconi, E. Marcenaro, R. Augugliaro, L. Moretta, and A. Moretta. 1998. NKp44, a novel triggering surface molecule specifically expressed by activated natural killer cells, is involved in non-major histocompatibility complex-restricted tumor cell lysis. *J. Exp. Med.* 187: 2065–2072.
 30. Cantoni, C., C. Bottino, M. Vitale, A. Pessino, R. Augugliaro, A. Malaspina, S. Parolini, L. Moretta, A. Moretta, and R. Biassoni. 1999. NKp44, a triggering receptor involved in tumor cell lysis by activated human natural killer cells, is a novel member of the immunoglobulin superfamily. *J. Exp. Med.* 189: 787–796.
 31. Muntasell, A., M. C. Ochoa, L. Cordeiro, P. Berraondo, A. López-Díaz de Cerio, M. Cabo, M. López-Botet, and I. Melero. 2017. Targeting NK-cell checkpoints for cancer immunotherapy. *Curr. Opin. Immunol.* 45: 73–81.
 32. Jondal, M., C. Spine, and S. Targan. 1978. Human spontaneous killer cells selective for tumour-derived target cells. *Nature* 272: 62–64.
 33. Yan, Y., P. Steinhilber, H. G. Klingemann, D. Dennig, B. H. Childs, J. McGuirk, and R. J. O'Reilly. 1998. Antileukemia activity of a natural killer cell line against human leukemias. *Clin. Cancer Res.* 4: 2859–2868.
 34. Nanbakhsh, A., C. Pochon, A. Mallavialle, S. Amsellem, J. H. Bourhis, and S. Chouaib. 2014. c-Myc regulates expression of NKG2D ligands ULBP1/2/3 in AML and modulates their susceptibility to NK-mediated lysis. *Blood* 123: 3585–3595.
 35. Robinson, T. M., P. V. O'Donnell, E. J. Fuchs, and L. Luznik. 2016. Haploidentical bone marrow and stem cell transplantation: experience with post-transplantation cyclophosphamide. *Semin. Hematol.* 53: 90–97.
 36. Huang, X.-J., X.-Y. Zhao, D.-H. Liu, K.-Y. Liu, and L.-P. Xu. 2007. Deleterious effects of KIR ligand incompatibility on clinical outcomes in haploidentical hematopoietic stem cell transplantation without in vitro T cell depletion. *Leukemia* 21: 848–851.
 37. Gagne, K., C. Willem, N. Legrand, Z. Djaoud, G. David, P. Rettman, C. Bressollette-Bodin, D. Senitzer, J. Esbelin, A. Cesbron-Gautier, 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.
 38. Roberto, A., C. Di Vito, E. Zaghi, E. M. C. Mazza, A. Capucetti, M. Calvi, P. Tentorio, V. Zanon, B. Sarina, J. Mariotti, et al. 2018. The early expansion of anergic NKG2A^{pos}/CD56^{dim}/CD16^{neg} natural killer represents a therapeutic target in haploidentical hematopoietic stem cell transplantation. *Haematologica* 103: 1390–1402.

RESULTATS

ARTICLE N°2: Genetic and Molecular Basis of Heterogeneous NK Cell Responses against Acute Leukemia

Dhon Roméo Makanga, Francesca Da Rin de Lorenzo, Gaëlle David, Catherine Willem, Léa Dubreuil, Nolwenn Legrand, Thierry Guillaume, Pierre Peterlin, Amandine Lebourgeois, Marie Christine Béné, Alice Garnier, Patrice Chevallier, Ketevan Gendzekhadze, Anne Cesbron, Katia Gagne, Béatrice Clemenceau and Christelle Retière.

Cancers, **2020**, 12, 1927

Les cellules NK sont des effecteurs cytotoxiques clés de l'immunité innée contre les cellules tumorales (Iannello et al., 2016) ou infectées par un virus (Waggoner et al., 2016). Elles sont capables de détecter l'absence ou la faible expression des molécules HLA de classe I à la surface des cellules tumorales ou infectées par un virus via les récepteurs KIR inhibiteurs (Kärre, 1991). Sur la base de leur reconnaissance des molécules HLA de classe I, un fort intérêt pour les cellules NK est porté en greffe de CSH pour optimiser l'effet GvL. Dans le contexte des leucémies aigües, l'immunosurveillance induite par les cellules NK nécessite la mise en place d'une synapse immunologique entre la cellule NK et la cible leucémique, impliquant l'interaction des récepteurs inhibiteurs et activateurs avec leurs ligands exprimés à la surface des cellules tumorales. Les principaux récepteurs inhibiteurs NK comprennent les KIR et le NKG2A qui sont spécifiques des molécules HLA de classe I. Les récepteurs activateurs NK connus pour être impliqués dans le rôle anti-leucémique des cellules NK comprennent les récepteurs NKG2D, DNAM-1 et des NCR tels que NKp30, NKp44 et NKp46 (Del Zotto et al., 2017) (Parham, 2015) (Gaggero et al., 2018) (Niehrs et al., 2019) (Barrow et al., 2018). Ces récepteurs activateurs reconnaissent des ligands induits ou surexprimés à la surface des cellules tumorales.

Les gènes KIR et HLA de classe I participent à la formation structurelle et fonctionnelle du répertoire des cellules NK. Les familles de gènes KIR et HLA constituent la paire récepteur/ligand la plus polymorphe et polygénique chez l'homme, et leurs interactions fonctionnelles entraînent une grande diversité de cellules NK avec un nombre limité de gènes codés par la lignée germinale (Parham, 2015). Selon le modèle de différenciation des cellules NK décrit par Björsktorm et ses collaborateurs (Björkström et al., 2010), les sous-populations NK peuvent être définies sur la base des marqueurs de différenciation NKG2A, KIR et CD57. De plus, le CMV humain modifie drastiquement ce répertoire de cellules NK en favorisant l'expansion massive et permanente des cellules NK mémoires ou adaptatives qui expriment le

récepteur CD94/NKG2C (Béziat et al., 2013) (Della Chiesa et al., 2013) (Foley et al., 2012). Ces populations NK NKG2C⁺ amplifiées co-expriment préférentiellement les récepteurs KIR inhibiteurs impliqués dans l'éducation des cellules NK (Djaoud et al., 2013).

Dans cette étude, nous avons émis l'hypothèse que les marqueurs immunogénétiques KIR/HLA et le statut CMV contribuent à la structuration en fréquence des sous-populations de cellules NK et que les sous-populations NK ne partagent pas un potentiel de dégranulation similaire contre les leucémies aiguës en fonction de leur nature. Ainsi, nous avons réalisé une étude approfondie du potentiel anti-leucémique des sous-populations NK contre un panel de lignées de leucémies aiguës myéloïdes et lymphoïdes et les cellules leucémiques primaires, en prenant en compte les paramètres génétiques KIR et HLA, le stade de développement des cellules NK et le statut CMV chez des donneurs de sang.

Pour étudier la diversité du potentiel anti-leucémique des cellules NK, nous avons d'abord étudié la dégranulation des cellules NK issues d'une cohorte de validation de donneurs sains (n=14) contre un panel de lignées tumorales hématologiques d'origine myéloïde et lymphoïde. Les lignées lymphoïdes, notamment les lignées de leucémies aiguës lymphoblastiques (LAL) et de lymphomes, étaient celles qui stimulaient très significativement la dégranulation des cellules NK comparée aux lignées de leucémies aiguës myéloïdes (LAM). La diversité des réponses des cellules NK observées contre ces cibles cellulaires nous a conduit à réaliser la caractérisation phénotypique de toutes les lignées cellulaires cibles pour l'expression des ligands des récepteurs NK connus pour être impliqués dans la modulation des fonctions effectrices des cellules NK. L'analyse du clustering hiérarchique de l'expression des ligands des récepteurs NK avec le logiciel Genesis[®] a permis de mettre en évidence deux clusters de lignées cellulaires cibles. Le premier cluster, constitué principalement de lignées cellulaires d'origine lymphoïde à l'exception de KG1, qui a montré une forte expression des molécules HLA de classe I, HLA-E, des récepteurs ULBP1/2/5/6 et CD48 que les lignées

cibles du deuxième cluster. Par contre, le second cluster, constitué principalement des lignées de LAM à l'exception de HP Ball, a montré une forte expression des ligands ULBP3/4, MICA-A/B, Nectin-2 (CD112) et PVR (CD155) que les lignées du premier cluster.

Dans le but de poursuivre notre étude sur une cohorte de donneurs sains plus large, nous avons focalisé notre étude sur la lignée H9 (LAL) et la lignée KG1 (LAM), deux lignées cellulaires cibles représentatives de chaque cluster qui sont reconnues différemment par les cellules NK. L'expression des récepteurs activateurs NKG2D, DNAM-1 et 2B4 était fortement diminuée à la surface des cellules NK stimulées contre H9 que sur les cellules NK stimulées contre la KG1 par rapport au cellules NK non stimulées. Ces résultats suggèrent que ces récepteurs activateurs NKG2D, DNAM-1 et 2B4 étaient potentiellement plus engagés avec leurs ligands exprimés à la surface de la lignée H9 que la lignée KG1.

Nous avons étudié le potentiel de dégranulation des cellules NK contre les cibles cellulaires H9 (LAL) et KG1 (LAM) à partir d'une cohorte plus large de 68 donneurs de sang. Nous avons montré que la lignée H9 stimule plus fortement la dégranulation des cellules NK que la lignée KG1, mettant en évidence chez les donneurs de bons répondeurs et de mauvais répondeurs contre chaque lignée. En effet, les meilleurs répondeurs contre H9 n'étaient pas systématiquement les bons répondeurs contre KG1, et inversement, les bons répondeurs contre KG1 n'étaient pas tous bons répondeurs contre H9. Nos résultats montrent une large diversité inter-individuelle des réponses des cellules NK contre les cellules leucémiques. De plus, la réactivité des cellules NK dépendait de la nature des cellules leucémiques, ce qui suggère que différentes sous-populations NK sont engagées en fonction de la nature de la leucémie.

Ces observations nous ont conduits à explorer la diversité intra-individuelle des cellules NK. Pour ce faire, nous avons défini les sous-populations NK en ciblant les marqueurs NKG2A, KIR2DL2/3 (désigné ici KIR), NKG2C et CD57 et nous avons déterminé

la fréquence de chaque sous-population NK par cytométrie en flux multicolore à partir de 68 donneurs sains, qui étaient repartis selon leurs caractéristiques génétiques KIR, HLA de classe I et le statut CMV. L'analyse hiérarchique du clustering de 9 sous-populations cellulaires NK basée sur les marqueurs NKG2A, KIR, CD57 et NKG2C des 68 donneurs sains a permis d'identifier les clusters de donneurs caractérisés par un phénotype spécifique du répertoire de cellules NK lié à un profil immunogénétique KIR et HLA et du statut CMV particulier (Figure 17).

Nous avons ensuite étudié le potentiel de dégranulation de chaque sous-population NK contre les lignées leucémiques H9 et KG1. Nous avons par la suite validé nos données obtenues contre ces lignées en réalisant l'étude de la dégranulation de chaque sous-population NK contre deux cibles leucémiques primaires, une cible LAL et une cible LAM. Les résultats ont montré que les sous-populations de cellules NK les plus efficaces contre les LAL expriment le récepteur NKG2A et représentent les sous-populations les plus fréquentes du répertoire des cellules NK (Figure 17). En revanche, les sous-populations de cellules NK CD57⁺ et/ou KIR⁺, faiblement représentées dans le répertoire de cellules NK, étaient les plus efficaces contre les LAM (Figure 17).

Par ailleurs, notre étude a mis en évidence l'amplification des sous-populations NK NKG2C⁺ sur une petite cohorte de donneurs infectés par le CMV (n=8) comme précédemment décrit (Béziat et al., 2012) (Della Chiesa et al., 2013) (Foley et al., 2012) (Djaoud et al., 2013). En prenant en compte les 9 sous-populations NK étudiées sur la base de l'expression des marqueurs NKG2A, KIR, CD57 et NKG2C, les sous-populations NK NKG2C⁺ étaient parmi les sous-populations NK les moins efficaces contre toutes les cibles leucémiques.

En conclusion, nos données peuvent aider à optimiser la sélection de donneurs de CSH sur des bases immunogénétiques KIR/HLA pour les patients atteints de LAL et identifier les

meilleurs candidats de cellules NK en immunothérapie pour le traitement de LAM. Les larges polymorphismes des gènes KIR et HLA de classe I nécessitent de poursuivre ces études à partir de cohortes plus larges de donneurs de sang.

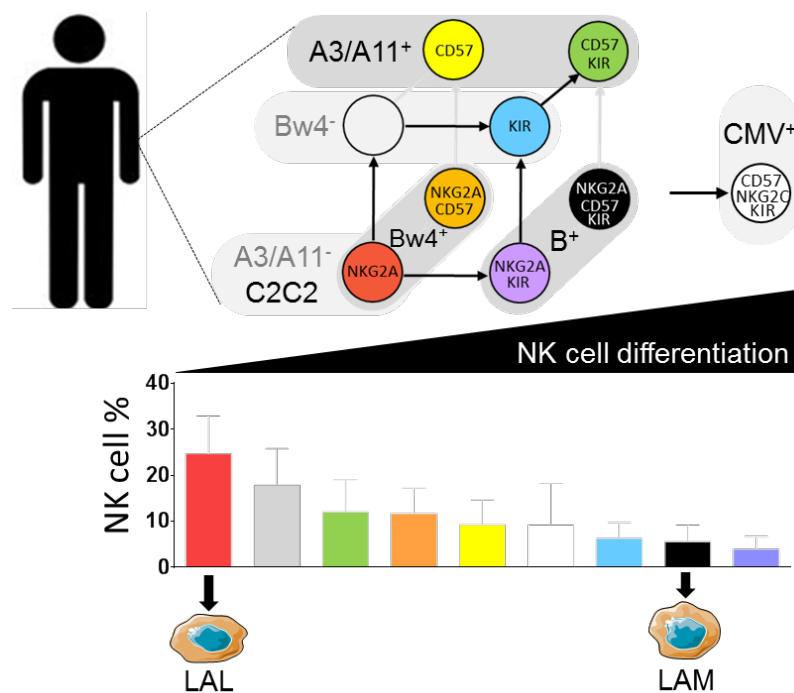



Figure 17 : Bases génétiques et moléculaires des réponses anti-leucémiques des cellules NK.

L'analyse des sous-populations NK basée sur les marqueurs NKG2A, KIR, CD57 et NKG2C de 68 donneurs de sang a permis d'identifier des groupes de donneurs caractérisés par un répertoire phénotypique spécifique de cellules NK lié à un profil immunogénétique KIR et HLA particulier et au statut CMV. Sur le plan fonctionnel, les LAL étaient mieux reconnues par les cellules NK que les LAM. Cependant, il existe une grande disparité inter-individuelle des réponses des cellules NK contre la même cible leucémique, mettant en évidence les bons et les mauvais repondeurs. Les sous-populations NK les plus efficaces contre les LAL expriment le NKG2A et représentent les populations NK les plus fréquentes dans le répertoire des cellules NK. En revanche, les sous-populations de cellules NK minoritaires CD57⁺ ou/et KIR⁺ étaient plus efficaces contre les LAM.

Article

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

Dhon Roméo Makanga^{1,2,3}, Francesca Da Rin de Lorenzo^{1,2,3}, Gaëlle David^{1,2,3}, Catherine Willem^{1,2,3}, Léa Dubreuil^{1,2,3}, Nolwenn Legrand^{1,2,3}, Thierry Guillaume^{2,4}, Pierre Peterlin⁴, Amandine Lebourgeois⁴, Marie Christine Béné^{2,3,5}, Alice Garnier⁴, Patrice Chevallier^{2,3,4}, Ketevan Gendzekhadze⁶, Anne Cesbron^{1,7}, Katia Gagne^{1,2,3,7}, Béatrice Clemenceau^{2,3,†} and Christelle Retière^{1,2,3,*,†} 

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

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

³ LabEx IGO “Immunotherapy, Graft, Oncology”, F-44000 Nantes, France

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

⁵ Hematology Biology, CHU, 44000 Nantes, France

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

⁷ LabEx Transplantex, Université de Strasbourg, 67000 Strasbourg, France

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

† The last two authors contributed equally to this work.

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



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

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

1. Introduction

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

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

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

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

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

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

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

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

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

2. Results

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

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

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

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

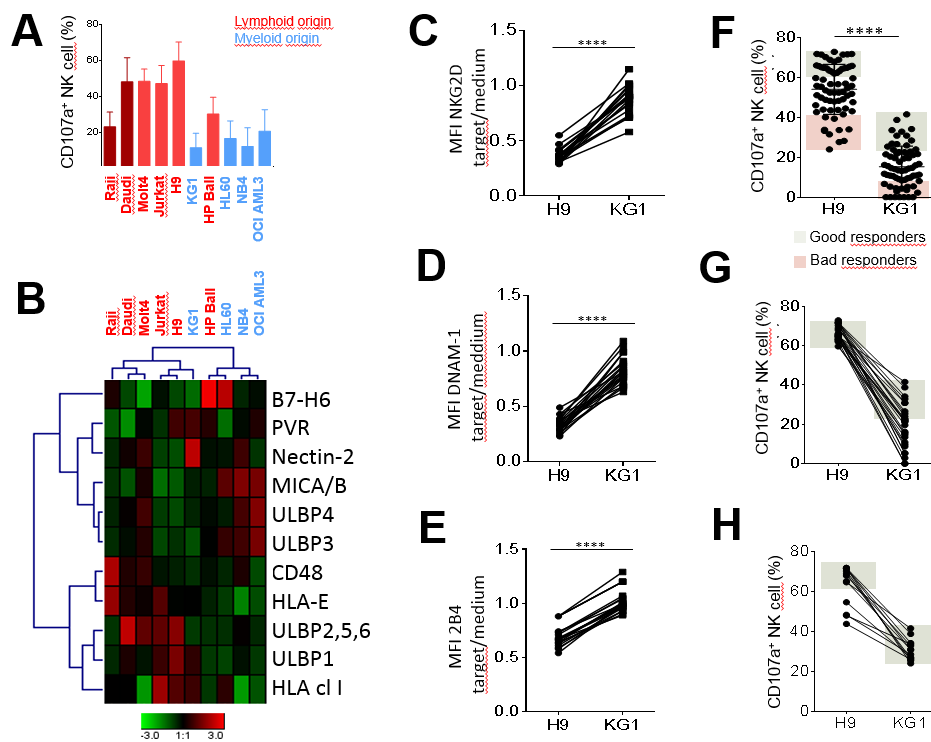


Figure 1. Inter- and intra-individual heterogeneity of NK cell responses against a panel of myeloid and lymphoid target cells. **(A)** Histogram outlining NK (CD3⁻ CD56⁺) cell degranulation observed after 5 h incubation in the presence of myeloid cell lines (blue bar) and lymphoid cell lines (red bar)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

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

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

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

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

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

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

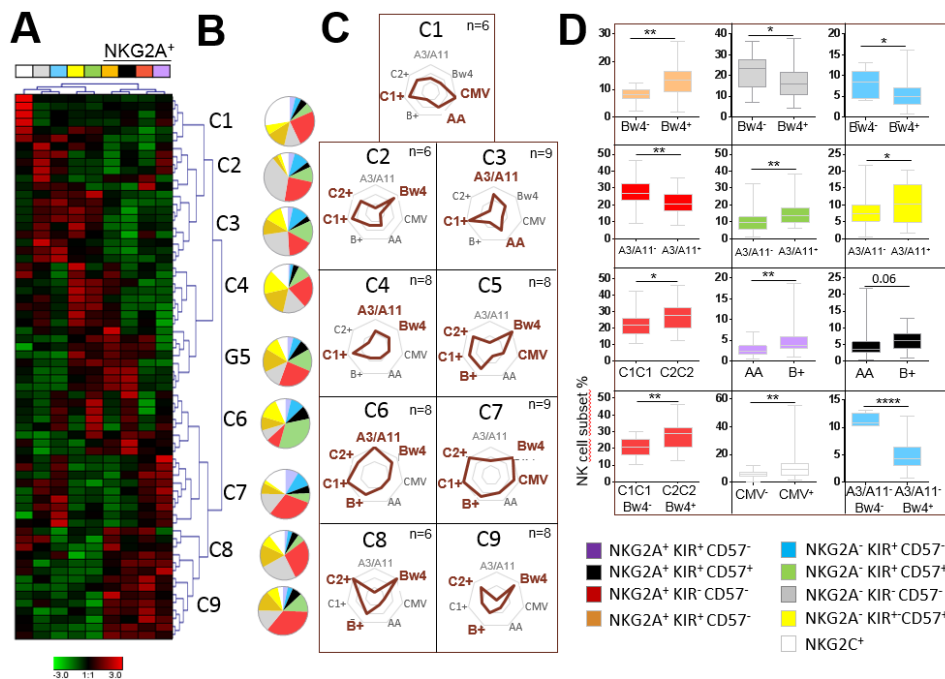


Figure 2. Impact of the immunogenetic KIR/HLA profile and CMV status on the structuration of the NK cell repertoire. (A) Heatmap (Genesis[®]) clustering of healthy blood donors (n = 68) from the frequency of nine NK cell subsets targeted by flow cytometry based on NKG2A, KIR, NKG2C and CD57 markers.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

2.4. NKG2A⁺ NK Cell Subsets are the Most Efficient against ALL Target Cells

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

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

2.5. KIR⁺ and CD57⁺ NK Cell Subsets are the Most Efficient against AML Target Cells

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

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

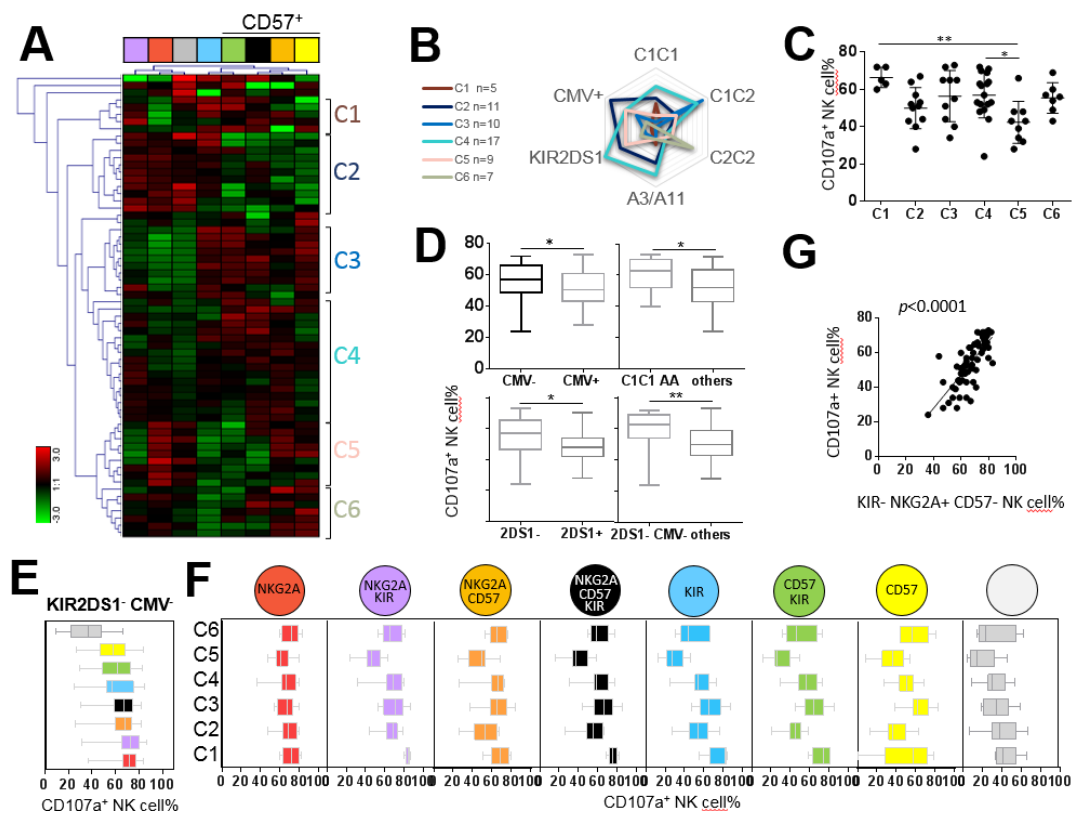


Figure 3. NKG2A⁺ NK cell subsets are the most efficient against the H9 ALL cell line. (A) Heatmap (Genesis[®]) clustering of healthy blood donors (n = 68) from the degranulation of eight targeted NK cell subsets. NK cell subset degranulation was assessed after 5 h incubation in the presence of the H9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

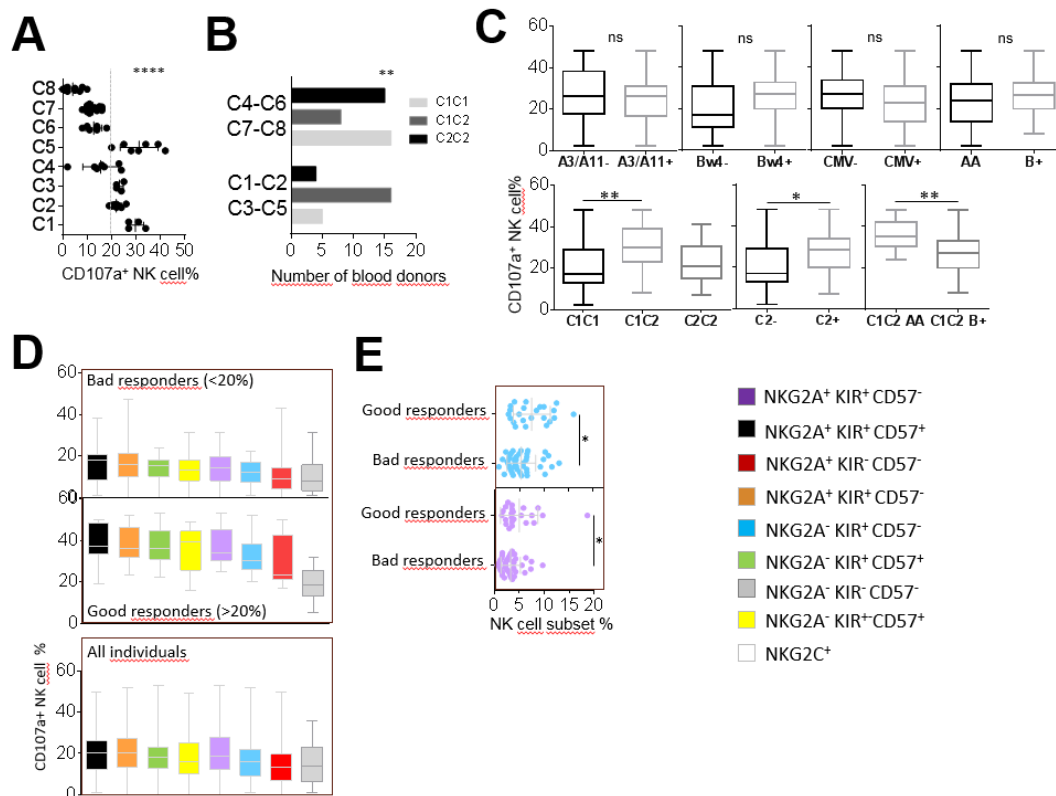


Figure 4. CD57⁺ NK cell subsets are the most efficient against the KG1 AML cell line. (A) Dot plots illustrating the whole NK cell degranulation of eight clusters of individuals. (B) Histograms indicating the number of individuals according to HLA-C environment (C1C1, C1C2 and C2C2) for good (C1, C2,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

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

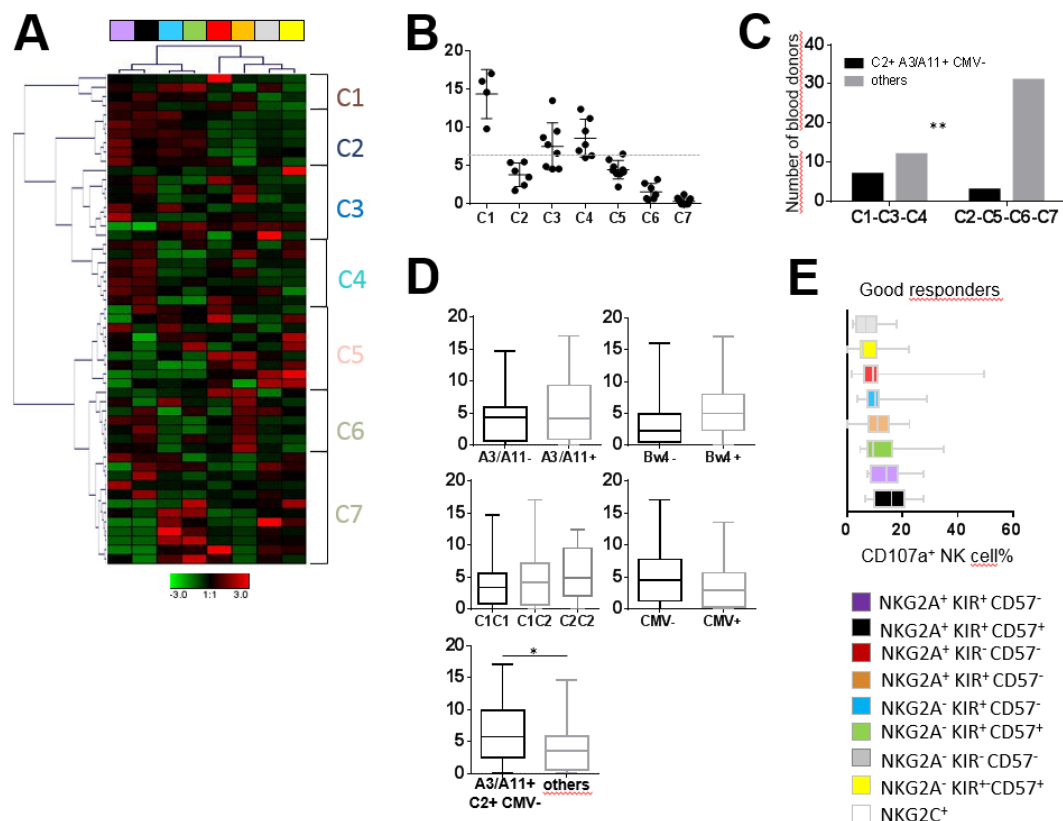


Figure 5. KIR⁺ NK cell subsets are the most efficient against primary AML blasts. (A) Heatmap (Genesis[®]) clustering of healthy blood donors (n = 51) from the degranulation of eight targeted NK cell subsets. NK cell subset degranulation was assessed after 5 h incubation in the presence of primary AML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

2.6. Hyporesponsiveness of CMV-Driven NKG2C⁺ NK Cell Subsets against Leukemia Target Cells

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

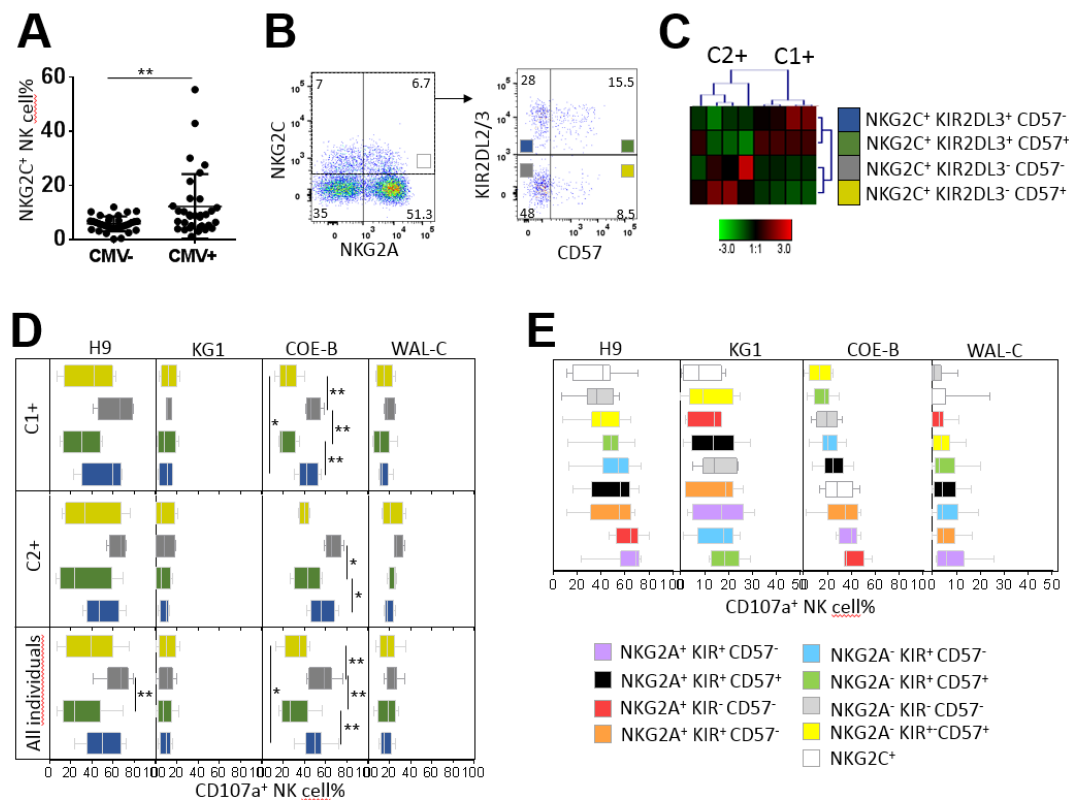


Figure 6. Degranulation potential of CMV-driven NKG2C⁺ NK cell subsets against leukemia target cells. (A) Dot plots of NKG2C⁺ NK cell frequencies in CMV⁻ (n = 32) and CMV⁺ (n = 36) individuals. (B) Density plots illustrating the cell strategy to target NKG2C⁺ NK cell subsets expressing or not expressing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

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

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

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

3. Discussion

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

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

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

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

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

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

4. Materials and Methods

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

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

4.2. HLA and KIR Genotyping

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

4.3. HCMV Serology

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

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

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

4.5. CD107a Mobilization Assay Detected by Flow Cytometry

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

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

4.6. Hierarchical Clustering Analysis of NK Cell Phenotype and Degranulation

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

4.7. Statistical Analyses

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

5. Conclusions

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

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

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

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

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

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

Appendix A

A.1. HLA and KIR Genotyping

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

A.2. NK Cell Phenotypic Analysis by Flow Cytometry

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

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

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

References

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

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

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

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



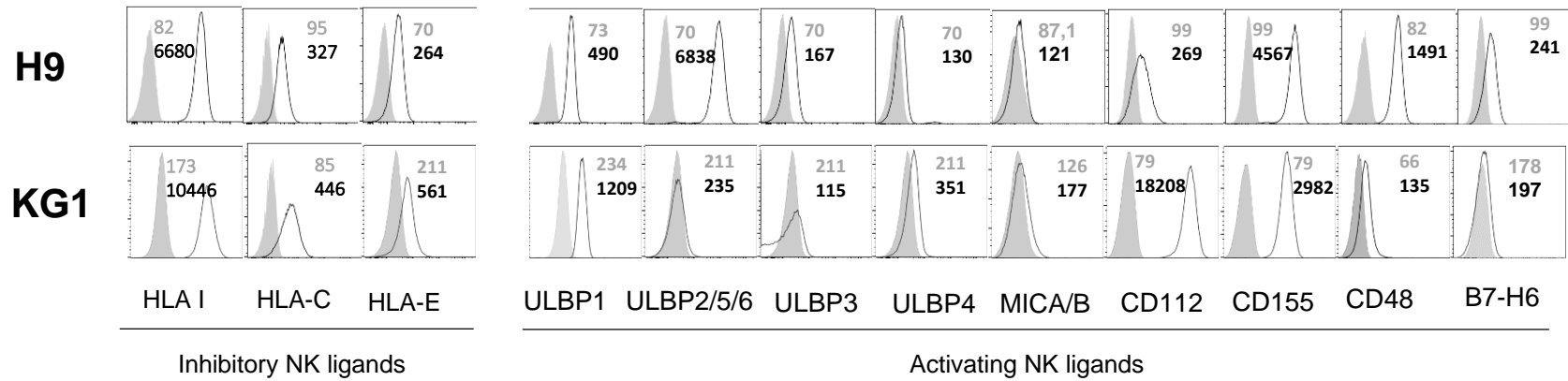


Figure S1: Immunophenotyping of H9 ALL and KG1 AML cell lines. Representative density plots illustrating inhibitory and activating NK ligand expression on H9 ALL and KG1 AML cell lines. Cell lines were stained using mAb (clear grey) and isotype control (filled grey) and were analyzed by flow cytometry.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

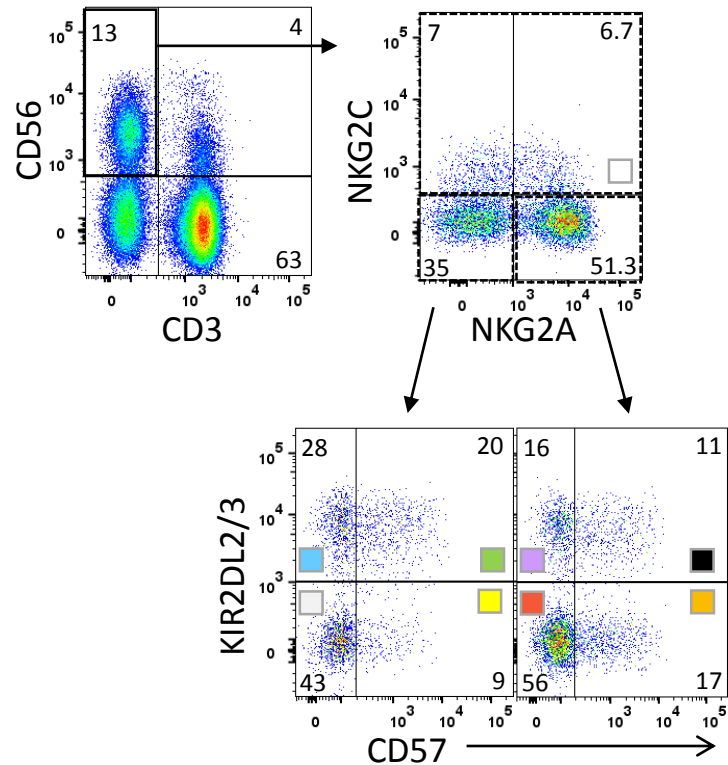
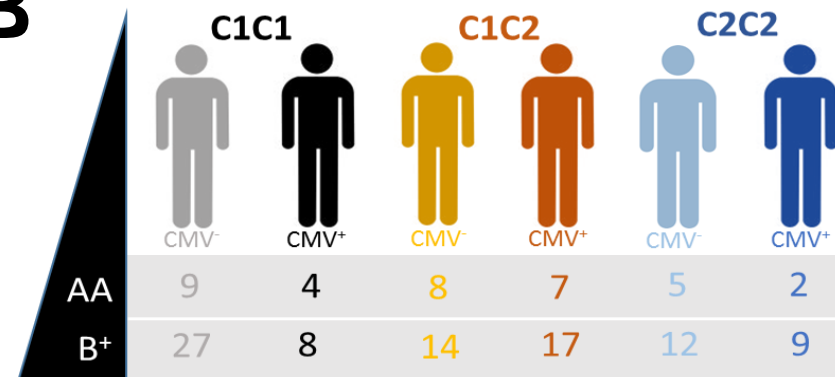
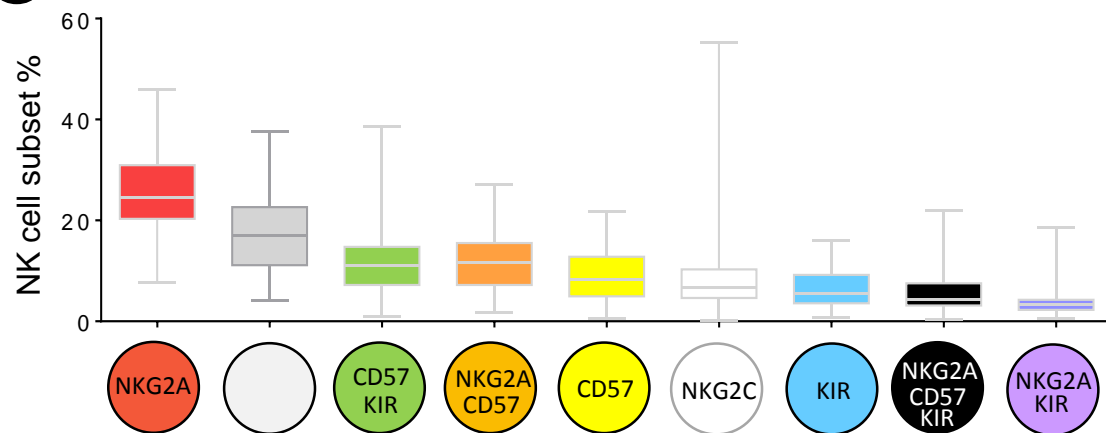
A**B****C**

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

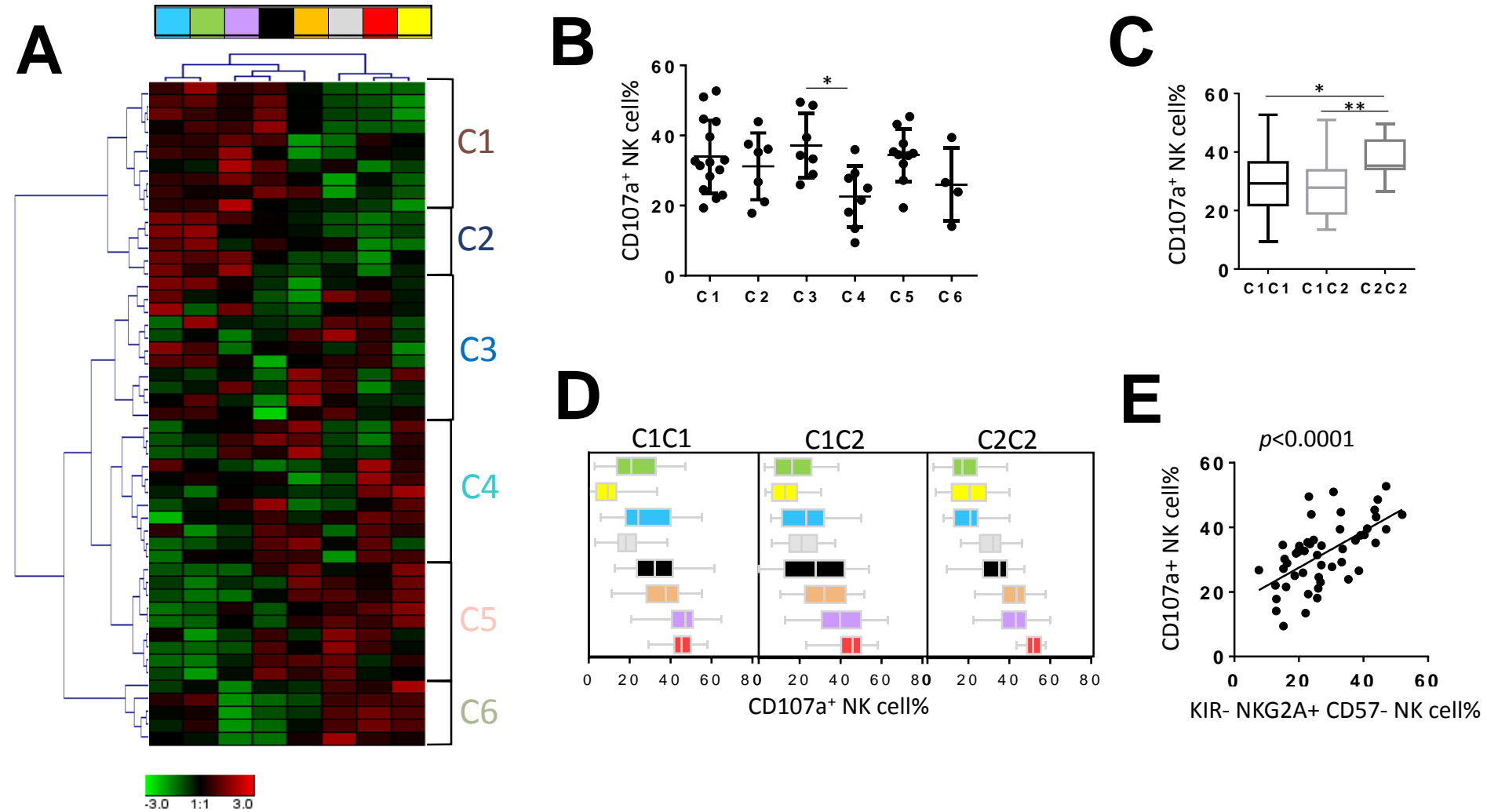
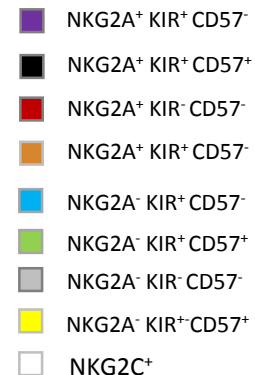


Figure S3: NKG2A⁺ NK cell subsets are the most efficient against primary ALL blasts. (A) Heatmap clustering 51 blood donors (C1 to C6) from the degranulation of 8 NK cell subsets against primary ALL COE-B blasts. Each column is dedicated to a defined NK cell subset. (B) Dot plots of the whole NK cell degranulation of all blood donors clustered from C1 to C6. (C) Whisker graphs of the whole NK cell degranulation according to the HLA-C environment (C1C1, C1C2 and C2C2) in 51 blood donors. (D) Whisker graphs of degranulation frequency of the 8 investigated NK cell subsets of C1C1, C1C2 and C2C2 individuals. (E) Correlation between frequencies of NKG2A⁺KIR⁻CD57⁻ NK cells and whole NK cell degranulation from 51 blood donors.



RESULTATS

ARTICLE N°3: Posttransplant Cyclophosphamide and Antithymocyte Globulin versus Posttransplant Cyclophosphamide as Graft-versus-Host Disease Prophylaxis for Peripheral Blood Stem Cell Haploidentical Transplants: Comparison of T Cell and NK Effector Reconstitution.

Dhon Roméo Makanga, Thierry Guillaume, Catherine Willem, Nolwenn Legrand, Katia Gagne, Anne Cesbron, Ketevan Gendzekhadze, Pierre Peterlin, Alice Garnier, Amandine Le Bourgeois, Marie C. Béné Patrice Chevallier and Christelle Retière.

The Journal of Immunology, **2020**, 205 : 1441 – 1448.

La greffe de CSH haplo-identiques est indiquée pour le traitement des hémopathies malignes chez des patients n'ayant pas de donneurs apparentés ou non-apparentés HLA 10/10 identiques et éligibles pour cette procédure de greffe. Deux principaux traitements immunosuppresseurs sont utilisés dans le contexte des greffes de CSH haplo-identiques non-T déplétées pour limiter le risque de survenue de la GvHD aigüe en éliminant les lymphocytes T *in vivo* : l'approche « chinoise » qui utilise de fortes doses d'ATG (Liu et al., 2008) et l'approche « Baltimore » qui utilise de fortes doses de Cyclophosphamide Post-greffe (PTCy) (Luznik et al., 2008). L'incidence de la GvHD aigüe est réduite avec l'ATG ou le PTCy quand la moelle osseuse est utilisée comme source de greffon après greffe de CSH haplo-identiques. Pour des raisons pratiques, mais également pour favoriser la prise de greffe et l'effet GvL en raison du nombre plus élevé des cellules souches CD34⁺ mobilisées, les cellules souches du sang périphérique (PBSC) sont désormais de plus en plus préférées à la moelle osseuse. Cependant, l'infusion de PBSC est associée à de fortes incidences de GvHD aigüe, probablement en raison de la quantité plus élevée de cellules T du donneur présentes dans le greffon de PBSC (Bashey et al., 2017) (Ruggeri et al., 2018). Par conséquent, l'association du PTCy avec l'anti-thymoglobuline (ATG) peut aider à réduire l'incidence de la GvHD.

Nous avons rapporté, lors d'une étude précédente (**Article n°1**), que la greffe de CSH haplo-identiques de PBSC avec PTCy était accompagnée d'incidence élevée de GvHD aigüe de grade 2-4. Cette incidence élevée était associée aux incompatibilités génétiques KIR/HLA entre le donneur et le receveur, mais également à des fréquences élevées de cellules NK différenciées et activées.

Pour réduire cette incidence de GvHD aigüe, l'ATG a été ajouté au PTCy dans une nouvelle cohorte de 26 patients. Dans cette étude, la reconstitution immunitaire précoce, en particulier des compartiments T et NK, a été comparée après les deux modalités de greffe

(PTCy + ATG versus PTCy), en étudiant leur influence sur le devenir clinique des patients. Cette étude rétrospective a inclus 58 adultes ayant bénéficié d'un conditionnement RIC à base de Cyclosporine et de Mycophénolate Mofetyl (MMF) + PTCy (n=32) ou de PTCy + ATG (n=26) comme traitements prophylactiques contre la GvHD. Tous les patients inclus dans l'étude ont reçu comme greffon des cellules souches du sang périphérique (PBSC). Les deux groupes de patients partageaient les caractéristiques similaires à l'exception du nombre médian de lymphocytes T CD3⁺ perfusés qui était significativement plus élevé pour le groupe de patients PTCy + ATG. Des échantillons sanguins de tous les patients ont été prélevés trois fois par semaine de J0 à J30, puis à J60 et J90/J100 afin d'évaluer la reconstitution des lymphocytes T et des cellules NK par cytométrie en flux.

Les résultats montrent que le PTCy + ATG limite significativement l'apparition de la GvHD aigüe de grade 2-4 comparé au PTCy seul, peut-être en raison de l'effet combiné de la reconstitution des lymphocytes T et des cellules NK. En effet, alors qu'une reconstitution plus lente des cellules T avec PTCy + ATG peut limiter l'apparition de la GvHD, la reconstitution plus rapide de certaines sous-populations cellulaires NK peut aider à éviter les rechutes.

Le compartiment des cellules NK semble être une arme clé pour éliminer les cellules leucémiques résiduelles avant la reconstitution de cellules T efficaces. Il est intéressant de noter que parmi les nombreuses sous-populations NK définies en fonction de leur combinaison de marqueurs de surface, KIR2DL2/3, NKG2A, CD57 et NKG2C, six groupes d'individus ont été identifiés ici et la présence de certaines sous-populations NK semble avoir des impacts différents sur les conséquences post-greffes de CSH haplo-identiques. A J30, lorsque la fréquence des cellules NK est fortement augmentée, un premier cluster de patients a été identifié (cluster 1), caractérisé par un répertoire de cellules NK avec une prédominance des sous-populations NK NKG2A⁻ KIR2DL2/3⁻ CD57⁻. Dans ce groupe, la majorité des patients appartenaient au groupe PTCy et 78% des patients ont rechuté, ce qui suggère que ce

profil de répertoire NK n'est pas efficace pour éliminer la leucémie. L'ATG peut contribuer à réduire la fréquence de cette sous-population, ce qui peut expliquer en partie le fait que la rechute n'était pas augmentée dans le groupe PTCy + ATG. En revanche, la sous-population NK NKG2A⁺ KIR2DL2/3⁻ CD57⁻ est plus prédominante dans le cluster 5, caractérisé par de plus faibles taux de rechute (30%). Une meilleure connaissance des sous-populations de cellules NK les plus efficaces dans la lutte contre les maladies hématologiques est nécessaire pour optimiser simultanément la sélection des donneurs de CSH et pour le transfert adoptif des cellules NK à forte potentialité fonctionnelle.

Des études prospectives plus importantes sont nécessaires pour mieux déterminer les sous-populations cellulaires NK qui peuvent influencer l'incidence de rechute après greffe de CSH haplo-identiques et optimiser la sélection des donneurs de CSH. D'autres études sur l'optimisation des traitements de prévention de la GvHD sont également nécessaires afin de déterminer les protocoles de greffes de CSH haplo-identiques les mieux adaptés pour garantir une meilleure survie des patients après greffe.

Empower
Precision
for Single Cell Analysis



SH800
cell sorter

SONY



This information is current as
of October 15, 2020.

Posttransplant Cyclophosphamide and Antithymocyte Globulin versus Posttransplant Cyclophosphamide as Graft-versus-Host Disease Prophylaxis for Peripheral Blood Stem Cell Haploidentical Transplants: Comparison of T Cell and NK Effector Reconstitution

Dhon Roméo Makanga, Thierry Guillaume, Catherine Willem, Nolwenn Legrand, Katia Gagne, Anne Cesbron, Ketevan Gendzekhadze, Pierre Peterlin, Alice Garnier, Amandine Le Bourgeois, Marie C. Béné, Patrice Chevallier and Christelle Retière

J Immunol 2020; 205:1441-1448; Prepublished online 3 August 2020;

doi: 10.4049/jimmunol.2000578

<http://www.jimmunol.org/content/205/5/1441>

Supplementary Material <http://www.jimmunol.org/content/suppl/2020/07/31/jimmunol.2000578.DCSupplemental>

References This article **cites 34 articles**, 9 of which you can access for free at:
<http://www.jimmunol.org/content/205/5/1441.full#ref-list-1>

Why *The JI*? Submit online.

- **Rapid Reviews! 30 days*** from submission to initial decision
- **No Triage!** Every submission reviewed by practicing scientists
- **Fast Publication!** 4 weeks from acceptance to publication

**average*

Subscription Information about subscribing to *The Journal of Immunology* is online at:
<http://jimmunol.org/subscription>

Permissions Submit copyright permission requests at:
<http://www.aai.org/About/Publications/JI/copyright.html>

The Journal of Immunology is published twice each month by
The American Association of Immunologists, Inc.,
1451 Rockville Pike, Suite 650, Rockville, MD 20852
Copyright © 2020 by The American Association of
Immunologists, Inc. All rights reserved.
Print ISSN: 0022-1767 Online ISSN: 1550-6606.



Email Alerts Receive free email-alerts when new articles cite this article. Sign up at:
<http://jimmunol.org/alerts>

The Journal of Immunology is published twice each month by
The American Association of Immunologists, Inc.,
1451 Rockville Pike, Suite 650, Rockville, MD 20852
Copyright © 2020 by The American Association of
Immunologists, Inc. All rights reserved.
Print ISSN: 0022-1767 Online ISSN: 1550-6606.



Posttransplant Cyclophosphamide and Antithymocyte Globulin versus Posttransplant Cyclophosphamide as Graft-versus-Host Disease Prophylaxis for Peripheral Blood Stem Cell Haploidentical Transplants: Comparison of T Cell and NK Effector Reconstitution

Dhon Roméo Makanga,^{*,†,‡} Thierry Guillaume,^{†,‡} Catherine Willem,^{*,†,‡}
 Nolwenn Legrand,^{*,†,‡} Katia Gagne,^{*,†,‡,§} Anne Cesbron,^{*,§} Ketevan Gendzekhadze,[¶]
 Pierre Peterlin,^{||} Alice Garnier,^{||} Amandine Le Bourgeois,^{||} Marie C. Béné,^{†,‡,#}
 Patrice Chevallier,^{†,‡,||,1} and Christelle Retière^{*,†,‡,1}

A higher incidence of graft-versus-host disease (GVHD) has been observed after haploidentical hematopoietic stem cell transplantation (h-HSCT) with posttransplant cyclophosphamide (PTCY) using peripheral blood stem cells (PBSC) as a source of graft. Moreover, combining PTCY with antithymocyte globulin (ATG) may help to reduce GVHD incidence. In this study, early immune reconstitution, especially of T and NK cell compartments, was compared after both types of transplant (PTCY versus PTCY + ATG) investigate their influence on patient outcomes. This retrospective study included 58 adults who received a reduced intensity conditioning to PBSC h-HSCT with cyclosporine and mycophenolate mofetyl + PTCY ($n = 32$) or PTCY + ATG ($n = 26$) as GVHD prophylaxis. Both groups shared similar characteristics except for the median number of CD3⁺ T cells infused, significantly higher for PTCY + ATG patients. Blood samples from all patients were collected three times a week from day 0 until day 30 then at day 60 and day 90/100 to evaluate T and NK cells reconstitution by flow cytometry. The results show that PTCY + ATG versus PTCY alone significantly limits the occurrence of acute grade 2–4 GVHD after reduced intensity conditioning PBSC h-HSCT, perhaps because of the combined effect of T and NK cell reconstitution. Indeed, although a slower T cell reconstitution with PTCY + ATG may limit GVHD occurrence, the quicker reconstitution of some NK cell subtypes may help with avoiding relapse. Larger prospective studies are needed to better determine which NK cell subsets may influence the incidence of relapse after h-HSCT and optimize donor selection. *The Journal of Immunology*, 2020, 205: 1441–1448.

Haploidentical hematopoietic stem cell transplantation (h-HSCT) has become a standard of care for patients lacking a matched donor (D) and eligible for such a procedure. Two major regimens are used for T-replete h-HSCT to limit the risk of graft-versus-host disease (GVHD) by removing T cells. The Chinese approach uses high-dose antithymocyte globulin (ATG) (1), and the Baltimore approach favors high-dose posttransplant cyclophosphamide (PTCY) (2). The incidence of GVHD is lowered with both ATG or PTCY when considering bone marrow (BM) as a source of graft for h-HSCT. For practical

reasons, but also to favor engraftment and a graft-versus-leukemia (GvL) effect because of higher numbers of mobilized CD34⁺ stem cells, peripheral blood stem cells (PBSC) rather than BM is now increasingly preferred. However, this translates in a significant increase of the incidence of GVHD, probably because of the higher quantity of D T cells infused (3, 4). The concomitant use of PTCY + ATG could help to decrease GVHD incidence in this setting (5).

Immune recovery has been poorly studied so far after h-HSCT (6–8). The reconstituting immune system in this high degree of

*Etablissement Français du Sang, Centre-Pays de la Loire, 44011 Nantes, France; †Université de Nantes, CNRS, INSERM, Centre de Recherche en Cancérologie et Immunologie Nantes-Angers, 44000 Nantes, France; ‡Laboratoire d'Excellence Immunotherapy Graft Oncology, 44000 Nantes, France; §LabEx Transplantex, Université de Strasbourg, 67000 Strasbourg, France; ¶Histocompatibility Laboratory, Department of Hematology and Hematopoietic Cell Transplantation, City of Hope, Duarte, CA 91010; ||Hematology Clinic, Centre Hospitalier-Universitaire, 44000 Nantes, France; and #Hematology Biology, Centre Hospitalier-Universitaire, 44000 Nantes, France

¹P.C. and C.R. have equally contributed to this work.

ORCID: 0000-0001-5482-8565 (T.G.); 0000-0002-1201-3429 (A.C.); 0000-0001-5865-0792 (K. Gendzekhadze); 0000-0002-6569-7414 (M.C.B.); 0000-0001-5943-6990 (C.R.).

Received for publication May 19, 2020. Accepted for publication July 4, 2020.

