UNIVERSITÉ DE LORRAINE | BIBLIOTHÈQUES UNIVERSITAIRES

AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact bibliothèque : ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr
(Cette adresse ne permet pas de contacter les auteurs)

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4
Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10
http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php
http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm

École Doctorale BioSE (Biologie – Santé – Environnement)

Thèse

Présentée et soutenue publiquement pour l'obtention du titre de

DOCTEUR DE l'UNIVERSITÉ DE LORRAINE

Mention « Sciences de la Vie et de la Santé »

par **Adèle DHUYSER**

Compatibilité donneur/receveur en dehors du polymorphisme HLA au décours de l'allogreffe de cellules hématopoïétiques : les gènes KIR et les antigènes mineurs d'histocompatibilité

le **5 mai 2025**

Présidente du jury :	Pr Marie-Thérèse RUBIO	PU-PH, IMoPA UMR 7365, Nancy
Rapporteurs :	Pr Paul ROUZAIRE	PU-PH, EA 7453 CHELTER, Clermont-Ferrand
	Dr Nicolas VINCE	Chargé de recherche, CR2TI UMR 1064, Nantes
Examinateur :	Dr Etienne DAGUINDAU	MCU-PH, UMR1098 RIGHT, Besançon
Membres invités :	Dr Valérie DUBOIS	Biologiste HLA, EFS Auvergne Rhône-Alpes, Lyon
	Dr Hugues RICHARD	Bioinformaticien, MF1 Robert Koch Institut, Berlin
Directeur de thèse :	Pr Laurent MESNARD	PU-PH, CoRaKiD UMRS 1155, Paris
Co-directrice de thèse :	Pr Alice AARNINK	PU-PH, IMoPA UMR 7365, Nancy

UMR 7365 CNRS – Université de Lorraine, Ingénierie Moléculaire et Physiopathologie Articulaire (IMoPA)
Campus Santé Brabois – 9, Avenue Forêt de Haye 54500 Vandoeuvre-lès-Nancy

REMERCIEMENTS

A nos juges et rapporteurs,
Monsieur le Professeur Paul Rouzaire,
Monsieur le Docteur Nicolas Vince,

Vous nous faites l'honneur de juger ce travail.
Je vous remercie de l'intérêt porté à nos travaux et de l'enthousiasme et la promptitude avec lesquels vous avez accepté d'être les rapporteurs de ce manuscrit. Je quitte à regret la bienveillante exigence de la SFHI – que vous me semblez incarner à l'occasion de cette soutenance – pour rejoindre sa sœur allemande, la DGI, mais je me réjouis par avance des opportunités professionnelles qui feront se recroiser nos chemins.
J'espère que ce travail sera à la hauteur de vos exigences.

A notre juge et présidente du jury,
Madame la Professeure Marie-Thérèse Rubio,

Vous nous faites l'honneur de juger ce travail.
J'espère que vous retrouverez dans ce manuscrit un peu de l'héritage hématologique qu'il me reste, et je souhaite très humblement que sa lecture vous intéressera. J'espère que vous apprécierez ce travail et qu'il sera à la hauteur de vos exigences.

A notre juge,
Monsieur le Docteur Etienne Daguindau,

Vous nous faites l'honneur de juger ce travail.
Je vous remercie chaleureusement du temps que vous nous accordez. J'espère que ce manuscrit dans un premier temps, puis la soutenance, seront à la hauteur de vos exigences.

A Madame la Docteure Valérie Dubois,

Je suis heureuse de vous compter parmi nos membres évaluateurs et je vous remercie d'avoir accepté notre invitation. J'espère que ce travail sera à la hauteur de vos exigences.

A Monsieur le Docteur Hugues Richard,

Hugues,
Merci pour ta confiance et ton approche macroscopique des problématiques ! L'interdisciplinarité n'est pas une chose facile mais je pense que nous nous en sommes plutôt bien tirés ! Je continuerai mon chemin consciente d'une autre vision de la recherche, décentrée de la paillasse, pleine de statistiques expliquées à la craie sur le tableau noir du bureau. Peut-être même aurais-je gagné quelques compétences en python (qui l'eut cru ?). Merci pour ton chaleureux accueil à Berlin, et ce petit bout de France au RKI. Merci pour cette main tendue à chaque fois au bon moment. J'ai une pensée chaleureuse pour Miriam, pour les petits plats par procuration et sa présence bienveillante.

A notre directeur de thèse,
Monsieur le Professeur Laurent Mesnard,

Laurent,
Merci pour ta confiance et tout l'écosystème humain, technique et matériel dont j'ai pu profiter sur le projet « allogenomics ». Je suis heureuse d'avoir pu faire un bout de route avec toi sur ce projet que j'ai adoré, du début à la fin.

A notre co-directrice de thèse,
Madame la Professeure Alice Aarnink,

Alice,
Que dire ? Je pourrais écrire une autre thèse sur ce que je te dois. Je peine à mesurer la chance que j'ai eue d'apprendre et de grandir à tes côtés. En huit ans, ton intelligence scientifique, clinique, managériale, émotionnelle n'a jamais cessé de me surprendre. Je ne saurais pas assez exprimer toute la gratitude, l'honneur, et peut être la fierté que je ressens d'avoir fait partie de ton équipe. J'espère exporter un peu de ton savoir-faire, de ton savoir-être, et de ton savoir tout court, avec moi.
Merci pour tout. Tu vas terriblement me manquer.

Par ordre chronologique des projets cliniques et scientifiques :

A L'ÉQUIPE DU LABORATOIRE HLA DU CHRU DE NANCY

Au docteur Michaël Pérès,
Michaël, quel plaisir j'ai eu à être ta collègue !
Je te remercie de m'avoir formée au HLA avec (beaucoup de) bienveillance et (vraiment beaucoup de) patience. Je mesure la chance que j'ai eue d'évoluer entourée d'encyclopédies humaines en immunologie ! Ce travail n'aurait pas été possible sans toi, et il t'appartient autant qu'à Alice et moi.

Au docteur Thomas Morel,
Thomas, merci pour tout le travail clinique abattu qui m'a permis de me concentrer sur la recherche. J'espère te retrouver un jour sur les routes du HLA, ou sur celles du Maïdo !

A Sandra Clément,
Sandra, je te remercie pour ton soutien cent fois renouvelé. Merci pour cette grande rigueur que j'espère avoir apprise à tes côtés, tout en humanité. Je vais avoir le temps de lire les autres BD de Riad Sattouf désormais !

Aux secrétaires d'enfer,
A Julie-Fane, Letittia, Emilie, pour cette petite bulle cosy au secrétariat et ces rires joyeux et communicatifs !

A l'ensemble des techniciens,
A Julie et Justine pour le séquençage des exomes.
A Sandrine, Anne-Sophie et Anna pour la gestion de la biobanque ! Je mesure le travail faramineux réalisé…
A Gaëtan et Stéphanie, pour leur disponibilité, l'aide informatique et les questions LymFIP.
A Muriel pour son accompagnement en qualité et les pérégrinations passionnantes de ses « deux grands fils ».
A Charlotte, Béren, Rosalba, Aurélie, Sabrina.
Aux « anciennes » et notamment Anne-Cécile et Claire qui m'ont initiée à la biologie moléculaire.

A nos cadres de santé,
Lorène et Karine.

Aux autres collègues avec qui j'ai eu la chance de travailler,
A Rébecca qui m'a donné le virus du HLA.
A Noémie, pour la suite du HLA et les moments confinés à Paris.
A Safa et Maël, je vous souhaite un parcours personnel et professionnel à la hauteur de vos ambitions, vous le méritez ! Foncez !

Et plus particulièrement :
A Julie encore, pour les « à-côtés boulangers » qui vont me manquer ! Je vous souhaite beaucoup de réussite pour la suite de cette aventure !
A Gaëtan encore, pour l'accueil à Gondreville, la patience dans l'explication des jeux de société et tout le reste !

A L'ÉQUIPE DU DEPARTMENT OF PATHOLOGY DE CAMBRIDGE

Au docteur James Traherne,
Au docteur John Trowsdale,
Thank you for trusting me and allowing me to join your prestigious team, for supporting the NK project until the end despite the many obstacles and moments of doubt. Can't wait to read "What the Body Knows" !!

A Jyothi Jayaraman, Neda Nemat-Gorgani, Vita Chamberlain-Evans,
Thank you for making Cambridge so welcoming !

A L'ÉQUIPE DU PROJET ALLOPIPE

Au docteur Pierre Laville,
Pierre, le projet « AlloPipe » te doit beaucoup, et je te dois encore plus.
Merci pour ta disponibilité, ta confiance, ta gentillesse et ta patience. Je te souhaite un avenir radieux, professionnel et personnel. Nos échanges vont me manquer. « AH ! »

A Pierre Delaugère,
Pierre, merci pour tout ce que tu as apporté au projet « AlloPipe » et pour cette introduction *en douceur* à la bioinformatique. C'est bien évidemment faux, j'ai souffert par tous les pores pendant des mois avec nos histoires de compilateur. Merci pour ta patience et ton travail !

A L'ÉQUIPE DU PROJET PÉDAGOGIQUE « COMPRENDRE L'ALLORÉACTIVITÉ »

A Anselma Boulanger,
Anselma, merci pour ta disponibilité et ton soutien. Ce site n'aurait pas été le même sans toi ! Merci pour tes encouragements dans la dernière ligne droite.

A Jeanne Lepoix, à Cassandra Michel,
Pour ces jolies illustrations !

A Ambre Maciel, à Patrick Cathala,
Pour avoir coordonné tout ce travail et cru dans notre capacité à mener à bien le projet.

A TOUS CEUX QUI CONTRIBUENT SANS S'EN APERCEVOIR

Au docteur Anne-Béatrice Notarantonio, au docteur Chrystel Marton,
Au plaisir que j'ai de vous rencontrer au détour d'un congrès ou d'une conversation scientifique impromptue, et pour l'amitié scientifique – mais pas que – qui nous lie.

A Yann Merlet,
Pour toute ton aide au séquençage de nos premiers exomes !

Au docteur Jean-Marie Ravel,
Merci pour les « tips » administratifs !

Aux chercheurs du Robert Koch Institut,
Martin, thank you again for your warm welcome and your trust.
Sofia, for our small talks, scientific and otherwise, and that lilting accent.
JB, pour les sirènes, le réveil-matin, et surtout, surtout ta patience quand je parle trop…

Après dix ans (déjà … !) passés au sein du CHRU de Nancy, il est évidemment impossible de citer tout le monde. J'ai une pensée particulière pour les collègues du laboratoire : l'équipe de génétique, l'équipe d'hémostase, l'équipe de toxicologie, Élise et Ma'atem, les techniciens du plateau, les internes et les externes avec qui j'ai eu la chance de travailler, et tant d'autres … Merci pour les interactions professionnelles riches et fructueuses. Je glisse une phrase à l'attention du personnel de l'ombre des différents instituts où j'ai travaillé, notamment les agents d'entretien …

AUX DIFFÉRENTS ORGANISMES OU ASSOCIATIONS,
qui ont soutenu une ou plusieurs parties de ce projet

- **L'association « les Kayaks de l'espoir »**
- **L'université de Lorraine**
- **La Société Francophone d'Histocompatibilité et d'Immunogénétique (SFHI)**
- **L'association « Laurette Fugain »**
- **La Sorbonne Université Maison des Modélisations Ingénieries et Technologies (SUMMIT)**
- **Les laboratoires Sanofi**

AUX PATIENTS AYANT ACCEPTÉ DE FAIRE PARTIE DE NOS ÉTUDES

Preuve d'une constance dont je ne peux que remercier les personnes citées ci-après, je suis heureuse de reporter les remerciements plus personnels écrits à l'occasion de ma thèse d'exercice, il y déjà 5 ans.
La liste s'est allongée au gré des unions et des naissances, mais aussi des nouveaux compagnons de route rencontrés plus tardivement. Je chéris tout particulièrement ces amitiés, longues de 25 ans ou plus récentes, qui m'inspirent et – je le crois – m'élèvent. Le manque de temps étant flagrant à quelques jours de rendre ce manuscrit, j'update *en italique* les changements notables !

A mes parents, Éric et Isabelle,
Vous m'avez donné les clés de l'indépendance et j'ai cultivé grâce à vous la plupart des valeurs que je chéris : la liberté, la tolérance, la solidarité et une vision humaniste de notre société. Votre éducation est le bien le plus précieux que vous m'ayez donné. Merci d'avoir cru pour moi en un idéal dans lequel tout est possible, et de m'avoir encouragée à croire en mes rêves en toutes circonstances.
A mon frère, Louis
Je t'aime et je serai toujours là pour toi.
A ma Tatie, Mareysia
Je te dois tellement. Depuis ma naissance, tu m'apprends à aimer la vie, à garder le meilleur et me débarrasser du reste. Ta maison et tes bras ont toujours été mon refuge. Merci pour ton soutien indéfectible, pour tes mots toujours réconfortants, pour ta présence tout simplement.

A mes ami(e)s, que ni les années ni les kilomètres n'éloignent :
A Lucie, depuis le début, parce que « pourquoi pas nous ?! ». *Devenue marraine de Gabriel, et c'est à ce jour le rôle dont je suis la plus fière. La famille s'est depuis agrandie avec Théo, et il me tarde de rendre ce travail pour venir vous rendre visite !*
A Gaëlle, pour ta bienveillance et notre petit ilot hors des soucis au 207, rue Alexandre Detroy.
A France, pour ta fraicheur, ta force et ta détermination sur lesquelles j'ai souvent pris exemple. *Merci Nico pour les punchlines, je te mets 10/10 !*
A Davelouz (*désolée, même ici Hélène ça ne passe toujours pas*) pour ta patience et ta juste mesure en toutes circonstances. *Nicolas est né et c'est un bonheur de le voir grandir.*
A Aurélien, pour tous ces moments partagés sans que je ne puisse me souvenir d'un seul nuage. *Alors toi copain, tu as fait le strike en 5 ans ! Une maison, deux enfants, et bientôt un mariage ? (ça c'est pour toi, Caro !)*
A Emilien, pour ton accueil à Paris et ton soutien cent fois renouvelés. *On se voit bientôt à Besak !*

A ma famille nancéienne : Martin, Fabien, Morgane *et Loulou*, vous avez illuminé mes jours en Lorraine et vous m'avez tant apporté. Du trajet partagé le tout premier jour de notre internat à la perspective des nombreux moments qui nous attendent, en passant par notre mémorable colocation, je peux affirmer que notre rencontre valait bien ces années passées en Lolo. Je vous aime très fort tous les quatre. #RYL #pobien #dictature #Céline. *Je vous aime encore plus fort qu'avant.*

A Julie & Eve, à Emile, *merci pour votre douceur, votre amitié, votre soutien et tout le réconfort que j'ai trouvé auprès de vous. J'ai hâte de rencontrer « Pâques » !*
A Mélissa, Tom, Anne-Julie et Clément *pour ces moments simples et heureux partagés ensemble.*
A Anaïs & Estelle, à Simone, *quel plaisir de vous avoir retrouvées après les années lycée !*
A Laetitia, Alice et Léa, *to our Berliner life !*

Aux Pirates lillois : Alice, Delphine, Jérôme, Romain, Damien, François, Alex, Luc … et à tous celles et ceux qui se sont ajoutés à cette belle équipe au gré des mariages et plus récemment des bébés. Vive les tontons et les tatas Cannettes !

A mes « grandes familles » : merci de m'avoir soutenue par l'intérêt que vous montrez à mes projets.

A C. *qui a voulu ne pas être cité, puis peut-être, puis oui, puis re-non, et puis ça a tellement changé qu'on a oublié… Tu as évidemment ta place ici. A nous et à notre sérénité malgré les tumultes de la vie.*

TABLE DES MATIÈRES

REMERCIEMENTS
LISTE DES ABBRÉVIATIONS
LISTE DES FIGURES
LISTE DES TABLEAUX
AVANT-PROPOS ET EXPOSÉ SUCCINCT DES OBJECTIFS 1
PARTIE I – L'ALLORÉACTIVITÉ AU DECOURS DE L'ALLOGREFFE DE CELLULES HÉMATOPOÏÉTIQUES 3
1. NOTIONS INTRODUCTIVES 3
1. Le recours à l'allo-HCT 3
2. Le principe et les défis de l'allo-HCT 6
1. Principe, objectifs et complications de l'allo-HCT 6
2. Le défi du management de la GVHD 7
2. LES INCOMPATIBILITÉS, INITIATRICES DE L'ALLORÉACTIVITÉ 9
1. La compatibilité HLA 9
1. Introduction au système HLA 9
2. Les molécules HLA de classe I et II 10
3. Les recommandations pour le typage et l'établissement de la compatibilité HLA 13
1. La nomenclature HLA 13
2. Les recommandations pour le typage HLA 14
3. Les recommandations pour l'établissement de la compatibilité 15
4. Le choix du donneur 17
5. La question de la « meilleure incompatibilité » 18
2. La compatibilité en dehors du système HLA 20
3. L'ALLORÉACTIVITÉ AU DÉCOURS DE L'ALLO-HCT 23
1. L'alloreconnaissance 23
1. L'activation des lymphocytes T par réactivité croisée 23
2. L'alloreconnaissance dans l'allo-HCT 24
2. L'effet GVL 26
1. Effet GVL médié par les lymphocytes T 26
2. Effet GVL médié par les cellules NK 27
3. La GVHD aiguë 27
4. La GVHD chronique 31
4. LES PARAMÈTRES IMPACTANT L'EXPRESSION DE L'ALLOREACTIVITÉ DANS L'ALLO-HCT 34
1. La pathologie sous-jacente 34
2. Le greffon 35
3. Management pré- et post-allo-HCT 37
1. Le conditionnement pré-greffe 37
2. La prévention de la GVHD 38
4. Autres traits phénotypiques 39

5. CONCLUSIONS ET OBJECTIFS DE THÈSE 42
PARTIE II – L'ACTIVATION DES CELLULES NK DANS L'ALLO-HCT À TRAVERS LE PRISME DU KIR-MISMATCH 44
1. INTRODUCTION 44
2. REVUE 45
3. ARTICLE 58
PARTIE III – L'ACTIVATION DES LYMPHOCYTES T DANS L'ALLO-HCT – INTÉRÊT DE L'IMMUNOPEPTIDOME 71
1. INTRODUCTION 71
1. La présentation antigénique et l'immunopeptidome 71
2. L'identification des antigènes mineurs d'histocompatibilité et l'outil AlloPipe 72
2. ARTICLE 74
PARTIE IV – DISCUSSIONS AUTOUR DES TRAVAUX, CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES 98
1. La nécessité de l'établissement d'une biobanque 98
2. Les travaux sur le système KIR 99
1. Les difficultés inhérentes au séquençage des gènes KIR par NGS 99
2. Les limitations de nos travaux 99
3. Etat de l'art actualisé 99
3. Le projet AlloPipe 100
1. Les difficultés liées à l'acquisition de données génomiques homogènes 100
2. Les limites conceptuelles de l'outil 102
3. Le défi de l'interprétation de la quantité de données générées 102
4. Conclusions finales et perspectives 104
1. Conclusions 104
2. Perspectives 104
BIBLIOGRAPHIE 108
LISTE DES VALORISATIONS ACADÉMIQUES 124
LISTE DES VALORISATIONS NON ACADÉMIQUES 126

LISTE DES ABBRÉVIATIONS

AA: Acide Aminé
ABM: Agence de la BioMédecine
ADCC: Antibody-Dependent Cellular Cytotoxicity
AID: AutoImmune Diseases
AL (amylose AL) : amylose à chaines légères
ALL: Acute Lymphocytic Leukemia
allo-HCT: allogeneic Hematopoietic Cell Transplantation
AML: Acute Myeloid Leukemia
AMS: Allogenomic Mismatch Score
ATG: Anti-ThymoGlobulin
auto-HCT: autologous Hematopoietic Cell Transplantation
Bcl-2: B-cell lymphoma 2
BMF: Bone Marrow Failure
BTK: Bruton's Tyrosine Kinase
CAR-T: Chimeric Antigen Receptor T-cell
CIITA: Class II major histocompatibility complex TransActivator
CLIP: CLass II associated Invariant chain Peptide
CLL: Chronic Lymphocytic Leukemia
CMH: Complexe Majeur d'Histocompatibilité
CML: Chronic Myeloid Leukemia
CMV: Cytomegalovirus
CPAp: Cellule Présentatrice de l'Antigène professionnelle
CR: Complete Remission
CREG: Cross-REactive Group
CSP: Cellules Souches Périphériques
DSA: Donor Specific Antibody
EBMT: European Society for Blood and Marrow Transplantation
EFI: European Federation for Immunogenetics
ERAP: Endoplasmic Reticulum Amino-Peptidase
ERT: Enzyme Replacement Therapy
FLT3: fms related receptor tyrosine kinase 3
FLT3-ITD: Internal Tandem Duplication de FLT3
G-CSF: Granulocyte Colony-Stimulating Factor
GTEx: Genotype-Tissue Expression Program
GVH: Graft-versus-Host
GVHD: Graft-versus-Host Disease
GVL: Graft-versus-Leukemia
HED: HLA Evolutionary Divergence
HG: Hémoglobinopathies
HL: Hodgkin Lymphoma
HLA: Human Leukocyte Antigen
HPN: Hémoglobinurie Paroxystique Nocturne
HVG: Host-versus-Graft
IDM: Inherited Diseases of Metabolism
IFN-γ: interféron γ
IgG: Immunoglobuline, isotype G
IgM: Immunoglobuline, isotype M
IL: Interleukine
ILC: Innate Lymphoid Cell
iNKT: invariant Natural Killer T-cell
NHL: Non Hodgkin Lymphoma
IPD-IMGT/HLA: Immuno-Polymorphism Database - ImMunoGeneTics / Human Leukocyte Antigen
ITK: Inhibiteur de Tyrosine Kinase

JMML: Juvenile MyeloMonocytic Leukaemia
KIR: Killer-cell Immunoglobulin-like Receptor
LBL: LymphoBlastic Lymphoma
MAC: MyeloAblative Conditioning
MAIT: Mucosal-Associated Invariant T cells
mDC: medullar Dendritic Cells
MDS MD/MPN overlap: Myelodysplastic or myelodysplastic/myeloproliferative neoplasia
MDSC: Myeloid-Derived Suppressor Cells
mHAgs: minor Histocompatibility Antigens
MICA/B: MHC Class I Chain-related protein A/B
MMF: Mycophenolate Mofétyl
MO: Moelle Osseuse
MPN: myeloproliferative neoplasm
MSC: Mesenchymal Stem Cells
mTEC: medullar Thymic Epithelial Cell
MTX: Methotrexate
NES: Nuclear Export Signal
NFAT: Nuclear Factor of Activated T-cells
NHL: Non Hodgkin Lymphoma
NIH: National Institute of Health
NK: Natural Killer
NKG2D: Natural Killer Group 2, Protein D
NMAC: Non-MyeloAblative Conditioning
NPM1: nucleophosmin 1
NRM: Non-Relapse Nortality
PCD: Plasma Cell Disorders
PCR: polymerase chain reaction
PD-1: Programmed Death 1
PD-L1: Programmed Death-Ligand 1
PID: primary immune deficiencies
PIRCHE: Predicted Indirectly ReCognizable HLA Epitopes
POEMS: Polyneuropathy, Organomegaly, Endocrinopathy, Myeloma, Skin
RIC: Reduced Intensity Conditioning
RTC: Reduced Toxicity Conditioning
SAA: Severe Aplastic Anemia
SCID: Severe Combined ImmunoDeficiency
SFGM-TC: Société Francophone de Greffe de Moelle et de Thérapie Cellulaire
SFHI: Société Francophone d'Histocompatibilité et d'Immunogénétique
SIRPα: SIgnal Regulatory Protein α
SNV: Single Nucleotide Variation
SSM: Sequence-Similarity Matching
TAA: Tumor Associated Antigens
TAP: Transporter associated with Antigen Processing
TBI: Total Body Irradiation
TCE: T-Cell Epitope
TCR: T-Cell Receptor
Tfh: T cells follicular helper
Tfr: T-cell follicular regulatory cells
TGF-β: Tumor Growth Factor β
TNF-α: Tumor Necrosis Factor α
TRA: Tissue Related Antigens
Treg: Regulatory T lymphocytes
TRM: Transplant-Related Mortality
USP: Unité de Sang Placentaire
VCF: Variant Calling Format
VEP: Variant Effect Predictor

VIH: Virus de l'Immunodéficience Humaine
WBMT: Worldwide network of Blood and Marrow Transplantation
β2m: β2 microglobuline

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Nombre absolu de patients recevant une première allo-HCT entre 1990 et 2023 en Europe.

Figure 2 : Evolution des types de donneurs recrutés pour une première allo-HCT entre 1990 et 2023 en Europe.

Figure 3 : Représentation des principaux gènes de la région 6p21.31, gènes du CMH de classe I et II.

Figure 4 : Schéma d'une molécule HLA de classe I et d'un peptide dans sa poche à peptide.

Figure 5 : Schéma d'une molécule HLA de classe II et d'un peptide dans sa poche à peptide.

Figure 6 : Schéma du sillon de la molécule HLA de classe I et des sites d'interaction HLA-TCR.

Figure 7 : Représentation des poches à peptides de la molécule HLA de classe I et II.

Figure 8 : Illustration des différents niveaux de résolution pour le typage HLA.

Figure 9 : Représentation des immunopeptidomes dans un couple donneur/receveur et des antigènes mineurs d'histocompatibilité en fonction du type d'allogreffe.

Figure 10 : Alloreconnaissance directe et indirecte.

Figure 11 : Représentation simplifiée des trois phases de la GVHD aiguë.

Figure 12 : Représentation simplifiée des trois phases de la GVHD chronique.

Figure 13 : Schéma des paramètres modulant l'expression de l'alloréactivité dans l'allo-HCT.

Figure 14 : Répartition des indications pour une première allo-HCT en 2022 en Europe.

Figure 15 : Représentation de quelques cytokines intervenant au décours de l'allo-HCT.

Figure 16 : Illustration des principales étapes de traitement bioinformatique après séquençage NGS, technologie Illumina.

Figure 17 : Représentation des principaux facteurs de variabilité au cours de la présentation antigénique.

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Indications de l'allo-HCT catégorisées par place dans la stratégie thérapeutique.

Tableau 2 : Classification des molécules HLA.

Tableau 3 : Polymorphisme des gènes HLA étudiés en pratique clinique.

Tableau 4 : Principe de la nomenclature HLA.

Tableau 5 : Etablissement des compatibilités HLA.

Tableau 6 : Comparaison simplifiée des différentes sources de greffon.

Tableau 7 : Forces, faiblesses, opportunités et menaces des laboratoires HLA accrédités EFI au regard de l'élargissement des caractéristiques génétiques impliquées dans l'histocompatibilité.

AVANT-PROPOS ET EXPOSÉ SUCCINCT DES OBJECTIFS

L'allogreffe est par nature responsable d'une situation hors-norme puisqu'elle consiste en la rencontre entre deux systèmes biologiques, celui d'un receveur avec une altérité, son donneur. La rencontre de ces deux entités génère un *conflit immunologique* dont l'expression biologique est *l'alloréactivité.* Cette définition sous-tend la notion de *compatibilité immunologique* entre le donneur et le receveur, tous deux uniques tant sur le plan constitutionnel que de leur histoire immunitaire.

Par définition, toutes les allogreffes sont susceptibles de générer de l'alloréactivité. En revanche les conséquences histologiques puis cliniques de l'alloréactivité, ainsi que leur intensité, différent en fonction des organes, des cellules ou des tissus transplantés.

Ce travail explore spécifiquement *l'alloréactivité au décours de l'allogreffe de cellules hématopoïétiques.*
Dans cette configuration, l'alloréactivité est exercée par le système immunitaire issu du donneur. Les cellules immunocompétentes contenues dans le greffon dans un premier temps, puis les cellules de l'immunité reconstituées à partir des progéniteurs également contenus dans le greffon, vont pouvoir s'activer contre des cellules et tissus immuno-accessibles du receveur.
Cette alloréactivité est à la fois responsable de l'effet *graft-versus-host (GVH)* – lorsque l'alloréactivité cible les tissus sains du receveur – et de l'effet *graft-versus-leukemia (GVL)* – lorsque l'alloréactivité cible les cellules tumorales du receveur.

Dans les indications non-malignes, l'effet GVL est par définition absent. Le principe thérapeutique de l'allogreffe est le remplacement du tissu hématologique pathologique du receveur par celui – sain – d'un donneur. L'objectif est de maintenir l'alloréactivité au niveau le plus faible afin de minimiser l'effet GVH délétère.
Dans les indications malignes en revanche – soit environ 80% des indications – le principe thérapeutique de l'allogreffe est celui d'une *immunothérapie* médiée par l'effet GVL. Ce n'est pas le plus faible niveau d'alloréactivité qui est recherché mais la meilleure alloréactivité, pourvoyeuse d'un effet GVL maximal et d'un effet GVH minimal. Cette *dimension qualitative de l'alloréactivité* impose la meilleure compréhension des mécanismes immunologiques mis en jeu afin d'en tirer *la meilleure balance GVL/GVH.*

Le *rôle de la compatibilité HLA* dans l'alloréactivité est clairement établi. Toutefois, les manifestations de l'alloréactivité – effet GVH, effet GVL – sont également présentes chez les receveurs greffés avec un donneur géno-identique, possédant strictement les mêmes molécules HLA. Cela signifie *qu'un ou plusieurs autre(s) système(s) intervien(nen)t nécessairement* dans l'initiation de l'alloréactivité.

L'objectif de ce travail est la meilleure compréhension des déclencheurs de l'activation des cellules de l'immunité responsables de l'alloréactivité, et notamment :
- L'activation des cellules NK à travers le prisme du KIR-mismatch
- L'activation des lymphocytes à travers le prisme de l'allogénomique

PARTIE I – L'ALLORÉACTIVITÉ AU DÉCOURS DE L'ALLOGREFFE DE CELLULES HÉMATOPOÏÉTIQUES

1. NOTIONS INTRODUCTIVES

1. Le recours à l'allo-HCT

Le dernier rapport du Worldwide Network of Blood and Marrow Transplantation (WBMT) de 2016 fait état de près de 40.000 greffes allogéniques de cellules souches (allogeneic haematopoietic cell transplantation, allo-HCT) réalisées à travers le monde chaque année dont plus de 15.000 en Europe (1), tandis que le rapport de l'European Society for Blood and Marrow Transplantation (EBMT) en rapporte plus de 20.000 en 2023 (2) de sorte que la procédure est considérée comme une thérapie de routine.

La section IX de la dernière édition du handbook de l'EBMT (3–25) fait l'état des lieux exhaustif des indications actuelles de l'allo-HCT. Elles sont reprises dans le **tableau 1** et catégorisées selon leur place dans la stratégie thérapeutique.

L'allo-HCT fait partie de l'arsenal thérapeutique standard :
- Leucémie aiguë myéloïde (AML) de l'adulte - Leucémie aiguë myéloïde (AML) de l'enfant - Leucémie aiguë lymphoblastique (ALL) de l'adulte - Leucémie aiguë lymphoblastique (ALL) de l'enfant et de l'adolescent - Syndromes/néoplasmes myélodysplasiques (MDS) de l'adulte - Syndromes myélodysplasiques (MDS) de l'enfant, dont les cytopénies réfractaires et la leucémie myélomonocytaire juvénile (JMML) - Syndromes myéloprolifératifs/myélodysplasiques (MDS/MPN) - Syndromes myéloprolifératifs (sauf CML) - Syndromes d'insuffisance médullaire (BMF) acquis : anémie aplasique (SAA) - Hémoglobinopathies (drépanocytose et thalassémie) *Pour cette dernière indication, la place de l'allo-HCT est à pondérer avec l'important potentiel des thérapies géniques.*
L'allo-HCT fait partie de l'arsenal thérapeutique mais de nouvelles thérapies ont rendu sa place moins centrale dans la prise en charge du patient :
- <u>Leucémie myéloïde chronique (CML)</u> Le recours à l'allo-HCT est plus tardif depuis l'introduction des inhibiteurs de tyrosine kinase (ITK), d'autant plus que le nombre de lignes d'ITK reçues avant la transplantation n'impacte pas la survie post-transplantation (26). - <u>Leucémie lymphoïde chronique (CLL)</u> L'allo-HCT reste la seule option curative (27) mais dont l'indication se fait rare, au regard de l'efficacité des inhibiteurs de BTK et de Bcl-2 ainsi que de l'évolution souvent progressive (hors syndrome de Richter). - <u>Hémoglobinurie paroxystique nocturne (HPN)</u> Les anticorps monoclonaux anti-C5 (eculizumab, ravulizumab) ne semblent pas inférieurs à l'allo-HCT (28,29).

- Lymphome B à grandes cellules

Les Chimeric Antigen Receptor T-cells (CAR-T cells) sont désormais considérés comme le traitement standard. L'allo-HCT reste une option pour les patients dont la maladie est chimio-sensible, en cas de rechute après l'administration des CAR-T cells ou en l'absence de CAR-T cells disponibles (30).

- Lymphome à cellules du manteau

Les CAR-T cells semblent désormais représenter une meilleure thérapie que l'allogreffe (31,32).

L'allo-HCT s'envisage si rechute ou progression après autogreffe

- Lymphome indolent (iNHL)

L'allo-HCT avec conditionnement d'intensité réduite s'envisage après une ou plusieurs rechutes, surtout après autogreffe (auto-HCT, autologous Hematopoietic Cell Transplantation) (33).

- Lymphome de Hodgkin

Seule option curative si rechute après auto-HCT.

- Myélome multiple

L'allo-HCT peut être indiquée aux patients jeunes avec une maladie à haut risque et une réponse sous-optimale et/ou une rechute précoce.

L'allo-HCT s'envisage en fonction des caractéristiques de la pathologie, souvent au cas par cas

- Anémie de Fanconi et autres syndromes d'insuffisance médullaires (BMF) héréditaires

- Déficits immunitaires primaires

A noter l'avènement des thérapies alternatives : Enzyme Replacement Therapy (ERT), thérapies géniques, thérapies ciblées.

- Maladies métaboliques héréditaires / ostéopétrose

- Lymphomes agressifs B et T et lymphomes associés au VIH
  - Burkitt : après deuxième rémission (Complete Remission 2, CR2)
  - Lymphomes périphériques à cellules T : après CR2 ou en cas de rechute après auto-HCT
  - Lymphomes cutanés à cellules T : tendance à l'augmentation du recours à l'allo-HCT
  - Lymphomes lymphoblastiques (LBL) : pas de place établie pour l'allo-HCT
  - Lymphomes associés au VIH : pas de recommandation

L'allo-HCT pourrait se développer dans les pathologies auto-immunes

La nature de certaines maladies auto-immunes semble indiquer que l'allo-HCT pourrait constituer une approche curative mais la mortalité liée à la procédure reste trop importante pour l'inclure dans une stratégie thérapeutique standard à ce jour.

L'allo-HCT n'a pas d'indication standard ou les indications sont très marginales
- <u>Amylose AL systémique</u> Peut être envisagée après un traitement d'intensité réduite en cas de rechute après auto-HCT chez des patients de moins de 60 ans sans dysfonction d'organe avec donneur HLA 10/10 (selon les résultats préliminaires présentés à EBMT 2016) - <u>Syndrome POEMS ou autres pathologies monoclonales à IgG</u> - <u>Tumeurs solides</u>

Tableau 1 : Indications de l'allo-HCT catégorisées par place dans la stratégie thérapeutique

D'après le handbook de l'EBMT version 2024 (3-25)

Ce résumé parait mettre en lumière un relatif recul de l'indication de l'allo-HCT au profit d'autres thérapies – surtout dans les indications lymphoïdes. La faible baisse (-4,0%) du nombre d'allo-HCT réalisées en 2022 par rapport à 2021 en Europe (34) semblait refléter cette tendance qui n'a pas été confirmée sur le rapport sur l'année 2023 avec une nouvelle hausse de 7,8% comparativement à 2022(2).

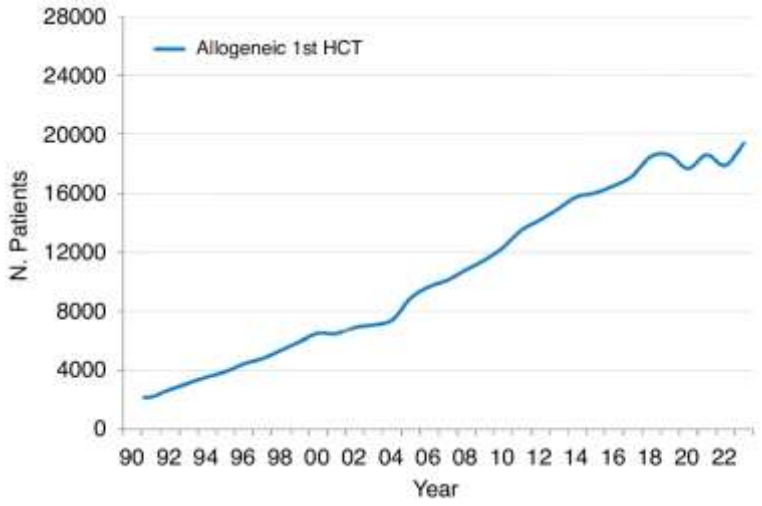


Figure 1 : Nombre absolu de patients recevant une première allo-HCT entre 1990 et 2023 en Europe.