This work was supported by the Etablissement Français du Sang/Centre Pays de la Loire and by grants from the International Research Group on Unrelated Hematopoietic Stem Cell Transplantation, la Ligue contre le Cancer (Comité de Loire-Atlantique, Comité de la Vienne, Comité de la Vendée, Comité du Morbihan et le Comité des Deux Sèvres), le Département Hospitalo-Universitaire

Oncogreffe, Leucémie Espoir Atlantique Famille, and Agence de Biomédecine. D.R.M. is a Ph.D. student supported by Industrial Agreement for Training through Research Grant 2017/0850.

Address correspondence and reprint requests to Dr. Christelle Retière, Etablissement Français du Sang-Pays de la Loire, CRCINA, INSERM, CNRS, Université de Nantes, 34 Boulevard Jean Monnet, 44011 Nantes Cedex 01, France. E-mail address: christelle.retiere@efs.sante.fr

The online version of this article contains supplemental material.

Abbreviations used in this article: ALL, acute lymphoblastic leukemia; AML, acute myeloid leukemia; ATG, antithymocyte globulin; BM, bone marrow; D, donor; DFS, disease-free survival; GRFS, GVHD-free/relapse-free survival; GVHD, graft-versus-host disease; GvL, graft-versus-leukemia; h-HSCT, haploidentical hematopoietic stem cell transplantation; HSCT, hematopoietic stem cell transplantation; inc., incompatibility; KIR, killer Ig-like receptor; NRM, nonrelapse mortality; OS, overall survival; PBSC, peripheral blood stem cell; PTCY, posttransplant cyclophosphamide; R, recipient; RIC, reduced intensity conditioning.

Copyright © 2020 by The American Association of Immunologists, Inc. 0022-1767/20/\$37.50

HLA mismatch context mobilizes HLA-regulated NK and T lymphocytes. These immune partners display different functions with complementary and synergic effects over different time-scales. As reported in the matched setting (9), NK cells are the first population to appear after h-HSCT, followed later by T cell reconstitution (8). However, both cell compartments can provide a GvL effect and allow limiting opportunistic viral infections, whereas GVHD is mainly mediated by T cells. Given the ability of NK cells to promptly mount effective alloreactive responses against tumor cells and pathogens, their kinetics and functionality in terms of immune response can certainly influence the clinical outcome of patients receiving a h-HSCT.

NK cells have the ability to overcome the downregulation or even the absence of “self” HLA molecules observed on malignant or virally infected cells that impeaches cytotoxic T cells. Functional NK cell education occurs mostly through interactions between HLA class I molecules and inhibitory receptors, such as the CD94/NKG2A heterodimer and, more prominently, killer Ig-like receptors (KIR) (10). The HLA and KIR gene families represent the most polymorphic and polygenic receptor–ligand pair in humans. They enable a great immunologic diversity of NK cells with a minimum number of germline-encoded genes (11). Both KIR and HLA genetics influence the NK cell repertoire, which is highly variable among individuals. The development of NK cell functional diversity is the product of qualitatively and quantitatively different interactions with host cells (12). A spectrum of functionality thus exists among NK cells, both within and between individuals. In the hematopoietic stem cell transplantation (HSCT) situation, the absence of recognition of HLA class I molecules on recipient (R) cells leads to D KIR-mediated NK cell cytotoxicity (8). Interestingly, CMV infection has recently been associated with the expansion of adaptive-like NK cells with a late differentiation status (13, 14). This NK cell subset is associated with lower relapse rates after reduced intensity conditioning (RIC) HSCT (15).

We have previously reported our experience of PBSC RIC h-HSCT with PTCY showing, as described before, a rate of grade 2–4 acute GVHD of ~57% (8). This was associated with a genetic D/R KIR2DL/HLA (KIR_D/HLA_R) incompatibility (inc.) but also with increased levels of differentiated and activated NK cells. To reduce this high incidence of GVHD, ATG was added to PTCY in a new cohort of 26 patients. This allowed us to evaluate this combination versus PTCY alone on outcomes and to compare the rates of immune NK and T cell reconstitution.

Materials and Methods

Study design

This retrospective study has included 58 consecutive adults with various hematological malignancies who received a RIC PBSC h-HSCT with cyclosporine, mycophenolate mofetil, and PTCY ($n = 32$, period: 08/2014–05/2017) or PTCY + ATG ($n = 26$, period: 05/2017–03/2019) as GVHD prophylaxis in the Hematology Department of Nantes University Hospital. The PTCY group received a Baltimore-based RIC regimen with fludarabine ($n = 10$) or clofarabine ($n = 22$) (2). The PTCY + ATG group received a CloB2A1 regimen consisting of clofarabine 30 mg/m²/d, day –6 to –2, busulfan 3, 4 mg/kg day –3 and –2, and ATG 2.5 mg/kg day –1 (16). This regimen was initiated as of May 2017 after observing a high incidence of grade 2–4 acute GVHD with Baltimore-based RIC regimens between 2014 and 2017. As mentioned above, the main objective of the study was to compare early T and NK cells recoveries between both prophylaxis groups and to appreciate their influence on GVHD and relapse incidences. The secondary objective was to compare the outcomes between both groups in terms of engraftment, overall survival (OS) and disease-free survival (DFS), GVHD-free/relapse-free survival (GRFS), relapse, non-relapse mortality (NRM), and acute and chronic GVHD. The influence of HLA/KIR incompatibilities and KIR genotype was also evaluated for NK cell recoveries and outcomes as well as the role of mature/immature NK cells subsets early after transplant.

The study complies with the Declaration of Helsinki. All patients provided informed consent for collecting their own data from the Project Manager Internet Server database of the European BM Transplantation. In addition, declaration of the preparation and conservation of a biocollection (DC-2014-2340) was submitted to the French Ministry of Research and had received agreement from the Institutional Review Board (2015-DC-1) to study NK cell reconstitution after transplant. This biologic study was approved by the Ethics Review Board of the Nantes University Hospital, and all included patients and Ds provided informed consent. The outcomes and immune reconstitution of some patients of the PTCY group have been already reported previously (8) and have been updated for this study.

HLA and KIR genotyping

High-resolution typing for HLA-A, -B, and -C loci was carried out for all D and R samples by next-generation sequencing, and KIR generic typing was performed on all D samples using a KIR multiplex PCR–sequence-specific primer amplification method (17) as previously described (8). The presence or absence of KIR2DL1, 2DL2, 2DL3, 2DL5, 3DL1, 2DS1, 2DS2, 2DS3, 2DS4/1D, 2DS5, and 3DS1 genes was verified. D KIR genotypes were then determined based on the presence or absence of activating KIR. Thus, a KIR AA genotype was defined by the presence of only KIR2DS4 as activating KIR gene and a KIR B⁺ genotype by the presence of several activating KIR genes (18). KIR ligands such as C1, C2, and Bw4 were defined based on allelic HLA class I typing.

Immunophenotypic analysis by flow cytometry for T and NK cells recovery analyses posttransplant

The immunophenotype of NK and T cells was determined by eight-color multiparameter flow cytometry on graft aliquots and patient samples using the following mAbs: anti-CD56 (HCD56), anti-CD3 (SK7; Sony Biotechnology, San Jose, CA), anti-CD57 (HNK-1), anti-NKp46 (9E2; BD Biosciences, San Jose, CA), anti-NKG2C (134591; R&D Systems, Minneapolis, MN), anti-KIR2DL2/3/2DS3 (GL183), anti-KIR2DL1/2DS1 (EB6), and anti-KIR3DL1/3DS1 (Z27; Beckman Coulter Immunotech, Marseilles, France), as previously described (8). Two eight-color panels have been designed in pairing markers and fluorochromes based on Ag density and brightness, respectively: 1) CD57-FITC, NKG2C-PE, NKG2D-PerCP-Cy5.5, NKG2A-PC7, CD56-allophycocyanin-PC7, and CD3-BV510 and 2) 2B4-FITC, NKp30-PE, DNAM-1-PERCp-Cy5.5, NKp44-PC7, CD56-allophycocyanin-PC7, and CD3-BV510. Spillover and coexpression were taken into consideration. Experimental controls included unstained, single stained, and fluorescence minus one controls. A lock template was created for the acquisition of stained graft and patient samples. All flow cytometry data were acquired on a unique FACSCanto II cytometer in our ISO 9001 certified research laboratory. BD FACSDiva CS&T Research Beads (BD Biosciences) were used systematically before acquisition.

The nine NK cell subsets were also examined, identified according to their differentiation status based on CD57, NKG2A, and KIR2DL3 expression (19) as presented in Supplemental Fig. 1. The NKG2A⁺ subset is the most immature that can lose NKG2A later when acquiring CD57 or KIR expression. The NKG2C⁺ CD57⁺ KIR⁺ subset constitutes an adaptive-like subset described mainly in CMV-infected individuals (14, 20). It can represent more than half of NK cell repertoire. Multiparameter flow cytometry data were acquired on a FACSCanto II instrument (BD Biosciences) and analyzed with FlowJo 10.2 software (Ashland, OR). Samples were collected three times per week between day 0 (day of graft infusion) and day +30 then at day +60 and +90/100 posttransplant. A sample from the graft was obtained also for each patient.

Hierarchical clustering analysis of mature/immature NK cell subsets

A hierarchical clustering of the nine NK cell subsets mentioned above was performed at day 30 following complete linkage using the Genesis software (21).

Statistical analyses

Engraftment was defined as sustained neutrophil recovery with D chimerism >5%. OS was defined as the time from day 0 of allo-HSCT to death or last follow-up for survivors. DFS was defined as the time from day 0 of h-HSCT to the 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 reoccurrence of the disease. Acute and chronic GVHD were classified according to standard criteria (14, 15). GRFS was defined as patients alive with no previous grade 3–4 acute GVHD, nor moderate/severe chronic GVHD, nor relapse (22). NRM was defined as death from any cause without previous relapse or progression.

Categorical data were analyzed by χ^2 tests, and univariate comparisons were performed by the Student *t* test. Comparisons of multiple groups were performed by one-way ANOVA. Probabilities of OS, DFS, and GRFS were calculated using the log-rank test and Kaplan–Meier graphical representation. Analyses were performed using the GraphPad Prism v6.0 software (San Diego, CA). The *p* values <0.05 were considered statistically significant.

Results

Comparison of clinical outcomes between both groups

As shown in Table I, both groups were identical for most of the characteristics, including the disease risk index (23). They differed only regarding the conditioning regimen and median number of CD3⁺ T cells infused, significantly higher for PTCY + ATG patients.

All patients engrafted in the PTCY group, whereas five failed to do so in the PTCY + ATG group (19%, *p* = 0.03). With a median follow-up for alive patients of 43.5 and 24.2 mo for PTCY and PTCY + ATG patients, respectively, OS, DFS, GRFS, relapse, NRM, and deaths were similar between both groups (Table II).

Considering engrafted patients, the incidence of grade 2–4 acute GVHD was significantly lower in the PTCY + ATG subgroup (23.8 versus 59.3%, *p* = 0.004), despite higher numbers of CD3⁺ T cells infused in this group. The incidence of grade 3–4 acute GVHD was similar (PTCY: 18.7% versus PTCY + ATG: 4.7%, *p* = 0.29) as well as that of moderate/severe chronic GVHD (PTCY: 20.6% versus PTCY + ATG: 11.1%, *p* = 0.65). To evaluate the impact of CD3⁺ T cell infused on relapse incidence, we considered

PTCY + ATG group in deleting four patients with high CD3⁺ T cells graft dose (>39.25 $10 \times 7/\text{kg}$) to have similar median CD3⁺ T cells infused in each group (PTCY: 22.69 versus PTCY + ATG: 25.98, *p* = 0.08). In comparing PTCY versus PTCY + ATG group with a similar number of infused CD3⁺ T cells, incidences of relapse were the same (PTCY: 38.7%, *n* = 12/31 versus PTCY + ATG: 31.8%, *n* = 7/22, *p* = 0.82).

NK and T cell recoveries in the PTCY + ATG group and correlation with engraftment, GVHD, and relapse

The NK and T cell recoveries have been already reported for the PTCY group (12). In the PTCY + ATG group, NK cells constituted the main lymphocyte population at day 30 ($0.193 \pm 33 \times 10^9/\text{l}$), day 60 ($0.279 \pm 45 \times 10^9/\text{l}$), and day 100 ($0.301 \pm 45 \times 10^9/\text{l}$) (Fig. 1A). Indeed, T cell counts were particularly low at these three points ($9 \pm 3 \times 10^9/\text{l}$, $17 \pm 11 \times 10^9/\text{l}$, and $53 \pm 42 \times 10^9/\text{l}$, respectively) because of the efficient immunosuppressive combination of ATG and PTCY. Patients with no engraftment had a lower NK cell frequency at day 30 (19.5 versus 52.5% of the lymphocytes, *p* = 0.01), but no difference was observed for T cell reconstitution (Fig. 1B). Thus, to avoid a biased analysis of the T and NK cell repertoires, cellular investigations were then performed from engrafted Rs (*n* = 21). NK and T cell frequencies were similar in patients with or without GVHD occurrence in the PTCY + ATG group (Fig. 1C). This was also the case for patients with or without relapse (Fig. 1D).

Table I. Characteristics of patients (*n* = 58)

Period of transplant	August 2014–May 2017		<i>p</i> Value
	PTCY, <i>n</i> = 32	PTCY + ATG, <i>n</i> = 26	
Median follow-up for alive patients: mo (range)	43.5 (7–64.8)	24.2 (12–34.4)	
Gender: male/female	21/11	16/10	0.96
Median age: y (range)	61 (32–71)	62 (24–71)	0.97
Disease			
AML	14	13	0.78
MDS	6	5	0.89
Myelofibrosis	2	2	
CML	1	0	
ALL	2	0	
NHL	5	4	
HL	2	1	
CLL	0	1	
Lymphoid/myeloid	9/23	6/20	
Disease risk index (low + Int/high + very high)	24/8	15/11	0.26
Previous allotransplant	3	3	1
RIC regimen			<0.001
Baltimore	10	26	
Clo-Baltimore	22		
CloB2			
D			
Median age: y (range)	42 (22–72)	39 (22–65)	0.13
Type	1/2	0/1	0.33
Mother/father	5/8	2/6	0.93
Sister/brother	3/10	7/9	
Daughter/son	0/3	1/0	
Niece/nephew	6	6	
Female D for male R			
ABO compatibility (Com/minor/major)	24/5/3	17/3/6	0.35
D/R CMV status			
–/–	15	21	0.73
–/+	3	5	
+/-	2	2	
+/+	6	4	
CD34 ⁺ graft cells ($10 \times 6/\text{kg}$): median (range)	7.88 (2.88–14.16)	8.79 (3.1–19.94)	0.06
CD3 ⁺ graft cells ($10 \times 7/\text{kg}$): median (range)	22.69 (7.71–38.71)	27.56 (12.48–49.99)	0.01
CD45 ⁺ graft cells ($10 \times 8/\text{kg}$): median (range)	7.9 (5.04–16.06)	8.61 (4.94–16.35)	0.27

CLL, chronic lymphocytic leukemia; CML, chronic myeloid leukemia; Com, compatibility; HL, Hodgkin lymphoma; Int, intermediate; MDS, myelodysplastic syndrome; NHL, non-Hodgkin lymphoma; PTCY, posttransplantation cyclophosphamide.

Table II. Comparison of outcomes between both groups

	PTCY, n = 32	PTCY + ATG, n = 26	p Value
Engraftment	32 (100%)	21 (80.7%)	0.03
OS			0.75
1 y	71.5% (57–89)	61.5% (45–83)	
2 y	58.5% (43–78)	57.4% (41–80)	
DFS			0.98
1 y	59.3% (44–79)	53.8% (37–76)	
2 y	46.8% (32–67)	49.3% (33–73)	
GRFS			0.24
1 y	43.7% (29–64)	53.8% (37–76)	
2 y	31.2% (18–52)	49.3% (33–73)	
Relapses	12 (37.5%)	8 (30.7%)	0.79
Deaths	14 (43.7%)	11 (42.3%)	1
Death from relapse	8 (25%)	6 (23%)	1
NRM	6 (18.7%)	5 (19.2%)	1
Acute GVHD			
Grade 2–4	19 (59.3%)	5 (23.8%)	0.004
Grade 3–4	6 (18.7%)	1 (4.7%)	0.29
Chronic GVHD (moderate/severe)	6 (20.6%)	2 (11.1%)	0.65

Inhibitory KIR_D/HLA_R inc. have previously been shown to be associated with a lower incidence of relapse in the PTCY group (8). KIR_D/HLA_R inc. were evaluated in the group of engrafted PTCY + ATG ($n = 21$), including inhibitory and activating KIR (Table III). The three cases with inhibitory KIR_D/HLA_R inc. showed a lower NK cell frequency between day +30 and +90/100 compared with the cases without KIR_D/HLA_R inc. or with activating KIR_D/HLA_R inc., but the difference was only significant at day 60 between inhibitory KIR_D/HLA_R inc. patients without inc. (15% of lymphocytes versus 68.6%, $p = 0.007$) (Fig. 1E). Because of the low number of D/R pairs with inhibitory KIR_D/HLA_R inc., it was not possible to correlate this parameter to clinical outcome. Regarding the influence of KIR genotype (Table III) on relapse, only 1/7 who received a C1C1 D relapsed compared with 7/14

who received a C2C2 (D9, D11, D12, and D15) or a C1C2 (D17, D19, and D20) D. Finally, patients who did not relapse were documented with a higher frequency of NKG2A⁺ KIR2DL2/3/S2⁻ NK cells (48.6% of lymphocytes versus 76.6%, $p = 0.01$) at day +60 (Fig. 1F).

Comparison of NK and T cell reconstitutions between the PTCY and PTCY + ATG groups

Only patients who engrafted were also considered for this analysis. PTCY + ATG patients were infused with higher CD3⁺ T cells in the graft as reported above. Of note, the graft T cell frequency between both groups was not significantly different probably because of the higher frequency of CD45⁺ cell number in PTCY + ATG group, even NS. Compared with PTCY patients (8), this

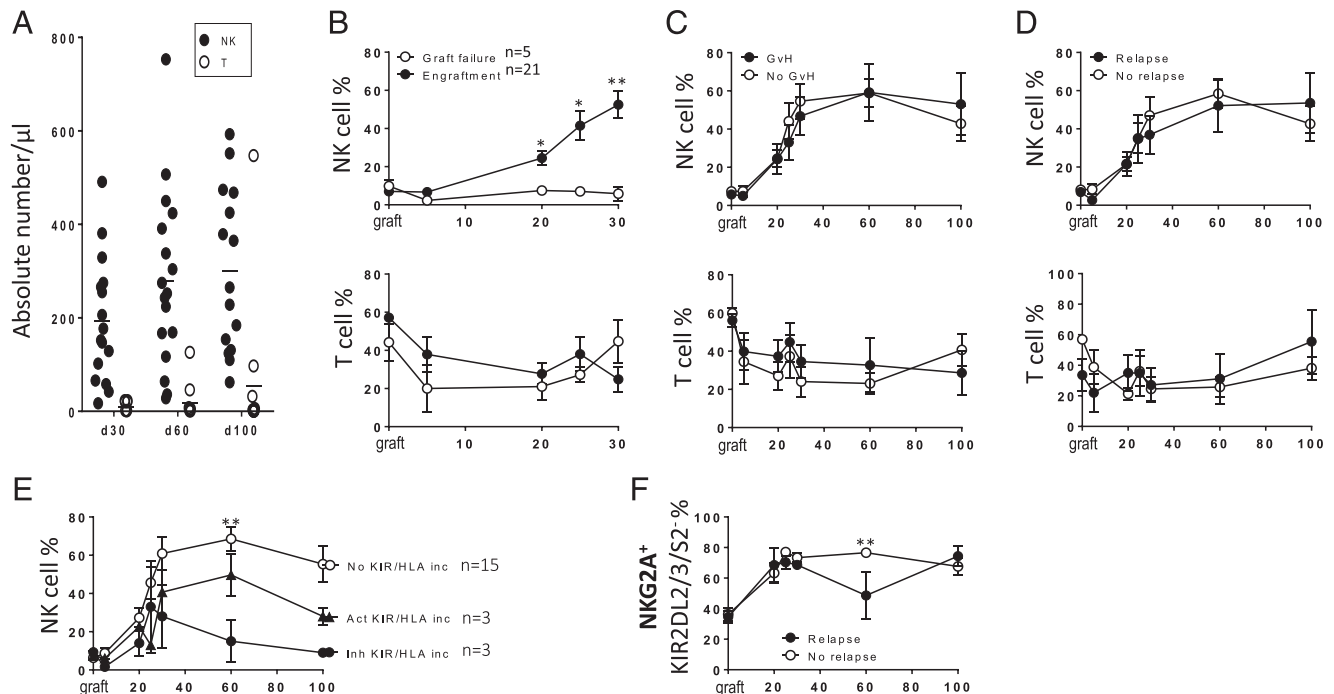


FIGURE 1. Better NK than T cell reconstitution in PTCY + ATG group. (A) T and NK absolute numbers from Rs following the posttransplantation kinetic (days 30, 60, and 100) and NK and T cell frequencies determined by flow cytometry from graft and Rs following the posttransplantation kinetic (days 5, 20, 25, 30, 60, and 100), according to (B) engraftment ($n = 21$) and (C) GvHD occurrence. NK cell frequencies from graft and Rs following the posttransplantation kinetic (days 5, 20, 25, 30, 60, and 100), according to (D) KIR/HLA inc. and (E) relapse occurrence. (F) NKG2A⁺ KIR2DL2/3/S2⁻ NK cell frequencies according to relapse occurrence. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, Student t test.

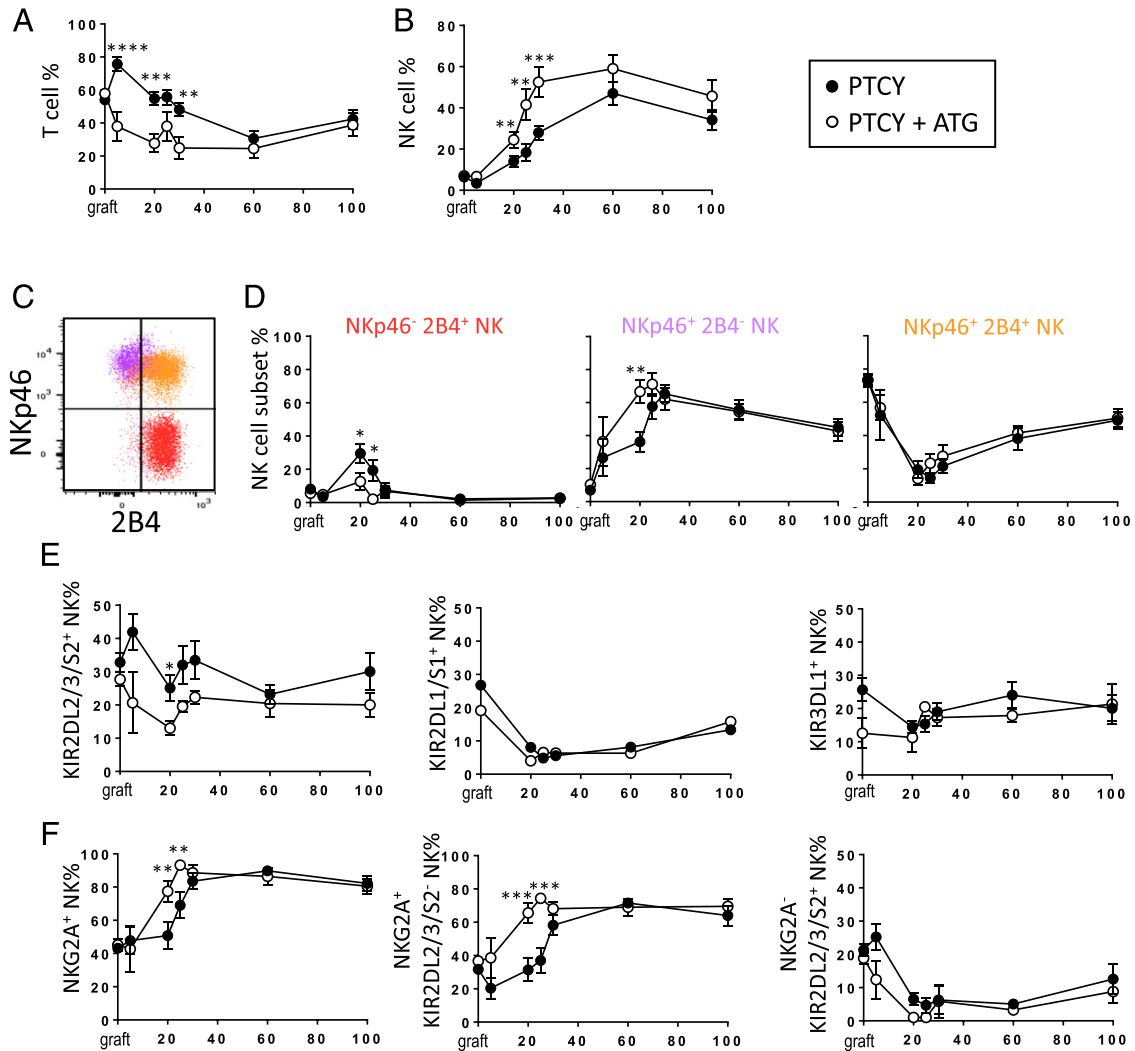


FIGURE 2. NK cell reconstitution in PTCY + ATG group versus PTCY group. **(A)** T cell and **(B)** NK cell frequencies determined by flow cytometry from graft and Rs following the posttransplantation kinetic (days 5, 20, 25, 30, 60, and 100), according to GVHD prophylaxis (PTCY + ATG versus PTCY). **(C)** Representative density plot showing three NK cell subsets related to their maturity level determined by 2B4⁺ and NKp46-specific mAbs by flow cytometry. **(D)** NKp46⁻ 2B4⁺ (immature), NKp46⁺ 2B4⁺ (intermediate), and NKp46⁺ 2B4⁻ (mature) NK cell frequencies from graft and Rs following the posttransplantation kinetic (days 5, 20, 25, 30, 60, and 100). **(E)** KIR2DL2/3/S2⁺, KIR2DL1/S1⁺, and KIR3DL1⁺ NK cell frequencies and **(F)** NKG2A⁺, NKG2A⁺ KIR2DL2/3/S2⁻, and NKG2A⁻ KIR2DL2/3/S2⁺ NK cell frequencies determined by flow cytometry from graft and Rs following the posttransplantation kinetic (days 5, 20, 25, 30, 60, and 100). **p* > 0.05, ***p* < 0.01, ****p* < 0.001, *****p* < 0.0001, Student *t* test.

graft depletion. In this study, we compared the combination of PTCY + ATG versus PTCY as GVHD prophylaxis for h-HSCT by analyzing early NK and T cell immune reconstitution and its influence on outcomes.

Clinically, the PTCY + ATG combination significantly reduced the incidence of acute grade 2–4 GVHD without increasing the risk of relapse. This confirmed previous results (5). It is well documented that D T cells are responsible for the GvL effect but also induce GVHD. Unfortunately, many treatments that reduced GVHD severity via T cell depletion and hence a decreased GvL effect have been associated with relapse (24). In this study, a reasonable GVHD rate was obtained probably because of the synergistic effect of PTCY and ATG on T cell depletion.

Regarding the reconstitution of the immune system, T cell reconstitution was slower in the PTCY + ATG group but associated to a faster reappearance of NK cells, which also matured more rapidly. This was particularly documented by the higher frequency of NKp46⁺ 2B4⁻ cells at day 20. In this context, a substantial GvL effect mediated by NK cells can be considered. Indeed, it has been demonstrated that licensed NK cells are mainly efficient cells, and in

the HSCT context, the cytokine environment may trigger unlicensed NK cells to become additionally efficient effectors (25). Moreover, in the h-HSCT setting, the first D NK cells that reappear can be potentially alloreactive against host cells that do not share HLA molecules, such as leukemic cells, favoring a NK-mediated GvL effect. However, PTCY will also likely eliminate alloreactive NK cells after transplant (26). It is also known that NK cells derived from D CD34⁺ stem cells will be educated by HLA expressed either on D hematopoietic cells or on host stromal cells (27). Thus, in h-HSCT, whether ATG is used, NK cell alloreactivity stimulated by HLA class deficiency is not determinant, and other characteristics of the NK cell repertoire need to be addressed such as the distribution of each NK cell subset potentially engaged in a GvL effect, according to their differentiation status.

Because of the large HLA mismatch, h-HSCT is a privileged context to investigate NK cell differentiation and reconstitution. The distribution of all NK cell subsets, based on the expression of KIR2DL3, NKG2A, CD57, and NKG2C, led us to identify different NK cell repertoires in the two cohorts analyzed in this study. At day 30, when the NK cell frequency is strongly increased, a first

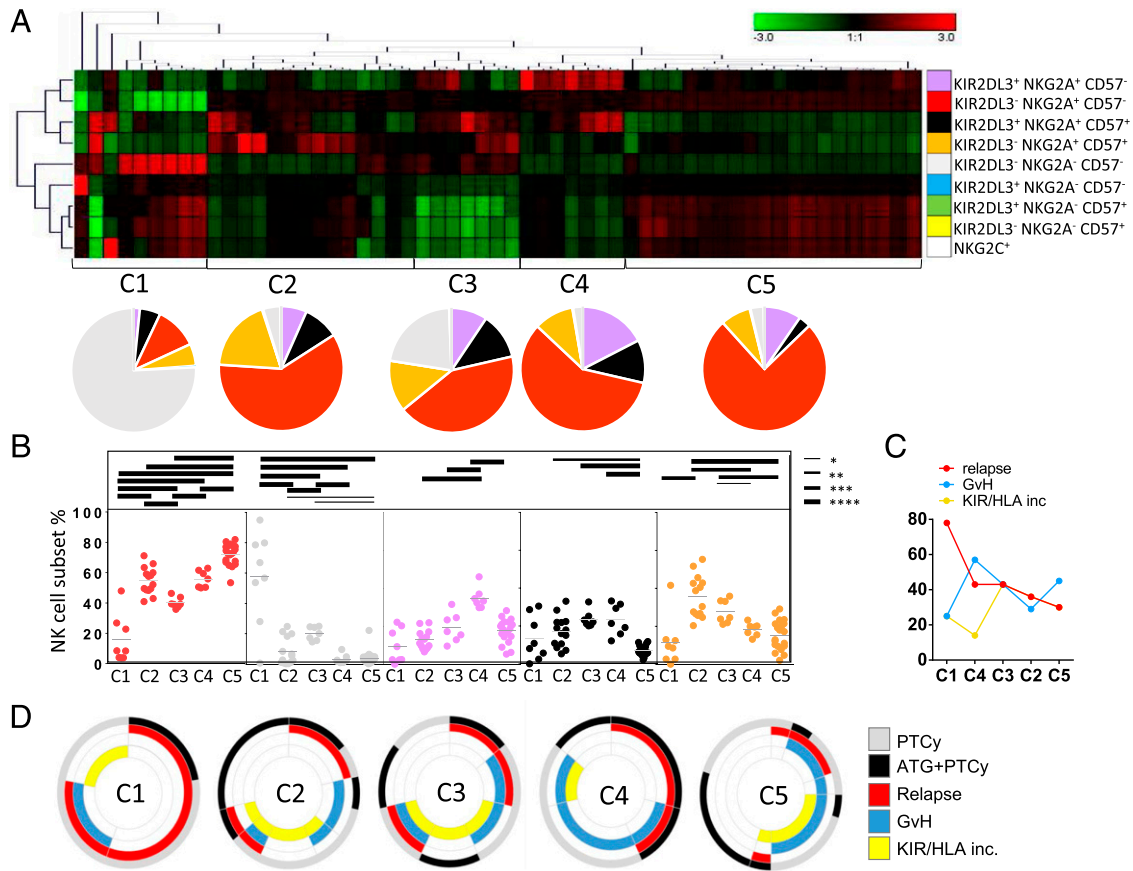


FIGURE 3. CD57-, NKG2A-, KIR-, and NKG2C-based identification of different NK cell repertoires at day 25/30. **(A)** Hierarchical clustering analysis of nine NK cell subsets from all Ds identified five clusters of Ds with pie charts illustrating the mean frequency of nine studied NK cell subsets in each cluster. **(B)** KIR2DL3⁻ NKG2A⁺ CD57⁻, KIR2DL3⁻ NKG2A⁻ CD57⁻, KIR2DL3⁺ NKG2A⁺ CD57⁻, KIR2DL3⁺ NKG2A⁻ CD57⁺, and KIR2DL3⁻ NKG2A⁺ CD57⁺ NK cell subset frequencies in all clusters. **(C)** Frequency of relapse, GVHD, and KIR/HLA inc. in the five clusters. **(D)** Repartition of patients in each cluster according to GVHD prophylaxis (PTCY + ATG or PTCY), relapse, GVH, and KIR/HLA inc. **p* < 0.05, ***p* < 0.01, ****p* < 0.001, *****p* < 0.0001, Student *t* test.

cluster of Rs (cluster 1) was identified, characterized by a predominant KIR2DL3⁻ NKG2A⁻ CD57⁻ NK subset. Interestingly, in this cluster, the majority of patients belonged to the PTCY group, and 78% of patients relapsed, suggesting that this NK repertoire profile is not efficient to eliminate leukemia. ATG may help to reduce this particular subset, explaining in part the fact that relapse was not increased in the PTCY + ATG group. By contrast, the KIR2DL3⁻ NKG2A⁺ CD57⁻ NK cell subset was more predominant in cluster 5, also characterized by the lowest relapse rate (30%). A beneficial impact on relapse of these naive NK cells has been previously reported (28). It has been previously documented that KIR2DL3⁻ NKG2A⁺ CD57⁻ NK cells display a more dynamic migration associated with an increased target cell conjugation and a higher probability of killing leukemic cells (29). Of note, in this study, acute myeloid leukemia (AML) and acute lymphoblastic leukemia (ALL) cases were combined, making it impossible to know if this subset is effective for AML, ALL, or both. More generally, infusion of allogeneic activated and expanded NK cells constitutes a promising consolidation therapy for leukemic patients. Several reports have proven the safety and feasibility of NK cell infusion in AML patients and, in some cases, provided evidence that transferred NK cells are functionally alloreactive and may have a role in disease control (28–32).

At day 30, some NK cell subsets such as KIR2DL3⁺ NKG2A⁻ CD57^{-/+} and KIR2DL3⁻ NKG2A⁻ CD57⁺ cells remained poorly represented. Additionally, it is not possible to evaluate the beneficial impact of adaptive NKG2C⁺ NK cells (30) in the absence of their expansion at this kinetic point in our cohort. Proinflammatory signals

and CMV strains encoding variable UL40 peptides determine adaptive NKG2C⁺ NK cell expansion and differentiation (31). In fact, in this study, this NK cell subset was observed later, around days 60 and 100, at a time when CMV reactivation is preferably observed. Merino et al. (32) have recently shown that these cells are dysfunctional when challenged by tumor targets, probably because of a chronic stimulation that drives the expression of inhibitory checkpoints such as LAG-3 and PD-1.

In this study, a significant rate of engraftment failure was observed in the PTCY + ATG group. It is hardly comprehensible as immunodepression may be higher with this combination than with PTCY alone. One explanation for that could be that the conditioning regimen itself is not sufficiently immunosuppressive in a context of HLA mismatch. As a consequence, other RIC regimens may be tested in combination with PTCY + ATG, such as thio-tepa–busulfan–fludarabine or Baltimore-based regimens. We cannot exclude that the significant depletion effects of ATG on T cells contribute to increased graft failure. Another explanation may be linked to the particular NK cell reconstitution observed in this population. Indeed, the absence of engraftment was associated with a lower frequency of NK cell reconstitution. The role of NK cells in h-HSCT, to promote engraftment, has been previously documented (33, 34), notably by the consolidation of engraftment by the infusion of purified NK cells (35).

Of note, in this study, the number of D/R pairs with KIR_D/HLA_R inc. was low, including three patients with inhibitory KIR and three with activating KIR. Larger cohorts are definitely needed to appreciate the impact of inc.

In conclusion, PTCY, with or without ATG, allows for in vivo depletion, and the NK cell compartment seems to be a key arm to eliminate residual leukemia cells before reconstitution of efficient T cells. Of interest, among the numerous possible subtypes of NK cells based on their combination of surface markers, six clusters were individualized in this study that seem to have different impacts on the consequence of h-HSCT. A better knowledge of efficient NK cell subsets in the fight against hematological diseases is needed to optimize simultaneously hematopoietic stem cell D selection and transfer efficient NK cell subsets. It should be a logical step to take to further analyze whether these NK cell subsets have any prognostic values in predicting the outcomes of the h-HSCT using a broader cohort of patients.

Acknowledgments

We thank all Ds and Rs who accepted to participate to this study.

Disclosures

The authors have no financial conflicts of interest.

References

- Huang, X.-J., D.-H. Liu, K.-Y. Liu, L.-P. Xu, H. Chen, W. Han, Y.-H. Chen, J.-Z. Wang, Z.-Y. Gao, Y.-C. Zhang, et al. 2006. Haploidentical hematopoietic stem cell transplantation without in vitro T cell depletion for the treatment of hematological malignancies. [Published erratum appears in 2008 *Bone Marrow Transplant.* 42: 295.] *Bone Marrow Transplant.* 38: 291–297.
- Luznik, L., P. V. O'Donnell, H. J. Symons, A. R. Chen, M. S. Leffell, M. Zahurak, T. A. Gooley, S. Piantadosi, M. Kaup, R. F. Ambinder, et al. 2008. HLA-haploidentical bone marrow transplantation for hematologic malignancies using nonmyeloablative conditioning and high-dose, posttransplantation cyclophosphamide. *Biol. Blood Marrow Transplant.* 14: 641–650.
- Bashey, A., M.-J. Zhang, S. R. McCurdy, A. St Martin, T. Argall, C. Anasetti, S. O. Ciurea, O. Fasan, S. Gaballa, M. Hamadani, et al. 2017. Mobilized peripheral blood stem cells versus unstimulated bone marrow as a graft source for T-cell-replete haploidentical donor transplantation using post-transplant cyclophosphamide. [Published erratum appears in 2019 *J. Clin. Oncol.* 37: 528.] *J. Clin. Oncol.* 35: 3002–3009.
- Ruggeri, A., M. Labopin, A. Bacigalupo, Z. Gülbas, Y. Koc, D. Blaise, B. Bruno, G. Irrera, J. Fischer, J. L. Diez-Martin, et al. 2018. Bone marrow versus mobilized peripheral blood stem cells in haploidentical transplants using post-transplantation cyclophosphamide. *Cancer* 124: 1428–1437.
- Salas, M. Q., S. Prem, E. G. Atenafu, A. Datt Law, W. Lam, Z. Al-Shaibani, D. Loach, D. D. H. Kim, F. V. Michelis, J. H. Lipton, et al. 2020. Dual T-cell depletion with ATG and PTCy for peripheral blood reduced intensity conditioning allo-HSCT results in very low rates of GVHD. *Bone Marrow Transplant.*
- Baumeister, S. H. C., B. Rambaldi, R. M. Shapiro, and R. Romee. 2020. Key aspects of the immunobiology of haploidentical hematopoietic cell transplantation. *Front. Immunol.* 11: 191.
- Retière, C., C. Willem, T. Guillaume, H. Vié, L. Gautreau-Rolland, E. Scotet, X. Saulquin, K. Gagne, M. C. Béné, B.-M. Imbert, 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.
- Willem, C., D. R. Makanga, T. Guillaume, B. Manianguou, N. Legrand, K. Gagne, P. Peterlin, A. Garnier, M. C. Béné, A. Cesbron, et al. 2019. Impact of KIR/HLA incompatibilities on NK cell reconstitution and clinical outcome after T cell-replete haploidentical hematopoietic stem cell transplantation with post-transplant cyclophosphamide. *J. Immunol.* 202: 2141–2152.
- Triplett, B. M., E. M. Horwitz, R. Iyengar, V. Turner, M. S. Holladay, K. Gan, F. G. Behm, and W. Leung. 2009. Effects of activating NK cell receptor expression and NK cell reconstitution on the outcomes of unrelated donor hematopoietic cell transplantation for hematologic malignancies. *Leukemia* 23: 1278–1287.
- Anfossi, N., P. André, S. Guia, C. S. Falk, S. Roeytynck, C. A. Stewart, V. Bresco, C. Frassati, D. Reviron, D. Middleton, et al. 2006. Human NK cell education by inhibitory receptors for MHC class I. *Immunity* 25: 331–342.
- Parham, P. 2015. Co-evolution of lymphocyte receptors with MHC class I. *Immunol. Rev.* 267: 1–5.
- Goodridge, J. P., B. Önfelt, and K.-J. Malmberg. 2015. Newtonian cell interactions shape natural killer cell education. *Immunol. Rev.* 267: 197–213.
- Gumá, M., M. Budt, A. Sáez, T. Breckalo, H. Hengel, A. Angulo, and M. López-Botet. 2006. Expansion of CD94/NKG2C+ NK cells in response to human cytomegalovirus-infected fibroblasts. *Blood* 107: 3624–3631.
- Béziat, V., L. L. Liu, J.-A. Malmberg, M. A. Ivarsson, E. Sohlberg, A. T. Björklund, C. Retière, E. Sverremark-Ekström, J. Traherne, P. Ljungman, 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.
- Cichocki, F., S. Cooley, Z. Davis, T. E. DeFor, H. Schlums, B. Zhang, C. G. Brunstein, B. R. Blazar, J. Wagner, D. J. Diamond, et al. 2016. CD56dimCD57+NKG2C+ NK cell expansion is associated with reduced leukemia relapse after reduced intensity HCT. *Leukemia* 30: 456–463.
- Le Bourgeois, A., M. Labopin, M. Leclerc, R. P. de Latour, J.-H. Bourhis, P. Ceballos, C. Orvain, H. L. Wallet, K. Bilger, D. Blaise, et al; Société Française de Greffe de Moelle et de Thérapie Cellulaire. 2018. Clofarabine/busulfan-based reduced intensity conditioning regimens provides very good survivals in acute myeloid leukemia patients in complete remission at transplant: a retrospective study on behalf of the SFGM-TC. *Oncotarget* 9: 36603–36612.
- Sun, J. Y., L. Gaidulis, M. M. Miller, R. M. Goto, R. Rodriguez, S. J. Forman, and D. Senitzer. 2004. Development of a multiplex PCR-SSP method for killer-cell immunoglobulin-like receptor genotyping. *Tissue Antigens* 64: 462–468.
- Hsu, K. C., S. Chida, D. E. Geraghty, and B. Dupont. 2002. The killer cell immunoglobulin-like receptor (KIR) genomic region: gene-order, haplotypes and allelic polymorphism. *Immunol. Rev.* 190: 40–52.
- Björkström, N. K., P. Riese, F. Heuts, S. Andersson, C. Fauriat, M. A. Ivarsson, A. T. Björklund, M. Flodström-Tullberg, J. Michaëlsson, M. E. Rottenberg, 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.
- Djaoud, Z., G. David, C. Bressollette, C. Willem, P. Rettman, K. Gagne, N. Legrand, S. Mehlal, A. Cesbron, B.-M. Imbert-Marcille, and C. Retière. 2013. Amplified NKG2C+ NK cells in cytomegalovirus (CMV) infection preferentially express killer cell Ig-like receptor 2DL: functional impact in controlling CMV-infected dendritic cells. *J. Immunol.* 191: 2708–2716.
- Sturn, A., J. Quackenbush, and Z. Trajanoski. 2002. Genesis: cluster analysis of microarray data. *Bioinformatics* 18: 207–208.
- Ruggeri, A., M. Labopin, F. Ciceri, M. Mohty, and A. Nagler. 2016. Definition of GVHD-free, relapse-free survival for registry-based studies: an ALWP-EBMT analysis on patients with AML in remission. *Bone Marrow Transplant.* 51: 610–611.
- Armand, P., H. T. Kim, B. R. Logan, Z. Wang, E. P. Alyea, M. E. Kalaycio, R. T. Maziarz, J. H. Antin, R. J. Soiffer, D. J. Weisdorf, et al. 2014. Validation and refinement of the disease risk index for allogeneic stem cell transplantation. *Blood* 123: 3664–3671.
- Choi, S. W., and P. Reddy. 2014. Current and emerging strategies for the prevention of graft-versus-host disease. *Nat. Rev. Clin. Oncol.* 11: 536–547.
- Sun, K., M. Alvarez, E. Ames, I. Barao, M. Chen, D. L. Longo, D. Redelman, and W. J. Murphy. 2012. Mouse NK cell-mediated rejection of bone marrow allografts exhibits patterns consistent with Ly49 subset licensing. *Blood* 119: 1590–1598.
- McCurdy, S. R., and L. Luznik. 2019. Immune reconstitution after T-cell replete HLA-haploidentical transplantation. *Semin. Hematol.* 56: 221–226.
- Boudreau, J. E., X.-R. Liu, Z. Zhao, A. Zhang, L. D. Shultz, D. L. Greiner, B. Dupont, and K. C. Hsu. 2016. Cell-extrinsic MHC class I molecule engagement augments human NK cell education programmed by cell-intrinsic MHC class I. *Immunity* 45: 280–291.
- Björklund, A. T., T. Clancy, J. P. Goodridge, V. Béziat, M. Schaffer, E. Hovig, H.-G. Ljunggren, P. T. Ljungman, and K.-J. Malmberg. 2016. Naive donor NK cell repertoires associated with less leukemia relapse after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *J. Immunol.* 196: 1400–1411.
- Forslund, E., E. Sohlberg, M. Enqvist, P. E. Olofsson, K.-J. Malmberg, and B. Önfelt. 2015. Microchip-based single-cell imaging reveals that CD56dimCD57–KIR–NKG2A+ NK cells have more dynamic migration associated with increased target cell conjugation and probability of killing compared to CD56dimCD57–KIR–NKG2A– NK cells. *J. Immunol.* 195: 3374–3381.
- Fehniger, T. A., and M. A. Cooper. 2016. Harnessing NK cell memory for cancer immunotherapy. *Trends Immunol.* 37: 877–888.
- Hammer, Q., T. Rückert, E. M. Borst, J. Dunst, A. Haubner, P. Durek, F. Heinrich, G. Gasparoni, M. Babic, A. Tomic, et al. 2018. Peptide-specific recognition of human cytomegalovirus strains controls adaptive natural killer cells. *Nat. Immunol.* 19: 453–463.
- Merino, A., B. Zhang, P. Dougherty, X. Luo, J. Wang, B. R. Blazar, J. S. Miller, and F. Cichocki. 2019. Chronic stimulation drives human NK cell dysfunction and epigenetic reprogramming. *J. Clin. Invest.* 129: 3770–3785.
- Pierini, A., M. Alvarez, and R. S. Negrin. 2016. NK cell and CD4+FoxP3+ regulatory T cell based therapies for hematopoietic stem cell engraftment. *Stem Cells Int.* 2016: 9025835.
- Panse, J. P., S. Heimfeld, K. A. Guthrie, M. B. Maris, D. G. Maloney, B. B. Baril, M.-T. Little, T. R. Chaucey, B. E. Storer, R. Storb, and B. M. Sandmaier. 2005. Allogeneic peripheral blood stem cell graft composition affects early T-cell chimerism and later clinical outcomes after non-myeloablative conditioning. *Br. J. Haematol.* 128: 659–667.
- Pasweg, J. R., A. Tichelli, S. Meyer-Monard, D. Heim, M. Stern, T. Kühne, G. Favre, and A. Gratwohl. 2004. Purified donor NK-lymphocyte infusion to consolidate engraftment after haploidentical stem cell transplantation. *Leukemia* 18: 1835–1838.

RESULTATS

ARTICLE N°4: Low number of KIR ligands in lymphoma patients favors a good rituximab-dependent NK cell responses.

Dhon Roméo Makanga, Maxime Julien, Gaëlle David, Nolwenn Legrand, Catherine Willem, Léa Dubreuil, Marie-Christine Béné, Anne Cesbron, Ketevan Gendzekhadze, Katia Gagne, Patrice Chevallier, Béatrice Clemenceau, Christelle Retière.

(Soumis)

La fonction effectrice de cytotoxicité cellulaire dépendante de l'anticorps (ADCC) des cellules NK est largement exploitée en clinique comme l'un des mécanismes d'action pour l'immunothérapie anti-cancéreuse à base de rituximab. Ce dernier est un anticorps monoclonal chimérique anti-CD20 utilisé, entre autres, pour le traitement des lymphomes à cellules B (Alderson and Sondel, 2011) (Becker et al., 2016). Une partie de l'effet anti-tumoral de cet anticorps passe par l'activité cytotoxique de lymphocytes exprimant des récepteurs au fragment Fc des immunoglobulines tel que le FcγRIIIa (CD16). En clinique, les preuves du rôle de l'ADCC dans l'effet anti-tumoral du rituximab sont indirectes et reposent en particulier sur le polymorphisme de CD16. Ainsi, il a été montré que le polymorphisme V158F de CD16 influence l'ADCC exercée *in vitro* par les cellules NK en présence de rituximab (Dall'Ozzo et al., 2004) (Veeramani et al., 2011). Ce polymorphisme influence également la réponse clinique et biologique au rituximab chez des patients atteints de lymphome Non-Hodgkinien (LNH) folliculaire (Cartron et al., 2002). Par ailleurs, l'inhibition de la fonction ADCC des cellules NK via les interactions entre les récepteurs KIR inhibiteurs avec les ligands HLA de classe I a été décrite comme l'un des mécanismes potentiels de la résistance de lymphomes au rituximab (Borgerding et al., 2010) (Terszowski et al., 2014). Ces résultats suggèrent donc fortement que les cellules NK sont impliquées dans le mécanisme d'action du rituximab *in vivo*.

Dans cette étude, nous avons revisité l'influence des différents polymorphismes KIR, HLA et CD16 impliqués dans la dégranulation des cellules NK dépendante du rituximab à partir d'un modèle cellulaire *in vitro* basé sur des lignées B-EBV CD20⁺, HLA de classe I homozygotes. Les cellules NK sont issues de donneurs de sang pour lesquels nous avons déterminé les génotypes KIR, HLA et CD16. En parallèle, nous avons étudié l'impact de ces mêmes génotypes sur une cohorte de 74 patients atteints de LNH traités au rituximab.

Dans le but d'évaluer la modulation de la cytotoxicité des cellules NK par les principaux KIR inhibiteurs KIR2DL2/3, KIR2DL1 et KIR3DL1 et le KIR activateur KIR2DS1, nous avons utilisé trois lignées B-EBV HLA homozygotes exprimant ou pas les ligands KIR Bw4, C1 et C2. Chaque sous-population NK KIR⁺ était ciblée par les anticorps monoclonaux spécifiques et leur potentiel de dégranulation dépendante du rituximab était évalué contre les cibles B-EBV. Nous avons défini la concentration optimale du rituximab (0,1µg/mL) afin d'observer l'inhibition de l'interaction KIR/HLA. A cette concentration, aucune différence de dégranulation dépendante du rituximab des cellules NK n'a été observée entre les cellules NK issues des donneurs de sang de génotype CD16-158 VV et celles issues des donneurs de sang de génotype CD16-158 VF. Les fortes concentrations en rituximab limitent considérablement l'effet inhibiteur des KIR observé sur l'ADCC.

Les résultats montrent que la dégranulation dépendante du rituximab des sous-populations NK KIR2DL1⁺, KIR2DL2/3⁺ et KIR3DL1⁺ était fortement inhibée en présence des lignées B-EBV C2⁺, C1⁺ et Bw4⁺, respectivement. La dégranulation induite par le rituximab des sous-populations NK KIR2DL1⁺ C2C2 éduquées était significativement plus élevée que celle des cellules NK KIR2DL1⁺ C1C1 non éduquées contre les cibles B-EBV C2⁻. De la même façon, la dégranulation induite par le rituximab des sous-populations NK KIR2DL2/3⁺ C1C1 éduquées était significativement plus importante que celle des cellules NK KIR2DL1⁺ C2C2 non éduquées contre les cibles B-EBV C1⁻. Le faible effectif de nos donneurs de sang ne nous a pas permis de mettre en évidence l'influence de l'éducation des cellules NK KIR3DL1⁺ Bw4⁺ sur la dégranulation dépendante du rituximab dans cette étude. Globalement, ces résultats montrent un effet inhibiteur significatif des sous-populations NK KIR⁺ en présence des ligands HLA de classe I correspondants (Figure 18). Par ailleurs, nous avons montré pour la première fois que le récepteur KIR2DS1 potentialise fortement la

dégranulation dépendante du rituximab des cellules NK de donneurs sains de génotype C2⁻ contre les cibles B-EBV C2⁺.

Pour évaluer l'influence potentielle du polymorphisme CD16 et des interactions KIR/HLA *in vivo*, nous avons étudié les réponses cliniques des patients atteints de LNH traités avec le rituximab. Nous avons déterminé le polymorphisme CD16, la nature et le nombre des ligands KIR (HLA) et la fréquence des sous-populations NK (KIR2DL1⁺, KIR2DL2/3⁺ et KIR3DL1⁺) sur une cohorte de 74 patients atteints de LNH traités au rituximab. Nous soulignons que l'environnement HLA de classe I avec peu de ligands KIR favorise des fréquences élevées de cellules NK KIR⁺ (Figure 18). Ces cellules NK KIR⁺ comprennent les cellules NK éduquées et non éduquées, deux compartiments cellulaires NK qui présentent des dégranulations dépendantes du rituximab plus élevées que les cellules NK KIR⁻. En revanche, un environnement HLA de classe I avec beaucoup de ligands KIR (n≥5) favorise des fréquences élevées des cellules NK KIR⁻ peu efficaces ainsi que de nombreuses inhibitions fonctionnelles KIR/HLA de cellules NK KIR⁺ éduquées (Figure 18). Tous ces paramètres expliquent pourquoi les patients LNH qui ont un environnement limité en ligands KIR ont de meilleures réponses au rituximab. Dans cet environnement, le polymorphisme CD16 semble avoir un effet collatéral.

Ces résultats permettent d'ouvrir la voie de nouveaux axes d'optimisation de la prédiction des réponses au rituximab chez les patients atteints de LNH. En effet, un typage HLA de classe I (HLA-A, -B et -C) même à 2 digits par biologie moléculaire et/ou la détermination de la fréquence des cellules NK KIR⁺ par cytométrie de flux pourraient être des marqueurs simples et utiles pour prédire les réponses au rituximab. Nous avons montré que de fortes concentrations en rituximab limitent les inhibitions via les récepteurs KIR. Aussi, l'augmentation des concentrations en rituximab chez les patients susceptibles de présenter de mauvaises réponses au rituximab permettrait de limiter les inhibitions via les KIR.

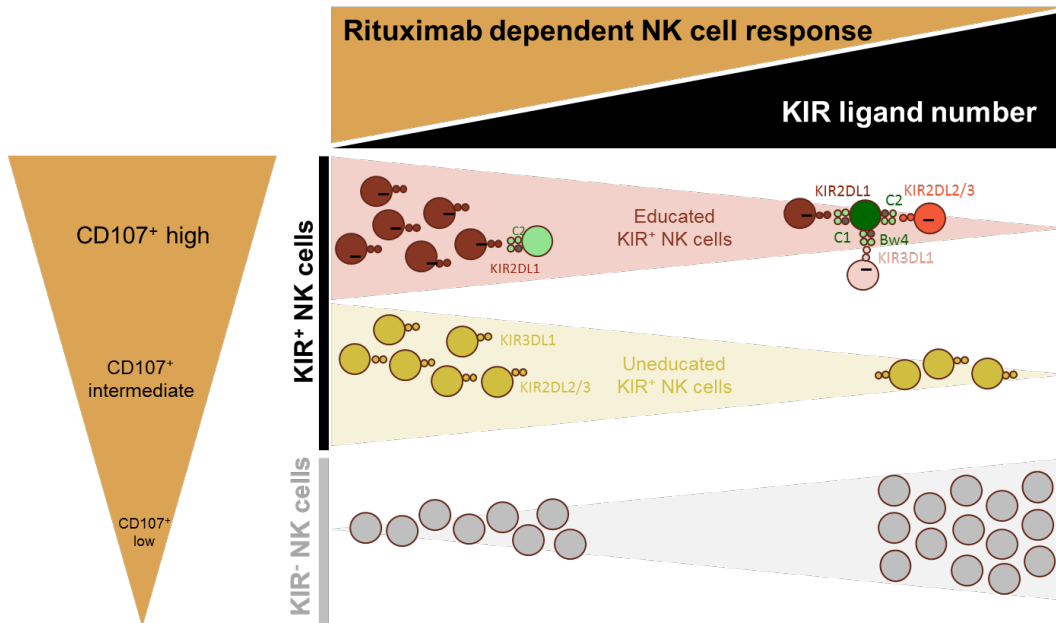


Figure 18 : Influence du nombre de ligands KIR et de la fréquence des cellules NK sur la dégranulation des cellules NK dépendante du rituximab.

Les NK KIR⁺ éduquées et non éduquées semblent être représentées en forte fréquence dans un environnement HLA de classe I avec peu de ligands KIR. Cette fréquence importante des sous-populations NK KIR⁺ avec le faible nombre de ligand KIR sont associés à la dégranulation des cellules NK dépendante du rituximab élevée.

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

3 Dhon Roméo Makanga^{1,2,3}, Maxime Jullien⁴, Gaëlle David^{1,2,3}, Nolwenn Legrand^{1,2,3}, Catherine
4 Willem^{1,2,3}, Léa Dubreuil^{1,2,3}, Alexandre Walencik¹, Cyrille Touzeau⁴, Thomas Gastinne⁴, Benoit
5 Tessoulin⁴, Steven Le Gouill⁴, Béatrice Mahé⁴, Katia Gagne^{1,2,3,5}, Patrice Chevallier^{2,3,4}, Béatrice
6 Clemenceau^{2,3*}, Christelle Retière^{1,2,3*‡}.

7 **Institutional affiliations:**

8 ¹Etablissement Français du Sang, Nantes, 44011, Nantes, France ; ²Université de Nantes,
9 INSERM U1232 CNRS, CRCINA, F-44000 Nantes, France ; ³LabEx IGO “Immunotherapy,
10 Graft, Oncology”, Nantes, F-44000, France ; ⁴Hematology Clinic, CHU, 44000 Nantes, France ;
11 ⁵LabEx Transplantex, Université de Strasbourg, 67000, Strasbourg, France. *Co-senior authors.

12 **Running title:** KIR/HLA pairs affect NK ADCC

13 **Keywords:** KIR, HLA, ADCC, Rituximab, NK cells, CD16, Non Hodgkin Lymphoma

14 **Abbreviations:** HLA, Human Leucocyte Antigen; KIR, Killer cell Immunoglobulin-like
15 Receptor; NK, Natural Killer; PBMC, Peripheral Blood Mononuclear Cell; ADCC, Antibody
16 Dependent Cellular Cytotoxicity

17 **Words count:** Abstract, 323 words; Main text, 3977 words

18 **Number of figures:** 6; **Number of Tables:** 1; **Additional files:** 7; **Number of references:** 37

1 † **Corresponding author:** Christelle Retière, Ph.D. Etablissement Français du Sang-Pays de la
2 Loire, CRCINA, INSERM, CNRS, Université d'Angers, Université de Nantes, 34 boulevard Jean
3 Monnet, 44011 Nantes cedex 01, France. christelle.retiere@efs.sante.fr

4

5

6

7

8

9

10

11

12

13

14

15

16

17

18

19

20

21

22

23

1 **Abstract**

2 **Background:** the antibody-dependent cellular cytotoxicity (ADCC) effector function of Natural
3 Killer (NK) cells is widely used clinically as a mechanism of action for rituximab-based anti-
4 cancer immunotherapy. Inhibition of ADCC function of NK cells through interactions between
5 inhibitory KIR (Killer cell Immunoglobulin-like Receptors) and HLA class I ligands is associated
6 with resistance of cancers to rituximab.