Adapté du rapport de l'EBMT sur l'année 2023 (2)

(Figure 1) L'augmentation du nombre d'allo-HCT est donc quasi constant depuis 1990, décuplant au cours des trois dernières décennies. Ceci a été rendu possible par l'amélioration de l'accès à la greffe, notamment grâce aux facteurs suivants :

- <u>Assouplissement des restrictions relatives à l'éligibilité du receveur</u>

Les premières allo-HCT étaient précédées de conditionnements responsables d'une toxicité majeure (35) ce qui imposait la très stricte sélection des receveurs pour éviter une trop grande mortalité liée à l'allo-HCT (TRM, transplant-related mortality). Le développement de conditionnements moins toxiques – par exemple non-myéloablatifs – a permis l'accès à l'allo-HCT pour des patients âgés ou comorbides (36). Le meilleur management des nombreux événements intercurrents possibles – infectieux, endothéliaux, néoplasiques – contribue également à l'élargissement du recrutement des receveurs.

- Assouplissement des restrictions relatives au choix du donneur

Les premiers essais thérapeutiques dans les années 1970 reposent quasi uniquement sur des couples HLA-identiques intra-familiaux (35). La probabilité de l'existence d'un tel donneur est de 25% par membre de la fratrie du receveur, estimée à 30% pour chaque receveur en moyenne en tenant compte de son âge et de la taille de sa fratrie ; ces statistiques soulignent l'absence de donneur HLA-identique intra-familial pour la majorité des patients (37).

Le développement des registres nationaux puis internationaux de donneurs volontaires a rendu possibles l'identification et le recrutement de donneurs non-apparentés HLA-identiques de manière efficace. Dans un second temps, l'essor des greffes toujours dites « alternatives » que sont celles réalisées avec des donneurs non-apparentés dont la compatibilité HLA est inférieure à 10/10, les donneurs familiaux haplo-identiques (38) ainsi que les unités de sang placentaires (39), ont complété le panorama des donneurs possibles **(figure 2)**, et contribué au changement de paradigme suivant : *il existe désormais dans la plupart des cas plusieurs donneurs potentiels pour un receveur.*

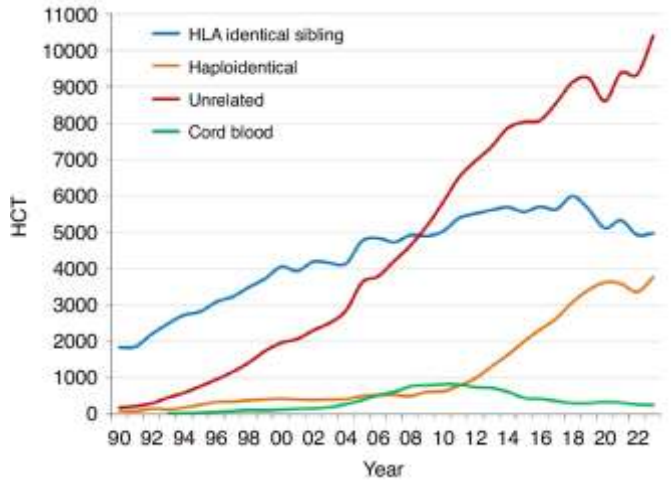


Figure 2 : Evolution des types de donneurs recrutés pour une première allo-HCT entre 1990 et 2023 en Europe

D'après le rapport de l'EBMT sur l'année 2023 (2)

2. Le principe et les défis de l'allo-HCT

Le paysage de l'allo-HCT s'est profondément modifié et complexifié au fur et à mesure des avancées médicales, mais le principe de la procédure, ses objectifs et ses défis sont restés similaires.

1. Principe, objectifs et complications de l'allo-HCT

L'allo-HCT désigne l'injection d'un greffon contenant notamment des cellules souches hématopoïétiques au décours d'une (radio-)chimiothérapie appelée conditionnement. Le patient est alors en aplasie, signe de la myélo-ablation et de la lympho-déplétion engendrées par le conditionnement.
Le greffon est administré par voie veineuse et les cellules souches vont circuler quelques heures à quelques jours avant de se nicher dans la moelle osseuse du receveur et y reprendre l'hématopoïèse. Le délai de la prise de greffe peut varier mais la sortie d'aplasie – définie par un nombre de polynucléaires neutrophiles > $0{,}5x10^9$G/L et de plaquettes > $20x10^9$G/L pendant 3 jours consécutifs sans support transfusionnel – survient généralement en 2 à 3 semaines (40).

Dans le cadre des pathologies non-malignes, l'objectif est d'atteindre une prise de greffe durable afin (i) d'améliorer les fonctions hématopoïétiques et/ou (ii) de corriger les anomalies immunitaires et/ou (iii) de normaliser un ou plusieurs déficits (41). Dans les pathologies malignes, l'objectif est principalement anti-tumoral. Il est attendu que les cellules immuno-compétentes – contenues dans le greffon et résultant de l'hématopoïèse après la prise de greffe – exercent un effet GVL permettant de contrôler la pathologie de façon durable.

Cette procédure comporte des risques précoces liés à :

- La toxicité du conditionnement

La (radio-)chimiothérapie est responsable d'importants dommages cellulaires et tissulaires qui ne sont pas spécifiques au tissu hématopoïétique. Cela est discuté plus longuement dans le **paragraphe 4.3.1**.

- L'aplasie

Pendant l'aplasie, le receveur est exposé aux complications de l'anémie et de la thrombopénie. Il est possible de prévenir ces complications en monitorant le taux d'hémoglobine et de plaquettes et en transfusant le patient si nécessaire. En revanche, les complications infectieuses précoces sont plus difficilement prévisibles. 13 à 60% des receveurs ont une aplasie fébrile documentée par une bactériémie au décours de l'allogreffe, associée à une mortalité entre 12 et 42% selon les séries (42). Des protocoles de traitements probabilistes par antibiothérapie sont établis en fonction des portages du patient.

Sur le moyen terme, la latence de la pleine reconstitution immunitaire est responsable de la susceptibilité aux infections du receveur. Bien que les cellules myéloïdes de l'immunité innée atteignent rapidement leurs taux normaux, un déficit quantitatif et qualitatif des lymphocytes T et B est observé jusqu'à deux années post-greffe. Cette déficience persistante du système immunitaire adaptatif se traduit notamment par une sensibilité accrue aux infections, qu'elles soient virales, bactériennes, fungiques ou parasitaires(43).

2. Le défi du management de la GVHD

La GVHD aiguë et/ou chronique – conséquence de l'alloréactivité inhérente à la procédure d'allogreffe – est également une complication majeure de l'allo-HCT. Malgré l'essor des stratégies prophylactiques et curatives de la GVHD, les études cliniques chez l'Homme montrent que la GVHD aiguë concerne 30 à 70% des receveurs, tous matching HLA confondus (44). Le Mount Sinai Acute GVHD Consortium explique que « la différence de taux [observée à travers les cohortes] est probablement due à de multiples facteurs tels que la fréquence des biopsies des organes cibles lorsque les symptômes apparaissent, la prise en compte et l'application appropriées des mesures visant à exclure les diagnostics alternatifs, et l'absence de lignes directrices consensuelles pour répondre aux défis inhérents à la stadification de la GVHD, tels que la quantification du volume des selles » (45).

L'approximation la plus exacte est sans doute la suivante : 30 à 50 % des receveurs d'allo-HCT – toutes modalités confondues – présentent une GVHD aiguë et 14 % une GVHD aiguë sévère (grades III ou IV) (46). En cas de matching HLA 10/10, environ 40 % des receveurs développent une GVHD aiguë nécessitant l'introduction d'un traitement par stéroïdes systémiques à hautes doses (47). Enfin, les patients atteints de GVHD aiguë résistante au traitement initial par glucocorticoïdes ont un pronostic sombre, avec un taux de survie global de seulement 5 à 30 % (48).

Concernant la GVHD chronique, elle survient pour 30 à 70 % des receveurs transplantés avec un greffon non manipulé après une prophylaxie associant un inhibiteur de la calcineurine et un antimétabolite (49). Seuls 50 à 60 % des patients répondent au traitement initial, souvent partiellement et temporairement, tandis que 80 % d'entre eux nécessitent un traitement de seconde intention (44).

A l'échelle du receveur, la GVHD aiguë guide le pronostic vital tandis que la GVHD chronique est un enjeu au regard de qualité de vie à moyen et long terme. En termes de santé publique, c'est un enjeu économique majeur puisque la prise en charge de la GVHD est le premier poste de dépense au décours d'un traitement par allo-HCT. Une étude américaine de 2023 estime qu'elle représente 37% à 53% du coût total estimé à plus de 1.000.000$, alors que la procédure en elle-même représente moins de 20%(50).

Ces chiffres mettent en évidence qu'une maitrise optimale de la GVHD du receveur est nécessaire. La réponse thérapeutique à adopter semblerait être une pression immunosuppressive importante pour juguler l'alloréactivité qui en est responsable. Cependant, l'alloréactivité est également responsable de l'effet GVL constituant *en lui-même* le principe thérapeutique de l'allo-HCT dans les indications malignes. Dans ce contexte, le meilleur traitement de la GVHD émergerait donc d'une approche qualitative de l'alloréactivité – empêchant l'effet GVH mais respectant l'effet GVL – ce qui impose la meilleure compréhension des mécanismes de l'alloréactivité.

2. LES INCOMPATIBILITÉS, INITIATRICES DE L'ALLORÉACTIVITÉ

« L'alloréactivité désigne la stimulation de certaines cellules T par des molécules HLA de classe I et de classe II allogéniques, c'est-à-dire d'individus de la même espèce mais génétiquement différents » selon le dictionnaire français de l'académie de médecine (51).

La stimulation des lymphocytes T repose sur la discrimination entre le « soi » et le « non-soi » (52). *L'alloréactivité n'est possible que si et seulement s'il existe des incompatibilités entre le donneur et le receveur* ; il n'existe d'ailleurs pas d'alloréactivité au décours des greffes syngéniques. On peut établir le niveau de compatibilité / d'incompatibilité entre un receveur et son donneur à plusieurs échelles.

1. La compatibilité HLA

1. Introduction au système HLA

L'ensemble des vertébrés à l'exception des agnathes possède des molécules spécialisées regroupées sous l'entité fonctionnelle « Complexe Majeur d'Histocomptabilité » (CMH, MHC en anglais) (53). Chez l'Homme, le CMH est aussi appelé HLA (Human Leukocyte Antigen) et les gènes codant pour les protéines qui le constituent sont regroupés sur le bras court du chromosome 6, dans la région 6p21.31 **(figure 3)**. Cette très large région de 4 Mb comprend les gènes du CMH de classe I et de classe II, impliqués dans la présentation antigénique, mais également plus de 200 gènes codant pour des composants majeurs de l'immunité, par exemple des cytokines (TNF, LTA, LTB, …), des molécules du complément (C2, Bf, C4A, C4B, …) ou des protéines *heat shock* (HSPA1L, HSPA1A/B, …) (54).

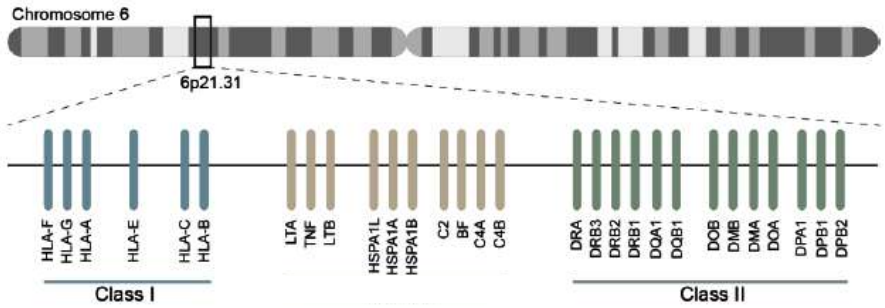


Figure 3 : Représentation des principaux gènes de la région 6p21.31, gènes du CMH de classe I et II.
Adapté de la source internet : www.biorigami.com (55)

On distingue les molécules HLA classiques dont la fonction principale est la présentation de peptides aux lymphocytes T, des molécules HLA non-classiques qui ont d'autres fonctions (dans l'apprêtement des peptides, la présentation d'antigènes de différentes natures, à des cellules différentes..) **(Tableau 2)**.

Les molécules HLA non-classiques sont aussi des acteurs majeurs du système immunitaire. Les protéines MHC IIb jouent par exemple un rôle dans le démantèlement du complexe [CLIP/HLA de classe II] permettant ainsi le chargement des peptides antigèniques dans le sillon des molécules HLA de classe II (56). MICA et MICB sont eux les ligands de NKG2D et sont impliquées dans l'activation des cellules NK (57). Ces molécules sont cependant peu polymorphes en comparaison des molécules HLA classiques et n'ont pas – encore ? – trouvé leur place dans le matching donneur/receveur en pratique clinique.

HLA classe I	HLA classe II
Classiques (CMH Ia) HLA-A HLA-B HLA-C	**Classiques (CMH IIa)** HLA-DR HLA-DQ HLA-DP
Non Classiques (CMH Ib) HLA-E HLA-F HLA-G MICA/B	**Non Classiques (CMH IIb)** HLA-DM HLA-DO

Tableau 2 : Classification des molécules HLA

Ainsi, la compatibilité donneur/receveur s'établit à ce jour sur l'ensemble des molécules HLA classiques de classe I et de classe II. *Les paragraphes suivants traitent uniquement de ces molécules « classiques » et nous omettons ce qualificatif ci-après pour une lecture plus fluide.*

2. Les molécules HLA de classe I et II

Les molécules HLA ont la structure suivante :

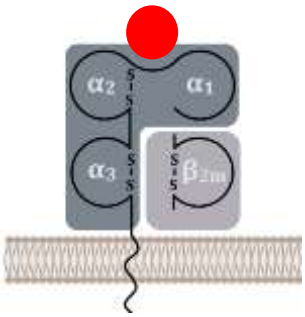


Figure 4 : Schéma d'une molécule HLA de classe I et d'un peptide dans sa poche à peptide.
Adapté de la source internet: www.cours-pharmacie.com (58)

Les gènes HLA de classe I codent pour une chaine glycoprotéique α qui s'associe de façon non-covalente à une chaine non-polymorphe appelée β2-microglobuline (β2m) pour former la molécule HLA de classe I. Les domaines α1 et α2 forment la poche à peptide où peut se loger un peptide de 8 à 16 acides aminés (AA) – mais usuellement court et majoritairement de 9 AA, soit des nonamères (59).

Les gènes HLA de classe II codent pour une chaine α et une chaine β qui s'associent pour former une molécule HLA de classe II. Les domaines α1 et β1 forment la poche à peptide où peut se loger un peptide globalement plus long et de longueur variable – entre 12 et 25AA(60).

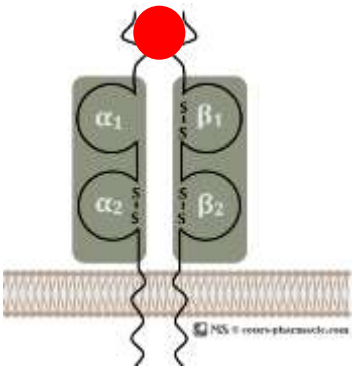


Figure 5 : Schéma d'une molécule HLA de classe II et d'un peptide dans sa poche à peptide.
Adapté de la source internet: www.cours-pharmacie.com (58)

Les molécules HLA de classe I et II possèdent des caractéristiques communes :

- La transmission en haplotypes et la codominance

Du fait de la proximité des gènes **(figure 3)**, il existe de forts déséquilibres de liaison intéressant l'ensemble de la région et particulièrement entre les gènes *HLA-B* et *-C* d'une part et les gènes *HLA-DRB1, -DQA1* et *-DQB1* d'autre part. Les allèles HLA sont donc le plus souvent transmis en bloc à la descendance, ce qui définit la notion d'haplotype. Chaque individu hérite d'un haplotype paternel et d'un haplotype maternel et les produits des deux haplotypes sont exprimés à la surface de la cellule (61).

- L'importance du polymorphisme

Le polymorphisme allélique des molécules HLA est souvent cité comme étant le plus important de l'espèce humaine. La plupart des allèles codent une protéine qui diffère par un ou plusieurs acides aminés en comparaison des autres allèles, c'est la notion d'allotype HLA. Le polymorphisme est représenté dans le **tableau 3.**

HLA classe I			
Gène	**A**	**B**	**C**
Allèles	8 556	10 346	8 657
Protéines	5 004	6 172	4 776
Nuls	449	370	388

HLA classe II									
Gène	**DRA**	**DRB1**	**DRB3**	**DRB4**	**DRB5**	**DQA1**	**DQB1**	**DPA1**	**DPB1**
Allèles	78	3 787	523	273	215	872	2 813	765	2 795
Protéines	17	2 443	399	169	157	448	1 682	373	1 611
Nuls	0	135	28	27	25	21	122	33	145

Tableau 3 : Polymorphisme des gènes HLA classiques étudiés en pratique clinique
D'après la source internet IMGT-HLA (62) *actualisée en janvier 2025 (version 3.59).*
Note : Le gène HLA-DRA est omis dans la pratique clinique

- La fonction de présentation antigénique aux lymphocytes T

La fonction des molécules HLA est la présentation des antigènes peptidiques qui y sont enchâssés aux lymphocytes T. Les molécules HLA de classe I présentent spécifiquement les peptides aux TCR des lymphocytes T CD8+, ce dernier stabilisant l'interaction [HLA-peptide]/TCR en se fixant sur le domaine α3 de la molécule HLA de classe I. De la même façon, les molécules HLA de classe II présentent spécifiquement les peptides aux TCR des lymphocytes T CD4+, ce dernier stabilisant l'interaction [HLA-peptide]/TCR en se fixant sur le domaine β2 de la molécule HLA de classe II.

Les TCR des lymphocytes reconnaissent à la fois les bords du sillon de la molécule HLA et le peptide enchâssé **(figure 6)**. Les domaines α1/α2 pour la molécule HLA de classe I et α1/β1 pour la molécule HLA de classe II sont donc impliqués dans la reconnaissance par le TCR.

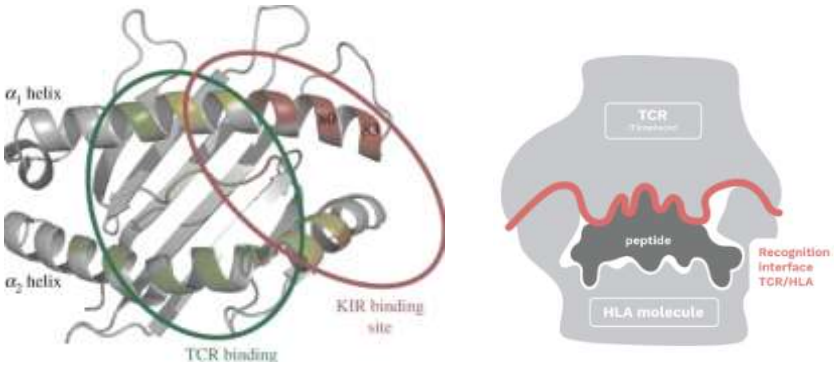


Figure 6 : Schéma du sillon de la molécule HLA de classe I et des sites d'interaction HLA-TCR
Partie de gauche adaptée de "Human-specific evolution of killer cell immunoglobulin-like receptor recognition of major histocompatibility complex class I molecules" (63)

Les molécules HLA de classe I et II différent notoirement :

- Par leur expression :

Tandis que les molécules HLA de classe I sont exprimées à la surface de toutes les cellules nucléées et des plaquettes, les molécules HLA de classe II sont exprimées à l'état basal uniquement sur des cellules spécialisées de l'immunité, comme les cellules présentatrices de l'antigène professionnelles (CPAp) – cellules dendritiques, les monocytes/macrophages et les lymphocytes B – et les cellules épithéliales thymiques (64).
Dans les états pro-inflammatoires – comme durant le conditionnement de l'allo-HCT– l'expression des molécules HLA de classe I augmente à la surface des cellules, et les cellules épithéliales et endothéliales peuvent se mettre à exprimer des molécules HLA de classe II (44).

- Par les propriétés de la poche à peptide :

On décrit classiquement la poche à peptides des molécules HLA de classe I comme fermée et contraignante, alors que la poche à peptide de la molécule HLA de classe II est plus lâche, ouverte à ses extrémités, et tolère des peptides plus longs. Dans les deux cas, il existe des sites d'ancrage qui correspondent à des acides aminés particuliers du peptide **(figure 7)**. De façon intéressante, ces points d'ancrage correspondent aux régions les plus polymorphes des gènes HLA (65).

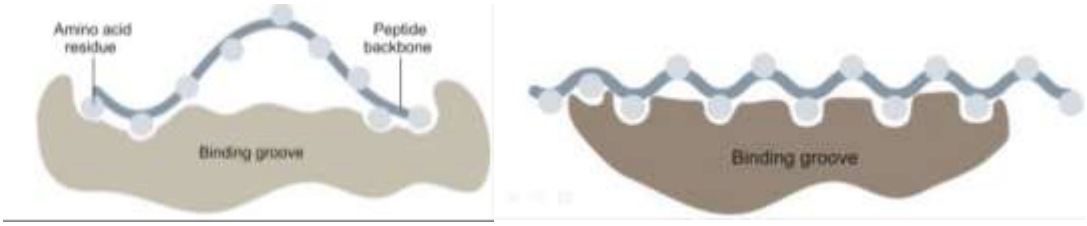


Figure 7 : Représentation des poches à peptides de la molécule HLA de classe I (à gauche) et de classe II (à droite)
D'après "Primer to the Immune Response (Second Edition)", chapitre 6 (66)

- Par la nature des peptides enchâssés :

Globalement, les molécules HLA de classe I présentent des peptides de nature endogène, tandis que les molécules HLA de classe II présentent des peptides de nature exogène. Il existe cependant des exceptions :

- La présentation croisée des cellules dendritiques

Les cellules dendritiques sont des cellules hautement spécialisées de l'immunité. Cheffes de file des cellules présentatrices de l'antigènes professionnelles, elles sont les seules à pouvoir effectuer la présentation croisée. La présentation croisée désigne la présentation d'un antigène endogène par une molécule HLA de classe II et permet d'activer les lymphocytes CD4+ naïfs qui vont soutenir l'activation des lymphocytes T CD8+.

- La présentation antigénique des cellules endothéliales thymiques

Les cellules endothéliales thymiques (TEC, thymic endothelial cells) peuvent présenter des antigènes endogènes via les molécules HLA de classe II grâce notamment aux autophagosomes.

La reconnaissance d'une zone d'interface constituée par le complexe [HLA/peptide] différente du soi par un TCR constitue le premier signal de l'activation du lymphocyte T CD4+ et/ou CD8+.

Autrement dit, l'alloréactivité imputable aux lymphocytes T n'est possible que si et seulement si la molécule HLA et/ou le peptide enchâssé sont différents dans le couple donneur/receveur. Dans ce contexte, la compatibilité HLA – a minima au niveau des domaines impliqués dans la poche à peptides, c'est-à-dire les domaines α1/α2 pour la molécule HLA de classe I et α1/β1 pour la molécule HLA de classe II – est incontournable pour prédire l'alloréactivité T-médiée.

La prédiction du matching peptidique semble souhaitable pour compléter cette prédiction.

3. Les recommandations pour le typage et l'établissement de la compatibilité HLA

1. La nomenclature HLA

Le rendu d'un typage HLA suit la nomenclature de la base de données IPD-IMGT/HLA (67), mise à jour tous les trois mois en incrémentant notamment les nouveaux allèles soumis. Le **tableau 4** décrit la standardisation de la nomenclature. Un exemple de typage est :

HLA-A*01:01:01:01

Où :
A est le gène HLA considéré
* indique qu'il s'agit d'un typage obtenu par biologie moléculaire
: constitue un délimiteur de champs

Champs	Exemple	Signification
1er champ	HLA-A*01	Groupe d'allèles partageant souvent le même sérotype (ex : A1)
2ème champ	HLA-A*01:01	Groupe d'allèles partageant la même séquence protéique
3ème champ	HLA-A*01:01:01	Groupe d'allèles partageant la même séquence nucléotidique dans les exons
4ème champ	HLA-A*01:01:01:01	Typage le plus spécifique, discriminant les allèles avec des substitutions nucléotidiques dans les introns.

Tableau 4 : Principe de la nomenclature HLA

Dans l'exemple .

- les allèles *HLA-A*01:01:01:01* et *HLA-A*02:01:01:01* codent pour deux molécules HLA-A différentes : HLA-A*01:01 et HLA-A*02:01, dont le pattern de réactivité sérologique est différent (A1 et A2)
- les allèles *HLA-A*01:01:01:01* et *HLA-A*01:02:01:01* codent pour deux molécules HLA-A : HLA-A*01:01 et HLA-A*01:02, qui différent par au moins un acide aminé, mais dont la structure reste suffisamment proche pour qu'ils appartiennent au même pattern de réactivité sérologique (A1)
- les allèles *HLA-A*01:01:01:01* et *HLA-A*01:01:02* codent pour la même protéine HLA-A*01:01 mais différent par une variation synonyme sur un des exons (possible en raison de la redondance du code génétique)
- les allèles *HLA-A*01:01:01:01* et *HLA-A*01:01:01:03* codent pour la même protéine HLA-A*01:01, possèdent la même séquence nucléotidique sur l'ensemble des exons, mais différent par des mutations introniques

Il existe également des suffixes, apportant une information sur :

- l'expression des allèles

Le typage apporte une information sur l'expression attendue des allèles en complétant éventuellement les champs par une lettre : L (Low), S (Secreted), C (Cytoplasm), A (Aberrant) et Q (Questionable). Les allèles portant ces suffixes restent rares en pratique clinique.
En revanche, une attention extrême doit être portée aux allèles nuls (N) qui ne sont pas exprimés à la surface de la cellule !!

- la catégorisation des allèles

Une information critique du typage HLA concerne les domaines de reconnaissance antigénique, pour mémoire α1 et α2 pour les molécules HLA de classe I et α1 et β1 pour les molécules HLA de classe II. Ces domaines correspondent respectivement aux exons 2 et 3 des gènes des molécules HLA de classe I et aux exons 2 des gènes des molécules HLA de classe II. On appelle encore ces exons les exons « clés ».

Les groupes P regroupent un ensemble d'allèles codant pour des protéines HLA différentes mais qui possèdent la même séquence protéique au niveau des exons clés, en excluant les allèles nuls.
Les groupes G regroupent un ensemble d'allèles ayant des séquences nucléotidiques différentes mais la même séquence nucléotidique au niveau des exons clés.

2. Les recommandations pour le typage HLA

Les typages HLA doivent être réalisés dans un laboratoire accrédité EFI (European Federation for Immunogenetics) (68). La Société Francophone de Greffe de Moelle et de Thérapie Cellulaire (SFGM-TC) et la Société Francophone d'Histocompatibilité et d'Immunogénétique (SFHI) ont émis conjointement en 2021 des recommandations quant à la définition et à la standardisation des bilans d'histocompatibilité (69).

Il est statué que le receveur et le(s) donneur(s) potentiel(s) devraient bénéficier en première intention d'un typage haute résolution **(figure 8)** pour les gènes *HLA-A, -B, -C, -DRB1,-DQB1* et *-DPB1*. Le typage de haute résolution est défini comme « un ensemble d'allèles codant pour la même séquence protéique au niveau des domaines de la molécule HLA reconnaissant l'antigène [domaines α1/α2 pour la molécule HLA de classe I et domaines α1/β1 pour la molécule HLA de classe II], en excluant les allèles non-exprimés à la surface de la cellule (allèles nuls) » (70).

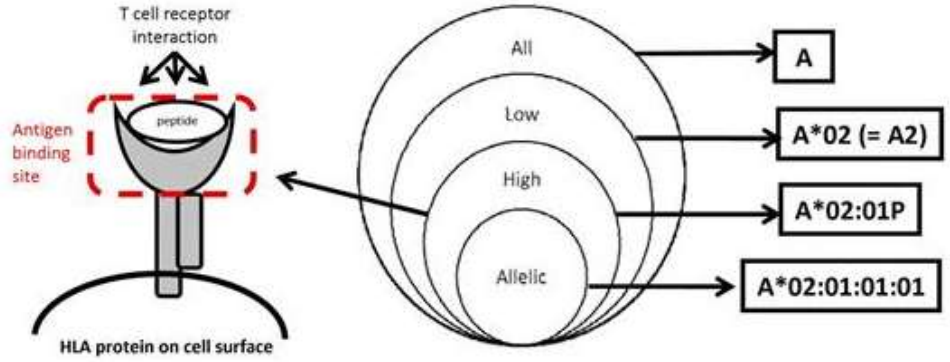


Figure 8 : Illustration des différents niveaux de résolution pour le typage HLA
D'après "Definitions of histocompatibility typing terms" (70).

La vérification des homozygoties est également recommandée, surtout si elles ne sont pas justifiées par un déséquilibre de liaison fréquent ou si elles sont incohérentes avec la ségrégation des haplotypes familiaux. Cette recommandation s'applique particulièrement aux receveurs atteints d'une hémopathie maligne, a fortiori typés en période blastique sur prélèvement sanguin en raison de la perte fréquente d'hétérozygotie sur les blastes. La vérification de tout allèle nouveau ou rare est également encouragée(69).

Le typage des autres loci HLA (DRB3/4/5, DQA1, DPA1) n'est pas recommandé en routine, sauf si :
- le receveur présente des anticorps anti-HLA dirigés contre ces loci, afin de ne pas méconnaitre un ou plusieurs DSA préformés (DSA, donor specific antibodies)
- le donneur potentiel présente une ou plusieurs incompatibilités sur des loci HLA en fort déséquilibre de liaison avec ces loci afin de ne pas méconnaitre un effet cumulatif des incompatibilités (69).

Néanmoins, de nombreux laboratoires français rendent désormais ces résultats en première intention car les kits de typage utilisés le permettent.

3. Les recommandations pour l'établissement de la compatibilité

Selon l'EFI, le couple donneur/receveur pour l'allo-HCT est compatible locus à locus si les molécules HLA ont le même domaine de reconnaissance du peptide. En d'autres termes, les allèles du donneur et du receveur doivent appartenir au même groupe P – d'où la nécessité du typage de haute résolution.

Le nombre de molécules prises en compte pour l'établissement de la compatibilité a varié selon les possibilités technologiques et dépend encore à ce jour de disparités géographiques ou du type de greffon. Dans les études américaines par exemple, la compatibilité est souvent établie sur huit molécules HLA – HLA-A, -B, -C et -DRB1, en omettant HLA-DQB1 et -DPB1. En cas de recours aux unités de sang placentaires (USP), la compatibilité était auparavant considérée sur six molécules – HLA-A, -B et -DRB1 – auxquelles se sont ajoutées plus récemment les deux molécules HLA-C. Le **tableau 5** reprend les différentes compatibilités pouvant être considérées.

	HLA-A	HLA-B	HLA-C	HLA-DRB1	HLA-DQB1	HLA-DPB1
/6	X	X		X		
/8	X	X	X	X		
/10	X	X	X	X	X	
/12	X	X	X	X	X	X

Tableau 5 : Etablissement des compatibilités HLA

La SFGM-TC et la SFHI recommandent l'établissement de la compatibilité donneur/receveur sur 12 molécules HLA : HLA-A, -B, -C, -DRB1, -DQB1 et -DPB1. Lorsque le donneur potentiel est intra-familial, il est également recommandé d'essayer d'établir les quatre haplotypes familiaux afin d'utiliser la terminologie définie par le groupe de travail « centre receveur » de l'Agence de la Biomédecine (ABM) :

- En présence des quatre haplotypes familiaux :
  - Géno-identité : pour un couple donneur/receveur identique, après vérification de(s) homozygotie(s) par une autre technique.
  - Haplo-identité : pour un couple donneur/receveur partageant un haplotype commun, après vérification de(s) homozygotie(s) par une autre technique.
  - Semi-identité : pour un couple donneur/receveur partageant probablement un haplotype, en présence d'une homozygotie au locus A ou DPB1.

- En l'absence des quatre haplotypes familiaux :
  - Phéno-identité : pour un couple donneur/receveur identique sur les locus considérés.
  - Semi-identité : pour un couple donneur/receveur non identique mais au moins à moitié identique sur les locus considérés.

Lorsque la compatibilité donneur/receveur est complète, il est intéressant de faire la différence entre la géno-identité et la phéno-identité. Dans le premier cas, le donneur et le receveur sont nécessairement des membres de la même fratrie qui partagent l'entièreté des haplotypes de la région HLA (comprenant les gènes HLA classiques, non-classiques, leurs exons clés, non clés, les régions introniques et intergéniques). Il s'agit d'une compatibilité a priori totale sur l'ensemble de la région du CMH.
Dans les couples phéno-identiques en revanche – familiaux ou non – on ne peut pas extrapoler la compatibilité au-delà de la résolution du typage qui peut être fourni.

Concernant le typage des unités de sang placentaire, la SFGM-TC recommande le typage en haute résolution des loci HLA-A, -B, -C et -DRB1 pour établir une compatibilité sur huit loci. La place de la compatibilité HLA dans le choix de l'USP est différente en fonction de la nature de la pathologie du receveur. Dans les indications malignes, la cellularité est le premier critère de choix et la compatibilité minimale requise de l'USP avec le receveur est de 5/8. Dans les indications non malignes en revanche, la compatibilité est le premier critère et doit être ≥ 6/8. En cas de double USP, la compatibilité des USP entre elles n'est plus recommandée (71).

4. Le choix du donneur

La SFGM-TC a repris en 2024 l'ensemble des critères pertinents pour la sélection d'un donneur (72). Elle recommande d'envisager les donneurs potentiels dans l'ordre suivant :

1. Donneur HLA géno-identique
2. Donneur HLA phéno-identique, idéalement 12/12 (surtout en cas de pathologie non maligne) ou avec une incompatibilité DPB1 permissive.
3. Donneur compatible 9/10 ou haplo-identique ou unité de sang placentaire

en précisant qu'il n'y a pas à l'heure actuelle de recommandation pour privilégier un type de donneur plutôt qu'un autre parmi la troisième catégorie.

A compatibilité HLA égale, les facteurs déterminant le choix d'un donneur plutôt qu'un autre sont listés ci-après. L'âge est le premier critère de sélection en dehors de la compatibilité HLA et les DSA doivent être pris en compte dans le choix du donneur, mais il n'y a pas de hiérarchie établie pour les autres critères.

- **L'âge du donneur**

Le donneur le plus jeune est préféré, l'âge étant un facteur de risque indépendant pour la survie et le risque de GVHD après allogreffe dans la majorité des séries (73).

- **L'immunisation anti-HLA et les DSA préformés**

Dans le cadre des allo-HCT avec au moins une incompatibilité, il est recommandé de choisir le donneur en tenant compte des anticorps anti-HLA du receveur dirigés spécifiquement contre les molécules HLA incompatibles du donneur, soit les DSA préformés. L'objectif est de limiter le risque de rejet du greffon et il est recommandé de tenir compte également des anticorps anti-DPB1, -DPA1, -DQA1, -DRB3/4/5(74).

Pour mémoire, ces DSA préformés peuvent être la conséquence d'événements immunisants tels que :

- Les grossesses, connues ou non dans le cadre des avortements spontanés précoces (75)
- Les transfusions sanguines (76)
- Les antécédents d'allogreffes

Les DSA préformés peuvent également être la conséquence de réactions croisées avec des antigènes présents dans l'environnement (77). Chez les receveurs de rein, ces DSA dits « naturels » sont associés à une évolution favorable de la greffe et ne représenteraient pas de contre-indication à l'allogreffe (78). Il n'y a pas de donnée concernant ce type de DSA dans l'allo-HCT.

- **Le statut sérologique contre le cytomégalovirus (CMV)**

Il est préférable de favoriser les donneurs séropositifs pour un receveur séropositif, afin de favoriser la reconstitution des lymphocytes T CMV-spécifiques (79). Ces derniers participent au contrôle de la réactivation virale du CMV, celle-ci étant associée à une plus importante mortalité sans rechute (NRM, non-relapse mortality) (80). L'efficacité du létermovir, antiviral montrant de bonnes performances dans la prévention de l'infection à CMV tend à restreindre l'importance de ce critère (81).

- **Le sex-mismatch**

Il est préférable d'éviter le sex-mimatch « donneuse pour receveur » (female-to-male). Cette configuration est associée à une augmentation du risque de mortalité sans rechute et de GVHD chronique chez les receveurs, comparativement à ceux greffés avec un donneur (male-to-male) (82).

Cette notion peut être reliée à celle des « minor histocompatibility antigens » développée dans la **partie III** de ce manuscrit.

5. La question de la « meilleure incompatibilité »

Il est possible de greffer un patient avec un donneur présentant une ou plusieurs incompatibilités aux loci HLA-A, -B, -C, -DRB1, -DQB1 ou -DPB1. Toutes les incompatibilités ne sont pas équivalentes au regard de l'alloréactivité attendue, et on peut décrire trois caractéristiques de l'incompatibilité : sa directionnalité, le locus concerné et la qualification de l'incompatibilité.

A) La directionnalité de l'incompatibilité

Une incompatibilité HLA peut être de « sens HVG » - aussi appelé « sens rejet » - lorsque le donneur possède une molécule HLA absente chez le receveur (exemple : receveur HLA-A*01:01 / donneur HLA-A*01:01,02:01). Il peut également être de « sens GVH » - lorsque le receveur possède une molécule HLA absente chez le donneur (exemple : receveur HLA-A*01:01,02:01 / donneur HLA-A*01:01). Enfin, l'incompatibilité peut être bi-directionnelle lorsque les deux conditions précédentes sont réunies (exemple : receveur HLA-A*01:01,02:01 / donneur HLA-A*01:01,03:01). La SFGM-TC recommande de préférer les incompatibilités dans le sens HVG, en d'autres termes de privilégier une incompatibilité sur un locus pour lequel le receveur est homozygote (72).

B) Le locus concerné par l'incompatibilité

La conséquence d'une incompatibilité HLA diffère selon la molécule HLA considérée :

- **HLA-A, -B, -C, -DRB1 : loci à niveau d'expression élevé**

Chaque locus incompatible réduit la survie d'environ 10% par rapport à un donneur 8/8 (83). Chaque incompatibilité a un impact sur la GVHD aiguë et la survie (84) bien que l'incompatibilité sur le locus DRB1 serait la moins néfaste en termes de NRM (85).

Pour le locus HLA-B, un autre paramètre à prendre en compte est celui du dimorphisme à la position -21 appartenant au « leader peptide ». Les « leader peptides » - aussi appelés « signal peptides » - correspondent aux exons 1 des molécules HLA-A, -B, -C et -G (86). Ils constituent à la fois un stimulus antigénique pour les lymphocytes T en étant enchâssés dans les molécules HLA classiques et influencent également l'alloreconnaissance des cellules NK en facilitant l'expression de HLA-E à la surface des cellules (87). Les leader peptides des molécules HLA-A et -C ne sont pas polymorphes ; en revanche, celui de HLA-B est dimorphique, résultat du variant rs1050458C/T codant respectivement une Méthionine ou une Thréonine à la position -21 de la molécule HLA (soit le deuxième acide aminé du leader peptide). Des études ont montré que l'incompatibilité -21M/T influence le risque de GVHD aiguë et la survie globale (88) et des outils sont disponibles pour établir la compatibilité sur le B leader-peptide(89).

- **Loci à niveau d'expression faible**

  - **HLA-DQB1**

L'incompatibilité au locus DQB1 est sans effet sur la mortalité, mais avec un effet démontré sur la survenue de GVHD (90).

  - **HLA-DPB1**

Il semble y avoir deux façons pertinentes d'approcher la compatibilité concernant le locus DPB1.

- Compatibilité épitopique (TCE, T-cell epitope)

Ce modèle a été initialement défini in vitro en comparant le potentiel alloréactif de clones lymphocytaires T obtenus au moment du rejet après allo-HCT avec incompatibilité DPB1 (91). Les allèles HLA-DPB1 ont initialement été classés en trois groupes en fonction de l'importance de leur immunogénicité. Si les allèles incompatibles appartiennent au même groupe TCE, l'incompatibilité est

décrite comme « permissive », tandis que s'ils se trouvent dans des groupes différents, l'incompatibilité est « non permissive ». Cet algorithme a été redéfini sur la base de la distance fonctionnelle de 10 acides aminés polymorphes situés dans l'exon 2 du gène *HLA-DPB1* et comporte désormais quatre groupes (92). Les incompatibilités non-permissives sont associées à un risque plus élevé de GVHD aiguë et de mortalité (93,94).

- Niveau d'expression

Le variant rs9277534 situé dans la région 3′UTR du gène *HLA-DPB1* est associé au niveau d'expression de la molécule HLA-DP : rs9277534A est associé à une expression faible tandis que rs9277534G à une expression forte (95). Le risque de GVHD aiguë est plus fort si un receveur rs9277534A homozygote reçoit un greffon d'un donneur possédant au moins un allèle rs9277534G (96).

Un webserver compilant ces deux modèles est disponible : ExPAT (97).

- **HLA-DRB3/4/5/6, -DQA1 et -DPA1**

Si l'effet individuel de ces loci n'a pas été démontré, plusieurs études montrent l'impact délétère au-dessus de trois incompatibilités dans le sens GVH parmi ces cinq loci (90,98,99).

C) La qualification de l'incompatibilité

Il existe en réalité plusieurs façons d'évaluer l'incompatibilité à un locus dont le typage est différent entre le donneur et le receveur (100). Toutes conceptuellement intéressantes, certaines n'ont pas – encore ? – démontré leur pertinence clinique dans l'allo-HCT.

▪ Sur la base du typage

Il n'a pas été mis en évidence de différence significative entre une incompatibilité au premier ou au second champ (101). De plus, il existe des incompatibilités à considérer comme permissives – par exemple HLA- C*03:03/03:04, DRB1*11:01/11:04 et DRB3*02:01/02:02 et DQB1*03:01/03:02 – car elles n'ont pas d'impact sur la probabilité de survenue de la GVHD ou la mortalité. Ces données suggèrent que le typage moléculaire ne permet pas intrinsèquement de discriminer l'immunogénicité de l'incompatibilité (102).

▪ Sur la base des CREG

Un CREG (cross-reactive group) correspond à un antisérum HLA monospécifique réagissant avec plusieurs antigènes HLA. Cette réactivité est attribuée à des épitopes partagés par plusieurs molécules HLA, dits publiques – à la différence des épitopes spécifiques d'une molécule appelés privés (103). Il existe donc pour toute incompatibilité donneur/receveur différents niveaux de compatibilité possibles au regard des CREG. Une étude s'intéressant aux mismatchs des CREG entre le donneur et le receveur ne montrait pas de différence dans les outcomes de l'allogreffe (104).

▪ Sur la base de la compatibilité épitopique

Un épitope est la plus petite structure moléculaire reconnue de façon spécifique par l'immunité adaptative. HLAMatchmaker est un outil « disséquant » les molécules HLA dans leur conformation tertiaire afin d'identifier les épitopes accessibles aux anticorps, qui sont appelés éplets. Les éplets différents dans le couple donneur/receveur peuvent être la cible de l'immunité humorale au décours de l'allo-HCT, alors que les éplets partagés ne peuvent pas générer d'alloréactivité (105,106).
Ce concept d'appariement a montré sa pertinence clinique en transplantation d'organe solide (107) et pour la sélection des donneurs de plaquettes pour les patients thrombocytopéniques et réfractaires aux transfusions (108). Dans l'allo-HCT en revanche, la pertinence clinique du matching épitopique n'a pas éte mise en évidence (109).

- **Sur la base d'un index de dissimilarité des séquences protéiques ***

L'algorithme HistoCheck propose d'estimer le « sequence-similarity matching » (SSM) qui évalue la différence donneur/receveur acide aminé par acide aminé. L'attribution d'un score à cette différence tient compte de la similarité fonctionnelle des acides aminés selon la matrice de Risler et de la position et la fonction dans la molécule (liaison peptidique, contact avec le TCR) des acides aminés. L'analyse est restreinte au niveau des domaines α1/α2 pour les molécules HLA de classe I et des domaines α1/β1 pour les molécules HLA de classe II. Au plus le SSM est bas, au plus les molécules HLA sont semblables (110). La pertinence clinique de cette mesure de l'incompatibilité n'a pas éte mise en évidence pour l'allo-HCT (111,112).

- **Sur la base des supertypes ***

Les supertypes regroupent les allèles HLA avec des propriétés physico-chimiques similaires au niveau des domaines α1/α2 pour les molécules HLA de classe I et des domaines α1/β1 pour les molécules HLA de classe II (113). Des données suggèrent que l'incompatibilité des supertypes HLA-B augmente le risque de GVHD aiguë de grade II-IV (114).

- **Sur la base des modèles PIRCHE et de l'alloreconnaissance indirecte ***

Les modèles PIRCHE (Predicted Indirectly ReCognizable HLA Epitopes) se basent sur les peptides dérivés des molécules HLA pouvant être présentés aux lymphocytes T au décours de l'alloréactivité indirecte (115).
PIRCHE-I détermine d'abord le clivage protéasomique des molécules HLA du donneur et du receveur en peptides et leur transport vers le réticulum endoplasmique grâce à NetChop (116). Ensuite, l'affinité de ces peptides est prédite pour le sillon des molécules HLA de classe I partagées dans le couple donneur/receveur, grâce à des outils comme NetMHCpan (117).
PIRCHE-II se limite à la prédiction de l'affinité des peptides pour le sillon des molécules HLA de classe II partagées entre le donneur et le receveur grâce à NetMHCIIpan (118) puisque les schémas de clivage enzymatique n'ont pas encore été clairement définis pour la classe II.
Différentes études ont montré l'effet défavorable du nombre de PIRCHE dans le sens GVH au décours de l'allo-HCT, que ce soit sur la survenue de la GVHD aiguë et/ou chronique, dans des couples donneur/receveur avec une incompatibilité (9/10) ou des couples semi-identiques (119–121).

* Les modèles marqués d'une étoile reflètent en partie la divergence entre les immunopeptidomes du donneur et du receveur. Cette notion est discutée dans la **partie III.**

2. La compatibilité en dehors du système HLA

Les molécules HLA concentrent un polymorphisme majeur et leur reconnaissance est un élément clé de l'activation des lymphocytes T. Ils sont donc incontournables dans l'établissement de la compatibilité donneur/receveur. Il existe cependant d'autres systèmes polymorphes pouvant initier l'alloréactivité.

- **Les immunopeptidomes et la notion de « minor histocompatibility antigens » (mHAgs)**

La survenue de l'alloréactivité médiée par les lymphocytes – comprenant la cytotoxicité des lymphocytes T CD8+ et la synthèse d'anticorps par les plasmocytes – chez les receveurs greffés avec un donneur géno-identique impose que des peptides enchâssés dans le sillon peptidique des molécules HLA puissent être intrinsèquement responsables du déclenchement de l'alloréactivité.

Brièvement, chaque individu synthétise un set de protéines marquées par des polymorphismes génétiques distribués sur l'ensemble du génome et qui lui sont propres. L'ensemble des protéines exprimées par un individu constitue son protéome. La dégradation des protéines en peptides par le système ubiquitine-protéasome est un phénomène physiologique dont il résulte des peptides qui vont – en fonction de leurs propriétés physico-chimiques et de celles des molécules HLA de l'individu – pouvoir être enchâssés dans les molécule HLA. L'ensemble des peptides enchâssés dans les molécules HLA de l'individu constitue son immunopeptidome qui découle du « polymorphisme des molécules HLA » x « polymorphisme du peptidome ». L'immunopeptidome est donc très spécifique de chaque individu.

La non-intersection des immunopeptidomes du donneur et du receveur constitue la fraction des peptides enchâssés dans les molécules HLA contre lesquels le système immunitaire peut s'activer dans le cadre de l'allogreffe **(figure 9)**. Ces peptides sont appelés « antigènes mineurs d'histocompatibilité » (mHAgs) par opposition au « complexe majeur d'histocompatibilité » que représentent les molécules HLA.

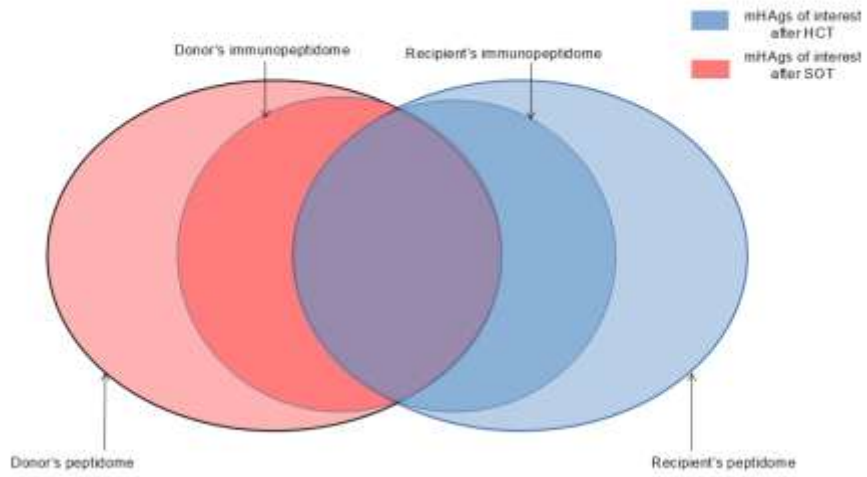


Figure 9 : Représentation des immunopeptidomes dans un couple donneur/receveur et des antigènes mineurs d'histocompatibilité en fonction du type d'allogreffe

SOT : solid organ transplantation

L'apport des antigènes mineurs d'histocompatibilité dans l'allo-HCT est discutée dans la **partie III** du manuscrit.

- **<u>Le système KIR</u>**

Les Killer-cell Immunoglobulin-like Receptor (KIR) sont des récepteurs exprimés à la surface des cellules NK et de certaines sous-populations de lymphocytes T (122). Il s'agit d'un système de compatibilité particulièrement complexe qui associe un important polymorphisme génique (présence/absence des gènes) à un important polymorphisme allélique. L'implication des KIR dans l'activation des cellules NK – dont la cytotoxicité est impliquée dans la physiopathologie de la GVHD – en font un modèle attractif pour mieux comprendre l'alloréactivité.

L'apport du typage des KIR et la discussion autour de sa place potentielle dans la stratégie du choix du donneur dans l'allo-HCT fait l'objet de la **partie II** de ce travail.

- **MICA et MICB**

Les molécules MICA et MICB – MHC class I chain–related gene A et B, respectivement – sont des molécules HLA non-classiques de classe I. La molécule MICA est exprimée par les cellules endothéliales et épithéliales, notamment digestives (123,124) et MICB semble suivre la même expression, même si cette dernière est moins bien connue. MICA et MICB ne présentent pas de peptide contrairement aux molécule HLA classiques mais constituent les ligands du récepteur NKG2D activateur retrouvé sur les cellules NK et certaines sous populations de lymphocytes T (125).

Différents mécanismes pourraient expliquer la part de l'alloréactivité imputable à MICA (126) :

- La compatibilité dans le couple donneur/receveur

Trois études ont montré une augmentation de l'incidence de GVHD aiguë en cas d'incompatibilité donneur/receveur sur le locus MICA, mais ces résultats demeurent controversés car l'association n'a pas été vérifiée dans d'autres études.

- Le polymorphisme à la position 129 – le variant rs1051792A/G

La substitution d'une Adénosine par une Guanine est responsable du polymorphisme Méthionine/Valine en position 129 dans le domaine α2 de MICA. Ce polymorphisme modifie l'avidité de la liaison de MICA au récepteur NKG2D : les molécules avec une Valine lient faiblement NKG2D tandis que celles avec une Méthionine le lient fortement. Dans ce modèle encore, les résultats cliniques divergent.

- La présence de DSA dirigés contre MICA chez le receveur

Les DSA anti-MICA préformés seraient associés à une probabilité réduite de développer une GVHD chronique, alors que les DSA développés après l'allo-HCT seraient associés au risque de rechute.

Il n'y pas de donnée sur l'impact du polymorphisme de MICB dans l'allo-HCT.

3. L'ALLORÉACTIVITÉ AU DÉCOURS DE L'ALLO-HCT

La grossesse constitue la seule situation physiologique capable de générer de l'alloréactivité, souvent maitrisée grâce à l'induction d'un environnement tolérogène très performant autour du fœtus (127). Dans le cadre de l'allogreffe, l'alloréactivité correspond en réalité à la réaction adaptée d'un système immunitaire en présence de « non-soi ». En transplantation d'organe solide, elle compromet cependant l'objectif thérapeutique de la procédure puisqu'elle est responsable du rejet du greffon (128). L'immunosuppression à vie reste la règle pour retarder le rejet tant que possible, quel que soit l'organe greffé (129–131).

Dans l'allo-HCT, le management de l'alloréactivité est plus complexe. Premièrement parce que dans les indications malignes – environ 80% des indications (34) – elle constitue l'objectif thérapeutique de la procédure en médiant l'effet GVL. La réponse à cette alloréactivité ne peut pas être l'immunosupression maximale, mais la recherche du maintien de la « meilleure » alloréactivité. Deuxièmement, parce le greffon administré n'est pas un organe, mais un assortiment de cellules immunocompétentes et de progéniteurs qui vont concourir à restaurer une immunité marquée du patrimoine génétique et du passé immunologique du donneur, pouvant ensuite « se retourner » contre tous les autres tissus de l'organisme du receveur. Enfin, parce que l'allo-HCT est une procédure complexe dans laquelle interviennent de nombreux paramètres (source du greffon, conditionnement, prophylaxie anti-GVHD, mémoire immunologique, …) – discutés dans le **paragraphe 4** de cette section.

Nous reprenons ici succinctement les principaux mécanismes physiopathologiques de l'alloréactivité au décours de l'allo-HCT.

1. L'alloreconnaissance

Les greffons contiennent en proportions variables des cellules immunocompétentes qui sont impliquées dans l'alloreconnaissance – les lymphocytes T et les cellules NK notamment – en plus des cellules souches hématopoïétiques responsables de la reprise de l'hématopoïèse.

1. L'activation des lymphocytes T par réactivité croisée

En fonction de la source du greffon, de son éventuelle manipulation et des agent immuno-modulateurs administrés au receveur, des lymphocytes T αβ matures peuvent être administrés en proportions variables. Ces derniers constituent un des piliers de l'homéostasie immunologique. Via leur TCR (T-cell Receptor), ils « scrutent » en permanence les complexes [molécule HLA-peptide] pour (i) discriminer le « soi » du « non-soi » afin de (ii) tolérer le « soi » ou initier une réponse immunologique appropriée au « non-soi ».

Brièvement, les TCR αβ résultent de réarrangements somatiques dits « V(D)J », associant une diversité combinatoire des gènes avec une diversité jonctionnelle. Ces événements sont totalement aléatoires, et il existe un risque de produire des TCR qui puissent reconnaitre des complexes [molécule HLA-peptide] du soi, c'est à dire des clones lymphocytaires avec un potentiel auto-réactif. Il est donc nécessaire que l'ontogenèse des thymocytes permette de supprimer ces clones, c'est le rôle – entre autres – de la sélection négative, dans laquelle interviennent notamment :

- Les cellules épithéliales thymiques médullaires (mTEC, medullary thymic epithelial cells)

Elles ont la propriété unique d'exprimer les antigènes spécifiques des tissus périphériques (TRA, tissue-restricted antigen), notamment grâce au facteur de transcription AIRE. Ces antigènes sont présentés sous la forme de peptides dans les molécules HLA de classe I (présentation antigénique classique) ou de classe II (grâce au circuit autophagique).

- Les cellules dendritiques médullaires (mDC, medullary dendritic cell)

Elles recaptent les antigènes ectopiques TRA pour les présenter à leur tour dans les molécules HLA de classe I et II.

Ces deux types cellulaires sont responsables d'un mécanisme de délétion clonale où les interactions de forte affinité d'un TCR avec le complexe [molécule HLA-peptide] du soi conduisent le thymocyte à l'apoptose. Il en résulte que les clones persistants à l'issue de la sélection négative tolèrent le soi et ne s'activent que si et seulement s'ils reconnaissent un complexe [molécule HLA-peptide] différent du soi.

Dans le cadre de l'allo-HCT, les lymphocytes T αβ matures du donneur ont subi la sélection négative dans le thymus du donneur, en présence des complexes [molécules HLA-peptides] du donneur. Lorsqu'ils se retrouvent dans le système du receveur, ils « scrutent »via leur TCR les complexes [molécules HLA-peptides] du receveur et s'activent par réactivité croisée envers ces derniers (132).

Cependant, les lymphocytes T ont une durée de vie courte et peuvent être absents du greffon. Ils sont également supprimés par l'administration de certaines molécules comme l'ATG (anti-thymoglobuline) et le cyclophosphamide. Ce constat implique que d'autres mécanismes plus durables soient responsables de l'alloréactivité.

2. L'alloreconnaissance dans l'allo-HCT

Les cellules dendritiques sont les plus capables d'activer un lymphocyte T naïf. L'activation d'un lymphocyte T a lieu dans les organes lymphoïdes secondaires et requiert trois signaux :

- Signal 1 : reconnaissance d'un complexe [molécule HLA-peptide] différent du soi
- Signal 2 : engagement d'un signal de co-stimulation, par exemple CD80/86 – CD28
- Signal 3 : renforcement du signal par les signaux cytokiniques pro-inflammatoires de l'environnement

Les mécanismes décrits ci-dessous compilent les données des revues et articles suivants : Allorecognition pathways in transplant rejection and tolerance (133)*, Allorecognition by T Lymphocytes and Allograft Rejection* (134)*, Predicting Alloreactivity in Transplantation* (115)*, PIRCHE-II: an algorithm to predict indirectly recognizable HLA epitopes in solid organ transplantation* (135) *et Allorecognition* (136)*.*

Dans un premier temps, les lymphocytes T naïfs du donneur contenus dans le greffon vont pouvoir s'activer au contact des cellules dendritiques du receveur et leurs molécules HLA, c'est l'alloreconnaissance directe **(figure 10).**

- Si le donneur et le receveur sont strictement HLA-identiques

L'activation du lymphocyte T naïf est secondaire à la reconnaissance spécifique du peptide du complexe [molécule HLA-peptide] (signal 1), ce qui correspond à l'activation du lymphocyte T telle qu'elle se produit en dehors de l'alloréactivité. L'activation est d'autant plus probable que (i) l'environnement est saturé de peptides issus du receveur ce qui augmente la probabilité de présentation d'un peptide inconnu du donneur et que (ii) le contexte post-allo-HCT est très inflammatoire, induisant une forte augmentation des signaux 2 et 3.

- Si le donneur et le receveur présentent au moins une incompatibilité HLA

Le lymphocyte T naïf peut s'activer de la même façon au contact des molécules HLA partagées, d'autant plus que les molécules HLA incompatibles peuvent faire office d'antigène mineur d'histocompatibilité. Par ailleurs, il serait attendu du lymphocyte T naïf qu'il ne puisse pas s'activer au contact des molécules HLA incompatibles, en raison de la sélection positive subie dans le thymus et la restriction attendue au CMH du donneur. Il peut cependant s'opérer une réactivité croisée expliquant que le lymphocyte T naïf puisse s'activer contre un complexe [molécule HLA du receveur – peptide] (137). Cette interaction dépend à la fois de la molécule HLA et du peptide enchâssé (138).

Les cellules dendritiques du receveur disparaissent en quelques semaine ou mois, remplacées au fur et à mesure de la reconstitution immunologique par les cellules dendritiques issues de l'hématopoïèse des progéniteurs du donneur (abrégé « du donneur ») (43). L'alloreconnaissance indirecte désigne alors l'activation des lymphocytes T naïfs par les cellules dendritiques du donneur et leurs molécules HLA **(figure 10)**. Dans cette configuration, ce sont les peptides enchâssés dans les molécules HLA qui sont responsables de l'activation des lymphocytes T.

Dans l'alloreconnaissance directe comme dans l'alloreconnaissance indirecte, les lymphocytes T CD8+ sont activés au contact des molécules HLA de classe I et les lymphocytes T CD4+ au contact des molécules HLA de classe II. Certains auteurs décrivent une activation plus importante des lymphocytes T CD8+ par l'alloreconnaissance directe et des lymphocytes T CD4+ par l'alloreconnaissance indirecte, expliquant la prévalence des dommages tissulaires médiés par la cytotoxicité des lymphocytes T CD8+ dans les phases aiguës de l'alloréactivité *versus* les lésions humorales dans les phases plus tardives (133).

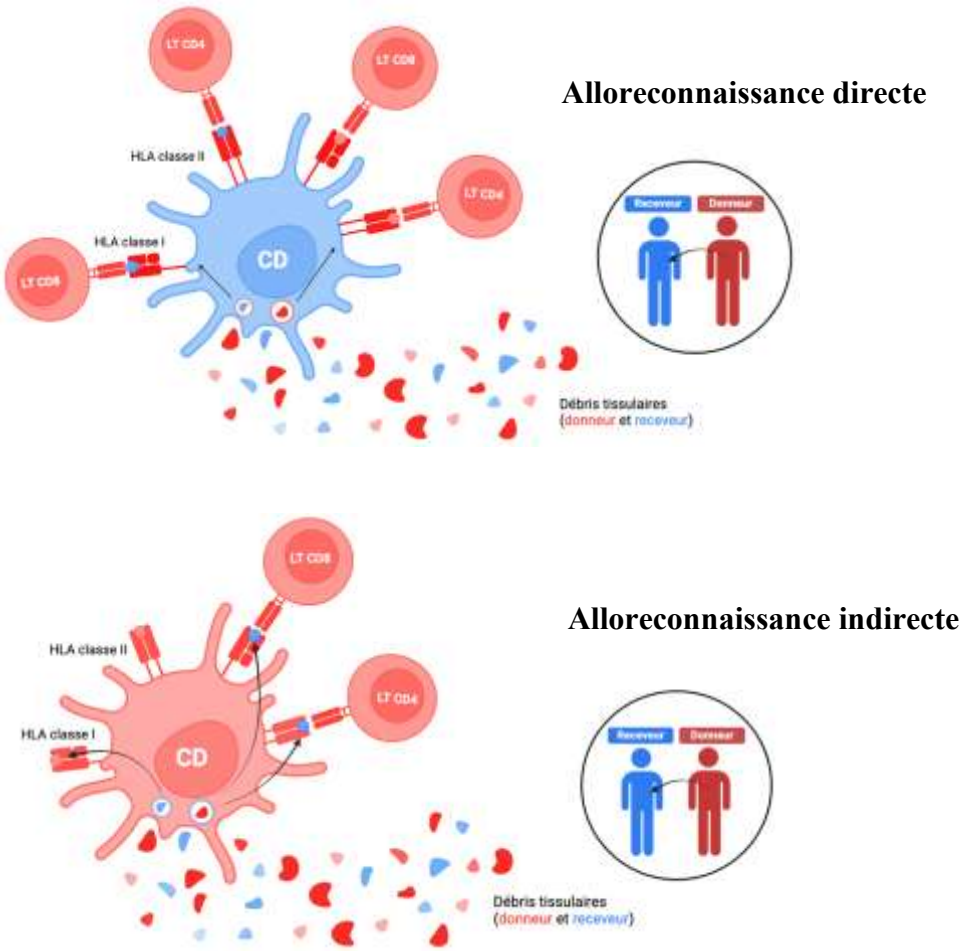


Figure 10 : Alloreconnaissances directe (partie supérieure) **et indirecte** (partie inférieure)

Pour mémoire, l'alloreconnaissance semi-directe est aussi décrite bien que son rôle dans l'allo-HCT soit mal connu : les cellules dendritiques du donneur et celles du receveur seraient capables d'échanger, entre elles ou avec d'autres types cellulaires, des molécules HLA de classe I, tout en conservant le peptide initialement enchâssé dans la cellule source.

2. L'effet GVL

L'effet anti-leucémique de l'alloréactivité a été mis en évidence dès 1979 (139). Communément appelé effet GVL – graft-versus-leukemia – il est important de rappeler qu'il s'agit en réalité d'un effet anti-tumoral qui s'applique à d'autres cellules tumorales que les blastes leucémiques. L'effet GVL est médié par les lymphocytes T et les cellules NK du donneur.

1. Effet GVL médié par les lymphocytes T

La preuve de l'implication des lymphocytes T du donneur dans l'effet GVL est apporté par l'augmentation de la rechute au décours des greffes avec greffon déplété en lymphocytes T (140) et plus récemment par l'efficacité des DLI (DLI, donor lymphocytes infusion) (141). Comme décrit dans les paragraphes précédents, les lymphocytes T peuvent s'activer contre tout complexe [molécule HLA – peptide] différent du soi du donneur. L'effet GVL est donc la conséquence de la reconnaissance par les lymphocytes alloréactifs :

- des molécules HLA incompatibles dans le sens GVH

Les cellules tumorales expriment – au même titre que les autres cellules nucléées – les molécules HLA de classe I du receveur. Lorsqu'il existe une ou plusieurs incompatibilités dans le sens GVH sur les molécules HLA de classe I, ces dernières sont reconnues par les lymphocytes T du donneur, quel que soit le peptide enchâssé.

- des antigènes mineurs d'histocompatibilité (mHAgs)

Les cellules tumorales expriment un protéome qui reflète la singularité génétique du receveur. Les peptides présentant un polymorphisme présent chez le receveur mais absent chez le donneur et ayant des propriétés physico-chimiques permettant leur enchâssement dans les molécules HLA constituent des mHAgs responsables de l'effet GVL **(voir paragraphe 2.2.** et **partie III).**

- des antigènes spécifiques des cellules tumorales

Les cellules tumorales sont des cellules anormales, au programme dit « dégénéré » à la suite de modifications génétiques et/ou épigénétiques. Le fonctionnement anormal de ces cellules est responsable de la synthèse de protéines aberrantes dont les peptides – nécessairement inconnus du donneur – peuvent initier l'activation des lymphocytes T après enchâssement dans une molécules HLA(142).

Citons par exemple la mutation de *NPM1*, retrouvée dans près de 30% des leucémies aiguës myéloïdes. Dans 99% des cas, la mutation se situe dans l'exon 12 et correspond à l'insertion de quatre nucléotides, entrainant un décalage du cadre de lecture ayant pour conséquence la perte d'un ou plusieurs tryptophanes (W288 et W290 ou W290 uniquement) et le gain d'un troisième domaine NES (NES, nuclear export signal) (143). Au-delà de l'implication de cette protéine aberrante dans la leucémogenèse, il résulte de la terminaison anormale de *NPM1* muté des peptides spécifiques pouvant aller s'enchâsser dans les molécules HLA (144). De la même façon, la duplication en tandem de *FLT3* (FLT3-ITD) est également à l'origine de la synthèse de peptides qu'expriment spécifiquement les cellules tumorales portant la mutation.

2. Effet GVL médié par les cellules NK

La preuve de concept de l'alloréactivité des cellules NK et de son implication dans l'effet GVL a été apportée par cette étude publiée en 2002 (145).

Il existe plusieurs voies d'activation des cellules NK, mais le système KIR est sans doute celui qui a le plus retenu l'attention des chercheurs en raison de son important polymorphisme. Succinctement – cela est discuté plus longuement dans la revue intégrée à la **partie II –** les gènes KIR et les gènes HLA se situent sur des chromosomes différents – le bras long du chromosome 19 pour les premiers, le bras court du chromosome 6 pour les seconds. Pendant la méiose, la ségrégation de ces deux complexes est indépendante, et la compatibilité dans le système HLA ne prédit pas la compatibilité dans le système KIR. Plusieurs études montrent que les cellules NK sont éduquées par les molécules HLA de leur environnement, puis capables de s'activer en cas de « missing-self ».
Dans le cadre des greffes avec incompatibilités HLA – et notamment les greffes haplo-identiques – les cellules NK sont donc éduquées avec un autre set de molécules HLA que celles présentes chez le receveur, ce qui peut conduire à leur activation envers les cellules tumorales dans le cadre du « missing self ».
Dans le cadre des greffes sans incompatibilité HLA, l'alloréactivité des cellules NK reste applicable surtout qu'un des mécanismes d'échappement tumoral consiste en la perte d'expression d'une, plusieurs, voire d'un haplotype entier de molécules HLA.

Au-delà de ceux reçus par les KIR, la cellule NK intègre de très nombreux signaux via un grand nombre d'interactions ligand/récepteur (146). La plupart des ligands des récepteurs activateurs sont sur-exprimés dans le contexte pro-inflammatoire que constitue l'allo-HCT, ce qui favorise également leur activation (147).

3. La GVHD aiguë

La GVHD aiguë est la principale cause de décès à court terme après l'allo-HCT. Sur le plan clinique, elle touche classiquement la peau, le tube digestif et le foie. Elle est donc systématiquement soupçonnée en cas d'érythème cutané, de cholestase hépatique ou de symptômes digestifs hauts ou bas et de temporalité compatible, habituellement dans les 100 premiers jours après l'allo-HCT. Les critères diagnostiques – définition, temporalité, gradation de la sévérité – sont parfaitement établis (148). La physiopathologie de la GVHD aiguë est classiquement décrite en trois phases qui sont reprises dans la **figure 11.**

Les mécanismes décrits ci-dessous compilent les données des articles suivants : Graft-versus-host disease (47), Acute Graft-versus-Host Disease — Biologic Process, Prevention, and Therapy (149), Current Concepts and Advances in Graft-Versus-Host Disease Immunology (44).

- **Phase 1 : Inflammation non-spécifique**

Les chiomiothérapies administrées pendant le conditionnement, et la radiothérapie le cas échéant, sont responsables de dommages tissulaires, notamment au niveau des épithéliums. Les cellules en souffrance secrètent des signaux de danger non-spécifiques que sont les DAMP (DAMP, Damage-Associated Molecular Pattern) et qui sont les ligands des récepteurs Toll-like (TLR, Toll like Receptors) situés à la surface des cellules de l'immunité innée du receveur résidant dans le tissu. Cela a pour conséquence l'initiation d'une cascade cytokinique pro-inflammatoire avec notamment la sécrétion d'IFN-γ, TNF-α, IL-1, IL-6, IL-10 et IL-12. Ces signaux inflammatoires sont responsables – entre autres – du recrutement puis de l'activation des cellules présentatrices de l'antigène du receveur et notamment des cellules dendritiques du receveur. Ils sont également responsables du recrutement des polynucléaires

neutrophiles qui vont aggraver les dommages tissulaires initiaux. Sous l'action de l'IL-12, les ILC1 (ILC, innate lymphoid cells) vont également secréter IFN-γ responsable à la fois de la sur-expression des molécules HLA de classe I, de l'expression des molécules HLA de classe II sur les cellules épithéliales ainsi que de dommages tissulaires directs.
Le tube digestif et le tissu lymphoïde secondaire (MALT, mucosa-associated lymphoid tissue) qui y est annexé – les plaques de Peyer – jouent un rôle important dans cette étape préliminaire à l'alloréactivité. En plus d'être agressé par le conditionnement, l'épithélium digestif l'est aussi par la dysbiose résultant de l'administration d'antibiothérapie et la perturbation de la flore bactérienne normale (150). La dysbiose est responsable de l'aggravation des dommages tissulaires par les bactéries intestinales, ce qui engendre la libération de PAMP (PAMP, Pathogens-Associated Molecular Pattern) renforçant les lésions tissulaires, la cascade cytokinique pro-inflammatoire et la présentation antigénique aberrante dans les plaques de Peyer.

- **Phase 2 : Alloreconnaissance**

Une fois activées, les cellules présentatrices de l'antigène professionnelles du receveur, et en particulier les cellules dendritiques, migrent vers les organes lymphoïdes secondaires où elles vont rencontrer les lymphocytes T du donneur. Dans ce contexte très inflammatoire, les cellules dendritiques sur-expriment leurs molécules HLA de classe I et II dans un environnement saturé par les peptides du receveur. De plus, elles possèdent tout l'« arsenal » nécessaire à l'activation des lymphocytes T et notamment les signaux 2 et 3 décrits dans le **paragraphe 3.1.2.**

Il est classiquement décrit que les cellules présentatrices de l'antigène du receveur sont nécessaires au déclenchement de la GVHD aiguë (alloréactivité directe) tandis que celles du donneur sont nécessaires pour la maintenir (alloréactivité indirecte) (151). Dans les deux cas, les cellules dendritiques vont être responsables de l'activation des lymphocytes T naïfs comme décrit dans le **paragraphe 3.1.2.** Les cellules dendritiques sont également responsables de la remigration des lymphocytes T vers l'organe dont elles proviennent (152).

Les plaques de Peyer et les ganglions mésentériques sont sans doute un site d'interaction privilégié entre les cellules présentatrices de l'antigène activées et les lymphocytes T du donneur.

- **Phase 3 : Phase effectrice**

En plus des signaux de relocalisation émis par les cellules dendritiques, les cytokines secrétées à la phase 1 participent à l'orientation des lymphocytes T activés vers les tissus cibles de la GVHD aiguë, à savoir la peau, le tube digestif et le foie. Une fois relocalisés dans ces épithéliums agressés, les lymphocytes T vont exercer leurs fonctions effectrices :

- Lymphocytes T CD8+

Ils sont responsables d'une cytotoxicité directe grâce aux interactions FAS/FAS-L, au système TRAIL et à l'action conjointe perforine/granzyme.

- Lymphocytes T CD4+

Dans le contexte très inflammatoire, les lymphocytes helpers s'orientent surtout vers un profil Th1, sous l'influence de l'IL-12 et de l'IL-18 sécrétées par les cellules dendritiques et les macrophages, et l'IFN-γ secrété par les cellules présentatrices de l'antigène professionnelles. Les lymphocytes Th1 secrètent à leur tour de l'IFN-γ, IL-2 et TNF-α responsables de dommages tissulaires. Il existe également – bien qu'il soit moins important – un engagement vers la voie Th17 dont la synthèse d'IL-21 promeut l'expansion des lymphocytes Tfh (Tfh, T cells follicular helper) impliqués dans la formation du centre germinal, la survie, l'expansion et la différenciation des lymphocytes B, ce qui fait le terreau de la GVHD chronique.

Les cellules NK sont également impliquées et exercent des fonctions cytotoxiques similaires à celles des lymphocytes T CD8+ et relarguent des cytokines notamment pro-inflammatoires qui participent aux dommages tissulaires et au recrutement d'autres acteurs de l'immunité innée.