7 **Methods:** In this study, we deeply revisited the influence of KIR, HLA and CD16
8 polymorphisms on rituximab dependent NK cell degranulation from *in vitro* cellular model based
9 on homozygous HLA class I EBV-transformed CD20⁺ B lymphocyte cell lines and NK cells from
10 KIR, HLA and CD16 typed healthy blood donors. In parallel, we raised the question from a
11 cohort of 74 Non-Hodgkin Lymphoma (NHL) patients receiving a rituximab-based treatment and
12 genotyped for KIR, HLA and CD16.

13 **Results:** We highlight that HLA environment with limited KIR ligands is beneficial to mount a
14 higher frequency of KIR⁺ NK cells including both educated and uneducated NK cells, two NK
15 cell compartments that harbor a higher rituximab dependent degranulation than KIR⁻ NK cells. In
16 contrast, a substantial KIR ligand environment favors a higher frequency of poorly effective KIR⁻
17 NK cells and numerous functional KIR/HLA inhibitions of educated KIR⁺ NK cells. These points
18 explain why NHL patients with limited KIR ligands have better rituximab responses. In this HLA
19 environment, CD16 polymorphism appears to have a collateral effect. Furthermore, we highlight
20 the synergic effect of KIR2DS1 that strongly potentiates NK cell ADCC from C2⁻ blood donors
21 against C2⁺ target cells.

22 **Conclusions:** Taken together, our results permit an overview on the influence of KIR, KIR
23 ligand and CD16 polymorphisms on rituximab dependent NK cell cytotoxicity integrating

1 genetic rules of the phenotypic and functional structuration of the NK cell repertoire. These
2 results pave the way for strengthening the prediction of rituximab responses for NHL patients.
3 HLA class I typing and/or peripheral blood KIR⁺ NK cell frequency could be simple and useful
4 markers for predicting rituximab responses.

5

6

7

8

9

10

11

12

13

14

15

16

17

18

19

20

21

22

23

1 **Background**

2 The antibody-dependent cellular cytotoxicity (ADCC) effector function of Natural Killer (NK)
3 cells is widely used clinically as a mechanism of action for rituximab based anti-cancer
4 immunotherapy [1]. Rituximab is a chimeric anti-CD20 monoclonal antibody used in the
5 treatment of B cell lymphomas [1] [2]. Rituximab-mediated ADCC activity of NK cells is
6 triggered through interaction between CD16 (Fc γ RIIIa) activating receptor with the Fc fragments
7 of this monoclonal antibody. On the clinical side, CD16 polymorphism is an argument that
8 ADCC is one of the mechanisms of action responsible of rituximab's anti-tumor effects. It has
9 been shown that rituximab had a strong affinity for the CD16 158V allotype compared to 158F
10 counterpart [3] [4]. Numerous studies reported that the use of low dose of rituximab was
11 associated with greater ADCC responses in patients with the CD16 158VV or VF genotype
12 compared to patients with the 158FF genotype [5].

13 Several mechanisms of cancer resistance to rituximab have been documented in the literature,
14 and different strategies are used to increase the effector activity of NK cells to improve anti-
15 tumor responses. The inhibition of the ADCC function of NK cells through interactions between
16 inhibitory Killer cell Immunoglobulin-like Receptors (KIR) and HLA class I ligands has been
17 described as one of the potential mechanisms of cancer resistance to rituximab [6] [7] . KIRs are
18 mainly expressed by NK cells and modulate NK cell responses by recognizing HLA class I
19 molecules on the tumoral or virus-infected cells. The interactions between KIR and autologous
20 HLA class I ligands during development contribute to the functional education of KIR⁺ NK cells
21 [8]. This functional competence gives to educated KIR⁺ NK cells the ability to recognize and
22 eliminate target cells which exhibit an absence of expression (missing-self) or a downregulation
23 of HLA class I molecules. The main inhibitory KIRs are KIR2DL1, KIR2DL2/3 and KIR3DL1

1 which respectively recognize HLA-C molecules of group C2 (Lys80), HLA-C molecules of
2 group C1 (Asn80) and Bw4 motifs bearing by some HLA-A and -B molecules. In contrast, the
3 activating KIR2DS1 triggers NK cell alloreactivity by recognizing HLA-C molecules of group
4 C2 on the surface of allogenic target cells only when KIR2DS1⁺ NK cells have evolved in a C2⁻
5 environment [9] [10] [11]. KIR genes are clonally expressed on the surface of NK cells [12].
6 Thus, KIR⁺ NK cell repertoire is diverse between individuals since the NK cell repertoire harbors
7 different NK cell populations with different functional orientations.

8
9 Previous studies have demonstrated the impact of NK cell education on ADCC in the context of
10 HIV [13] [14] [15] [16]. Furthermore, only few studies had documented the impact of KIR/HLA
11 interactions in the anti-tumor context [17] [18] [19] [20] [7]. However, these observations present
12 disparities in regards to the impact of KIR/HLA interactions on the ADCC responses of NK cells.
13 The experimental strategies used in these studies and the cellular models used do not necessarily
14 represent the best means to study the activity of KIR⁺ NK cells. Thus, in this study, we revisited
15 the influence of KIR, HLA and CD16 polymorphisms on rituximab dependent NK cell
16 degranulation from *in vitro* cellular model based on homozygous HLA class I EBV-transformed
17 CD20⁺ B lymphocyte cell lines and NK cells from KIR, HLA and CD16 typed healthy blood
18 donors. In parallel, we raised the question from a cohort of 74 Non-Hodgkin Lymphoma (NHL)
19 patients receiving a rituximab-based treatment and genotyped for KIR, HLA and CD16. Our
20 results permit an overview on the influence of KIR, HLA class I and CD16 polymorphisms on
21 rituximab dependent NK cell cytotoxicity integrating genetic rules of the phenotypic and
22 functional structuration of the NK cell repertoire.

23

1 **Methods**

2 **Study design and patient samples**

3 From November 2019 to February 2020, 80 consecutive adult patients treated in our institution
4 for a Non-Hodgkin Lymphoma (NHL) with a rituximab-based immunochemotherapy were
5 included after providing informed consent. Routine informations, as disease status, previous
6 treatments received (including anterior exposition to rituximab), and CMV serology were
7 collected from the medical file. The best response to immunochemotherapy at the end of the
8 follow-up period (July 2020) was determined using Cheason 2007 revised criteria [21] for
9 patients with CT-measurable disease. Patients treated for a Waldenström Macroglobulinemia
10 with no CT-measurable disease were evaluated using Owen 2012 criteria [22]. In both cases,
11 complete response (CR) was defined as disappearance of all evidence of disease, partial response
12 (PR) as regression $\geq 50\%$ of measurable disease, progressive disease (PD) as the apparition of
13 any new lesion or increase by $\geq 50\%$ of disease measure, and stable disease (SD) as failure to
14 attain CR/PR or PD. At the time of analysis, 6 patients did not have an assessment of disease
15 response and were excluded.

16

17 **Cells (PBMC and cell lines)**

18 PBMC (Peripheral Blood Mononuclear Cells) were isolated as previously described [23]. All
19 blood donors were recruited at the Blood Transfusion Center (EFS, Nantes, France) and informed
20 consent was given by all individuals. The following CD20⁺ HLA class I homozygous EBV-
21 transformed B lymphoblastoid cell lines were used as targets for functional assays: AMALA
22 (HLA-B*15:01, -C*03:03, Bw4⁻/C1C1), SP001 (HLA-B*44:02, -C*05:01, Bw4⁺/C2C2) and
23 RSH (HLA-B*42:01, -C*17:01, Bw4⁻/C2C2). Cell lines were cultured in RPMI 1640 medium

1 (Gibco, Paisley, Scotland, UK) containing glutamine (Gibco) and penicillin-streptomycin (Gibco)
2 and supplemented with 10% fetal bovine serum (Gibco). Mycoplasma tests performed by PCR
3 were negative for all cell lines. CD20 and HLA class I cell surface expressions were confirmed
4 by flow cytometry using the following mouse anti-human mAbs: anti-CD20-FITC and anti-HLA
5 class I -FITC (F41-IE3H1D2, EFS Nantes).

6

7 **HLA, KIR and FcγRIIIa (CD16) genotyping**

8 HLA class I allele assignment was performed for all blood volunteer donors and lymphoma
9 patients as previously described [24]. KIR generic typing was performed on all blood donors
10 using a KIR multiplex PCR-SSP method as previously described [25] using primers provided by
11 Dr Ketevan Gendzekhadze. The presence or absence of KIR2DL1, 2DL2, 2DL3, 2DL5, 3DL1,
12 2DS1, 2DS2, 2DS3, 2DS4/1D, 2DS5 and 3DS1 genes were assigned. Donor KIR genotypes were
13 then determined based on the presence or the absence of activating KIR. Thus, a KIR AA
14 genotype was defined by the presence of only KIR2DS4 as activating KIR gene, and a KIR B⁺
15 genotype by the presence of several activating KIR genes [26]. KIR ligands such as A3/A11,
16 Bw4 (HLA-A and/or HLA-B), C1 and C2 were defined on all blood donors and lymphoma
17 patients based on allelic HLA-A, -B and -C typing. FcγRIIIa V158F polymorphism was typed on
18 14 healthy blood donors and 80 lymphoma patients by PCR-SSP as previously described [27].

19

20 **NK cell phenotypic analysis by flow cytometry**

21 The NK cell surface phenotype was determined by eight-color multiparameter flow cytometry
22 (MFC) on PBMC using the following mouse anti-human mAbs: anti-KIR2DL1-FITC (143211,
23 R&D Systems, Minneapolis, MN) anti-KIR2DL1/2DS1 (EB6, Beckman Coulter, Immunotech,

1 Marseilles, France), anti-KIR2DL2/3-PE-Cy7 (GL183, Beckman Coulter), anti-KIR3DL1/3DS1-
2 PE (Z27.3.7, Beckman Coulter), anti-CD3-APC-Cy7 (SK7, Sony Biotechnology, San Jose, CA),
3 anti-CD56-BV510 (HCD56, BD Sony), anti-CD16-PerCP-Cy5.5 (3G8, Sony) and anti-NKG2C-
4 APC (REA205, Miltenyi Biotec, Paris, France).

5

6 **CD107a mobilization assay detected by flow cytometry**

7 EBV-B cell lines were pre-incubated with the anti-CD20 mAb (Roche, Basel, Switzerland) to a
8 final concentration of 0.1µg/mL, 1µg/mL or 10µg/mL. NK cells from healthy blood donors were
9 mixed with EBV-B target cells in the presence of the anti-CD107a-BV421 (H4A3, Sony) mAb
10 and NK-cell degranulation against EBV-B cell lines was assessed after incubation for 5h alone
11 (negative control), or with different target cells (E:T ratio=1:1) with brefeldin A (Sigma) at 10
12 µg/mL for the last 4 h. All flow cytometry data were collected using a FACSCanto II (BD
13 Biosciences) and analyzed with Flowjo™ 10.6 software (LLC, Ashland, OR).

14

15 **Statistical analyses**

16 Comparison of data in two different series were performed using the Student's t-test. Statistical
17 differences between different groups were analysed using one-way ANOVA. All statistical
18 analysis were performed using the GraphPad Prism v6.0 software (San Diego, CA). P values
19 <0.05 were considered statistically significant.

20

21

22

1 **Results**

2 **Inhibitory KIR2DL1-C2 interaction brings rituximab dependent educated KIR2DL1⁺ NK** 3 **cell degranulation down to the degranulation baseline of uneducated counterpart**

4 To evaluate the modulation of rituximab dependent NK cell cytotoxicity by main inhibitory
5 KIR2DL2/3, KIR2DL1 and KIR3DL1, we used three homozygous HLA class I EBV-B cell lines
6 expressing or not Bw4, C1 and C2 KIR ligands. All EBV-B cell lines express CD20 and a similar
7 level of HLA class I molecules (**figure S1**).

8 KIR2DL1⁺ 2DS1⁻/2DL2/3⁻/3DL1⁻ (others⁻) NK cell subset was targeted using a
9 combination of KIR-specific mAbs (**figure 1A**). A first mAbs combination led to exclude
10 KIR3DL1/S1⁺ and KIR2DL2/3⁺ NK cells. A second mAbs combination led to select only
11 KIR2DL1⁺ 2DS1⁻ NK cells. Different rituximab concentrations were evaluated to determine the
12 best one to assess the modulator effect of inhibitory KIR/HLA interactions in our *in vitro* cellular
13 model. A high rituximab concentration (10 µg/ml) led a CD16-mediated activation that bypasses
14 the inhibitory effect of KIR2DL1 on NK cell cytotoxicity against the C2⁺ EBV-B cell line (**figure**
15 **1B**). The best concentration of rituximab was 0.1 µg/ml used in all subsequent experiments in
16 this study. At this concentration, we observed a lower rituximab dependent degranulation of all
17 NK cells from CD16-158FF blood donors compared to CD16-158VV and VF blood donors and
18 no difference between the last two groups (data not shown).

19 Thus, we worked from healthy blood donors for whom KIR genotypes and HLA class I
20 typing were determined as well as CD16 V158F polymorphism in order to include only donors
21 with CD16 158VV or VF (**supplemental table S1**). The comparison of rituximab dependent NK
22 cell degranulation observed from CD16 158VV and 158VF blood donors did not show a

1 significant difference (data not shown). Seven C1C1, three C1C2 and four C2C2 were studied out
2 of 14 blood donors. Of note, the majority of donors (11/14) were HLA-A and/or HLA-B Bw4⁺
3 **(supplemental table S1).**

4 The rituximab-dependent NK cell degranulation was associated with a decreased
5 expression of CD16 on the cell surface (**figure 1C**) as previously demonstrated [28] [29].
6 Rituximab dependent KIR2DL1⁺ other⁻ NK cell degranulation was inhibited against both C2⁺
7 EBV-B cell lines compared to the C2⁻ EBV-B cell line (p<0.0001) (**figure 1C-D**). The
8 degranulation of C2C2 KIR2DL1⁺ others⁻ NK cells was significantly higher than their C1C1
9 counterparts against the C2⁺ EBV-B cell line (p=0.0012) (**figure 1E**). However, the inhibition
10 ratio against C2⁺ EBV-B cell lines compared to the C2⁻ EBV-B cell line was similar for C1C1,
11 C1C2 and C2C2 donors (data not shown) due to a better spontaneous degranulation of educated
12 KIR2DL1⁺ NK cells observed against the C2⁻ EBV-B cell line (**figure 1E**). Interestingly,
13 although KIR2DL1/C2 interaction inhibited the rituximab dependent educated KIR2DL1⁺ other⁻
14 NK cell degranulation, the latter was brought down to the degranulation level of uneducated
15 KIR2DL1⁺ other⁻ NK cells. Together, these results show a significant inhibitory effect of
16 KIR2DL1 on NK cell ADCC and the hyporesponsiveness of uneducated C1C1 KIR2DL1⁺ NK
17 cells.

18

19 **Activating KIR2DS1 triggers rituximab dependent NK cell degranulation from C2⁻ blood** 20 **donors**

21 The activating KIR2DS1 recognizes HLA-C C2 ligands as its inhibitory homolog
22 KIR2DL1 [10] [30] [31] [9]. Using the same KIR-specific mAbs combination, we further

1 investigated the triggering potential of KIR2DS1 on rituximab dependent NK cell degranulation
2 (**figure 2A**). The degranulation of KIR2DS1⁺ others⁻ (KIR2DL1/2/3⁻/3DL1⁻) NK cell subset was
3 higher after rituximab NK cell activation against both C2⁺ EBV-B cell lines in comparison to the
4 C2⁻ EBV-B cell line (p=0.0246) (**figure 2B**). We observed two groups of responders against C2⁺
5 EBV-B cell line. Indeed, this observation was particularly obvious for C1C1 in comparison to
6 C2C2 blood donors (p<0.0001) (**figure 2C**) in accordance with the fact that only KIR2DS1⁺ NK
7 cells from C2⁻ blood donors are C2 alloreactive.

8

9 **Although efficient on rituximab dependent NK cell degranulation, inhibition of**
10 **KIR2DL2/3-C1 interaction brought down it to an overhead level of uneducated counterpart**

11 In the same way, we investigated the potential inhibitory effect of KIR2DL2/3 with its C1
12 ligands on EBV-B cell lines on rituximab dependent NK cell degranulation. KIR2DL2/3⁺ others⁻
13 (KIR2DL1⁻/3DL⁻/2DS1⁻) NK cell subset was targeted using 2 KIR-specific mAbs combination. A
14 first mAbs combination led to exclude KIR3DL1/S1⁺ NK cells and to select KIR2DL2/3⁺ NK
15 cells. A second mAbs combination led to exclude KIR2DL1⁺ and KIR2DS1⁺ NK cells (**figure**
16 **3A**). The rituximab dependent KIR2DL2/3⁺ others⁻ NK cell degranulation was reduced with the
17 C1⁺ EBV-B cell line in comparison with both C1⁻ EBV-B cell lines (p=0.0255) (**figure 3B**). The
18 lower degranulation potential of uneducated C2C2 KIR2DL2/3⁺ others⁻ NK cells was clearly
19 observed against C1⁻ EBV-B cell lines (p=0.0007) and in less extend with only one C1 ligand
20 present to educate KIR2DL2/3⁺ others⁻ NK cells (p=0.0271) (**figure 3C**).

21 Although the KIR2DL2/3/C1 interaction inhibited the rituximab dependent educated
22 KIR2DL2/3⁺ other⁻ NK cell degranulation, the latter was brought down to an overhead level than

1 those of uneducated C2C2 KIR2DL2/3⁺ other⁻ NK cells. Together, these results show a
2 significant inhibitory effect of KIR2DL2/3 on NK cell ADCC and the hyporesponsiveness of
3 uneducated C2C2 KIR2DL2/3⁺ NK cells.

4

5 **Inhibitory KIR3DL1-Bw4 interaction brings rituximab dependent NK cell degranulation** 6 **down to the degranulation baseline of uneducated KIR3DL1⁺ NK cells**

7 KIR3DL1⁺ other⁻ (KIR2DL1/2/3⁻2DS1⁻) NK cells were targeted using a first mAbs
8 combination to select KIR3DL1/S1⁺ NK cells and to exclude KIR2DL2/3⁺ NK cells. A second
9 mAbs combination led to exclude KIR2DL1⁺ and KIR2DS1⁺ NK cells (**figure 4A**). Rituximab
10 dependent KIR3DL1⁺ other⁻ NK cell degranulation was significantly inhibited against Bw4⁺
11 EBV-B cell line in comparison with Bw4⁻ EBV-B cell line after rituximab NK cell activation
12 ($p=0.0002$) (**figure 4B**). Educated KIR3DL1⁺ NK cells displayed a better degranulation than
13 uneducated ones against Bw4⁻ and Bw4⁺ target cells (**figure 4C**). However, the differences of
14 degranulation were not significant due probably to the broad polymorphism of KIR3DL1 known
15 to impact drastically its membrane expression and its inhibitory effect.

16

17 **Lower modulator effect of KIR2DL2/3 than KIR2DL1, KIR3DL1 and KIR2DS1 on** 18 **rituximab dependent NK cell degranulation**

19 After considering each KIR⁺ NK cell subset, we further compared these KIR⁺ NK cell
20 subsets to one another against each EBV-B target cell. KIR⁻ NK cell subset was included in our
21 analysis (supplemental **Figure S2A**) as a control cell subset since its rituximab dependent

1 degranulation was similar against all EBV-B cell lines whatever their HLA class I genotype in
2 terms of KIR ligands (**supplemental figure S2B**).

3 Inhibitory KIR⁺ NK cells display a similar rituximab dependent degranulation against the
4 C1C1 Bw4⁻ EBV-B cell line despite a potential inhibition mediated by KIR2DL2/3/C1
5 interaction (**figure 5A**). Of note, KIR2DS1⁺ others⁻ and KIR⁻ NK cell subsets harbored a lower
6 rituximab dependent degranulation (p=0.0228 between KIR2DS1⁺ others⁻ and KIR2DL1⁺ others⁻
7 NK cell subsets, p=0.0051 between KIR⁻ and KIR2DL1⁺ others⁻ NK cell subsets). In contrast,
8 KIR2DL1/C2 inhibition and KIR2DS1/C2 activation limited rituximab dependent NK cell
9 degranulation against the C2C2 Bw4⁻ EBV-B cell line (**figure 5B**) (p<0.0001 between
10 KIR2DL1⁺others⁻ and KIR3DL1⁺ others⁻ NK cell subsets). Finally, KIR2DL1/C2 and
11 KIR3DL1/Bw4 inhibitions and KIR2DS1/C2 activation also reduced rituximab dependent NK
12 cell degranulation against the C2C2 Bw4⁺ EBV-B cell line (**figure 5C**). Once more, KIR⁻ NK
13 cell subsets harbored a low rituximab dependent NK cell degranulation against these last EBV-B
14 cell lines (**figure 5B-C**). Taken together, these results highlight a lower modulator effect of
15 KIR2DL2/3 with its C1 ligands on NK cell rituximab dependent NK cell degranulation in
16 comparison to inhibitory KIR2DL1 and KIR3DL1 and activating KIR2DS1.

17 In order to have an overview of how KIR and HLA class I molecules affect rituximab
18 dependent NK cell degranulation, we analyzed the NK cell degranulation of all NK cells taking
19 into account the number of KIR ligands and the frequency of peripheral blood KIR⁻ and KIR⁺ NK
20 cells in studied blood donors. For this, we choose the NK cell degranulation against the EBV-B
21 cell line that does not express any KIR ligand susceptible to inhibit NK cell functions. Thus, we
22 kept only results obtained for C1C1 or C2C2 blood donors in this analysis. For instance, the NK
23 cell degranulation from C1C1 and C2C2 Bw4⁻ or Bw4⁺ blood donors was retained respectively

1 against C2C2 Bw4⁻ and C1C1Bw4⁻ EBV-B cell lines. Interestingly, the higher it is, more the KIR
2 ligands number limits the frequency of rituximab dependent CD107a⁺ NK cells ($p=0.01$) (**figure**
3 **5D**). Of note, the frequency of KIR⁺ NK cells (KIR2DL1/2/3⁺ KIR3DL1⁺) whatever their
4 education correlates with the rituximab dependent CD107a⁺ NK cells ($p=0.04$) (**figure 5E**).

5
6 **A low number of KIR ligands and a high peripheral blood KIR⁺ NK cell frequency are both**
7 **good prognostic markers of rituximab responses in lymphoma patients**

8 The influence of CD16, number of KIR ligands and peripheral blood KIR⁺ NK cell
9 frequency was evaluated in a cohort of 74 NHL patients treated with rituximab as part of
10 immunochemotherapy (**Table 1**).

11 Details on treatments and pathologies of NHL patients are presented in **supplemental table**
12 **S2**. Forty-four patients were treated for low grade (LG) NHL (FL, n=24; WM, n=16; other, n=4)
13 and 30 were treated for high grade (HG) (DLBCL, n=16; MCL, n=12; other, n=2). As expected,
14 given the intensity of treatments received, a higher rate of CR was observed in patients treated for
15 a HG NHL compared with those treated for LG NHL ($p=0.003$) (**supplemental figure S3A**).
16 The distribution of CD16 genotype, number of KIR ligands and frequency of peripheral blood
17 KIR⁺ NK cells were comparable between patients treated for HG and LG NHL (**supplemental**
18 **figure S3B-D**).

19 CD16 genotypes distribution in the cohort (10% VV, 47% VF and 43% FF) was consistent
20 with known frequencies [27] [3]. Of note, no association between CD16-158V/F polymorphism
21 and the rituximab response was observed (**figure 6A**).

1 Clinical response to rituximab was analyzed according to the number of KIR ligands and
2 the frequency of peripheral blood KIR⁻ NK cells. Complete responses were significantly higher in
3 the group of patients displaying only 2 KIR ligands compared to more than 5 KIR ligands
4 ($p=0.03$) (**figure 6B**). The same analysis in the LG subgroup shows analogous results with a 75%
5 rate of CR in patients displaying 2 KIR ligands vs 0% in patients displaying ≥ 5 KIR ligands
6 ($p=0.03$) (**supplemental figure S4A**). HG subgroup analysis shows an unfavorable trend for
7 patients with ≥ 5 KIR ligands, with no significant difference, probably due to a small sample size
8 (**supplemental figure S4B**).

9 Moreover, patients with PD are more frequent in patients displaying high frequency of
10 KIR⁻ NK cells ($\geq 71.80\%$) compared to low KIR⁻ NK cell frequency (44.5–56.80%, $p=0.01$ and
11 56.80–71.80%, $p=0.04$) (**figure 6C**). In contrast, CR are less frequent in patients displaying high
12 frequency of KIR⁻ NK cells ($\geq 71.80\%$) compared to lower frequency of KIR⁻ NK cells (44.5–
13 56.80%, $p=0.02$ and 56.80–71.80%, $p=0.01$) (**figure 6C**). The same result was observed when
14 analyzing the LG subgroup, patients exhibiting higher frequency of KIR⁻ NK cells ($\geq 71.80\%$)
15 achieving less CR ($p=0.01$) and more PD ($p=0.01$) (**supplemental figure S5B**). Finally, NK cell
16 subsets phenotype could be determined in 72 patients. Even though non-significant, we observed
17 that the frequency of KIR⁺ NK cells decreased with the increased of KIR ligands number (**figure**
18 **5D**).

19

20

21

22

1 **Discussion**

2 In our *in vitro* cellular model, we determined the optimal rituximab concentration (0.1 µg/ml) in
3 accordance with previous studies [14] leading to assess KIR/HLA inhibition on rituximab
4 dependent NK cell degranulation from blood donors with CD16-158VV or VF genotype to rule
5 out the influence of CD16-158FF polymorphism. All inhibitory KIR investigated in our cellular
6 model inhibit rituximab dependent NK cell degranulation as previously observed by other groups
7 with different cellular models [6] [13] [7] [14] [17] [15]. Nonetheless, KIR2DL1 has a greater
8 effect than KIR2DL2/3 or KIR3DL1. Educated KIR NK cells harbor higher responsiveness
9 compared to uneducated counterpart. However, the inhibitory effect was similar on both NK cell
10 subsets. Thus, despite the inhibitory signal mediated by KIR/HLA interactions, educated NK
11 cells constitute the best subset to mediate high ADCC rituximab dependent NK cell
12 degranulation. Finally, we observed a negative correlation between the rituximab dependent NK
13 cell degranulation and the KIR ligand number and between this degranulation and KIR⁺ NK cell
14 frequencies.

15
16 To go further on the clinical side, we observed an increased frequency of KIR⁻ NK cells
17 and inversely decreased frequency of KIR⁺ NK cells associated with disease progression in
18 lymphoma patients. These results are in accordance with the NK cell dysfunction observed in
19 chronic lymphocytic leukemia (CLL) associated to a striking reduction in the frequency of NK
20 cells expressing KIR2DL1 and/or KIR3DL1 which progressed over time in most patients [18].
21 Our observation can be explained by the poor contribution of KIR⁻ NK cells in rituximab
22 dependent ADCC against all EBV-B cell lines in our cellular model in contrast to educated and
23 uneducated KIR⁺ NK cells. It is known that the induction of ADCC resistance can be explained

1 in part by a lower immune synapse [32]. Genetic diversity in KIRs affects membrane-proximal
2 signaling and the formation of activating immune synapses [33]. KIR⁻ NK cells may present a
3 lower immune synapse due to the absence of education via KIR/HLA interactions. Moreover, our
4 study emphasizes the influence of KIR ligand number on the frequency of KIR⁺ NK cells
5 showing that the frequency of KIR⁺ NK cells decreases with the number of KIR ligands and
6 inversely for KIR⁻ NK cells. Thus, KIR⁺ NK cells appear essential to drive an efficient ADCC
7 rituximab dependent degranulation whatever their education status as even uneducated, KIR⁺ NK
8 cells harbor a higher responsiveness than KIR⁻ NK cells in rituximab dependent degranulation.

9
10 Furthermore, we described for the first time the triggering effect of KIR2DS1-C2
11 interaction on rituximab dependent NK cell degranulation. Although triggering effect of
12 KIR2DS1 on the rituximab dependent total NK cell response is limited due to the low frequency
13 of KIR2DS1⁺ NK cells, it can be an advantage to select KIR2DS1⁺ C2⁻ NK cells in an
14 overarching goal to obtain an efficient CD16⁺ cell line for ADCC as previously described [34].

15
16 Taken together, our results highlight that weak HLA class I environment in terms of KIR
17 ligand number is beneficial to mount a higher frequency of KIR⁺ NK cells including both
18 educated and uneducated NK cells, two NK cell compartments that harbor a higher rituximab
19 dependent degranulation than KIR⁻ NK cells. In contrast, a sizable KIR ligand environment
20 favors a higher frequency of inefficient KIR⁻ NK cells and numerous functional KIR/HLA
21 inhibitions of educated KIR⁺ NK cells. All these parameters explain why lymphoma patients with
22 a weak KIR ligand environment have better rituximab responses. The deleterious influence of
23 CD16-158F/F genotype has been described on clinical outcome after rituximab treatment of NHL

1 patients [3]. In this HLA background, CD16 polymorphism appears to have a collateral effect as
2 no association between CD16-158V/F polymorphism and rituximab responses was observed in
3 74 NHL patients. This discrepancy can be due to the lower number of NHL patients (n=49) in the
4 original study and the focus only on the CD16-158V/F polymorphism as the authors suggested
5 themselves another potential genetic polymorphisms explaining their observations. Moreover, it
6 has been shown that this functional difference of NK cells between VV and FF genotyped
7 patients is hidden by using high rituximab concentrations [5]. Delgado et al. have previously
8 shown that relapsed/refractory neuroblastoma (NB) patients with KIR/KIR-ligand mismatches
9 was associated with better response/improvement to humanized anti-GD2 monoclonal antibody
10 linked to human IL2 in a phase II trial [19]. Interestingly, in their study, autologous KIR/KIR-
11 ligand mismatches were more meaningful than CD16 polymorphism in this study. Due to the
12 limited number of patients and the low frequency of the CD16 158-V/V variant, no significant
13 association between this genotype and response was determined.

14

15 Additive approaches may improve the poor clinical prognostic of rituximab treatment in
16 NHL patients [35]. For instance, it has been demonstrated that the combination of rituximab and
17 inhibitory KIR blocking mAbs yield improved NK cell-mediated lysis over rituximab alone [36]
18 [37].

19

20 Taken together, our results permit an overview on the influence of KIR, KIR ligand and
21 CD16 polymorphisms on rituximab dependent NK cell cytotoxicity integrating genetic rules of
22 the phenotypic and functional structuration of the NK cell repertoire. These results pave the way
23 for strengthening the prediction of rituximab responses for NHL patients. Indeed, a 2 digits HLA

- 1 class I (HLA-A, -B and -C) typing by molecular biology and/or KIR⁺ NK cell frequency
- 2 determined by flow cytometry could be simple and useful markers for predicting rituximab
- 3 responses.
- 4

1 **Declarations**

2 **Ethics approval and consent to participate**

3 The study complies with the Declaration of Helsinki. In addition, declaration of the preparation
4 and conservation of a bio-collection (DC-2014-2340) was submitted to the French Ministry of
5 Research and had received agreement from the IRB (2015- DC-1) to study NK cell reconstitution
6 after transplant. This study was approved by the Ethics Review Board of the Nantes University
7 Hospital and all included patients and blood donors provided informed consent.

8 **Consent for publication**

9 Not required

10 **Availability of data and material**

11 The data that support the findings of this study are included in the article or uploaded as
12 supplementary information. Data are available from the corresponding author on reasonable
13 request.

14 **Competing interests**

15 The authors declare that they have no competing interests.

16 **Funding**

17 This work was financially supported by the Etablissement Français du Sang (EFS)/Centre Pays
18 de la Loire and by grants from la Ligue contre le Cancer (comité de Loire-Atlantique et comité de
19 Charente Maritime), Leucémie Espoir Atlantique Famille (LEAF) and l'Agence de Biomédecine
20 (ABM). DRM is a PhD student supported by Industrial Agreement for Training Through Research

1 Grants 2017/0850. LD is a PhD student supported by la Région Pays de la Loire/EFS Centre Pays
2 de la Loire (N°2018-09766).

3 **Author's contributions**

4 Study design: BC and CR; Acquisition and analysis of flow cytometry data: DRM, GD and CW;
5 HLA typing: AW; KIR genotyping: NL, LD and KG; FcγRIIIa (CD16) genotyping: DRM, NL
6 and GD; Patient's samples collection and clinical documentation: MJ, CT, TG, BT, SLG, BM
7 and PC; Data interpretation: DRM, MJ and CR; Figure and table design: DRM, MJ and CR.
8 Manuscript writing: DRM, MJ and CR; All authors read and approved the final manuscript.

9 **Acknowledgements**

10 We thank all blood volunteer donors and lymphoma patients who accepted to participate to the
11 study. We thank also Dr Catherine Pellat-Deceunynck and Dr Fabienne Haspot for advises.

12

13

14

15

16

17

18

19

1 **References**

- 2 1. Alderson KL, Sondel PM. Clinical Cancer Therapy by NK Cells via Antibody-Dependent
3 Cell-Mediated Cytotoxicity. *J Biomed Biotechnol* [Internet]. 2011 [cited 2019 Jul 25];2011.
4 Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3110303/>
- 5 2. Becker PSA, Suck G, Nowakowska P, Ullrich E, Seifried E, Bader P, et al. Selection and
6 expansion of natural killer cells for NK cell-based immunotherapy. *Cancer Immunol*
7 *Immunother*. 2016;65:477–84.
- 8 3. Cartron G, Dacheux L, Salles G, Solal-Celigny P, Bardos P, Colombat P, et al. Therapeutic
9 activity of humanized anti-CD20 monoclonal antibody and polymorphism in IgG Fc receptor
10 *FcγRIIIa* gene. *Blood*. 2002;99:754–8.
- 11 4. Veeramani S, Wang S-Y, Dahle C, Blackwell S, Jacobus L, Knutson T, et al. Rituximab
12 infusion induces NK activation in lymphoma patients with the high-affinity CD16 polymorphism.
13 *Blood*. 2011;118:3347–9.
- 14 5. Dall'Ozzo S, Tartas S, Paintaud G, Cartron G, Colombat P, Bardos P, et al. Rituximab-
15 dependent cytotoxicity by natural killer cells: influence of FCGR3A polymorphism on the
16 concentration-effect relationship. *Cancer Res*. 2004;64:4664–9.
- 17 6. Borgerding A, Hasenkamp J, Engelke M, Burkhart N, Trümper L, Wienands J, et al. B-
18 lymphoma cells escape rituximab-triggered elimination by NK cells through increased HLA class
19 I expression. *Exp Hematol*. 2010;38:213–21.
- 20 7. Terszowski G, Klein C, Stern M. KIR/HLA interactions negatively affect rituximab- but not
21 GA101 (obinutuzumab)-induced antibody-dependent cellular cytotoxicity. *J Immunol Baltim Md*
22 *1950*. 2014;192:5618–24.
- 23 8. Anfossi N, André P, Guia S, Falk CS, Roetynck S, Stewart CA, et al. Human NK cell
24 education by inhibitory receptors for MHC class I. *Immunity*. 2006;25:331–42.
- 25 9. Morvan M, David G, Sébille V, Perrin A, Gagne K, Willem C, et al. Autologous and
26 allogeneic HLA KIR ligand environments and activating KIR control KIR NK-cell functions. *Eur*
27 *J Immunol*. 2008;38:3474–86.
- 28 10. Chewing JH, Gudme CN, Hsu KC, Selvakumar A, Dupont B. KIR2DS1-positive NK cells
29 mediate alloresponse against the C2 HLA-KIR ligand group in vitro. *J Immunol Baltim Md 1950*.
30 2007;179:854–68.
- 31 11. Pittari G, Liu X-R, Selvakumar A, Zhao Z, Merino E, Huse M, et al. NK cell tolerance of
32 self-specific activating receptor KIR2DS1 in individuals with cognate HLA-C2 ligand. *J*
33 *Immunol Baltim Md 1950*. 2013;190:4650–60.

- 1 12. Uhrberg M, Valiante NM, Shum BP, Shilling HG, Lienert-Weidenbach K, Corliss B, et al.
2 Human diversity in killer cell inhibitory receptor genes. *Immunity*. 1997;7:753–63.
- 3 13. Tarek N, Le Luque J-B, Gallagher MM, Zheng J, Venstrom JM, Chamberlain E, et al.
4 Unlicensed NK cells target neuroblastoma following anti-GD2 antibody treatment. *J Clin Invest*.
5 2012;122:3260–70.
- 6 14. Du J, Lopez-Verges S, Pitcher BN, Johnson J, Jung S-H, Zhou L, et al. CALGB 150905
7 (Alliance): rituximab broadens the antilymphoma response by activating unlicensed NK cells.
8 *Cancer Immunol Res*. 2014;2:878–89.
- 9 15. Lisovsky I, Kant S, Tremblay-McLean A, Isitman G, Kiani Z, Dupuy FP, et al. Differential
10 contribution of education through KIR2DL1, KIR2DL3, and KIR3DL1 to antibody-dependent
11 (AD) NK cell activation and ADCC. *J Leukoc Biol*. 2019;105:551–63.
- 12 16. Kristensen AB, Kent SJ, Parsons MS. Contribution of NK Cell Education to both Direct and
13 Anti-HIV-1 Antibody-Dependent NK Cell Functions. *J Virol*. 2018;92.
- 14 17. Forlenza CJ, Boudreau JE, Zheng J, Le Luque J-B, Chamberlain E, Heller G, et al.
15 KIR3DL1 Allelic Polymorphism and HLA-B Epitopes Modulate Response to Anti-GD2
16 Monoclonal Antibody in Patients With Neuroblastoma. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*.
17 2016;34:2443–51.
- 18 18. MacFarlane AW, Jillab M, Smith MR, Alpaugh RK, Cole ME, Litwin S, et al. NK cell
19 dysfunction in chronic lymphocytic leukemia is associated with loss of the mature cells
20 expressing inhibitory killer cell Ig-like receptors. *Oncoimmunology*. 2017;6:e1330235.
- 21 19. Delgado DC, Hank JA, Kolesar J, Lorentzen D, Gan J, Seo S, et al. Genotypes of NK cell
22 KIR receptors, their ligands, and Fcγ receptors in the response of neuroblastoma patients to
23 Hu14.18-IL2 immunotherapy. *Cancer Res*. 2010;70:9554–61.
- 24 20. Erbe AK, Wang W, Carmichael L, Hoefges A, Grzywacz B, Reville PK, et al. Follicular
25 lymphoma patients with KIR2DL2 and KIR3DL1 and their ligands (HLA-C1 and HLA-Bw4)
26 show improved outcome when receiving rituximab. *J Immunother Cancer*. 2019;7:70.
- 27 21. Cheson BD, Pfistner B, Juweid ME, Gascoyne RD, Specht L, Horning SJ, et al. Revised
28 response criteria for malignant lymphoma. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. 2007;25:579–
29 86.
- 30 22. Owen RG, Kyle RA, Stone MJ, Rawstron AC, Leblond V, Merlini G, et al. Response
31 assessment in Waldenström macroglobulinaemia: update from the VIth International Workshop.
32 *Br J Haematol*. 2013;160:171–6.
- 33 23. Morvan M, David G, Sébille V, Perrin A, Gagne K, Willem C, et al. Autologous and
34 allogeneic HLA KIR ligand environments and activating KIR control KIR NK-cell functions. *Eur*
35 *J Immunol*. 2008;38:3474–86.

- 1 24. Willem C, Makanga DR, Guillaume T, Maniangou B, Legrand N, Gagne K, et al. Impact of
2 KIR/HLA Incompatibilities on NK Cell Reconstitution and Clinical Outcome after T Cell–
3 Replete Haploidentical Hematopoietic Stem Cell Transplantation with Posttransplant
4 Cyclophosphamide. *J Immunol*. 2019;202:2141–52.
- 5 25. Sun JY, Gaidulis L, Miller MM, Goto RM, Rodriguez R, Forman SJ, et al. Development of a
6 multiplex PCR-SSP method for Killer-cell immunoglobulin-like receptor genotyping. *Tissue*
7 *Antigens*. 2004;64:462–8.
- 8 26. Hsu KC, Chida S, Geraghty DE, Dupont B. The killer cell immunoglobulin-like receptor
9 (KIR) genomic region: gene-order, haplotypes and allelic polymorphism. *Immunol Rev*.
10 2002;190:40–52.
- 11 27. Leppers-van de Straat FG, van der Pol WL, Jansen MD, Sugita N, Yoshie H, Kobayashi T, et
12 al. A novel PCR-based method for direct Fc gamma receptor IIIa (CD16) allotyping. *J Immunol*
13 *Methods*. 2000;242:127–32.
- 14 28. Bowles JA, Weiner GJ. CD16 polymorphisms and NK activation induced by monoclonal
15 antibody-coated target cells. *J Immunol Methods*. 2005;304:88–99.
- 16 29. Romee R, Foley B, Lenvik T, Wang Y, Zhang B, Ankarlo D, et al. NK cell CD16 surface
17 expression and function is regulated by a disintegrin and metalloprotease-17 (ADAM17). *Blood*.
18 2013;121:3599–608.
- 19 30. Fauriat C, Ivarsson MA, Ljunggren H-G, Malmberg K-J, Michaëlsson J. Education of human
20 natural killer cells by activating killer cell immunoglobulin-like receptors. *Blood*.
21 2010;115:1166–74.
- 22 31. Foley B, De Santis D, Lathbury L, Christiansen F, Witt C. KIR2DS1-mediated activation
23 overrides NKG2A-mediated inhibition in HLA-C C2-negative individuals. *Int Immunol*.
24 2008;20:555–63.
- 25 32. Aldeghaither DS, Zahavi DJ, Murray JC, Fertig EJ, Graham GT, Zhang Y-W, et al. A
26 Mechanism of Resistance to Antibody-Targeted Immune Attack. *Cancer Immunol Res*.
27 2019;7:230–43.
- 28 33. Kennedy PR, Barthen C, Williamson DJ, Pitkeathly WTE, Hazime KS, Cumming J, et al.
29 Genetic diversity affects the nanoscale membrane organization and signaling of natural killer cell
30 receptors. *Sci Signal*. 2019;12.
- 31 34. Clémenceau B, Vivien R, Pellat C, Foss M, Thibault G, Vié H. The human natural killer
32 cytotoxic cell line NK-92, once armed with a murine CD16 receptor, represents a convenient
33 cellular tool for the screening of mouse mAbs according to their ADCC potential. *mAbs*.
34 2013;5:587–94.
- 35 35. Wang W, Erbe AK, Hank JA, Morris ZS, Sondel PM. NK Cell-Mediated Antibody-
36 Dependent Cellular Cytotoxicity in Cancer Immunotherapy. *Front Immunol*. 2015;6:368.

1 36. Binyamin L, Alpaugh RK, Hughes TL, Lutz CT, Campbell KS, Weiner LM. Blocking NK
2 cell inhibitory self-recognition promotes antibody-dependent cellular cytotoxicity in a model of
3 anti-lymphoma therapy. *J Immunol Baltim Md 1950*. 2008;180:6392–401.

4 37. Kohrt HE, Thielens A, Marabelle A, Sagiv-Barfi I, Sola C, Chanuc F, et al. Anti-KIR
5 antibody enhancement of anti-lymphoma activity of natural killer cells as monotherapy and in
6 combination with anti-CD20 antibodies. *Blood*. American Society of Hematology;
7 2014;123:678–86.

8

9

10

11

12

13

14

15

16

17

18

19

20

21

1 **Figure legends**

2

3 **Figure 1. Inhibitory KIR2DL1-C2 interaction brings rituximab dependent educated**
4 **KIR2DL1⁺ NK cell degranulation down to the degranulation baseline of uneducated**
5 **counterpart. (A)** Representative density plots illustrating the strategy to target KIR2DL1⁺ others⁻
6 (KIR2DL2/3⁻ 3DL1/S1⁻, 2DS1⁻) NK cells and to determine their rituximab (RTX) dependent NK
7 cell degranulation (CD107a⁺) against representative C2⁻ or C2⁺ EBV-B cell line by flow
8 cytometry. **(B)** Determination of the optimal rituximab (RTX) concentration to observe inhibiting
9 KIR2DL1-C2 interaction on ADCC. **(C)** Rituximab (RTX) dependent KIR2DL1⁺ others⁻ NK cell
10 degranulation (% CD107a⁺) against C2⁻ (n=14) and C2⁺ (Bw4⁻, n=14 and Bw4⁺, n=14) EBV-B
11 cell lines for all blood donors determined by flow cytometry. **(D)** Rituximab (RTX) dependent
12 KIR2DL1⁺ others⁻ NK cell degranulation (% CD107a⁺) against one C2⁻ EBV-B cell line for
13 C1C1 (n=6), C1C2 (n=3) and C2C2 (n=4) blood donors determined by flow cytometry. **(E)**
14 Rituximab (RTX) dependent KIR2DL1⁺ others⁻ NK cell degranulation against 2 C2⁺ (Bw4⁻ and
15 Bw4⁺) EBV-B cell lines for C1C1 (n=12), C1C2 (n=6) and C2C2 (n=8) blood donors determined
16 by flow cytometry. **p<0.01, ****p<0.0001.

17

18 **Figure 2. Activating KIR2DS1 triggers rituximab dependent NK cell degranulation from**
19 **C2⁻ blood donors. (A)** Representative density plots illustrating the strategy to target KIR2DS1⁺
20 others⁻ (KIR2DL1/2/3⁻ 3DL1/S1⁻) NK cells and to determine their rituximab (RTX) dependent
21 NK cell degranulation against representative C2⁻ or C2⁺ EBV-B cell lines by flow cytometry. **(B)**
22 Rituximab (RTX) dependent KIR2DS1⁺ others⁻ NK cell degranulation (% CD107a⁺) against C2⁻

1 (n=7) and C2⁺ (Bw4⁻, n=7 and Bw4⁺, n=7) EBV-B cell lines for all blood donors determined by
2 flow cytometry. (C) Rituximab dependent KIR2DS1⁺ others⁻ NK cell degranulation against 2 C2⁺
3 (Bw4⁻ and Bw4⁺) EBV-B cell lines for C1C1 (n=8) and C2C2 (n=6) blood donors and against
4 one C2⁻ EBV-B cell line for C1C1 (n=4) and C2C2 (n=3) blood donors determined by flow
5 cytometry. *p<0.05, ****p<0.0001.

6
7 **Figure 3. Although efficient on rituximab dependent NK cell degranulation, inhibition of**
8 **KIR2DL2/3-C1 interaction brought down it to an overhead level of uneducated**
9 **counterpart. (A)** Representative density plots illustrating the strategy to target KIR2DL2/3⁺
10 others⁻ (KIR2DL1/2DS1⁻ 3DL1/S1⁻) NK cells and to determine their rituximab (RTX) dependent
11 NK cell degranulation (% CD107a⁺) against representative C1⁻ or C1⁺ EBV-B cell lines by flow
12 cytometry. (B) Rituximab dependent KIR2DL2/3⁺ others⁻ NK cell degranulation (% CD107a⁺)
13 against C1⁻ (Bw4⁻, n=14 and Bw4⁺, n=14) and C1⁺ (n=14) EBV-B cell lines for all blood donors
14 determined by flow cytometry. (C) Rituximab dependent KIR2DL2/3⁺ others⁻ NK cell
15 degranulation against C1⁻ EBV-B cell lines for C1C1 (n=14), C1C2 (n=6) and C2C2 (n=8) blood
16 donors and against C1⁺ EBV-B cell lines for C1C1 (n=7), C1C2 (n=3) and C2C2 (n=4) blood
17 donors determined by flow cytometry. *p<0.05, **p<0.01.

18
19 **Figure 4. Inhibitory KIR3DL1-Bw4 interaction brings rituximab dependent NK cell**
20 **degranulation down to the degranulation baseline of uneducated KIR3DL1⁺ NK cells. (A)**
21 Representative density plots illustrating the strategy to target KIR3DL1⁺ others⁻ (KIR2DL1/2/3⁻
22 2DS1⁻ 3DS1⁻) NK cells and to determine their rituximab (RTX) dependent NK cell degranulation
23 (%CD107a⁺) against representative Bw4⁻ or Bw4⁺ EBV-B cell lines by flow cytometry. (B)

1 Rituximab dependent KIR3DL1⁺ others⁻ NK cell degranulation against Bw4⁻ (Bw4⁻, n=11 and
2 Bw4⁺, n=11) and Bw4⁺ (n=11) EBV-B cell lines for all blood donors determined by flow
3 cytometry. (C) Rituximab dependent KIR3DL1⁺ others⁻ NK cell degranulation against Bw4⁻
4 EBV-B cell lines for Bw4⁻ (n=6) and Bw4⁺ (n=16) blood donors and against Bw4⁺ EBV-B cell
5 lines for Bw4⁻ (n=3) and Bw4⁺ (n=8) blood donors determined by flow cytometry. ***p<0.005

6
7 **Figure 5. Lower modulator effect of KIR2DL2/3 than KIR2DL1, KIR3DL1 and KIR2DS1**
8 **on rituximab dependent NK cell degranulation.** Rituximab dependent NK cell degranulation
9 (%CD107a⁺) for each targeted NK cell subset: 2DL1⁻ others⁻, 2DL2/3 others⁻, 3DL1⁺ others⁻,
10 2DS1⁺ others⁻ and KIR- NK cells against (A) C1C1 Bw4⁻ EBV-B cell line (B) C2C2 Bw4⁻ EBV-
11 B cell line and (C) C2C2 Bw4⁺ EBV-B cell line. ANOVA test. (D) Rituximab dependent NK cell
12 degranulation (CD107a⁺ %) following KIR ligands number. The Student's t-test was performed
13 between the series with 3 and 5 KIR ligands number. (E) Correlation between percentage of
14 rituximab dependent NK cell degranulation (CD107a⁺ %) and the KIR⁺ NK cell frequency.
15 *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.005, ****p<0.0001.

16
17 **Figure 6. A low number of KIR ligands and a high peripheral blood KIR⁺ NK cell**
18 **frequency are both good prognostic markers of rituximab responses in lymphoma patients.**
19 (A) Pie charts representing the distribution of lymphoma patients (n=74) following clinical
20 outcome (CR, PR and SD/PD) and CD16 polymorphism (VV, VF and FF). (B) Pie charts
21 representing the distribution of lymphoma patients following clinical outcome (CR, PR and
22 SD/PD) and the number of KIR ligands (2, 3, 4 or ≥5). (C) Pie charts representing the
23 distribution of lymphoma patients following clinical outcome (CR, PR and SD/PD) and the KIR⁻

1 NK cell frequency (≤ 44.5 , $44.5 - 56.80$, $56.80 - 71.80$ and ≥ 71.80). **(D)** KIR⁺ NK cell frequencies
2 following the number of KIR ligands for all lymphoma patients. The green and blue lines
3 determine the significant difference between 2 groups for CR and SD/PD outcomes *p<0.05.