- **Les éléments régulateurs**

Il existe des contreparties régulatrices de la physiopathologie de la GVHD aiguë que nous mentionnons succinctement (43) :

- Les cellules NK

Elles peuvent également cibler les cellules présentatrices de l'antigène du receveur et ainsi réduire l'alloréactivité T-médiée, d'où leur rôle versatile dans l'alloréactivité.

- Les lymphocytes T régulateurs (Treg)

Les Treg sont des lymphocytes T CD4+ régulant l'activation des lymphocytes. Dans le contexte de l'allo-HCT, ils peuvent inhiber la prolifération des lymphocytes T alloréactifs.

- Les lymphocytes NKT invariants (iNKT, invariant natural killer T cells)

Les iNKT sont des lymphocytes T caractérisés notamment pas un TCR αβ peu variant qui reconnait surtout des glycolipides présentés par CD1d. Ils ciblent les cellules présentatrices de l'antigène du receveur et réduisent l'alloréactivité T-médiée (153).

- Les cellules souches mésenchymateuses (MSC, mesenchymal stem cells)

Les MSC sont des progéniteurs multipotents qui ont la particularité d'être administrés avec une faible immunogénicité ce qui en fait un produit intéressant de thérapie cellulaire. Elles peuvent notamment inhiber les lymphocytes T activés, secréter des médiateurs immunosuppresseurs, réorienter la réponse des lymphocytes T CD4+ de Th1 vers Th2, et induire la production de Tregs.

- Les MDSC (myeloid-derived suppressor cells)

Il s'agit d'un groupe hétérogène de cellules qui ont la capacité de supprimer les réponses lymphocytaires T sans tenir compte des restrictions HLA et qui peuvent notamment inhiber la prolifération des lymphocytes T allogéniques.

- Les ILC-2 et ILC-3

ILC-2 secrète entre autres de l'IL-13 qui inhibe l'activation des cellules dendritiques.
ILC-3 secrète entre autres de l'IL-22 qui supporte la régénération cellulaire, surtout dans le tube digestif.

- Les MAIT (mucosal-associated invariant T)

Les MAIT sont des lymphocytes T « innate-like » secrétant des cytokines comme l'IL-17A qui contribue au maintien de la barrière épithéliale et prévient la dysbiose.

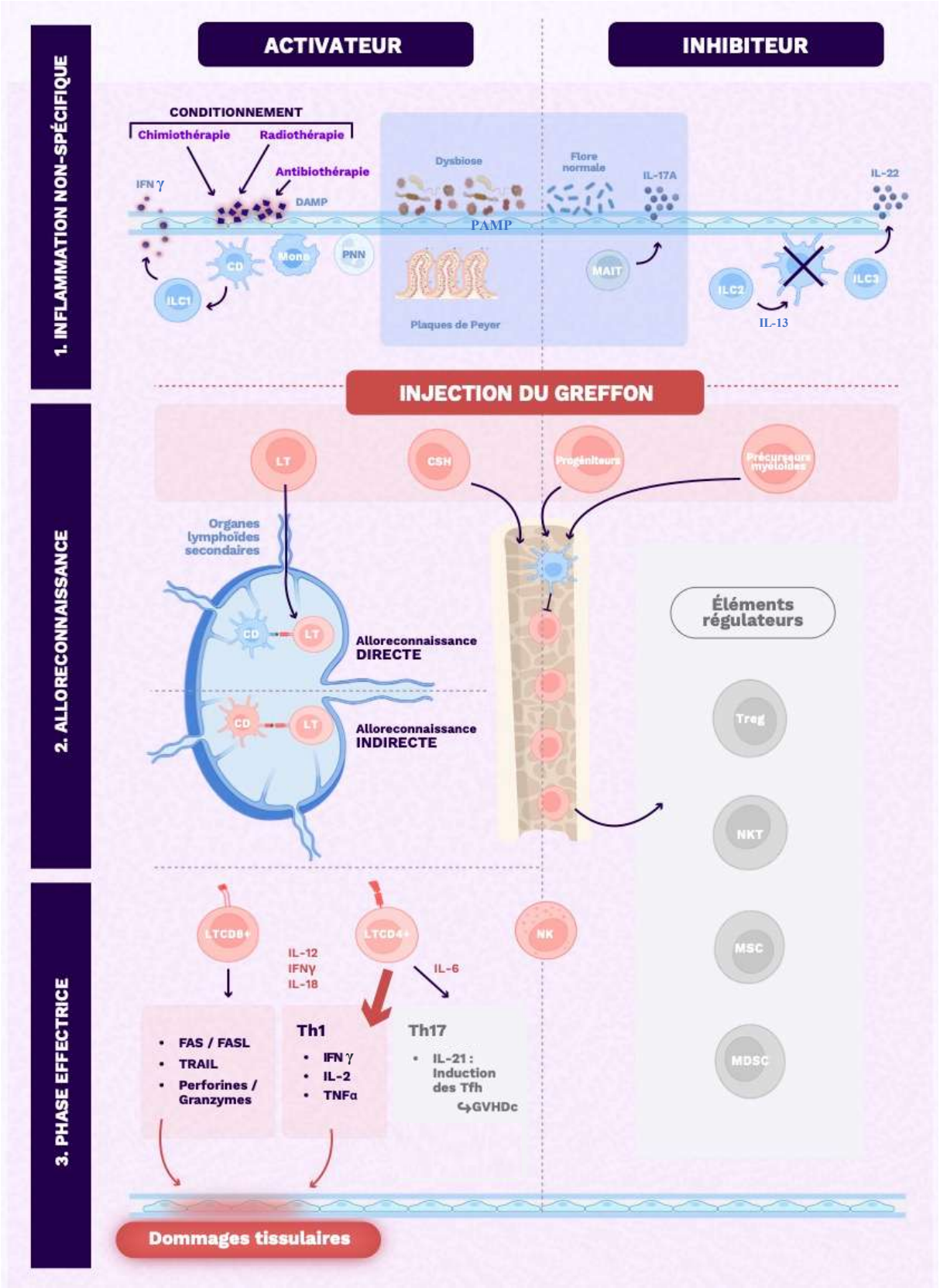


Figure 11 : Représentation simplifiée des trois phases de la GVHD aiguë
Créée avec BioRender et avec l'aide de l'agence de communication en santé Atout21

4. La GVHD chronique

Les manifestations cliniques de la GVHD chronique commencent généralement entre 3 mois et 2 ans après l'allo-HCT, mais une apparition plus précoce est possible – néanmoins pas à moins d'un mois de l'allo-HCT. Le National Institute for Health (NIH) reprend l'atteinte de huit organes ou systèmes pour établir le diagnostic de GVHD chronique : la peau, les yeux, la muqueuse orale, le foie, le tube digestif, les muqueuses génitales, les poumons et les atteintes articulaires et des fascias (154). La physiopathologie de la GVHD chronique est également décrite en trois étapes qui sont reprises dans la **figure 12.**

D'après les publications suivantes : Current Concepts and Advances in Graft-Versus-Host Disease Immunology (44), Pathophysiology of Chronic Graft-versus-Host Disease and Therapeutic Targets (49) et B-cell targeting in chronic graft-versus-host disease (155).

- **Phase 1 : Inflammation non-spécifique et conséquences de la GVHD aiguë le cas échéant**

L'inflammation non-spécifique résultant du conditionnement a déjà été décrite pour la phase 1 de la GVHD aiguë. Les lésions d'une éventuelle GVHD aiguë viennent s'y ajouter. Le contexte inflammatoire est profond, et les lymphocytes T alloréactifs ont été activés au cours de l'alloreconnaissance directe et indirecte. Parmi les tissus cibles de ces phénomènes, on retrouve notamment les organes lymphoïdes primaires – soit le thymus et la moelle osseuse – qui sont le siège des principaux mécanismes de la tolérance immunitaire.

- **Phase 2 : Rupture des différents mécanismes de tolérance**

On peut scinder la perte des mécanismes de tolérance en deux groupes : ceux qui interviennent dans l'ontogenèse des lymphocytes T et ceux qui interviennent dans l'ontogenèse des lymphocytes B.

- Perte de tolérance dans l'ontogenèse des lymphocytes T

Le conditionnement, les inhibiteurs de la calcineurine et les lymphocytes T alloréactifs sont responsables de la dysfonction des tissus thymiques. La GVHD aiguë est aussi responsable de la déplétion en ILC-3 et de la diminution en IL-22 impliquée dans la réparation du tissu thymique. Dans le cortex thymique, la déplétion en cTEC induit la perte de la sélection positive, et les thymocytes reçoivent des signaux de survie quelle que soit leur affinité avec la molécule HLA. Dans la médulla thymique, la déplétion en mTEC induit la perte de la sélection négative, et les thymocytes reçoivent des signaux de survie quelle que soit leur affinité avec le complexe [molécule HLA-peptide]. Il existe de plus une diminution quantitative et qualitative des Treg. Pris tous ensembles, ces mécanismes sont responsables de l'augmentation du nombre de clones T avec un potentiel autoréactifs. Au décours de la GVHD chronique, l'expansion des lymphocytes T CD4+, et en particulier des Th17 est favorisée.

- Perte de tolérance dans l'ontogenèse des lymphocytes B

A l'état physiologique, les mécanismes de tolérance qui s'appliquent aux lymphocytes B sont globalement moins performants que ceux qui s'appliquent aux lymphocytes T. Le répertoire des lymphocytes B naïfs comprend des clones autoréactifs mais ces derniers restent anergiques – même si ils rencontrent l'antigène spécifique du BCR (BCR, B-cell receptor) – jusqu'à leur rencontre avec un lymphocyte T CD4+ permettant leur activation dans le cadre de la coopération T/B. L'augmentation des clones autoréactifs T contribue en soi à augmenter le pool des lymphocytes B autoréactifs, surtout compte tenu du profil Th17 autoréactif qui prédomine.

En parallèle, la perturbation de l'environnement médullaire participe à la perte de tolérance centrale tandis que remaniements des tissus lymphoïdes secondaires est responsable de la perte de la tolérance périphérique. Dans les organes lymphoïdes secondaires en particulier, la sur-expression de BAFF, la

diminution des Tfr (Tfr, T-cell follicular regulatory cells) et l'augmentation des Tfh favorisent la formation de centres germinatifs et la différentiation des lymphocytes B en plasmocytes. L'IL-21 secrétée par Th17 augmente le switch isotypique IgM/IgG.

- **Phase 3 : Dommages tissulaires et réparations fibrosantes**

Les lymphocytes T CD8+ autoréactifs mais surtout les lymphocytes B et les plasmocytes autoréactifs contribuent aux lésions de la GVHD chronique. Les plasmocytes secrètent des auto-anticorps IgM puis IgG pouvant activer la cascade du complément et – pour IgG uniquement – médier l'ADCC (ADCC, antibody-dependent cellular cytotoxicity) par les cellules NK et les macrophages. Ces derniers participent à la destruction des tissus ainsi qu'à la synthèse de TGF-β qui active les fibroblastes responsables de lésions sclérosantes.

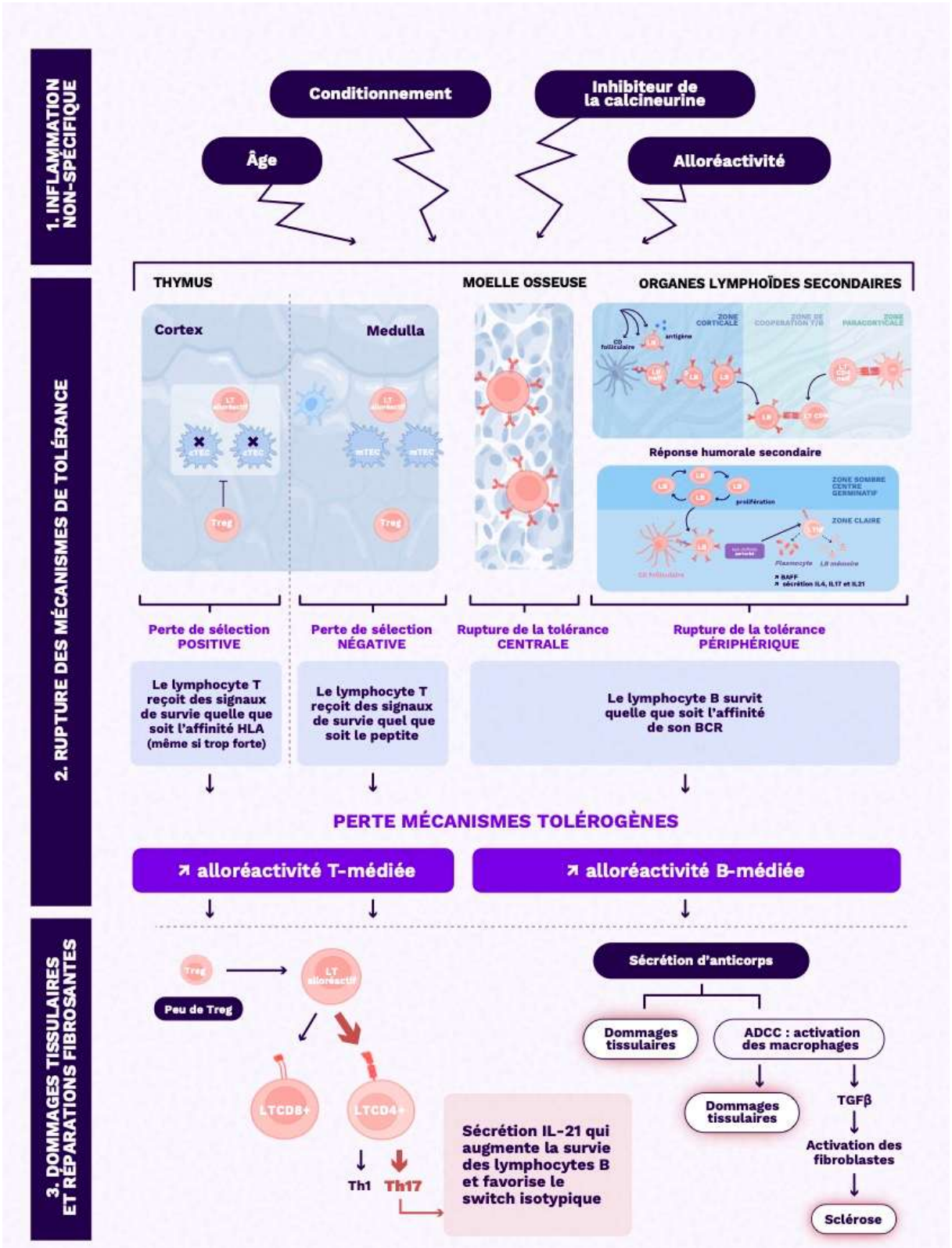


Figure 12 : Représentation simplifiée des trois phrases de la GVHD chronique
Créée avec BioRender et avec l'aide de l'agence de communication en santé Atout21

4. LES PARAMÈTRES IMPACTANT L'EXPRESSION DE L'ALLOREACTIVITÉ DANS L'ALLO-HCT

L'allo-HCT est une procédure multiparamétrique **(figure 13)**. L'alloréactivité résulte toujours de la reconnaissance du « non-soi » dont la différence donneur/receveur constitue le *primum movens*. L'expression de cette alloréactivité est cependant très fortement modulée par (i) la nature de la pathologie du receveur, (ii) le type de greffon administré et ses éventuelles manipulations, (iii) les thérapies pré-greffes et post-greffes administrées, et dans une moindre mesure (iv) les autres traits phénotypiques du receveur ou du donneur. Nous reprenons succinctement ces paramètres dans cette dernière partie.

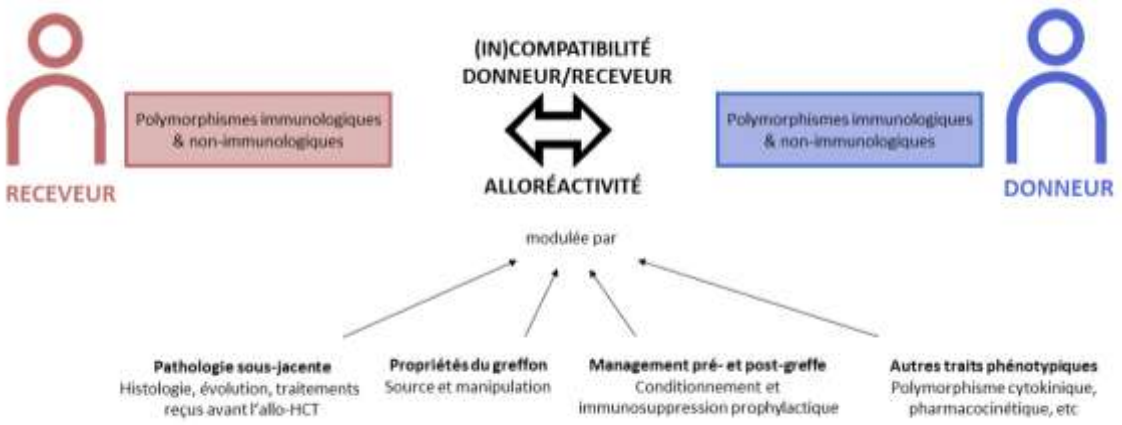


Figure 13 : Schéma des paramètres modulant l'expression de l'alloréactivité dans l'allo-HCT

1. La pathologie sous-jacente

Le rapport de l'EBMT de 2023 sur les allo-HCT réalisées en 2022 reprend la distribution des indications pour une première allo-HCT en Europe (34). Plus de 80% des indications sont des indications malignes **(figure 14)**. Les cellules tumorales peuvent, selon la nature de la pathologie (156) :

- Compromettre la présentation antigénique

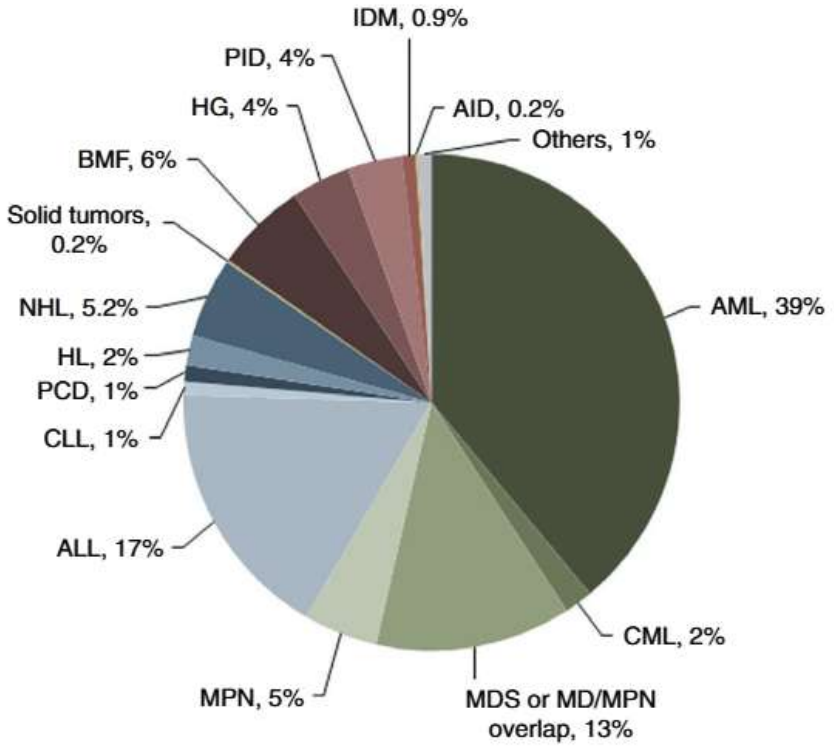
Afin d'échapper aux lymphocytes T qui pourraient reconnaitre le complexe [HLA-TAA] via leur TCR, les cellules tumorales peuvent sous-exprimer les molécules HLA de classe I et/ou II (157). Avant allo-HCT, ces sous-expressions ont été rapportées sur des blastes (leucémie myéloïde chronique) et des cellules lymphomateuses (lymphomes de Hodgkin ou agressifs) et seraient induites par la sous-expression de CIITA à la suite de l'expression de cytokines telles que TGF-β, TNF-α, IL-4 et IL-10 (158) ou de réarrangements impliquant CIITA (159).

- Modifier l'environnement tumoral cytokinique

Les cellules tumorales peuvent restreindre leur sécrétion en cytokines pro-inflammatoires afin d'échapper, ici encore, aux mécanismes de contrôle tumoral. Les blastes de leucémie aiguë lymphoïde peuvent par exemple réduire leur synthèse en IFN-γ (160) tandis que ceux de leucémie aiguë myéloïde diminuent leur synthèse en IL-15 (161).

- Exprimer des ligands des checkpoints inhibiteurs

Les cellules lymphomateuses porteuses de mutation sur le facteur de transcription *Myc* ont une expression augmentée de CD47 and PD-L1, ligands respectifs de SIRPα et PD-1 et qui entrainent pour l'un la diminution de la présentation antigénique (162) et pour l'autre de l'apoptose (163).



AML: acute myeloid leukemia
CML: chronic myeloid leukemia
MDS MD/MPN overlap: Myelodysplastic or myelodysplastic/myeloproliferative neoplasia
MPN: myeloproliferative neoplasm
ALL: acute lymphocytic leukemia
CLL: chronic lymphocytic leukemia
PCD : plasma cell disorders
HL: Hodgkin lymphoma
NHL: non Hodgkin lymphoma
BMF: bone marrow failure
HG : thalassemia and sickle cell disease
PID: primary immune deficiencies
IDM: inherited diseases of metabolism
AID: autoimmune diseases

Figure 14 : Répartition des indications pour une première allo-HCT en 2022 en Europe
D'après le rapport de l'EBMT de 2023 sur l'année 2022 (34)

Les cellules tumorales peuvent donc être responsables d'une immuno-modulation au sein de l'environnement tumoral affectant l'expression de l'alloréactivité. Dans les pathologies non malignes, par exemple les syndromes d'insuffisance médullaire, la niche hématopoïétique peut également être altérée, impactant la prise de greffe et la reconstitution immunitaire, et modifiant également l'expression de l'alloréactivité.

2. Le greffon

Il existe trois sources de greffon : les greffons de moelle osseuse, les cellules souches périphériques et les unités de sang de cordon placentaire (164–166). Leurs caractéristiques sont reprises dans le **tableau 6.** L'immunogénicité de l'allogreffe dépend notamment de la cellularité du greffon, ainsi que du nombre de lymphocytes T matures et de cellules NK qu'il contient.

- **Greffons de moelle osseuse (MO)**

Source « historique » de cellules souches, cette modalité de don est en recul et représente à ce jour à peine 20% des greffons en Europe (2). Le donneur est prélevé au niveau des crêtes iliaques, sous anesthésie générale. Le prélèvement ne nécessite pas d'administration préalable de facteurs de croissance, ce qui autorise son utilisation pour des donneurs pédiatriques. La cellularité du greffon prélevé est généralement plus faible que pour les greffons de cellules souches périphériques et la contamination par les érythrocytes est plus importante ce qui peut requérir leur déplétion en cas d'incompatibilité ABO, réduisant encore la cellularité du greffon. L'objectif est de récolter 2 à $4x10^8$ TNC/kg du receveur (TNC, total nucleated cells), et au moins $3x10^8$ TNC/kg dans le cadre des dons non-apparentés. Ces greffons contiennent moins de lymphocytes T matures ce qui peut réduire l'alloréactivité, en conséquence de quoi le risque de GVHD est moindre, mais l'effet GVL est également réduit. La reconstitution immunitaire peut être retardée, exposant le receveur plus longuement aux effets indésirables de l'aplasie **(paragraphe 1.2.1).**

- **Greffons de cellules souches périphériques (CSP)**

Ce type de greffons représente désormais 80% des sources utilisées dans l'allo-HCT. Le prélèvement des cellules souches est réalisé par cytaphérèse après administration de facteurs de croissance (G-CSF) ce qui permet de prélever un nombre plus important de cellules souches CD34+, entrainant une prise de greffe plus rapide. L'objectif est de prélever $4x10^6$ CD34+/kg du receveur et jusqu'à $8x10^6$ si une manipulation du greffon est prévue. Le nombre de lymphocytes T contenus dans le greffon est plus élevé, ce qui renforce la prise de greffe et l'effet GVL, mais augmente aussi le risque de GVHD. Le produit de la cytaphérèse contient peu d'érythrocytes, ce qui évite leur déplétion dans le cadre des greffes ABO-incompatibles et permet de maintenir un nombre élevé de cellules CD34+ et de lymphocytes T dans le greffon.

- **Unités de sang de cordon placentaire (USP)**

Les unités de sang placentaire sont des sources de cellules souches rapidement disponibles et pour lesquelles la compatibilité HLA requise est moins stricte. Leur utilisation se heurte à une NRM importante et à la cellularité des unités qui peut être faible, imposant l'administration conjointe de deux unités, ce qui augmente encore la NRM. De plus, les boosts ou les DLI sont impossibles en cas de rechute ou de prise de greffe retardée. L'essor des greffes haplo-identiques a fortement contribué au recul de l'utilisation de ces greffons.

		MO	**CSP**	**USP**
Teneur du greffon :	Lymphocytes T matures	Faible	Importante	Faible
	Erythrocytes	Importante	Faible	Faible
Caractère invasif de la procédure		Invasif	Peu invasif	Non invasif
Receveur	Prise de greffe	Moyenne	Rapide	Lente
	Reconstitution	Rapide	Rapide	Lente
	Risque de GVHD	Faible	Importante	Faible

Tableau 6 : Comparaison simplifiée des différentes sources de greffon
D'après "Optimizing allogeneic grafts in hematopoietic stem cell transplantation" (167)

Le choix de la source du greffon repose principalement sur les caractéristiques du donneur et la pathologie du receveur. Les greffons de moelle osseuse sont globalement préférés dans les populations pédiatriques, surtout pour les indications non malignes. A contrario, les greffons de cellules souches périphériques sont souvent préférés pour les indications malignes de l'adulte.

Notons que les greffons peuvent être manipulés, c'est-à-dire que leur contenu peut être modulé pour atteindre une meilleure immunogénicité ou éviter certains effets indésirables (168). Citons par exemple :

- La désérythrocytation : afin d'éviter le risque d'hémolyse immédiate et l'érythroblastopénie dans la cadre des incompatibilités ABO majeures.
- La déplasmatisation : afin de réduire le risque d'hémolyse immédiate ou retardée dans le cadre des incompatibilités ABO mineures.

La déplétion en lymphocytes T (T-cell depletion) est discutée dans la prophylaxie de la GVHD **paragraphe 4.3.2**. et également dans la revue « KIR in allogeneic hematopoietic stem cell transplantation: need for a unified paradigm for donor selection » de la **partie II.**

3. Management pré- et post-allo-HCT

1. Le conditionnement pré-greffe

Les objectifs du conditionnement ont été initialement décrits ayant quatre buts : (i) libérer de l'espace et préparer la niche hématopoïétique, (ii) supprimer la mémoire immunitaire du receveur, (iii) éviter le rejet du greffon et (iv) supprimer les cellules cancéreuses le cas échéant (169).
La démonstration de greffes pédiatriques réalisées dans le cadre des déficits immunitaires combinés sévères (SCID) et des anémies anaplasiques sévères (SAA) sans conditionnement – si le donneur est un membre de la fratrie HLA-identique (170) – remet en question le premier point.

A ce jour on décrit plutôt les objectifs du conditionnement en termes de :

- Cytoréduction : ayant pour but de réduire le nombre de cellules cancéreuses dans le cadre des pathologies malignes.
- Immunosuppression : à la fois dirigée contre les cellules immunitaires du receveur pour éviter le rejet du greffon (44) mais également contre les cellules immunitaires du donneur pour restreindre l'effet GVH.

Les conditionnements ont initialement été répartis en trois catégories en fonction de leur intensité (171).

- **Conditionnements myéloablatifs (MAC, myeloablative conditioning)**

Ils sont définis comme la « combinaison d'agents ayant pour but d'induire une pancytopénie profonde et une myéloablation dans les 1 à 3 semaines suivant l'administration ; la pancytopénie est de longue durée, généralement irréversible et dans la plupart des cas fatale, à moins que l'hématopoïèse ne soit rétablie par l'administration de cellules souches hématopoïétiques. »
Ces conditionnements offrent une cytoréduction – et donc un effet anti-tumoral – importante qui diminue le risque de rechute (172) ainsi qu'une prise de greffe le plus souvent rapide. Ils sont néanmoins marqués par une toxicité importante (TRT : transplant-related toxicity), ce qui en restreint l'accessibilité aux patients jeunes sans comorbidité (173).

- **Conditionnements non-myéloablatifs (NMAC, non-myeloablative conditioning)**

Ils sont définis comme des conditionnements « causant des cytopénies minimales et ne nécessitant pas l'administration de cellules souches [pour assurer la reconstitution hématopoïétique] ».
Ils sont de fait moins toxiques et permettent l'accès à la greffe à des patients qui ne pourraient pas tolérer les conditionnements myéloablatifs (174). La cytoréduction est faible mais l'immunosuppression est importante ce qui permet la prise de greffe et donc l'effet GVL, bien que le nombre de CD3+ et de CD34+ à administrer soit plus important (175). La reconstitution immunitaire est plus tardive que pour les conditionnements myéloablatifs (176).

- **Conditionnements d'intensité réduite (RIC, reduced intensity conditioning)**

Ce sont des conditionnements qui ne sont ni myéloablatifs, ni non-myéloablatifs.
Ils ne sont pas non-myéloablatifs car ils sont responsables de cytopénies prolongées nécessitant l'administration de cellules souches. Ils ne sont pas non plus myéloablatifs car la dose d'agents alkylants administrée ou de TBI (TBI, total body irradiation) est réduite de 30%.

Plus récemment, les conditionnements à toxicité réduite (RTC, reduced toxicity conditioning) ont été définis comme de nouvelles versions de MAC moins toxiques, par exemple en remplaçant le cyclophosphamide par la fludarabine. De plus en plus de nouveaux conditionnements incluant de nouveaux agents thérapeutiques se développent, challengeant la traditionnelle classification MAC/RIC/NMAC. Une récente étude propose un score basé sur la compilation de l'intensité des différents agents du conditionnement et propose une catégorisation en intensités faible, intermédiaire ou élevée (177) qui prédit mieux la NRM que la classification initiale MAC/NMAC.

Le choix du conditionnement se base essentiellement sur l'âge du patient, ses comorbidités, le statut de la maladie au moment de la transplantation, la compatibilité HLA du donneur, le type de greffon et l'histologie de la pathologie (ciblant spécifiquement les cellules tumorales ou au contraire minimisant la cytotoxicité dans le cas des indications non-malignes) (178).
L'intensité du conditionnement est corrélée à celle des dommages potentiels pouvant générer de l'alloréactivité. Une plus grande toxicité du conditionnement augmente donc le risque de GVH.

2. La prévention de la GVHD

La prophylaxie de la GVHD reste à ce jour un défi compte tenu de l'incidence encore importante de la GVHD aiguë et chronique dans les différentes séries. L'objectif n'est pas de couvrir ce champ de l'allogreffe mais de mentionner les molécules fréquemment utilisées en évoquant leurs mécanismes d'action. Certains agents ciblent les signaux d'activation mentionnés dans le **paragraphe 3.1.2.,** d'autres sont lymphopéniants tandis que d'autres encore sont dits anti-prolifératifs et agissent de façon moins spécifique sur le cycle cellulaire (40).

- **Les agents ciblant les signaux d'activation lymphocytaire**

Pour mémoire :
- *Signal 1 : reconnaissance d'un complexe [molécule HLA-peptide] différent du soi*
- *Signal 2 : engagement d'un signal de co-stimulation, par exemple CD80/86 – CD28*
- *Signal 3 : renforcement du signal par les signaux cytokiniques pro-inflammatoires de l'environnement. En particulier, IL-2 se fixe sur son récepteur CD25, dont l'engagement active les voies Jak/Stat et mTOR, favorisant la progression de la phase G1 à la phase S du cycle cellulaire soutenant la prolifération cellulaire*

- Signal 1 : les inhibiteurs de la calcineurine (ciclosporine-A ou tacrolimus)

Les deux molécules ont le même mécanisme d'action. Elles empêchent l'action de la calcineurine et donc la déphosphorylation de NFAT (NFAT, Nuclear Factor of Activated T-cells). NFAT phosphorylé reste dans le cytoplasme et ne peut pas exercer son rôle de facteur de transcription pour la synthèse du récepteur de l'IL-2. Sans le signal IL-2, le signal 3 nécessaire à l'activation des lymphocytes est empêché et donc l'activation des lymphocytes T ne se fait pas. L'effet n'est cependant pas spécifique aux lymphocytes allo- ou autoréactifs mais concerne tous les types de lymphocytes, dont les Treg.

- Signal 2 : les stéroïdes

Les stéroïdes inhibent l'interaction entre les cellules présentatrices de l'antigène et les lymphocytes T, ils trouvent leur place dans le traitement curatif de la GVHD.

- Signal 3 : Les anti-CD25 et les inhibiteurs de mTOR

Les anti-CD25 sont des anticorps monoclonaux dirigés contre la chaîne α du récepteur de l'IL-2 (CD25) qui empêchent la fixation de l'IL-2 sur son récepteur et bloquent les voies d'aval, notamment mTOR. Les inhibiteurs de mTOR (sirolimus, everolimus) bloquent spécifiquement cette voie. Dans les deux cas, les agents empêchent l'avancée du cycle cellulaire de G1 à S, ce qui bloque la prolifération cellulaire.

- **Les agents anti-prolifératifs**

Le mycophenolate mofetyl (MMF) est un inhibiteur enzymatique réversible, spécifique et non compétitif d'une enzyme clé de la synthèse *de novo* des purines. Le MMF entraîne une déplétion spécifiquement lymphocytaire car seuls les lymphocytes sont exclusivement dépendants de cette voie de synthèse. Le MMF inhibe préférentiellement les lymphocytes activés (179).
Le méthotrexate (MTX) est un antagoniste de l'acide folique qui agit sur de nombreuses voies métaboliques critiques pour la survie et la prolifération cellulaires. Il inhibe lui aussi la synthèse *de novo* des purines mais aussi des pyrimidines, inhibe la voie Jak-Stat et empêche également la translocation nucléaire de NK-κB (180).
Le cyclophosphamide est une prodrogue dont le métabolite intracellulaire constitue le principe actif sous la forme d'un agent alkykant. Le métabolisme vers la forme active dépend de la concentration de l'enzyme aldéhyde déshydrogénase (ALDH) : au plus la concentration en ALDH est faible, au plus l'effet antiprolifératif est fort. Ainsi, le cyclophosphamide diminue significativement la prolifération des lymphocytes activés et alloréactifs, tout en préservant les autres cellules hématopoïétiques et les épitheliums (181).

- **Les agents lymphopéniants**

Parmi les agents lymphopéniants les plus utilisés, on retrouve l'ATG (ATG, anti-thymoglobin). Il existe plusieurs formulations qui sont toutes des sérums anti-lymphocytaires polyclonaux. En plus de la lymphodéplétion T, l'ATG entraine entre autres l'épuisement des monocytes, des cellules NK et des lymphocytes B ainsi que l'induction de l'activation de cellules avec un profil immunotolérant (182).

La T-deplétion est discutée plus longuement dans la revue « KIR in allogeneic hematopoietic stem cell transplantation: need for a unified paradigm for donor selection » de la **partie II.**

4. Autres traits phénotypiques

Certains traits phénotypiques – en rapport avec l'immunologie ou non – du donneur et/ou du receveur peuvent impacter l'amplitude de l'alloréactivité (183) :

- **Le polymorphisme cytokinique**

Il existe au décours de l'allo-HCT une implication majeure des cytokines, aussi appelée « orage cytokinique ». La **figure 15** – bien qu'ancienne – donne un aperçu des principales cytokines engagées au décours de l'allo-HCT.

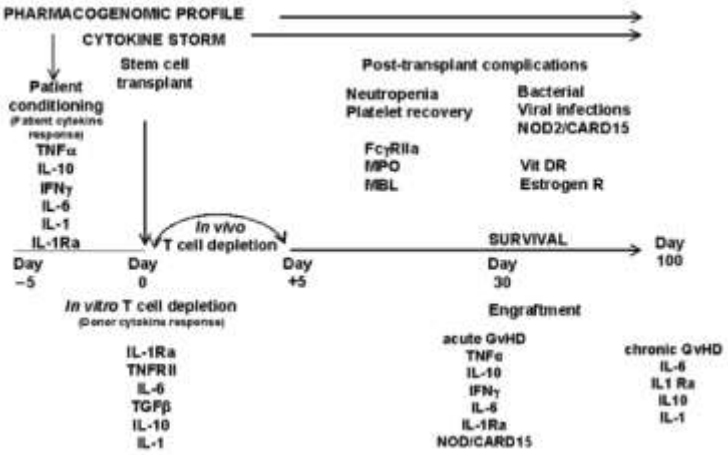


Figure 15 : Représentation de quelques cytokines intervenant au décours de l'allo-HCT
D'après "Genetic polymorphisms predicting the outcome of bone marrow transplants" (184)

Cette illustration datée de 2004 reprend pourtant déjà les principaux axes de variabilité des cytokines, à savoir :

- « Les régimes de conditionnement entrainent la libération de cytokines chez le receveur, dépendamment de polymorphismes génétiques. Certains patients peuvent être prédisposés à libérer des niveaux élevés de certaines cytokines avant et après la transplantation […] et donc être prédisposés et/ou protégés (en fonction de la libération de cytokines, par exemple TNFα par rapport à IL-10) à la GVHD aiguë ou chronique
- Les cellules issues du donneur sont également génétiquement prédisposées à libérer des niveaux élevés ou faibles de certaines cytokines
- Le degré de prophylaxie de la GVHD et/ou les stratégies de déplétion des lymphocytes T influencent ce phénomène. » (184)

Une revue plus récente (2017) reprend les mécanismes impliqués dans le polymorphisme de l'expression cytokinique (185).