4

5

6

7

8

9

10

11

12

13

14

15

16

17

18

1 **Table 1. Characteristics of Patients**

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

2 Data are presented as n (%).

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

5

6

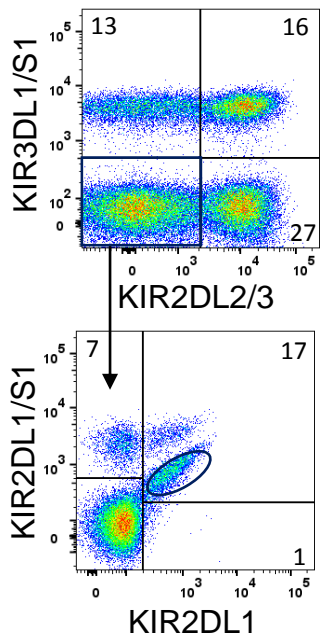
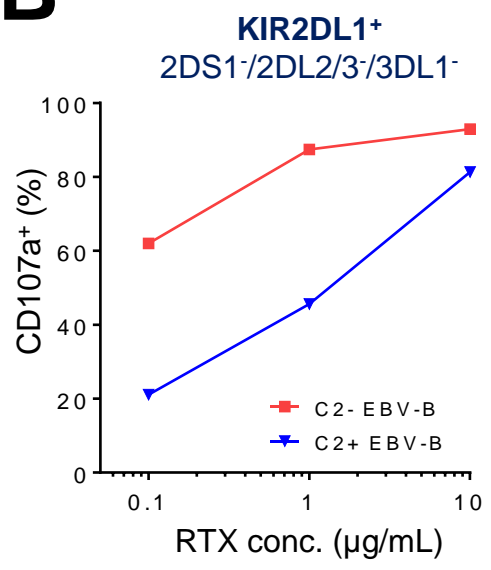
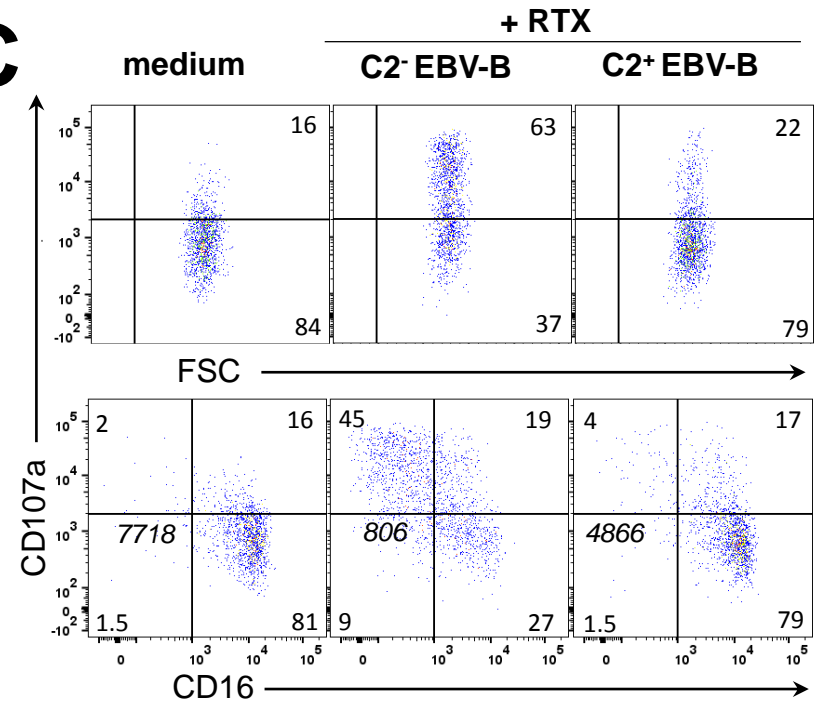
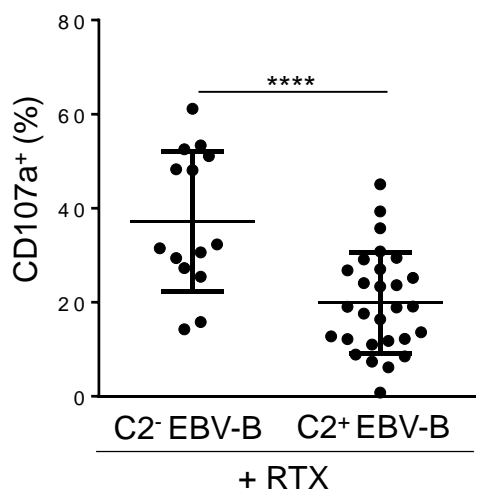
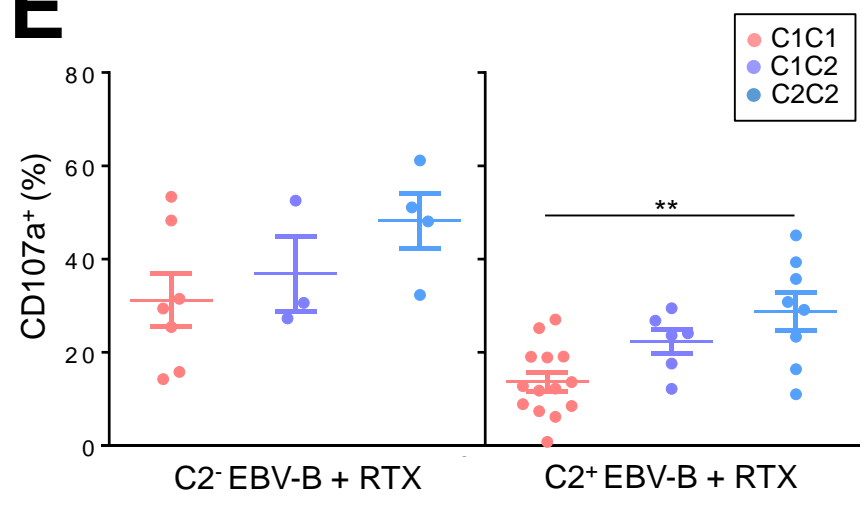
A**B****C****D****E**

FIGURE 1

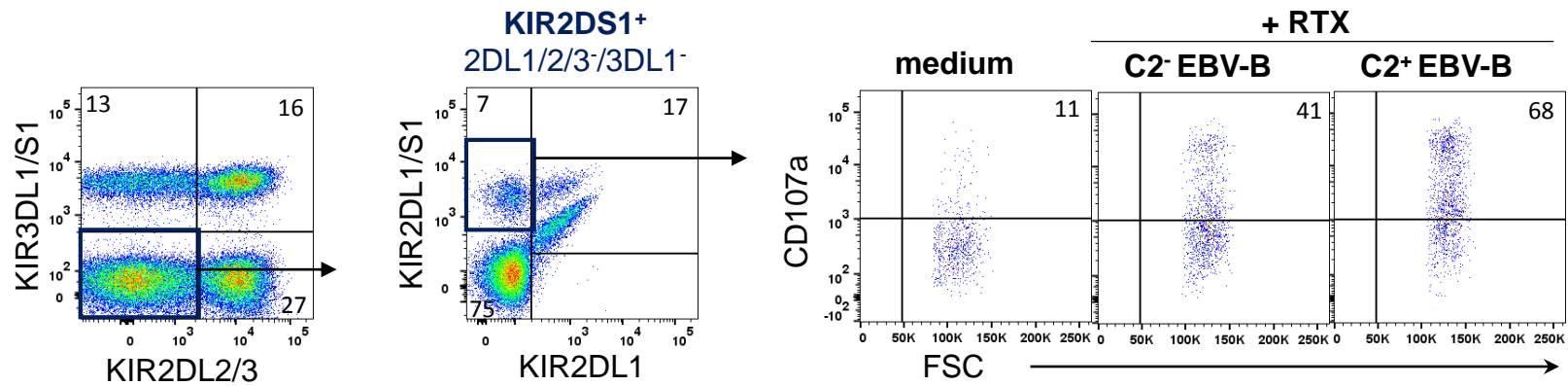
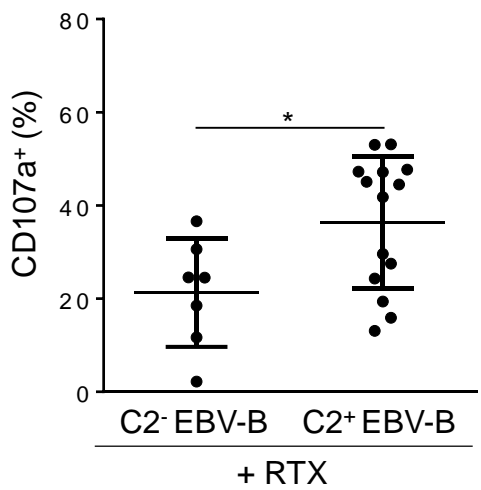
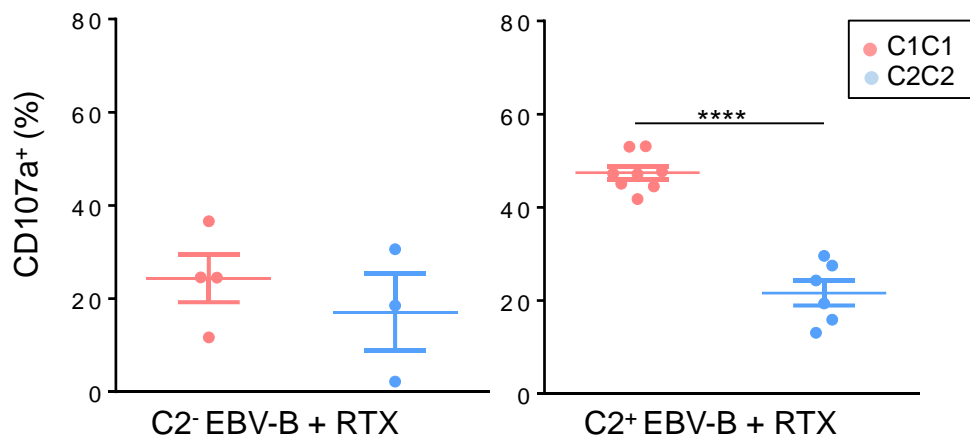
A**B****C**

FIGURE 2

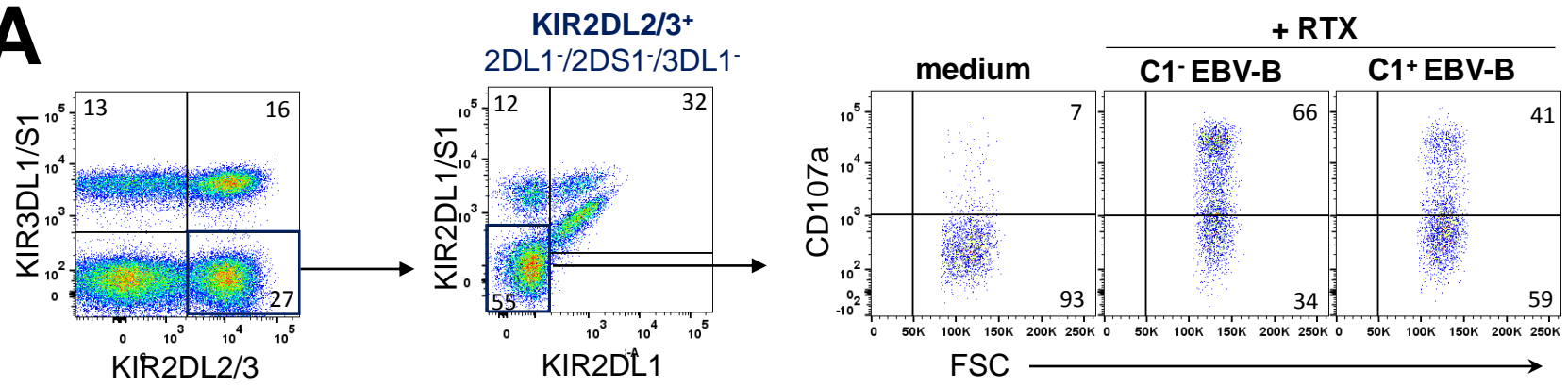
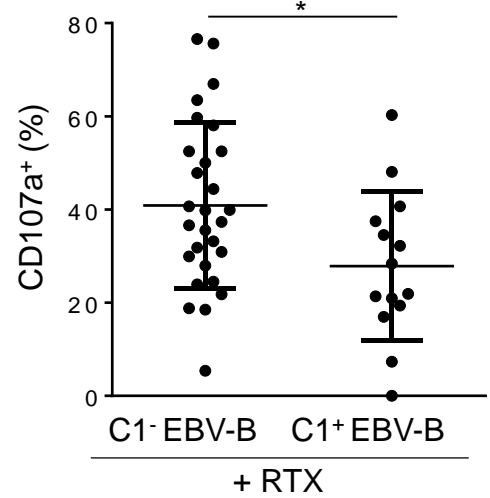
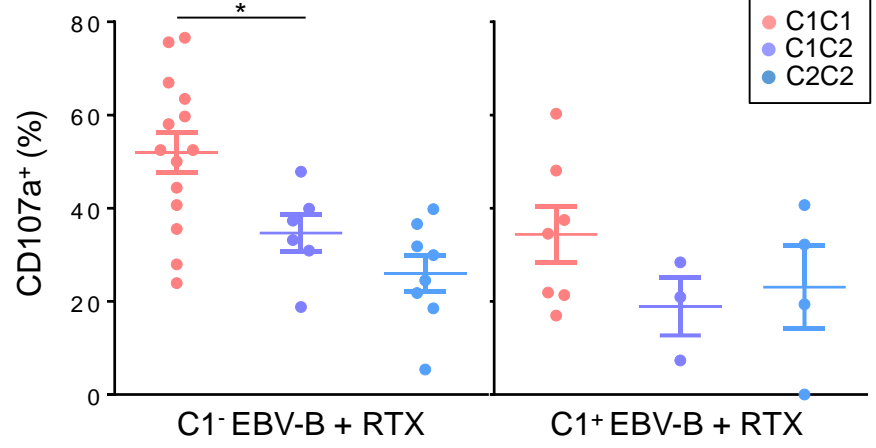
A**B****C**

FIGURE 3

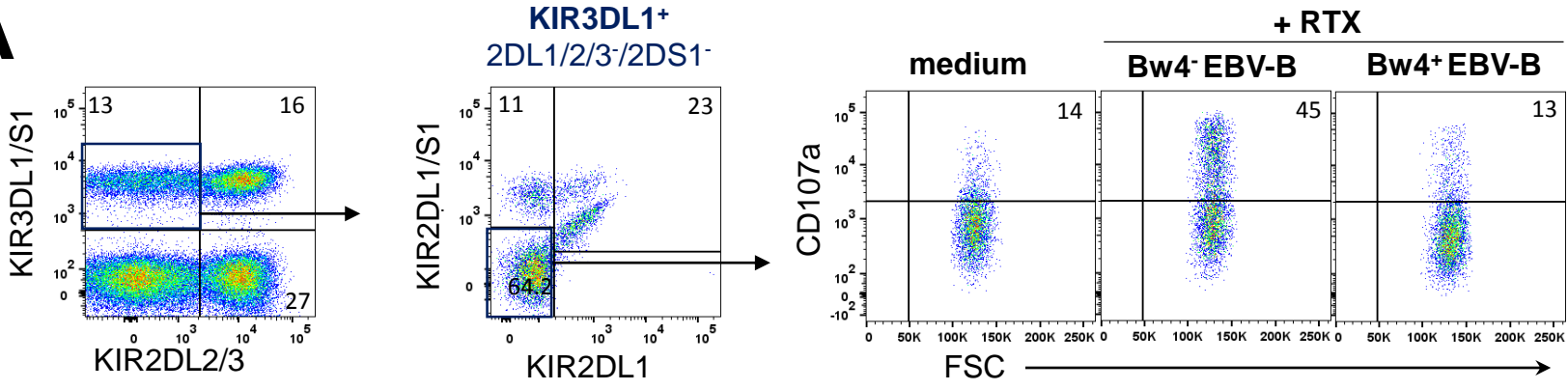
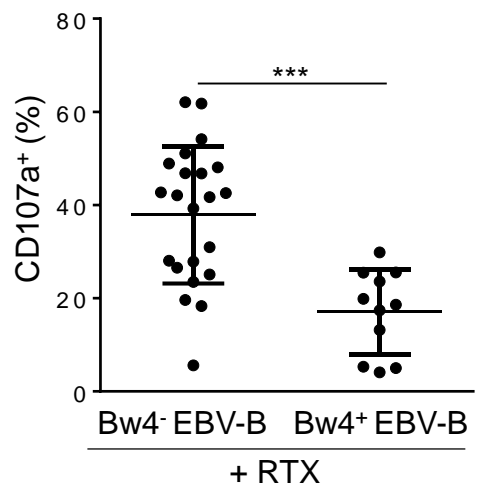
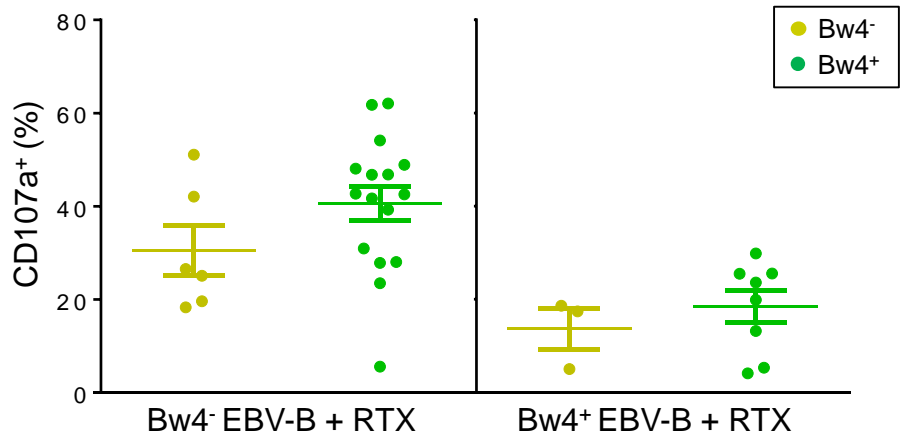
A**B****C**

FIGURE 4

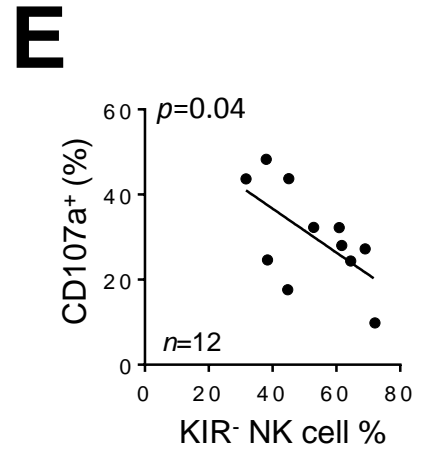
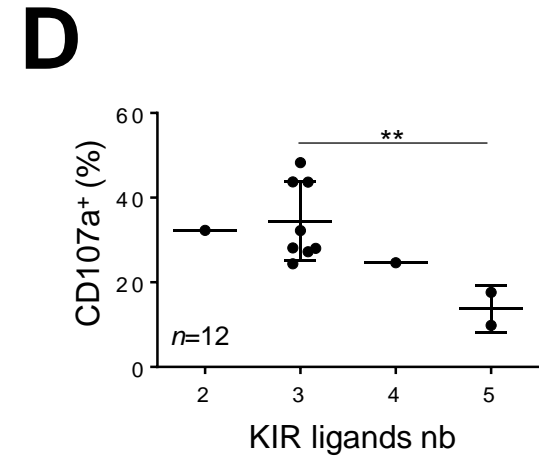
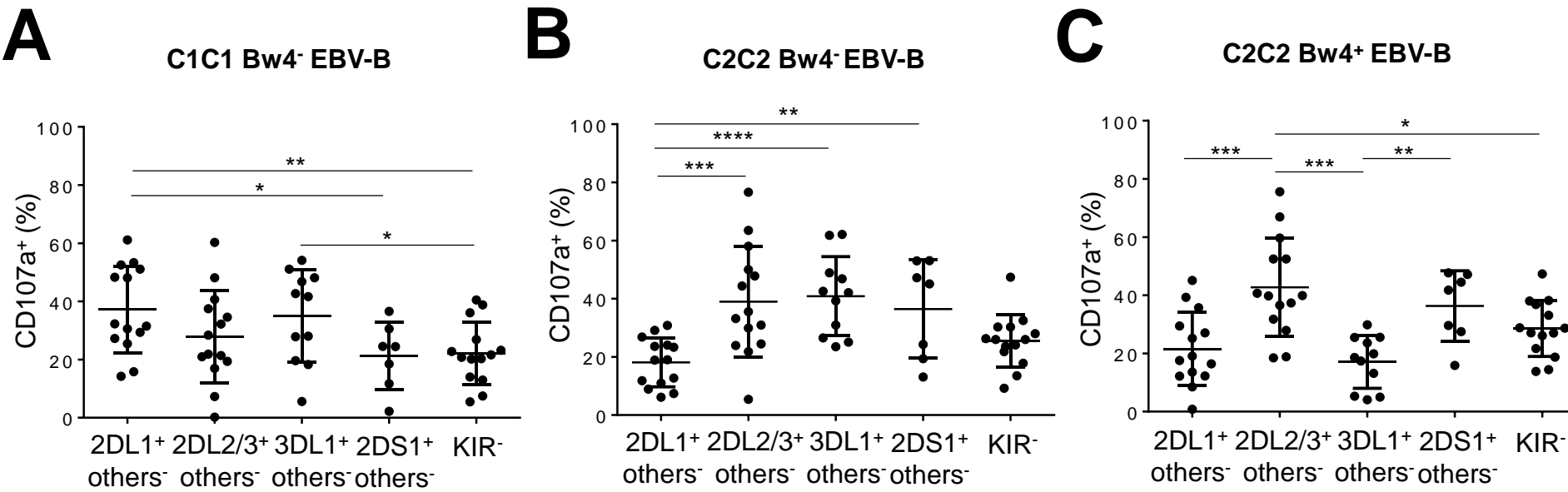
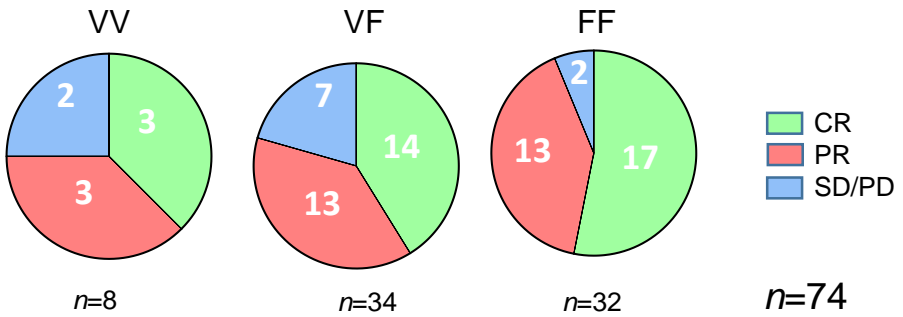
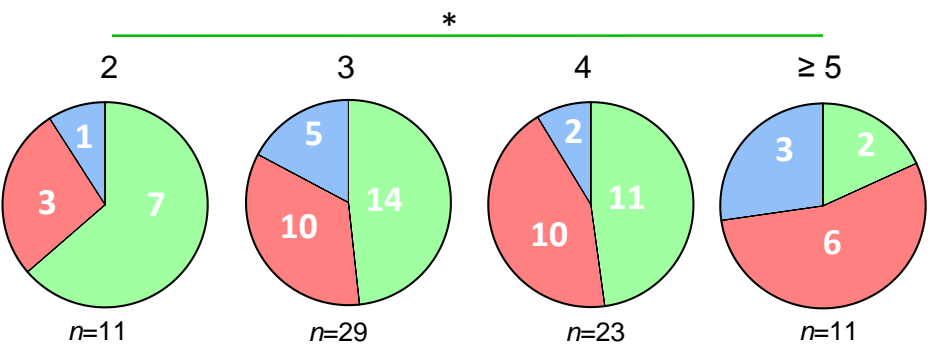
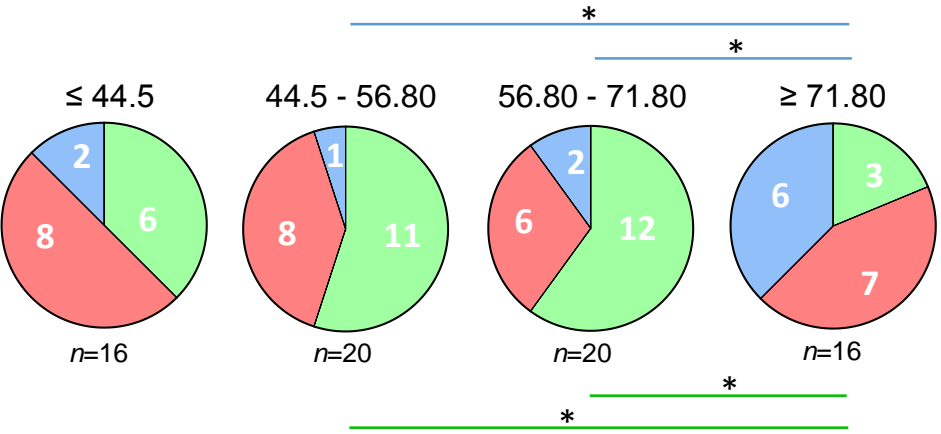
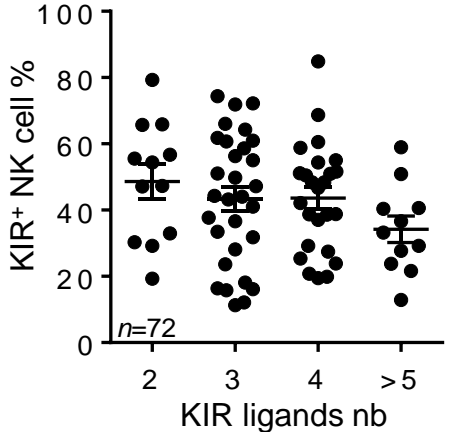


FIGURE 5

A**CD16 genotype****B****KIR ligands number****C****KIR⁻ NK cell %****D****FIGURE 6**

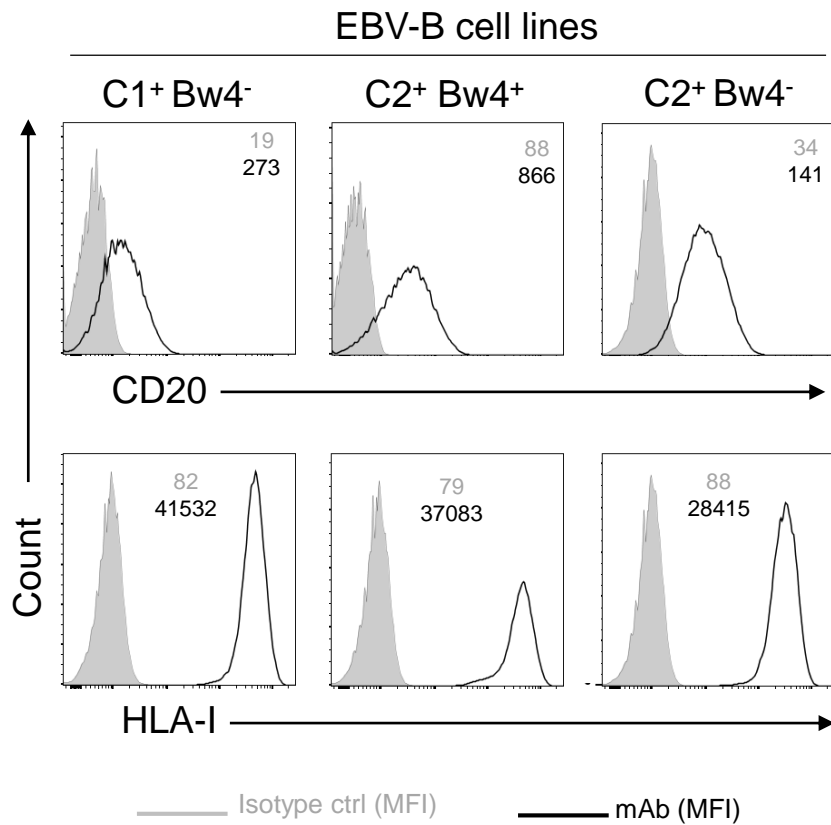


Figure S1. Profile of CD20 and HLA class I expression of homozygous HLA EBV-B cell lines used in the cellular model to investigate the KIR/HLA modulation on rituximab dependent NK cell degranulation. Histograms showing CD20 and HLA class I expression on C1+Bw4⁻, C2+Bw4⁺ and C2+Bw4⁻ EBV-B cell lines determined by flow cytometry using a specific mAb (open histogram) and isotype IgG controls (grey histogram). The Mean Fluorescent Intensity is indicated in each histogram following the color code.

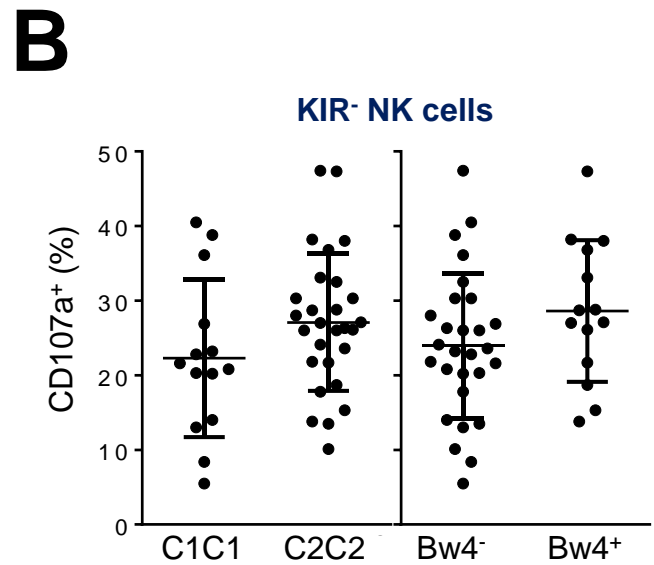
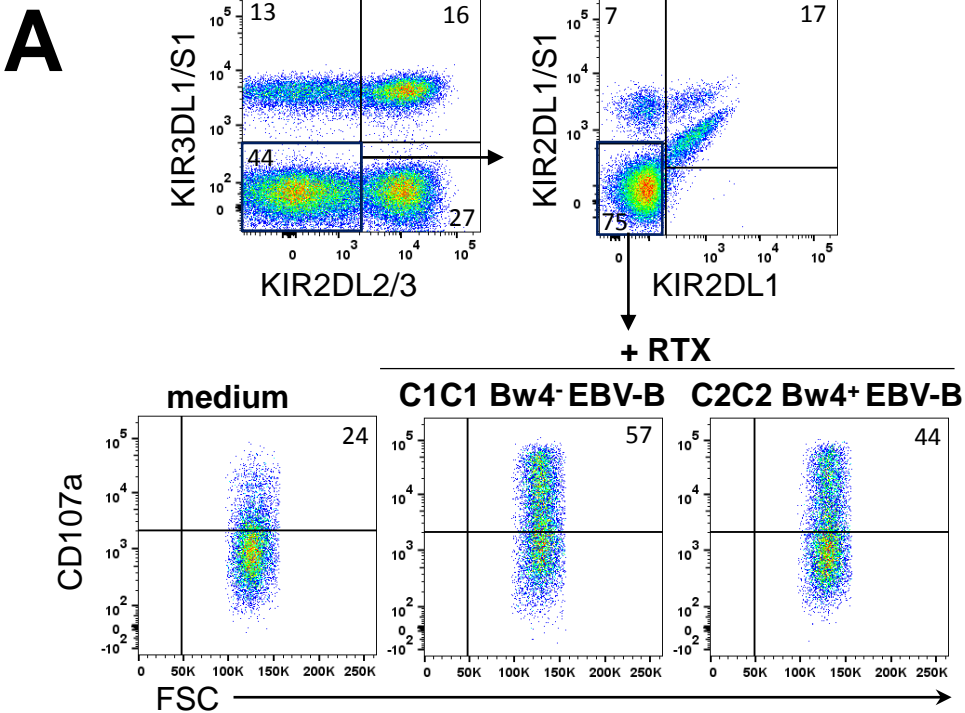


Figure S2. Targeting strategy of KIR⁻ NK cells to assess its rituximab dependent degranulation. (A) Density plots illustrating the gating strategy of KIR⁻ NK cell subset by flow cytometry. (B) Rituximab dependent NK cell degranulation for KIR⁻ cells against C1C1 (n=14), C2C2 (n=28), Bw4⁻ (n=28) and Bw4⁺ (n=14) EBV-B cell lines.

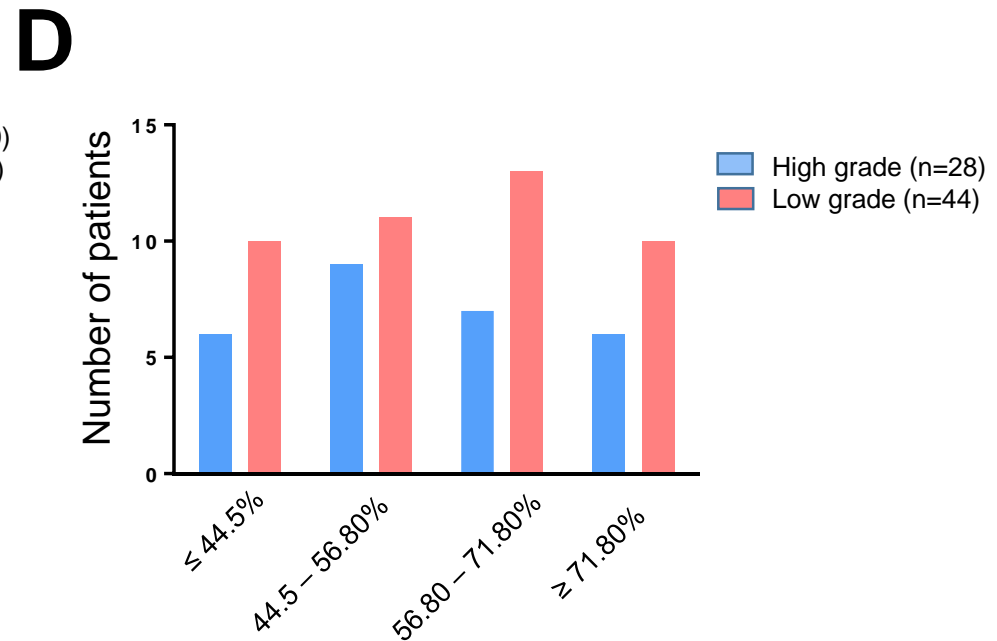
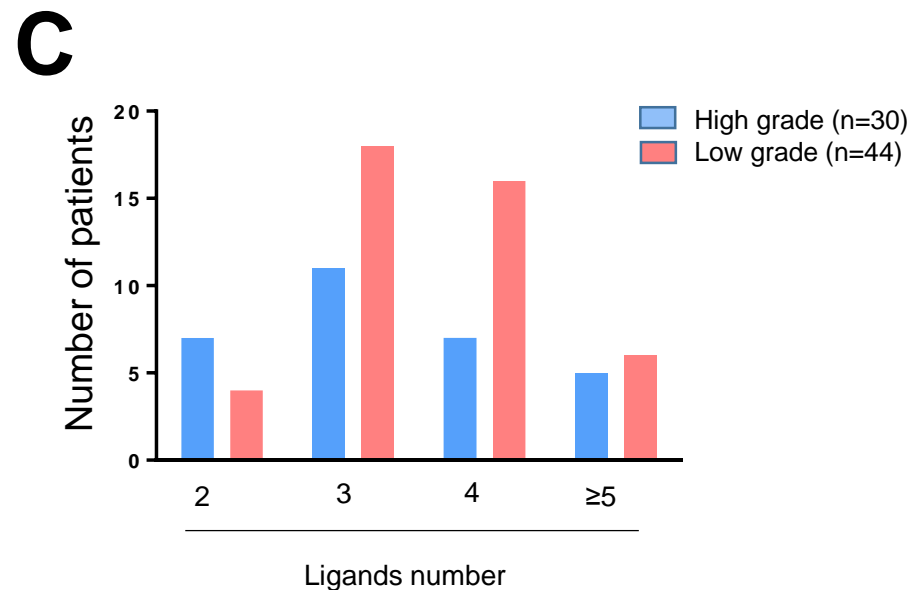
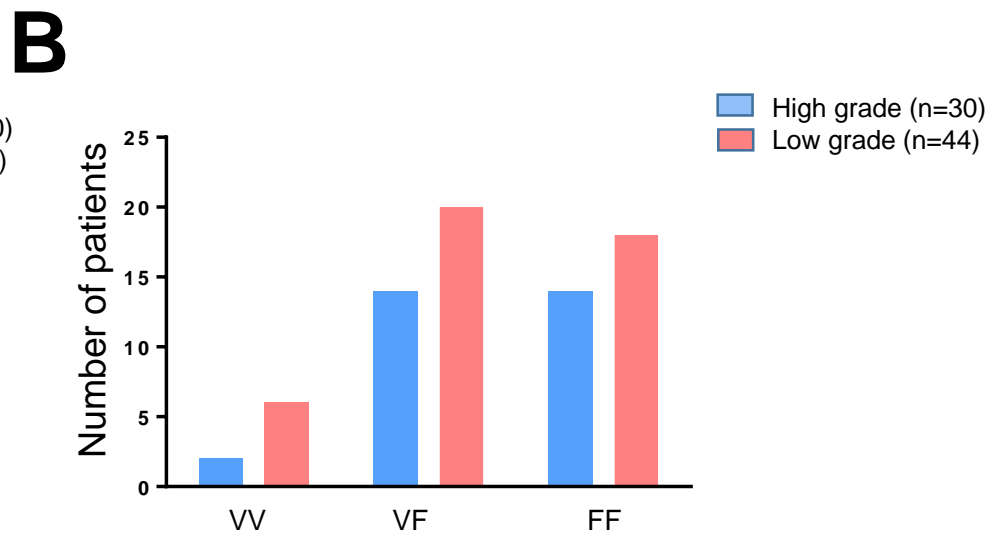
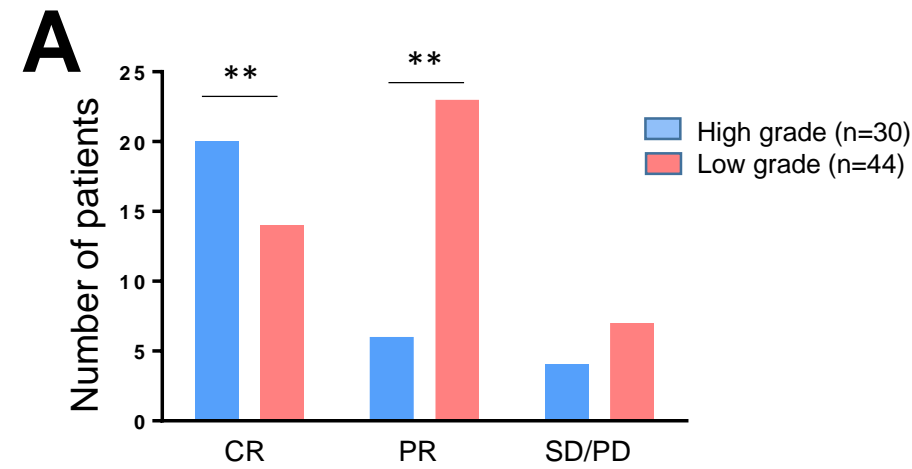


Figure S3. Distribution of lymphoma patients following clinical grade level. Histograms representing the distribution of high grade and low grade lymphoma patients (n=74) following **(A)** clinical outcome (CR, PR and SD/PD), **(B)** CD16 polymorphism (VV, VF and FF), **(C)** the number of KIR ligands (2, 3, 4 or ≥5) and **(D)** the KIR⁺ NK cell frequency (≤ 44.5, 44.5 - 56.80, 56.80 - 71.80 and ≥ 71.80). *p<0.05.

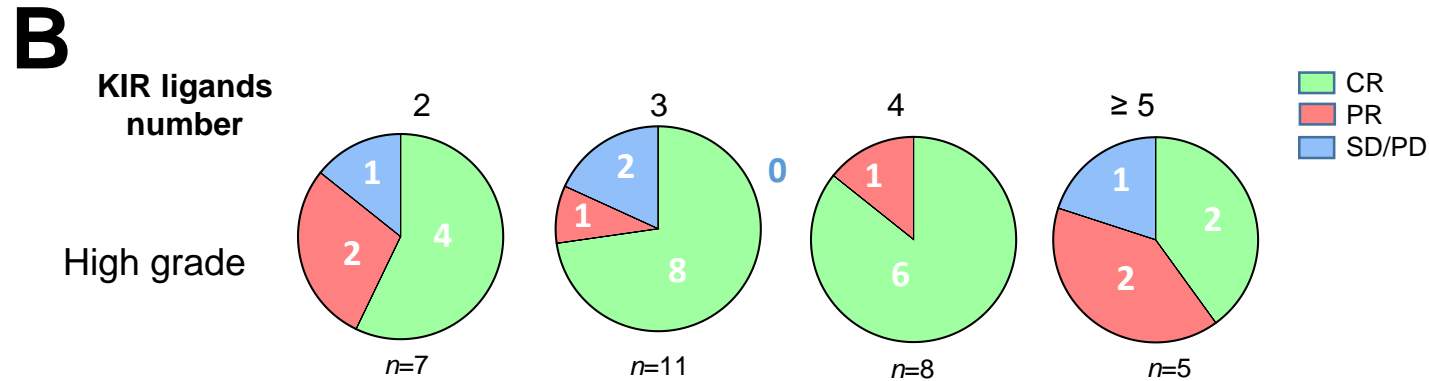
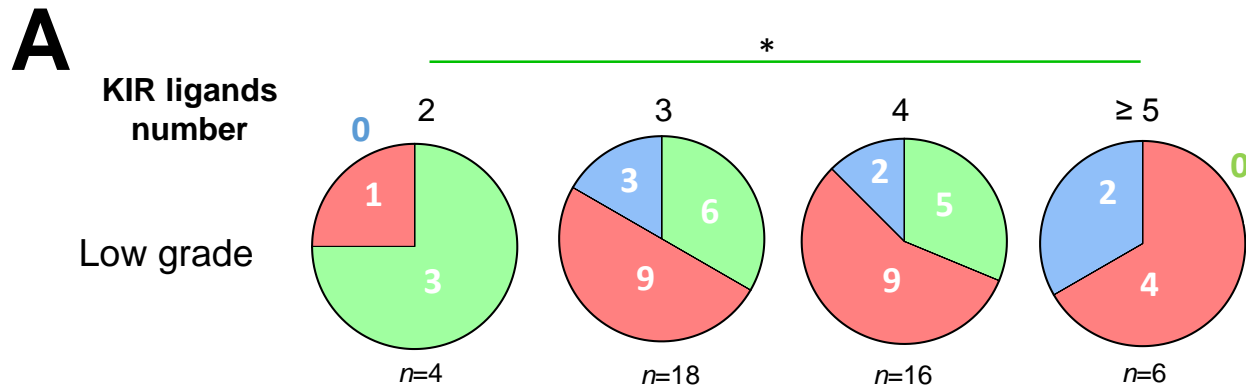


Figure S4. A low number of KIR ligands is a good prognostic marker of rituximab responses in low grade lymphoma patients. Pie charts representing the distribution of (A) low grade and (B) high grade lymphoma patients following clinical outcome (CR, PR and SD/PD) and the number of KIR ligands (2, 3, 4 or ≥ 5). The green line determines the significant difference between 2 groups for CR outcome. * $p < 0.05$.

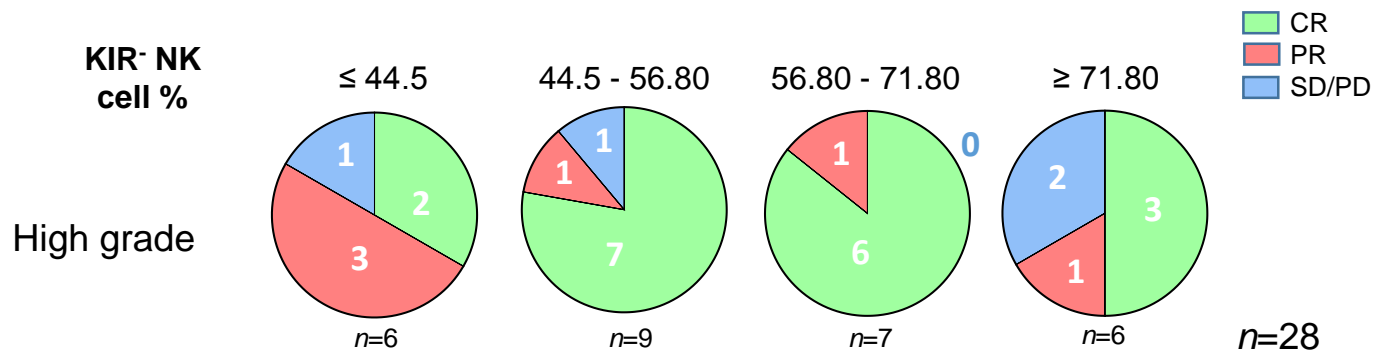
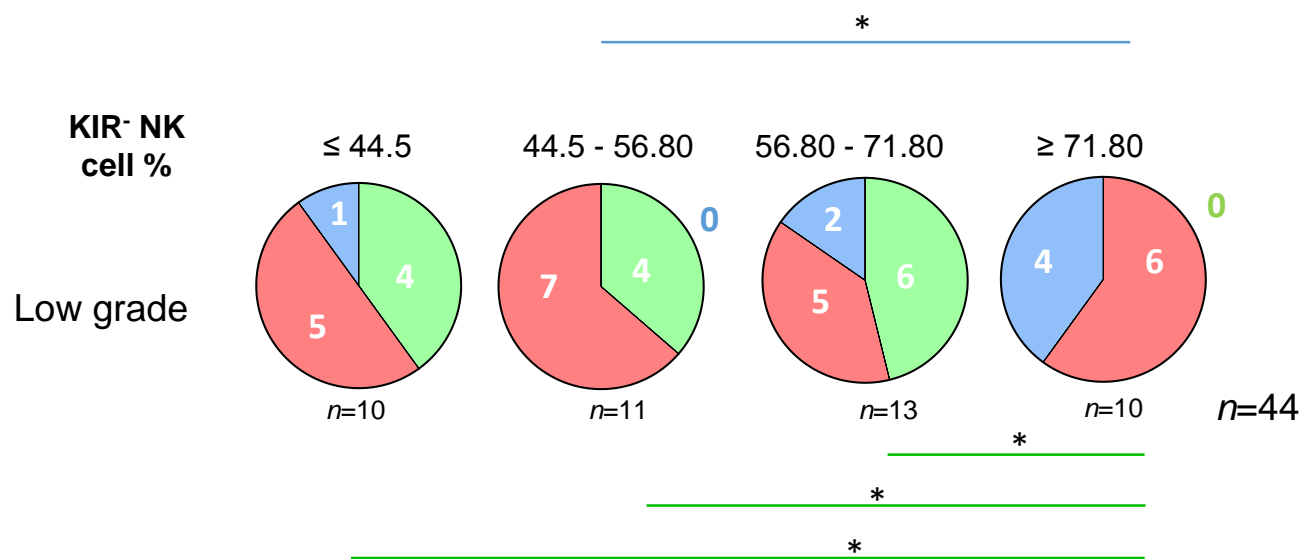
A**B**

Figure S5. A low peripheral blood KIR⁻ NK cell frequency is a good prognostic marker of rituximab responses in low grade lymphoma patients. Pie charts representing the distribution of (A) high grade and (B) low grade lymphoma patients following clinical outcome (CR, PR and SD/PD) and the KIR⁻ NK cell frequency (≤ 44.5, 44.5 - 56.80, 56.80 - 71.80 and ≥ 71.80). The green and blue lines determine the significant difference between 2 groups for CR and SD/PD outcomes. *p<0.05.

Table S1. KIR and HLA genotypes and CD16 polymorphism of healthy blood donors

Donor	KIR genes ^a															KIR genotype	HLA typing						KIR ligands		FCGR3A V158F	CMV status
	2DL1	2DL2	2DL3	2DL4	2DL5	3DL1	3DL2	3DL3	2DS1	2DS2	2DS3	2DS4	1D	2DS5	3DS1		HLA-A*	HLA-B*	HLA-C*	Nature	Nb					
D1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	AB	03:01	68:01	07:02	40:01	03:04	07:02	A3 C1	3	V/F	+
D2	1	0	1	1	0	1	1	1	0	0	0	0	1	0	0	AA	01:01	24:02	07:02	39:01	07:02	12:03	Bw4 C1	3	V/F	-
D3	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	1	1	1	AB	02:01	24:02	07:02	15:01	03:04	07:02	Bw4 C1	3	V/F	-
D4	1	0	1	1	0	1	1	1	0	0	0	1	1	0	0	AA	03	03	07	14	07	08	A3 C1	4	V/V	-
D5	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	AB	31:01	68:01	18:01	39:01	07:01	12:03	C1	2	V/V	-
D6	1	0	1	1	0	1	1	1	0	0	0	1	1	0	0	AA	03:01	24:02	38:01	51:01	12:03	14:02	A3 Bw4 C1	6	V/V	-
D7	1	0	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	1	1	1	AB	01:01	29:02	44:03	55:01	01:02	16:01	Bw4 C1	3	V/F	+
D8	1	0	1	1	0	1	1	1	0	0	0	1	1	0	0	AA	24:02	29:01	07:02	35:02	04:01	14:02	Bw4 C1C2	3	V/V	-
D9	1	0	1	1	0	1	1	1	0	0	0	0	1	0	0	AA	02:01	26:01	38:01	44:02	05:01	12:03	Bw4 C1C2	4	V/V	-
D10	1	0	1	1	0	1	1	1	0	0	0	0	1	0	0	AA	02:01	02:01	51:01	57:01	06:02	07:02	Bw4 C1C2	4	V/V	+
D11	1	0	1	1	1	0	1	1	1	0	1	0	0	1	1	AB	24:03	31:01	44:02	51:01	05:01	15:02	Bw4 C2	5	V/F	nd
D12	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	0	AB	02:01	66:01	41:02	51:01	02:02	17:01	Bw4 C2	3	V/F	-
D13	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	0	1	0	0	AB	26:01	68:01	40:02	47:01	02:02	06:02	Bw4 C2	3	V/F	-
D14	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	0	0	1	1	AB	02:01	02:01	40:02	51:01	02:02	04:01	Bw4 C2	3	V/F	-

^a0= KIR gene absence and 1= KIR gene presence. KIR ligands are indicated in bold. nd= not determined.

Table S2. Pathologies and treatments of NHL patients (n=74)

Patient number	Neoplasia	Treatment : R+	Best response
1	DLBCL	CHOP	PD
2	DLBCL	bendamustine	PD
3	DLBCL	CHOP	PR
4	DLBCL	CEP	CR
5	DLBCL	CHOP	PR
6	DLBCL	DHAC	CR
7	DLBCL	CHOP	CR
8	DLBCL	CHOP MTX	CR
9	DLBCL	CHOP MTX	CR
10	DLBCL	CHOP	CR
11	DLBCL	miniCHOP	PR
12	DLBCL	GEMOX	SD
13	DLBCL	CHOP	CR
14	DLBCL	miniCHOP + MTX	CR
15	DLBCL	miniCHOP	PR
16	DLBCL	CHOP / DHAC	CR
17	PMBL	CHOP	CR
18	Grey Zone	CHOP	CR
19	MCL	bendamustine	CR
20	MCL	CHOP	PR
21	MCL	miniCHOP	CR
22	MCL	CHOP	CR
23	MCL	CHOP	CR
24	MCL	DHAOX	CR
25	MCL	BVD	PR
26	MCL	CHOP	CR
27	MCL	BVD	PD
28	MCL	CHOP	CR
29	MCL	DHAOX BEAM	CR
30	MCL	CHOP/HAD	CR
31	FL	miniCHOP	CR
32	FL	CHOP	CR
33	FL	CHOP	CR
34	FL	miniCHOP	PR
35	FL	lenalidomide	PR
36	FL	R single agent	SD
37	FL	R single agent	PR
38	FL	miniCHOP	CR
39	FL	CHOP	PR
40	FL	miniCHOP	PR
41	FL	bendamustine	PR
42	FL	bendamustine	CR
43	FL	miniCHOP	PR

44	FL	bendamustine	CR
45	FL	miniCHOP	PR
46	FL	CHOP	CR
47	FL	DHAOX + Ibrutinib	CR
48	FL	miniCHOP	CR
49	FL	miniCHOP	PR
50	FL	R single agent	PR
51	FL	miniCHOP	PR
52	FL	miniCHOP	CR
53	FL	bendamustine	PR
54	FL	miniCHOP	CR
55	MZL	Chlo	CR
56	MZL	Chlo	PR
57	MZL	DHAC	PR
58	MZL	chlorambucil	SD
59	MZL	bendamustine	SD
60	WM	bendamustine	PR
61	WM	bendamustine	PR
62	WM	fludarabine	PR
63	WM	R single agent	PD
64	WM	bendamustine	PR
65	WM	bendamustine	CR
66	WM	bendamustine	PR
67	WM	chlorambucil	PR
68	WM	chlorambucil	SD
69	WM	bendamustine	PR
70	WM	chlorambucil	SD
71	WM	bendamustine	PR
72	WM	bendamustine	PR
73	WM	chlorambucil	PD
74	nodular paraganuloma	BV-DHAC	CR

DLBCL : diffuse large B cell lymphoma; PMBL : primary mediastinal B cell lymphoma; MCL : mantle cell lymphoma; FL : follicular lymphoma; MZL : marginal zone lymphoma; MALT : mucosa associated lymphoid tissue; WM : Waldenström Macroglobulinemia; R : rituximab ; CHOP : cyclophosphamide doxorubicine vincristine prednisone; CEP : cyclophosphamide vindesine prednisone; MTX : methotrexate; GEMOX : gemcitabine oxaliplatine; DHAC/Ox : dexamethasone cytarabine carboplatine/oxaliplatine; HAD : cytarabine; BVD : bendamustine bortezomib dexamethasone; BV : brentuximab vedotin.

DISCUSSIONS ET PERSPECTIVES

La greffe de CSH haplo-identiques est devenue le traitement des leucémies aigües de plus en plus utilisée ces dernières années chez des patients en l'absence de donneurs apparentés ou non-apparentés HLA 10/10 identiques. En effet, l'administration de PTCy après l'infusion de cellules souches du donneur non-T déplétées est capable d'éliminer les cellules T alloréactives du donneur sans lèser les cellules souches CD34⁺ du greffon, ce qui permet de favoriser une bonne prise de greffe et limiter l'incidence de GvHD aigües ou chroniques sévères (Robinson et al., 2016). Ces résultats sont aussi actuellement associés à des taux de survie élevés, comme démontré dans ce travail, ce qui marque une nouvelle étape et une révolution dans la longue histoire des greffes allogéniques de CSH. Si les réactions du greffon contre l'hôte (GvH) restent de grades limités, les rechutes constituent un problème majeur post-greffes de CSH haplo-identiques non-T déplétées avec PTCy. Dans le contexte de la greffe haplo-identique, plusieurs donneurs pour le même patient peuvent être identifiés au sein d'une famille. De plus, les disparités HLA de classe I observées entre le donneur et le receveur, dans ce type de greffes, représentent un contexte propice aux alloréactivités des cellules NK induites par les récepteurs KIR inhibiteurs. En raison d'un choix plus large possible de donneurs dans la greffe haplo-identique, la prédiction de l'alloréactivité des cellules NK pourrait être d'une importance cruciale pour le devenir clinique des greffes et pour la sélection des meilleurs donneurs de CSH. Au cours de ce travail, le premier objectif était d'étudier la reconstitution immunitaire des cellules NK et leur potentiel rôle sur le devenir clinique des greffes de CSH non-T déplétées, à conditionnement RIC avec PTCy.

Nous avons évalué l'influence des incompatibilités KIR/HLA entre le donneur et le receveur sur le devenir clinique des greffes de CSH du sang périphérique (PBSC) non-T déplétées, à conditionnement RIC avec PTCy et sur la reconstitution du répertoire de cellules NK après ces greffes. Les résultats rapportés ici montrent que les incompatibilités KIR/HLA entre le donneur et le receveur favorisent la GvHD aigüe et protègent contre la rechute après

greffe. L'analyse de la reconstitution des cellules NK indique que les incompatibilités KIR/HLA sont associées à une perte plus significative des sous-populations NK KIR2DL2/3⁺ contrairement aux sous-populations NK KIR3DL1⁺ à J30 au moment de la survenue de la GvHD aigüe, ce qui suggère que les incompatibilités KIR2DL/HLA-C sont les plus bénéfiques et peuvent améliorer le devenir clinique des patients en termes de rechute et de survie. Ainsi une étude plus approfondie de l'expression des KIR pourrait être importante pour documenter les cellules NK mono-KIR⁺, tout en excluant les cellules NK co-exprimant d'autres récepteurs KIR inhibiteurs. Ainsi, il semble possible de proposer un nouveau modèle montrant l'impact des incompatibilités KIR inhibiteurs/HLA sur la GvHD et la rechute après greffe de CSH du sang périphérique non-T déplétées, à conditionnement RIC avec PTCy.

Les patients ayant développé une GvHD aigüe présentent des fréquences élevées de cellules NK différenciées et activées. L'analyse de la reconstitution des cellules NK indique que les incompatibilités KIR/HLA sont associées à une perte significative des sous-populations NK KIR2DL2/3⁺ et KIR3DL1⁺ à J30 au moment de la GvHD.

Les données concernant l'impact des cellules NK alloréactives après greffe de CSH haplo-identiques non-T déplétée sont rares (Symons et al., 2010a) (Shimoni et al., 2019) (Russo et al., 2018) (Huang et al., 2007). En utilisant de fortes doses d'ATG au lieu du PTCy comme prophylaxie de la GvHD, Huang et ses collègues ont montré un effet délétère des incompatibilités KIR sur les évolutions cliniques après greffe de CSH haplo-identiques, caractérisée par plus de GvHD aigües, plus de rechute et une survie plus courte. Cependant, ces auteurs ont suggéré que la forte dose de lymphocytes T contenus dans le greffon et infusés chez les patients pourrait affecter la fonction des cellules NK et l'expression des récepteurs KIR *in vivo*, et occulter leur rôle bénéfique en termes d'effet GvL. Les résultats issus des études précédentes sont contradictoires concernant l'impact des incompatibilités KIR inhibiteurs/HLA après greffe de CSH haplo-identiques utilisant le PTCy (Symons et al., 2010)

(Shimoni et al., 2019) (Russo et al., 2018). Symons et ses collaborateurs (Symons et al., 2010) ont montré, dans une série de 86 patients dont la moelle osseuse était la source du greffon, que les incompatibilités des gènes KIR entre le donneur et le receveurs étaient associées à une diminution des rechutes et à une amélioration de la survie globale (OS). Inversement, une récente analyse rétrospective multicentrique, portant sur 444 patients atteints de leucémie aigüe ayant reçu une greffe de CSH haplo-identiques avec PTCy, utilisant soit la moelle osseuse, soit les PBSC comme source de CSH et le MAC ou le RIC comme conditionnement, a fait état d'un impact délétère des incompatibilités des ligands KIR (définis sur la base du typage HLA de classe I) (Shimoni et al., 2019). Différents points peuvent expliquer ces résultats discordants par rapport aux nôtres. Le génotypage du KIR n'était pas disponible dans certaines séries pour analyser correctement les incompatibilités KIR/HLA (Shimoni et al., 2019). De plus, dans ce modèle d'incompatibilités basé sur l'absence des ligands KIR chez le receveur, la présence du KIR inhibiteur chez le donneur a été supposée mais non vérifiée. Ceci est problématique puisque les gènes KIR présentent un polymorphisme allélique large qui peut conduire à un KIR non exprimé ou faiblement exprimé à la membrane cellulaire, comme cela a été documenté pour le KIR3DL1 (Gagne et al., 2013). En outre, la moelle osseuse et les PBSC sont 2 sources différentes de greffon intégrées dans cette étude, alors que nous n'avons inclus que des patients recevant des PBSC. Enfin, Russo et ses collaborateurs (Russo et al., 2018) ont montré l'élimination des NK KIR alloréactives avec le PTCy mais ils n'ont observé aucun impact de l'alloréactivité des cellules NK après greffe de CSH haplo-identiques avec PTCy. A noter que dans cette étude, la moelle osseuse a été utilisée comme source de cellules souches avec un conditionnement MAC ; deux paramètres majeurs qui peuvent influencer sur la reconstitution du répertoire NK.

L'un des intérêts majeurs de notre étude était également de pouvoir étudier en profondeur, la reconstitution post-greffe des cellules NK. Les incompatibilités KIR

inhibiteurs/HLA ont été associées à une perte de cellules NK KIR2DL2/3⁺ à J30 après la greffe. De plus, une proportion importante des patients avec des incompatibilités KIR inhibiteurs/HLA ont développé une GvHD aigüe vers J30 avec un phénotype de cellules NK plus différencié. Ainsi, conformément aux résultats récents de Russo et ses collaborateurs (Russo et al., 2018), nous avons observé que PTCy semble éliminer précocement les cellules NK KIR2DL⁺ alloréactives dans le groupe des patients avec des incompatibilités KIR/HLA. Cela s'est avéré particulièrement probant pour les cellules NK KIR2DL2/3⁺. Il a été démontré que les taux élevés d'IL-15 sériques observés plus tôt après greffe de CSH sont associés à un statut plus différencié des cellules NK chez des patients ayant développé une GvHD (Russo et al., 2018). On peut émettre l'hypothèse que le contexte alloréactif favorise une forte activation des cellules NK réactives qui sont ensuite ciblées par le traitement immunosuppresseur PTCy. Ces résultats soulèvent la question de la nature des effecteurs cellulaires directement impliqués dans les réponses anti-leucémiques des cellules NK.

Afin de déterminer la nature des sous-populations cellulaires NK les plus efficaces contre la leucémie, nous avons développé une approche *in vitro* basée sur l'étude du potentiel de dégranulation des cellules NK *ex vivo* vis-à-vis d'un large panel de lignées leucémiques (LAM et LAL) et des cellules leucémiques primaires en prenant en compte les paramètres génétiques KIR/HLA et le statut CMV des donneurs sains qui concourent à la formation structurelle et fonctionnelle des cellules NK. Le rôle des cellules NK dans les réponses immunes contre les leucémies aigües a été mis en évidence dans plusieurs contextes cliniques (Torelli et al., 2014) (Locatelli et al., 2014) (Sweeney and Vyas, 2019). En effet, la capacité des cellules NK à entraîner une réponse contre les cellules tumorales dépend de la présence des ligands exprimés à la surface des cellules tumorales, reconnus par les récepteurs activateurs NK (Mastaglio et al., 2018) (Pende et al., 2005) (Torelli et al., 2014) (Paczulla et al., 2019). Dans ce travail, nous avons montré que les lignées cellulaires lymphoïdes (LAL et

lymphomes de Burkitt) stimulent plus fortement la dégranulation des cellules NK que les lignées cellulaires myéloïdes (LAM). La disparité de réponses NK entre LAL et LAM semble en partie être liée au phénotype des cibles leucémiques présentant une expression hétérogène de ligands de récepteurs NK. Par ailleurs, une diversité inter-individuelle des réponses des cellules NK a été observée contre une même cible leucémique, mettant en évidence de bons répondeurs et de mauvais répondeurs contre une même cible leucémique. De plus, les bons répondeurs contre une cible leucémique n'étaient pas systématiquement de bons répondeurs contre une autre cible leucémique. Ces résultats indiquent que ces diversités inter-individuelles des réponses NK sont probablement liées à une diversité intra-individuelle du répertoire des cellules NK. Les polymorphismes immunogénétiques KIR/HLA et le statut CMV des individus impactent la structuration du répertoire des cellules NK. Il est donc possible que les populations NK efficaces contre une cible leucémique donnée soient moins représentées et/ou moins efficaces chez les mauvais donneurs en raison de leurs profils génétiques et inversement pour les bons répondeurs.

Sur la base des marqueurs NKG2A, KIR, CD57 et NKG2C, nous avons pu identifier différents clusters d'individus partageant des répertoires NK communs liés à des profils KIR/HLA et à des statuts CMV particuliers. Nous avons montré que les sous-populations NK $\text{NKG2A}^+\text{KIR2DL2/3}^-\text{CD57}^-$ sont représentées de manière prédominante dans la majorité des répertoires NK et plus significativement chez les individus de génotype HLA C2C2 Bw4+. Il est à noter que les individus C2C2 sont plus représentés dans la population africaine (plus de 40%) que la population caucasienne (20%) (Venstrom et al., 2012) (Shimoni et al., 2017). Les sous-populations NK $\text{NKG2A}^-\text{KIR2DL2/3}^{+/-}\text{CD57}^{+/-}$ sont représentées en faible fréquence dans les répertoires NK. Nos données s'inscrivent dans un vaste ensemble de la littérature sur la structuration du répertoire des cellules NK (David et al., 2013) (Morvan et al., 2008) (Goodridge et al., 2015), avec notamment l'étude récente de Pfeerle et ses collaborateurs qui

montre que le répertoire des cellules NK est bien maintenu dans le temps (Pfefferle et al., 2019). En effet, la plasticité intra-lignée maintient l'homéostasie phénotypique et fonctionnelle des cellules NK et le phénotype acquis détermine le potentiel fonctionnel des cellules NK.