- **<u>Pharmacocinétique/pharmacodynamique</u>**

Le poids et/ou la surface corporelle du receveur sont des paramètres incontournables de l'ajustement des drogues administrées avant et après l'allo-HCT, ainsi que du nombre de cellules désirées pour la réinjection du greffon. La variabilité inter-individuelle du métabolisme de certains agents thérapeutiques (ciclosporine, MTX, …) impose le suivi de leur concentration pour assurer une efficacité optimale et prévenir les effets indésirables qui seraient liés à un surdosage.
D'autres traits phénotypiques peuvent entrer en jeu, comme le nombre absolu de lymphocytes pour la détermination de la dose optimale en ATG (anti-thymoglobuline) (186). Dans une étude prospective conduite sur une population pédiatrique, les receveurs ayant eu un dosage optimal en ATG ont bénéficié d'une meilleure reconstitution CD4+ sans augmentation de GVHD ou de non-prise de greffe, quelle que soit la source du greffon, ce qui semble souligner l'importance de l'adaptation des thérapies à d'autres paramètres phénotypiques que le poids (187).

- **<u>Le score HED</u>**

La divergence évolutive du HLA (HED, HLA evolutionary divergence) utilise le score de Grantham pour quantifier la différence des propriétés physico-chimiques des acides aminés des molécules HLA : composition, polarité et volume. L'analyse est restreinte au niveau des domaines α1/α2 pour la molécule HLA de classe I et domaines α1/β1 pour la molécule HLA de classe II (188).
L'hypothèse se base sur « l'avantage hétérozygote » et postule qu'un haut HED augmente la diversité des peptides pouvant être enchâssés, élargissant l'immunopeptidome de l'individu et augmentant par

conséquent la capacité de discrimination entre le « soi » et le « non-soi » par le TCR des lymphocytes T (voir **section III**).
Le plus haut HED est ainsi corrélé à une meilleure survie dans une cohorte de patients transplantés pour leucémie aiguë myéloide (189).

5. CONCLUSIONS ET OBJECTIFS DE THÈSE

Dans cette première partie, nous avons mis en évidence le problème de santé publique posé par la GVHD en soulignant la nécessité de garder intact un effet GVL dans les indications malignes – **section 1.** Nous avons expliqué la complexité des mécanismes l'alloréactivité soutenant ces deux effets – **section 3** – en particulier dans le modèle multi-paramétrique que représente l'allo-HCT – **section 4**. Cependant, une constante émerge : il faut de l'incompatibilité pour générer de l'alloréactivité – **section 2.**

L'incompatibilité au regard de l'activation des lymphocytes T correspond au « signal 1 » de reconnaissance entre le TCR et le complexe [molécule HLA-peptide] tandis que l'incompatibilité au regard de l'activation de cellules NK correspond à plusieurs modèles de compatibilité : MICA/MICB et le système KIR. Nous avons choisi d'adresser chacune de ces problématiques au travers des deux projets que comportent cette thèse de sciences.

- L'activation des cellules NK et l'incompatibilité KIR :

La justification de notre intérêt pour les KIR émane de (i) l'important – et fascinant ! – polymorphisme de ce système, supérieur à celui des protéines MICA et MICB ainsi que de (ii) l'apparent manque d'unité s'agissant de la définition du KIR-mismatch. Conscients que la petitesse des cohortes que nous pouvions séquencer – à la fois sur le plan réglementaire et financier – ne nous permettrait pas de tirer des conclusions clinico-biologiques, nous nous sommes concentrés sur la construction d'une « preuve de concept » montrant que les modèles de prédiction utilisés jusqu'à présent par les différentes études pouvaient se « contredire ».

- L'activation des lymphocytes T et les antigènes mineurs d'histocompatibilité

La justification de notre intérêt pour les antigènes mineurs d'histocompatibilité réside dans la proportion significative de receveurs greffés avec un donneur géno-identique et qui ont développent une GVHD aiguë, parfois sévère en dehors de toute incompatibilité HLA. Ce constat impose l'implication des peptides présentés par les molécules HLA – regroupés sous le terme d'« immunopeptidome » et notamment de ceux qui sont différents entre le donneur et le receveur – les antigènes mineurs d'histocompatibilité (mHAgs). Depuis une décennie, le séquençage de l'exome est une réalité qui s'est exportée des les laboratoires spécialisés vers des laboratoires plus polyvalents. Nous avons – au laboratoire HLA du CHRU de Nancy – réalisé la préparation de librairies destinées au séquençage de l'exome avec une qualité tout à fait acceptable et ce sans automatisation. Nous avons ensuite contribué au développement d'un outil bioinformatique permettant la comparaison directionnelle des peptides mismatchés dans le couple donneur/receveur. Ces deux derniers points soulignent la faisabilité en pratique clinique d'un matching donneur/receveur qui viendrait compléter celui du HLA pour expliquer l'alloréactivité T.

PARTIE II – L'ACTIVATION DES CELLULES NK DANS L'ALLO-HCT À TRAVERS LE PRISME DU KIR-MISMATCH

1. INTRODUCTION

Nous avons souligné dans les **paragraphes 3.2.2. et 3.3.** l'implication des cellules NK au décours des processus physiopathologiques post-allo-HCT. Brièvement, les cellules NK présentes dans le greffon ont été éduquées au contact des molécules HLA de classe I du donneur. Elles contribuent notamment à l'effet GVL en ciblant les cellules tumorales qui (i) auraient tenté d'échapper à la pression du système immunitaire en sous-exprimant les molécules HLA de classe I et/ou (ii) auxquelles il manque une plusieurs molécules HLA lorsque le couple donneur/receveur n'est pas HLA compatible. Elles contribuent à l'effet GVH sur un mode plus ambivalent, à la fois responsables des dommages tissulaires impliqués dans la clinique de la GVHD aiguë, mais également de la suppression des cellules dendritiques du receveur ce qui empêche l'alloreconnaissance directe et l'activation des lymphocytes T alloréactifs à un stade précoce.
La cinétique rapide de la reconstitution des cellules NK apparait séduisante pour en déduire que les cellules NK seraient engagées dans un effet GVL précoce et empêcherait la genèse de la GVHD (43). Cependant, les études cliniques sont longtemps apparues contrastées.

Nous avons relevé 27 modèles de prédiction de l'alloréactivité des cellules NK, répartis en six grandes catégories : trois dépendantes du typages HLA – les modèles ligand-ligand, récepteur-ligand et éducationnels – et trois indépendantes du HLA basés sur les haplotype KIR, le contenu en gènes activateur et inhibiteurs et le polymorphisme allélique. Nous les avons décrits dans la **revue de la littérature** suivante ; puis nous avons publié un **article** où ces modèles sont appliqués à deux cohortes de donneur/receveur – l'une géno-identique et l'autre haplo-identique – pour lesquelles nous avons séquencés les gènes KIR et HLA. Nous avons relevé que les différentes études établissaient l'activation des KIR via des modèles prédictifs qui s'opposent conceptuellement et factuellement, ce qui complexifie la littérature tentant de définir l'effet bénéfique ou préjudiciable d'un mismatch KIR sur les outcomes de l'allo-HCT.

Nous discutons ces travaux dans la **partie IV** du manuscrit.

2. REVUE

frontiers in Immunology

REVIEW
published: 15 February 2022
doi: 10.3389/fimmu.2022.821533

KIR in Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplantation: Need for a Unified Paradigm for Donor Selection

Adèle Dhuyser[1,2], *Alice Aarnink*[1,2], *Michaël Pérès*[1], *Jyothi Jayaraman*[3], *Neda Nemat-Gorgani*[3], *Marie Thérèse Rubio*[2,4], *John Trowsdale*[3] *and James Traherne*[3*]

[1] Histocompatibility Laboratory, CHRU de Nancy, Vandoeuvre-les-Nancy, France, [2] IMoPA6, UMR7365 CNRS, Université de Lorraine, Vandoeuvre-les-Nancy, France, [3] Department of Pathology, University of Cambridge, Cambridge, United Kingdom, [4] Department of Hematology, CHRU de Nancy, Vandoeuvre-les-Nancy, France

OPEN ACCESS

Edited by:
Indira Guleria,
Brigham and Women's Hospital and Harvard Medical School, United States

Reviewed by:
Marco Andreani,
Bambino Gesù Children's Hospital (IRCCS), Italy
Roberto Crocchiolo,
Niguarda Ca' Granda Hospital, Italy

***Correspondence:**
James Traherne
jat51@cam.ac.uk

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

Received: 24 November 2021
Accepted: 06 January 2022
Published: 15 February 2022

Citation:
Dhuyser A, Aarnink A, Pérès M, Jayaraman J, Nemat-Gorgani N, Rubio M-T, Trowsdale J and Traherne J (2022) KIR in Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplantation: Need for a Unified Paradigm for Donor Selection. Front. Immunol. 13:821533. doi: 10.3389/fimmu.2022.821533

Allogeneic hematopoietic stem cell transplantation (aHSCT) is a lifesaving therapy for hematological malignancies. For years, a fully matched HLA donor was a requisite for the procedure. However, new immunosuppressive strategies have enabled the recruitment of viable alternative donors, particularly haploidentical donors. Over 95% of patients have at least two potential haploidentical donors available to them. To identify the best haploidentical donor, the assessment of new immunogenetic criteria could help. To this end, the clinical benefit of KIR genotyping in aHSCT has been widely studied but remains contentious. This review aims to evaluate the importance of KIR-driven NK cell alloreactivity in the context of aHSCT and explain potential reasons for the discrepancies in the literature. Here, through a non-systematic review, we highlight how the studies in this field and their respective predictive models or scoring strategies could be conceptually opposed, explaining why the role of NK cells remains unclear in aHCST outcomes. We evaluate the limitations of each published prediction model and describe how every scoring strategy to date only partly delivers the requirements for optimally effective NK cells in aHSCT. Finally, we propose approaches toward finding the optimal use of KIR genotyping in aHSCT for a unified criterion for donor selection.

Keywords: killer immunoglobulin-like receptors (KIR), allogeneic hematopoietic stem cell transplantation (aHSCT), Donor selection, alloreactivity potential, predictive model

1 INTRODUCTION

Allogeneic hematopoietic stem cell transplantation (aHSCT) is a lifesaving therapy for hematological as well as non-hematological diseases (1, 2). Technological advances notably in the field of molecular biology and drug development have enabled personalized approaches, improving the management of negative outcomes such as graft versus host disease (GVHD) or graft failure. A major step forward in aHSCT has been the possibility of using alternative donors, a feature that has increased markedly this past decade (3).

For years, it was thought that a fully matched HLA donor, i.e., a donor with 10/10 allele compatibility for the HLA-A, HLA-B, HLA-C, HLA-DRB1, and HLA-DQB1, loci was required for aHSCT.

Considering the average number of siblings in Caucasian populations, the likelihood of finding a matched sibling donor (MSD) is around 30% (4), but this probability increases in populations with higher natality rates. The likelihood of finding a matched unrelated donor (MUD) depends on the ethnicity and is much higher for whites of European descent than minorities such as blacks of South or Central American descent, 75% vs. 16% respectively, according to US registries (5, 6). Moreover, MUDs are only available within a median time of 2–3 months from the start of the donor search, a delay that might be too long for patients requiring aHSCT for high-risk hematological malignancies (7).

2 PARADIGM SHIFT IN DONOR AVAILABILITY AND DONOR SELECTION

2.1 Alternative Donors for aHSCT

When no fully matched HLA donor is available or can be recruited within an acceptable timescale, aHSCT can therefore be performed with mismatched unrelated donors (MMUD), umbilical blood cord (UBC) stem cell products, or haploidentical (haplo-) related donors. Each of these graft sources tend to lead to particular clinical outcomes and have specific pros and cons arising from transplantation logistics (8–10) (**Supplementary Table 1**).

Concerning haplo-HSCT, the limiting factor of success in the past was the T-cell response of the donor to allogeneic HLA molecules resulting in high incidences of GVHD and unacceptable treatment-related mortality (TRM) (11–13). T-cell depletion (TCD) has, therefore, revolutionized haplo-HSCT clinical outcomes. Currently, there are several different strategies to obtain TCD (**Table 1**). A large retrospective registry analysis, conducted by The European Society for Blood and Marrow Transplantation (EBMT), has reported the relative use of each platform between 2011 and 2015, highlighting a preference for T-cell replete (TCR) transplant with PT-Cy (post-transplant cyclophosphamide) platforms (76% of 2,698 haplo-HSCT), followed by TCR with ATG (anti-thymocyte globulin)-based platforms (21.4%), while *ex-vivo* TCD is only marginally used (16).

Comparing UBC to haploidentical donors in a randomized study, van Besien et al. highlighted that both procedures achieve favorable and similar results for non-relapse mortality, relapse, and survival (17). Concerning the use of 9/10 MMUD, a high cumulative incidence of grade II–IV acute GVHD (aGVHD) was previously reported, which reached 69% in some cohorts (18–20) and restricted the use of such donors. Recent studies introducing PT-Cy instead of historical anti-thymoglobulins (ATG) as GVHD prophylaxis show significantly lower rates of aGVHD using 9/10 MMUD (21, 22). One question being addressed now under clinical trials is whether haploidentical donor or 9/10 MMUD is a better alternative donor (NCT01597778, NCT03250546).

However, practical considerations, such as lower costs, faster availability, and feasibility of donor-lymphocyte infusions, tilt the balance in favor of haplo-HSCT compared with both 9/10 MMUD and UBC (8–10).

2.2 Outcomes of Haplo-HSCT in Adult Populations

Considering current standards of care, studies converging toward the beneficial use of haplo-HSCT are increasing as outlined below.

In leukemia, two prospective studies have highlighted that haplo-HSCT was similarly effective as MSD for both acute myeloid leukemia (AML) and acute lymphoid leukemia (ALL) using the Beijing protocol (23, 24). In high-risk leukemia patients, a retrospective study suggested that PT-Cy haplo-HSCT may have a greater graft versus leukemia (GVL) effect, compared with MSD (25). In terms of cGVHD, PT-Cy haplo-HSCT showed better outcome than 8/8 MUD, with similar overall survival (OS) (26). Compared with UBC, in retrospective studies and one randomized study, results differ depending on the strategy used, but PT-Cy haplo-HSCT was as successful as the haplo-cord strategy for OS (17, 27), while being more effective than single-cord transplantation (28, 29).

In ALL with positive residual disease, the haplo-HSCT cohort had a lower 3-year cumulative incidence of relapse (CIR) and higher 3-year probability of leukemia-free survival (LFS) and OS without any difference for non-relapse mortality (NRM) compared with the MSD cohort (30).

In non-Hodgkin lymphoma, retrospective studies have compared the results of PT-Cy haplo-HSCT to single-unit UBC, achieving better results in terms of OS with haplo-HSCT especially when bone marrow is used as the stem cell source (29, 31). In Hodgkin lymphoma, haplo-HSCT compared in large registry studies to both MSD and MUD showed similar survival outcomes compared with MSD and lower cGVHD compared with MUD (32, 33).

Haplo-HSCT has also shown promising results in non-malignant disorders: for example, in sickle cell disease, using both TCD and TCR platforms (34–37); in patients with thalassemia major, using the Baltimore strategy (38); in anaplastic anemia as salvage treatment in patients without an MSD and failing after immunotherapies (39) but also as upfront therapy using the Baltimore protocol (40, 41); and in primary immunodeficiency disorders for patients with high-risk features (42) especially in low-income settings in which family donors are the only available option (43).

Through a meta-analysis of 30 studies and 22,974 recipients (44), PT-Cy haplo-HSCT was associated with increased all-cause mortality compared with MSD but similar all-cause mortality compared with MUD and reduced all-cause mortality compared with MMUD. Considering NRM, PT-Cy haplo-HSCT was associated with worse outcomes compared with MSD but better outcomes compared with MUD and MMUD. In terms of relapse, PT-Cy haplo-HSCT was associated with similar outcome compared with MSD and MMUD but showed increased relapse compared with MUD.

2.3 KIR Genotyping as an Insight to Identify the Best Haploidentical Donor

Favorable practical aspects of using a haploidentical donor and accumulation of evidence of improved outcomes achieved with T-

TABLE 1 | Comparison of current methods for T-cell depletion.

	Protocol name Principle	Biological hypothesis underlying clinical effects	Reported clinical outcomes
Ex-vivo T-cell depletion **TCD platforms**	*$CD34^+$ megadose* Positive $CD34^+$ selection	Use of G-CSF mobilized PBSC as graft source allows the collection of high numbers of stem cells that are isolated using immune magnetic strategies. Slow immune reconstitution leads to high incidence of infection and high relapse rates	Engraftment 91% Grade II–IV aGVHD 8%/cGVHD 7% TRM 37%–44%
	Specific alloreactive T-cell depletion ⇔ Selective $CD3^+$/$CD19^+$ cell depletion	NK cells, monocytes and dendritic cells are retained, which may contribute to a better immune reconstitution after transplantation Significantly increase of the risk of GVHD compared with positive $CD34^+$ selection	Engraftment 95% Grade II–IV aGVHD 46%/cGVHD 18% 2y TRM 42% 2y relapse rate 31% 2y OS 28%
	Designed graft ⇔ Specific removal of alloreactive cells	Depletion of $TCR\alpha\beta^+$/$CD19^+$ cells/depletion of $CD45RA^+$ naive T cells Low incidence of GVHD and NRM, excellent relapse-free survival	Engraftment 97.5% Grade I–II aGVHD 30%/no cGVHD TRM 5% Relapse 24%
	Adoptive T-cell add-back ⇔ Treg/Tcons infusion following haplo-HSCT	– Donor-derived Tregs decrease aGVHD – Co-infusion of Treg + conventional T cells fosters immune reconstitution and prevents aGVHD → Low incidence of GVHD, optimal immune reconstitution, and very low relapse rate	Engraftment 95%, 46 months DFS 56% Grade II–IV aGVHD 15%/no cGVHD
	Genetically engineered TK cells add-back ⇔ Infusion of donor lymphocytes expressing herpes-simplex thymidine kinase suicide gene (TK-cells) following haplo-HSCT (14)	TK-cell infusions would confer GVL activity and early protective immune reconstitution after haplo-HSCT, while the suicide gene allow the control of GVHD which could be induced by the TK-cells	3y NRM 40% for patients with *de-novo* AML in CR at haplo-HSCT/41% for patients in relapse at haplo-HSCT 3y OS: 49% for patients with *de-novo* leukemias in any CR No GVHD-related deaths or long-term complication (10 of 22 immune reconstituted patients developed aGVHD + 1 patient developed cGVHD)
In-vivo T-cell depletion **TCR platforms**	*Baltimore protocol* T-cell replete (TCR), unmanipulated graft + High doses PT-Cy: 50 mg/kg/day on day +3/+4	<u>High-dose PT-Cy</u> – Selectively eliminates the alloreactive donor T cells (mainly naive T cells) without exerting toxic effects on hematopoietic stem cells ↘ Proliferation of alloreactive $CD4^+$ effector T cells ↘ Survival of alloreactive $CD4^+$ and $CD8^+$ alloreactive T cells –Preferentially encourages recovery of regulatory T cells →Host regulatory T cells thereby expand shifting the Treg:T-cell ratio in favor of an immunotolerant balance	<u>Non-myeloablative conditioning</u> Engraftment 85%–90%, OS 40%–45%, Relapse >40% <u>Myeloablative regimen</u> Decreased relapse compared to NMAC CR1 11%/CR2 26%/active disease 40% Increased OS compared to NMAC CR1 77%/CR2 49%/active disease 38%
	Beijing protocol T-cell replete (TCR), unmanipulated and G-CSF primed graft + ATG + Intensive post-graft IS (MTX, CsA, MMF)	<u>G-CSF</u> Induces T-cell hyporesponsiveness Induces Th2 polarization in BM and PBSC harvests Induces proliferative expansion of regulatory cells, including regulatory T cells, myeloid-derived suppressor cells, and regulatory B cells	Engraftment 99%, Grade II–IV aGVHD 40%/3y cGVHD 50% 3y NRM 17%, 3y relapse 17%, 3y DFS 67%, 3y OS 70%

Adapted from "Evolution of the Role of Haploidentical` Stem Cell Transplantation: Past, Present, and Future", Kwon et al. (7) and "Update on Current Research Into Haploidentical Hematopoietic Stem Cell Transplantation", Sun et al. (15).

aGVHD, acute GVHD; AML, acute myeloid leukemia; ATG, anti-thymoglobulin; BM, bone marrow; cGVHD, chronic GVHD; CR(#), complete remission (number #); CsA, ciclosporin-A; DFS, disease-free survival; G-CSF, granulocyte colony-stimulating factor; GVL: graft versus leukemia; IS, immunosuppression; MMF, mycophenolate mofetil; MTX, methotrexate; NRM, non-relapse mortality; OS, overall survival; PBSC, peripheral blood stem cell; PFS, progression-free survival; PT-Cy, post-transplant cyclophosphamide; TCD, T-cell depleted; TCR, T-cell replete; TRM, transplant-related mortality; NMAC, non myeloablative conditioning; #y, # years.

cell replete platforms have led to a 291% increase of haplo-HSCT in Europe between 2005 and 2015 according to the 2015 EBMT activity survey report (45). This trend continues since the use of haploidentical donors encountered a 11% increase between 2018 and 2019, according to their last report (46). In particular, 42% of pediatric patients (<18 years old at transplant) undergoing aHSCT with a related donor receive a transplant from a haploidentical relative (46). A comprehensive list of aHSCT indications published

in 2019 has specified situations where mismatched alternative donors (MMAD)—i.e., MMUD, UBC, or haploidentical donors —ought to be performed, highlighting the ever wider applications of this procedure (47).

Johns Hopkins cohort data have highlighted that at least 1 and on average 2.7 first-degree relative haploidentical donors would be available for 95% of patients suffering from hematological malignancies. Second-degree relative haploidentical donors have also been successfully used (48–50). The democratization of using haploidentical donors, therefore, leads to a major paradigm shift: while donor availability represented the main drawback for years, the issue now becomes one of finding the best haploidentical donor among several potential ones.

Recent optimization of the resolution/cost ratio for genetic technologies has enabled genomics to become effective in the field of aHSCT, improving HLA typing quality and providing alternative means to assess the compatibility and predict the potential alloreactivity within a donor/recipient (D/R) couple. Natural killer (NK) cell alloreactivity assessment through killer immunoglobulin-like receptor (KIR) genotyping currently represents one of the most promising perspectives.

3 POTENTIAL OF NK CELLS IN ALLOGENEIC HSCT

3.1 NK Cell Education in Autologous Settings

Natural killer cells are innate lymphoid cells involved in early immunity against infectious agents and tumors (51). They work through cytolytic activity and production of cytokines, features regulated by interactions of germline-encoded receptors with their ligands, including major histocompatibility complex (MHC) molecules (52, 53). Two main groups of receptors interact with MHC class I molecules: lectin-like CD94/NKG2 and immunoglobulin superfamily KIR. Here, we focus on KIR as they are highly polymorphic. The cytotoxicity of NK cells is considered as a feature of innate immunity as their receptors are not dependent on somatic rearrangement, although KIRs are also expressed on some T cells. They are regulated by undergoing a process called "education" in humans ("licensing" in murine models) to prevent inappropriate activation of NK cells against normal cells.

An NK cell interacts with an MHC class I molecule *via* one of its cognate receptors to become competent, i.e., to be able to activate itself against abnormal cells (54). NK cells that have not had any contact with an MHC class I molecule remain inactive. Thus, each competent NK cell maintains self-tolerance to autologous healthy cells through an inhibitory receptor, while it can recognize and kill abnormal cells that have downregulated MHC class I molecules, according to the missing-self theory (55).

3.2 NK Cell Alloreactivity in aHSCT

As MHC and KIR genes are located on chromosomes 6 and 19, respectively, they segregate independently. In a non-autologous setting, such as aHSCT, donor NK cells can be alloreactive when they express inhibitory KIR that are not engaged by the MHC class I molecules present on the cells of the recipient (52). This ability to sense missing-self ligands is the rationale for an alloreactivity that triggers GVL without promoting GVHD, and is supported by *in-vitro* functional studies (56).

Moreover, the kinetics of recovery and rates of early post-transplant NK cells reached during the period of severe lymphopenia tend to correlate with lower relapse rates and better survival (57, 58) indicating that NK-medicated alloreactivity could be responsible for an early crucial GVL effect.

Considering that i) the current nomenclature of KIR reports 13 genes [*KIR2DL1*, *KIR2DL2/2DL3*, *KIR2DL4*, *KIR2DL5A*, *KIR2DL5B*, *KIR2DS1*, *KIR2DS2*, *KIR2DS3*, *KIR2DS4*, *KIR2DS5*, *KIR3DL1/3DS1*, *KIR3DL2*, and *KIR3DL3*; and 2 pseudogenes: *KIR2DP1* and *KIR3DP1* (59)], ii) genes may either be present or absent on a haplotype, and iii) 1,532 KIR alleles described to date, then KIR/MHC interactions are expected to have massive combinatorial possibilities, shaping NK alloreactivity in aHSCT.

3.3 Current Recommendations for Haploidentical Donor Selection and the Place of KIR

Taking conclusions from the literature, in 2019, the EBMT published recommendations for donor selection in haplo-HSCT (**Table 2**) (60). On TCD platforms, "NK alloreactive donor" is ranked as the second criterion of interest, whereas "donor with KIR ligand match for the recipient" is ranked as the seventh criterion among eight on TCR platforms, probably because T-

TABLE 2 | EBMT recommendations for haploidentical donor selection, by order.

T-cell-depleted haploidentical transplants	T-cell-replete haploidentical transplants
No DSAs (MFI < 1,000)	No DSAs (MFI < 1,000)
NK cell alloreactive donor	Younger donor over older donor
Younger donor over older donor	Male donor for a male recipient
Male donor for a male recipient	Sibling or offspring donor over parent donor
First-degree relative over second-degree HLA half-matched donor	Between parent donors, the father is preferred over the mother
Between parent donors, the mother is preferred over the father	ABO matched is preferred to minor ABO mismatch to major ABO mismatched donor[a]
ABO matched donor	Donor with KIR ligand match for a recipient of HHCT[a]
CMV seropositive donor for CMV seropositive recipients	Donor with NIMA mismatch over NIPA mismatch for a recipient of HHCT[a]
First-degree relative over second-degree HLA half-matched donor	
Donor with NIMA mismatch over NIPA mismatch for a recipient of HHCTa	

From "The European Society for Blood and Marrow Transplantation (EBMT) consensus recommendations for donor selection in haploidentical hematopoietic cell transplantation" Ciurea et al. (60).
[a]Conclusive data available with the Beijing protocol only.

lymphocyte alloreactivity blurs that of NK cells. However, the EBMT does not recommend which predictive strategy should be used to predict NK alloreactivity, while several models exist that can be conceptually opposed, as reviewed below.

4 KIR ALLOREACTIVITY ASSESSMENT

4.1 Basic Concepts

KIR proteins are characterized by their extracellular immunoglobulin-like domain which determines ligand specificity (61, 62) and by the length of their cytoplasmic tail which determines their function (63). The KIR nomenclature is based on these features: KIR2Dxx and KIR3Dxx have two and three extracellular domains, respectively, while KIRxDSx and KIRxDLx have a short activating or a long inhibitory cytoplasmic tail, respectively. KIR2DL4 is an exception and can be activating or inhibitory depending on allelic polymorphism (64).

Most of the KIR ligands are MHC molecules, as reported in **Table 3**. HLA-C1 and HLA-C2 epitopes refer to the amino acid at position 80 within the α1 domain of HLA class I heavy chain: asparagine residue or lysine residue defines C1 or C2 epitopes, respectively (66). C1 and C2 epitopes are mutually exclusive and can be found in different proportions across populations (67). A similar split can be described for HLA-B molecules between HLA-Bw4 and HLA-Bw6, depending on the amino acid sequence between positions 77 and 83 of α1 domain of the HLA class I heavy chain (68). However, certain HLA-A and HLA-C antigens also bear the Bw4 and Bw6 epitopes, respectively (69).

Since NK cell alloreactivity in aHSCT settings can be modulated by KIR/MHC interactions within the D/R couple, KIR and MHC typing can be used to predict NK alloreactivity.

4.2 Main Models Predicting NK-Mediated Alloreactivity in aHSCT

4.2.1 Ligand–Ligand Model

First proposed by the Perugia team (70), this model compares the donor and recipient KIR ligands while KIR genotyping is not considered for either of them (**Figure 1A**) . The underlying hypothesis is that the donor NK cells would be alloreactive toward host cells when the recipient is lacking MHC class I ligand present in the donor. As it does not consider whether the cognate KIR is present or not within the donor, this model does not take account of the educational process. The suitable KIR

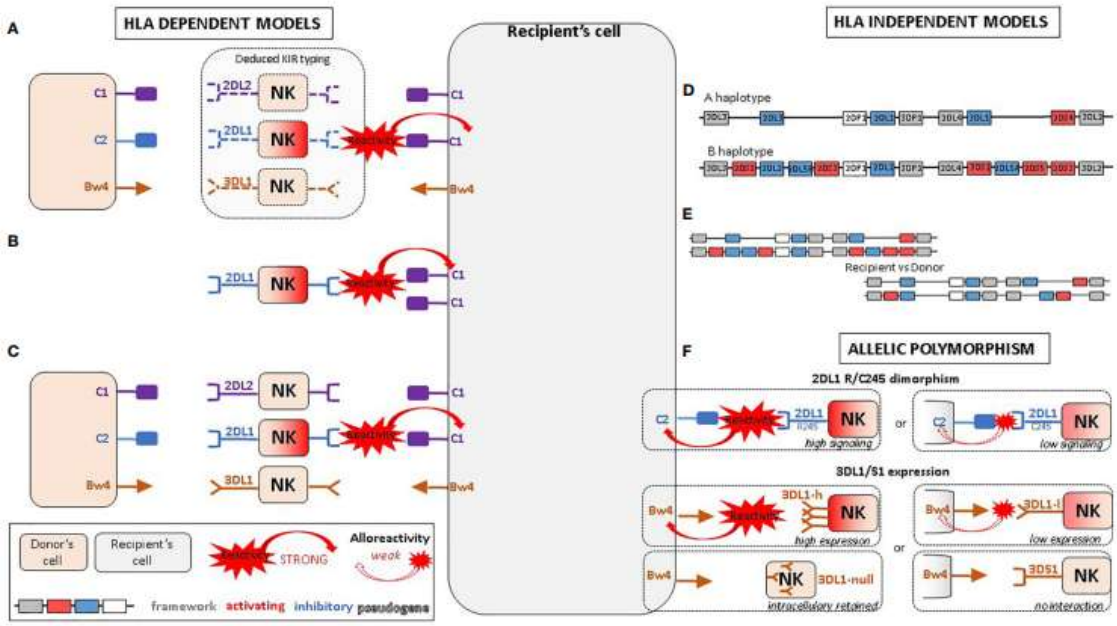


FIGURE 1 | Proposed NK alloreactivity mechanisms in aHSCT according to different models. **(A)** Ligand–ligand model confronts the MHC of the donor with the MHC of the recipient: KIR genotyping is unknown and NK alloreactivity of the donor toward host cells is expected when the recipient lacks MHC class I ligand present in the donor. **(B)** Receptor–ligand model considers the KIR of the donor and the MHC of the recipient: if at least one KIR gene expressed in the donor does not recognize any of the MHC molecules of the recipient ("missing-ligand"), the NK cells of the donor will increase their cytotoxic activity. **(C)** Educational models consider the MHC class I molecules of the donor and recipient and the KIR typing of the donor. It should reflect the "education" process required for NK cells to become competent. **(D)** The KIR haplotypes of the donor: the B/x of the donor and particularly those carrying Cen-B/B are expected to be more alloreactive toward the cell of the recipients, as they carry mostly activating KIR genes. **(E)** KIR matching models represent the number of aKIR and/or iKIR gene present in the donor but absent in the recipient and vice versa. **(F)** KIR polymorphism leads to KIR molecules with relevant biological differences.

mismatch (GVH direction) is defined as the donor possessing a KIR ligand, an MHC class I epitope, which is absent in the recipient. The IPD database proposes online assessment of mismatches (GVH direction, HVG direction, both or none) by entering the D/R couple HLA-B and HLA-C typing (71). As HLA-A may carry Bw4 or A3/A11 epitopes, this algorithm only approximates ligand–ligand mismatches. Moreover, it does not consider HLA-Bw4 that might be carried by an HLA-C molecule.

Using TCD haplo-HSCT settings, Ruggeri et al. found that alloreactive NK cells in the GVH direction helped to promote engraftment and graft-versus-tumor effect, resulting in reduced risk of leukemia relapse and better survival in adults with AML without increasing the rate of GVHD (56).

4.2.2 Receptor–Ligand/Missing-Ligand Model

Leung et al. proposed an alternative model that considers the donor KIR in relation to the MHC of the recipient, in other words, the KIR receptor of the donor with the KIR ligand of the recipient (72) (**Figure 1B**). Donor MHC typing and recipient KIR typing are not required for this model. The underlying hypothesis is that if at least one KIR gene expressed in the donor does not recognize any of the MHC molecules of the recipient ("missing-ligand"), the NK cell inhibition of the donor will be reduced and consequently their cytotoxic activity will be increased.

The KIR mismatch is defined as the donor possessing inhibitory KIR for which the recipient lacks a ligand. The suitable donor according to this model has at least one KIR receptor–ligand mismatch but should exhibit at least one inhibitory KIR specific for a recipient ligand to maintain NK cell immunoregulatory function, to reduce the risk of NK cell autoimmunity post-transplant, although no case of such autoimmunity has yet been observed (73).

KIR mismatching using the receptor–ligand model shows a trend toward improved overall survival and disease-free survival, as well as decreased risk of relapse (74). In the original study of pediatric patients with high-risk leukemia, given $CD34^+$ selected haploidentical graft, Leung et al. found that NK alloreactivity based on this model predicted the risk of leukemia relapse more accurately than the ligand–ligand model (72).

4.2.3 Educational/Missing Licensing Proof Models

Nowak et al. described models that take into account the "education" process required for NK cells to become competent alloreactive NK cells: the presence of a KIR and its cognate MHC molecule in the donor (75) (**Figure 1C**). They, therefore, consider both donor and recipient MHC class I molecules as well as the KIR type of the donor. If the donor possesses both a KIR and its ligand, the NK cells of the donor will be licensed and fully alloreactive. Conversely, if the donor possesses the KIR but not its ligand, the NK cells of the donor will not be licensed. This model has mainly been described for the four main inhibitory KIR genes and their MHC ligands: 2DL1 with C2, 2DL2/3 with C1, 3DL1 with Bw4, and 3DL2 with A3/A11. The KIR mismatch leading to alloreactivity is obtained when the donor has licensed NK cells—i.e., KIR and its cognate MHC ligand—but the recipient lacks the cognate MHC ligand (for example donor 2DL1+ C2+ but recipient C2−).

Counterintuitively, this clinical study (75) has shown that recipients not lacking the KIR–ligand of the cognate donor experienced better overall survival in leukemia patients, in contradiction with the receptor–ligand model (76). Nowak et al. have suggested that the interaction between KIR molecules and their cognate MHC ligands in the recipient contributes to post-transplant immunosurveillance of malignancy, but it could also be argued that the plasticity of education could blur the concept, as NK cell education is a dynamic process during which NK cells can calibrate their functional potential to the MHC ligands present (77). Indeed, the transfer of mature NK cells from one MHC environment to another results in reshaping of the functional potential based on the inhibitory input of the new MHC setting (78).

Nowak et al. also hypothesize that couples predicted as alloreactive by the receptor–ligand model could have lymphocytes remaining largely hyporesponsive to stimulus, as the receptor–ligand model does not take into account donor NK cell education (79). However, the proportion of favorable couples fitting the educational model is small, meaning that only few D/R couples could benefit (76).

This educational model has also been described for the activating KIR and their ligands (80), and especially for KIR2DS1 and its C2 ligand, with donor 2DS1+ C1+ NK cells being fully educated and capable of recognizing their ligands on the C2+ leukemia cells of the recipient. Conversely, donor 2DS1+ C1− NK cells remain hyporesponsive regardless of the ligands exhibited by leukemic cells, highlighting that education differs between activating and inhibitory KIR (81, 82).

4.2.4 Haplotype-Based Models of the Donor

Cooley et al. have defined KIR haplotypes that correlate with the content of activating KIR within a cohort of recipients undergoing aHSCT from unrelated donors (83) (**Figure 1D**). Only donor KIR typing is required for this model. The underlying hypothesis is that certain donors are expected to be more alloreactive toward recipient cells, based on consideration of the activating and inhibitory gene content of KIR haplotypes in the leukocyte receptor complex (LRC) at 19q13.4 (52, 84). The genetic proximity between each KIR gene (2.4 kb) leads to a transmission of haplotypes (85, 86). Haplotypes are split into a centromeric (Cen) and a telomeric (Tel) part delimited by the framework genes *KIR3DL3*/*KIR3DP1* and *KIR2DL4*/*KIR3DL2*, respectively. The gap between *KIR3DP1* and *KIR2DL4* measures 14 kb and represents a hotspot for crossing-over (recombination) between Cen and Tel regions (87).