L'étude approfondie du potentiel de dégranulation *in vitro* de chacune des sous-populations cellulaires NK ciblées a montré que les sous-populations NK NKG2A⁺ sont les plus efficaces contre les LAL. La forte fréquence des sous-populations NK NKG2A⁺ dans le répertoire des cellules NK pourrait expliquer les fortes capacités de dégranulation de ces sous-populations NK contre les LAL. De plus, Forslund et ses collègues ont rapporté que les sous-populations NKG2A⁺ KIR⁻ CD57⁻ présentent une migration plus dynamique, qui est associée à une capacité de conjugaison plus accrue avec des cellules cibles et à une plus grande probabilité de tuer ces cibles par rapport aux cellules NK NKG2A⁻ KIR⁻ CD57⁻ (Forslund et al., 2015). Les auteurs ont suggéré que la capacité des cellules NK NKG2A⁺ à former davantage de conjugués résulte de leur capacité de motilité augmentée, ce qui entraîne une augmentation des contacts avec les cellules cibles (Forslund et al., 2015). Dans notre étude, toutes les cibles cellulaires LAL exprimaient les molécules HLA-E. Nous pouvons supposer que l'effet inhibiteur médié à travers l'interaction entre le récepteur NKG2A et son ligand HLA-E est probablement contrebalancé par les puissants signaux d'activation médiés par les interactions des récepteurs activateurs NKG2D et DNAM-1 avec leurs ligands exprimés à la surface des LAL. Ainsi, les mécanismes cellulaires qui contrôlent les réponses efficaces médiées par ces cellules NK exprimant le récepteur NKG2A particulièrement contre les cibles leucémiques lymphoïdes restent encore inconnus. Il est important de noter que les bons répondeurs contre les LAL étaient soit des individus de génotype KIR2DS1⁻, soit de génotype HLA C2C2. De manière intéressante, les individus de génotype C2C2 sont ceux qui présentent une fréquence plus élevée des sous-populations NK NKG2A⁺ KIR⁻ CD57⁻ dans

leur répertoire cellulaire NK. Ces paramètres sont importants car ils peuvent aider à choisir les donneurs de CSH qui présentent ces cellules NK $\text{NKG2A}^+ \text{KIR}^- \text{CD57}^-$, qui sont plus efficaces et plus fréquentes, pour traiter les leucémies aiguës lymphoblastiques (LAL) chez l'adulte.

Dans le contexte de la greffe de CSH haplo-identiques, de nombreuses études ont rapporté que l'alloréactivité médiée par les cellules NK est induite par les cellules NK KIR^+ du donneur (Russo et al., 2018) (Mancusi et al., 2016) (Locatelli et al., 2013). En accord avec ces études, nous avons rapporté dans ce travail que les sous-populations NK KIR^+ et CD57^+ sont celles qui étaient les plus efficaces contre les LAM. Dans notre première étude (**Article n°1**) menée sur les greffes de CSH haplo-identiques avec PTCy, nous avons montré que les incompatibilités KIR/HLA étaient associées à un phénotype plus différencié et activé des cellules NK, exprimant fortement le récepteur CD57 et les récepteurs activateurs comme NKG2D et DNAM-1, accompagné d'une forte incidence de GvHD aiguë et un taux de rechute faible. Conformément à cette étude, nous montrons ici que les cellules NK les plus efficaces contre les LAM expriment les récepteurs KIR et CD57. La faible fréquence de ces sous-populations NK dans le répertoire cellulaire NK des donneurs de sang pourrait expliquer pourquoi les cibles LAM stimulaient faiblement la dégranulation des cellules NK totales. Inversement, les cellules NK $\text{NKG2A}^+ \text{KIR}^- \text{CD57}^-$ ont présenté de faible fréquence de dégranulation contre les LAM. Cette observation est conforme à l'étude de Nguyen et ses collaborateurs qui ont montré que la fréquence élevée des cellules NK de phénotype immature NKG2A^+ au moment de la reconstitution des cellules NK après la greffe de CSH était associée à moins d'effet GvL chez les patients atteints de LAM (Nguyen et al., 2005). En revanche, les cellules NK KIR^+ avec le phénotype CD57^+ présentent un potentiel fonctionnel important associé à la transcription accrue de gènes impliqués dans l'adhésion et la synapse immunitaire (Pfefferle et al., 2019). Dans l'ensemble, ces données suggèrent que les sous-

populations de cellules NK KIR⁺ et CD57⁺ pourraient être mieux adaptées pour interagir avec les cibles LAM et dans l'élimination de ces cibles leucémiques. Parmi les approches thérapeutiques développées pour améliorer la cytotoxicité des cellules NK contre les cancers (Hodgins et al., 2019), l'expansion des cellules NK allogéniques constitue une approche intéressante (Ruggeri et al., 2015). Ainsi, l'expansion de cellules NK sélectionnées sur la base de l'expression des marqueurs KIR et CD57 pourrait constituer une immunothérapie cellulaire prometteuse après greffe de CSH haplo-identiques pour améliorer les effets GvL chez les patients atteints de LAM. De plus, de nouvelles découvertes ouvrent des perspectives sur l'immunothérapie basée sur les cellules NK, en particulier les cellules NK équipées d'un CAR (Liu et al., 2020). Nous pouvons imaginer de modifier génétiquement les sous-populations de cellules NK KIR⁺ et CD57⁺ les plus efficaces contre les LAM pour exploiter leur capacité à tuer ces cibles.

Dans ce travail, nous avons documenté l'amplification massive de cellules NKG2C⁺ adaptatives et plus différenciées chez des individus séropositifs pour le CMV, en accord avec les études précédentes (Béziat et al., 2013) (Della Chiesa et al., 2013) (Foley et al., 2012) (Djaoud et al., 2013). Sur le plan fonctionnel, nous avons montré que les sous-populations NKG2C⁺ étaient parmi les sous-populations NK les moins efficaces contre toutes les cibles leucémiques. Merino et ses collègues ont récemment mis en évidence que les cellules NK adaptatives stimulées chroniquement étaient dysfonctionnelles lorsqu'elles étaient confrontées à des cellules tumorales (Merino et al., 2019). Bien que ces sous-populations NK présentent des caractéristiques intéressantes, nous avons observé une efficacité anti-tumorale limitée.

Dans l'ensemble, cette étude nous a permis de montrer une grande disparité des réponses des cellules NK, mettant en évidence les bons et les mauvais répondeurs sur la base des paramètres génétiques KIR et HLA et du statut CMV des individus. Nous avons également montré que certaines sous-populations NK étaient particulièrement favorisées chez

des individus avec un profil immunogénétique KIR/HLA et d'un statut CMV particuliers. On sait également que ces paramètres impactent la structuration phénotypique et fonctionnelle du répertoire des cellules NK KIR⁺. Afin de simplifier l'analyse des populations cellulaires NK à forte potentialité anti-leucémique par cytométrie en flux multicolore, nous avons pris en compte seulement le récepteur inhibiteur KIR2DL2/3 car les sous-populations NK exprimant le KIR2DL2/3 sont les plus prévalentes dans le répertoire des cellules NK KIR. Cependant, des études supplémentaires sont nécessaires pour évaluer le rôle d'autres récepteurs KIR inhibiteurs, tels que KIR2DL1, KIR3DL1 et KIR3DL2 dans les réponses anti-leucémiques, en particulier contre les LAM. Dans une étude récente réalisée dans notre équipe de recherche (**Article en annexe**), nous montrons que certains allèles des gènes KIR2DL impactent la structuration phénotypique et fonctionnelle du répertoire cellulaire NK KIR⁺. Cette étude réalisée sur une cohorte de 108 donneurs de sang, met en évidence que les individus avec un motif centromérique AA (CenAA, KIR2DL2⁻/KIR2DL3⁺) présentent les allotypes KIR2DL1*003 et KIR2DL3*001 dont la fréquence, le niveau d'expression, le potentiel de dégranulation des cellules NK et la force d'interactions KIR/HLA sont plus élevés par rapport aux individus CenAB (KIR2DL2⁺/KIR2DL3⁺) ou CenBB (KIR2DL2⁺/KIR2DL3⁻) présentant respectivement les allotypes KIR2DL1*002 et KIR2DL1*004. Sur une cohorte de 81 greffes de CSH haplo-identiques non-T déplétées avec PTCy, nous montrons une incidence de rechute post-greffe significativement diminuée chez des patients atteints de LAM ayant reçu des CSH issues de donneurs CenAA. Cette observation n'a pas été confirmée dans le contexte des LAL. Les cellules NK étant cruciales dans la reconstitution poste-greffe, la prise en compte du polymorphisme allélique peut aider à redéfinir les scores utilisés pour la sélection des donneurs de CSH. Les sous-populations NK KIR2DL1*003⁺ issues de donneurs de sang avec les motifs CenAA peuvent constituer une source de cellules NK alloréactives bénéfiques dans le cadre d'une immunothérapie adoptive à base de cellules NK. Par ailleurs, le

polymorphisme allélique HLA-C participerait également à moduler les interactions KIR/HLA et/ou l'éducation des cellules NK KIR2DL. Notre équipe a mis en place d'une cohorte de donneurs HLA-C homozygotes dans le but d'évaluer l'impact du polymorphisme allélique HLA-C sur l'expression des molécules HLA-C et sur leur niveau d'expression ainsi que sur la structuration fonctionnelle du répertoire cellulaire NK KIR. Ces données devraient permettre de mieux comprendre l'impact des polymorphismes alléliques KIR2DL et HLA-C sur les fonctions des cellules NK et leurs implications en clinique.

En raison des incidences élevées de GvHD aiguës observées après greffes de CSH haplo-identiques à conditionnement RIC, réalisées à partir des greffons de PBSC non-T déplétés avec le PTCy à forte dose (**Article n°1**), nous avons mené une autre étude, en collaboration avec le service d'Hématologie clinique de Nantes, qui compare les combinaisons PTCy + ATG versus PTCy seul comme prophylaxie de la GvHD en greffe de CSH haplo-identiques en analysant la reconstitution précoce des cellules NK et des lymphocytes T et de leur influence sur le devenir clinique de ces patients. Sur le plan clinique, la combinaison PTCy + ATG a réduit significativement l'incidence de la GvHD aiguë de grade 2-4 sans augmenter le risque de rechute. Cela a confirmé les résultats de précédentes études (Salas et al., 2020). Il est bien documenté que les cellules T du donneur sont responsables de l'effet GvL et également des GvHD aiguës. De nombreux traitements ont réduit la sévérité de la GvHD aiguë par une déplétion des lymphocytes T. Par conséquent, cette déplétion des cellules T a limité les effets GvL médiés par les lymphocytes T (Choi and Reddy, 2014). Dans notre étude, l'addition de l'ATG au traitement PTCy limite significativement la GvHD aiguë tout en maintenant l'effet GvL observé sans ATG suggérant que d'autres effecteurs sont impliqués dans le maintien de l'effet GvL. Les cellules NK présentes en fréquence élevée constituent de probables acteurs de cet effet GvL maintenu.

En ce qui concerne la reconstitution du système immunitaire, celle des cellules T était plus lente dans le groupe PTCy + ATG, mais associée à une apparition plus rapide des cellules NK, qui ont subi une maturation plus rapide. Ceci a été particulièrement documenté par la fréquence plus élevée des cellules NKp46⁺ 2B4⁻ à J20. Dans ce contexte, un important effet GvL médié par les cellules NK peut être pris en compte. En effet, il a été démontré que les cellules NK éduquées sont principalement les plus efficaces, et dans le contexte des greffes de CSH, l'environnement cytokinique peut stimuler la cytotoxicité des cellules NK non éduquées qui deviennent des cellules effectrices additionnelles plus efficaces (Sun et al., 2012). De plus, dans le contexte des greffes de CSH haplo-identiques, les premières cellules NK du donneur qui apparaissent peuvent être alloréactives contre les cellules de l'hôte qui ne partagent pas les mêmes molécules HLA de classe I avec le donneur, telles que les cellules leucémiques, favorisant l'effet GvL induit par les cellules NK. Cependant, PTCy peut aussi probablement éliminer les cellules NK alloréactives après greffe (McCurdy and Luznik, 2019). On sait également que les cellules NK dérivées des cellules souches CD34⁺ du donneur seront éduquées soit par les molécules HLA de classe I exprimées par les cellules hématopoïétiques du donneur, soit par les cellules stromales de l'hôte du donneur (Boudreau et al., 2016). Ainsi, dans la greffe de CSH haplo-identiques si l'ATG est utilisée, l'alloréactivité des cellules NK stimulée par les molécules HLA n'est pas déterminante, et d'autres caractéristiques du répertoire des cellules NK doivent être prises en compte, par exemple la distribution de chaque sous-population de cellules NK potentiellement engagées dans un effet GvL, en fonction de leur état de différenciation. Sur la base de notre approche d'identification des sous-populations NK développée *in vitro* à partir des cellules NK de donneurs de sang, la distribution de toutes les sous-populations NK basée sur l'expression des marqueurs KIR2DL2/3, NKG2A, CD57 et NKG2C, nous a permis de mettre en évidence différents répertoires de cellules NK dans les deux cohortes de patients greffés analysés dans

cette étude. A J30, lorsque la fréquence des cellules NK est fortement augmentée, un premier cluster de patients a été identifié (cluster 1), caractérisé par un répertoire de cellules NK avec une prédominance des sous-populations NK NKG2A⁻KIR2DL2/3⁻CD57⁻. Il est intéressant de noter que, dans ce groupe, la majorité des patients appartenaient au groupe PTCy et que 78% des patients ont rechuté, ce qui suggère que ce profil de répertoire NK n'est pas efficace pour éliminer la leucémie. De la même façon, notre étude *in vitro* a montré que cette sous-population NK était parmi les moins efficaces contre toutes les cibles leucémiques étudiées. L'ATG peut contribuer à réduire la fréquence de cette sous-population, ce qui peut expliquer en partie le fait que la rechute n'était pas augmentée dans le groupe PTCy + ATG. En revanche, la sous-population NK NKG2A⁺KIR2DL2/3⁻CD57⁻ est plus prédominante dans le cluster 5, caractérisé par de plus faibles taux de rechute (30%). Un impact bénéfique sur la rechute de ces cellules NK naïves a déjà été documenté (Björklund et al., 2016). De manière intéressante, nous avons montré que ces sous-populations NK étaient les plus efficaces *in vitro* contre les LAL suggérant que ces sous-populations NK pourraient être associées à des effets GvL après greffe de CSH chez des patients atteints de LAL. Il est important de noter que dans cette étude, les cas de LAM et de LAL ont été combinés, ce qui rend impossible de savoir si ces sous-populations étaient efficaces contre les LAM, les LAL ou les deux types de leucémies aigües. L'effectif des patients était trop faible pour différencier les deux types de leucémie. Il serait intéressant de poursuivre l'analyse pour savoir si ces sous-populations NK ont une valeur pronostique dans la prédiction du devenir clinique des greffes de CSH haplo-identiques à partir d'une cohorte de patients plus large.

Les récepteurs KIR sont impliqués dans la lyse spontanée des cellules NK, mais ils sont aussi impliqués dans la modulation de l'ADCC des NK. Dans le deuxième volet de cette thèse, nous avons étudié l'impact des interactions KIR/HLA sur la modulation de la fonction

effectrice ADCC des cellules NK induite par le rituximab. Dans notre modèle cellulaire *in vitro*, nous avons d'abord déterminé la concentration optimale de rituximab permettant l'ADCC des cellules NK tout en observant l'inhibition via les récepteurs KIR. Cette concentration est conforme aux études précédentes (Du et al., 2014). L'utilisation du rituximab à forte concentration (10µg/mL) occulte l'effet inhibiteur des KIR. En effet, 0,1µg/mL de rituximab était suffisant pour stimuler l'ADCC des cellules NK contre les lignées cellulaires B-EBV. A cette concentration, nous n'avons observé aucune différence du niveau de dégranulation dépendante du rituximab des cellules NK totales des donneurs de sang de génotype CD16-158VV et VF (données non présentées).

Tous les KIR étudiés dans notre modèle cellulaire inhibent la dégranulation des cellules NK comme cela a été observé précédemment par d'autres groupes avec différents modèles cellulaires (Borgerding et al., 2010) (Tarek et al., 2012) (Du et al., 2014) (Forlenza et al., 2016) (Lisovsky et al., 2019). Néanmoins, KIR2DL1 a un effet inhibiteur plus important que KIR2DL2/3 ou KIR3DL1. Les cellules NK KIR éduquées présentent des réponses plus importantes que les cellules NK KIR non éduquées. Cependant, l'effet inhibiteur était similaire sur les deux sous-populations NK KIR2DL1⁺. Ainsi, malgré le signal inhibiteur médié par les interactions KIR/HLA, les cellules NK éduquées constituent les meilleures sous-populations pour induire une dégranulation plus forte des cellules NK dépendante du rituximab. Contrairement aux résultats précédents par le groupe de K. Hsu (Tarek et al., 2012) montrant que les cellules NK non éduquées jouent un rôle anti-tumoral important, nous avons montré que les cellules NK éduquées présentaient une meilleure réponse que les cellules NK non éduquées malgré l'inhibition médiée par les KIR. Enfin, nous avons observé une corrélation négative entre la dégranulation des cellules NK dépendantes du rituximab et le nombre de ligands KIR et entre cette dégranulation et les fréquences des cellules NK KIR⁺.

Sur le plan clinique, nous avons observé que les fortes fréquences des cellules NK KIR⁻ ou faibles fréquences des cellules NK KIR⁺ favorisaient la progression de la maladie chez les patients atteints d'un lymphome. Ces résultats sont en accord avec le dysfonctionnement des cellules NK observé dans la leucémie lymphoïde chronique (LLC) associée à une réduction frappante de la fréquence des cellules NK exprimant le KIR2DL1 et/ou KIR3DL1 qui a progressé dans le temps chez la plupart des patients (Tarek et al., 2012). Notre observation peut s'expliquer par la faible contribution des cellules NK KIR⁻ dans l'ADCC dépendante du rituximab contre toutes les lignées cellulaires B-EBV dans notre modèle cellulaire, contrairement aux cellules NK KIR⁺ éduquées et non éduquées. On sait également que l'induction d'une résistance à l'ADCC peut s'expliquer en partie par une synapse immunitaire plus faible (Aldeghaither et al., 2019). Les cellules NK KIR⁻ peuvent présenter une synapse immunitaire plus faible en raison de l'absence d'éducation via les interactions KIR/HLA. De plus, notre étude souligne l'influence du nombre de ligands KIR sur la fréquence des cellules NK KIR⁺ en montrant que la fréquence des cellules NK KIR⁺ diminue avec le nombre de ligands KIR. Ainsi, les cellules NK KIR⁺ semblent essentielles pour déclencher une dégranulation dépendante du rituximab efficace, quel que soit le statut d'éducation. En effet, même sans éducation, les cellules NK KIR⁺ présentent une plus grande réactivité que les cellules NK KIR⁻ dans la dégranulation dépendante du rituximab.

Nous avons également décrit pour la première fois l'effet activateur de l'interaction entre le récepteur KIR2DS1 et son ligand C2 sur la dégranulation des cellules NK dépendante du rituximab. Bien que l'effet activateur du KIR2DS1 sur la réponse des cellules NK totales dépendante du rituximab soit limité en raison de la faible fréquence des cellules NK KIR2DS1⁺, il peut être avantageux de sélectionner des cellules NK KIR2DS1⁺ issues des donneurs C2⁻ dans l'objectif d'obtenir une lignée cellulaire CD16⁺ avec un fort potentiel ADCC comme décrit précédemment (Clémenceau et al., 2013).

Globalement, nos résultats montrent que l'environnement HLA de classe I avec moins de ligands KIR (exemple individus C1C1 ou C2C2) est bénéfique pour avoir une fréquence élevée de cellules NK KIR⁺, intégrant les cellules NK éduquées et non éduquées qui présentent des dégranulations dépendantes du rituximab plus élevées que celles des cellules NK KIR⁻. En revanche, un environnement HLA de classe I avec beaucoup de ligands KIR (exemple n= 5 ligands, individu C1C2 Bw4 Bw4 A3/A11) favorise une fréquence élevée des cellules NK KIR⁻ peu efficaces. De plus, cet environnement riche en ligands KIR favorise de nombreuses inhibitions fonctionnelles KIR/HLA des cellules NK KIR⁺ éduquées. Tous ces paramètres expliquent pourquoi les patients LNH avec un environnement HLA limité en termes de ligands KIR ont de meilleures réponses au rituximab. L'influence délétère du génotype CD16-158FF a été décrite sur les réponses cliniques après le traitement au rituximab des patients atteints de LNH (Cartron et al., 2002). Dans cet environnement, le polymorphisme CD16 semble avoir un effet collatéral.

Des approches additionnelles peuvent améliorer le pronostic clinique du traitement au rituximab chez les patients atteints de LNH ayant un faible nombre de ligands KIR ou une faible fréquence de cellules NK KIR⁺ (Wang et al., 2015). Par exemple, il a été démontré que l'association du rituximab avec des anticorps bloquant des KIR permettait d'améliorer la lyse à médiation cellulaire des cellules NK par rapport au rituximab seul (Kohrt et al., 2014). Par contre, augmenter la concentration en rituximab pour limiter l'effet inhibiteur des KIR est observé *in vitro*, mais pas forcément *in vivo*.

Nos résultats permettent de donner un aperçu de l'influence des polymorphismes KIR, HLA et CD16 sur la cytotoxicité des cellules NK dépendante du rituximab en intégrant les règles génétiques de la structuration phénotypique et fonctionnelle du répertoire des cellules NK. Ces résultats permettent d'ouvrir la voie de nouveaux axes d'optimisation de la prédiction des réponses au rituximab chez les patients atteints de LNH. En effet, un typage

HLA de classe I (HLA-A, -B et -C) même à 2 digits par biologie moléculaire permettant d'identifier les ligands KIR et/ou la détermination de la fréquence des cellules NK KIR⁺ par cytométrie de flux pourraient être des marqueurs simples et utiles pour prédire les réponses au rituximab.

BIBLIOGRAPHIE

- Abel, A.M., Yang, C., Thakar, M.S., Malarkannan, S., 2018. Natural Killer Cells: Development, Maturation, and Clinical Utilization. *Front. Immunol.* 9. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.01869>
- Adams, E.J., Juo, Z.S., Venook, R.T., Boulanger, M.J., Arase, H., Lanier, L.L., Garcia, K.C., 2007. Structural elucidation of the m157 mouse cytomegalovirus ligand for Ly49 natural killer cell receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104, 10128–10133. <https://doi.org/10.1073/pnas.0703735104>
- Adib-Conquy, M., Scott-Algara, D., Cavaillon, J.-M., Souza-Fonseca-Guimaraes, F., 2014. TLR-mediated activation of NK cells and their role in bacterial/viral immune responses in mammals. *Immunology & Cell Biology* 92, 256–262. <https://doi.org/10.1038/icb.2013.99>
- Afonina, I.S., Cullen, S.P., Martin, S.J., 2010. Cytotoxic and non-cytotoxic roles of the CTL/NK protease granzyme B. *Immunol Rev* 235, 105–116. <https://doi.org/10.1111/j.0105-2896.2010.00908.x>
- Aldeghaither, D.S., Zahavi, D.J., Murray, J.C., Fertig, E.J., Graham, G.T., Zhang, Y.-W., O'Connell, A., Ma, J., Jablonski, S.A., Weiner, L.M., 2019. A Mechanism of Resistance to Antibody-Targeted Immune Attack. *Cancer Immunol Res* 7, 230–243. <https://doi.org/10.1158/2326-6066.CIR-18-0266>
- Alderson, K.L., Sondel, P.M., 2011. Clinical Cancer Therapy by NK Cells via Antibody-Dependent Cell-Mediated Cytotoxicity. *J Biomed Biotechnol* 2011. <https://doi.org/10.1155/2011/379123>
- Alter, G., Teigen, N., Davis, B.T., Addo, M.M., Suscovich, T.J., Waring, M.T., Streeck, H., Johnston, M.N., Staller, K.D., Zaman, M.T., Yu, X.G., Lichterfeld, M., Basgoz, N., Rosenberg, E.S., Altfeld, M., 2005. Sequential deregulation of NK cell subset distribution and function starting in acute HIV-1 infection. *Blood* 106, 3366–3369. <https://doi.org/10.1182/blood-2005-03-1100>
- Anasetti, C., Amos, D., Beatty, P.G., Appelbaum, F.R., Bensinger, W., Buckner, C.D., Clift, R., Doney, K., Martin, P.J., 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. <https://doi.org/10.1056/NEJM198901263200401>
- Anderson, A.C., Joller, N., Kuchroo, V.K., 2016. Lag-3, Tim-3, and TIGIT: Co-inhibitory Receptors with Specialized Functions in Immune Regulation. *Immunity* 44, 989–1004. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2016.05.001>
- Anfossi, N., André, P., Guia, S., Falk, C.S., Roetynck, S., Stewart, C.A., Bresó, V., Frassati, C., Reviron, D., Middleton, D., Romagné, F., Ugolini, S., Vivier, E., 2006. Human NK cell education by inhibitory receptors for MHC class I. *Immunity* 25, 331–342. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2006.06.013>
- Angelini, D.F., Borsellino, G., Poupot, M., Diamantini, A., Poupot, R., Bernardi, G., Poccia, F., Fournié, J.-J., Battistini, L., 2004. FcγRIII discriminates between 2 subsets of Vγ9Vδ2 effector cells with different responses and activation pathways. *Blood* 104, 1801–1807. <https://doi.org/10.1182/blood-2004-01-0331>
- Angelucci, E., Matthes-Martin, S., Baronciani, D., Bernaudin, F., Bonanomi, S., Cappellini, M.D., Dalle, J.-H., Di Bartolomeo, P., de Heredia, C.D., Dickerhoff, R., Giardini, C., Gluckman, E., Hussein, A.A., Kamani, N., Minkov, M., Locatelli, F., Rocha, V., Sedlacek, P., Smiers, F., Thuret, I., Yaniv, I., Cavazzana, M., Peters, C., EBMT Inborn Error and EBMT Paediatric Working Parties, 2014. Hematopoietic stem cell transplantation in thalassemia major and sickle cell disease: indications and management recommendations from an international expert panel. *Haematologica* 99, 811–820. <https://doi.org/10.3324/haematol.2013.099747>
- Antoniou, A.N., Powis, S.J., 2008. Pathogen evasion strategies for the major histocompatibility complex class I assembly pathway. *Immunology* 124, 1–12. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2567.2008.02804.x>
- Artis, D., Spits, H., 2015. The biology of innate lymphoid cells. *Nature* 517, 293–301. <https://doi.org/10.1038/nature14189>
- Aversa, F., Tabilio, A., Velardi, A., Cunningham, I., Terenzi, A., Falzetti, F., Ruggeri, L., Barbabietola, G., Aristei, C., Latini, P., Reisner, Y., Martelli, M.F., 1998. 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* 339, 1186–1193. <https://doi.org/10.1056/NEJM199810223391702>
- Bachanova, V., Cooley, S., Defor, T.E., Verneris, M.R., Zhang, B., McKenna, D.H., Curtsinger, J., Panoskaltis-Mortari, A., Lewis, D., Hippen, K., McGlave, P., Weisdorf, D.J., Blazar, B.R., Miller, J.S., 2014. Clearance of acute myeloid leukemia by haploidentical natural killer cells is improved using IL-2 diphtheria toxin fusion protein. *Blood* 123, 3855–3863. <https://doi.org/10.1182/blood-2013-10-532531>
- Bachiller, M., Battram, A.M., Perez-Amill, L., Martín-Antonio, B., 2020. Natural Killer Cells in Immunotherapy: Are We Nearly There? *Cancers* 12, 3139. <https://doi.org/10.3390/cancers12113139>
- Bacigalupo, A., Socié, G., Schrezenmeier, H., Tichelli, A., Locasciulli, A., Fuehrer, M., Risitano, A.M., Dufour, C., Passweg, J.R., Oneto, R., Aljurf, M., Flynn, C., Mialou, V., Hamladji, R.M., Marsh, J.C.W., Aplastic Anemia Working Party of the European Group for Blood and Marrow Transplantation (WPSAA-EBMT), 2012. Bone marrow versus peripheral blood as the stem cell source for sibling transplants in acquired aplastic anemia: survival advantage for bone marrow in all age groups. *Haematologica* 97, 1142–1148. <https://doi.org/10.3324/haematol.2011.054841>
- Bae, D.S., Lee, J.K., 2014. Development of NK cell expansion methods using feeder cells from human myelogenous leukemia cell line. *Blood Res* 49, 154–161. <https://doi.org/10.5045/br.2014.49.3.154>
- Bahram, S., Inoko, H., Shiina, T., Radosavljevic, M., 2005. MIC and other NKG2D ligands: from none to too many. *Curr Opin Immunol* 17, 505–509. <https://doi.org/10.1016/j.coi.2005.07.016>
- Balkwill, F., 2009. Tumour necrosis factor and cancer. *Nat Rev Cancer* 9, 361–371. <https://doi.org/10.1038/nrc2628>
- Barnes, D.W., Corp, M.J., Loutit, J.F., Neal, F.E., 1956. Treatment of murine leukaemia with X rays and homologous bone marrow; preliminary communication. *Br Med J* 2, 626–627. <https://doi.org/10.1136/bmj.2.4993.626>
- Barrow, A.D., Edeling, M.A., Trifonov, V., Luo, J., Goyal, P., Bohl, B., Bando, J.K., Kim, A.H., Walker, J., Andahazy, M., Bugatti, M., Melocchi, L., Vermi, W., Fremont, D.H., Cox, S., Cella, M., Schmedt, C., Colonna, M., 2018. Natural Killer Cells Control Tumor Growth by Sensing a Growth Factor. *Cell* 172, 534-548.e19. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.11.037>
- Barrow, A.D., Martin, C.J., Colonna, M., 2019. The Natural Cytotoxicity Receptors in Health and Disease. *Front Immunol* 10, 909. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.00909>
- Barten, R., Torkar, M., Haude, A., Trowsdale, J., Wilson, M.J., 2001. Divergent and convergent evolution of NK-cell receptors. *Trends Immunol* 22, 52–57. [https://doi.org/10.1016/s1471-4906\(00\)01802-0](https://doi.org/10.1016/s1471-4906(00)01802-0)
- Bashey, A., Solomon, S.R., 2014. 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 Transplantation* 49, 999–1008. <https://doi.org/10.1038/bmt.2014.62>
- Bashey, A., Zhang, M.-J., McCurdy, S.R., St Martin, A., Argall, T., Anasetti, C., Ciurea, S.O., Fasan, O., Gaballa, S., Hamadani, M., Munshi, P., Al Malki, M.M., Nakamura, R., O'Donnell, P.V., Perales, M.-A., Raj, K., Romee, R., Rowley, S., Rocha, V., Salit, R.B., Solh, M., Soiffer, R.J., Fuchs, E.J., Eapen, M., 2017. Mobilized Peripheral Blood Stem Cells Versus Unstimulated Bone Marrow As a Graft Source for T-Cell-Replete Haploidentical Donor Transplantation Using Post-Transplant Cyclophosphamide. *J Clin Oncol* 35, 3002–3009. <https://doi.org/10.1200/JCO.2017.72.8428>
- Bastos-Oreiro, M., Anguita, J., Martínez-Laperche, C., Fernández, L., Buces, E., Navarro, A., Pascual, C., Pérez-Corral, A., Balsalobre, P., Muñoz, C., Kwon, M., Serrano, D., Perez-Martinez, A., Buño, I., Gayoso, J., Díez-Martín, J.L., 2016. Inhibitory killer cell immunoglobulin-like receptor (iKIR) mismatches improve survival after T-cell-repleted haploidentical transplantation. *Eur J Haematol* 96, 483–491. <https://doi.org/10.1111/ejh.12616>

- Batlevi, C.L., Matsuki, E., Brentjens, R.J., Younes, A., 2016. Novel immunotherapies in lymphoid malignancies. *Nat Rev Clin Oncol* 13, 25–40. <https://doi.org/10.1038/nrclinonc.2015.187>
- Baumeister, S.H.C., Rambaldi, B., Shapiro, R.M., Romee, R., 2020. Key Aspects of the Immunobiology of Haploidentical Hematopoietic Cell Transplantation. *Front. Immunol.* 11. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.00191>
- Baychelier, F., Sennepin, A., Ermonval, M., Dorgham, K., Debré, P., Vieillard, V., 2013. Identification of a cellular ligand for the natural cytotoxicity receptor NKp44. *Blood* 122, 2935–2942. <https://doi.org/10.1182/blood-2013-03-489054>
- Beatty, P.G., Clift, R.A., Mickelson, E.M., Nisperos, B.B., Flournoy, N., Martin, P.J., Sanders, J.E., Stewart, P., Buckner, C.D., Storb, R., 1985. Marrow transplantation from related donors other than HLA-identical siblings. *N Engl J Med* 313, 765–771. <https://doi.org/10.1056/NEJM198509263131301>
- Becker, I., Salaiza, N., Aguirre, M., Delgado, J., Carrillo-Carrasco, N., Kobeh, L.G., Ruiz, A., Cervantes, R., Torres, A.P., Cabrera, N., González, A., Maldonado, C., Isibasi, A., 2003. Leishmania lipophosphoglycan (LPG) activates NK cells through toll-like receptor-2. *Mol Biochem Parasitol* 130, 65–74. [https://doi.org/10.1016/s0166-6851\(03\)00160-9](https://doi.org/10.1016/s0166-6851(03)00160-9)
- Becker, P.S.A., Suck, G., Nowakowska, P., Ullrich, E., Seifried, E., Bader, P., Tonn, T., Seidl, C., 2016. Selection and expansion of natural killer cells for NK cell-based immunotherapy. *Cancer Immunol Immunother* 65, 477–484. <https://doi.org/10.1007/s00262-016-1792-y>
- Becknell, B., Caligiuri, M.A., 2005. Interleukin-2, interleukin-15, and their roles in human natural killer cells. *Adv Immunol* 86, 209–239. [https://doi.org/10.1016/S0065-2776\(04\)86006-1](https://doi.org/10.1016/S0065-2776(04)86006-1)
- Beldi-Ferchiou, A., Lambert, M., Dogniaux, S., Vély, F., Vivier, E., Olive, D., Dupuy, S., Levasseur, F., Zucman, D., Lebbé, C., Sène, D., Hivroz, C., Caillat-Zucman, S., 2016. PD-1 mediates functional exhaustion of activated NK cells in patients with Kaposi sarcoma. *Oncotarget* 7, 72961–72977. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.12150>
- Benson, D.M., Bakan, C.E., Zhang, S., Collins, S.M., Liang, J., Srivastava, S., Hofmeister, C.C., Efebera, Y., Andre, P., Romagne, F., Bléry, M., Bonnafous, C., Zhang, J., Clever, D., Caligiuri, M.A., Farag, S.S., 2011. IPH2101, a novel anti-inhibitory KIR antibody, and lenalidomide combine to enhance the natural killer cell versus multiple myeloma effect. *Blood* 118, 6387–6391. <https://doi.org/10.1182/blood-2011-06-360255>
- Benson, D.M., Cohen, A.D., Jagannath, S., Munshi, N.C., Spitzer, G., Hofmeister, C.C., Efebera, Y.A., Andre, P., Zerbib, R., Caligiuri, M.A., 2015. A Phase I Trial of the Anti-KIR Antibody IPH2101 and Lenalidomide in Patients with Relapsed/Refractory Multiple Myeloma. *Clin Cancer Res* 21, 4055–4061. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-15-0304>
- Berke, G., 1994. The binding and lysis of target cells by cytotoxic lymphocytes: molecular and cellular aspects. *Annu Rev Immunol* 12, 735–773. <https://doi.org/10.1146/annurev.iy.12.040194.003511>
- Bernardini, G., Gismondi, A., Santoni, A., 2012. Chemokines and NK cells: Regulators of development, trafficking and functions. *Immunol Lett* 145, 39–46. <https://doi.org/10.1016/j.imlet.2012.04.014>
- Béziat, V., Dalgard, O., Asselah, T., Halfon, P., Bedossa, P., Boudifa, A., Hervier, B., Theodorou, I., Martinot, M., Debré, P., Björkström, N.K., Malmberg, K.-J., Marcellin, P., Vieillard, V., 2012. CMV drives clonal expansion of NKG2C+ NK cells expressing self-specific KIRs in chronic hepatitis patients. *Eur J Immunol* 42, 447–457. <https://doi.org/10.1002/eji.201141826>
- Béziat, V., Liu, L.L., Malmberg, J.-A., Ivarsson, M.A., Sohlberg, E., Björklund, A.T., Retière, C., Sverremark-Ekström, E., Traherne, J., Ljungman, P., Schaffer, M., Price, D.A., Trowsdale, J., Michaëlsson, J., Ljunggren, H.-G., Malmberg, K.-J., 2013a. NK cell responses to cytomegalovirus infection lead to stable imprints in the human KIR repertoire and involve activating KIRs. *Blood* 121, 2678–2688. <https://doi.org/10.1182/blood-2012-10-459545>
- Béziat, V., Traherne, J.A., Liu, L.L., Jayaraman, J., Enqvist, M., Larsson, S., Trowsdale, J., Malmberg, K.-J., 2013b. Influence of KIR gene copy number on natural killer cell education. *Blood* 121, 4703–4707. <https://doi.org/10.1182/blood-2012-10-461442>

- Béziat, V., Traherne, J.A., Liu, L.L., Jayaraman, J., Enqvist, M., Larsson, S., Trowsdale, J., Malmberg, K.-J., 2013c. Influence of KIR gene copy number on natural killer cell education. *Blood* 121, 4703–4707. <https://doi.org/10.1182/blood-2012-10-461442>
- Bi, J., Tian, Z., 2017. NK Cell Exhaustion. *Frontiers in Immunology* 8. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.00760>
- Bialoszewska, A., Malejczyk, J., 2018. Biological and Clinical Significance of Human NKR1A/LLT1 Receptor/Ligand Interactions. *Crit Rev Immunol* 38, 479–489. <https://doi.org/10.1615/CritRevImmunol.2019029559>
- Biassoni, R., Pessino, A., Malaspina, A., Cantoni, C., Bottino, C., Sivori, S., Moretta, L., Moretta, A., 1997. Role of amino acid position 70 in the binding affinity of p50.1 and p58.1 receptors for HLA-Cw4 molecules. *Eur J Immunol* 27, 3095–3099. <https://doi.org/10.1002/eji.1830271203>
- Biron, C.A., Byron, K.S., Sullivan, J.L., 1989. Severe herpesvirus infections in an adolescent without natural killer cells. *N Engl J Med* 320, 1731–1735. <https://doi.org/10.1056/NEJM198906293202605>
- Björklund, A.T., Clancy, T., Goodridge, J.P., Béziat, V., Schaffer, M., Hovig, E., Ljunggren, H.-G., Ljungman, P.T., Malmberg, K.-J., 2016. Naive Donor NK Cell Repertoires Associated with Less Leukemia Relapse after Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplantation. *J. Immunol.* 196, 1400–1411. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1501434>
- Björkström, N.K., Riese, P., Heuts, F., Andersson, S., Fauriat, C., Ivarsson, M.A., Björklund, A.T., Flodström-Tullberg, M., Michaëlsson, J., Rottenberg, M.E., Guzmán, C.A., Ljunggren, H.-G., Malmberg, K.-J., 2010. Expression patterns of NKG2A, KIR, and CD57 define a process of CD56dim NK-cell differentiation uncoupled from NK-cell education. *Blood* 116, 3853–3864. <https://doi.org/10.1182/blood-2010-04-281675>
- Blázquez-Moreno, A., Park, S., Im, W., Call, M.J., Call, M.E., Reyburn, H.T., 2017. Transmembrane features governing Fc receptor CD16A assembly with CD16A signaling adaptor molecules. *Proc Natl Acad Sci U S A* 114, E5645–E5654. <https://doi.org/10.1073/pnas.1706483114>
- Blokhuis, J.H., Hilton, H.G., Guethlein, L.A., Norman, P.J., Nemat-Gorgani, N., Nakimuli, A., Chazara, O., Moffett, A., Parham, P., 2017. KIR2DS5 allotypes that recognize the C2 epitope of HLA-C are common among Africans and absent from Europeans. *Immun Inflamm Dis* 5, 461–468. <https://doi.org/10.1002/iid3.178>
- Boissel, L., Betancur-Boissel, M., Lu, W., Krause, D.S., Van Etten, R.A., Wels, W.S., Klingemann, H., 2013. Retargeting NK-92 cells by means of CD19- and CD20-specific chimeric antigen receptors compares favorably with antibody-dependent cellular cytotoxicity. *Oncoimmunology* 2, e26527. <https://doi.org/10.4161/onci.26527>
- Bonilla, F.A., Oettgen, H.C., 2010. Adaptive immunity. *Journal of Allergy and Clinical Immunology, 2010 Primer on Allergic and Immunologic Diseases* 125, S33–S40. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2009.09.017>
- Borg, C., Jalil, A., Laderach, D., Maruyama, K., Wakasugi, H., Charrier, S., Ryffel, B., Cambi, A., Figdor, C., Vainchenker, W., Galy, A., Caignard, A., Zitvogel, L., 2004. NK cell activation by dendritic cells (DCs) requires the formation of a synapse leading to IL-12 polarization in DCs. *Blood* 104, 3267–3275. <https://doi.org/10.1182/blood-2004-01-0380>
- Borgerding, A., Hasenkamp, J., Engelke, M., Burkhart, N., Trümper, L., Wienands, J., Glass, B., 2010. B-lymphoma cells escape rituximab-triggered elimination by NK cells through increased HLA class I expression. *Experimental Hematology* 38, 213–221. <https://doi.org/10.1016/j.exphem.2009.12.007>
- Borrego, F., 2006. The first molecular basis of the “missing self” hypothesis. *J Immunol* 177, 5759–5760. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.177.9.5759>
- Borrego, F., Kabat, J., Kim, D.-K., Lieto, L., Maasho, K., Peña, J., Solana, R., Coligan, J.E., 2002. Structure and function of major histocompatibility complex (MHC) class I specific receptors expressed on human natural killer (NK) cells. *Molecular Immunology* 38, 637–660. [https://doi.org/10.1016/S0161-5890\(01\)00107-9](https://doi.org/10.1016/S0161-5890(01)00107-9)

- Bottino, C., Castriconi, R., Pende, D., Rivera, P., Nanni, M., Carnemolla, B., Cantoni, C., Grassi, J., Marcenaro, S., Reymond, N., Vitale, M., Moretta, L., Lopez, M., Moretta, A., 2003. Identification of PVR (CD155) and Nectin-2 (CD112) as cell surface ligands for the human DNAM-1 (CD226) activating molecule. *J. Exp. Med.* 198, 557–567. <https://doi.org/10.1084/jem.20030788>
- Bottino, C., Falco, M., Parolini, S., Marcenaro, E., Augugliaro, R., Sivori, S., Landi, E., Biassoni, R., Notarangelo, L.D., Moretta, L., Moretta, A., 2001. NTB-A [correction of GNTB-A], a novel SH2D1A-associated surface molecule contributing to the inability of natural killer cells to kill Epstein-Barr virus-infected B cells in X-linked lymphoproliferative disease. *J Exp Med* 194, 235–246. <https://doi.org/10.1084/jem.194.3.235>
- Boudreau, J.E., Hsu, K.C., 2018. Natural killer cell education in human health and disease. *Current Opinion in Immunology* 50, 102–111. <https://doi.org/10.1016/j.coi.2017.11.003>
- Boudreau, J.E., Le Luduec, J.-B., Hsu, K.C., 2014. Development of a novel multiplex PCR assay to detect functional subtypes of KIR3DL1 alleles. *PLoS One* 9, e99543. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0099543>
- Boudreau, J.E., Liu, X.-R., Zhao, Z., Zhang, A., Shultz, L.D., Greiner, D.L., Dupont, B., Hsu, K.C., 2016a. Cell-Extrinsic MHC Class I Molecule Engagement Augments Human NK Cell Education Programmed by Cell-Intrinsic MHC Class I. *Immunity* 45, 280–291. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2016.07.005>
- Boudreau, J.E., Mulrooney, T.J., Le Luduec, J.-B., Barker, E., Hsu, K.C., 2016b. KIR3DL1 and HLA-B Density and Binding Calibrate NK Education and Response to HIV. *J Immunol* 196, 3398–3410. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1502469>
- Boulanger, M.J., Garcia, K.C., 2004. Shared cytokine signaling receptors: structural insights from the gp130 system. *Adv Protein Chem* 68, 107–146. [https://doi.org/10.1016/S0065-3233\(04\)68004-1](https://doi.org/10.1016/S0065-3233(04)68004-1)
- Brandt, C.S., Baratin, M., Yi, E.C., Kennedy, J., Gao, Z., Fox, B., Haldeman, B., Ostrander, C.D., Kaifu, T., Chabannon, C., Moretta, A., West, R., Xu, W., Vivier, E., Levin, S.D., 2009. The B7 family member B7-H6 is a tumor cell ligand for the activating natural killer cell receptor NKp30 in humans. *The Journal of Experimental Medicine* 206, 1495. <https://doi.org/10.1084/jem.20090681>
- Braud, V., Jones, E.Y., McMichael, A., 1997. The human major histocompatibility complex class Ib molecule HLA-E binds signal sequence-derived peptides with primary anchor residues at positions 2 and 9. *Eur J Immunol* 27, 1164–1169. <https://doi.org/10.1002/eji.1830270517>
- Braud, V.M., Allan, D.S., O’Callaghan, C.A., Söderström, K., D’Andrea, A., Ogg, G.S., Lazetic, S., Young, N.T., Bell, J.I., Phillips, J.H., Lanier, L.L., McMichael, A.J., 1998. HLA-E binds to natural killer cell receptors CD94/NKG2A, B and C. *Nature* 391, 795–799. <https://doi.org/10.1038/35869>
- Braud, V.M., Biton, J., Becht, E., Knockaert, S., Mansuet-Lupo, A., Cosson, E., Damotte, D., Alifano, M., Validire, P., Anjuère, F., Cremer, I., Girard, N., Gossot, D., Seguin-Givelet, A., Dieu-Nosjean, M.-C., Germain, C., 2018. Expression of LLT1 and its receptor CD161 in lung cancer is associated with better clinical outcome. *Oncoimmunology* 7. <https://doi.org/10.1080/2162402X.2017.1423184>
- Brauner, H., Elemans, M., Lemos, S., Broberger, C., Holmberg, D., Flodström-Tullberg, M., Kärre, K., Höglund, P., 2010. Distinct phenotype and function of NK cells in the pancreas of nonobese diabetic mice. *J Immunol* 184, 2272–2280. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.0804358>
- Brodin, P., Höglund, P., 2008. Beyond licensing and disarming: A quantitative view on NK-cell education. *European Journal of Immunology* 38, 2934–2937. <https://doi.org/10.1002/eji.200838760>
- Brumbaugh, K.M., Binstadt, B.A., Billadeau, D.D., Schoon, R.A., Dick, C.J., Ten, R.M., Leibson, P.J., 1997. Functional role for Syk tyrosine kinase in natural killer cell-mediated natural cytotoxicity. *J Exp Med* 186, 1965–1974. <https://doi.org/10.1084/jem.186.12.1965>

- Bryceson, Y.T., Ljunggren, H.-G., Long, E.O., 2009. Minimal requirement for induction of natural cytotoxicity and intersection of activation signals by inhibitory receptors. *Blood* 114, 2657–2666. <https://doi.org/10.1182/blood-2009-01-201632>
- Bryceson, Y.T., March, M.E., Ljunggren, H.-G., Long, E.O., 2006. Synergy among receptors on resting NK cells for the activation of natural cytotoxicity and cytokine secretion. *Blood* 107, 159–166. <https://doi.org/10.1182/blood-2005-04-1351>
- Bubić, I., Wagner, M., Krmpotić, A., Saulig, T., Kim, S., Yokoyama, W.M., Jonjić, S., Koszinowski, U.H., 2004. Gain of virulence caused by loss of a gene in murine cytomegalovirus. *J Virol* 78, 7536–7544. <https://doi.org/10.1128/JVI.78.14.7536-7544.2004>
- Buller, C.W., Mathew, P.A., Mathew, S.O., 2020. Roles of NK Cell Receptors 2B4 (CD244), CS1 (CD319), and LLT1 (CLEC2D) in Cancer. *Cancers* 12, 1755. <https://doi.org/10.3390/cancers12071755>
- Buonocore, S., Ahern, P.P., Uhlig, H.H., Ivanov, I.I., Littman, D.R., Maloy, K.J., Powrie, F., 2010. Innate lymphoid cells drive interleukin-23-dependent innate intestinal pathology. *Nature* 464, 1371–1375. <https://doi.org/10.1038/nature08949>
- Caligiuri, M.A., 2008. Human natural killer cells. *Blood* 112, 461–469. <https://doi.org/10.1182/blood-2007-09-077438>
- Campbell, J.J., Qin, S., Unutmaz, D., Soler, D., Murphy, K.E., Hodge, M.R., Wu, L., Butcher, E.C., 2001. Unique Subpopulations of CD56+ NK and NK-T Peripheral Blood Lymphocytes Identified by Chemokine Receptor Expression Repertoire. *The Journal of Immunology* 166, 6477–6482. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.166.11.6477>
- Cannon, M.J., Schmid, D.S., Hyde, T.B., 2010. Review of cytomegalovirus seroprevalence and demographic characteristics associated with infection. *Rev Med Virol* 20, 202–213. <https://doi.org/10.1002/rmv.655>
- Cantoni, C., Bottino, C., Vitale, M., Pessino, A., Augugliaro, R., Malaspina, A., Parolini, S., Moretta, L., Moretta, A., Biassoni, R., 1999. NKp44, a triggering receptor involved in tumor cell lysis by activated human natural killer cells, is a novel member of the immunoglobulin superfamily. *J Exp Med* 189, 787–796. <https://doi.org/10.1084/jem.189.5.787>
- Caocci, G., Orofino, M.G., Vacca, A., Piroddi, A., Piras, E., Addari, M.C., Caria, R., Pilia, M.P., Origa, R., Moi, P., La Nasa, G., 2017. Long-term survival of beta thalassemia major patients treated with hematopoietic stem cell transplantation compared with survival with conventional treatment. *Am J Hematol* 92, 1303–1310. <https://doi.org/10.1002/ajh.24898>
- Carlomagno, S., Falco, M., Bono, M., Alicata, C., Garbarino, L., Mazzocco, M., Moretta, L., Moretta, A., Sivori, S., 2017. KIR3DS1-Mediated Recognition of HLA-*B51*: Modulation of KIR3DS1 Responsiveness by Self HLA-B Allotypes and Effect on NK Cell Licensing. *Front Immunol* 8, 581. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.00581>
- Carlsten, M., Björkström, N.K., Norell, H., Bryceson, Y., van Hall, T., Baumann, B.C., Hanson, M., Schedvins, K., Kiessling, R., Ljunggren, H.-G., Malmberg, K.-J., 2007. DNAX accessory molecule-1 mediated recognition of freshly isolated ovarian carcinoma by resting natural killer cells. *Cancer Res* 67, 1317–1325. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-06-2264>
- Carlsten, M., Childs, R.W., 2015. Genetic Manipulation of NK Cells for Cancer Immunotherapy: Techniques and Clinical Implications. *Front. Immunol.* 6. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2015.00266>
- Carlsten, M., Järås, M., 2019. Natural Killer Cells in Myeloid Malignancies: Immune Surveillance, NK Cell Dysfunction, and Pharmacological Opportunities to Bolster the Endogenous NK Cells. *Front Immunol* 10, 2357. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.02357>
- Carlsten, M., Korde, N., Kotecha, R., Reger, R., Bor, S., Kazandjian, D., Landgren, O., Childs, R.W., 2016. Checkpoint Inhibition of KIR2D with the Monoclonal Antibody IPH2101 Induces Contraction and Hyporesponsiveness of NK Cells in Patients with Myeloma. *Clin Cancer Res* 22, 5211–5222. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-16-1108>
- Carlsten, M., Norell, H., Bryceson, Y.T., Poschke, I., Schedvins, K., Ljunggren, H.-G., Kiessling, R., Malmberg, K.-J., 2009. Primary human tumor cells expressing CD155 impair tumor targeting

- by down-regulating DNAM-1 on NK cells. *J Immunol* 183, 4921–4930. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.0901226>
- Carr, W.H., Rosen, D.B., Arase, H., Nixon, D.F., Michaelsson, J., Lanier, L.L., 2007. Cutting Edge: KIR3DS1, a gene implicated in resistance to progression to AIDS, encodes a DAP12-associated receptor expressed on NK cells that triggers NK cell activation. *J Immunol* 178, 647–651. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.178.2.647>
- Carretero, M., Cantoni, C., Bellón, T., Bottino, C., Biassoni, R., Rodríguez, A., Pérez-Villar, J.J., Moretta, L., Moretta, A., López-Botet, M., 1997. The CD94 and NKG2-A C-type lectins covalently assemble to form a natural killer cell inhibitory receptor for HLA class I molecules. *Eur J Immunol* 27, 563–567. <https://doi.org/10.1002/eji.1830270230>
- Cartron, G., Dacheux, L., Salles, G., Solal-Celigny, P., Bardos, P., Colombat, P., Watier, H., 2002. Therapeutic activity of humanized anti-CD20 monoclonal antibody and polymorphism in IgG Fc receptor FcγRIIIa gene 99, 6.
- Casado, J.G., Pawelec, G., Morgado, S., Sanchez-Correa, B., Delgado, E., Gayoso, I., Duran, E., Solana, R., Tarazona, R., 2009. Expression of adhesion molecules and ligands for activating and costimulatory receptors involved in cell-mediated cytotoxicity in a large panel of human melanoma cell lines. *Cancer Immunol Immunother* 58, 1517–1526. <https://doi.org/10.1007/s00262-009-0682-y>
- Cashen, A., Lopez, S., Gao, F., Calandra, G., MacFarland, R., Badel, K., DiPersio, J., 2008. A phase II study of plerixafor (AMD3100) plus G-CSF for autologous hematopoietic progenitor cell mobilization in patients with Hodgkin lymphoma. *Biol Blood Marrow Transplant* 14, 1253–1261. <https://doi.org/10.1016/j.bbmt.2008.08.011>
- Castriconi, R., Cantoni, C., Della Chiesa, M., Vitale, M., Marcenaro, E., Conte, R., Biassoni, R., Bottino, C., Moretta, L., Moretta, A., 2003. Transforming growth factor beta 1 inhibits expression of Nkp30 and NKG2D receptors: consequences for the NK-mediated killing of dendritic cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 4120–4125. <https://doi.org/10.1073/pnas.0730640100>
- Castriconi, R., Dondero, A., Corrias, M.V., Lanino, E., Pende, D., Moretta, L., Bottino, C., Moretta, A., 2004. Natural killer cell-mediated killing of freshly isolated neuroblastoma cells: critical role of DNAX accessory molecule-1-poliovirus receptor interaction. *Cancer Res* 64, 9180–9184. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-04-2682>
- Carboni, C., Achour, A., Wärnmark, A., Mousavi-Jazi, M., Sandalova, T., Hsu, M.-L., Cosman, D., Kärre, K., Carbone, E., 2006. Spontaneous mutations in the human CMV HLA class I homologue UL18 affect its binding to the inhibitory receptor LIR-1/ILT2/CD85j. *Eur J Immunol* 36, 732–741. <https://doi.org/10.1002/eji.200425220>
- Chalifour, A., Jeannin, P., Gauchat, J.-F., Blaecke, A., Malissard, M., N’Guyen, T., Thieblemont, N., Delneste, Y., 2004. Direct bacterial protein PAMP recognition by human NK cells involves TLRs and triggers alpha-defensin production. *Blood* 104, 1778–1783. <https://doi.org/10.1182/blood-2003-08-2820>
- Chan, C.J., Andrews, D.M., Smyth, M.J., 2012. Receptors that interact with nectin and nectin-like proteins in the immunosurveillance and immunotherapy of cancer. *Curr Opin Immunol* 24, 246–251. <https://doi.org/10.1016/j.coi.2012.01.009>
- Chan, C.J., Martinet, L., Gilfillan, S., Souza-Fonseca-Guimaraes, F., Chow, M.T., Town, L., Ritchie, D.S., Colonna, M., Andrews, D.M., Smyth, M.J., 2014. The receptors CD96 and CD226 oppose each other in the regulation of natural killer cell functions. *Nat Immunol* 15, 431–438. <https://doi.org/10.1038/ni.2850>
- Chang, C., Rodríguez, A., Carretero, M., López-Botet, M., Phillips, J.H., Lanier, L.L., 1995. Molecular characterization of human CD94: a type II membrane glycoprotein related to the C-type lectin superfamily. *Eur J Immunol* 25, 2433–2437. <https://doi.org/10.1002/eji.1830250904>
- Chen, K.C., Stanton, R.J., Banat, J.J., Wills, M.R., 2016. Leukocyte Immunoglobulin-Like Receptor 1-Expressing Human Natural Killer Cell Subsets Differentially Recognize Isolates of Human Cytomegalovirus through the Viral Major Histocompatibility Complex Class I Homolog UL18. *J Virol* 90, 3123–3137. <https://doi.org/10.1128/JVI.02614-15>

- Chen, Y., Lu, D., Churov, A., Fu, R., 2020. Research Progress on NK Cell Receptors and Their Signaling Pathways. *Mediators Inflamm* 2020. <https://doi.org/10.1155/2020/6437057>
- Chester, C., Fritsch, K., Kohrt, H.E., 2015. Natural Killer Cell Immunomodulation: Targeting Activating, Inhibitory, and Co-stimulatory Receptor Signaling for Cancer Immunotherapy. *Front. Immunol.* 6. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2015.00601>
- Chewning, J.H., Gudme, C.N., Hsu, K.C., Selvakumar, A., Dupont, B., 2007. KIR2DS1-positive NK cells mediate alloresponse against the C2 HLA-KIR ligand group in vitro. *J Immunol* 179, 854–868. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.179.2.854>
- Chiossone, L., Vienne, M., Kerdiles, Y.M., Vivier, E., 2017. Natural killer cell immunotherapies against cancer: checkpoint inhibitors and more. *Semin Immunol* 31, 55–63. <https://doi.org/10.1016/j.smim.2017.08.003>
- Choi, S.W., Reddy, P., 2014. Current and emerging strategies for the prevention of graft-versus-host disease. *Nat Rev Clin Oncol* 11, 536–547. <https://doi.org/10.1038/nrclinonc.2014.102>
- Choo, S.Y., 2007. The HLA System: Genetics, Immunology, Clinical Testing, and Clinical Implications. *Yonsei Med J* 48, 11–23. <https://doi.org/10.3349/ymj.2007.48.1.11>
- Chowdhury, D., Lieberman, J., 2008. Death by a thousand cuts: granzyme pathways of programmed cell death. *Annu Rev Immunol* 26, 389–420. <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.26.021607.090404>
- Cichocki, F., Cooley, S., Davis, Z., DeFor, T.E., Schlums, H., Zhang, B., Brunstein, C.G., Blazar, B.R., Wagner, J., Diamond, D.J., Verneris, M.R., Bryceson, Y.T., Weisdorf, D.J., Miller, J.S., 2016. CD56dimCD57+NKG2C+ NK cell expansion is associated with reduced leukemia relapse after reduced intensity HCT. *Leukemia* 30, 456–463. <https://doi.org/10.1038/leu.2015.260>
- Cichocki, F., Valamehr, B., Bjordahl, R., Zhang, B., Rezner, B., Rogers, P., Gaidarova, S., Moreno, S., Tuininga, K., Dougherty, P., McCullar, V., Howard, P., Sarhan, D., Taras, E., Schlums, H., Abbot, S., Shoemaker, D., Bryceson, Y.T., Blazar, B.R., Wolchko, S., Cooley, S., Miller, J.S., 2017. GSK3 Inhibition Drives Maturation of NK Cells and Enhances Their Antitumor Activity. *Cancer Res* 77, 5664–5675. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-17-0799>
- Ciurea SO, Schafer JR, Bassett R, et al. Phase 1 clinical trial using mbIL21 ex vivo-expanded donor-derived NK cells after haploidentical transplantation. *Blood*. 2017;130(16):1857-1868, 2018. . *Blood* 132, 2782. <https://doi.org/10.1182/blood-2018-11-884247>
- Clark, R., Griffiths, G.M., 2003. Lytic granules, secretory lysosomes and disease. *Curr Opin Immunol* 15, 516–521. [https://doi.org/10.1016/s0952-7915\(03\)00113-4](https://doi.org/10.1016/s0952-7915(03)00113-4)
- Clémenceau, B., Vivien, R., Berthomé, M., Robillard, N., Garand, R., Gallot, G., Vollant, S., Vié, H., 2008. Effector memory alpha T lymphocytes can express Fc gamma RIIIa and mediate antibody-dependent cellular cytotoxicity. *J Immunol* 180, 5327–5334. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.180.8.5327>
- Clémenceau, B., Vivien, R., Pellat, C., Foss, M., Thibault, G., Vié, H., 2013. The human natural killer cytotoxic cell line NK-92, once armed with a murine CD16 receptor, represents a convenient cellular tool for the screening of mouse mAbs according to their ADCC potential. *MAbs* 5, 587–594. <https://doi.org/10.4161/mabs.25077>
- Colonna, M., 1997. Specificity and function of immunoglobulin superfamily NK cell inhibitory and stimulatory receptors. *Immunol Rev* 155, 127–133. <https://doi.org/10.1111/j.1600-065x.1997.tb00945.x>
- Colucci, F., 2017. The role of KIR and HLA interactions in pregnancy complications. *Immunogenetics* 69, 557–565. <https://doi.org/10.1007/s00251-017-1003-9>
- Congy-Jolivet, N., Bolzec, A., Ternant, D., Ohresser, M., Watier, H., Thibault, G., 2008. Fc gamma RIIIa expression is not increased on natural killer cells expressing the Fc gamma RIIIa-158V allotype. *Cancer Res* 68, 976–980. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-07-6523>
- Cooley, S., He, F., Bachanova, V., Vercellotti, G.M., DeFor, T.E., Curtsinger, J.M., Robertson, P., Grzywacz, B., Conlon, K.C., Waldmann, T.A., McKenna, D.H., Blazar, B.R., Weisdorf, D.J., Miller, J.S., 2019. First-in-human trial of rhIL-15 and haploidentical natural killer cell therapy