Thus, Cooley et al. have standardized gene content into three centromeric units (Cen-A, Cen-B1, and Cen-B2) and two telomeric units (Tel-A and Tel-B) (83). The combinations of Cen and Tel units lead to the assessment of the KIR-B content score. KIR-B content score can be easily calculated by entering the KIR typing of the donor by referring to the IPD database (88).

The A-haplotype contains seven genes (*KIR3DL3*, *KIR2DL3*, *KIR2DL1*, *KIR2DL4*, *KIR3DL1*, *KIR2DS4*, *KIR3DL2*) and two pseudogenes (*KIR2DP1* and *KIR3DP1*). As it mainly contains KIRDL genes, the A-haplotype could be considered as predominantly inhibitory. The polymorphism of this haplotype does not depend on gene presence/absence as it has fixed gene

TABLE 3 | Human KIR and their cognate ligands.

Inhibitory KIR		Activating KIR	
KIR2DL1	HLA-C2 epitope	KIR2DS1	HLA-C2 epitope
KIR2DL2/3	HLA-C1 epitope	KIR2DS2	Unknown
KIR2DL4	HLA-G	KIR2DS3	Unknown
KIR2DL5A/B	Unknown	KIR2DS4	Subsets of HLA-C and HLA-A*11
KIR3DL1	HLA-A and HLA-B alleles encoding Bw4 epitope	KIR2DS5	HLA-C (variable)
KIR3DL2	HLA-A*03 and HLA-A*11	KIR3DS1	HLA-F
KIR3DL3	Unknown	KIR2DL4	HLA-G

Adapted from Boudreau and Hsu, Natural killer cell in human health and disease (65).

content but mainly depends on allelic polymorphism of the inhibitory KIR, which is generally greater than that of the activating KIR (89). B-haplotypes can have up to 12 genes and two pseudogenes, 8 of which are specific to it: *KIR2DS2*, *KIR2DL2*, *KIR2DL5B*, *KIR2DS3*, *KIR3DS1*, *KIR2DL5A*, *KIR2DS5*, and *KIR2DS1*. The B-haplotype is defined by the presence of at least one of these 8 genes even if it contains any gene of haplotype A. Gene content of B-haplotypes is highly variable, and since they contain one or more KIRxDSx genes, they are generally considered to have a more activating profile compared with A.

Thus, all individuals can be categorized as homozygous group A KIR haplotype (A/A) or having at least one group B haplotype (B/x). In their studies, Cooley et al. have shown that significantly reduced relapse was achieved with donors having KIR-B content score ≥2 compared with 0. As the beneficial effects of KIR B/B donors are greater than double those observed when using KIR A/B diplotype donors, A-haplotypes could also have a detrimental impact on aHSCT outcomes. Comparing centromeric and telomeric regions independently, Cen-B and Tel-B motifs both contributed to relapse protection and improved survival, but Cen-B homozygosity had the strongest independent effect on cumulative incidence of relapse, overall survival, and DFS (83).

4.2.5 Gene–Gene/KIR Matching Models

Gene–gene mismatch within the D/R couple—i.e., KIR gene present in the donor but absent in the recipient and vice versa—has been correlated with discrepant clinical outcomes (**Figure 1E**). Symons et al. have shown that haploidentical D/R couples who differed in iKIR gene content had a significantly improved overall survival, event-free survival, and lower relapse rates without any increase of NRM when compared with those patient–donor pairs with identical iKIR gene content (90). This was found for patients with lymphoid diseases as well as myeloid diseases. Conversely, Sahin et al. have shown that KIR matching with an MSD had a protective effect on relapse and occurrence of cGVHD (91). Various scoring strategies can be made from this gene–gene model by assessing the differences between the number of activating and inhibitory KIR genes in the donor and recipient.

4.3 Allelic Polymorphisms and NK Alloreactivity in aHSCT

So far, the approaches described above have simply taken into account the presence/absence of KIR genes without considering their polymorphism. A total of 1,532 KIR alleles have been described for KIR genes to date (89) (**Table 4**). This allelic polymorphism leads to KIR molecules with relevant biological differences, such as i) intracellular retention of KIR receptors or low cell-membrane expression (92–94), ii) premature termination codon (null alleles), iii) production of soluble receptors (95), iv) variability in ligand affinity (96), and v) diversity in signal transduction capability (97). Notably, recent clinical studies underline the relevance of *KIR2DL1* (98) and *KIR3DL1* polymorphisms (99) for the selection of aHSCT donor.

4.3.1 2DL1 245 R/C Dimorphism

KIR2DL1 receptors can be split into two groups according to the amino acid at position 245 of its transmembrane domain: KIR2DL1-R245 and KIR2DL1-C245 with arginine or cysteine, respectively (**Figure 1F**). KIR2DL1-R245, known to signal stronger than KIR2DL1-C245 as it can recruit more Src-homology-2 domain-containing protein tyrosine phosphatase 2 and beta-arrestin, shows higher inhibition of lipid raft polarization at the immune synapse and has less downregulation of cell-surface expression on interaction with its ligand (97).

TABLE 4 | KIR polymorphism, IPD database Release 2.10.0 (December 2020).

Gene	*2DL1*	*2DL2*	*2DL3*	*2DL4*	*2DL5*	*2DS1*	*2DS2*	*2DS3*
Alleles	173	34	64	112	91	33	64	71
Proteins	65	15	35	58	40	12	21	23
Nulls	7	0	1	0	1	0	0	2
Gene	***2DS4***	***2DS5***	***3DL1***	***3DS1***	***3DL2***	***3DL3***	***2DP1***	***3DP1***
Alleles	39	88	183	39	165	228	40	108
Proteins	20	38	92	22	115	112	0	0
Nulls	20	0	3	1	1	1	0	0

From the IPD database (https://www.ebi.ac.uk/ipd/kir/stats.html) (89).

A clinical study from one center, including 313 pediatric patients undergoing aHSCT, showed that recipients who received aHSCT from a KIR2DL1-R245 donor have significantly better survival and lower cumulative incidence of disease progression than those receiving from a KIR2DL1-C245 donor. This effect was similar in patients with AML or ALL and was even higher when patients received a KIR2DL1-R245–positive graft with HLA-C receptor–ligand mismatch in terms of overall survival and compared with those who received a KIR2DL1-C245 homozygous graft (98).

4.3.2 3DL1/S1 Expression

The *KIR3DL1/S1* gene is one of the most polymorphic KIR genes (89) (**Figure 1F**). Allelic versions of this gene are correlated to the expression level and KIR3DL1/3DS1 can be expressed at high (KIR3DL1-h) or low (KIR3DL1-l) cell-surface densities or be retained within the cell (KIR3DL1-n) (100), whereas KIR3DS1 receptors are displayed on the cell surface but do not bind HLA-Bw4 (101, 102). Dimorphism between isoleucine and threonine at position 80 in HLA-Bw4 (Bw4-80I vs. Bw4-80T) is similarly associated with surface expression on healthy cells (103) (80I: high; 80T: low). Allelic combinations of KIR3DL1-h and Bw4-80I are enriched among patients with AML, which suggests that this is a strongly inhibitory combination that may predispose individuals to develop cancer (104). In aHSCT, KIR3DL1/HLA-B combinations with *in-vitro* weak or no inhibition significantly decrease relapse and improve survival compared with strong inhibition combination patients. This effect was greatest in the high-risk group and independent from the benefit of donor activating KIR2DS1 (99).

4.3.3 HLA-B Leader Peptide-21 M/T Dimorphism

KIRs are not the only receptors responsible for NK alloreactivity. *HLA-B* dimorphism at position −21 (methionine or threonine, thus M/T dimorphism) in the segment encoding the leader peptide dictates whether NK cell regulation primarily relies on the KIR or another important heterodimer receptor, NKG2A/CD94. Subjects carrying HLA-B −21M harbor better-educated $NKG2A^+$ NK cells and display a superior capacity to degranulate lytic granules against KIR ligand-matched primary leukemic blasts (105).

5 CLINICAL SIGNIFICANCE OF PREDICTED NK ALLOREACTIVITY

In spite of the detailed analysis undertaken for all of the models described to date, the clinical significance of predicted NK alloreactivity in aHSCT is still unclear. **Supplementary Table 2** aims to associate the models of alloreactivity described above and the clinical settings under which they have been studied. Studies were selected reflecting the current knowledge about KIR, alloreactivity prediction, and aHSCT outcomes, as discussed in the previous sections. Particular attention has been paid to studies on which the EBMT based its recommendations (60).

In addition to the discrepancies due to alloreactivity scoring strategies, this highlights other factors contributing to the inconsistencies described in the literature. First, the studies are mostly retrospective and some of them are considerably dated and span periods up to 20 years. In such a moving field as aHSCT, standards of care have been greatly impacted by medical improvements over such long periods. Additionally, MHC and KIR genotyping has improved, from serological typing to third generation sequencing. Moreover, the heterogeneity of patients that have been studied, especially in terms of ethnicity, pathologies (myeloid vs. lymphoid malignancies), and ages (pediatric vs. adult), further blurs the conclusions regarding NK alloreactivity and aHSCT outcomes. Considering these two last points, the phenotypic changes of leukemic cells related to both factors are responsible for differentiated efficacy of NK cells toward them. As an example, lower expression of ICAM on leukemic cells weakens ICAM/LFA1 interaction, leading to the decrease of NK cell adhesion and cytolytic activity toward them (106).

More importantly, the different graft procedures greatly impact clinical outcomes and therefore lead to inconsistent conclusions. For example, the T-cell depletion in Perugia's haploidentical transplant protocol is vigorous with stem cell inocula containing an average of 3×10^4 T cells/kg (70), compared with an average of 1.48×10^8 T cells/kg in the Huang study (107). T cells in the allograft might affect NK cell function and KIR expression *in vivo*, as reported in unrelated aHSCT (108), and the beneficial role of NK alloreactivity in transplantation might be inhibited by coadministration of large doses of T cells. The latter could explain the clear positive effect of NK alloreactivity on clinical outcomes when using TCD platforms, while the impact of this alloreactivity remains uncertain when using TCR platforms. On TCR platforms, and using haploidentical grafts, Russo et al. (57) have shown that donor NK cells proliferate immediately after graft infusion but that the level of alloreactive NK cells decreases significantly following PT-Cy administration. Considering the kinetics of NK cell recovery after haplo-HSCT (109), this could be consistent with a suitable GVL effect led by NK cells within a narrow and early but crucial time lapse.

6 DISCUSSION

This work aims to report to what extent the NK alloreactivity predicted through KIR genotyping within a D/R couple impacts aHSCT outcomes. The presentation of each model of alloreactivity prediction highlights that every scoring strategy has limitations in assessing NK education required for NK cells to be functional and efficient. Consequently, clinical outcomes differ depending on the model used for alloreactivity prediction. Every scoring strategy has pros and cons that would influence its use (**Table 5**).

Solomon et al. (110) have proposed the first integrative model that takes into account two different methods of predicting NK alloreactivity (receptor–ligand model and the combination of Bx-haplotype and KIR2DS2 presence in donors) but also other factors known to impact haplo-HSCT outcomes such as the relationship between donor and recipient (child, parent, sibling) and D/R mismatches for CMV serostatus, HLA-DR and HLA-DP. This integrative scoring strategy manages to stratify the

TABLE 5 | Pros and cons of scoring strategies for NK alloreactivity assessment.

Models	NK cells of the donor alloreactive toward host cells when:	Pros	Cons
Ligand–ligand model	Recipient is lacking an MHC class I ligand that is present in the donor	No KIR typing required Easy to use (online algorithm)	Simple approximation of educational model Approximate estimation of the mismatches if using the IPD database (does not take into account HLA-Bw4 epitopes related to HLA-A and HLA-C or HLA-A3/11 epitopes)
Receptor–ligand model	At least one KIR gene expressed in the donor does not recognize any of the MHC molecules of the recipient	KIR typing only at genic resolution for donors	
Educational models	Donor has educated NK cells—i.e., KIR and its cognate MHC ligand—but the recipient lacks the cognate KIR MHC ligand	KIR typing only at genic resolution for donors Most comprehensive model for NK alloreactivity	Delicate process that can be overridden in certain conditions, e.g., high inflammation surroundings such as in aHSCT
Haplotypes	Donor has at least one KIR B haplotype	KIR typing only at genic resolution for donors Easy to use (online algorithm)	
Gene–gene model	KIR gene is present in the donor but absent in the recipient	Easy to use	Far from any biological underlying process
Allelic polymorphisms	A specific D/R interaction is present	Directly targets a functional gene difference	Multitude of models with variable relevance Allelic KIR genotyping (time and cost) Complex

couples for significant differences in DFS of the recipient and cumulative incidence of relapse, especially when disease risk index (DRI) is high, highlighting the improvements that have been made in this field.

NK education is a fine-tuned process, but recent studies have shown that early post-aHSCT uneducated NK cells expressing KIR for non-self HLA are hyperresponsive. This could be due to their inflammatory *in-vivo* environment (radiation, chemotherapy, infections) that might override the educational process. Unlicensed NK cells could be activated regardless of their educational state by lowering their threshold for reactivity (79). Thus, different models based only on receptor–ligand mismatches have been proposed.

This review focused on KIR-related alloreactivity, but many other receptors are known to impact NK functions, such as natural cytotoxicity receptors (NCRs) which play an important role in killing tumor cells of different origins including leukemic cells (111): for example, NKG2D, which is involved in tumor cell recognition by binding specific stress-inducible molecules, MICA/B and ULBPs (112). There is also a report of a monomorphic receptor on NK cells, NKp44, interacting with HLA-DP (113).

Finally, the genotype/phenotype correlation for KIR molecules is not linear and KIR expression depends on i) NK maturation stage (114), ii) education processes and interactions with MHC class I molecules (54), iii) the surrounding area and notably cytokine profile and density (114), and iv) the KIR gene, its allelic version, copy number, and the haplotype that contains it (94).

Even if the KIR-related NK alloreactivity in aHSCT is poorly understood, the strengths of associations in clinical studies are encouraging for its use for i) donor selection in haplo-HSCT, especially when using TCD platforms; ii) donor selection in case of the 9/10 MMUD (47); and iii) adjustments of immunosuppressive therapies in all aHSCT settings, according to the predicted outcome, i.e., to reduce GVHD prophylaxis when graft failure or delayed immune reconstitution is expected, while intensifying it when GVHD is expected. Prospective studies are currently being run on adults and pediatric populations (NCT02450708, NCT02646839 among others).

A better understanding of the different scoring strategies and their underlying processes is therefore crucial to enable the optimal use of KIR genotyping in medical practice, in aHSCT but also in other fields of immunology such as in renal transplantations, as recently described (115). It is worth noting that KIR/MHC interactions have also largely been described in the genetic prediction of malignancies such as AML (104) or neuroblastoma (116) and outcomes of solid tumors (117), pregnancy disorders (118), or viral disease clearance such as HCV/HBV (119, 120) or HIV (121), highlighting all the potential implications and power of this extraordinary system that is slowly revealing its secrets.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

AD wrote the manuscript. AA, MTR, JoT, and JaT reviewed the manuscript. MP, JJ, and NN-G supported this work by their constructive comments and suggestions along the writing process. All authors contributed to the article and approved the submitted version.

FUNDING

JoT and JaT are funded by the European Research Council (ERC) under the European Union's Horizon 2020 research and innovation program (grant no. 695551). AD received a 1-year funding from l'Agence Régionale de Santé (ARS): contrat année recherche no. 54-2019-1.

ACKNOWLEDGMENTS

We warmly thank all the co-authors associated to this work who kindly reviewed this paper and support the writing of this review.

SUPPLEMENTARY MATERIAL

The Supplementary Material for this article can be found online at: https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2022.821533/full#supplementary-material

REFERENCES

1. Niederwieser D, Baldomero H, Szer J, Gratwohl M, Aljurf M, Atsuta Y, et al. Hematopoietic Stem Cell Transplantation Activity Worldwide in 2012 and a SWOT Analysis of the Worldwide Network for Blood and Marrow Transplantation Group (WBMT) Including the Global Survey. *Bone Marrow Transplant* (2016) 51:778–85. doi: 10.1038/bmt.2016.18
2. Gratwohl A, Pasquini MC, Aljurf M, Atsuta Y, Baldomero H, Foeken L, et al. One Million Haemopoietic Stem-Cell Transplants: A Retrospective Observational Study. *Lancet Haematol* (2015) 2:e91–100. doi: 10.1016/S2352-3026(15)00028-9
3. Nguyen S, Chalandon Y, Lemarie C, Simon S, Masson D, Dhedin N, et al. Greffe De Cellules-Souches Hématopoïétiques Haplo-Identiques: Recommandations De La Société Francophone De Greffe De Moelle Et De Thérapie Cellulaire (SFGM-Tc). *Bull Cancer* (2016) 103:S229–42. doi: 10.1016/j.bulcan.2016.09.007
4. HLA-Identical Sibling Odds Calculator. Available at: https://web.stanford.edu/~arezvani/sibs.html (Accessed August 23, 2020).
5. Ballen KK, King RJ, Chitphakdithai P, Bolan CD, Agura E, Hartzman RJ, et al. The National Marrow Donor Program 20 Years of Unrelated Donor Hematopoietic Cell Transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant* (2008) 14:2–7. doi: 10.1016/j.bbmt.2008.05.017
6. Gragert L, Eapen M, Williams E, Freeman J, Spellman S, Baitty R, et al. HLA Match Likelihoods for Hematopoietic Stem-Cell Grafts in the U.S. Registry. *N Engl J Med* (2014) 371:339–48. doi: 10.1056/NEJMsa1311707
7. Kwon M, Bailén R, Diez-Martin JL. Evolution of the Role of Haploidentical Stem Cell Transplantation: Past, Present, and Future. *Expert Rev Hematol* (2020) 13:835–50. doi: 10.1080/17474086.2020.1796621
8. Tolar J, Sodani P, Symons H. Alternative Donor Transplant of Benign Primary Hematologic Disorders. *Bone Marrow Transplant* (2015) 50:619–27. doi: 10.1038/bmt.2015.1
9. Gale R, Eapen M. Who Is the Best Alternative Allotransplant Donor? *Bone Marrow Transplant* (2015) 50:S40–2. doi: 10.1038/bmt.2015.94
10. Metheny L, de Lima M. Hematopoietic Stem Cell Transplant With HLA-Mismatched Grafts: Impact of Donor, Source, Conditioning, and Graft Versus Host Disease Prophylaxis. *Expert Rev Hematol* (2019) 12:47–60. doi: 10.1080/17474086.2019.1562331
11. Beatty PG, Clift RA, Mickelson EM, Nisperos BB, Flournoy N, Martin PJ, et al. Marrow Transplantation From Related Donors Other Than HLA-Identical Siblings. *N Engl J Med* (1985) 313:765–71. doi: 10.1056/NEJM198509263131301
12. Anasetti C, Beatty PG, Storb R, Martin PJ, Mori M, Sanders JE, et al. Effect of HLA Incompatibility on Graft-Versus-Host Disease, Relapse, and Survival After Marrow Transplantation for Patients With Leukemia or Lymphoma. *Hum Immunol* (1990) 29:79–91. doi: 10.1016/0198-8859(90)90071-V
13. Szydlo R, Goldman JM, Klein JP, Gale RP, Ash RC, Bach FH, et al. Results of Allogeneic Bone Marrow Transplants for Leukemia Using Donors Other Than HLA-Identical Siblings. *J Clin Oncol* (1997) 15:1767–77. doi: 10.1200/JCO.1997.15.5.1767
14. Ciceri F, Bonini C, Stanghellini MTL, Bondanza A, Traversari C, Salomoni M, et al. Infusion of Suicide-Gene-Engineered Donor Lymphocytes After Family Haploidentical Haemopoietic Stem-Cell Transplantation for Leukaemia (The TK007 Trial): A Non-Randomised Phase I–II Study. *Lancet Oncol* (2009) 10:489–500. doi: 10.1016/S1470-2045(09)70074-9
15. Sun Y-Q, Chang Y-J, Huang X-J. Update on Current Research Into Haploidentical Hematopoietic Stem Cell Transplantation. *Expert Rev Hematol* (2018) 11:273–84. doi: 10.1080/17474086.2018.1447379
16. Shouval R, Fein JA, Labopin M, Kröger N, Duarte RF, Bader P, et al. Outcomes of Allogeneic Haematopoietic Stem Cell Transplantation From HLA-Matched and Alternative Donors: A European Society for Blood and Marrow Transplantation Registry Retrospective Analysis. *Lancet Haematol* (2019) 6:e573–84. doi: 10.1016/S2352-3026(19)30158-9
17. van Besien K, Artz A, Champlin RE, Guarneri D, Bishop MR, Chen J, et al. Haploidentical vs Haplo-Cord Transplant in Adults Under 60 Years Receiving Fludarabine and Melphalan Conditioning. *Blood Adv* (2019) 3:1858–67. doi: 10.1182/bloodadvances.2019000200
18. Lee SJ, Klein J, Haagenson M, Baxter-Lowe LA, Confer DL, Eapen M, et al. High-Resolution Donor-Recipient HLA Matching Contributes to the Success of Unrelated Donor Marrow Transplantation. *Blood* (2007) 110:4576–83. doi: 10.1182/blood-2007-06-097386
19. Woolfrey A, Klein JP, Haagenson M, Spellman S, Petersdorf E, Oudshoorn M, et al. HLA-C Antigen Mismatch Is Associated With Worse Outcome in Unrelated Donor Peripheral Blood Stem Cell Transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant* (2011) 17:885–92. doi: 10.1016/j.bbmt.2010.09.012
20. Nakamae H, Storer BE, Storb R, Storek J, Chauncey TR, Pulsipher MA, et al. Low-Dose Total Body Irradiation and Fludarabine Conditioning for HLA Class I-Mismatched Donor Stem Cell Transplantation and Immunologic Recovery in Patients With Hematologic Malignancies: A Multicenter Trial. *Biol Blood Marrow Transplant* (2010) 16:384–94. doi: 10.1016/j.bbmt.2009.11.004
21. Battipaglia G, Labopin M, Kröger N, Vitek A, Afanasyev B, Hilgendorf I, et al. Posttransplant Cyclophosphamide vs Antithymocyte Globulin in HLA-Mismatched Unrelated Donor Transplantation. *Blood* (2019) 134:892–9. doi: 10.1182/blood.2019000487
22. Shaw BE, Jimenez-Jimenez AM, Burns LJ, Logan BR, Khimani F, Shaffer BC, et al. National Marrow Donor Program-Sponsored Multicenter, Phase II Trial of HLA-Mismatched Unrelated Donor Bone Marrow Transplantation Using Post-Transplant Cyclophosphamide. *J Clin Oncol* (2021) 39:1971–82. doi: 10.1200/JCO.20.03502
23. Wang Y, Liu Q-F, Xu L-P, Liu K-Y, Zhang X-H, Ma X, et al. Haploidentical vs Identical-Sibling Transplant for AML in Remission: A Multicenter, Prospective Study. *Blood* (2015) 125:3956–62. doi: 10.1182/blood-2015-02-627786
24. Wang Y, Liu Q-F, Xu L-P, Liu K-Y, Zhang X-H, Ma X, et al. Haploidentical Versus Matched-Sibling Transplant in Adults With Philadelphia-Negative High-Risk Acute Lymphoblastic Leukemia: A Biologically Phase III Randomized Study. *Clin Cancer Res* (2016) 22:3467–76. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-15-2335
25. Salvatore D, Labopin M, Ruggeri A, Battipaglia G, Ghavamzadeh A, Ciceri F, et al. Outcomes of Hematopoietic Stem Cell Transplantation From Unmanipulated Haploidentical Versus Matched Sibling Donor in Patients With Acute Myeloid Leukemia in First Complete Remission With Intermediate or High-Risk Cytogenetics: A Study From the Acute Leukemia Working Party of the European Society for Blood and Marrow Transplantation. *Haematologica* (2018) 103:1317–28. doi: 10.3324/haematol.2018.189258
26. Ciurea SO, Zhang M-J, Bacigalupo AA, Bashey A, Appelbaum FR, Aljitawi OS, et al. Haploidentical Transplant With Posttransplant Cyclophosphamide vs Matched Unrelated Donor Transplant for Acute Myeloid Leukemia. *Blood* (2015) 126:1033–40. doi: 10.1182/blood-2015-04-639831
27. Kwon M, Bautista G, Balsalobre P, Sánchez-Ortega I, Montesinos P, Bermúdez A, et al. Haplo-Cord Transplantation Compared to Haploidentical Transplantation With Post-Transplant Cyclophosphamide in Patients With AML. *Bone Marrow Transplant* (2017) 52:1138–43. doi: 10.1038/bmt.2017.36
28. Sanz J, Montoro J, Solano C, Valcárcel D, Sampol A, Ferrá C, et al. Prospective Randomized Study Comparing Myeloablative Unrelated Umbilical Cord Blood Transplantation Versus HLA-Haploidentical Related Stem Cell Transplantation for Adults With Hematologic Malignancies. *Biol Blood Marrow Transplant* (2020) 26:358–66. doi: 10.1016/j.bbmt.2019.10.014

29. Fatobene G, Rocha V, Martin AS, Hamadani M, Robinson S, Bashey A, et al. Nonmyeloablative Alternative Donor Transplantation for Hodgkin and Non-Hodgkin Lymphoma: From the LWP-EBMT, Eurocord, and CIBMTR. *J Clin Oncol: Off J Am Soc Clin Oncol* (2020) 38:1518–26. doi: 10.1200/JCO.19.02408
30. Chang Y-J, Wang Y, Xu L-P, Zhang X-H, Chen H, Chen Y-H, et al. Haploidentical Donor Is Preferred Over Matched Sibling Donor for Pre-Transplantation MRD Positive ALL: A Phase 3 Genetically Randomized Study. *J Hematol Oncol* (2020) 13:27. doi: 10.1186/s13045-020-00860-y
31. Esquirol A, Querol S, Garcia-Cadenas I, Novelli S, Garrido A, Saavedra S, et al. When an HLA Identical Donor Is Not Available in Adults With Hematological Neoplasms: Single-Center Comparison of Single-Unit Cord Blood Transplantation and Haploidentical-Related PBSC Transplantation With PTCy Using a Standardized Conditioning Platform (Thiotepa-Busulfan-Fludarabine). *Ann Hematol* (2020) 99:157–65. doi: 10.1007/s00277-019-03870-0
32. Martinez C, Gayoso J, Canals C, Finel H, Peggs K, Dominietto A, et al. Post-Transplantation Cyclophosphamide-Based Haploidentical Transplantation as Alternative to Matched Sibling or Unrelated Donor Transplantation for Hodgkin Lymphoma: A Registry Study of the Lymphoma Working Party of the European Society for Blood and Marrow Transplantation. *J Clin Oncol* (2017) 35:3425–32. doi: 10.1200/JCO.2017.72.6869
33. Gayoso J, Balsalobre P, Pascual MJ, Castilla-Llorente C, López-Corral L, Kwon M, et al. Busulfan-Based Reduced Intensity Conditioning Regimens for Haploidentical Transplantation in Relapsed/Refractory Hodgkin Lymphoma: Spanish Multicenter Experience. *Bone Marrow Transplant* (2016) 51:1307–12. doi: 10.1038/bmt.2016.115
34. de la Fuente J, Dhedin N, Koyama T, Bernaudin F, Kuentz M, Karnik L, et al. Haploidentical Bone Marrow Transplantation With Post-Transplantation Cyclophosphamide Plus Thiotepa Improves Donor Engraftment in Patients With Sickle Cell Anemia: Results of an International Learning Collaborative. *Biol Blood Marrow Transplant* (2019) 25:1197–209. doi: 10.1016/j.bbmt.2018.11.027
35. Gaziev J, Isgrò A, Sodani P, Paciaroni K, De Angelis G, Marziali M, et al. Haploidentical HSCT for Hemoglobinopathies: Improved Outcomes With TCRαβ+/CD19+-Depleted Grafts. *Blood Adv* (2018) 2:263–70. doi: 10.1182/bloodadvances.2017012005
36. Foell J, Schulte JH, Pfirstinger B, Troeger A, Wolff D, Edinger M, et al. Haploidentical CD3 or α/β T-Cell Depleted HSCT in Advanced Stage Sickle Cell Disease. *Bone Marrow Transplant* (2019) 54:1859–67. doi: 10.1038/s41409-019-0550-0
37. Patel DA, Akinsete AM, Connelly JA, Kassim AA. T-Cell Deplete Versus T-Cell Replete Haploidentical Hematopoietic Stem Cell Transplantation for Sickle Cell Disease: Where Are We? *Expert Rev Hematol* (2019) 12:733–52. doi: 10.1080/17474086.2019.1642103
38. Anurathapan U, Hongeng S, Pakakasama S, Sirachainan N, Songdej D, Chuansumrit A, et al. Hematopoietic Stem Cell Transplantation for Homozygous β-Thalassemia and β-Thalassemia/Hemoglobin E Patients From Haploidentical Donors. *Bone Marrow Transplant* (2016) 51:813–8. doi: 10.1038/bmt.2016.7
39. DeZern AE, Zahurak M, Symons H, Cooke K, Jones RJ, Brodsky RA. Alternative Donor Transplantation With High-Dose Post-Transplantation Cyclophosphamide for Refractory Severe Aplastic Anemia. *Biol Blood Marrow Transplant* (2017) 23:498–504. doi: 10.1016/j.bbmt.2016.12.628
40. Xu L-P, Jin S, Wang S-Q, Xia L-H, Bai H, Gao S-J, et al. Upfront Haploidentical Transplant for Acquired Severe Aplastic Anemia: Registry-Based Comparison With Matched Related Transplant. *J Hematol Oncol* (2017) 10:25. doi: 10.1186/s13045-017-0398-y
41. DeZern AE, Zahurak ML, Symons HJ, Cooke KR, Rosner GL, Gladstone DE, et al. Haploidentical BMT for Severe Aplastic Anemia With Intensive GVHD Prophylaxis Including Posttransplant Cyclophosphamide. *Blood Adv* (2020) 4:1770–9. doi: 10.1182/bloodadvances.2020001729
42. Acevedo MJ, Wilder JS, Adams S, Davis J, Kelly C, Hilligoss D, et al. Outcomes of Related and Unrelated Donor Searches Among Patients With Primary Immunodeficiency Diseases Referred for Allogeneic Hematopoietic Cell Transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant* (2019) 25:1666–73. doi: 10.1016/j.bbmt.2019.04.008
43. Uppuluri R, Sivasankaran M, Patel S, Swaminathan VV, Ramanan KM, Ravichandran N, et al. Haploidentical Stem Cell Transplantation With Post-Transplant Cyclophosphamide for Primary Immune Deficiency Disorders in Children: Challenges and Outcome From a Tertiary Care Center in South India. *J Clin Immunol* (2019) 39:182–7. doi: 10.1007/s10875-019-00600-z
44. Gagelmann N, Bacigalupo A, Rambaldi A, Hoelzer D, Halter J, Sanz J, et al. Haploidentical Stem Cell Transplantation With Posttransplant Cyclophosphamide Therapy vs Other Donor Transplantations in Adults With Hematologic Cancers: A Systematic Review and Meta-Analysis. *JAMA Oncol* (2019) 5:1739–48. doi: 10.1001/jamaoncol.2019.3541
45. Passweg JR, Baldomero H, Bader P, Bonini C, Duarte RF, Dufour C, et al. Use of Haploidentical Stem Cell Transplantation Continues to Increase: The 2015 European Society for Blood and Marrow Transplant Activity Survey Report. *Bone Marrow Transplant* (2017) 52:811–7. doi: 10.1038/bmt.2017.34
46. Passweg JR, Baldomero H, Chabannon C, Basak GW, de la Cámara R, Corbacioglu S, et al. Hematopoietic Cell Transplantation and Cellular Therapy Survey of the EBMT: Monitoring of Activities and Trends Over 30 Years. *Bone Marrow Transplant* (2021) 56:1651–64. doi: 10.1038/s41409-021-01227-8
47. Duarte RF, Labopin M, Bader P, Basak GW, Bonini C, Chabannon C, et al. Indications for Haematopoietic Stem Cell Transplantation for Haematological Diseases, Solid Tumours and Immune Disorders: Current Practice in Europe, 2019. *Bone Marrow Transplant* (2019) 54:1525–52. doi: 10.1038/s41409-019-0516-2
48. Luznik L, O'Donnell PV, Symons HJ, Chen AR, Leffell MS, Zahurak M, et al. HLA-Haploidentical Bone Marrow Transplantation for Hematologic Malignancies Using Nonmyeloablative Conditioning and High-Dose, Posttransplantation Cyclophosphamide. *Biol Blood Marrow Transplant* (2008) 14:641–50. doi: 10.1016/j.bbmt.2008.03.005
49. Fabricius WA, Ramanathan M. Review on Haploidentical Hematopoietic Cell Transplantation in Patients With Hematologic Malignancies. *Adv Hematol* (2016) 2016:5726132. doi: 10.1155/2016/5726132
50. Fuchs EJ. Haploidentical Transplantation for Hematologic Malignancies: Where Do We Stand? *Hematol Am Soc Hematol Educ Program* (2012) 2012:230–6. doi: 10.1182/asheducation-2012.1.230
51. Spits H, Bernink JH, Lanier L. NK Cells and Type 1 Innate Lymphoid Cells: Partners in Host Defense. *Nat Immunol* (2016) 17:758–64. doi: 10.1038/ni.3482
52. 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) 39:577–90. doi: 10.1016/j.it.2018.04.009
53. Moretta A, Bottino C, Vitale M, Pende D, Biassoni R, Mingari MC, et al. Receptors for Hla Class-I Molecules in Human Natural Killer Cells. *Annu Rev Immunol* (1996) 14:619–48. doi: 10.1146/annurev.immunol.14.1.619
54. Yokoyama WM, Kim S. Licensing of Natural Killer Cells by Self-Major Histocompatibility Complex Class I. *Immunol Rev* (2006) 214:143–54. doi: 10.1111/j.1600-065X.2006.00458.x
55. Ljunggren HG, Kärre K. In Search of the "Missing Self": MHC Molecules and NK Cell Recognition. *Immunol Today* (1990) 11:237–44. doi: 10.1016/0167-5699(90)90097-S
56. Ruggeri L, Capanni M, Urbani E, Perruccio K, Shlomchik WD, Tosti A, et al. Effectiveness of Donor Natural Killer Cell Alloreactivity in Mismatched Hematopoietic Transplants. *Science* (2002) 295:2097–100. doi: 10.1126/science.1068440
57. Russo A, Oliveira G, Berglund S, Greco R, Gambacorta V, Cieri N, et al. NK Cell Recovery After Haploidentical HSCT With Posttransplant Cyclophosphamide: Dynamics and Clinical Implications. *Blood* (2018) 131:247–62. doi: 10.1182/blood-2017-05-780668
58. Savani BN, Mielke S, Adams S, Uribe M, Rezvani K, Yong ASM, et al. Rapid Natural Killer Cell Recovery Determines Outcome After T-Cell-Depleted HLA-Identical Stem Cell Transplantation in Patients With Myeloid Leukemias But Not With Acute Lymphoblastic Leukemia. *Leukemia* (2007) 21:2145–52. doi: 10.1038/sj.leu.2404892
59. Robinson J, Halliwell JA, McWilliam H, Lopez R, Marsh SGE. IPD—The Immuno Polymorphism Database. *Nucleic Acids Res* (2013) 41:D1234–40. doi: 10.1093/nar/gks1140

60. Ciurea SO, Al Malki MM, Kongtim P, Fuchs EJ, Luznik L, Huang X-J, et al. The European Society for Blood and Marrow Transplantation (EBMT) Consensus Recommendations for Donor Selection in Haploidentical Hematopoietic Cell Transplantation. *Bone Marrow Transplant* (2019) 55:12–24. doi: 10.1038/s41409-019-0499-z
61. Middleton D, Curran M, Maxwell L. Natural Killer Cells and Their Receptors. *Transpl Immunol* (2002) 10:147–64. doi: 10.1016/S0966-3274(02)00062-X
62. Williams AP, Bateman AR, Khakoo SI. Hanging in the Balance. KIR and Their Role in Disease. *Mol Interv* (2005) 5:226–40. doi: 10.1124/mi.5.4.6
63. *IPD - KIR Introduction*. EBI. Available at: https://www.ebi.ac.uk/ipd/kir/introduction.html (Accessed July 25, 2018).
64. Colonna M, Samaridis J. Cloning of Immunoglobulin-Superfamily Members Associated With HLA-C and HLA-B Recognition by Human Natural Killer Cells. *Science* (1995) 268:405–8. doi: 10.1126/science.7716543
65. Boudreau JE, Hsu KC. Natural Killer Cell Education in Human Health and Disease. *Curr Opin Immunol* (2018) 50:102–11. doi: 10.1016/j.coi.2017.11.003
66. Mandelboim O, Reyburn HT, Valés-Gómez M, Pazmany L, Colonna M, Borsellino G, et al. 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* (1996) 184:913–22. doi: 10.1084/jem.184.3.913
67. Moffett A, Chazara O, Colucci F, Johnson MH. Variation of Maternal KIR and Fetal HLA-C Genes in Reproductive Failure: Too Early for Clinical Intervention. *Reprod BioMed Online* (2016) 33:763–9. doi: 10.1016/j.rbmo.2016.08.019
68. Wan AM, Ennis P, Parham P, Holmes N. The Primary Structure of HLA-A32 Suggests a Region Involved in Formation of the Bw4/Bw6 Epitopes. *J Immunol (Baltimore Md: 1950)* (1986) 137:3671–4.
69. Ho C-S, Ramon D, Jaramillo A. OR27: Bw4/Bw6 on HLA-A and HLA-C: the Forgotten Serological Properties of HLA Class I Antigens. *Hum Immunol* (2014) 75:22. doi: 10.1016/j.humimm.2014.08.030
70. Ruggeri L, Capanni M, Casucci M, Volpi I, Tosti A, Perruccio K, et al. Role of Natural Killer Cell Alloreactivity in HLA-Mismatched Hematopoietic Stem Cell Transplantation. *Blood* (1999) 94:333–9. doi: 10.1182/blood.V94.1.333.413a31_333_339
71. *IPD - KIR Ligand Calculator*. EBI. Available at: https://www.ebi.ac.uk/ipd/kir/ligand.html (Accessed July 24, 2018).
72. Leung W, Iyengar R, Turner V, Lang P, Bader P, Conn P, et al. Determinants of Antileukemia Effects of Allogeneic NK Cells. *J Immunol* (2004) 172:644–50. doi: 10.4049/jimmunol.172.1.644
73. Faridi RM, Kemp TJ, Dharmani-Khan P, Lewis V, Tripathi G, Rajalingam R, et al. Donor-Recipient Matching for KIR Genotypes Reduces Chronic GVHD and Missing Inhibitory KIR Ligands Protect Against Relapse After Myeloablative, HLA Matched Hematopoietic Cell Transplantation. *PloS One* (2016) 11:e0158242. doi: 10.1371/journal.pone.0158242
74. Park S, Kim K, Jang JH, Kim SJ, Kim WS, Kang E-S, et al. KIR Alloreactivity Based on the Receptor–Ligand Model Is Associated With Improved Clinical Outcomes of Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplantation: Result of Single Center Prospective Study. *Hum Immunol* (2015) 76:636–43. doi: 10.1016/j.humimm.2015.09.009
75. Nowak J, Kościńska K, Mika-Witkowska R, Rogatko-Koroś M, Mizia S, Jaskuła E, et al. Donor NK Cell Licensing in Control of Malignancy in Hematopoietic Stem Cell Transplant Recipients. *Am J Hematol* (2014) 89:E176–183. doi: 10.1002/ajh.23802
76. Wright PA. Killer-Cell Immunoglobulin-Like Receptor Assessment Algorithms in Haemopoietic Progenitor Cell Transplantation: Current Perspectives and Future Opportunities. *HLA* (2020) 95:435–48. doi: 10.1111/tan.13817
77. Goodridge JP, Jacobs B, Saetersmoen ML, Clement D, Hammer Q, Clancy T, et al. Remodeling of Secretory Lysosomes During Education Tunes Functional Potential in NK Cells. *Nat Commun* (2019) 10:514. doi: 10.1038/s41467-019-08384-x
78. Elliott JM, Wahle JA, Yokoyama WM. MHC Class I-Deficient Natural Killer Cells Acquire a Licensed Phenotype After Transfer Into an MHC Class I-Sufficient Environment. *J Exp Med* (2010) 207:2073–9. doi: 10.1084/jem.20100986
79. Boudreau JE, Hsu KC. Natural Killer Cell Education and the Response to Infection and Cancer Therapy: Stay Tuned. *Trends Immunol* (2018) 39:222–39. doi: 10.1016/j.it.2017.12.001
80. Nowak J, Kościńska K, Mika-Witkowska R, Rogatko-Koroś M, Mizia S, Jaskuła E, et al. Role of Donor Activating KIR-HLA Ligand-Mediated NK Cell Education Status in Control of Malignancy in Hematopoietic Cell Transplant Recipients. *Biol Blood Marrow Transplant* (2015) 21:829–39. doi: 10.1016/j.bbmt.2015.01.018
81. Venstrom JM, Pittari G, Gooley TA, Chewning JH, Spellman S, Haagenson M, et al. HLA-C–Dependent Prevention of Leukemia Relapse by Donor Activating Kir2ds1. *N Engl J Med* (2012) 367:805–16. doi: 10.1056/NEJMoa1200503
82. Pende D, Marcenaro S, Falco M, Martini S, Bernardo ME, Montagna D, et al. Anti-Leukemia Activity of Alloreactive NK Cells in KIR Ligand-Mismatched Haploidentical HSCT for Pediatric Patients: Evaluation of the Functional Role of Activating KIR and Redefinition of Inhibitory KIR Specificity. *Blood* (2009) 113:3119–29. doi: 10.1182/blood-2008-06-164103
83. Cooley S, Weisdorf DJ, Guethlein LA, Klein JP, Wang T, Le CT, et al. Donor Selection for Natural Killer Cell Receptor Genes Leads to Superior Survival After Unrelated Transplantation for Acute Myelogenous Leukemia. *Blood* (2010) 116:2411–9. doi: 10.1182/blood-2010-05-283051
84. Trowsdale J. Genetic and Functional Relationships Between MHC and NK Receptor Genes. *Immunity* (2001) 15:363–74. doi: 10.1016/S1074-7613(01)00197-2
85. Hsu KC, Chida S, Geraghty DE, Dupont B. The Killer Cell Immunoglobulin-Like Receptor (KIR) Genomic Region: Gene-Order, Haplotypes and Allelic Polymorphism. *Immunol Rev* (2002) 190:40–52. doi: 10.1034/j.1600-065X.2002.19004.x
86. Pende D, Falco M, Vitale M, Cantoni C, Vitale C, Munari E, et al. Killer Ig-Like Receptors (KIRs): Their Role in NK Cell Modulation and Developments Leading to Their Clinical Exploitation. *Front Immunol* (2019) 10:1179. doi: 10.3389/fimmu.2019.01179
87. Besson C, Roetynck S, Williams F, Orsi L, Amiel C, Lependeven C, et al. Association of Killer Cell Immunoglobulin-Like Receptor Genes With Hodgkin's Lymphoma in a Familial Study. *PloS One* (2007) 2:e406. doi: 10.1371/journal.pone.0000406
88. *IPD - KIR Sequence Database*. EBI. Available at: https://www.ebi.ac.uk/ipd/kir/donor_b_content.html (Accessed September 22, 2019).
89. *IPD - KIR Database Statistics*. EBI. Available at: https://www.ebi.ac.uk/ipd/kir/stats.html (Accessed September 12, 2018).
90. Symons HJ, Leffell MS, Rossiter ND, Zahurak M, Jones RJ, Fuchs EJ. 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) 16:533–42. doi: 10.1016/j.bbmt.2009.11.022
91. Sahin U, Dalva K, Gungor F, Ustun C, Beksac M. Donor-Recipient Killer Immunoglobulin Like Receptor (KIR) Genotype Matching has a Protective Effect on Chronic Graft Versus Host Disease and Relapse Incidence Following HLA-Identical Sibling Hematopoietic Stem Cell Transplantation. *Ann Hematol* (2018) 97:1027–39. doi: 10.1007/s00277-018-3274-0
92. VandenBussche CJ, Dakshanamurthy S, Posch PE, Hurley CK. A Single Polymorphism Disrupts the Killer Ig-Like Receptor 2dl2/2dl3 D1 Domain. *J Immunol* (2006) 177:5347–57. doi: 10.4049/jimmunol.177.8.5347
93. VandenBussche CJ, Mulrooney TJ, Frazier WR, Dakshanamurthy S, Hurley CK. Dramatically Reduced Surface Expression of NK Cell Receptor KIR2DS3 Is Attributed to Multiple Residues Throughout the Molecule. *Genes Immun* (2009) 10:162–73. doi: 10.1038/gene.2008.91
94. Yawata M, Yawata N, Draghi M, Little A-M, Partheniou F, Parham P. Roles for HLA and KIR Polymorphisms in Natural Killer Cell Repertoire Selection and Modulation of Effector Function. *J Exp Med* (2006) 203:633–45. doi: 10.1084/jem.20051884
95. Maxwell LD, Wallace A, Middleton D, Curran MD. A Common KIR2DS4 Deletion Variant in the Human That Predicts a Soluble KIR Molecule Analogous to the KIR1D Molecule Observed in the Rhesus Monkey. *Tissue Antigens* (2002) 60:254–8. doi: 10.1034/j.1399-0039.2002.600307.x

96. Béziat V, Hilton HG, Norman PJ, Traherne JA. Deciphering the Killer-Cell Immunoglobulin-Like Receptor System at Super-Resolution for Natural Killer and T-Cell Biology. *Immunology* (2017) 150:248–64. doi: 10.1111/imm.12684
97. Bari R, Bell T, Leung W-H, Vong QP, Chan WK, Das Gupta N, et al. Significant Functional Heterogeneity Among KIR2DL1 Alleles and a Pivotal Role of Arginine245. *Blood* (2009) 114:5182–90. doi: 10.1182/blood-2009-07-231977
98. Bari R, Rujkijyanont P, Sullivan E, Kang G, Turner V, Gan K, et al. Effect of Donor KIR2DL1 Allelic Polymorphism on the Outcome of Pediatric Allogeneic Hematopoietic Stem-Cell Transplantation. *J Clin Oncol* (2013) 31:3782–90. doi: 10.1200/JCO.2012.47.4007
99. Boudreau JE, Giglio F, Gooley TA, Stevenson PA, Le Luduec J-B, Shaffer BC, et al. KIR3DL1/ HL A-B Subtypes Govern Acute Myelogenous Leukemia Relapse After Hematopoietic Cell Transplantation. *J Clin Oncol* (2017) 35:2268–78. doi: 10.1200/JCO.2016.70.7059
100. Gardiner CM, Guethlein LA, Shilling HG, Pando M, Carr WH, Rajalingam R, et al. Different NK Cell Surface Phenotypes Defined by the DX9 Antibody Are Due to KIR3DL1 Gene Polymorphism. *J Immunol* (2001) 166:2992–3001. doi: 10.4049/jimmunol.166.5.2992
101. Carr WH, Pando MJ, Parham P. KIR3DL1 Polymorphisms That Affect NK Cell Inhibition by HLA-Bw4 Ligand. *J Immunol* (2005) 175:5222–9. doi: 10.4049/jimmunol.175.8.5222
102. Gillespie GMA, Bashirova A, Dong T, McVicar DW, Rowland-Jones SL, Carrington M. Lack of KIR3DS1 Binding to MHC Class I Bw4 Tetramers in Complex With CD8+ T Cell Epitopes. *AIDS Res Hum Retroviruses* (2007) 23:451–5. doi: 10.1089/aid.2006.0165
103. Boudreau JE, Mulrooney TJ, Le Luduec J-B, Barker E, Hsu KC. KIR3DL1 and HLA-B Density and Binding Calibrate NK Education and Response to HIV. *J Immunol* (2016) 196:3398–410. doi: 10.4049/jimmunol.1502469
104. Shen M, Linn Y-C, Ren E-C. KIR-HLA Profiling Shows Presence of Higher Frequencies of Strong Inhibitory KIR-Ligands Among Prognostically Poor Risk AML Patients. *Immunogenetics* (2016) 68:133–44. doi: 10.1007/s00251-015-0888-4
105. Hallner A, Bernson E, Hussein BA, Ewald Sander F, Brune M, Aurelius J, et al. The HLA-B –21 Dimorphism Impacts on NK Cell Education and Clinical Outcome of Immunotherapy in Acute Myeloid Leukemia. *Blood* (2019) 133:1479–88. doi: 10.1182/blood-2018-09-874990
106. Gross CC, Brzostowski JA, Liu D, Long EO. Tethering of ICAM on Target Cells Is Required for LFA-1-Dependent NK Cell Adhesion and Granule Polarization. *J Immunol* (2010) 185:2918–26. doi: 10.4049/jimmunol.1000761
107. Huang X-J, Zhao X-Y, Liu D-H, Liu K-Y, Xu L-P. Deleterious Effects of KIR Ligand Incompatibility on Clinical Outcomes in Haploidentical Hematopoietic Stem Cell Transplantation Without *In Vitro* T-Cell Depletion. *Leukemia* (2007) 21:848–51. doi: 10.1038/sj.leu.2404566
108. Cooley S, McCullar V, Wangen R, Bergemann TL, Spellman S, Weisdorf DJ, et al. KIR Reconstitution Is Altered by T Cells in the Graft and Correlates With Clinical Outcomes After Unrelated Donor Transplantation. *Blood* (2005) 106:4370–6. doi: 10.1182/blood-2005-04-1644
109. Mohty M, Brissot E. Allogreffe de Cellules Souches Hématopoïétiques - Manuel de Pratique. Paris: Le Grand Métier - Sciences (2017). p. 236.
110. Solomon SR, Aubrey MT, Zhang X, Piluso A, Freed BM, Brown S, 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) 24:789–98. doi: 10.1016/j.bbmt.2018.01.013
111. Pende D, Parolini S, Pessino A, Sivori S, Augugliaro R, Morelli L, et al. Identification and Molecular Characterization of Nkp30, a Novel Triggering Receptor Involved in Natural Cytotoxicity Mediated by Human Natural Killer Cells. *J Exp Med* (1999) 190:1505–16. doi: 10.1084/jem.190.10.1505
112. Pende D, Rivera P, Marcenaro S, Chang C-C, Biassoni R, Conte R, et al. Major Histocompatibility Complex Class I-Related Chain A and UL16-Binding Protein Expression on Tumor Cell Lines of Different Histotypes. *Cancer Res* (2002) 62:6178–86.
113. Niehrs A, Garcia-Beltran WF, Norman PJ, Watson GM, Hölzemer A, Chapel A, et al. A Subset of HLA-DP Molecules Serve as Ligands for the Natural Cytotoxicity Receptor Nkp44. *Nat Immunol* (2019) 20:1129–37. doi: 10.1038/s41590-019-0448-4
114. Lamas B. Caractérisation De L'activité Fonctionnelle Et Métabolique Des Cellules NK En Situation De Stress Nutritionnels: Approche Expérimentale In Vitro Et *In Vivo*. (2012) 417.
115. Koenig A, Chen C-C, Marçais A, Barba T, Mathias V, Sicard A, et al. Missing Self Triggers NK Cell-Mediated Chronic Vascular Rejection of Solid Organ Transplants. *Nat Commun* (2019) 10:5350. doi: 10.1038/s41467-019-13113-5
116. Forlenza CJ, Boudreau JE, Zheng J, Le Luduec J-B, Chamberlain E, Heller G, et al. KIR3DL1 Allelic Polymorphism and HLA-B Epitopes Modulate Response to Anti-GD2 Monoclonal Antibody in Patients With Neuroblastoma. *J Clin Oncol* (2016) 34:2443–51. doi: 10.1200/JCO.2015.64.9558
117. Passweg JR, Huard B, Tiercy J-M, Roosnek E. HLA and KIR Polymorphisms Affect NK-Cell Anti-Tumor Activity. *Trends Immunol* (2007) 28:437–41. doi: 10.1016/j.it.2007.07.008
118. Male V, Sharkey A, Masters L, Kennedy PR, Farrell LE, Moffett A. The Effect of Pregnancy on the Uterine NK Cell KIR Repertoire. *Eur J Immunol* (2011) 41:3017–27. doi: 10.1002/eji.201141445
119. Khakoo SI, Thio CL, Martin MP, Brooks CR, Gao X, Astemborski J, et al. HLA and NK Cell Inhibitory Receptor Genes in Resolving Hepatitis C Virus Infection. *Science* (2004) 305:872–4. doi: 10.1126/science.1097670
120. Torimiro J, Yengo CK, Bimela JS, Tiedeu AB, Lebon PA, Sake CS, et al. Killer Cell Immunoglobulin-Like Receptor Genotypes and Haplotypes Contribute to Susceptibility to Hepatitis B Virus and Hepatitis C Virus Infection in Cameroon. *OMICS* (2020) 24:110–5. doi: 10.1089/omi.2019.0173
121. Mori M, Leitman E, Walker B, Ndung'u T, Carrington M, Goulder P. Impact of HLA Allele-KIR Pairs on HIV Clinical Outcome in South Africa. *J Infect Dis* (2019) 219:1456–63. doi: 10.1093/infdis/jiy692

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

Publisher's Note: All claims expressed in this article are solely those of the authors and do not necessarily represent those of their affiliated organizations, or those of the publisher, the editors and the reviewers. Any product that may be evaluated in this article, or claim that may be made by its manufacturer, is not guaranteed or endorsed by the publisher.

Copyright © 2022 Dhuyser, Aarnink, Pérès, Jayaraman, Nemat-Gorgani, Rubio, Trowsdale and Traherne. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner(s) are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

3. ARTICLE

frontiers | Frontiers in Immunology

TYPE Original Research
PUBLISHED 02 March 2023
DOI 10.3389/fimmu.2023.1028162

Check for updates

OPEN ACCESS

EDITED BY
Zinaida Peric,
University of Zagreb, Croatia

REVIEWED BY
Daniela Pende,
San Martino Hospital (IRCCS), Italy
Frank M. Cichocki,
University of Minnesota Twin Cities, United States

*CORRESPONDENCE
James Traherne
jat51@cantab.ac.uk
Adèle Dhuyser
a.dhuyser@chru-nancy.fr

†These authors have contributed equally to this work and share last authorship

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

RECEIVED 25 August 2022
ACCEPTED 17 January 2023
PUBLISHED 02 March 2023

CITATION
Dhuyser A, Remen T, Pérès M, Chamberlain-Evans V, Nemat-Gorgani N, Campidelli A, Clément S, Rubio MT, Trowsdale J, Aarnink A and Traherne J (2023) Comparison of NK alloreactivity prediction models based on KIR-MHC interactions in haematopoietic stem cell transplantation. *Front. Immunol.* 14:1028162. doi: 10.3389/fimmu.2023.1028162

COPYRIGHT
© 2023 Dhuyser, Remen, Pérès, Chamberlain-Evans, Nemat-Gorgani, Campidelli, Clément, Rubio, Trowsdale, Aarnink and Traherne. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner(s) are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

Comparison of NK alloreactivity prediction models based on KIR-MHC interactions in haematopoietic stem cell transplantation

Adèle Dhuyser[1,2*], Thomas Remen[3], Michaël Pérès[1], Vitalina Chamberlain-Evans[4], Neda Nemat-Gorgani[4], Arnaud Campidelli[5], Sandra Clément[1], Marie Thérèse Rubio[2,5], John Trowsdale[4], Alice Aarnink[1,2†] and James Traherne[4*†]

[1]Histocompatibility Laboratory, Centre Hospitalier Régional Universitaire de Nancy, Nancy, France, [2]Ingénieurie Moléculaire et Physiopathologie Articulaire, team 6 (IMoPA6), Unité Mixte de Recherche 7365 Centre national de la Recherche Scientifique, Université de Lorraine, Nancy, France, [3]Direction de la Recherche Clinique et de l'Innovation, Unité de Méthodologie, Datamanagement et Statistiques, Centre Hospitalier Régional Universitaire de Nancy, Nancy, France, [4]Department of Pathology, University of Cambridge, Cambridge, United Kingdom, [5]Department of Hematology, Centre Hospitalier Régional Universitaire de Nancy, Nancy, France

The biological processes underlying NK cell alloreactivity in haematopoietic stem cell transplantation (HSCT) remain unclear. Many different models to predict NK alloreactivity through KIR and MHC genotyping exist, raising ambiguities in its utility and application for clinicians. We assessed 27 predictive models, broadly divided into six categories of alloreactivity prediction: ligand-ligand, receptor-ligand, educational, KIR haplotype-based, KIR matching and KIR allelic polymorphism. The models were applied to 78 NGS-typed donor/recipient pairs undergoing allogeneic HSCT in genoidentical (n=43) or haploidentical (n=35) matchings. Correlations between different predictive models differed widely, suggesting that the choice of the model in predicting NK alloreactivity matters. For example, two broadly used models, *educational* and *receptor-ligand*, led to opposing predictions especially in the genoidentical cohort. Correlations also depended on the matching fashion, suggesting that this parameter should also be taken into account in the choice of the scoring strategy. The number of centromeric B-motifs was the only model strongly correlated with the incidence of acute graft-versus-host disease in our set of patients in both the genoidentical and the haploidentical cohorts, suggesting that KIR-based alloreactivity, not MHC mismatches, are responsible for it. To our best knowledge, this paper is the first to experimentally compare NK alloreactivity prediction models within a cohort of genoidentical and haploidentical donor-recipient pairs. This study helps to resolve current discrepancies in KIR-based alloreactivity predictions and highlights the need for deeper consideration of the models used in clinical studies as well as in medical practice.

KEYWORDS

KIR, MHC, HLA, alloreactivity, prediction, natural killer (NK), allogeneic stem cell transplantation, donor selection

Introduction

Allogeneic haematopoietic stem cell transplantation (aHSCT) is an immunotherapy based on donor cell alloreactivity. This procedure can be used in a wide spectrum of diseases but especially as standard of care in haematological malignancies, when chemotherapies are insufficient for tumorigenesis control (1). Indeed, alloreactivity mediated by the donor's competent cells contained within the graft can achieve a life-saving graft versus leukemia (GVL) effect, where the graft destroys leukemic cells. However, alloreactivity also risks life-threatening effects such as graft versus host disease (GVHD).

The limited availability of 10/10 HLA-matched donor, either from sibling or unrelated donors, has restricted aHSCT feasibility for decades. However, current data are consistent with good outcomes using haploidentical donors (2). Together with favourable practical aspects to their use, this led to a 291% increase of haploidentical aHSCT in Europe between 2005 and 2015 (3) and a further 11% between 2018 and 2019 according to the last EBMT activity survey report (4).

Considering that at least one first-degree relative haploidentical donor is available for 95% of patients with haematological malignancies (5), the use of haploidentical donors leads to a major paradigm shift: while donor availability represented the main drawback for years, the issue now becomes one of finding the best haploidentical donor among several potential candidates. A major focus of attention is the assessment of natural killer (NK) cell alloreactivity through Killer Immunoglobulin-like Receptor (KIR) genotyping.

NK cells are innate lymphoid cells involved in early immunity against tumors (6). Their cytolytic activity is finely regulated to prevent inappropriate activation against normal cells through a process called "education" in which the interaction between KIRs and their cognate ligands appears to be crucial (7, 8). This process is not fully understood but the current consensus requires an NK cell to interact with a major histocompatibility complex (MHC) class I molecule *via* one of its KIR receptors to become competent, i.e. to be able to activate itself against abnormal cells (9). NK cells that have not had any contact with an MHC class I molecule remain inactive and thus less able to cause damage by autoreactivity. According to the missing-self theory, each competent NK cell maintains self-tolerance to autologous healthy cells, while it can recognize and kill abnormal cells that have downregulated MHC class I molecules (10).

In context of aHSCT, there is general agreement that NK cells are important players in the GVL effect while alloreactive TCRαβ T-lymphocytes are mainly responsible for GVHD. Indeed, kinetics of recovery and rates of early post-transplant NK cells reached during the period of severe lymphopenia correlate with lower relapse rates and better survival (11, 12), suggesting that this alloreactivity could be responsible for an early crucial GVL effect. Moreover, the historic functional study led by Ruggeri et al. has clearly shown that alloreactivity directly mediated by NK cells does not increase the rate of GVHD (13). Shah et al. have however reported that the adoptive transfer of donor-derived activated NK cells following HLA-matched T-cell depleted aHSCT led to especially high rates of GVHD: five of nine transplant recipient experienced GVHD, with grade 4 GVHD observed in 3 subjects (14). Given that the T-cell dose was below the threshold required for GVHD in this setting, Shah et al. conclude that activated donor's NK indirectly contributed to the acute GVHD (aGVHD) observed, likely by augmenting underlying T-cell alloreactivity, which is consistent with murine observations (15).

Finally, clinical studies remain discrepant regarding the association of NK predicted alloreactivity and positive or negative allograft outcomes (16). Problems in assessing these data include: (i) the clinical studies are mainly retrospective and the data collection partial (ii) some studies span periods up to 20 years over which time standards of care and technologies for MHC/KIR assessments have greatly evolved (iii) heterogeneity of cohorts especially in terms of ethnicities, pathologies (myeloid vs lymphoid malignancies) and ages (paediatric vs adult populations) (iv) heterogeneity of graft procedures leading to various quantity and quality of NK cells (11, 17, 18).

Besides these possible explanations, heterogeneous KIR-MHC based models have been used to predict NK alloreactivity, which could also be partly responsible for discrepancies. Therefore, the objective of the current work was to compare the different approaches predicting NK alloreactivity. We also explored correlations between the models with the following clinical outcomes: death, relapse, aGVHD and chronic GVHD (cGVHD).

Materials and methods

Cohorts

Two independent cohorts of patients undergoing aHSCT and their respective siblings – genoidentical for the first cohort and haploidentical for the second - were compiled in this study. The genoidentical cohort includes 43 donor/recipient (D/R) pairs for whom dried pellets derived from peripheral blood and clinical data were provided by the CRYOSTEM consortium (https://doi.org/10.25718/cryostem-collection/2018) and the SFGM-TC. The haploidentical cohort includes the 35 first consecutive haploidentical D/R pairs belonging to the local biocollection established by the histocompatibility laboratory at Centre Hospitalier Régional Universitaire of Nancy, France. More details are to found in Supplementary Data, section "Materials and methods".

This noninterventional research study is registered to the Protocol Registration and Results System under the number NCT04882605. It has been approved by the local ethic committee and carried out in accordance with the current French and European ethical standards, as well as the code of ethics of the World Medical Association. All patients gave their written consent for the generation and use of genetic data for research purposes as well as clinical data collection, not allowing the identification of individual subjects in accordance with the MR-004 reference edited by the Commission Nationale Informatique et Liberté (number 2020PI142-173 in the register of CNIL activities of the CHRU of Nancy).

MHC and KIR genotyping

DKMS Life Science Lab GmbH provided allelic genotyping resolution of all 13 KIR genes (*(KIR2DL1, KIR2DL2/3, KIR2DL4, KIR2DL5A, KIR2DL5B, KIR2DS1, KIR2DS2, KIR2DS3, KIR2DS4, KIR2DS5, KIR3DL1/3DS1, KIR3DL2, KIR3DL3)*, 2 KIR pseudogenes (*KIR2DP1* and *-3DP1*) and HLA genes (*HLA-A, -B, -C, -DRB1, -DQA1, -DQB1, -DPA1, -DPB1* and *-DRB3/4/5)*

for all enrolled individuals as previously described (19, 20). For the haploidentical pairs, presence or absence of donor's KIR genes and pseudogenes was also assessed by PCR-SSO using the Luminex® xMAP® technology.

To avoid artefacts (e.g. DNA contamination or sample inverting) the linkage disequilibria between HLA-B/-C and HLA-DR/-DQ (21) as well as the known KIR copy numbers imbalances (22) were verified as described previously, plus the consistency of HLA compatibility within each D/R couple.

Details about DNA extraction and MHC/KIR genotyping can be found in Supplementary Data, section "Material and methods".

Alloreactivity prediction

Figures 1A–F represent the six main categories of NK cell alloreactivity prediction models that have been applied to our two cohorts: 24 models divided into five categories of alloreactivity prediction based on KIR presence or absence (ligand-ligand, receptor-ligand, educational, KIR haplotype-based and KIR matching) as well as three models based on KIR allelic polymorphism. Figure 2 also shows the acronyms for each of the 27 models used in the rest of this article, as well as a brief description and the possible values according to our research methodology.

Ligand-ligand models

Donor NK cells are expected to be alloreactive toward host cells when the recipient is lacking MHC class I ligand present in donor (18). This drives the beneficial GVL effect as well as its GVHD counterpart. Conversely, mismatch in host versus graft (HVG) direction is assumed when MHC class I ligand is present in recipient but not in donor. In the Bw4/Bw6 model, HLA-Bw4/-Bw6 epitopes were manually annotated according to the amino acid at positions 77 and 80 of α1 domain of HLA class I heavy chain, but also taking into account the Bw4 and Bw6 epitopes that might be carried by certain HLA-A or HLA-C molecules respectively.

In the same fashion, HLA-C1/-C2 epitopes were manually annotated according to amino acid at position 80 of α1 domain of HLA class I heavy chain to assess the C1/C2 model.

A D/R couple can therefore be either matched, mismatched in GVH direction or mismatched in HVG direction for HLA-B epitopes (Bw4/Bw6) and/or HLA-C epitopes (C1/C2).

The IPD database proposes online assessments of mismatches by entering the D/R couple HLA-B and -C typing (23) that we used through the BwIPD model. Unlike the manual annotation above, this algorithm does not take into account the Bw4 and Bw6 epitopes that are carried by certain HLA-A or HLA-C molecules, respectively.

Ligand-ligand synthesis aims to assess ligand-ligand models across HLA-B and HLA-C so the D/R pairs fall into one of four categories; (i) at least one model predicting mismatch in the GVH direction, (ii) at least one model predicting mismatch in the HVG direction, (iii) one model predicting mismatch in the GVH direction whereas the second model is predicting mismatch in the HVG direction, or (iv) no mismatch in any direction.

Receptor-ligand/missing-ligand models

Donor NK cells are expected to be alloreactive toward host cells when the donor possesses inhibitory KIR for which the recipient lacks ligand (24). Accordingly, the following models: 2DL1-C2, 3DL1-Bw4, 3DL2-A3/11 and 2DL2/3-C1 reflect the receptor-ligand mismatch for each known inhibitory KIR/MHC interaction pair.

The synthesis of these receptor-ligand mismatch models was done in a quantitative way - the number of missing-ligand models predicting an alloreactivity (R/L quantitative synthesis) - and in a qualitative way - at least one missing-ligand model predicting an alloreactivity (R/L qualitative synthesis).

Education models

As a reflection of the education process required for a NK cell to become fully functional and reactive, the KIR mismatch leading to alloreactivity was assessed when the donor has licenced NK cells - i.e. inhibitory KIR and its cognate MHC ligand - but the recipient lacks the cognate MHC ligand (25, 26). Thus, the donor's NK cells either show (i) no alloreactivity because they lack certain KIR or D/R are matched for cognate MHC, (ii) remain uneducated because the donor does not have MHC ligand or (iii) are predicted to be educated and alloreactive for each model (Educ-2DL1, Educ-2DL2/3, Educ-3DL1 and Educ-3DL2) as summarized in the Figure 3. It is worth to note that each KIR haplotype carries a *KIR3DL2* gene since it is a framework gene, and a version of either *KIR2DL2* or *KIR2DL3* gene as these are alleles of the same *KIR2DL2/3* gene, carried by either the B-haplotype or the A-haplotype, respectively.

Educ-DL synthesis summarizes the number of Educ_xDLx models that predict alloreactivity among the four previously described KIRxDLx models.

There is also a potential educational process achieved by the activating KIR2DS1 and its cognate C2 ligand (27). Donor 2DS1+ C1+ NK cells are fully educated and capable of recognizing their ligands on recipient's C2+ leukemia cells. Conversely, donor 2DS1+ C1- NK cells remain hyporesponsive regardless of the ligands exhibited by leukemic cells (28). This educational process is described through the Educ-2DS1 model.

KIR haplotype based models

KIR genes are in strong linkage disequilibrium and are transmitted in haplotypes (29). Two main haplotypes have been described: A-haplotypes mostly contain inhibitory KIR (iKIR) whereas B-haplotypes contain one or more activating KIR (aKIR) gene. Each of these haplotypes can be divided into a centromeric (Cen) and a telomeric (Tel) part. Many studies have focused on the contribution of each particular motif of donors' KIR haplotypes (e.g. Cen-A, Cen-B, Tel-A, Tel-B, AA-haplotypes vs Bx haplotypes) in the generation of alloreactivity. We assessed the following scores counting the number of donor Cen-B motifs, Tel-B motifs, and number of donor B-motifs either Cen or Tel (B-pattern). As a synthesis of the previous models, Cooley et al. have designed the KIR-B content score that considers both the centromeric and telomeric parts in the assessment of alloreactivity (30). KIR-B content score can be generated by entering the donor KIR type (presence or absence of

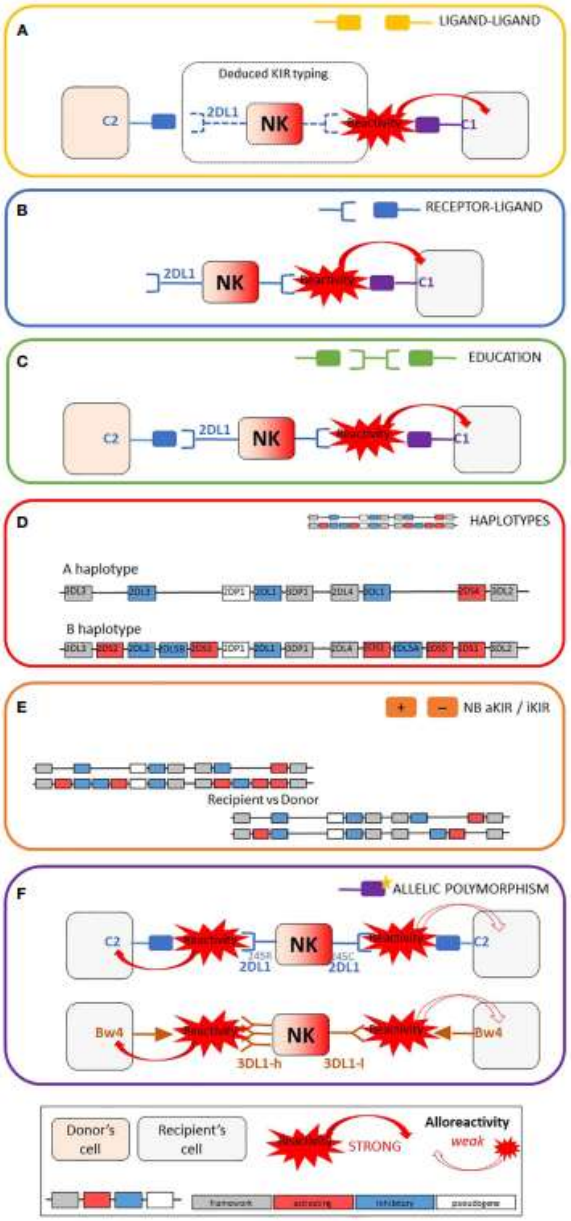


FIGURE 1
Schematic representation of the six main categories of models used for NK alloreactivity prediction and summary table of the characteristics of each category. Adapted from Dhuyser et al. (16). **(A)** Ligand–ligand model confronts the MHC of the donor with the MHC of the recipient: KIR genotyping is unknown and NK alloreactivity of the donor toward host cells is expected when the recipient lacks MHC class I ligand present in the donor. **(B)** Receptor–ligand model considers the KIR of the donor and the MHC of the recipient: if at least one KIR gene expressed in the donor does not recognize any of the MHC molecules of the recipient ("missing-ligand"), the NK cells of the donor will increase their cytotoxic activity. **(C)** Educational models consider the MHC class I molecules of the donor and recipient and the KIR typing of the donor. It should reflect the "education" process required for NK cells to become competent. **(D)** The KIR haplotypes of the donor: the B/x of the donor and particularly those carrying Cen-B/B are expected to be more alloreactive toward the cell of the recipients, as they carry mostly activating KIR genes. **(E)** KIR matching models represent the number of aKIR and/or iKIR gene present in the donor but absent in the recipient and vice versa. **(F)** KIR polymorphism leads to KIR molecules with relevant biological differences.