- for advanced acute myeloid leukemia. *Blood Adv* 3, 1970–1980. <https://doi.org/10.1182/bloodadvances.2018028332>
- Cooley, S., Parham, P., Miller, J.S., 2018. Strategies to activate NK cells to prevent relapse and induce remission following hematopoietic stem cell transplantation. *Blood* 131, 1053–1062. <https://doi.org/10.1182/blood-2017-08-752170>
- Cooley, S., Trachtenberg, E., Bergemann, T.L., Saeteurn, K., Klein, J., Le, C.T., Marsh, S.G.E., Guethlein, L.A., Parham, P., Miller, J.S., Weisdorf, D.J., 2009. Donors with group B KIR haplotypes improve relapse-free survival after unrelated hematopoietic cell transplantation for acute myelogenous leukemia. *Blood* 113, 726–732. <https://doi.org/10.1182/blood-2008-07-171926>
- Cooper, M.A., Fehniger, T.A., Turner, S.C., Chen, K.S., Ghaheri, B.A., Ghayur, T., Carson, W.E., Caligiuri, M.A., 2001. Human natural killer cells: a unique innate immunoregulatory role for the CD56(bright) subset. *Blood* 97, 3146–3151. <https://doi.org/10.1182/blood.v97.10.3146>
- Cornelissen, J.J., Blaise, D., 2016. Hematopoietic stem cell transplantation for patients with AML in first complete remission. *Blood* 127, 62–70. <https://doi.org/10.1182/blood-2015-07-604546>
- Cosman, D., Fanger, N., Borges, L., Kubin, M., Chin, W., Peterson, L., Hsu, M.L., 1997. A novel immunoglobulin superfamily receptor for cellular and viral MHC class I molecules. *Immunity* 7, 273–282. [https://doi.org/10.1016/s1074-7613\(00\)80529-4](https://doi.org/10.1016/s1074-7613(00)80529-4)
- Cosman, D., Müllberg, J., Sutherland, C.L., Chin, W., Armitage, R., Fanslow, W., Kubin, M., Chalupny, N.J., 2001. ULBPs, novel MHC class I-related molecules, bind to CMV glycoprotein UL16 and stimulate NK cytotoxicity through the NKG2D receptor. *Immunity* 14, 123–133. [https://doi.org/10.1016/s1074-7613\(01\)00095-4](https://doi.org/10.1016/s1074-7613(01)00095-4)
- Costello, R.T., Sivori, S., Marcenaro, E., Lafage-Pochitaloff, M., Mozziconacci, M.-J., Reviron, D., Gastaut, J.-A., Pende, D., Olive, D., Moretta, A., 2002. Defective expression and function of natural killer cell-triggering receptors in patients with acute myeloid leukemia. *Blood* 99, 3661–3667. <https://doi.org/10.1182/blood.v99.10.3661>
- Croxford, J.L., Tang, M.L.F., Pan, M.F., Huang, C.W., Kamran, N., Phua, C.M.L., Chng, W.J., Ng, S.B., Raulet, D.H., Gasser, S., 2013. ATM-dependent spontaneous regression of early E μ -myc-induced murine B-cell leukemia depends on natural killer and T cells. *Blood* 121, 2512–2521. <https://doi.org/10.1182/blood-2012-08-449025>
- Dai, H., Wang, Y., Lu, X., Han, W., 2016. Chimeric Antigen Receptors Modified T-Cells for Cancer Therapy. *J Natl Cancer Inst* 108. <https://doi.org/10.1093/jnci/djv439>
- Daldrup-Link, H.E., Meier, R., Rudelius, M., Piontek, G., Piert, M., Metz, S., Settles, M., Uherek, C., Wels, W., Schlegel, J., Rummeny, E.J., 2005. In vivo tracking of genetically engineered, anti-HER2/neu directed natural killer cells to HER2/neu positive mammary tumors with magnetic resonance imaging. *Eur Radiol* 15, 4–13. <https://doi.org/10.1007/s00330-004-2526-7>
- Dall'Ozzo, S., Tartas, S., Paintaud, G., Cartron, G., Colombat, P., Bardos, P., Watier, H., Thibault, G., 2004. Rituximab-Dependent Cytotoxicity by Natural Killer Cells: Influence of FCGR3A Polymorphism on the Concentration-Effect Relationship. *Cancer Res* 64, 4664–4669. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-03-2862>
- D'Andrea, A., Chang, C., Phillips, J.H., Lanier, L.L., 1996. Regulation of T cell lymphokine production by killer cell inhibitory receptor recognition of self HLA class I alleles. *J Exp Med* 184, 789–794. <https://doi.org/10.1084/jem.184.2.789>
- Dar, A., Kollet, O., Lapidot, T., 2006. Mutual, reciprocal SDF-1/CXCR4 interactions between hematopoietic and bone marrow stromal cells regulate human stem cell migration and development in NOD/SCID chimeric mice. *Experimental Hematology* 34, 967–975. <https://doi.org/10.1016/j.exphem.2006.04.002>
- Dausset, J., 1958. Iso-leuco-anticorps. *AHA* 20, 156–166. <https://doi.org/10.1159/000205478>
- David, G., Djaoud, Z., Willem, C., Legrand, N., Rettman, P., Gagne, K., Cesbron, A., Retière, C., 2013. Large spectrum of HLA-C recognition by killer Ig-like receptor (KIR)2DL2 and KIR2DL3 and restricted C1 SPECIFICITY of KIR2DS2: dominant impact of KIR2DL2/KIR2DS2 on KIR2D NK cell repertoire formation. *J. Immunol.* 191, 4778–4788. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1301580>

- Deauvieau, F., Ollion, V., Doffin, A.-C., Achard, C., Fonteneau, J.-F., Verronese, E., Durand, I., Ghittoni, R., Marvel, J., Dezutter-Dambuyant, C., Walzer, T., Vie, H., Perrot, I., Goutagny, N., Caux, C., Valladeau-Guilemond, J., 2015. Human natural killer cells promote cross-presentation of tumor cell-derived antigens by dendritic cells. *International Journal of Cancer* 136, 1085–1094. <https://doi.org/10.1002/ijc.29087>
- Degli-Esposti, M.A., Smyth, M.J., 2005. Close encounters of different kinds: dendritic cells and NK cells take centre stage. *Nat Rev Immunol* 5, 112–124. <https://doi.org/10.1038/nri1549>
- Del Zotto, G., Marcenaro, E., Vacca, P., Sivori, S., Pende, D., Della Chiesa, M., Moretta, F., Ingegnere, T., Mingari, M.C., Moretta, A., Moretta, L., 2017. Markers and function of human NK cells in normal and pathological conditions: MARKERS AND FUNCTION OF HUMAN NK CELLS. *Cytometry Part B: Clinical Cytometry* 92, 100–114. <https://doi.org/10.1002/cyto.b.21508>
- Della Chiesa, M., Carlomagno, S., Frumento, G., Balsamo, M., Cantoni, C., Conte, R., Moretta, L., Moretta, A., Vitale, M., 2006. The tryptophan catabolite L-kynurenine inhibits the surface expression of NKp46- and NKG2D-activating receptors and regulates NK-cell function. *Blood* 108, 4118–4125. <https://doi.org/10.1182/blood-2006-03-006700>
- Della Chiesa, M., Falco, M., Podestà, M., Locatelli, F., Moretta, L., Frassoni, F., Moretta, A., 2012. Phenotypic and functional heterogeneity of human NK cells developing after umbilical cord blood transplantation: a role for human cytomegalovirus? *Blood* 119, 399–410. <https://doi.org/10.1182/blood-2011-08-372003>
- Della Chiesa, M., Muccio, L., Moretta, A., 2013. CMV induces rapid NK cell maturation in HSCT recipients. *Immunology Letters* 155, 11–13. <https://doi.org/10.1016/j.imlet.2013.09.020>
- Della Chiesa, M., Pesce, S., Muccio, L., Carlomagno, S., Sivori, S., Moretta, A., Marcenaro, E., 2016. Features of Memory-Like and PD-1(+) Human NK Cell Subsets. *Front Immunol* 7, 351. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2016.00351>
- Della Chiesa, M., Sivori, S., Carlomagno, S., Moretta, L., Moretta, A., 2015. Activating KIRs and NKG2C in Viral Infections: Toward NK Cell Memory? *Front Immunol* 6, 573. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2015.00573>
- Demoulin, B., Cook, W.J., Murad, J., Graber, D.J., Sentman, M.-L., Loney, C., Gilham, D.E., Sentman, C.L., Agaugue, S., 2017. Exploiting natural killer group 2D receptors for CAR T-cell therapy. *Future Oncol* 13, 1593–1605. <https://doi.org/10.2217/fon-2017-0102>
- Dempke, W.C.M., Fenchel, K., Uciechowski, P., Dale, S.P., 2017. Second- and third-generation drugs for immuno-oncology treatment-The more the better? *Eur J Cancer* 74, 55–72. <https://doi.org/10.1016/j.ejca.2017.01.001>
- Deng, W., Gowen, B.G., Zhang, L., Wang, L., Lau, S., Iannello, A., Xu, J., Rovis, T.L., Xiong, N., Raulet, D.H., 2015. Antitumor immunity. A shed NKG2D ligand that promotes natural killer cell activation and tumor rejection. *Science* 348, 136–139. <https://doi.org/10.1126/science.1258867>
- Denman, C.J., Senyukov, V.V., Somanchi, S.S., Phatarpekar, P.V., Kopp, L.M., Johnson, J.L., Singh, H., Hurton, L., Maiti, S.N., Huls, M.H., Champlin, R.E., Cooper, L.J.N., Lee, D.A., 2012. Membrane-bound IL-21 promotes sustained ex vivo proliferation of human natural killer cells. *PLoS One* 7, e30264. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0030264>
- Deteix, C., Mesnil, F., Furst, S., Milpied, N., Yakoub-Agha, I., Fegueux, N., Latour, R.P. de, Mohty, M., Chevallier, P., Labussière Wallet, H., Huynh, A., Larosa, F., Bourhis, J.-H., Cahn, J.-Y., Chantepie, S., Bay, J.-O., Audat, F., Foote, A., Faucher, C., Marry, E., Garban, F., 2020. Influence of alternative donor type on early survival after hematopoietic stem cell transplantation for acute myeloid leukemia lacking a sibling donor. *Bone Marrow Transplantation* 55, 749–757. <https://doi.org/10.1038/s41409-019-0722-y>
- Di Santo, J.P., 2006. Natural killer cell developmental pathways: a question of balance. *Annu Rev Immunol* 24, 257–286. <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.24.021605.090700>
- Di Vito, C., Mikulak, J., Mavilio, D., 2019. On the Way to Become a Natural Killer Cell. *Front Immunol* 10. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.01812>

- Dimberg, L.Y., Anderson, C.K., Camidge, R., Behbakht, K., Thorburn, A., Ford, H.L., 2013. On the TRAIL to successful cancer therapy? Predicting and counteracting resistance against TRAIL-based therapeutics. *Oncogene* 32, 1341–1350. <https://doi.org/10.1038/onc.2012.164>
- Djaoud, Z., David, G., Bressollette, C., Willem, C., Rettman, P., Gagne, K., Legrand, N., Mehlal, S., Cesbron, A., Imbert-Marcille, B.-M., Retière, C., 2013. Amplified NKG2C+ NK Cells in Cytomegalovirus (CMV) Infection Preferentially Express Killer Cell Ig-like Receptor 2DL: Functional Impact in Controlling CMV-Infected Dendritic Cells. *The Journal of Immunology* 191, 2708–2716. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1301138>
- Döhring, C., Scheidegger, D., Samaridis, J., Cella, M., Colonna, M., 1996. A human killer inhibitory receptor specific for HLA-A1,2. *J Immunol* 156, 3098–3101.
- Dotta, F., Fondelli, C., Falorni, A., 2008. Can NK cells be a therapeutic target in human type 1 diabetes? *Eur J Immunol* 38, 2961–2963. <https://doi.org/10.1002/eji.200838851>
- Draghi, M., Pashine, A., Sanjanwala, B., Gendzekhadze, K., Cantoni, C., Cosman, D., Moretta, A., Valiante, N.M., Parham, P., 2007. NKp46 and NKG2D recognition of infected dendritic cells is necessary for NK cell activation in the human response to influenza infection. *J Immunol* 178, 2688–2698. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.178.5.2688>
- Du, J., Lopez-Verges, S., Pitcher, B.N., Johnson, J., Jung, S.-H., Zhou, L., Hsu, K., Czuczman, M.S., Cheson, B., Kaplan, L., Lanier, L.L., Venstrom, J.M., 2014. CALGB 150905 (Alliance): rituximab broadens the antilymphoma response by activating unlicensed NK cells. *Cancer Immunol Res* 2, 878–889. <https://doi.org/10.1158/2326-6066.CIR-13-0158>
- Dubois, V., Amokrane, K., Beguin, Y., Bruno, B., Chevallier, P., Delbos, F., Devillier, R., Giannoli, C., Guidicelli, G., Harif, M., Loiseau, P., Rouzaire, P.-O., Varlet, P., Yakoub-Agha, I., Nguyen, S., 2020. [Haploidentical hematopoietic stem cell transplant: How to choose the best donor? Guidelines from the Francophone Society of Bone Marrow Transplantation and Cellular Therapy (SFGM-TC)]. *Bull Cancer* 107, S72–S84. <https://doi.org/10.1016/j.bulcan.2019.07.011>
- Duev-Cohen, A., Bar-On, Y., Glasner, A., Berhani, O., Ophir, Y., Levi-Schaffer, F., Mandelboim, M., Mandelboim, O., 2016. The human 2B4 and NTB-A receptors bind the influenza viral hemagglutinin and co-stimulate NK cell cytotoxicity. *Oncotarget* 7, 13093–13105. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.7597>
- Dulphy, N., 2018. AHR: leukemic countermeasure against NK cells. *Blood* 132, 1733–1734. <https://doi.org/10.1182/blood-2018-09-873570>
- Dulphy, N., Chrétien, A.-S., Khaznadar, Z., Fauriat, C., Nanbakhsh, A., Caignard, A., Chouaib, S., Olive, D., Toubert, A., 2016. Underground Adaptation to a Hostile Environment: Acute Myeloid Leukemia vs. Natural Killer Cells. *Front Immunol* 7, 94. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2016.00094>
- Dunn, G.P., Bruce, A.T., Ikeda, H., Old, L.J., Schreiber, R.D., 2002. Cancer immunoediting: from immunosurveillance to tumor escape. *Nature Immunology* 3, 991–998. <https://doi.org/10.1038/ni1102-991>
- El-Cheikh, J., Devillier, R., Dulery, R., Massoud, R., Al Chami, F., Ghaoui, N., Moukalled, N., Pagliardini, T., Marino, F., Malard, F., Bazarbachi, A.H., Mohty, R., Bazarbachi, A., Castagna, L., Mohty, M., Blaise, D., 2020. Impact of Adding Antithymocyte Globulin to Posttransplantation Cyclophosphamide in Haploidentical Stem-Cell Transplantation. *Clin Lymphoma Myeloma Leuk* 20, 617–623. <https://doi.org/10.1016/j.clml.2020.04.003>
- Elliott, J.M., Yokoyama, W.M., 2011. Unifying concepts of MHC-dependent natural killer cell education. *Trends Immunol* 32, 364–372. <https://doi.org/10.1016/j.it.2011.06.001>
- El-Sherbiny, Y.M., Meade, J.L., Holmes, T.D., McGonagle, D., Mackie, S.L., Morgan, A.W., Cook, G., Feyler, S., Richards, S.J., Davies, F.E., Morgan, G.J., Cook, G.P., 2007. The requirement for DNAM-1, NKG2D, and NKp46 in the natural killer cell-mediated killing of myeloma cells. *Cancer Res.* 67, 8444–8449. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-06-4230>

- Etzioni, A., Eidenschenk, C., Katz, R., Beck, R., Casanova, J.L., Pollack, S., 2005. Fatal varicella associated with selective natural killer cell deficiency. *J Pediatr* 146, 423–425. <https://doi.org/10.1016/j.jpeds.2004.11.022>
- Falschlehner, C., Emmerich, C.H., Gerlach, B., Walczak, H., 2007. TRAIL signalling: decisions between life and death. *Int J Biochem Cell Biol* 39, 1462–1475. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2007.02.007>
- Fang, F., Xiao, W., Tian, Z., 2017. NK cell-based immunotherapy for cancer. *Semin Immunol* 31, 37–54. <https://doi.org/10.1016/j.smim.2017.07.009>
- Farnault, L., Sanchez, C., Baier, C., Le Treut, T., Costello, R.T., 2012. Hematological malignancies escape from NK cell innate immune surveillance: mechanisms and therapeutic implications. *Clin Dev Immunol* 2012, 421702. <https://doi.org/10.1155/2012/421702>
- Farrington, L.A., Callaway, P.C., Vance, H.M., Baskevitch, K., Lutz, E., Warriier, L., McIntyre, T.I., Budker, R., Jagannathan, P., Nankya, F., Musinguzi, K., Nalubega, M., Sikyomu, E., Naluwu, K., Arinaitwe, E., Dorsey, G., Kanya, M.R., Feeney, M.E., 2020. Opsonized antigen activates Vδ2+ T cells via CD16/FCγRIIIa in individuals with chronic malaria exposure. *PLoS Pathog* 16, e1008997. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1008997>
- Fasbender, F., Claus, M., Wingert, S., Sandusky, M., Watzl, C., 2017. Differential Requirements for Src-Family Kinases in SYK or ZAP70-Mediated SLP-76 Phosphorylation in Lymphocytes. *Front Immunol* 8, 789. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.00789>
- Fauriat, C., Ivarsson, M.A., Ljunggren, H.-G., Malmberg, K.-J., Michaëlsson, J., 2010a. Education of human natural killer cells by activating killer cell immunoglobulin-like receptors. *Blood* 115, 1166–1174. <https://doi.org/10.1182/blood-2009-09-245746>
- Fauriat, C., Long, E.O., Ljunggren, H.-G., Bryceson, Y.T., 2010b. Regulation of human NK-cell cytokine and chemokine production by target cell recognition. *Blood* 115, 2167–2176. <https://doi.org/10.1182/blood-2009-08-238469>
- Fehniger, T.A., Suzuki, K., VanDeusen, J.B., Cooper, M.A., Freud, A.G., Caligiuri, M.A., 2001. Fatal leukemia in interleukin-15 transgenic mice. *Blood Cells Mol Dis* 27, 223–230. <https://doi.org/10.1006/bcmd.2001.0379>
- Felices, M., Lenvik, T.R., Davis, Z.B., Miller, J.S., Vallera, D.A., 2016. Generation of BiKEs and TriKEs to Improve NK Cell-Mediated Targeting of Tumor Cells. *Methods Mol Biol* 1441, 333–346. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-3684-7_28
- Ferlazzo, G., Morandi, B., 2014. Cross-Talks between Natural Killer Cells and Distinct Subsets of Dendritic Cells. *Front Immunol* 5. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2014.00159>
- Ferlazzo, G., Tsang, M.L., Moretta, L., Melioli, G., Steinman, R.M., Münz, C., 2002. Human dendritic cells activate resting natural killer (NK) cells and are recognized via the Nkp30 receptor by activated NK cells. *J Exp Med* 195, 343–351. <https://doi.org/10.1084/jem.20011149>
- Fernandez, N.C., Treiner, E., Vance, R.E., Jamieson, A.M., Lemieux, S., Raulet, D.H., 2005. A subset of natural killer cells achieves self-tolerance without expressing inhibitory receptors specific for self-MHC molecules. *Blood* 105, 4416–4423. <https://doi.org/10.1182/blood-2004-08-3156>
- Flórez-Álvarez, L., Hernandez, J.C., Zapata, W., 2018. NK Cells in HIV-1 Infection: From Basic Science to Vaccine Strategies. *Front. Immunol.* 9. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.02290>
- Fodil-Cornu, N., Lee, S.-H., Belanger, S., Makrigiannis, A.P., Biron, C.A., Buller, R.M., Vidal, S.M., 2008. Ly49h-deficient C57BL/6 mice: a new mouse cytomegalovirus-susceptible model remains resistant to unrelated pathogens controlled by the NK gene complex. *J Immunol* 181, 6394–6405. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.181.9.6394>
- Fogel, L.A., Yokoyama, W.M., French, A.R., 2013. Natural killer cells in human autoimmune disorders. *Arthritis Res Ther* 15, 216. <https://doi.org/10.1186/ar4232>
- Foley, B., Cooley, S., Verneris, M.R., Curtsinger, J., Luo, X., Waller, E.K., Anasetti, C., Weisdorf, D., Miller, J.S., 2012. Human Cytomegalovirus (CMV)-Induced Memory-like NKG2C⁺ NK Cells Are Transplantable and Expand In Vivo in Response to Recipient CMV Antigen. *J.I.* 189, 5082–5088. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1201964>

- Foley, B., Cooley, S., Verneris, M.R., Curtsinger, J., Luo, X., Waller, E.K., Weisdorf, D.J., Miller, J.S., 2011. NK cell education after allogeneic transplantation: dissociation between recovery of cytokine-producing and cytotoxic functions. *Blood* 118, 2784–2792. <https://doi.org/10.1182/blood-2011-04-347070>
- Forlenza, C.J., Boudreau, J.E., Zheng, J., Le Luque, J.-B., Chamberlain, E., Heller, G., Cheung, N.-K.V., Hsu, K.C., 2016. *KIR3DL1* Allelic Polymorphism and HLA-B Epitopes Modulate Response to Anti-GD2 Monoclonal Antibody in Patients With Neuroblastoma. *Journal of Clinical Oncology* 34, 2443–2451. <https://doi.org/10.1200/JCO.2015.64.9558>
- Forslund, E., Sohlberg, E., Enqvist, M., Olofsson, P.E., Malmberg, K.-J., Önfelt, B., 2015. Microchip-Based Single-Cell Imaging Reveals That CD56^{dim} CD57⁻ KIR⁻ NKG2A⁺ NK Cells Have More Dynamic Migration Associated with Increased Target Cell Conjugation and Probability of Killing Compared to CD56^{dim} CD57⁻ KIR⁻ NKG2A⁻ NK Cells. *J.I.* 195, 3374–3381. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1500171>
- Fraza, A., Rethacker, L., Messaoudene, M., Avril, M.-F., Toubert, A., Dulphy, N., Caignard, A., 2019. NKG2D/NKG2-Ligand Pathway Offers New Opportunities in Cancer Treatment. *Front Immunol* 10. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.00661>
- Freud, A.G., Caligiuri, M.A., 2006. Human natural killer cell development. *Immunol Rev* 214, 56–72. <https://doi.org/10.1111/j.1600-065X.2006.00451.x>
- 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., Baiocchi, R.A., Yu, J., Carson, W.E., Caligiuri, M.A., 2016. NKp80 Defines a Critical Step during Human Natural Killer Cell Development. *Cell Rep* 16, 379–391. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2016.05.095>
- Freud, A.G., Mundy-Bosse, B.L., Yu, J., Caligiuri, M.A., 2017. The Broad Spectrum of Human Natural Killer Cell Diversity. *Immunity* 47, 820–833. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2017.10.008>
- Fuchs, E.J., 2012. Haploidentical transplantation for hematologic malignancies: where do we stand? *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 2012, 230–236. <https://doi.org/10.1182/asheducation-2012.1.230>
- Gaggero, S., Bruschi, M., Petretto, A., Parodi, M., Del Zotto, G., Lavarello, C., Prato, C., Santucci, L., Barbuto, A., Bottino, C., Candiano, G., Moretta, A., Vitale, M., Moretta, L., Cantoni, C., 2018. Nidogen-1 is a novel extracellular ligand for the NKp44 activating receptor. *Oncoimmunology* 7, e1470730. <https://doi.org/10.1080/2162402X.2018.1470730>
- Gagne, K., Busson, M., Bignon, J.-D., Balère-Appert, M.-L., Loiseau, P., Dormoy, A., Dubois, V., Perrier, P., Jollet, I., Bois, M., Masson, D., Moine, A., Absi, L., Blaise, D., Charron, D., Raffoux, C., ARS2000 FRM and FGM group, 2009. Donor *KIR3DL1/3DS1* gene and recipient *Bw4 KIR* ligand as prognostic markers for outcome in unrelated hematopoietic stem cell transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant* 15, 1366–1375. <https://doi.org/10.1016/j.bbmt.2009.06.015>
- Gagne, K., Willem, C., Legrand, N., Djaoud, Z., David, G., Rettman, P., Bressollette-Bodin, C., Senitzer, D., Esbelin, J., Cesbron-Gautier, A., Schneider, T., Retière, C., 2013. Both the nature of *KIR3DL1* alleles and the *KIR3DL1/S1* allele combination affect the *KIR3DL1* NK-cell repertoire in the French population. *European Journal of Immunology* 43, 1085–1098. <https://doi.org/10.1002/eji.201243007>
- Gao, J., Zheng, Q., Xin, N., Wang, W., Zhao, C., 2017. CD155, an onco-immunologic molecule in human tumors. *Cancer Sci* 108, 1934–1938. <https://doi.org/10.1111/cas.13324>
- Garcia-Iglesias, T., Del Toro-Arreola, A., Albarran-Somoza, B., Del Toro-Arreola, S., Sanchez-Hernandez, P.E., Ramirez-Dueñas, M.G., Balderas-Peña, L.M.A., Bravo-Cuellar, A., Ortiz-Lazareno, P.C., Daneri-Navarro, A., 2009. Low NKp30, NKp46 and NKG2D expression and reduced cytotoxic activity on NK cells in cervical cancer and precursor lesions. *BMC Cancer* 9, 186. <https://doi.org/10.1186/1471-2407-9-186>
- Garni-Wagner, B.A., Purohit, A., Mathew, P.A., Bennett, M., Kumar, V., 1993. A novel function-associated molecule related to non-MHC-restricted cytotoxicity mediated by activated natural killer cells and T cells. *J Immunol* 151, 60–70.

- Gasteiger, G., Hemmers, S., Firth, M.A., Le Floch, A., Huse, M., Sun, J.C., Rudensky, A.Y., 2013. IL-2-dependent tuning of NK cell sensitivity for target cells is controlled by regulatory T cells. *J Exp Med* 210, 1167–1178. <https://doi.org/10.1084/jem.20122462>
- Gatti, R.A., Meuwissen, H.J., Allen, H.D., Hong, R., Good, R.A., 1968. Immunological reconstitution of sex-linked lymphopenic immunological deficiency. *Lancet* 2, 1366–1369. [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(68\)92673-1](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(68)92673-1)
- Ge, M.Q., Ho, A.W.S., Tang, Y., Wong, K.H.S., Chua, B.Y.L., Gasser, S., Kemeny, D.M., 2012. NK cells regulate CD8+ T cell priming and dendritic cell migration during influenza A infection by IFN- γ and perforin-dependent mechanisms. *J Immunol* 189, 2099–2109. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1103474>
- Ghoreschi, K., Laurence, A., O’Shea, J.J., 2009. Janus kinases in immune cell signaling. *Immunol Rev* 228, 273–287. <https://doi.org/10.1111/j.1600-065X.2008.00754.x>
- Giuliani, M., Janji, B., Berchem, G., 2017. Activation of NK cells and disruption of PD-L1/PD-1 axis: two different ways for lenalidomide to block myeloma progression. *Oncotarget* 8, 24031–24044. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.15234>
- Giuliani, M., Poggi, A., 2020. Checkpoint Inhibitors and Engineered Cells: New Weapons for Natural Killer Cell Arsenal Against Hematological Malignancies. *Cells* 9, 1578. <https://doi.org/10.3390/cells9071578>
- Glasner, A., Ghadially, H., Gur, C., Stanietzky, N., Tsukerman, P., Enk, J., Mandelboim, O., 2012. Recognition and prevention of tumor metastasis by the NK receptor NKp46/NCR1. *J Immunol* 188, 2509–2515. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1102461>
- Glass, B., Uharek, L., Zeis, M., Loeffler, H., Mueller-Ruchholtz, W., Gassmann, W., 1996. Graft-versus-leukaemia activity can be predicted by natural cytotoxicity against leukaemia cells. *Br J Haematol* 93, 412–420. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2141.1996.4941035.x>
- Gleason, M.K., Ross, J.A., Warlick, E.D., Lund, T.C., Verneris, M.R., Wiernik, A., Spellman, S., Haagenson, M.D., Lenvik, A.J., Litzow, M.R., Epling-Burnette, P.K., Blazar, B.R., Weiner, L.M., Weisdorf, D.J., Valleria, D.A., Miller, J.S., 2014. CD16xCD33 bispecific killer cell engager (BiKE) activates NK cells against primary MDS and MDSC CD33+ targets. *Blood* 123, 3016–3026. <https://doi.org/10.1182/blood-2013-10-533398>
- Gleason, M.K., Verneris, M.R., Todhunter, D.A., Zhang, B., McCullar, V., Zhou, S.X., Panoskaltsis-Mortari, A., Weiner, L.M., Valleria, D.A., Miller, J.S., 2012. Bispecific and trispecific killer cell engagers directly activate human NK cells through CD16 signaling and induce cytotoxicity and cytokine production. *Mol Cancer Ther* 11, 2674–2684. <https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-12-0692>
- Glienke, W., Esser, R., Priesner, C., Suerth, J.D., Schambach, A., Wels, W.S., Grez, M., Kloess, S., Arseniev, L., Koehl, U., 2015. Advantages and applications of CAR-expressing natural killer cells. *Front Pharmacol* 6, 21. <https://doi.org/10.3389/fphar.2015.00021>
- Glorius, P., Baerenwaldt, A., Kellner, C., Staudinger, M., Dechant, M., Stauch, M., Beurskens, F.J., Parren, P.W.H.I., Winkel, J.G.J. van de, Valerius, T., Humpe, A., Repp, R., Gramatzki, M., Nimmerjahn, F., Peipp, M., 2013. The novel tribody [(CD20)(2)xCD16] efficiently triggers effector cell-mediated lysis of malignant B cells. *Leukemia* 27, 190–201. <https://doi.org/10.1038/leu.2012.150>
- Gonen-Gross, T., Gazit, R., Achdout, H., Hanna, J., Mizrahi, S., Markel, G., Horejsí, V., Mandelboim, O., 2003. Special organization of the HLA-G protein on the cell surface. *Hum Immunol* 64, 1011–1016. <https://doi.org/10.1016/j.humimm.2003.08.355>
- Goodier, M.R., Jonjić, S., Riley, E.M., Lisnić, V.J., 2018. CMV and natural killer cells: shaping the response to vaccination. *European Journal of Immunology* 48, 50–65. <https://doi.org/10.1002/eji.201646762>
- Goodridge, J.P., Lee, N., Burian, A., Pyo, C.-W., Tykodi, S.S., Warren, E.H., Yee, C., Riddell, S.R., Geraghty, D.E., 2013. HLA-F and MHC-I open conformers cooperate in a MHC-I antigen cross-presentation pathway. *J Immunol* 191, 1567–1577. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1300080>

- Goodridge, J.P., Önfelt, B., Malmberg, K.-J., 2015. Newtonian cell interactions shape natural killer cell education. *Immunological Reviews* 267, 197–213. <https://doi.org/10.1111/imr.12325>
- Graef, T., Moesta, A.K., Norman, P.J., Abi-Rached, L., Vago, L., Older Aguilar, A.M., Gleimer, M., Hammond, J.A., Guethlein, L.A., Bushnell, D.A., Robinson, P.J., Parham, P., 2009. KIR2DS4 is a product of gene conversion with KIR3DL2 that introduced specificity for HLA-A*11 while diminishing avidity for HLA-C. *J Exp Med* 206, 2557–2572. <https://doi.org/10.1084/jem.20091010>
- Gragert, L., Eapen, M., Williams, E., Freeman, J., Spellman, S., Baitty, R., Hartzman, R., Rizzo, J.D., Horowitz, M., Confer, D., Maiers, M., 2014. HLA match likelihoods for hematopoietic stem-cell grafts in the U.S. registry. *N Engl J Med* 371, 339–348. <https://doi.org/10.1056/NEJMsa1311707>
- Granzin, M., Wagner, J., Köhl, U., Cerwenka, A., Huppert, V., Ullrich, E., 2017. Shaping of Natural Killer Cell Antitumor Activity by Ex Vivo Cultivation. *Front Immunol* 8. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.00458>
- Green, M.L., Leisenring, W.M., Xie, H., Walter, R.B., Mielcarek, M., Sandmaier, B.M., Riddell, S.R., Boeckh, M., 2013. CMV reactivation after allogeneic HCT and relapse risk: evidence for early protection in acute myeloid leukemia. *Blood* 122, 1316–1324. <https://doi.org/10.1182/blood-2013-02-487074>
- Groh, V., Wu, J., Yee, C., Spies, T., 2002. Tumour-derived soluble MIC ligands impair expression of NKG2D and T-cell activation. *Nature* 419, 734–738. <https://doi.org/10.1038/nature01112>
- Gross, C.C., Ahmetspahic, D., Ruck, T., Schulte-Mecklenbeck, A., Schwarte, K., Jörgens, S., Scheu, S., Windhagen, S., Graefe, B., Melzer, N., Klotz, L., Arolt, V., Wiendl, H., Meuth, S.G., Alferink, J., 2016. Alemtuzumab treatment alters circulating innate immune cells in multiple sclerosis. *Neurol Neuroimmunol Neuroinflamm* 3, e289. <https://doi.org/10.1212/NXI.0000000000000289>
- Guethlein, L.A., Norman, P.J., Hilton, H.G., Parham, P., 2015. Co-evolution of MHC class I and variable NK cell receptors in placental mammals. *Immunological Reviews* 267, 259–282. <https://doi.org/10.1111/imr.12326>
- Gumá, M., Angulo, A., Vilches, C., Gómez-Lozano, N., Malats, N., López-Botet, M., 2004. Imprint of human cytomegalovirus infection on the NK cell receptor repertoire. *Blood* 104, 3664–3671. <https://doi.org/10.1182/blood-2004-05-2058>
- Gumá, M., Budt, M., Sáez, A., Brckalo, T., Hengel, H., Angulo, A., López-Botet, M., 2006. Expansion of CD94/NKG2C+ NK cells in response to human cytomegalovirus-infected fibroblasts. *Blood* 107, 3624–3631. <https://doi.org/10.1182/blood-2005-09-3682>
- Gur, C., Porgador, A., Elboim, M., Gazit, R., Mizrahi, S., Stern-Ginossar, N., Achdout, H., Ghadially, H., Dor, Y., Nir, T., Doviner, V., Hershkovitz, O., Mendelson, M., Naparstek, Y., Mandelboim, O., 2010. The activating receptor NKp46 is essential for the development of type 1 diabetes. *Nat Immunol* 11, 121–128. <https://doi.org/10.1038/ni.1834>
- Hadadi, L., Hafezi, M., Amirzargar, A.A., Sharifian, R.A., Abediankenari, S., Asgarian-Omran, H., 2019. Dysregulated Expression of Tim-3 and NKp30 Receptors on NK Cells of Patients with Chronic Lymphocytic Leukemia. *Oncol Res Treat* 42, 202–208. <https://doi.org/10.1159/000497208>
- Halenius, A., Gerke, C., Hengel, H., 2015. Classical and non-classical MHC I molecule manipulation by human cytomegalovirus: so many targets—but how many arrows in the quiver? *Cell Mol Immunol* 12, 139–153. <https://doi.org/10.1038/cmi.2014.105>
- Halfteck, G.G., Elboim, M., Gur, C., Achdout, H., Ghadially, H., Mandelboim, O., 2009. Enhanced in vivo growth of lymphoma tumors in the absence of the NK-activating receptor NKp46/NCR1. *J Immunol* 182, 2221–2230. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.0801878>
- Hammer, Q., Rückert, T., Borst, E.M., Dunst, J., Haubner, A., Durek, P., Heinrich, F., Gasparoni, G., Babic, M., Tomic, A., Pietra, G., Nienen, M., Blau, I.W., Hofmann, J., Na, I.-K., Prinz, I., Koenecke, C., Hemmati, P., Babel, N., Arnold, R., Walter, J., Thurley, K., Mashreghi, M.-F., Messerle, M., Romagnani, C., 2018. Peptide-specific recognition of human cytomegalovirus

- strains controls adaptive natural killer cells. *Nat Immunol* 19, 453–463. <https://doi.org/10.1038/s41590-018-0082-6>
- Hart, O.M., Athie-Morales, V., O'Connor, G.M., Gardiner, C.M., 2005. TLR7/8-mediated activation of human NK cells results in accessory cell-dependent IFN-gamma production. *J Immunol* 175, 1636–1642. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.175.3.1636>
- Heatley, S.L., Pietra, G., Lin, J., Widjaja, J.M.L., Harpur, C.M., Lester, S., Rossjohn, J., Szer, J., Schwarer, A., Bradstock, K., Bardy, P.G., Mingari, M.C., Moretta, L., Sullivan, L.C., Brooks, A.G., 2013. Polymorphism in human cytomegalovirus UL40 impacts on recognition of human leukocyte antigen-E (HLA-E) by natural killer cells. *J Biol Chem* 288, 8679–8690. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.409672>
- Hedlund, M., Stenqvist, A.-C., Nagaeva, O., Kjellberg, L., Wulff, M., Baranov, V., Mincheva-Nilsson, L., 2009. Human placenta expresses and secretes NKG2D ligands via exosomes that down-modulate the cognate receptor expression: evidence for immunosuppressive function. *J Immunol* 183, 340–351. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.0803477>
- 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., Morgan, L., Tower, C., Regan, L., Moore, G.E., Carrington, M., Moffett, A., 2010. Maternal activating KIRs protect against human reproductive failure mediated by fetal HLA-C2. *J Clin Invest* 120, 4102–4110. <https://doi.org/10.1172/JCI43998>
- Hiby, S.E., Regan, L., Lo, W., Farrell, L., Carrington, M., Moffett, A., 2008. Association of maternal killer-cell immunoglobulin-like receptors and parental HLA-C genotypes with recurrent miscarriage. *Hum Reprod* 23, 972–976. <https://doi.org/10.1093/humrep/den011>
- Higuchi, M., Asao, H., Tanaka, N., Oda, K., Takeshita, T., Sugamura, K., 1997. Regulation of IL-2 signaling. *Leukemia* 11 Suppl 3, 416–417.
- Hilpert, J., Grosse-Hovest, L., Grünebach, F., Buechele, C., Nuebling, T., Raum, T., Steinle, A., Salih, H.R., 2012. Comprehensive analysis of NKG2D ligand expression and release in leukemia: implications for NKG2D-mediated NK cell responses. *J Immunol* 189, 1360–1371. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1200796>
- Hilton, H.G., Guethlein, L.A., Goyos, A., Nemat-Gorgani, N., Bushnell, D.A., Norman, P.J., Parham, P., 2015. Polymorphic HLA-C Receptors Balance the Functional Characteristics of KIR Haplotypes. *The Journal of Immunology* 195, 3160–3170. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1501358>
- Hilton, H.G., McMurtrey, C.P., Han, A.S., Djaoud, Z., Guethlein, L.A., Blokhuis, J.H., Pugh, J.L., Goyos, A., Horowitz, A., Buchli, R., Jackson, K.W., Bardet, W., Bushnell, D.A., Robinson, P.J., Mendoza, J.L., Birnbaum, M.E., Nielsen, M., Garcia, K.C., Hildebrand, W.H., Parham, P., 2017. The Intergenic Recombinant HLA-B*46:01 Has a Distinctive Peptidome that Includes KIR2DL3 Ligands. *Cell Rep* 19, 1394–1405. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2017.04.059>
- Hodgins, J.J., Khan, S.T., Park, M.M., Auer, R.C., Ardolino, M., 2019. Killers 2.0: NK cell therapies at the forefront of cancer control [WWW Document]. <https://doi.org/10.1172/JCI129338>
- Hollenbach, J.A., Ladner, M.B., Saeteurn, K., Taylor, K.D., Mei, L., Haritunians, T., McGovern, D.P.B., Erlich, H.A., Rotter, J.I., Trachtenberg, E.A., 2009. Susceptibility to Crohn's disease is mediated by KIR2DL2/KIR2DL3 heterozygosity and the HLA-C ligand. *Immunogenetics* 61, 663–671. <https://doi.org/10.1007/s00251-009-0396-5>
- Horowitz, A., Stegmann, K.A., Riley, E.M., 2011. Activation of natural killer cells during microbial infections. *Front Immunol* 2, 88. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2011.00088>
- Horton, R.E., McLaren, P.J., Fowke, K., Kimani, J., Ball, T.B., 2010. Cohorts for the study of HIV-1-exposed but uninfected individuals: benefits and limitations. *J Infect Dis* 202 Suppl 3, S377–381. <https://doi.org/10.1086/655971>
- Hoster, E., Pott, C., 2016. Minimal residual disease in mantle cell lymphoma: insights into biology and impact on treatment. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 2016, 437–445. <https://doi.org/10.1182/asheducation-2016.1.437>
- Hsu, K.C., Chida, S., Geraghty, D.E., Dupont, B., 2002. The killer cell immunoglobulin-like receptor (KIR) genomic region: gene-order, haplotypes and allelic polymorphism. *Immunological Reviews* 190, 40–52. <https://doi.org/10.1034/j.1600-065X.2002.19004.x>

- Huang, X.-J., Zhao, X.-Y., Liu, D.-H., Liu, K.-Y., Xu, L.-P., 2007. Deleterious effects of KIR ligand incompatibility on clinical outcomes in haploidentical hematopoietic stem cell transplantation without in vitro T-cell depletion. *Leukemia* 21, 848–851. <https://doi.org/10.1038/sj.leu.2404566>
- Huang, Y.-H., Zhu, C., Kondo, Y., Anderson, A.C., Gandhi, A., Russell, A., Dougan, S.K., Petersen, B.-S., Melum, E., Pertel, T., Clayton, K.L., Raab, M., Chen, Q., Beauchemin, N., Yazaki, P.J., Pyzik, M., Ostrowski, M.A., Glickman, J.N., Rudd, C.E., Ploegh, H.L., Franke, A., Petsko, G.A., Kuchroo, V.K., Blumberg, R.S., 2015. CEACAM1 regulates TIM-3-mediated tolerance and exhaustion. *Nature* 517, 386–390. <https://doi.org/10.1038/nature13848>
- Humann, J., Lenz, L.L., 2010. Activation of naive NK cells in response to *Listeria monocytogenes* requires IL-18 and contact with infected dendritic cells. *J Immunol* 184, 5172–5178. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.0903759>
- Iannello, A., Thompson, T.W., Ardolino, M., Marcus, A., Raulet, D.H., 2016. Immunosurveillance and immunotherapy of tumors by innate immune cells. *Current Opinion in Immunology* 38, 52–58. <https://doi.org/10.1016/j.coi.2015.11.001>
- Iguchi-Manaka, A., Kai, H., Yamashita, Y., Shibata, K., Tahara-Hanaoka, S., Honda, S., Yasui, T., Kikutani, H., Shibuya, K., Shibuya, A., 2008. Accelerated tumor growth in mice deficient in DNAM-1 receptor. *J Exp Med* 205, 2959–2964. <https://doi.org/10.1084/jem.20081611>
- Ikeda, H., Old, L.J., Schreiber, R.D., 2002. The roles of IFN gamma in protection against tumor development and cancer immunoediting. *Cytokine Growth Factor Rev* 13, 95–109. [https://doi.org/10.1016/s1359-6101\(01\)00038-7](https://doi.org/10.1016/s1359-6101(01)00038-7)
- Iwasaki, A., Medzhitov, R., 2010. Regulation of Adaptive Immunity by the Innate Immune System. *Science* 327, 291–295. <https://doi.org/10.1126/science.1183021>
- Jacquemin, G., Margiotta, D., Kasahara, A., Bassoy, E.Y., Walch, M., Thiery, J., Lieberman, J., Martinvalet, D., 2015. Granzyme B-induced mitochondrial ROS are required for apoptosis. *Cell Death Differ* 22, 862–874. <https://doi.org/10.1038/cdd.2014.180>
- Jacquemont, L., Tilly, G., Yap, M., Doan-Ngoc, T.-M., Danger, R., Guérif, P., Delbos, F., Martinet, B., Giral, M., Foucher, Y., Brouard, S., Degauque, N., 2020. Terminally Differentiated Effector Memory CD8+ T Cells Identify Kidney Transplant Recipients at High Risk of Graft Failure. *J Am Soc Nephrol* 31, 876–891. <https://doi.org/10.1681/ASN.2019080847>
- Jamieson, A.M., Diefenbach, A., McMahan, C.W., Xiong, N., Carlyle, J.R., Raulet, D.H., 2002. The role of the NKG2D immunoreceptor in immune cell activation and natural killing. *Immunity* 17, 19–29. [https://doi.org/10.1016/s1074-7613\(02\)00333-3](https://doi.org/10.1016/s1074-7613(02)00333-3)
- Jiang, W., Chai, N.R., Maric, D., Bielekova, B., 2011. Unexpected role for granzyme K in CD56bright NK cell-mediated immunoregulation of multiple sclerosis. *J Immunol* 187, 781–790. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1100789>
- Johansson, S.E., Rollman, E., Chung, A.W., Center, R.J., Hejdeman, B., Stratov, I., Hinkula, J., Wahren, B., Kärre, K., Kent, S.J., Berg, L., 2011. NK cell function and antibodies mediating ADCC in HIV-1-infected viremic and controller patients. *Viral Immunol* 24, 359–368. <https://doi.org/10.1089/vim.2011.0025>
- Joller, N., Hafler, J.P., Brynedal, B., Kassam, N., Spoerl, S., Levin, S.D., Sharpe, A.H., Kuchroo, V.K., 2011. Cutting edge: TIGIT has T cell-intrinsic inhibitory functions. *J Immunol* 186, 1338–1342. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1003081>
- Joller, N., Kuchroo, V.K., 2017. Tim-3, Lag-3, and TIGIT. *Curr Top Microbiol Immunol* 410, 127–156. https://doi.org/10.1007/82_2017_62
- Joncker, N.T., Fernandez, N.C., Treiner, E., Vivier, E., Raulet, D.H., 2009. NK cell responsiveness is tuned commensurate with the number of inhibitory receptors for self-MHC class I: the rheostat model. *J Immunol* 182, 4572–4580. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.0803900>
- Jones, D.C., Edgar, R.S., Ahmad, T., Cummings, J.R.F., Jewell, D.P., Trowsdale, J., Young, N.T., 2006. Killer Ig-like receptor (KIR) genotype and HLA ligand combinations in ulcerative colitis susceptibility. *Genes Immun* 7, 576–582. <https://doi.org/10.1038/sj.gene.6364333>

- Jones, D.C., Kosmoliaptsis, V., Apps, R., Lapaque, N., Smith, I., Kono, A., Chang, C., Boyle, L.H., Taylor, C.J., Trowsdale, J., Allen, R.L., 2011. HLA class I allelic sequence and conformation regulate leukocyte Ig-like receptor binding. *J Immunol* 186, 2990–2997. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1003078>
- Jonjić, S., Babić, M., Polić, B., Krmpotić, A., 2008. Immune evasion of natural killer cells by viruses. *Curr Opin Immunol* 20, 30–38. <https://doi.org/10.1016/j.coi.2007.11.002>
- Kaiser, B.K., Yim, D., Chow, I.-T., Gonzalez, S., Dai, Z., Mann, H.H., Strong, R.K., Groh, V., Spies, T., 2007. Disulphide-isomerase-enabled shedding of tumour-associated NKG2D ligands. *Nature* 447, 482–486. <https://doi.org/10.1038/nature05768>
- Kärre, K., 1991. MHC gene control of the natural killer system at the level of the target and the host. *Semin. Cancer Biol.* 2, 295–309.
- Kärre, K., Ljunggren, H.G., Piontek, G., Kiessling, R., 2005. Selective rejection of H-2-deficient lymphoma variants suggests alternative immune defence strategy. 1986. *J Immunol* 174, 6566–6569.
- Kärre, K., Ljunggren, H.G., Piontek, G., Kiessling, R., 1986. Selective rejection of H-2-deficient lymphoma variants suggests alternative immune defence strategy. *Nature* 319, 675–678. <https://doi.org/10.1038/319675a0>
- Katz, G., Krummey, S.M., Larsen, S.E., Stinson, J.R., Snow, A.L., 2014. SAP facilitates recruitment and activation of LCK at NTB-A receptors during restimulation-induced cell death. *J Immunol* 192, 4202–4209. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1303070>
- Kellner, C., Maurer, T., Hallack, D., Repp, R., van de Winkel, J.G.J., Parren, P.W.H.I., Valerius, T., Humpe, A., Gramatzki, M., Peipp, M., 2012. Mimicking an induced self phenotype by coating lymphomas with the NKp30 ligand B7-H6 promotes NK cell cytotoxicity. *J Immunol* 189, 5037–5046. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1201321>
- Kennedy, M.K., Glaccum, M., Brown, S.N., Butz, E.A., Viney, J.L., Embers, M., Matsuki, N., Charrier, K., Sedger, L., Willis, C.R., Brasel, K., Morrissey, P.J., Stocking, K., Schuh, J.C., Joyce, S., Peschon, J.J., 2000. Reversible defects in natural killer and memory CD8 T cell lineages in interleukin 15-deficient mice. *J Exp Med* 191, 771–780. <https://doi.org/10.1084/jem.191.5.771>
- Khaddour, K., Hana, C.K., Mewawalla, P., 2020. Hematopoietic Stem Cell Transplantation (Bone Marrow Transplant), in: *StatPearls*. StatPearls Publishing, Treasure Island (FL).
- Khaznadar, Z., Boissel, N., Agaagué, S., Henry, G., Cheok, M., Vignon, M., Geromin, D., Cayuela, J.-M., Castaigne, S., Pautas, C., Raffoux, E., Lachuer, J., Sigaux, F., Preudhomme, C., Dombret, H., Dulphy, N., Toubert, A., 2015. Defective NK Cells in Acute Myeloid Leukemia Patients at Diagnosis Are Associated with Blast Transcriptional Signatures of Immune Evasion. *J Immunol* 195, 2580–2590. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1500262>
- Khaznadar, Z., Henry, G., Setterblad, N., Agaague, S., Raffoux, E., Boissel, N., Dombret, H., Toubert, A., Dulphy, N., 2014. Acute myeloid leukemia impairs natural killer cells through the formation of a deficient cytotoxic immunological synapse. *Eur J Immunol* 44, 3068–3080. <https://doi.org/10.1002/eji.201444500>
- Kiessling, R., Klein, E., Wigzell, H., 1975. „Natural” killer cells in the mouse. I. Cytotoxic cells with specificity for mouse Moloney leukemia cells. Specificity and distribution according to genotype. *European Journal of Immunology* 5, 112–117. <https://doi.org/10.1002/eji.1830050208>
- Kim, H.S., Das, A., Gross, C.C., Bryceson, Y.T., Long, E.O., 2010. Synergistic signals for natural cytotoxicity are required to overcome inhibition by c-Cbl ubiquitin ligase. *Immunity* 32, 175–186. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2010.02.004>
- Kim, R., Emi, M., Tanabe, K., 2006. Cancer immunosuppression and autoimmune disease: beyond immunosuppressive networks for tumour immunity. *Immunology* 119, 254–264. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2567.2006.02430.x>
- Kim, S., Poursine-Laurent, J., Truscott, S.M., Lybarger, L., Song, Y.-J., Yang, L., French, A.R., Sunwoo, J.B., Lemieux, S., Hansen, T.H., Yokoyama, W.M., 2005. Licensing of natural killer cells by host

- major histocompatibility complex class I molecules. *Nature* 436, 709–713. <https://doi.org/10.1038/nature03847>
- King, A., Hiby, S.E., Gardner, L., Joseph, S., Bowen, J.M., Verma, S., Burrows, T.D., Loke, Y.W., 2000. Recognition of trophoblast HLA class I molecules by decidual NK cell receptors--a review. *Placenta* 21 Suppl A, S81-85. <https://doi.org/10.1053/plac.1999.0520>
- Klein Wolterink, R.G.J., Hendriks, R.W., 2013. Type 2 innate lymphocytes in allergic airway inflammation. *Curr Allergy Asthma Rep* 13, 271–280. <https://doi.org/10.1007/s11882-013-0346-z>
- Klezovich-Bénard, M., Corre, J.-P., Jusforgues-Saklani, H., Fiole, D., Burjek, N., Tournier, J.-N., Goossens, P.L., 2012. Mechanisms of NK cell-macrophage *Bacillus anthracis* crosstalk: a balance between stimulation by spores and differential disruption by toxins. *PLoS Pathog* 8, e1002481. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002481>
- Kohrt, H.E., Houot, R., Marabelle, A., Cho, H.J., Osman, K., Goldstein, M., Levy, R., Brody, J., 2012. Combination strategies to enhance antitumor ADCC. *Immunotherapy* 4, 511–527. <https://doi.org/10.2217/imt.12.38>
- Kohrt, H.E., Thielens, A., Marabelle, A., Sagiv-Barfi, I., Sola, C., Chanuc, F., Fuseri, N., Bonnafous, C., Czerwinski, D., Rajapaksa, A., Waller, E., Ugolini, S., Vivier, E., Romagne, F., Levy, R., Blery, M., Andre, P., 2014. Anti-KIR antibody enhancement of anti-lymphoma activity of natural killer cells as monotherapy and in combination with anti-CD20 antibodies. *Blood* 123, 678–686. <https://doi.org/10.1182/blood-2013-08-519199>
- Laffont, S., Seillet, C., Ortaldo, J., Coudert, J.D., Guéry, J.-C., 2008. Natural killer cells recruited into lymph nodes inhibit alloreactive T-cell activation through perforin-mediated killing of donor allogeneic dendritic cells. *Blood* 112, 661–671. <https://doi.org/10.1182/blood-2007-10-120089>
- Lafont, V., Liautard, J., Liautard, J.P., Favero, J., 2001. Production of TNF-alpha by human V gamma 9V delta 2 T cells via engagement of Fc gamma RIIIA, the low affinity type 3 receptor for the Fc portion of IgG, expressed upon TCR activation by nonpeptidic antigen. *J Immunol* 166, 7190–7199. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.166.12.7190>
- Lajoie, L., Congy-Jolivet, N., Bolzec, A., Gouilleux-Gruart, V., Sicard, E., Sung, H.C., Peiretti, F., Moreau, T., Vié, H., Clémenceau, B., Thibault, G., 2014. ADAM17-mediated shedding of FcγRIIIA on human NK cells: identification of the cleavage site and relationship with activation. *J Immunol* 192, 741–751. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1301024>
- Lakshmikanth, T., Burke, S., Ali, T.H., Kimpfler, S., Ursini, F., Ruggeri, L., Capanni, M., Umansky, V., Paschen, A., Sucker, A., Pende, D., Groh, V., Biassoni, R., Höglund, P., Kato, M., Shibuya, K., Schadendorf, D., Anichini, A., Ferrone, S., Velardi, A., Kärre, K., Shibuya, A., Carbone, E., Colucci, F., 2009. NCRs and DNAM-1 mediate NK cell recognition and lysis of human and mouse melanoma cell lines in vitro and in vivo. *J Clin Invest* 119, 1251–1263. <https://doi.org/10.1172/JCI36022>
- Lanier, L.L., 2015. NKG2D receptor and its ligands in host defense. *Cancer Immunol Res* 3, 575–582. <https://doi.org/10.1158/2326-6066.CIR-15-0098>
- Lanier, L.L., 2008. Up on the tightrope: natural killer cell activation and inhibition. *Nat Immunol* 9, 495–502. <https://doi.org/10.1038/ni1581>
- Lanier, L.L., 2005. NK cell recognition. *Annu Rev Immunol* 23, 225–274. <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.23.021704.115526>
- Lanier, L.L., 1998. NK cell receptors. *Annu Rev Immunol* 16, 359–393. <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.16.1.359>
- Leibson, P.J., 1997. Signal Transduction during Natural Killer Cell Activation: Inside the Mind of a Killer. *Immunity* 6, 655–661. [https://doi.org/10.1016/S1074-7613\(00\)80441-0](https://doi.org/10.1016/S1074-7613(00)80441-0)
- Levin, S.D., Taft, D.W., Brandt, C.S., Bucher, C., Howard, E.D., Chadwick, E.M., Johnston, J., Hammond, A., Bontadelli, K., Ardourel, D., Hebb, L., Wolf, A., Bukowski, T.R., Rixon, M.W., Kuijper, J.L., Ostrander, C.D., West, J.W., Bilsborough, J., Fox, B., Gao, Z., Xu, W., Ramsdell, F., Blazar, B.R.,

- Lewis, K.E., 2011. Vstm3 is a member of the CD28 family and an important modulator of T-cell function. *Eur J Immunol* 41, 902–915. <https://doi.org/10.1002/eji.201041136>
- Levy, E.M., Bianchini, M., Von Euw, E.M., Barrio, M.M., Bravo, A.I., Furman, D., Domenichini, E., Macagno, C., Pinsky, V., Zucchini, C., Valvassori, L., Mordoh, J., 2008. Human leukocyte antigen-E protein is overexpressed in primary human colorectal cancer. *Int J Oncol* 32, 633–641.
- Lieberman, J., Fan, Z., 2003. Nuclear war: the granzyme A-bomb. *Curr Opin Immunol* 15, 553–559. [https://doi.org/10.1016/s0952-7915\(03\)00108-0](https://doi.org/10.1016/s0952-7915(03)00108-0)
- Lisovsky, I., Isitman, G., Song, R., DaFonseca, S., Tremblay-McLean, A., Lebouché, B., Routy, J.-P., Bruneau, J., Bernard, N.F., 2015. A Higher Frequency of NKG2A+ than of NKG2A- NK Cells Responds to Autologous HIV-Infected CD4 Cells irrespective of Whether or Not They Coexpress KIR3DL1. *J Virol* 89, 9909–9919. <https://doi.org/10.1128/JVI.01546-15>
- Lisovsky, I., Kant, S., Tremblay-McLean, A., Isitman, G., Kiani, Z., Dupuy, F.P., Gilbert, L., Bruneau, J., Shoukry, N.H., Lebouché, B., Bernard, N.F., 2019. Differential contribution of education through KIR2DL1, KIR2DL3, and KIR3DL1 to antibody-dependent (AD) NK cell activation and ADCC. *J Leukoc Biol* 105, 551–563. <https://doi.org/10.1002/JLB.4A0617-242RRR>
- Liu, D.-H., Liu, K.-Y., Xu, L.-P., Han, W., Chen, H., Chen, Y.-H., Zhang, X.-H., Huang, X.-J., 2008. [Donor lymphocyte infusion for treatment of relapse of leukemia after HLA-mismatched hematopoietic stem cell transplantation]. *Zhonghua Xue Ye Xue Za Zhi* 29, 78–82.
- Liu, E., Marin, D., Banerjee, P., Macapinlac, H.A., Thompson, P., Basar, R., Kerbauy, L.N., Overman, B., Thall, P., Kaplan, M., Nandivada, V., Kaur, I., Cortes, A.N., Cao, K., Daher, M., Hosing, C., Cohen, E.N., Kebriaei, P., Mehta, R., Neelapu, S., Nieto, Y., Wang, M., Wierda, W., Keating, M., Champlin, R., Shpall, E.J., Rezvani, K., 2020. Use of CAR-Transduced Natural Killer Cells in CD19-Positive Lymphoid Tumors. *New England Journal of Medicine*. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1910607>
- Liu, J., Xiao, Z., Ko, H.L., Shen, M., Ren, E.C., 2014. Activating killer cell immunoglobulin-like receptor 2DS2 binds to HLA-A*11. *Proc Natl Acad Sci U S A* 111, 2662–2667. <https://doi.org/10.1073/pnas.1322052111>
- Ljunggren, H.G., Kärre, K., 1990. In search of the “missing self”: MHC molecules and NK cell recognition. *Immunol Today* 11, 237–244. [https://doi.org/10.1016/0167-5699\(90\)90097-s](https://doi.org/10.1016/0167-5699(90)90097-s)
- Locatelli, F., Moretta, F., Brescia, L., Merli, P., 2014. Natural killer cells in the treatment of high-risk acute leukaemia. *Seminars in Immunology, New vistas on NK cell development and function* 26, 173–179. <https://doi.org/10.1016/j.smim.2014.02.004>
- Locatelli, F., Pende, D., Mingari, M.C., Bertaina, A., Falco, M., Moretta, A., Moretta, L., 2013. Cellular and molecular basis of haploidentical hematopoietic stem cell transplantation in the successful treatment of high-risk leukemias: role of alloreactive NK cells. *Front. Immun.* 4. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2013.00015>
- Long, E.O., Kim, H.S., Liu, D., Peterson, M.E., Rajagopalan, S., 2013. Controlling natural killer cell responses: integration of signals for activation and inhibition. *Annu Rev Immunol* 31, 227–258. <https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-020711-075005>
- López-Botet, M., Bellón, T., 1999. Natural killer cell activation and inhibition by receptors for MHC class I. *Curr Opin Immunol* 11, 301–307. [https://doi.org/10.1016/s0952-7915\(99\)80048-x](https://doi.org/10.1016/s0952-7915(99)80048-x)
- Lopez-Vergès, S., Milush, J.M., Pandey, S., York, V.A., Arakawa-Hoyt, J., Pircher, H., Norris, P.J., Nixon, D.F., Lanier, L.L., 2010. CD57 defines a functionally distinct population of mature NK cells in the human CD56dimCD16+ NK-cell subset. *Blood* 116, 3865–3874. <https://doi.org/10.1182/blood-2010-04-282301>
- Lopez-Verges, S., Milush, J.M., Schwartz, B.S., Pando, M.J., Jarjoura, J., York, V.A., Houchins, J.P., Miller, S., Kang, S.-M., Norris, P.J., Nixon, D.F., Lanier, L.L., 2011. Expansion of a unique CD57+NKG2Chi natural killer cell subset during acute human cytomegalovirus infection. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 108, 14725–14732. <https://doi.org/10.1073/pnas.1110900108>

- Lopez-Vergès, S., Milush, J.M., Schwartz, B.S., Pando, M.J., Jarjoura, J., York, V.A., Houchins, J.P., Miller, S., Kang, S.-M., Norris, P.J., Nixon, D.F., Lanier, L.L., 2011. Expansion of a unique CD57⁺NKG2Chi natural killer cell subset during acute human cytomegalovirus infection. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108, 14725–14732. <https://doi.org/10.1073/pnas.1110900108>
- Lugli, E., Hudspeth, K., Roberto, A., Mavilio, D., 2016. Tissue-resident and memory properties of human T-cell and NK-cell subsets. *Eur J Immunol* 46, 1809–1817. <https://doi.org/10.1002/eji.201545702>
- Luhm, J., Brand, J.-M., Koritke, P., Höppner, M., Kirchner, H., Frohn, C., 2002. Large-scale generation of natural killer lymphocytes for clinical application. *J Hematother Stem Cell Res* 11, 651–657. <https://doi.org/10.1089/15258160260194794>
- Lusty, E., Poznanski, S.M., Kwofie, K., Mandur, T.S., Lee, D.A., Richards, C.D., Ashkar, A.A., 2017. IL-18/IL-15/IL-12 synergy induces elevated and prolonged IFN- γ production by ex vivo expanded NK cells which is not due to enhanced STAT4 activation. *Mol Immunol* 88, 138–147. <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2017.06.025>
- 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., Huff, C.A., Matsui, W., Bolaños-Meade, J., Borrello, I., Powell, J.D., Harrington, E., Warnock, S., Flowers, M., Brodsky, R.A., Sandmaier, B.M., Storb, R.F., Jones, R.J., Fuchs, E.J., 2008. HLA-Haploidentical Bone Marrow Transplantation for Hematologic Malignancies Using Nonmyeloablative Conditioning and High-Dose, Posttransplantation Cyclophosphamide. *Biol Blood Marrow Transplant* 14, 641–650. <https://doi.org/10.1016/j.bbmt.2008.03.005>
- Mahaweni, N.M., Ehlers, F.A.I., Bos, G.M.J., Wieten, L., 2018. Tuning Natural Killer Cell Anti-multiple Myeloma Reactivity by Targeting Inhibitory Signaling via KIR and NKG2A. *Front Immunol* 9, 2848. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.02848>
- Male, V., Trundley, A., Gardner, L., Northfield, J., Chang, C., Apps, R., Moffett, A., 2010. Natural killer cells in human pregnancy. *Methods Mol Biol* 612, 447–463. https://doi.org/10.1007/978-1-60761-362-6_30
- Manches, O., Lui, G., Chaperot, L., Gressin, R., Molens, J.-P., Jacob, M.-C., Sotto, J.-J., Leroux, D., Bensa, J.-C., Plumas, J., 2003. In vitro mechanisms of action of rituximab on primary non-Hodgkin lymphomas. *Blood* 101, 949–954. <https://doi.org/10.1182/blood-2002-02-0469>
- Mancusi, A., Ruggeri, L., Velardi, A., 2016. Haploidentical hematopoietic transplantation for the cure of leukemia: from its biology to clinical translation. *Blood* 128, 2616–2623. <https://doi.org/10.1182/blood-2016-07-730564>
- Mandelboim, O., Reyburn, H.T., Valés-Gómez, M., Pazmany, L., Colonna, M., Borsellino, G., 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. <https://doi.org/10.1084/jem.184.3.913>
- Maniangou, B., Legrand, N., Alizadeh, M., Guyet, U., Willem, C., David, G., Charpentier, E., Walencik, A., Retière, C., Gagne, K., 2017. Killer Immunoglobulin-Like Receptor Allele Determination Using Next-Generation Sequencing Technology. *Front Immunol* 8, 547. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.00547>
- Manicklal, S., Emery, V.C., Lazzarotto, T., Boppana, S.B., Gupta, R.K., 2013. The “silent” global burden of congenital cytomegalovirus. *Clin Microbiol Rev* 26, 86–102. <https://doi.org/10.1128/CMR.00062-12>
- Manser, A.R., Weinhold, S., Uhrberg, M., 2015. Human KIR repertoires: shaped by genetic diversity and evolution. *Immunol Rev* 267, 178–196. <https://doi.org/10.1111/imr.12316>
- Marcenaro, E., Augugliaro, R., Falco, M., Castriconi, R., Parolini, S., Sivori, S., Romeo, E., Millo, R., Moretta, L., Bottino, C., Moretta, A., 2003. CD59 is physically and functionally associated with natural cytotoxicity receptors and activates human NK cell-mediated cytotoxicity. *Eur J Immunol* 33, 3367–3376. <https://doi.org/10.1002/eji.200324425>

- Martin, M.P., Gao, X., Lee, J.-H., Nelson, G.W., Detels, R., Goedert, J.J., Buchbinder, S., Hoots, K., Vlahov, D., Trowsdale, J., Wilson, M., O'Brien, S.J., Carrington, M., 2002. Epistatic interaction between KIR3DS1 and HLA-B delays the progression to AIDS. *Nat Genet* 31, 429–434. <https://doi.org/10.1038/ng934>
- Martinet, L., Smyth, M.J., 2015. Balancing natural killer cell activation through paired receptors. *Nat Rev Immunol* 15, 243–254. <https://doi.org/10.1038/nri3799>
- Mastaglio, S., Wong, E., Perera, T., Ripley, J., Blombery, P., Smyth, M.J., Koldej, R., Ritchie, D., 2018. Natural killer receptor ligand expression on acute myeloid leukemia impacts survival and relapse after chemotherapy. *Blood Adv* 2, 335–346. <https://doi.org/10.1182/bloodadvances.2017015230>
- Mathew, P.A., Garni-Wagner, B.A., Land, K., Takashima, A., Stoneman, E., Bennett, M., Kumar, V., 1993. Cloning and characterization of the 2B4 gene encoding a molecule associated with non-MHC-restricted killing mediated by activated natural killer cells and T cells. *J Immunol* 151, 5328–5337.
- Mathew, S.O., Kumaresan, P.R., Lee, J.K., Huynh, V.T., Mathew, P.A., 2005. Mutational analysis of the human 2B4 (CD244)/CD48 interaction: Lys68 and Glu70 in the V domain of 2B4 are critical for CD48 binding and functional activation of NK cells. *J Immunol* 175, 1005–1013. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.175.2.1005>
- Mathew, S.O., Rao, K.K., Kim, J.R., Bambard, N.D., Mathew, P.A., 2009. Functional role of human NK cell receptor 2B4 (CD244) isoforms. *Eur J Immunol* 39, 1632–1641. <https://doi.org/10.1002/eji.200838733>
- Matta, J., Baratin, M., Chiche, L., Forel, J.-M., Cognet, C., Thomas, G., Farnarier, C., Piperoglou, C., Papazian, L., Chaussabel, D., Ugolini, S., Vély, F., Vivier, E., 2013. Induction of B7-H6, a ligand for the natural killer cell-activating receptor Nkp30, in inflammatory conditions. *Blood* 122, 394–404. <https://doi.org/10.1182/blood-2013-01-481705>
- Matzinger, P., 2002. An Innate Sense of Danger. *Annals of the New York Academy of Sciences* 961, 341–342. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2002.tb03118.x>
- Maude, S.L., Teachey, D.T., Porter, D.L., Grupp, S.A., 2015. CD19-targeted chimeric antigen receptor T-cell therapy for acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 125, 4017–4023. <https://doi.org/10.1182/blood-2014-12-580068>
- McCurdy, S.R., Luznik, L., 2019. How we perform haploidentical stem cell transplantation with posttransplant cyclophosphamide. *Blood* 134, 1802–1810. <https://doi.org/10.1182/blood.2019001323>
- McNerney, M.E., Lee, K.-M., Kumar, V., 2005. 2B4 (CD244) is a non-MHC binding receptor with multiple functions on natural killer cells and CD8+ T cells. *Mol Immunol* 42, 489–494. <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2004.07.032>
- McWilliams, E.M., Mele, J.M., Cheney, C., Timmerman, E.A., Fiazuddin, F., Strattan, E.J., Mo, X., Byrd, J.C., Muthusamy, N., Awan, F.T., 2016. Therapeutic CD94/NKG2A blockade improves natural killer cell dysfunction in chronic lymphocytic leukemia. *Oncoimmunology* 5, e1226720. <https://doi.org/10.1080/2162402X.2016.1226720>
- Meazza, R., Azzarone, B., Orengo, A.M., Ferrini, S., 2011. Role of common-gamma chain cytokines in NK cell development and function: perspectives for immunotherapy. *J Biomed Biotechnol* 2011, 861920. <https://doi.org/10.1155/2011/861920>
- Meazza, R., Falco, M., Marcenaro, S., Loiacono, F., Canevali, P., Bellora, F., Tuberosa, C., Locatelli, F., Micalizzi, C., Moretta, A., Mingari, M.C., Moretta, L., Aricò, M., Bottino, C., Pende, D., 2017. Inhibitory 2B4 contributes to NK cell education and immunological derangements in XLP1 patients. *Eur J Immunol* 47, 1051–1061. <https://doi.org/10.1002/eji.201646885>
- Mebius, R.E., Rennert, P., Weissman, I.L., 1997. Developing lymph nodes collect CD4+CD3- LTbeta+ cells that can differentiate to APC, NK cells, and follicular cells but not T or B cells. *Immunity* 7, 493–504. [https://doi.org/10.1016/s1074-7613\(00\)80371-4](https://doi.org/10.1016/s1074-7613(00)80371-4)

- Melsen, J.E., Lugthart, G., Lankester, A.C., Schilham, M.W., 2016. Human Circulating and Tissue-Resident CD56(bright) Natural Killer Cell Populations. *Front Immunol* 7, 262. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2016.00262>
- Mentlik, A.N., Sanborn, K.B., Holzbaur, E.L., Orange, J.S., 2010. Rapid lytic granule convergence to the MTOC in natural killer cells is dependent on dynein but not cytolytic commitment. *Mol Biol Cell* 21, 2241–2256. <https://doi.org/10.1091/mbc.e09-11-0930>
- Merino, A., Zhang, B., Dougherty, P., Luo, X., Wang, J., Blazar, B.R., Miller, J.S., Cichocki, F., 2019. Chronic stimulation drives human NK cell dysfunction and epigenetic reprogramming. *J Clin Invest* 129, 3770–3785. <https://doi.org/10.1172/JCI125916>
- Milush, J.M., López-Vergès, S., York, V.A., Deeks, S.G., Martin, J.N., Hecht, F.M., Lanier, L.L., Nixon, D.F., 2013. CD56negCD16⁺ NK cells are activated mature NK cells with impaired effector function during HIV-1 infection. *Retrovirology* 10, 158. <https://doi.org/10.1186/1742-4690-10-158>
- Mincheva-Nilsson, L., Nagaeva, O., Chen, T., Stendahl, U., Antsiferova, J., Mogren, I., Hernestål, J., Baranov, V., 2006. Placenta-derived soluble MHC class I chain-related molecules down-regulate NKG2D receptor on peripheral blood mononuclear cells during human pregnancy: a possible novel immune escape mechanism for fetal survival. *J Immunol* 176, 3585–3592. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.176.6.3585>
- Mingari, M.C., Vitale, C., Schiavetti, F., Cambiaggi, A., Bertone, S., Zunino, A., Ponte, M., 1996. HLA-class I-specific inhibitory receptors of NK type on a subset of human T cells. *Chem Immunol* 64, 135–145.
- Moffett, A., Colucci, F., 2015. Co-evolution of NK receptors and HLA ligands in humans is driven by reproduction. *Immunol Rev* 267, 283–297. <https://doi.org/10.1111/imr.12323>
- Moffett, A., Colucci, F., 2014. Uterine NK cells: active regulators at the maternal-fetal interface. *J Clin Invest* 124, 1872–1879. <https://doi.org/10.1172/JCI68107>
- Mohty, M., Labopin, M., Volin, L., Gratwohl, A., Socié, G., Esteve, J., Tabrizi, R., Nagler, A., Rocha, V., Ebmt, on behalf of the A.L.W.P. of, 2010. Reduced-intensity versus conventional myeloablative conditioning allogeneic stem cell transplantation for patients with acute lymphoblastic leukemia: a retrospective study from the European Group for Blood and Marrow Transplantation. *Blood* 116, 4439–4443. <https://doi.org/10.1182/blood-2010-02-266551>
- Molfetta, R., Zitti, B., Lecce, M., Milito, N.D., Stabile, H., Fionda, C., Cippitelli, M., Gismondi, A., Santoni, A., Paolini, R., 2020. CD155: A Multi-Functional Molecule in Tumor Progression. *Int J Mol Sci* 21. <https://doi.org/10.3390/ijms21030922>
- Monsiváis-Urenda, A., Noyola-Cherpitel, D., Hernández-Salinas, A., García-Sepúlveda, C., Romo, N., Baranda, L., López-Botet, M., González-Amaro, R., 2010. Influence of human cytomegalovirus infection on the NK cell receptor repertoire in children. *Eur J Immunol* 40, 1418–1427. <https://doi.org/10.1002/eji.200939898>
- Montaldo, E., Vacca, P., Moretta, L., Mingari, M.C., 2013. Understanding human NK cell differentiation: Clues for improving the haploidentical hematopoietic stem cell transplantation. *Immunology Letters* 155, 2–5. <https://doi.org/10.1016/j.imlet.2013.09.022>
- Montaldo, E., Vitale, C., Cottalasso, F., Conte, R., Glatzer, T., Ambrosini, P., Moretta, L., Mingari, M.C., 2012. Human NK cells at early stages of differentiation produce CXCL8 and express CD161 molecule that functions as an activating receptor. *Blood* 119, 3987–3996. <https://doi.org/10.1182/blood-2011-09-379693>
- Monteverde, M., Milano, G., Strola, G., Maffi, M., Lattanzio, L., Vivenza, D., Tonissi, F., Merlano, M., Lo Nigro, C., 2015. The relevance of ADCC for EGFR targeting: A review of the literature and a clinically-applicable method of assessment in patients. *Crit Rev Oncol Hematol* 95, 179–190. <https://doi.org/10.1016/j.critrevonc.2015.02.014>
- Moon, B.-I., Kim, T.H., Seoh, J.-Y., 2015. Functional Modulation of Regulatory T Cells by IL-2. *PLoS One* 10, e0141864. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0141864>

- Morandi, B., Mortara, L., Chiossone, L., Accolla, R.S., Mingari, M.C., Moretta, L., Moretta, A., Ferlazzo, G., 2012. Dendritic Cell Editing by Activated Natural Killer Cells Results in a More Protective Cancer-Specific Immune Response. *PLoS One* 7. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0039170>
- Moretta, A., 2002. Natural killer cells and dendritic cells: rendezvous in abused tissues. *Nature Reviews Immunology* 2, 957–965. <https://doi.org/10.1038/nri956>
- Moretta, A., Biassoni, R., Bottino, C., Pende, D., Vitale, M., Poggi, A., Mingari, M.C., Moretta, L., 1997. Major histocompatibility complex class I-specific receptors on human natural killer and T lymphocytes. *Immunol Rev* 155, 105–117. <https://doi.org/10.1111/j.1600-065x.1997.tb00943.x>
- Moretta, A., Bottino, C., Vitale, M., Pende, D., Cantoni, C., Mingari, M.C., Biassoni, R., Moretta, L., 2001. Activating receptors and coreceptors involved in human natural killer cell-mediated cytotoxicity. *Annu. Rev. Immunol.* 19, 197–223. <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.19.1.197>
- Moretta, A., Sivori, S., Vitale, M., Pende, D., Morelli, L., Augugliaro, R., Bottino, C., Moretta, L., 1995. Existence of both inhibitory (p58) and activatory (p50) receptors for HLA-C molecules in human natural killer cells. *J Exp Med* 182, 875–884. <https://doi.org/10.1084/jem.182.3.875>
- Moretta, L., Moretta, A., 2004. Killer immunoglobulin-like receptors. *Curr. Opin. Immunol.* 16, 626–633. <https://doi.org/10.1016/j.coi.2004.07.010>
- Morvan, M., David, G., Sébille, V., Perrin, A., Gagne, K., Willem, C., Kerdudou, N., Denis, L., Clémenceau, B., Folléa, G., Bignon, J.-D., Retière, C., 2008. Autologous and allogeneic HLA KIR ligand environments and activating KIR control KIR NK-cell functions. *European Journal of Immunology* 38, 3474–3486. <https://doi.org/10.1002/eji.200838407>
- Morvan, M., Willem, C., Gagne, K., Kerdudou, N., David, G., Sebille, V., Follea, G., Bignon, J.-D., Retiere, C., 2009. Phenotypic and Functional Analyses of KIR3DL1+ and KIR3DS1+ NK Cell Subsets Demonstrate Differential Regulation by Bw4 Molecules and Induced KIR3DS1 Expression on Stimulated NK Cells. *The Journal of Immunology* 182, 6727–6735. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.0900212>
- Mössner, E., Brünker, P., Moser, S., Püntener, U., Schmidt, C., Herter, S., Grau, R., Gerdes, C., Nopora, A., van Puijenbroek, E., Ferrara, C., Sondermann, P., Jäger, C., Strein, P., Fertig, G., Friess, T., Schüll, C., Bauer, S., Dal Porto, J., Del Nagro, C., Dabbagh, K., Dyer, M.J.S., Poppema, S., Klein, C., Umaña, P., 2010. Increasing the efficacy of CD20 antibody therapy through the engineering of a new type II anti-CD20 antibody with enhanced direct and immune effector cell-mediated B-cell cytotoxicity. *Blood* 115, 4393–4402. <https://doi.org/10.1182/blood-2009-06-225979>
- Mueller, S.N., Mackay, L.K., 2016. Tissue-resident memory T cells: local specialists in immune defence. *Nature Reviews Immunology* 16, 79–89. <https://doi.org/10.1038/nri.2015.3>
- Naiyer, M.M., Cassidy, S.A., Magri, A., Cowton, V., Chen, K., Mansour, S., Kranidioti, H., Mbiribindi, B., Rettman, P., Harris, S., Fanning, L.J., Mulder, A., Claas, F.H.J., Davidson, A.D., Patel, A.H., Purbhoo, M.A., Khakoo, S.I., 2017. KIR2DS2 recognizes conserved peptides derived from viral helicases in the context of HLA-C. *Sci Immunol* 2. <https://doi.org/10.1126/sciimmunol.aal5296>
- Nguyen, S., Béziat, V., Roos-Weil, D., Vieillard, V., 2011. Role of natural killer cells in hematopoietic stem cell transplantation: myth or reality? *J Innate Immun* 3, 383–394. <https://doi.org/10.1159/000323935>
- Nguyen, S., Chalandon, Y., Lemarie, C., Simon, S., Masson, D., Dhedin, N., Suarez, F., Renaud, B., Charbonnier, A., Yafour, N., François, S., Duléry, R., Blaise, D., Yakoub-Agha, I., Rubio, M.-T., 2016. Greffe de cellules-souches hématopoïétiques haplo-identiques : recommandations de la Société francophone de greffe de moelle et de thérapie cellulaire (SFGM-TC). *Bulletin du Cancer, Recommandations de la Société Francophone de Greffe de Moelle et de Thérapie Cellulaire - Ateliers de Lille* 2015 103, S229–S242. <https://doi.org/10.1016/j.bulcan.2016.09.007>

- Nguyen, S., Dhedin, N., Vernant, J.-P., Kuentz, M., Jijakli, A.A., Rouas-Freiss, N., Carosella, E.D., Boudifa, A., Debré, P., Vieillard, V., 2005. NK-cell reconstitution after haploidentical hematopoietic stem-cell transplantations: immaturity of NK cells and inhibitory effect of NKG2A override GvL effect. *Blood* 105, 4135–4142. <https://doi.org/10.1182/blood-2004-10-4113>
- Niehrs, A., Garcia-Beltran, W.F., Norman, P.J., Watson, G.M., Hölzemer, A., Chapel, A., Richert, L., Pommerening-Röser, A., Körner, C., Ozawa, M., Martrus, G., Rossjohn, J., Lee, J.-H., Berry, R., Carrington, M., Altfeld, M., 2019. A subset of HLA-DP molecules serve as ligands for the natural cytotoxicity receptor NKp44. *Nat Immunol* 20, 1129–1137. <https://doi.org/10.1038/s41590-019-0448-4>
- Ochoa, M.C., Minute, L., Rodriguez, I., Garasa, S., Perez-Ruiz, E., Inogés, S., Melero, I., Berraondo, P., 2017a. Antibody-dependent cell cytotoxicity: immunotherapy strategies enhancing effector NK cells. *Immunology & Cell Biology* 95, 347–355. <https://doi.org/10.1038/icb.2017.6>
- Ochoa, M.C., Minute, L., Rodriguez, I., Garasa, S., Perez-Ruiz, E., Inogés, S., Melero, I., Berraondo, P., 2017b. Antibody-dependent cell cytotoxicity: immunotherapy strategies enhancing effector NK cells. *Immunol Cell Biol* 95, 347–355. <https://doi.org/10.1038/icb.2017.6>
- Orange, J.S., 2013. Natural killer cell deficiency. *J Allergy Clin Immunol* 132, 515–525. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2013.07.020>
- Orr, M.T., Lanier, L.L., 2010. Natural killer cell education and tolerance. *Cell* 142, 847–856. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.08.031>
- Othus, M., Appelbaum, F.R., Petersdorf, S.H., Kopecky, K.J., Slovak, M., Nevill, T., Brandwein, J., Larson, R.A., Stiff, P.J., Walter, R.B., Tallman, M.S., Stenke, L., Erba, H.P., 2015. Fate of patients with newly diagnosed acute myeloid leukemia who fail primary induction therapy. *Biol Blood Marrow Transplant* 21, 559–564. <https://doi.org/10.1016/j.bbmt.2014.10.025>
- Paczulla, A.M., Rothfelder, K., Raffel, S., Konantz, M., Steinbacher, J., Wang, H., Tandler, C., Mbarga, M., Schaefer, T., Falcone, M., Nievergall, E., Dörfel, D., Hanns, P., Passweg, J.R., Lutz, C., Schwaller, J., Zeiser, R., Blazar, B.R., Caligiuri, M.A., Dirnhofer, S., Lundberg, P., Kanz, L., Quintanilla-Martinez, L., Steinle, A., Trumpp, A., Salih, H.R., Lengerke, C., 2019. Absence of NKG2D ligands defines leukaemia stem cells and mediates their immune evasion. *Nature* 572, 254–259. <https://doi.org/10.1038/s41586-019-1410-1>
- Pai, S.-Y., Logan, B.R., Griffith, L.M., Buckley, R.H., Parrott, R.E., Dvorak, C.C., Kapoor, N., Hanson, I.C., Filipovich, A.H., Jyonouchi, S., Sullivan, K.E., Small, T.N., Burroughs, L., Skoda-Smith, S., Haight, A.E., Grizzle, A., Pulsipher, M.A., Chan, K.W., Fuleihan, R.L., Haddad, E., Loechelt, B., Aquino, V.M., Gillio, A., Davis, J., Knutsen, A., Smith, A.R., Moore, T.B., Schroeder, M.L., Goldman, F.D., Connelly, J.A., Porteus, M.H., Xiang, Q., Shearer, W.T., Fleisher, T.A., Kohn, D.B., Puck, J.M., Notarangelo, L.D., Cowan, M.J., O'Reilly, R.J., 2014. Transplantation outcomes for severe combined immunodeficiency, 2000-2009. *N Engl J Med* 371, 434–446. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1401177>
- Palm, A.-K.E., Friedrich, H.C., Mezger, A., Salomonsson, M., Myers, L.K., Kleinau, S., 2015. Function and regulation of self-reactive marginal zone B cells in autoimmune arthritis. *Cell Mol Immunol* 12, 493–504. <https://doi.org/10.1038/cmi.2015.37>
- Palmieri, G., Tullio, V., Zingoni, A., Piccoli, M., Frati, L., Lopez-Botet, M., Santoni, A., 1999. CD94/NKG2-A inhibitory complex blocks CD16-triggered Syk and extracellular regulated kinase activation, leading to cytotoxic function of human NK cells. *J Immunol* 162, 7181–7188.
- Pando, M.J., Gardiner, C.M., Gleimer, M., McQueen, K.L., Parham, P., 2003. The protein made from a common allele of KIR3DL1 (3DL1*004) is poorly expressed at cell surfaces due to substitution at positions 86 in Ig domain 0 and 182 in Ig domain 1. *J Immunol* 171, 6640–6649. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.171.12.6640>
- Paolini, R., Bernardini, G., Molfetta, R., Santoni, A., 2015. NK cells and interferons. *Cytokine Growth Factor Rev* 26, 113–120. <https://doi.org/10.1016/j.cytogfr.2014.11.003>

- Parham, P., 2015. Co-evolution of lymphocyte receptors with MHC class I. *Immunological Reviews* 267, 1–5. <https://doi.org/10.1111/imr.12338>
- Parham, P., 2005. Immunogenetics of killer cell immunoglobulin-like receptors. *Mol. Immunol.* 42, 459–462. <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2004.07.027>
- 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., Andrian, U.H. von, 2010a. Critical role for CXCR6 in NK cell-mediated antigen-specific memory to haptens and viruses. *Nature immunology* 11, 1127. <https://doi.org/10.1038/ni.1953>
- Paust, S., Senman, B., von Andrian, U.H., 2010b. Adaptive immune responses mediated by natural killer cells. *Immunol Rev* 235, 286–296. <https://doi.org/10.1111/j.0105-2896.2010.00906.x>
- Pende, D., Biassoni, R., Cantoni, C., Verdiani, S., Falco, M., di Donato, C., Accame, L., Bottino, C., Moretta, A., Moretta, L., 1996. The natural killer cell receptor specific for HLA-A allotypes: a novel member of the p58/p70 family of inhibitory receptors that is characterized by three immunoglobulin-like domains and is expressed as a 140-kD disulphide-linked dimer. *J Exp Med* 184, 505–518. <https://doi.org/10.1084/jem.184.2.505>
- Pende, D., Bottino, C., Castriconi, R., Cantoni, C., Marcenaro, S., Rivera, P., Spaggiari, G.M., Dondero, A., Carnemolla, B., Reymond, N., Mingari, M.C., Lopez, M., Moretta, L., Moretta, A., 2005a. 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. <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2004.07.028>
- Pende, D., Castriconi, R., Romagnani, P., Spaggiari, G.M., Marcenaro, S., Dondero, A., Lazzeri, E., Lasagni, L., Martini, S., Rivera, P., Capobianco, A., Moretta, L., Moretta, A., Bottino, C., 2006. Expression of the DNAM-1 ligands, Nectin-2 (CD112) and poliovirus receptor (CD155), on dendritic cells: relevance for natural killer-dendritic cell interaction. *Blood* 107, 2030–2036. <https://doi.org/10.1182/blood-2005-07-2696>
- Pende, D., Falco, M., Vitale, M., Cantoni, C., Vitale, C., Munari, E., Bertaina, A., Moretta, F., Del Zotto, G., Pietra, G., Mingari, M.C., Locatelli, F., Moretta, L., 2019. Killer Ig-Like Receptors (KIRs): Their Role in NK Cell Modulation and Developments Leading to Their Clinical Exploitation. *Front. Immunol.* 10. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.01179>
- Pende, D., Parolini, S., Pessino, A., Sivori, S., Augugliaro, R., Morelli, L., Marcenaro, E., Accame, L., Malaspina, A., Biassoni, R., Bottino, C., Moretta, L., Moretta, A., 1999. Identification and Molecular Characterization of Nkp30, a Novel Triggering Receptor Involved in Natural Cytotoxicity Mediated by Human Natural Killer Cells. *Journal of Experimental Medicine* 190, 1505–1516. <https://doi.org/10.1084/jem.190.10.1505>
- Pende, D., Spaggiari, G.M., Marcenaro, S., Martini, S., Rivera, P., Capobianco, A., Falco, M., Lanino, E., Pierri, I., Zambello, R., Bacigalupo, A., Mingari, M.C., Moretta, A., Moretta, L., 2005b. 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* 105, 2066–2073. <https://doi.org/10.1182/blood-2004-09-3548>
- Peng, H., Jiang, X., Chen, Y., Sojka, D.K., Wei, H., Gao, X., Sun, R., Yokoyama, W.M., Tian, Z., 2013. Liver-resident NK cells confer adaptive immunity in skin-contact inflammation. *J Clin Invest* 123, 1444–1456. <https://doi.org/10.1172/JCI66381>
- Pereira, B.I., Devine, O.P., Vukmanovic-Stejic, M., Chambers, E.S., Subramanian, P., Patel, N., Virasami, A., Sebire, N.J., Kinsler, V., Valdovinos, A., LeSaux, C.J., Passos, J.F., Antoniou, A., Rustin, M.H.A., Campisi, J., Akbar, A.N., 2019. Senescent cells evade immune clearance via HLA-E-mediated NK and CD8+ T cell inhibition. *Nat Commun* 10, 2387. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-10335-5>
- Perreau, M., Savoye, A.-L., De Crignis, E., Corpataux, J.-M., Cubas, R., Haddad, E.K., De Leval, L., Graziosi, C., Pantaleo, G., 2013. Follicular helper T cells serve as the major CD4 T cell compartment for HIV-1 infection, replication, and production. *J Exp Med* 210, 143–156. <https://doi.org/10.1084/jem.20121932>

- Pesce, S., Greppi, M., Grossi, F., Del Zotto, G., Moretta, L., Sivori, S., Genova, C., Marcenaro, E., 2019. PD/1-PD-Ls Checkpoint: Insight on the Potential Role of NK Cells. *Front Immunol* 10, 1242. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.01242>
- Pesce, S., Greppi, M., Tabellini, G., Rampinelli, F., Parolini, S., Olive, D., Moretta, L., Moretta, A., Marcenaro, E., 2017. Identification of a subset of human natural killer cells expressing high levels of programmed death 1: A phenotypic and functional characterization. *J Allergy Clin Immunol* 139, 335-346.e3. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2016.04.025>
- Pesce, S., Moretta, L., Moretta, A., Marcenaro, E., 2016. Human NK Cell Subsets Redistribution in Pathological Conditions: A Role for CCR7 Receptor. *Front Immunol* 7, 414. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2016.00414>
- Pfefferle, A., Jacobs, B., Netskar, H., Ask, E.H., Lorenz, S., Clancy, T., Goodridge, J.P., Sohlberg, E., Malmberg, K.-J., 2019. Intra-lineage Plasticity and Functional Reprogramming Maintain Natural Killer Cell Repertoire Diversity. *Cell Reports* 29, 2284-2294.e4. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2019.10.058>
- Pham, D.-H., Kim, J.-S., Kim, S.-K., Shin, D.-J., Uong, N.-T.-T., Hyun, H., Yoon, M.S., Kang, S.J., Ryu, Y.J., Cho, J.S., Yoon, J.H., Lee, J.S., Cho, D., Lee, S.-H., Park, M.H., 2017. Effects of ADAM10 and ADAM17 Inhibitors on Natural Killer Cell Expansion and Antibody-dependent Cellular Cytotoxicity Against Breast Cancer Cells In Vitro. *Anticancer Res* 37, 5507–5513. <https://doi.org/10.21873/anticancer.11981>
- Pietra, G., Manzini, C., Rivara, S., Vitale, M., Cantoni, C., Petretto, A., Balsamo, M., Conte, R., Benelli, R., Minghelli, S., Solari, N., Gualco, M., Queirolo, P., Moretta, L., Mingari, M.C., 2012. Melanoma cells inhibit natural killer cell function by modulating the expression of activating receptors and cytolytic activity. *Cancer Res* 72, 1407–1415. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-11-2544>
- Pisegna, S., Pirozzi, G., Piccoli, M., Frati, L., Santoni, A., Palmieri, G., 2004. p38 MAPK activation controls the TLR3-mediated up-regulation of cytotoxicity and cytokine production in human NK cells. *Blood* 104, 4157–4164. <https://doi.org/10.1182/blood-2004-05-1860>
- Pittari, G., Liu, X.-R., Selvakumar, A., Zhao, Z., Merino-Plaza, E., Huse, M., Chewing, J.H., Hsu, K.C., Dupont, B., 2013. NK cell tolerance of self-specific activating receptor KIR2DS1 in individuals with cognate HLA-C2 ligand. *J Immunol* 190, 4650–4660. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1202120>
- Poggi, A., Zocchi, M.R., 2014. NK cell autoreactivity and autoimmune diseases. *Front Immunol* 5, 27. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2014.00027>
- Ponassi, M., Cantoni, C., Biassoni, R., Conte, R., Spallarossa, A., Pesce, A., Moretta, A., Moretta, L., Bolognesi, M., Bordo, D., 2003. Structure of the human NK cell triggering receptor NKp46 ectodomain. *Biochem Biophys Res Commun* 309, 317–323. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2003.08.007>
- Rajagopalan, S., Fu, J., Long, E.O., 2001. Cutting edge: induction of IFN-gamma production but not cytotoxicity by the killer cell Ig-like receptor KIR2DL4 (CD158d) in resting NK cells. *J Immunol* 167, 1877–1881. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.167.4.1877>
- Raulet, D.H., Gasser, S., Gowen, B.G., Deng, W., Jung, H., 2013. Regulation of ligands for the NKG2D activating receptor. *Annu Rev Immunol* 31, 413–441. <https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-032712-095951>
- Raulet, D.H., Vance, R.E., 2006. Self-tolerance of natural killer cells. *Nat Rev Immunol* 6, 520–531. <https://doi.org/10.1038/nri1863>
- Ravetch, J.V., Bolland, S., 2001. IgG Fc receptors. *Annu Rev Immunol* 19, 275–290. <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.19.1.275>
- Reichmann, E., 2002. The biological role of the Fas/FasL system during tumor formation and progression. *Semin Cancer Biol* 12, 309–315. [https://doi.org/10.1016/s1044-579x\(02\)00017-2](https://doi.org/10.1016/s1044-579x(02)00017-2)
- Retière, C., Willem, C., Guillaume, T., Vié, H., Gautreau-Rolland, L., Scotet, E., Saulquin, X., Gagne, K., Béné, M.C., Imbert, B.-M., Clemenceau, B., Peterlin, P., Garnier, A., Chevallier, P., 2018.

- Impact on early outcomes and immune reconstitution of high-dose post-transplant cyclophosphamide vs anti-thymocyte globulin after reduced intensity conditioning peripheral blood stem cell allogeneic transplantation. *Oncotarget* 9, 11451–11464. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.24328>
- Rettman, P., Legrand, N., Willem, C., Lode, L., Chevallier, P., Cesbron, A., Senitzer, D., Retiere, C., Gagne, K., 2015. Use of killer cell immunoglobulin-like receptor genes as early markers of hematopoietic chimerism after double-umbilical cord blood transplantation. *Haematologica* 100, e475–e479. <https://doi.org/10.3324/haematol.2015.127993>
- Reynders, A., Yessaad, N., Vu Manh, T.-P., Dalod, M., Fenis, A., Aubry, C., Nikitas, G., Escalière, B., Renauld, J.C., Dussurget, O., Cossart, P., Lecuit, M., Vivier, E., Tomasello, E., 2011. Identity, regulation and in vivo function of gut NKp46+ROR γ t+ and NKp46+ROR γ t- lymphoid cells. *EMBO J* 30, 2934–2947. <https://doi.org/10.1038/emboj.2011.201>
- Rezvani, K., Rouce, R., Liu, E., Shpall, E., 2017. Engineering Natural Killer Cells for Cancer Immunotherapy. *Mol Ther* 25, 1769–1781. <https://doi.org/10.1016/j.ymthe.2017.06.012>
- Ribatti, D., 2017. Historical overview on the morphological characterization of large granular lymphocytes/natural killer cells. *Immunology Letters* 190, 58–63. <https://doi.org/10.1016/j.imlet.2017.07.014>
- Richard, J., Sindhu, S., Pham, T.N.Q., Belzile, J.-P., Cohen, E.A., 2010. HIV-1 Vpr up-regulates expression of ligands for the activating NKG2D receptor and promotes NK cell-mediated killing. *Blood* 115, 1354–1363. <https://doi.org/10.1182/blood-2009-08-237370>
- Robertson, M.J., Caligiuri, M.A., Manley, T.J., Levine, H., Ritz, J., 1990. Human natural killer cell adhesion molecules. Differential expression after activation and participation in cytolysis. *The Journal of Immunology* 145, 3194–3201.
- Robinson, T.M., O'Donnell, P.V., Fuchs, E.J., Luznik, L., 2016. Haploidentical bone marrow and stem cell transplantation: experience with post-transplantation cyclophosphamide. *Semin Hematol* 53, 90–97. <https://doi.org/10.1053/j.seminhematol.2016.01.005>
- Robinson, T.O., Schluns, K.S., 2017. The potential and promise of IL-15 in immuno-oncogenic therapies. *Immunol Lett* 190, 159–168. <https://doi.org/10.1016/j.imlet.2017.08.010>
- Robson, A., Harris, L.K., Innes, B.A., Lash, G.E., Aljunaidy, M.M., Aplin, J.D., Baker, P.N., Robson, S.C., Bulmer, J.N., 2012. Uterine natural killer cells initiate spiral artery remodeling in human pregnancy. *FASEB J* 26, 4876–4885. <https://doi.org/10.1096/fj.12-210310>
- Rölle, A., Pollmann, J., Ewen, E.-M., Le, V.T.K., Halenius, A., Hengel, H., Cerwenka, A., 2014. IL-12-producing monocytes and HLA-E control HCMV-driven NKG2C+ NK cell expansion. *J Clin Invest* 124, 5305–5316. <https://doi.org/10.1172/JCI77440>
- Romagnani, C., Juelke, K., Falco, M., Morandi, B., D'Agostino, A., Costa, R., Ratto, G., Forte, G., Carrega, P., Lui, G., Conte, R., Strowig, T., Moretta, A., Münz, C., Thiel, A., Moretta, L., Ferlazzo, G., 2007. CD56brightCD16- killer Ig-like receptor- NK cells display longer telomeres and acquire features of CD56dim NK cells upon activation. *J Immunol* 178, 4947–4955. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.178.8.4947>
- Romagné, F., André, P., Spee, P., Zahn, S., Anfossi, N., Gauthier, L., Capanni, M., Ruggeri, L., Benson, D.M., Blaser, B.W., Della Chiesa, M., Moretta, A., Vivier, E., Caligiuri, M.A., Velardi, A., Wagtman, N., 2009. Preclinical characterization of 1-7F9, a novel human anti-KIR receptor therapeutic antibody that augments natural killer-mediated killing of tumor cells. *Blood* 114, 2667–2677. <https://doi.org/10.1182/blood-2009-02-206532>
- Romee, R., Cooley, S., Berrien-Elliott, M.M., Westervelt, P., Verneris, M.R., Wagner, J.E., Weisdorf, D.J., Blazar, B.R., Ustun, C., DeFor, T.E., Vivek, S., Peck, L., DiPersio, J.F., Cashen, A.F., Kylo, R., Musiek, A., Schaffer, A., Anadkat, M.J., Rosman, I., Miller, D., Egan, J.O., Jeng, E.K., Rock, A., Wong, H.C., Fehniger, T.A., Miller, J.S., 2018. First-in-human phase 1 clinical study of the IL-15 superagonist complex ALT-803 to treat relapse after transplantation. *Blood* 131, 2515–2527. <https://doi.org/10.1182/blood-2017-12-823757>
- Romee, R., Foley, B., Lenvik, T., Wang, Y., Zhang, B., Ankarlo, D., Luo, X., Cooley, S., Verneris, M., Walcheck, B., Miller, J., 2013. NK cell CD16 surface expression and function is regulated by a

- disintegrin and metalloprotease-17 (ADAM17). *Blood* 121, 3599–3608. <https://doi.org/10.1182/blood-2012-04-425397>
- 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., Neal, C.C., Yu, L., Oh, S.T., Lee, Y.-S., Mulder, A., Claas, F., Cooper, M.A., Fehniger, T.A., 2016. Cytokine-induced memory-like natural killer cells exhibit enhanced responses against myeloid leukemia. *Sci Transl Med* 8, 357ra123. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aaf2341>
- Rosmaraki, E.E., Douagi, I., Roth, C., Colucci, F., Cumano, A., Di Santo, J.P., 2001. Identification of committed NK cell progenitors in adult murine bone marrow. *Eur J Immunol* 31, 1900–1909. [https://doi.org/10.1002/1521-4141\(200106\)31:6<1900::aid-immu1900>3.0.co;2-m](https://doi.org/10.1002/1521-4141(200106)31:6<1900::aid-immu1900>3.0.co;2-m)
- Ruggeri, A., Labopin, M., Bacigalupo, A., Afanasyev, B., Cornelissen, J.J., Elmaagacli, A., Itälä-Remes, M., Blaise, D., Meijer, E., Koc, Y., Milpied, N., Schouten, H.C., Kroeger, N., Mohty, M., Nagler, A., 2018. Post-transplant cyclophosphamide for graft-versus-host disease prophylaxis in HLA matched sibling or matched unrelated donor transplant for patients with acute leukemia, on behalf of ALWP-EBMT. *J Hematol Oncol* 11, 40. <https://doi.org/10.1186/s13045-018-0586-4>
- Ruggeri, L., Capanni, M., Urbani, E., Perruccio, K., Shlomchik, W.D., Tosti, A., Posati, S., Rogaia, D., Frassoni, F., Aversa, F., Martelli, M.F., Velardi, A., 2002. Effectiveness of donor natural killer cell alloreactivity in mismatched hematopoietic transplants. *Science* 295, 2097–2100. <https://doi.org/10.1126/science.1068440>
- Ruggeri, L., Mancusi, A., Burchielli, E., Capanni, M., Carotti, A., Aloisi, T., Aversa, F., Martelli, M.F., Velardi, A., 2008. NK cell alloreactivity and allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Blood Cells Mol Dis* 40, 84–90. <https://doi.org/10.1016/j.bcmd.2007.06.029>
- Ruggeri, L., Parisi, S., Urbani, E., Curti, A., 2015. Alloreactive Natural Killer Cells for the Treatment of Acute Myeloid Leukemia: From Stem Cell Transplantation to Adoptive Immunotherapy. *Front. Immunol.* 6. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2015.00479>
- Russo, A., Oliveira, G., Berglund, S., Greco, R., Gambacorta, V., Cieri, N., Toffalori, C., Zito, L., Lorentino, F., Piemontese, S., Morelli, M., Giglio, F., Assanelli, A., Stanghellini, M.T.L., Bonini, C., Peccatori, J., Ciceri, F., Luznik, L., Vago, L., 2018. NK cell recovery after haploidentical HSCT with posttransplant cyclophosphamide: dynamics and clinical implications. *Blood* 131, 247–262. <https://doi.org/10.1182/blood-2017-05-780668>
- Salas, M.Q., Prem, S., Atenafu, E.G., Datt Law, A., Lam, W., Al-Shaibani, Z., Loach, D., Kim, D.D.H., Michelis, F.V., Lipton, J.H., Kumar, R., Mattsson, J., Viswabandya, A., 2020. Dual T-cell depletion with ATG and PTCy for peripheral blood reduced intensity conditioning allo-HSCT results in very low rates of GVHD. *Bone Marrow Transplant* 55, 1773–1783. <https://doi.org/10.1038/s41409-020-0813-9>
- Sanchez-Correa, B., Valhondo, I., Hassouneh, F., Lopez-Sejas, N., Pera, A., Bergua, J.M., Arcos, M.J., Bañas, H., Casas-Avilés, I., Durán, E., Alonso, C., Solana, R., Tarazona, R., 2019. DNAM-1 and the TIGIT/PVRIG/TACTILE Axis: Novel Immune Checkpoints for Natural Killer Cell-Based Cancer Immunotherapy. *Cancers (Basel)* 11. <https://doi.org/10.3390/cancers11060877>
- Sánchez-Mejorada, G., Rosales, C., 1998. Signal transduction by immunoglobulin Fc receptors. *J Leukoc Biol* 63, 521–533. <https://doi.org/10.1002/jlb.63.5.521>
- Sandoval-Borrego, D., Moreno-Lafont, M.C., Vazquez-Sanchez, E.A., Gutierrez-Hoya, A., López-Santiago, R., Montiel-Cervantes, L.A., Ramírez-Saldaña, M., Vela-Ojeda, J., 2016. Overexpression of CD158 and NKG2A Inhibitory Receptors and Underexpression of NKG2D and NKp46 Activating Receptors on NK Cells in Acute Myeloid Leukemia. *Arch Med Res* 47, 55–64. <https://doi.org/10.1016/j.arcmed.2016.02.001>
- Santourlidis, S., Trompeter, H.-I., Weinhold, S., Eisermann, B., Meyer, K.L., Wernet, P., Uhrberg, M., 2002. Crucial role of DNA methylation in determination of clonally distributed killer cell Ig-like receptor expression patterns in NK cells. *J Immunol* 169, 4253–4261. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.169.8.4253>
- Sarkar, S., van Gelder, M., Noort, W., Xu, Y., Rouschop, K.M.A., Groen, R., Schouten, H.C., Tilanus, M.G.J., Germeraad, W.T.V., Martens, A.C.M., Bos, G.M.J., Wieten, L., 2015. Optimal selection

- of natural killer cells to kill myeloma: the role of HLA-E and NKG2A. *Cancer Immunol Immunother* 64, 951–963. <https://doi.org/10.1007/s00262-015-1694-4>
- Satoh-Takayama, N., Vosshenrich, C.A.J., Lesjean-Pottier, S., Sawa, S., Lochner, M., Rattis, F., Mention, J.-J., Thiam, K., Cerf-Bensussan, N., Mandelboim, O., Eberl, G., Di Santo, J.P., 2008. Microbial flora drives interleukin 22 production in intestinal NKp46+ cells that provide innate mucosal immune defense. *Immunity* 29, 958–970. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2008.11.001>
- Schlecker, E., Fiegler, N., Arnold, A., Altevogt, P., Rose-John, S., Moldenhauer, G., Sucker, A., Paschen, A., von Strandmann, E.P., Textor, S., Cerwenka, A., 2014. Metalloprotease-mediated tumor cell shedding of B7-H6, the ligand of the natural killer cell-activating receptor NKp30. *Cancer Res* 74, 3429–3440. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-13-3017>
- Schlums, H., Cichocki, F., Tesi, B., Theorell, J., Beziat, V., Holmes, T.D., Han, H., Chiang, S.C.C., Foley, B., Mattsson, K., Larsson, S., Schaffer, M., Malmberg, K.-J., Ljunggren, H.-G., Miller, J.S., Bryceson, Y.T., 2015. Cytomegalovirus infection drives adaptive epigenetic diversification of NK cells with altered signaling and effector function. *Immunity* 42, 443–456. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2015.02.008>
- Schmitz, N., Pfistner, B., Sextro, M., Sieber, M., Carella, A.M., Haenel, M., Boissevain, F., Zschaber, R., Müller, P., Kirchner, H., Lohri, A., Decker, S., Koch, B., Hasenclever, D., Goldstone, A.H., Diehl, V., German Hodgkin's Lymphoma Study Group, Lymphoma Working Party of the European Group for Blood and Marrow Transplantation, 2002. Aggressive conventional chemotherapy compared with high-dose chemotherapy with autologous haemopoietic stem-cell transplantation for relapsed chemosensitive Hodgkin's disease: a randomised trial. *Lancet* 359, 2065–2071. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(02\)08938-9](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(02)08938-9)
- Scoville, S.D., Freud, A.G., Caligiuri, M.A., 2019. Cellular pathways in the development of human and murine innate lymphoid cells. *Curr Opin Immunol* 56, 100–106. <https://doi.org/10.1016/j.coi.2018.11.003>
- Scoville, S.D., Nalin, A.P., Chen, Luxi, Chen, Li, Zhang, M.H., McConnell, K., Beceiro Casas, S., Ernst, G., Traboulsi, A.A.-R., Hashi, N., Williams, M., Zhang, X., Hughes, T., Mishra, A., Benson, D.M., Saultz, J.N., Yu, J., Freud, A.G., Caligiuri, M.A., Mundy-Bosse, B.L., 2018. Human AML activates the aryl hydrocarbon receptor pathway to impair NK cell development and function. *Blood* 132, 1792–1804. <https://doi.org/10.1182/blood-2018-03-838474>
- Screpanti, V., Wallin, R.P., Ljunggren, H.G., Grandien, A., 2001. A central role for death receptor-mediated apoptosis in the rejection of tumors by NK cells. *J Immunol* 167, 2068–2073. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.167.4.2068>
- Sengsayadeth, S., Gatwood, K.S., Boumendil, A., Labopin, M., Finke, J., Ganser, A., Stelljes, M., Ehninger, G., Beelen, D., Niederwieser, D., Blaise, D., Dreger, P., Mufti, G., Chevallier, P., Mailhol, A., Gillece, M.H., Gorin, N., Esteve, J., Ciceri, F., Baron, F., Schmid, C., Giebel, S., Mohty, M., Savani, B.N., Nagler, A., 2018. Conditioning intensity in secondary AML with prior myelodysplastic syndrome/myeloproliferative disorders: an EBMT ALWP study. *Blood Adv* 2, 2127–2135. <https://doi.org/10.1182/bloodadvances.2018019976>
- Shahsavari, F., Mapar, S., Ahmadi, S.A.Y., 2016. Multiple sclerosis is accompanied by lack of KIR2DS1 gene: A meta-analysis. *Genom Data* 10, 75–78. <https://doi.org/10.1016/j.gdata.2016.09.009>
- Sharkey, A.M., Xiong, S., Kennedy, P.R., Gardner, L., Farrell, L.E., Chazara, O., Ivarsson, M.A., Hiby, S.E., Colucci, F., Moffett, A., 2015. Tissue-Specific Education of Decidual NK Cells. *J Immunol* 195, 3026–3032. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1501229>
- Shem-Tov, N., Peczynski, C., Labopin, M., Itälä-Remes, M., Blaise, D., Labussière-Wallet, H., Socié, G., Kröger, N., Mielke, S., Afanasyev, B., Chevallier, P., Tischer, J., Helbig, G., Jindra, P., Peric, Z., Giebel, S., Mohty, M., Nagler, A., 2020. Haploidentical vs. unrelated allogeneic stem cell transplantation for acute lymphoblastic leukemia in first complete remission: on behalf of the ALWP of the EBMT. *Leukemia* 34, 283–292. <https://doi.org/10.1038/s41375-019-0544-3>

- Shibuya, K., Lanier, L.L., Phillips, J.H., Ochs, H.D., Shimizu, K., Nakayama, E., Nakauchi, H., Shibuya, A., 1999. Physical and functional association of LFA-1 with DNAM-1 adhesion molecule. *Immunity* 11, 615–623. [https://doi.org/10.1016/s1074-7613\(00\)80136-3](https://doi.org/10.1016/s1074-7613(00)80136-3)
- Shimoni, A., Labopin, M., Finke, J., Ciceri, F., Deconinck, E., Kröger, N., Gramatzki, M., Stelljes, M., Blaise, D., Stoenkel, F., Chevallier, P., Holler, E., Fegueux, N., Mohty, M., Nagler, A., 2019a. Donor selection for a second allogeneic stem cell transplantation in AML patients relapsing after a first transplant: a study of the Acute Leukemia Working Party of EBMT. *Blood Cancer J* 9, 88. <https://doi.org/10.1038/s41408-019-0251-3>
- Shimoni, A., Labopin, M., Lorentino, F., Van Lint, M.T., Koc, Y., Gülbas, Z., Tischer, J., Bruno, B., Blaise, D., Pioltelli, P., Afanasyev, B., Ciceri, F., Mohty, M., Nagler, A., 2019b. Killer cell immunoglobulin-like receptor ligand mismatching and outcome after haploidentical transplantation with post-transplant cyclophosphamide. *Leukemia* 33, 230–239. <https://doi.org/10.1038/s41375-018-0170-5>
- Shimoni, A., Vago, L., Bernardi, M., Yerushalmi, R., Peccatori, J., Greco, R., Shem-Tov, N., Lo Russo, A., Danylesko, I., Apel, A., Bonini, C., Lupo Stanghellini, M.T., Nagler, A., Ciceri, F., 2017. Missing HLA C group 1 ligand in patients with AML and MDS is associated with reduced risk of relapse and better survival after allogeneic stem cell transplantation with fludarabine and treosulfan reduced toxicity conditioning. *Am. J. Hematol.* 92, 1011–1019. <https://doi.org/10.1002/ajh.24827>
- Sim, M.J.W., Malaker, S.A., Khan, A., Stowell, J.M., Shabanowitz, J., Peterson, M.E., Rajagopalan, S., Hunt, D.F., Altmann, D.M., Long, E.O., Boyton, R.J., 2017. Canonical and Cross-reactive Binding of NK Cell Inhibitory Receptors to HLA-C Allotypes Is Dictated by Peptides Bound to HLA-C. *Front Immunol* 8, 193. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.00193>
- Sivori, S., Cantoni, C., Parolini, S., Marcenaro, E., Conte, R., Moretta, L., Moretta, A., 2003. IL-21 induces both rapid maturation of human CD34+ cell precursors towards NK cells and acquisition of surface killer Ig-like receptors. *Eur J Immunol* 33, 3439–3447. <https://doi.org/10.1002/eji.200324533>
- Sivori, S., Falco, M., Carlomagno, S., Romeo, E., Moretta, L., Moretta, A., 2007. Heterogeneity of TLR3 mRNA transcripts and responsiveness to poly (I:C) in human NK cells derived from different donors. *Int Immunol* 19, 1341–1348. <https://doi.org/10.1093/intimm/dxm105>
- Sivori, S., Falco, M., Carlomagno, S., Romeo, E., Soldani, C., Bensussan, A., Viola, A., Moretta, L., Moretta, A., 2010a. A novel KIR-associated function: evidence that CpG DNA uptake and shuttling to early endosomes is mediated by KIR3DL2. *Blood* 116, 1637–1647. <https://doi.org/10.1182/blood-2009-12-256586>
- Sivori, S., Falco, M., Della Chiesa, M., Carlomagno, S., Vitale, M., Moretta, L., Moretta, A., 2004. CpG and double-stranded RNA trigger human NK cells by Toll-like receptors: induction of cytokine release and cytotoxicity against tumors and dendritic cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 10116–10121. <https://doi.org/10.1073/pnas.0403744101>
- Sivori, S., Falco, M., Marcenaro, E., Parolini, S., Biassoni, R., Bottino, C., Moretta, L., Moretta, A., 2002. Early expression of triggering receptors and regulatory role of 2B4 in human natural killer cell precursors undergoing in vitro differentiation. *PNAS* 99, 4526–4531. <https://doi.org/10.1073/pnas.072065999>
- Sivori, S., Falco, M., Moretta, L., Moretta, A., 2010b. Extending killer Ig-like receptor function: from HLA class I recognition to sensors of microbial products. *Trends Immunol* 31, 289–294. <https://doi.org/10.1016/j.it.2010.05.007>
- Sivori, S., Meazza, R., Quintarelli, C., Carlomagno, S., Della Chiesa, M., Falco, M., Moretta, L., Locatelli, F., Pende, D., 2019. NK Cell-Based Immunotherapy for Hematological Malignancies. *J Clin Med* 8. <https://doi.org/10.3390/jcm8101702>
- Sivori, S., Pende, D., Quatrini, L., Pietra, G., Della Chiesa, M., Vacca, P., Tumino, N., Moretta, F., Mingari, M.C., Locatelli, F., Moretta, L., 2020. NK cells and ILCs in tumor immunotherapy. *Molecular Aspects of Medicine* 100870. <https://doi.org/10.1016/j.mam.2020.100870>

- Smyth, M.J., Cretney, E., Kelly, J.M., Westwood, J.A., Street, S.E.A., Yagita, H., Takeda, K., van Dommelen, S.L.H., Degli-Esposti, M.A., Hayakawa, Y., 2005. Activation of NK cell cytotoxicity. *Mol Immunol* 42, 501–510. <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2004.07.034>
- Solomon, S.R., Aubrey, M.T., Zhang, X., Piluso, A., Freed, B.M., Brown, S., Jackson, K.C., Morris, L.E., Holland, H.K., Solh, M.M., Bashey, A., 2018. Selecting the Best Donor for Haploidentical Transplant: Impact of HLA, Killer Cell Immunoglobulin-Like Receptor Genotyping, and Other Clinical Variables. *Biol Blood Marrow Transplant* 24, 789–798. <https://doi.org/10.1016/j.bbmt.2018.01.013>
- Stabile, H., Fionda, C., Gismondi, A., Santoni, A., 2017. Role of Distinct Natural Killer Cell Subsets in Anticancer Response. *Front Immunol* 8, 293. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.00293>
- Stanietsky, N., Simic, H., Arapovic, J., Toporik, A., Levy, O., Novik, A., Levine, Z., Beiman, M., Dassa, L., Achdout, H., Stern-Ginossar, N., Tsukerman, P., Jonjic, S., Mandelboim, O., 2009. The interaction of TIGIT with PVRL2 inhibits human NK cell cytotoxicity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106, 17858–17863. <https://doi.org/10.1073/pnas.0903474106>
- Steinle, A., Li, P., Morris, D.L., Groh, V., Lanier, L.L., Strong, R.K., Spies, T., 2001. Interactions of human NKG2D with its ligands MICA, MICB, and homologs of the mouse RAE-1 protein family. *Immunogenetics* 53, 279–287. <https://doi.org/10.1007/s002510100325>
- Stern, M., Ruggeri, L., Capanni, M., Mancusi, A., Velardi, A., 2008. Human leukocyte antigens A23, A24, and A32 but not A25 are ligands for KIR3DL1. *Blood* 112, 708–710. <https://doi.org/10.1182/blood-2008-02-137521>
- Stewart, C.A., Laugier-Anfossi, F., Vély, F., Saulquin, X., Riedmuller, J., Tisserant, A., Gauthier, L., Romagné, F., Ferracci, G., Arosa, F.A., Moretta, A., Sun, P.D., Ugolini, S., Vivier, E., 2005. Recognition of peptide-MHC class I complexes by activating killer immunoglobulin-like receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 13224–13229. <https://doi.org/10.1073/pnas.0503594102>
- Stringaris, K., Sekine, T., Khoder, A., Alsuliman, A., Razzaghi, B., Sargeant, R., Pavlu, J., Brisley, G., de Lavallade, H., Sarvaria, A., Marin, D., Mielke, S., Apperley, J.F., Shpall, E.J., Barrett, A.J., Rezvani, K., 2014. Leukemia-induced phenotypic and functional defects in natural killer cells predict failure to achieve remission in acute myeloid leukemia. *Haematologica* 99, 836–847. <https://doi.org/10.3324/haematol.2013.087536>
- Sun, K., Alvarez, M., Ames, E., Barao, I., Chen, M., Longo, D.L., Redelman, D., Murphy, W.J., 2012. Mouse NK cell-mediated rejection of bone marrow allografts exhibits patterns consistent with Ly49 subset licensing. *Blood* 119, 1590–1598. <https://doi.org/10.1182/blood-2011-08-374314>
- Sweeney, C., Vyas, P., 2019. The Graft-Versus-Leukemia Effect in AML. *Front. Oncol.* 9. <https://doi.org/10.3389/fonc.2019.01217>
- Symons, H.J., Leffell, M.S., Rossiter, N.D., Zahurak, M., Jones, R.J., Fuchs, E.J., 2010a. Improved survival with inhibitory killer immunoglobulin receptor (KIR) gene mismatches and KIR haplotype B donors after nonmyeloablative, HLA-haploidentical bone marrow transplantation. *Biol. Blood Marrow Transplant.* 16, 533–542. <https://doi.org/10.1016/j.bbmt.2009.11.022>
- Symons, H.J., Leffell, M.S., Rossiter, N.D., Zahurak, M., Jones, R.J., Fuchs, E.J., 2010b. Improved survival with inhibitory killer immunoglobulin receptor (KIR) gene mismatches and KIR haplotype B donors after nonmyeloablative, HLA-haploidentical bone marrow transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant* 16, 533–542. <https://doi.org/10.1016/j.bbmt.2009.11.022>
- Tang, X., Yang, L., Li, Z., Nalin, A.P., Dai, H., Xu, T., Yin, J., You, F., Zhu, M., Shen, W., Chen, G., Zhu, X., Wu, D., Yu, J., 2018. Erratum: First-in-man clinical trial of CAR NK-92 cells: safety test of CD33-CAR NK-92 cells in patients with relapsed and refractory acute myeloid leukemia. *Am J Cancer Res* 8, 1899.
- Tarek, N., Le Luëdec, J.-B., Gallagher, M.M., Zheng, J., Venstrom, J.M., Chamberlain, E., Modak, S., Heller, G., Dupont, B., Cheung, N.-K.V., Hsu, K.C., 2012. Unlicensed NK cells target

- neuroblastoma following anti-GD2 antibody treatment. *J Clin Invest* 122, 3260–3270. <https://doi.org/10.1172/JCI62749>
- Tay, C.H., Welsh, R.M., 1997. Distinct organ-dependent mechanisms for the control of murine cytomegalovirus infection by natural killer cells. *J Virol* 71, 267–275. <https://doi.org/10.1128/JVI.71.1.267-275.1997>
- Tay, S.S., Carol, H., Biro, M., 2016. TriKEs and BiKEs join CARs on the cancer immunotherapy highway. *Hum Vaccin Immunother* 12, 2790–2796. <https://doi.org/10.1080/21645515.2016.1198455>
- Terszowski, G., Klein, C., Stern, M., 2014. KIR/HLA Interactions Negatively Affect Rituximab- but Not GA101 (Obinutuzumab)-Induced Antibody-Dependent Cellular Cytotoxicity. *The Journal of Immunology* 192, 5618–5624. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1400288>
- Thomas, E.D., Lochte, H.L., Lu, W.C., Ferrebee, J.W., 1957. Intravenous infusion of bone marrow in patients receiving radiation and chemotherapy. *N Engl J Med* 257, 491–496. <https://doi.org/10.1056/NEJM195709122571102>
- Tobin, L.M., Mavinkurve, M., Carolan, E., Kinlen, D., O'Brien, E.C., Little, M.A., Finlay, D.K., Cody, D., Hogan, A.E., O'Shea, D., 2017. NK cells in childhood obesity are activated, metabolically stressed, and functionally deficient. *JCI Insight* 2. <https://doi.org/10.1172/jci.insight.94939>
- Torelli, G.F., Peragine, N., Raponi, S., Pagliara, D., De Propriis, M.S., Vitale, A., Bertaina, A., Barberi, W., Moretta, L., Basso, G., Santoni, A., Guarini, A., Locatelli, F., Foà, R., 2014. Recognition of adult and pediatric acute lymphoblastic leukemia blasts by natural killer cells. *Haematologica* 99, 1248–1254. <https://doi.org/10.3324/haematol.2013.101931>
- Torío, A., Pascual, M.J., Vidales, I., Ortiz, M., Caballero, A., Heiniger, A.I., 2018. Donor Selection Based on Killer Cell Immunoglobulin-Like Receptor (KIR) Genotype May Improve Outcome After T-Cell-Replete Haploidentical Transplantation. *Transplant Proc* 50, 679–682. <https://doi.org/10.1016/j.transproceed.2017.09.070>
- Traherne, J.A., Martin, M., Ward, R., Ohashi, M., Pellett, F., Gladman, D., Middleton, D., Carrington, M., Trowsdale, J., 2010. Mechanisms of copy number variation and hybrid gene formation in the KIR immune gene complex. *Hum Mol Genet* 19, 737–751. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddp538>
- Upshaw, J.L., Leibson, P.J., 2006. NKG2D-mediated activation of cytotoxic lymphocytes: unique signaling pathways and distinct functional outcomes. *Semin Immunol* 18, 167–175. <https://doi.org/10.1016/j.smim.2006.03.001>
- Vago, L., Perna, S.K., Zanussi, M., Mazzi, B., Barlassina, C., Stanghellini, M.T.L., Perrelli, N.F., Cosentino, C., Torri, F., Angius, A., Forno, B., Casucci, M., Bernardi, M., Peccatori, J., Corti, C., Bondanza, A., Ferrari, M., Rossini, S., Roncarolo, M.G., Bordignon, C., Bonini, C., Ciceri, F., Fleischhauer, K., 2009. Loss of mismatched HLA in leukemia after stem-cell transplantation. *N Engl J Med* 361, 478–488. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa0811036>
- Vaidya, S.V., Mathew, P.A., 2006. Of mice and men: different functions of the murine and human 2B4 (CD244) receptor on NK cells. *Immunol Lett* 105, 180–184. <https://doi.org/10.1016/j.imlet.2006.02.006>
- Valiante, N.M., Lienert, K., Shilling, H.G., Smits, B.J., Parham, P., 1997. Killer cell receptors: keeping pace with MHC class I evolution. *Immunol Rev* 155, 155–164. <https://doi.org/10.1111/j.1600-065x.1997.tb00948.x>
- Vallera, D.A., Felices, M., McElmurry, R., McCullar, V., Zhou, X., Schmohl, J.U., Zhang, B., Lenvik, A.J., Panoskaltis-Mortari, A., Verneris, M.R., Tolar, J., Cooley, S., Weisdorf, D.J., Blazar, B.R., Miller, J.S., 2016. IL15 Trispecific Killer Engagers (TriKE) Make Natural Killer Cells Specific to CD33+ Targets While Also Inducing Persistence, In Vivo Expansion, and Enhanced Function. *Clin Cancer Res* 22, 3440–3450. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-15-2710>
- van den Bosch, G., Preijers, F., Vreugdenhil, A., Hendriks, J., Maas, F., De Witte, T., 1995. Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) counteracts the inhibiting effect of monocytes on natural killer (NK) cells. *Clin Exp Immunol* 101, 515–520. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2249.1995.tb03143.x>

- van der Ploeg, K., Chang, C., Ivarsson, M.A., Moffett, A., Wills, M.R., Trowsdale, J., 2017. Modulation of Human Leukocyte Antigen-C by Human Cytomegalovirus Stimulates KIR2DS1 Recognition by Natural Killer Cells. *Front Immunol* 8, 298. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.00298>
- van Hall, T., André, P., Horowitz, A., Ruan, D.F., Borst, L., Zerbib, R., Narni-Mancinelli, E., van der Burg, S.H., Vivier, E., 2019. Monalizumab: inhibiting the novel immune checkpoint NKG2A. *J Immunother Cancer* 7, 263. <https://doi.org/10.1186/s40425-019-0761-3>
- VandenBussche, C.J., Dakshanamurthy, S., Posch, P.E., Hurley, C.K., 2006. A single polymorphism disrupts the killer Ig-like receptor 2DL2/2DL3 D1 domain. *J Immunol* 177, 5347–5357. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.177.8.5347>
- VandenBussche, C.J., Mulrooney, T.J., Frazier, W.R., Dakshanamurthy, S., Hurley, C.K., 2009. Dramatically reduced surface expression of NK cell receptor KIR2DS3 is attributed to multiple residues throughout the molecule. *Genes Immun* 10, 162–173. <https://doi.org/10.1038/gene.2008.91>
- Vari, F., Arpon, D., Keane, C., Hertzberg, M.S., Talaulikar, D., Jain, S., Cui, Q., Han, E., Tobin, J., Bird, R., Cross, D., Hernandez, A., Gould, C., Birch, S., Gandhi, M.K., 2018. Immune evasion via PD-1/PD-L1 on NK cells and monocyte/macrophages is more prominent in Hodgkin lymphoma than DLBCL. *Blood* 131, 1809–1819. <https://doi.org/10.1182/blood-2017-07-796342>
- Veeramani, S., Wang, S.-Y., Dahle, C., Blackwell, S., Jacobus, L., Knutson, T., Button, A., Link, B.K., Weiner, G.J., 2011. Rituximab infusion induces NK activation in lymphoma patients with the high-affinity CD16 polymorphism. *Blood* 118, 3347–3349. <https://doi.org/10.1182/blood-2011-05-351411>
- Veillette, A., 2010. SLAM-family receptors: immune regulators with or without SAP-family adaptors. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2, a002469. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a002469>
- Veillette, A., Latour, S., 2003. The SLAM family of immune-cell receptors. *Curr Opin Immunol* 15, 277–285. [https://doi.org/10.1016/s0952-7915\(03\)00041-4](https://doi.org/10.1016/s0952-7915(03)00041-4)
- Vendelbosch, S., de Boer, M., Gouw, R.A.T.W., Ho, C.K.Y., Geissler, J., Swelsen, W.T.N., Moorhouse, M.J., Lardy, N.M., Roos, D., van den Berg, T.K., Kuijpers, T.W., 2013. Extensive variation in gene copy number at the killer immunoglobulin-like receptor locus in humans. *PLoS One* 8, e67619. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0067619>
- Venstrom, J.M., Gooley, T.A., Spellman, S., Pring, J., Malkki, M., Dupont, B., Petersdorf, E., Hsu, K.C., 2010. Donor activating KIR3DS1 is associated with decreased acute GVHD in unrelated allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Blood* 115, 3162–3165. <https://doi.org/10.1182/blood-2009-08-236943>
- Venstrom, J.M., Pittari, G., Gooley, T.A., Chewing, J.H., Spellman, S., Haagenson, M., Gallagher, M.M., Malkki, M., Petersdorf, E., Dupont, B., Hsu, K.C., 2012. HLA-C-dependent prevention of leukemia relapse by donor activating KIR2DS1. *N. Engl. J. Med.* 367, 805–816. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1200503>
- Vignali, D.A.A., Kuchroo, V.K., 2012. IL-12 family cytokines: immunological playmakers. *Nat Immunol* 13, 722–728. <https://doi.org/10.1038/ni.2366>
- Vilches, C., Gardiner, C.M., Parham, P., 2000a. Gene structure and promoter variation of expressed and nonexpressed variants of the KIR2DL5 gene. *J Immunol* 165, 6416–6421. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.165.11.6416>
- Vilches, C., Pando, M.J., Parham, P., 2000b. Genes encoding human killer-cell Ig-like receptors with D1 and D2 extracellular domains all contain untranslated pseudoexons encoding a third Ig-like domain. *Immunogenetics* 51, 639–646. <https://doi.org/10.1007/s002510000184>
- Vilches, C., Parham, P., 2002. KIR: diverse, rapidly evolving receptors of innate and adaptive immunity. *Annu Rev Immunol* 20, 217–251. <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.20.092501.134942>
- Vitale, M., Della Chiesa, M., Carlomagno, S., Pende, D., Aricò, M., Moretta, L., Moretta, A., 2005. NK-dependent DC maturation is mediated by TNF α and IFN γ released upon engagement of the NKp30 triggering receptor. *Blood* 106, 566–571. <https://doi.org/10.1182/blood-2004-10-4035>






- Vitale, M., Falco, M., Castriconi, R., Parolini, S., Zambello, R., Semenzato, G., Biassoni, R., Bottino, C., Moretta, L., Moretta, A., 2001. Identification of Nkp80, a novel triggering molecule expressed by human NK cells. *Eur J Immunol* 31, 233–242. [https://doi.org/10.1002/1521-4141\(200101\)31:1<233::AID-IMMU233>3.0.CO;2-4](https://doi.org/10.1002/1521-4141(200101)31:1<233::AID-IMMU233>3.0.CO;2-4)
- Vivier, E., Artis, D., Colonna, M., Diefenbach, A., Di Santo, J.P., Eberl, G., Koyasu, S., Locksley, R.M., McKenzie, A.N.J., Mebius, R.E., Powrie, F., Spits, H., 2018. Innate Lymphoid Cells: 10 Years On. *Cell* 174, 1054–1066. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.07.017>
- von Freeden-Jeffry, U., Vieira, P., Lucian, L.A., McNeil, T., Burdach, S.E., Murray, R., 1995. Lymphopenia in interleukin (IL)-7 gene-deleted mice identifies IL-7 as a nonredundant cytokine. *J Exp Med* 181, 1519–1526. <https://doi.org/10.1084/jem.181.4.1519>
- Waggoner, S.N., Reighard, S.D., Gyurova, I.E., Cranert, S.A., Mahl, S.E., Karmelet, E.P., McNally, J.P., Moran, M.T., Brooks, T.R., Yaqoob, F., Rydzynski, C.E., 2016. Roles of natural killer cells in antiviral immunity. *Current Opinion in Virology, Emerging viruses* • *Viral immunology* 16, 15–23. <https://doi.org/10.1016/j.coviro.2015.10.008>
- Walch, M., Dotiwala, F., Mulik, S., Thiery, J., Kirchhausen, T., Clayberger, C., Krensky, A.M., Martinvalet, D., Lieberman, J., 2015. Cytotoxic Cells Kill Intracellular Bacteria through Granulysin-Mediated Delivery of Granzymes. *Cell* 161, 1229. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.05.021>
- Walzer, T., Dalod, M., Robbins, S.H., Zitvogel, L., Vivier, E., 2005. Natural-killer cells and dendritic cells: “l’union fait la force.” *Blood* 106, 2252–2258. <https://doi.org/10.1182/blood-2005-03-1154>
- Wang, S., Zhao, Y.-R., Jiao, Y.-L., Wang, L.-C., Li, J.-F., Cui, B., Xu, C.-Y., Shi, Y.-H., Chen, Z.-J., 2007. Increased activating killer immunoglobulin-like receptor genes and decreased specific HLA-C alleles in couples with recurrent spontaneous abortion. *Biochem Biophys Res Commun* 360, 696–701. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2007.06.125>
- Wang, W., Erbe, A.K., Hank, J.A., Morris, Z.S., Sondel, P.M., 2015. NK Cell-Mediated Antibody-Dependent Cellular Cytotoxicity in Cancer Immunotherapy. *Front Immunol* 6, 368. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2015.00368>
- Wanquet, A., Bramanti, S., Harbi, S., Fürst, S., Legrand, F., Faucher, C., Granata, A., Calmels, B., Lemarie, C., Picard, C., Chabannon, C., Weiller, P.-J., Castagna, L., Blaise, D., Devillier, R., 2018. Killer Cell Immunoglobulin-Like Receptor-Ligand Mismatch in Donor versus Recipient Direction Provides Better Graft-versus-Tumor Effect in Patients with Hematologic Malignancies Undergoing Allogeneic T Cell-Replete Haploidentical Transplantation Followed by Post-Transplant Cyclophosphamide. *Biol Blood Marrow Transplant* 24, 549–554. <https://doi.org/10.1016/j.bbmt.2017.11.042>
- Weber, E.W., Maus, M.V., Mackall, C.L., 2020. The Emerging Landscape of Immune Cell Therapies. *Cell* 181, 46–62. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.03.001>
- Weisdorf, D., Cooley, S., Wang, T., Trachtenberg, E., Haagenson, M.D., Vierra-Green, C., Spellman, S., Spahn, A., Vogel, J., Kobusingye, H., Fehninger, T., Woolfrey, A., Devine, S., Ross, M., Waller, E.K., Sobecks, R., Parham, P., Guethlein, L.A., Marsh, S.G.E., Miller, J., participating center writing committee, 2019. KIR Donor Selection: Feasibility in Identifying better Donors. *Biol Blood Marrow Transplant* 25, e28–e32. <https://doi.org/10.1016/j.bbmt.2018.08.022>
- Wendel, M., Galani, I.E., Suri-Payer, E., Cerwenka, A., 2008. Natural Killer Cell Accumulation in Tumors Is Dependent on IFN- γ and CXCR3 Ligands. *Cancer Res* 68, 8437–8445. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-08-1440>
- Williams, N.S., Klem, J., Puzanov, I.J., Sivakumar, P.V., Schatzle, J.D., Bennett, M., Kumar, V., 1998. Natural killer cell differentiation: insights from knockout and transgenic mouse models and in vitro systems. *Immunol Rev* 165, 47–61. <https://doi.org/10.1111/j.1600-065x.1998.tb01229.x>
- Wilson, M.J., Lindquist, J.A., Trowsdale, J., 2000. DAP12 and KAP10 (DAP10)-novel transmembrane adapter proteins of the CD3zeta family. *Immunol Res* 22, 21–42. <https://doi.org/10.1385/IR:22:1:21>

- Wright, P.A., 2020. Killer-cell immunoglobulin-like receptor assessment algorithms in haemopoietic progenitor cell transplantation: current perspectives and future opportunities. *HLA* 95, 435–448. <https://doi.org/10.1111/tan.13817>
- Xiong, S., Sharkey, A.M., Kennedy, P.R., Gardner, L., Farrell, L.E., Chazara, O., Bauer, J., Hiby, S.E., Colucci, F., Moffett, A., 2013. Maternal uterine NK cell-activating receptor KIR2DS1 enhances placentation. *J Clin Invest* 123, 4264–4272. <https://doi.org/10.1172/JCI68991>
- Yagita, H., Takeda, K., Hayakawa, Y., Smyth, M.J., Okumura, K., 2004. TRAIL and its receptors as targets for cancer therapy. *Cancer Sci* 95, 777–783. <https://doi.org/10.1111/j.1349-7006.2004.tb02181.x>
- Yanada, M., Matsuo, K., Suzuki, T., Naoe, T., 2006. Allogeneic hematopoietic stem cell transplantation as part of postremission therapy improves survival for adult patients with high-risk acute lymphoblastic leukemia: a metaanalysis. *Cancer* 106, 2657–2663. <https://doi.org/10.1002/cncr.21932>
- Yu, X., Harden, K., Gonzalez, L.C., Francesco, M., Chiang, E., Irving, B., Tom, I., Ivelja, S., Refino, C.J., Clark, H., Eaton, D., Grogan, J.L., 2009. The surface protein TIGIT suppresses T cell activation by promoting the generation of mature immunoregulatory dendritic cells. *Nat Immunol* 10, 48–57. <https://doi.org/10.1038/ni.1674>
- Zamai, L., Ahmad, M., Bennett, I.M., Azzoni, L., Alnemri, E.S., Perussia, B., 1998. Natural killer (NK) cell-mediated cytotoxicity: differential use of TRAIL and Fas ligand by immature and mature primary human NK cells. *J Exp Med* 188, 2375–2380. <https://doi.org/10.1084/jem.188.12.2375>
- Zamai, L., Del Zotto, G., Buccella, F., Gabrielli, S., Canonico, B., Artico, M., Ortolani, C., Papa, S., 2020. Understanding the Synergy of Nkp46 and Co-Activating Signals in Various NK Cell Subpopulations: Paving the Way for More Successful NK-Cell-Based Immunotherapy. *Cells* 9. <https://doi.org/10.3390/cells9030753>
- Zeiser, R., Vago, L., 2019. Mechanisms of immune escape after allogeneic hematopoietic cell transplantation. *Blood* 133, 1290–1297. <https://doi.org/10.1182/blood-2018-10-846824>
- Zhang, C., Tian, Z., 2017. NK cell subsets in autoimmune diseases. *Journal of Autoimmunity, The Pathogenesis of Autoimmunity: Epigenomics and Beyond* 83, 22–30. <https://doi.org/10.1016/j.jaut.2017.02.005>
- Zhang, Q., Bi, J., Zheng, X., Chen, Y., Wang, H., Wu, W., Wang, Z., Wu, Q., Peng, H., Wei, H., Sun, R., Tian, Z., 2018. Blockade of the checkpoint receptor TIGIT prevents NK cell exhaustion and elicits potent anti-tumor immunity. *Nature Immunology* 19, 723–732. <https://doi.org/10.1038/s41590-018-0132-0>
- Zitti, B., Bryceson, Y.T., 2018. Natural killer cells in inflammation and autoimmunity. *Cytokine & Growth Factor Reviews, Innate lymphocytes: development, homeostasis and disease* 42, 37–46. <https://doi.org/10.1016/j.cytogfr.2018.08.001>

ANNEXE

Article

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

Léa Dubreuil^{1,2,3}, Bercein Maniangou^{1,2,3} , Patrice Chevallier^{2,3,4}, Agnès Quémener^{2,3} , Nolwenn Legrand^{1,2,3}, Marie C. Béné^{2,3,4,5} , Catherine Willem^{1,2,3}, Gaëlle David^{1,2,3}, Mehdi Alizadeh⁶, Dhon Roméo Makanga^{1,2,3}, Anne Cesbron^{1,7}, Ketevan Gendzekhadze⁸, Katia Gagne^{1,2,3,7,*}  and Christelle Retière^{1,2,3,*} 

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

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



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

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

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

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

1. Introduction

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

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

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

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

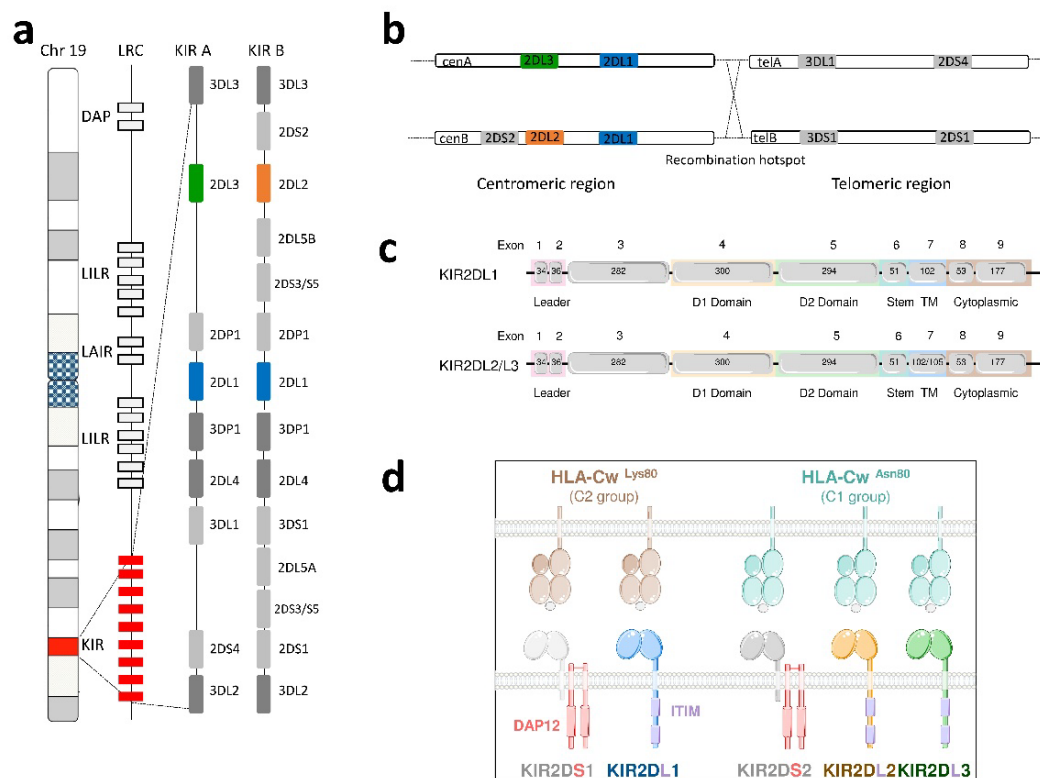


Figure 1. Localization, organization of Killer cell Immunoglobulin-like Receptors (KIR) genes and HLA-C specificity of KIR2DL interactions. KIR genes are located on chromosome 19 in the Leucocyte Region Complex (LRC), which also contains genes encoding DAP adaptor protein and other Natural Killer (NK)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

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

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

2. Results

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

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

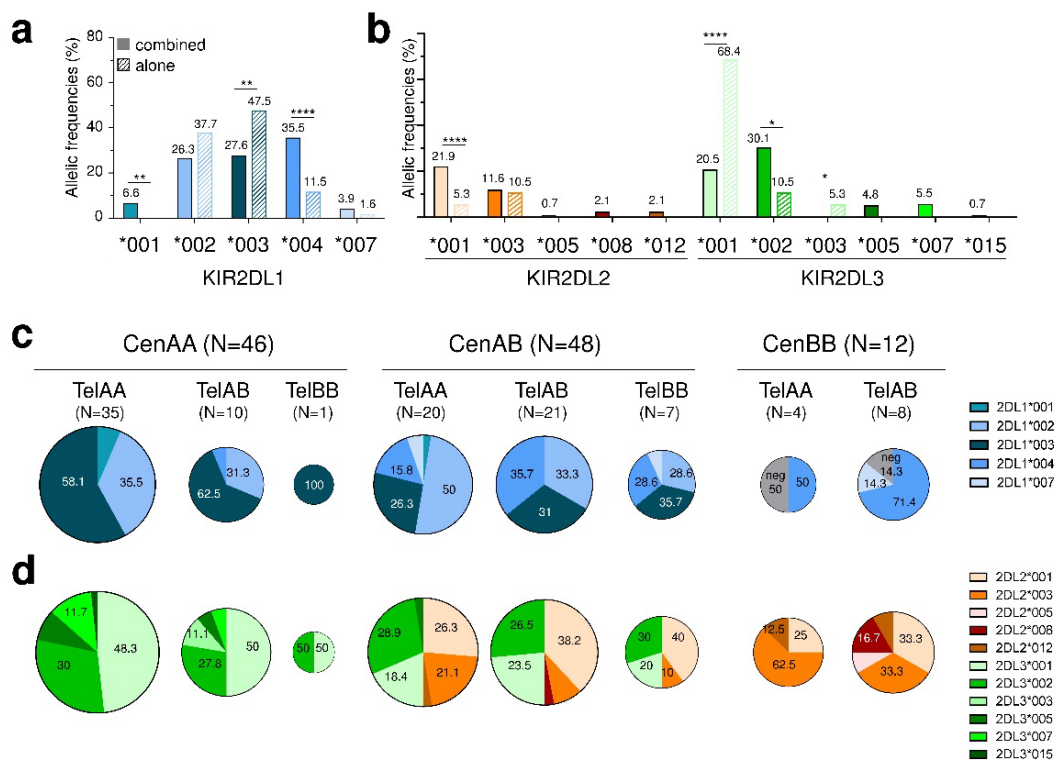


Figure 2. Predominant KIR2DL1*003 and KIR2DL3*003 alleles are frequently identified as unique allele and are associated with specific centromeric motifs. (a) KIR2DL1 allelic frequencies (%) established in blood donors either found alone (clear bars, $n = 59$) or combined with another KIR2DL1 allele (filled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

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

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

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

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

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

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

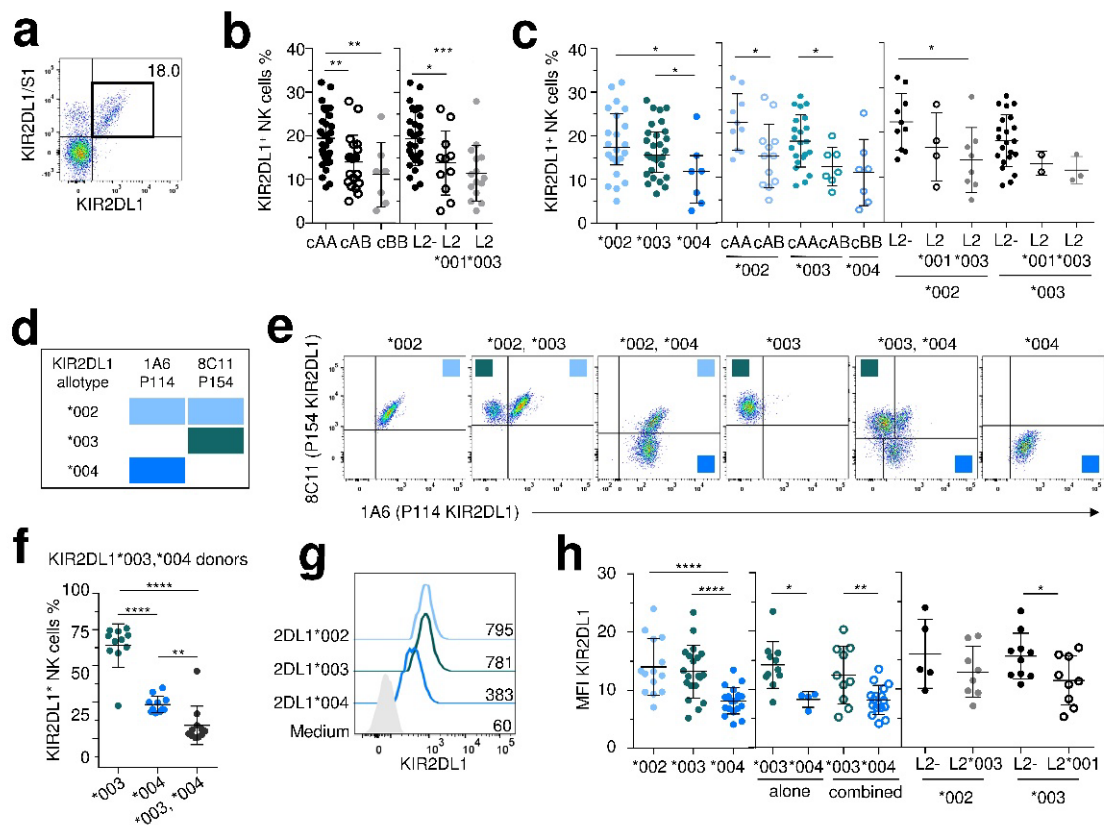


Figure 3. Predominant KIR2DL2 alleles associated with centromeric B+ motifs negatively affect both the frequency and the expression level of KIR2DL1 allotypes. (a) Density plot illustrating the cell targeting strategy used to target KIR2DL1 allotypes on NK (CD3⁺, CD56⁺) cells by combining anti-KIR2DL1/S1 (EB6) and a specific anti-KIR2DL1 mAbs. (b) Scatter plots showing the frequencies of KIR2DL1⁺ NK cells in individuals with centromeric (c) cAA (*n* = 32), cAB (*n* = 19), cBB (*n* = 7) motifs, and in 2DL2⁻ (*n* = 32), L2*001⁺ (*n* = 11) and L2*003⁺ (*n* = 15). (c) Scatter plots showing the frequencies of KIR2DL1⁺ NK cells in individuals with only one 2DL1 allele (L1*002⁺, *n* = 22, L1*003⁺, *n* = 29 and L1*004⁺, *n* = 7), in cAA (L1*002, *n* = 10, L1*003, *n* = 22), cAB⁺ (L1*002, *n* = 12, L1*003, *n* = 7) and cBB (L1*004, *n* = 7), in L1*002+/L2- (*n* = 10), L1*002/L2*001+ (*n* = 4), L1*002/L2*003+ (*n* = 8), L1*003+/L2- (*n* = 22), L1*003/L2*001+ (*n* = 2) and L1*003/L2*003+ (*n* = 3) individuals. (d) Site recognition of specific anti-KIR2D 1A6 and 8C11 mAbs and corresponding binding to main KIR2DL1 allotypes. (e) Density plots illustrating the overall strategy used to target KIR2DL1 allotypes on NK cells in 6 representative individuals using 1A6 and 8C11 mAbs combination. (e) Squares with the blue-scale gradient used in (d) lead to identify NK cell subset expressing each KIR2DL1 allotype. (f) Scatter plots showing the frequency of KIR2DL1⁺ NK cells in 11 L1*003, *004 individuals. (g) MFI of KIR2DL1 on NK cells depending on KIR2DL1 allotype. (h) Relative MFI of KIR2DL1 represents the ratio of the MFI of KIR2DL1 on the MFI of the isotype control for each KIR2DL1 allotype (L1*002⁺, *n* = 14, L1*003⁺, *n* = 20 and L1*004⁺, *n* = 20), as unique KIR2DL1 allele (alone, L1*003, *n* = 11, L1*004, *n* = 4) or combined with another KIR2DL1 allele (combined, L1*003, *n* = 10, L1*004, *n* = 16), and in L2⁻ (L1*002⁺, *n* = 5, L1*003, *n* = 10), L2*003+ (*n* = 8) or L2*001+ (*n* = 9) individuals. * *p* < 0.05, ** *p* < 0.01, *** *p* < 0.001, **** *p* < 0.0001.

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

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

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

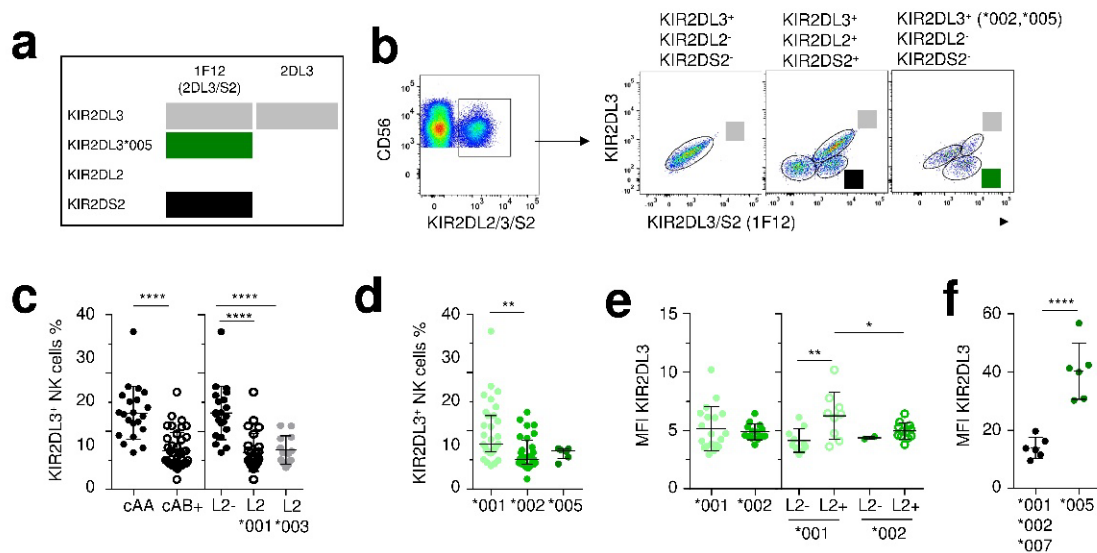


Figure 4. The KIR2DL2 gene specific of centromeric B⁺ motifs positively affects the expression level of the dominant KIR2DL3*001 allotype. (a) KIR2DL2/3/S2 recognition of anti-KIR2DL3 mAbs and an anti-KIR2DL3/S2 (1F12) mAbs. (b) Density plots illustrating the overall strategy used to target KIR2DL3 allotypes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

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

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

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

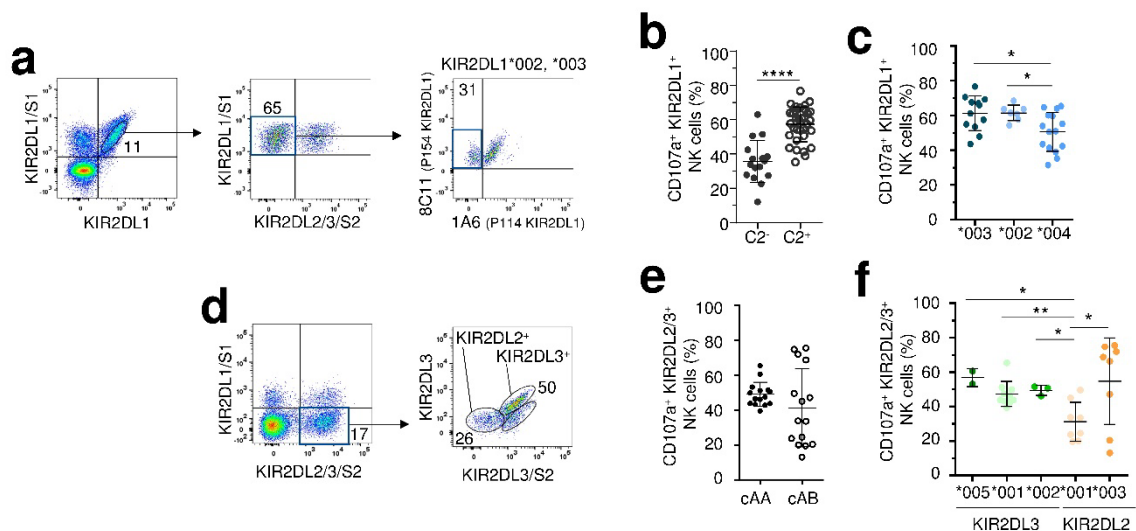


Figure 5. CenAA KIR2DL allotypes are associated with an efficient NK cell responsiveness. (a) Density plots illustrating the targeting strategy of KIR2DL1⁺/2/3/S1/S2⁻ NK cells. A first combination of anti-KIR2DL1 and anti-KIR2DL1/S1 (EB6) leads to target KIR2DL1⁺ KIR2DS1⁻ NK cells. A second combination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

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

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

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

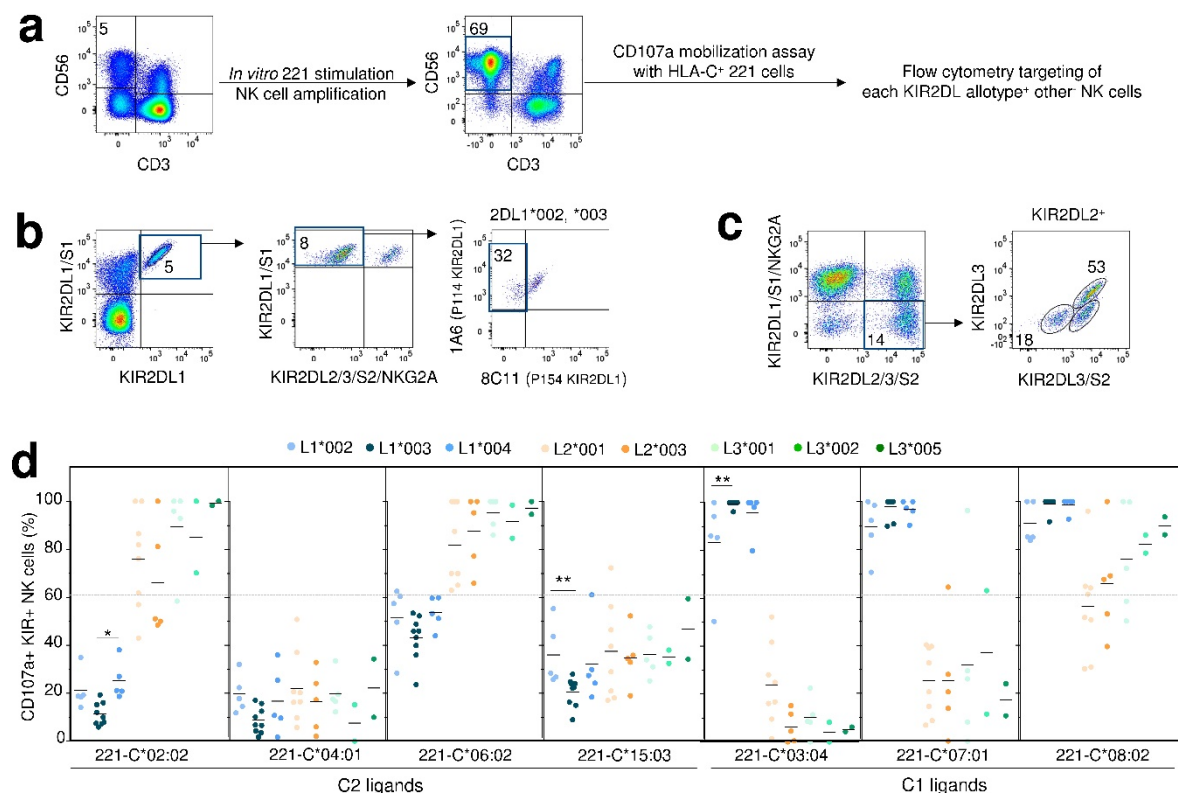


Figure 6. Broad disparity of HLA-C recognition between studied KIR2DL allotypes. (a) Strategy to analyze the degranulation potential of pre-stimulated KIR2D⁺ NK cells, against a panel of HLA-Cw transfected 721.221 cell lines. Density plots illustrating the amplification of NK cells (CD3⁻ CD56⁺) after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

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

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

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

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

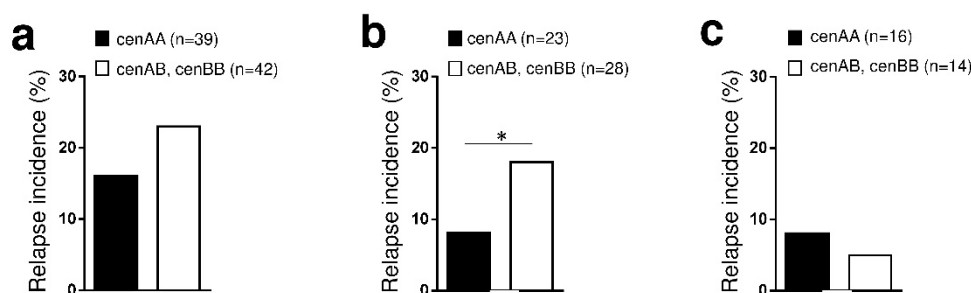


Figure 7. Beneficial impact of cenAA HSC donors on relapse incidence after T replete haplo-identical Hematopoietic Stem Cell Transplantation (HSCT) in myeloid diseases. Relapse incidence (%) observed after T-replete haplo-identical HSCT with post-transplant cyclophosphamide depending on donor centromeric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

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

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

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

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

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

3. Discussion

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

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

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

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

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

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

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

4. Materials and Methods

4.1. Healthy Individuals

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

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

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

consisted of a Baltimore-based RIC regimen with fludarabine ($n = 26$) [50] or clofarabine (Clo-Baltimore, $n = 27$) [51] or a CloB2A1 regimen with clofarabine 30 mg/m²/day (d), d-6 to -2, busulfan 3.4 mg/kg d-3 and d-2, and ATG 2.5 mg/kg d-1 ($n = 28$) [52]. The source of graft was peripheral blood stem cell (PBSC) for all cases. The study complies with the Declaration of Helsinki. All patients provided informed consent for collecting their own data from the PROMISE database of the European Bone Marrow Transplantation (EBMT). This study was approved by the Ethics Review Board of the Nantes University Hospital and all patients and HSC donors provided informed consent. The clinical outcome and immune reconstitution of some patients have been previously reported [30,53] and have been updated in October 2020 for this study. The primary endpoint was relapse incidence.

4.3. Cells (PBMCs and Cell Lines)

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

4.4. HLA Class I and KIR Genotyping

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

4.5. Phenotypic Analysis and CD107a Mobilization Assay Using Flow Cytometry

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

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

4.6. Statistical Analysis

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

5. Conclusions

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

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

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

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

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

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

Appendix A

Modelling of KIR2DL1/HLA-Cw4 Complexes

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

San Diego), and then manually optimized. The X-ray crystallographic structure of the KIR2DL1 bound to HLA-Cw4 (PDB code 1IM9) was used to obtain the structural models of the KIR2DL1 allotypes/HLA-Cw4 complexes. The structure was first prepared by adding hydrogen atoms, removing water molecules, and inserting the missing loop region using the Prepare Protein tool within DS. Non-bound KIR2DL1*002 allotype structure was extracted from the prepared structure complex (100% identity) and used to obtain the structural model of the two other non-bound KIR2DL1 allotypes (*003 and *004) using the “Build Mutant” tool of DS with secondary restraints and a distance cut-off of 5 Å centered on the mutate residues for including neighboring residues in optimization. The generated models were checked using Verify_3D (<https://servicesn.mbi.ucla.edu/Verify3D>) and Procheck (<https://servicesn.mbi.ucla.edu/PROCHECK>) programs and the structures with the best stereochemical and folding qualities were retained. The structural models of the KIR2DL1 allotypes have then undergone a series of energy minimizations with CHARMM force field implemented under DS in a two-step procedure to relax progressively the structures (1: all heavy atoms fixed; 2: heavy atoms of the backbone fixed) using steepest descent steps with convergence obtained at 0.001 and 0.01 rmsg respectively. Finally, the structural models of the three KIR2DL1 allotypes bound to the HLA-Cw4 molecule were obtained by superimposing the three non-bound KIR2DL1 allotype structural models into the prepared KIR2DL1/HLA-Cw4 complex structure. A last minimization step (steepest descent with convergence obtained at 0.01 rmsg and fixed constraints for the backbone atoms and for the heavy atoms of all residues outside the KIR2DL1/HLA-Cw4 interface) was then carried out to avoid atom clashes and to optimize interactions in the interface.

References

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

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

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

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

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



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

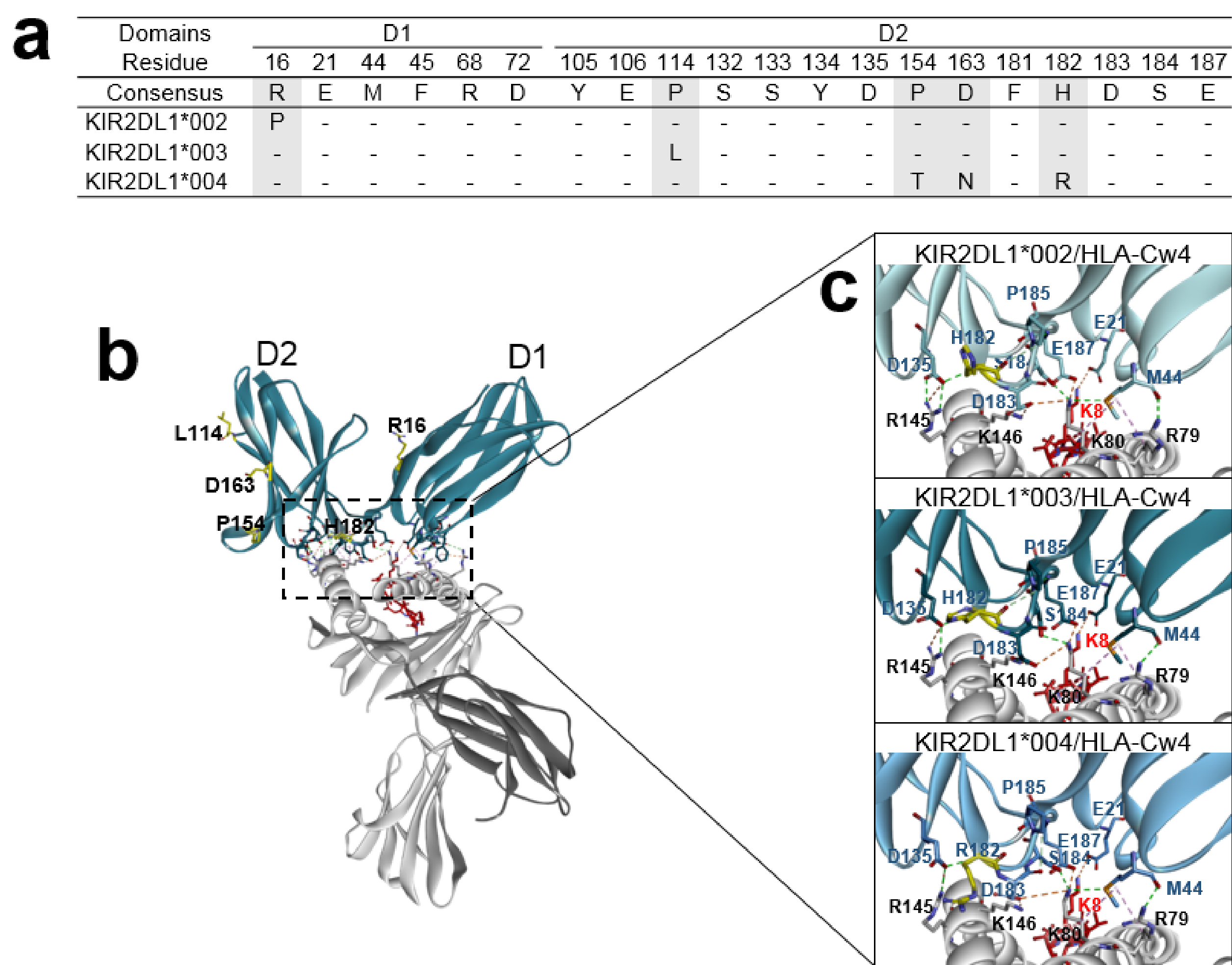


Figure S1. Structural model of KIR2DL1 allotypes complexed with HLA-Cw4 molecule. (a) Alignment of partial amino acid sequences of D1 and D2 domains for three KIR2DL1 allele-encoded receptors (allotypes). Identity with the consensus sequence is indicated by dashes “-”, the polymorphic residues are highlighted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

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

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

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

Table S2. Characteristics of patients

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

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

Titre : Contribution à l'étude des fonctions anti-tumorales des cellules Natural Killer (NK) : implication en greffe de cellules souches hématopoïétiques et dans le contexte des immunothérapies

Mots clés : Cellules NK, KIR, HLA, Leucémies, Greffe de Cellules Souches Hématopoïétiques (CSH), Immunothérapies

Résumé : La greffe de Cellules Souches Hématopoïétiques (CSH) haplo-identiques non-T déplétées avec utilisation de Cyclophosphamide Post-transplant (PTCy) pour la prophylaxie de la maladie du greffon contre l'hôte (GvHD) est indiquée pour le traitement des leucémies aiguës en l'absence de donneurs HLA identiques. Ces greffes présentent des incompatibilités HLA de classe I entre le donneur et le receveur propices aux alloréactivités des cellules Natural Killer (NK) qui ont une fonction anti-leucémique importante. Cependant, le rôle des cellules NK dans cette modalité de greffe reste à l'heure actuelle peu documenté. Dans ce travail, nous avons montré que les incompatibilités KIR/HLA entre le donneur et le receveur étaient associées à plus de GvHD aiguë et moins de rechute après greffe-PTCy, participant à l'activation et la différenciation plus précoce des cellules NK. Par la suite, nous avons montré que l'association du PTCy avec l'anti-thymoglobuline (ATG) réduit l'incidence de GvHD aiguë sans augmenter la rechute après greffe-PTCy. Dans le but d'identifier les sous-populations NK avec une forte potentialité anti-leucémique, nous avons défini 9 sous-populations NK sur la base de marqueurs de différenciation

des cellules NK et réalisé des études *in vitro* du potentiel fonctionnel de chacune de ces populations NK contre des cibles leucémiques. Nos résultats montrent que les sous-populations NK NKG2A⁺ sont les plus efficaces contre les leucémies aiguës lymphoïdes (LAL) et représentent les sous-populations NK les plus fréquentes du répertoire de cellules NK. En revanche, les sous-populations NK CD57⁺ et/ou KIR⁺, faiblement représentées dans le répertoire de cellules NK, sont les plus efficaces contre les leucémies aiguës myéloïdes (LAM). La reconstitution rapide de certaines sous-populations NK, comme celles exprimant le récepteur NKG2A par exemple, semble être associée à la réduction de rechute après greffe-PTCy. Par ailleurs, nous avons développé une autre étude mettant en évidence que le faible nombre de ligands KIR chez des patients atteints de lymphomes Non-Hodgkiniens (LNH) favorise une bonne réponse des cellules NK dépendante du rituximab. En conclusion, nos données peuvent aider, d'une part, à optimiser la sélection de donneurs de CSH et, d'autre part, à renforcer la prédiction des réponses au rituximab chez les patients atteints de LNH en prenant en compte les paramètres immunogénétiques KIR/HLA.

Titre : Contribution to the study of the anti-tumor functions of Natural Killer cells (NK) : involvement in Hematopoietic Stem Cell Transplantation (HSCT) and in the context of immunotherapies

Keywords : NK cells, KIR, HLA, Leukemia, Hematopoietic Stem Cell Transplantation (HSCT), Immunotherapy

Abstract: T cell-replete haplo-identical Hematopoietic Stem Cell Transplantation (HSCT), using Post-transplant Cyclophosphamide (PTCy) as a treatment for Graft-versus-Host-Disease (GvHD), constitute a potential curative treatment for leukemic patients without identical HLA donor. These graft modalities present HLA class I incompatibilities between donor and recipient that could sustain Natural Killer (NK) cell alloreactivity with an important anti-leukemic function. However, the role of NK cells in this modality of transplantation remains poorly understood. In this work, we showed that KIR/HLA incompatibilities between donor and recipient were associated with more acute GvHD and less relapse after PTCy-HSCT, participating in the activation and earlier differentiation of NK cells. Subsequently, we showed that the association of PTCy with Anti-thymoglobulin (ATG) could reduce the incidence of acute GvHD without increasing relapse after PTCy-HSCT. In order to identify NK cell subsets with high anti-leukemic potential, we defined 9 NK cell subsets based on NK cell differentiation markers and performed *in vitro* studies of the functional

potential of each of these NK populations against leukemic targets. Our results show that NKG2A⁺ NK cell subsets are the most effective against acute lymphoid leukemia (ALL) targets and represent the most frequent NK cell subsets in the NK cell repertoire. In contrast, CD57⁺ and/or KIR⁺ NK cell subsets, poorly represented in the NK cell repertoire, were the most effective against acute myeloid leukemia (AML) targets. The rapid reconstitution of certain NK cell subsets, such as those expressing NKG2A for example, seems to be associated with the reduction of relapse after PTCy-HSCT. Furthermore, we have investigated the influence of KIR/HLA interactions on Antibody Dependent Cellular Cytotoxicity (ADCC) modulation, showing that the low number of KIR ligands in lymphoma patients favors a good rituximab-dependent NK cell responses. In conclusion, our data may help to optimize the selection of HSC donors and improve the prediction of rituximab responses in lymphoma patients by taking into account immunogenetic KIR/HLA parameters.