10.3389/fimmu.2023.1028162

Category	Acronym	Description	Possible values
LIGAND-LIGAND	Bw4/Bw6	Ligand-ligand Bw4/Bw6 model	Qualitative value - No MM - MM, GVH direction - MM, HVG direction - MM, GVH + HVG directions
	Bw IPD	Ligand-ligand Bw4/Bw6 model according to IPD database	
	C1/C2	Ligand-ligand C1/C2 model	
	L/L synthesis	Synthesis of ligand-ligand models	Qualitative value - at least 1 model predicting GVH MM - at least 1 model predicting HVG MM - 1 model predicting GVH + 1 predicting HVG - no mismatch in any direction.
RECEPTOR-LIGAND	2DL1-C2	Predicted alloreactivity according 2DL1-C2 KIR-L MM	Qualitative value: yes/no
	3DL1-Bw4	Predicted alloreactivity according 3DL1-Bw4 KIR-L MM	Qualitative value: yes/no
	3DL2-A3/11	Predicted alloreactivity according 3DL2-A3/A11 KIR-L MM	Qualitative value: yes/no
	2DL2/3-C1	Predicted alloreactivity according 2DL2/3-C1 KIR-L MM	Qualitative value: yes/no
	R/L quantitative synthesis	Number of models predicting alloreactivity according receptor-ligand hypothesis	Quantitative value [0 ; 4]
	R/L qualitative synthesis	At least 1 model prediciting alloreactivity according KIR-L mismatch	Qualitative value: yes/no
EDUCATION	Educ-2DL1	Educational model for C-2DL1-C	Qualitative value - no KIR/ligand interaction - no predicted alloreactivity - predicted alloreactivity
	Educ-2DL2/3	Educational model for C-2DL2/3-C	
	Educ-3DL1	Educational model for Bw4-3DL1-Bw4	
	Educ-3DL2	Educational model for A3/11-3DL2-A3/11	
	Educ-DL synthesis	Number of models predicting alloreactivity among the 4 KIRDL models	Quantitative value [0 ; 4]
	Educ-2DS1	Educational model for C-2DS1-C	Qualitative value - no predicted alloreactivity - predicted alloreactivity
DONORS KIR HAPLOTYPES	B-pattern	Number of donor's B pattern	Quantitative value [0 ; 4]
	Cen-B	Number of donor's B centromeric pattern	Quantitative value [0 ; 2]
	Tel-B	Number of donor's B telomeric pattern	
	KIR-B content score	Donor's KIR B content score according IDP database	Qualitative value neutral or better or best
NB aKIR / iKIR	Donor's aKIR	Number of donor's activating KIR	Quantitative value [0 ; 6]
	R-D aKIR	Difference between donor's and recipient's activating KIR	Quantitative value [-6 ; 6]
	Donor's iKIR	Number of donor's inhibitory KIR	Quantitative value [0 ; 6]
	R-D iKIR	Difference between donor's and recipient's inhibitory KIR	Quantitative value [-6 ; 6]
ALLELIC POLYM.	3DL1 expression	Donor's KIR3DL1 expression level	Qualitative value : high / low / null or absent
	2DL1 245C/R	Donor's 2DL1 245C/R polymorphism	Qualitative value: no R / at least one R allele / ambiguous
	-21 B dimorphism	Donor's HLA-B -21M/T dimorphism	Qualitative value : TT or TM or MM

FIGURE 2
Acronyms used in this paper, short description of each model and possible values of alloreactivity assessment.

each gene) on the IPD database website (31), classifying the donors as "neutral", "better" or "best".

Gene content models and gene-gene models

T the number of donor aKIR and donor iKIR can be assessed, as well as the differences between donor and recipient numbers of aKIR and iKIR respectively through R-D aKIR and R-D iKIR models. Framework iKIR were excluded from counting.

Allelic polymorphism

KIR3DL1/S1 allele products have been correlated with high (KIR3DL1-h) or low (KIR3DL1-l) cell-surface densities. They may also either be retained within the cell (KIR3DL1-n) or displayed on the cell surface but do not bind HLA-Bw4 (KIR3DS1). Some studies correlate KIR3DL1-h and Bw4-80I with stronger NK inhibition and a reduced alloreactivity (32, 33). The 3DL1 expression model explores donor KIR3DL1 expression as described by Boudreau et al. (33). When the donor had two alleles with different expression level, the highest level of expression was retained. The association with Bw4 has not been tested because of the small cohort size.

KIR2DL1 receptors can be split in two groups according to the amino acid at position 245 of its transmembrane domain: KIR2DL1-R245 and KIR2DL1-C245 with arginine or cysteine, respectively. As KIR2DL1-R245 is known to signal stronger than KIR2DL1-C245, we explored this dimorphism using the 2DL1 245C/R model, that split the cohorts into two groups considering the presence or absence of at least one KIR2DL1-R245 receptor, assessed as described by Bari et al. (34).

KIR are not the only receptors responsible for NK alloreactivity. *HLA-B* dimorphism at position −21 (methionine or threonine, thus M/T dimorphism) in the segment encoding the leader peptide dictates

Donor		Recipient	
HLA-C	2DL1	HLA-C	Score
C2+	2DL1+	C2+	0
C2+	2DL1+	C2-	1
C2-	2DL1+	C2+	uned.
C2-	2DL1+	C2-	uned.
Any	2DL1-	Any	0

Donor		Recipient	
HLA-A/B	3DL1	HLA-A/B	Score
Bw4+	3DL1+	Bw4+	0
Bw4+	3DL1+	Bw4-	1
Bw4-	3DL1+	Bw4+	uned.
Bw4-	3DL1+	Bw4-	uned.
Any	3DL1-	Any	0

Donor		Recipient	
HLA-C	2DL2/3	HLA-C	Score
C1+	2DL2/3+	C1+	0
C1+	2DL2/3+	C1-	1
C1-	2DL2/3+	C1+	uned.
C1-	2DL2/3+	C1-	uned.
Any	2DL2/3-	Any	0

Donor		Recipient	
HLA-A	3DL2	HLA-A	Score
A3/A11+	3DL2-	A3/A11+	0
A3/A11+	3DL2+	A3/A11-	1
A3/A11-	3DL2+	A3/A11+	uned.
A3/A11-	3DL2+	A3/A11-	uned.
Any	3DL2-	Any	0

Donor		Recipient	
HLA-C	2DS1	HLA-C	Score
C1+	2DS1+	C2+	1
C1+	2DS1+	C2-	0
C1-	2DS1+	C2+	0
C1-	2DS1+	C2-	0
Any	2DS1-	Any	0

FIGURE 3
Alloreactivity assessments through educational models. D, donor; R, recipient; 0, no alloreactivity; 1, predicted alloreactivity ; uned., uneducated.

whether NK cell regulation primarily relies on the KIR or another important heterodimer receptor, NKG2A/CD94. Subjects carrying HLA-B -21M harbor better-educated NKG2A$^+$ NK cells and display superior capacity to degranulate lytic granules against KIR ligand-matched primary leukemic blasts (35). Donor's HLA-B 21M/T dimorphism was therefore explored using the -21B dimorphism model.

Data collection

Relapse was defined by the reappearance of malignant cells in the blood smear, the loss of molecular or cytogenic remission for myeloid neoplasia, or the reappearance of radiological lesions for lymphoid neoplasia. We assessed aGVHD and cGVHD as defined by international consensus (36, 37). aGVHD was considered only from grade II according to the Glücksberg classification. More details are to be found in Supplementary Data, section "Materials and methods".

Statistical analysis

Categorical variables are described by their counts and percentages, and continuous variables by their mean and standard deviation or median and extreme values depending on the variable's distribution. The comparison of patients' characteristics between the two groups (genoidentical vs haploidentical) was carried out through Chi-2 tests or Fisher's exact tests for the categorical variables and by Student's or Mann-Whitney U tests for the continuous variables. The strength of the association between the different biological scores was explored through Spearman's correlation coefficients. The comparison of the cumulative incidence of the various events according to the results of biological scores was carried out using the Gray test (survival model), death being considered as a competitive risk in the various models.

Results

Distribution of the predicted alloreactivity according to the models

We aimed to explore if the heterogeneity of the models could be responsible for literature discrepancies regarding the benefit of predicted NK alloreactivity. We first focused on the distribution of alloreactivity according to the 27 models described. Table 1 shows the distribution of pairs predicted to be alloreactive according to each model within the genoidentical and the haploidentical cohorts. It highlights that the distribution of alloreactivity differs according to the different subset models of each scoring category based on education, KIR haplotypes as well as KIR polymorphisms. Focusing on the ligand/ligand and receptor/ligand categories, the distributions may appear consistent with each other (e.g. Bw4/Bw6 and BwIPD have similar predictions of alloreactivity). Figure 4 however highlights that the prediction of alloreactivity differs according to the models in those two later categories. Indeed, the pairs contributing to the statistics are different from one model to another.

Taken together, these results show that models are not interchangeable and that it is wise to investigate further how they could be correlated in genoidentical and haploidentical matching.

Correlations between the different models

Figure 5 represents heatmaps showing the strength of the association between the different biological models explored through Spearman's correlation coefficients. Because the genoidentical cohort do not allow the assessment of every model, results were primarily explored within the haploidentical cohort (Figure 5A and Supplementary Table 1), then compared to genoidentical pairs (Figure 5B and Supplementary Table 2) and across the whole cohort (Supplementary Figure 1 and Supplementary Table 3). Values in brackets below correspond to correlation coefficients.

10.3389/fimmu.2023.1028162

TABLE 1 Distribution of pairs predicted to be alloreactive according each model.

	Genoidentical N=43 (55,1%)		Haploidentical N=35 (44,9%)		p*
	N	%/mean	N	%/mean	
LIGAND-LIGAND					
Bw4/Bw6					0,0004
HVG mismatch	0	0,0	6	17,1	
No mismatch	43	100,0	26	74,3	
GVH mismatch	0	0,0	3	8,6	
Bw IPD					0,0025
HVG mismatch	0	0,0	4	11,4	
No mismatch	43	100,0	28	80,0	
GVH mismatch	0	0,0	3	8,6	
C1/C2					<0,0001
HVG mismatch	0	0,0	4	11,4	
No mismatch	43	100,0	24	68,6	
GVH mismatch	0	0,0	7	20,0	
L/L synthesis					<0,0001
HVG mismatch in at least one model	0	0,0	10	28,6	
No mismatch in any model	43	100,0	14	40,0	
GVH mismatch in at least one model	0	0,0	10	28,6	
HVG mismatch + GVH mismatch	0	0,0	1	2,9	
RECEPTOR-LIGAND					
2DL1-C2					
No	35	81,4	21	60,0	0,0368
Yes	8	18,6	14	40,0	
3DL1-Bw4					
No	29	67,4	30	85,7	0,0615
Yes	14	32,6	5	14,3	
3DL2-A3/A11					0,9440
No	20	46,5	16	45,7	
Yes	23	53,5	19	54,3	
2DL2/3-C1					0,5287
No	38	88,4	29	82,9	
Yes	5	11,6	6	17,1	
R-L quantitative synthesis					0,2891
0	8	18,6	6	17,1	
1	20	46,5	17	48,6	
2	15	34,9	9	25,7	
3	0	0,0	3	8,6	
R-L qualitative synthesis					0,8671
No	8	18,6	6	17,1	
Yes	35	81,4	29	82,9	
EDUCATIONAL					
Educ-2DL1					0,0088
Uneducated (without 2DL1)	10 (2)	23,3	14 (2)	40,0	
No predicted alloreactivity	33	76,7	17	48,6	
Predicted alloreactivity	0	0,0	4	11,4	
Educ-2DL2/3					0,1853
Uneducated	5	11,6	4	11,4	
No predicted alloreactivity	38	88,4	28	80,0	
Predicted alloreactivity	0	0,0	3	8,6	
Educ-3DL1					0,1465
Uneducated (without 3DL1)	17 (3)	39,5	8 (2)	22,9	
No predicted alloreactivity	26	60,5	26	74,3	
Predicted alloreactivity	0	0,0	1	2,9	
Educ-3DL2					0,1298
Uneducated	23	53,5	24	68,6	
No predicted alloreactivity	20	46,5	10	28,6	
Predicted alloreactivity	0	0,0	1	2,9	
Educ-DL synthesis					0,0004
0	43	100,0	26	74,3	
1	0	0,0	9	25,7	
Educ-2DS1					0,2627
No predicted alloreactivity	34	79,1	31	88,6	
Predicted alloreactivity	9	20,9	4	11,4	
DONORS' HAPLOTYPES					
B-pattern					0,9609
0	11	25,6	11	31,4	
1	18	41,9	12	34,3	
2	9	20,9	8	22,9	
3	4	9,3	3	8,6	
4	1	2,3	1	2,9	
Cen-B					0,7159
0	17	39,5	14	40,0	
1	19	44,2	13	37,1	
2	7	16,3	8	22,9	
Tel-B					0,8051
0	27	62,8	25	71,4	
No	8	18,6	6	17,1	
Yes	35	81,4	29	82,9	

(Continued)

TABLE 1 Continued

	Genoidentical N=43 (55,1%)		Haploidentical N=35 (44,9%)		p*
	N	%/mean	N	%/mean	
1	13	30,2	8	22,9	
2	3	7,0	2	5,7	
KIR-B content score					0,6608
Neutral	29	67,4	23	65,7	
Better	7	16,3	4	11,4	
Best	7	16,3	8	22,9	
GENE-GENE					
Donor's aKIR					0,4623
0 aKIR	5	11,6	5	14,3	
1 or 2 aKIR	15	34,9	16	45,7	
Greater/equal 3 aKIR	23	53,5	14	40,0	
R-D aKIR					0,8593
Missing	2	3			
No. of recipient's aKIR > No of donor's aKIR	11	26,8	10	31,3	
No. of recipient's aKIR = No of donor's aKIR	21	51,2	16	50,0	
Donor has 1 or 2 aKIR more than recipient	4	9,8	4	12,5	
Donor has ≥ 3 aKIR more than recipient	5	12,2	2	6,3	
Donor's iKIR					0,9094
2 or 3 iKIR	13	30,2	11	31,4	
Greater/equal 4 iKIR	30	69,8	24	68,6	
R-D iKIR					0,5071
Missing	2	3			
No. of recipient's iKIR > No of donor's iKIR	13	31,7	11	34,4	
No. of recipient's iKIR = No of donor's iKIR	17	41,5	16	50,0	
Donor has 1 or 2 iKIR more than recipient	11	26,8	5	15,6	
ALLELIC POLYMORPHISM					
3DL1 expression					0,7294
Missing	1		5		
Null or absent	5	11,9	3	10,0	
Low	5	11,9	6	20,0	
High	32	76,2	21	70,0	
2DL1 R/C dimorphism					0,8199
Missing	0		4		
No R allele	6	14,0	5	16,1	
At least one R allele	34	79,1	25	80,6	
Ambiguous	3	7,0	1	3,2	

(Continued)

TABLE 1 Continued

	Genoidentical N=43 (55,1%)		Haploidentical N=35 (44,9%)		p*
	N	%/mean	N	%/mean	
-21 B dimorphism					0,9455
Donor TT	24	55,8	21	60,0	
Donor MT	14	32,6	11	31,4	
Donor MM	5	11,6	3	8,6	

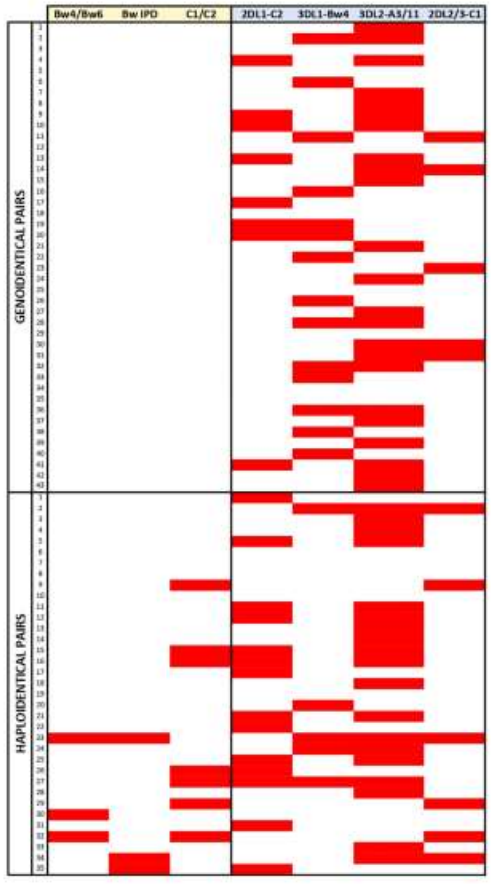


FIGURE 4
Representation of the alloreactivity prediction according the models of the ligand/ligand and receptor/ligand categories. Red rectangles highlight the greatest level of alloreactivity prediction according the considered model for a given pair.

The most striking correlations are highlighted in the following subsections.

Haploidentical cohort

Considering first the KIR haplotype-based categories; (i) KIR-B content score highly correlates with the number of Cen-B but not Tel-

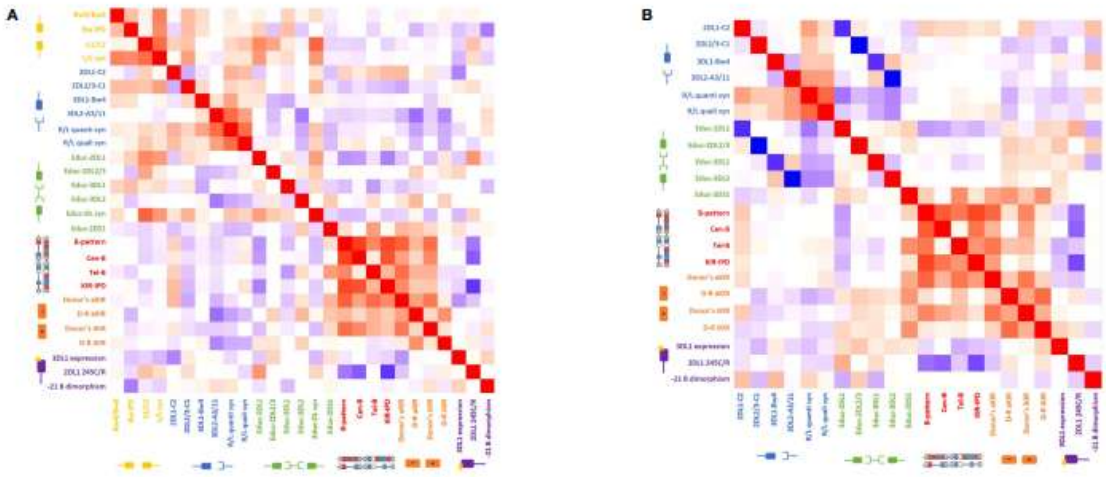


FIGURE 5
Heatmap of the Spearman's correlation coefficients reflecting the strength of the association between the different biological models **(A)** for the haploidentical cohort and **(B)** for the genoidentical cohort. Red squares represent a positive correlation between two different models whereas blue squares represent a negative correlation between two different models. See also Supplementary Tables 1, 2.

B motifs (0.81 and 0.4) as expected regarding the predominant effect of the centromeric part in this scoring strategy; (ii) Tel-B correlates with Educ-2DS1 (0.52), reflecting the fact that KIR2DS1 is only found on the telomeric part of B-haplotypes; (iii) KIR haplotype-based models correlate with the number of donor activating and inhibitory genes – e.g. B-pattern correlates with donor aKIR (0.76) and donor iKIR (0.70). This is related to the B-haplotype architecture, known to have higher gene content and to be especially enriched in aKIR. It is noteworthy that donor aKIR correlates with Tel-B but not Cen-B (0.71 vs 0.50) whereas donor iKIR correlate with Cen-B but not Tel-B (0.60 vs 0.42), reflecting that telomeric part is enriched in aKIR compared to the centromeric part.

Educ-2DL1 inversely correlates with donor KIR haplotype-based models: KIR-B content score (-0.55), B-pattern (-0.48), Cen-B (-0.45), the poorest correlation being for Tel-B (-0.18). This once again highlights the architecture of KIR haplotypes, with KIR2DL1 always present on the A-haplotype but not always on B-haplotypes.

2DL1 245C/R positively correlates with the alloreactivity predicted by Educ-2DL1 (0.55). Consequently, 2DL1 245C/R behaves similarly to the Educ-2DL1 model, i.e. inversely to KIR haplotype-based models. The correlations with B-pattern, Cen-B and KIR-B content score are respectively -0.59, -0.70 and -0.83. There is no correlation between 2DL1 245C/R and Tel-B (0.04). Noting that KIR2DL1 245R is carried by Cen A haplotypes, while 2DL1 245C by Cen B1 haplotypes, this reflects once again the architecture of KIR haplotypes.

Genoidentical cohort

Because genoidentical pairs are 10/10 HLA-matched, there is neither D/R ligand-ligand mismatch in any direction, nor predicted alloreactivity within the educational models.

The inverse correlation between the educational models and missing ligand models are much stronger than in the haploidentical cohort, with the following correlation coefficients: 2DL1-C2/Educ-2DL1: -0.87; 3DL1-Bw4/Educ-3DL1: -0.86; 3DL2-A3/11/Educ-3DL1: -1 and 2DL2/3-C1/Educ-2DL2/3: -1. Indeed, the lack of discrepancies between donor and recipient HLA-types allows focus on the KIR-based predicted alloreactivity and on the correlations between those models.

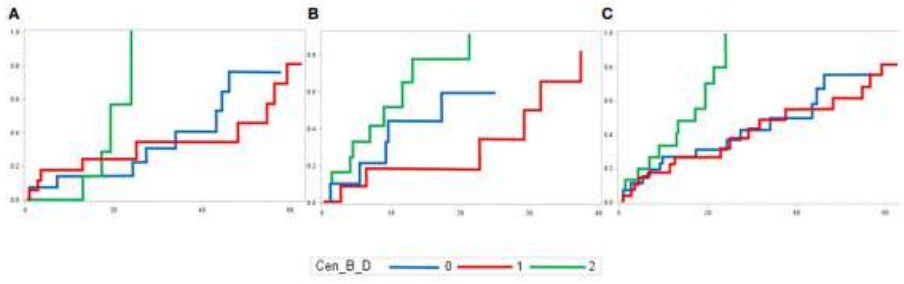


FIGURE 6
Cumulative incidences of aGVHD in **(A)** genoidentical, **(B)** haploidentical and **(C)** whole cohort according to the number of Cen-B motifs of the donor.

The strengths of correlations between donors' KIR haplotype-based strategies (B-pattern, Cen-B and KIR-B content score) are similar to the ones observed in the haploidentical cohorts with similar coefficients of correlation. Similar finding are observed for the models based on gene content (donor aKIR, donor iKIR). Indeed, those models only depend on donor KIR genotyping, and the D/R compatibility does not matter. 2DL1 245C/R behaves similarly in both cohorts, i.e. inversely to KIR haplotype-based models with approximately same coefficients of correlations.

Clinical-biological correlations

We hypothesized that particular models could be differentially predictive of clinical outcomes (death, relapse, aGVHD and cGVHD). Acknowledging the small sizes of the study cohorts as well as their heterogeneity (Supplementary Tables 4–6), we proceeded to look at the correlations between the different models and recipients' post-aHSCT outcomes as exploratory results. Supplementary Table 7 shows the p-values of the Gray test used to compare the cumulative incidence of post-allograft outcomes (death, relapse, aGVHD and cGVHD) according to the results of alloreactivity predictions, death being considered as a competitive risk in the various models.

The major clinical-biological correlation is found between the Cen-B model and the cumulative incidence of aGVHD. Higher number of Cen-B is associated with higher cumulative incidence of aGVHD (p-value of 0.08, 0.03 and 0.006 in genoidentical, haploidentical and whole cohort, respectively) (Figure 6). Because this effect is found in the genoidentical and in the haploidentical cohort as well, this might suggest that KIR predicted alloreactivity but not MHC mismatches are responsible for aGVHD occurrence in these series. The aGVHD took on average one month to occur after the transplantation (Supplementary Table 6), i.e. could not be led by T-lymphocytes resulting from *de novo* repertoire, but from donor's mature T-lymphocytes present within the graft likely supported by alloreactive donor's NK cells

Discussion

We hypothesized that the various models used to predict NK alloreactivity could be partly responsible for published discrepancies. Many models have been described, but they target different basic aspects of the complex biological process of education. The main objective of this work was to examine the heterogeneity of the major KIR-based prediction models in alloreactivity and to assess potential correlations.

Considering first the distributions of predicted alloreactivities among the models, we highlighted that (i) some models cannot be used within genoidentical pairs: indeed, genoidentical donors are 10/10 HLA-matched with the recipients, so there is neither mismatch according to ligand-ligand models nor predicted alloreactivity according to the educational models for those D/R pairs. (ii) Ligand-ligand and education models predict alloreactivity for only a small subset of recipients. Consequently, the stratification of potential donors using these models could have only a moderate benefit. Studies aiming to describe the effect of alloreactivity according to these models will need to enroll a sufficient number of patients. (iii) More importantly, prediction of alloreactivity according different models was not consistent within the same pair.

We then focused on correlations between the models in view of biological relationships. Indeed (i) receptor-ligand models negatively correlate with educational models, especially in the genoidentical cohort where the coefficients' correlations are about -1. In educational models, a donor's NK cells are supposed to be alloreactive when the donor has KIR and its cognate MHC molecule, but the recipient lacks the same cognate MHC molecule: this cannot occur in 10/10 HLA matched settings. Alloreactivity according to the receptor-ligand model is counted when a recipient lacks the cognate MHC for a donor KIR, so genoidentical pairs can be predicted as alloreactive according to this model. Because they rely on the same KIR/MHC interactions (i.e. 2DL1-C2, 2DL2/3-C1, 3DL1-Bw4 and 3DL2-A3/A11), they strongly correlate but in opposite directions. (ii) Predicted alloreactivity according to C2-2DL1 education tends to inversely correlate with each model assessing the presence of centromeric B-motifs but not with telomeric B-motif, highlighting the architecture of KIR haplotypes, with *KIR2DL1* always present on A-haplotype but not always on B-haplotypes and the hotspot recombination between centromeric and telomeric parts disrupting the linkage disequilibrium between *KIR2DL1* and telomeric B-motifs. (iii) KIR haplotype-based models positively correlate with the number of donors' activating and inhibitory genes, reflecting the higher gene content in B-haplotypes compared to A-haplotype. (iv) The presence of *KIR2DL1* 245R allele in donor correlating with 2DL1-C2 education could be explained by *KIR2DL1* copy number variation: the more *KIR2DL1* alleles a donor has, the higher the probability of him carrying at least one 245R allele and fulfilling education. (v) We also highlighted that the correlations between the models may differ according to the D/R compatibility, as the inverse correlations between the educational models and receptor-ligand models are much stronger in the genoidentical cohort compared to the haploidentical cohort.

We finally aimed to explore correlations between the different models and clinical outcomes. We acknowledge that our two cohorts significantly differ regarding recipient characteristics. Despite these limitations, we highlighted the following trends: (i) each model is differentially associated with different outcomes, (ii) the different models predict one outcome with different efficacy and (iii) the D/R compatibility greatly impacts the pertinence of the model.

Among the 27 models, the number of centromeric B-motifs is the only parameter correlated within both cohorts for the same outcome, i.e. the cumulative incidence of aGVHD. Because this effect is found in the genoidentical and the haploidentical cohort, this might suggest that KIR predicted alloreactivity but not MHC mismatching could be responsible for it. Even if the original study describing KIR haplotypes has correlated the presence of centromeric B-motifs with better long-term outcomes (increased overall survival and disease-free survival but decreased relapse) (30), our results should not be interpreted as standing in contradiction with the latter because the shortness of recipients' follow-up (median of 23 months *vs* 13 months for genoidentical and haploidentical cohorts respectively, Supplementary Table 6). However, our results are consistent with a more recent study of a Japanese cohort showing that Bx donors were associated with a higher risk for grade III to IV aGVHD (38). The presence of activating KIR genes on the centromeric B-motif, for example *KIR2DS2*, *KIR2DS3* as well as the

KIR2DL1 245C allele, could explain this greater alloreactivity. To our best knowledge, this paper is the first to experimentally compare NK alloreactivity prediction models within a cohort of genoidentical and haploidentical aHSCT donor-recipient pairs. This study helps to resolve current discrepancies in KIR-based alloreactivity predictions and highlights the need for deeper consideration of the models used in clinical studies as well as in medical practice.

Data availability statement

The raw data supporting the conclusions of this article will be made available by the authors, without undue reservation.

Ethics statement

The studies involving human participants were reviewed and approved by Ethics committee of Nancy's Centre Hospitalier Régional Universitaire, France Hospital. The patients/participants provided their written informed consent to participate in this study.

Author contributions

AD, AA and JaT designed the research project. AD was in charge of the establishment and declaration of the biocollection, samples' preparation as well as their shipping, HLA/KIR typing as well as clinical data management, models' interpretation and writing of the manuscript. AA extracted the DNA from dried PBMC sent by CRYOSTEM. AA and JaT supported every step of the models' analyses and interpretation of statistical results. TR accompanied the methodological aspects of the research and performed the statistical analyses. SC performed PCR-SSO for KIR typing. AC provided the written consent for all haploidentical donors. AA, JaT, JoT, TR, MP, VC-E and NN-G reviewed the manuscript. All authors contributed to the article and approved the submitted version.

Funding

The project received funding from the European Research Council (ERC) under the European Union's Horizon 2020 research and innovation programme (grant agreement No. 695551) AD received a one-year funding from l'Agence Régionale de Santé du Grand Est (ARS Grand Est): contrat année recherche n°54-2019-1. AA received *via* the HTC Project endowment fund (www.htcproject.org) a one-time funding from the patients association "Laurette Fugain" that was used to access to the CRYOSTEM biological resources and to fund the sequencing and the bioinformatic analyses.

Acknowledgments

We thank all the co-authors associated to this work who supported the writing of this paper and address a particular warm thank to Arnaud Campidelli for his help in the consent collection. We acknowledge One Lambda for providing a gratis KIR SSO Genotyping kit. We also acknowledge the Research and Innovation Delegation (DRCI) and especially the Centre de Ressources Biologiques (CRB) Lorrain of CHRU Nancy BB-0033-00035 for their regulatory support and their help in managing patient samples. Last but not least, we warmly thank the association "Laurette Fugain", the CRYOSTEM consortium and the Société Francophone de Greffe de Moelle et de Thérapie Cellulaire (SFGM-TC) for their support in this project.

Conflict of interest

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

Publisher's note

All claims expressed in this article are solely those of the authors and do not necessarily represent those of their affiliated organizations, or those of the publisher, the editors and the reviewers. Any product that may be evaluated in this article, or claim that may be made by its manufacturer, is not guaranteed or endorsed by the publisher.

Supplementary material

The Supplementary Material for this article can be found online at: https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2023.1028162/full#supplementary-material

SUPPLEMENTARY TABLE 1
Spearman's correlation coefficients between the different biological models within the haploidentical cohort.

SUPPLEMENTARY TABLE 2
Spearman's correlation coefficients between the different biological models within the genoidentical cohort.

SUPPLEMENTARY TABLE 3
Spearman's correlation coefficients between the different biological models within the whole cohort (genoidentical and haploidentical).

SUPPLEMENTARY TABLE 4
Recipients' characteristics per cohort.

SUPPLEMENTARY TABLE 5
Graft parameters per cohort.

SUPPLEMENTARY TABLE 6
Recipient's post-allograft outcomes per cohort.

SUPPLEMENTARY TABLE 7
p-values of the Gray test used to compare the cumulative incidence of post-allograft's outcomes (death, relapse, aGVHD and cGVHD) according to the results of alloreactivity predictions', death being considered as a competitive risk in the various models.

SUPPLEMENTARY FIGURE 1
Heatmap of the Spearman's correlation coefficients reflecting the strength of the association between the different biological within the whole cohort. Red squares represent a positive correlation between two different models whereas blue squares represent a negative correlation between two different models. See also Supplementary Table 3.

References

1. Duarte RF, Labopin M, Bader P, Basak GW, Bonini C, Chabannon C, et al. Indications for haematopoietic stem cell transplantation for haematological diseases, solid tumours and immune disorders: Current practice in Europe, 2019. *Bone Marrow Transplant* (2019) 54:1525–52. doi: 10.1038/s41409-019-0516-2

2. Kwon M, Ballèn R, Diez-Martin JL. Evolution of the role of haploidentical stem cell transplantation: past, present, and future. *Expert Rev Hematol* (2020) 13:835–50. doi: 10.1080/17474086.2020.1796621

3. Passweg JR, Baldomero H, Bader P, Bonini C, Duarte RF, Dufour C, et al. Use of haploidentical stem cell transplantation continues to increase: The 2015 European society for blood and marrow transplant activity survey report. *Bone Marrow Transplant* (2017) 52:811–7. doi: 10.1038/bmt.2017.34

4. Passweg JR, Baldomero H, Chabannon C, Basak GW, de la Cámara R, Corbacioglu S, et al. Hematopoietic cell transplantation and cellular therapy survey of the EBMT: monitoring of activities and trends over 30 years. *Bone Marrow Transplant* (2021) 56:1651–64. doi: 10.1038/s41409-021-01227-8

5. Fuchs EJ. Haploidentical transplantation for hematologic malignancies: Where do we stand? *Hematol Am Soc Hematol Educ Program* (2012) 2012:230–6. doi: 10.1182/asheducation-2012.1.230

6. Spits H, Bernink JH, Lanier L. NK cells and type 1 innate lymphoid cells: Partners in host defense. *Nat Immunol* (2016) 17:758–64. doi: 10.1038/ni.3482

7. 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) 39:577–90. doi: 10.1016/j.it.2018.04.009

8. Moretta A, Bottino C, Vitale M, Pende D, Biassoni R, Mingari MC, et al. Receptors for hla class-i molecules in human natural killer cells. *Annu Rev Immunol* (1996) 14:619–48. doi: 10.1146/annurev.immunol.14.1.619

9. Yokoyama WM, Kim S. Licensing of natural killer cells by self-major histocompatibility complex class I. *Immunol Rev* (2006) 214:143–54. doi: 10.1111/j.1600-065X.2006.00458.x

10. Ljunggren HG, Kärre K. In search of the "missing self": MHC molecules and NK cell recognition. *Immunol Today* (1990) 11:237–44. doi: 10.1016/0167-5699(90)90097-S

11. Russo A, Oliveira G, Berglund S, Greco R, Gambacorta V, Cieri N, et al. NK cell recovery after haploidentical HSCT with posttransplant cyclophosphamide: dynamics and clinical implications. *Blood* (2018) 131:247–62. doi: 10.1182/blood-2017-05-780668

12. Savani BN, Mielke S, Adams S, Uribe M, Rezvani K, Yong ASM, et al. Rapid natural killer cell recovery determines outcome after T-cell-depleted HLA-identical stem cell transplantation in patients with myeloid leukemias but not with acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia* (2007) 21:2145–52. doi: 10.1038/sj.leu.2404892

13. Ruggeri L, Capanni M, Urbani E, Perruccio K, Shlomchik WD, Tosti A, et al. Effectiveness of donor natural killer cell alloreactivity in mismatched hematopoietic transplants. *Science* (2002) 295:2097–100. doi: 10.1126/science.1068440

14. Shah NN, Baird K, Delbrook CP, Fleisher TA, Kohler ME, Rampertaap S, et al. Acute GVHD in patients receiving IL-15/4-1BBL activated NK cells following t-cell–depleted stem cell transplantation. *Blood* (2015) 125:784–92. doi: 10.1182/blood-2014-07-592881

15. Ghayur T, Seemayer TA, Kongshavn PA, Gartner JG, Lapp WS. Graft-versus-host reactions in the beige mouse. An investigation of the role of host and donor natural killer cells in the pathogenesis of graft-versus-host disease. *Transplantation* (1987) 44:261–7. doi: 10.1097/00007890-198708000-00017

16. Dhuyser A, Aarnink A, Pérès M, Jayaraman J, Nemat-Gorgani N, Rubio MT, et al. KIR in allogeneic hematopoietic stem cell transplantation: Need for a unified paradigm for donor selection. *Front Immunol* (2022) 13. doi: 10.3389/fimmu.2022.821533

17. Huang X-J, Zhao X-Y, Liu D-H, Liu K-Y, Xu L-P. Deleterious effects of KIR ligand incompatibility on clinical outcomes in haploidentical hematopoietic stem cell transplantation without *in vitro* T-cell depletion. *Leukemia* (2007) 21:848–51. doi: 10.1038/sj.leu.2404566

18. Ruggeri L, Capanni M, Casucci M, Volpi I, Tosti A, Perruccio K, et al. Role of natural killer cell alloreactivity in HLA-mismatched hematopoietic stem cell transplantation. *Blood* (1999) 94:333–9. doi: 10.1182/blood.V94.1.333.413a31_333_339

19. Wagner I, Schefzyk D, Pruschke J, Schöfl G, Schöne B, Gruber N, et al. Allele-level KIR genotyping of more than a million samples: Workflow, algorithm, and observations. *Front Immunol* (2018) 9:2843. doi: 10.3389/fimmu.2018.02843

20. Lange V, Böhme I, Hofmann J, Lang K, Sauter J, Schöne B, et al. Cost-efficient high-throughput HLA typing by MiSeq amplicon sequencing. *BMC Genomics* (2014) 15:63. doi: 10.1186/1471-2164-15-63

21. Maiers M, Gragert L, Klitz W. High-resolution HLA alleles and haplotypes in the united states population. *Hum Immunol* (2007) 68:779–88. doi: 10.1016/j.humimm.2007.04.005

22. Jayaraman J, Kirgizova V, Di D, Johnson C, Jiang W, Traherne JA. qKAT: Quantitative semi-automated typing of killer-cell immunoglobulin-like receptor genes. *J Vis Exp* (2019). doi: 10.3791/58646

23. *IPD-KIR database*. Available at: https://www.ebi.ac.uk/ipd/kir/matching/ligand/ (Accessed November 18, 2022).

24. Leung W, Iyengar R, Turner V, Lang P, Bader P, Conn P, et al. Determinants of antileukemia effects of allogeneic NK cells. *J Immunol* (2004) 172:644–50. doi: 10.4049/jimmunol.172.1.644

25. Nowak J, Kościńska K, Mika-Witkowska R, Rogatko-Koroś M, Mizia S, Jaskuła E, et al. Donor NK cell licensing in control of malignancy in hematopoietic stem cell transplant recipients. *Am J Hematol* (2014) 89:E176–183. doi: 10.1002/ajh.23802

26. Nowak J, Kościńska K, Mika-Witkowska R, Rogatko-Koroś M, Mizia S, Jaskuła E, et al. Role of donor activating KIR-HLA ligand-mediated NK cell education status in control of malignancy in hematopoietic cell transplant recipients. *Biol Blood Marrow Transplant* (2015) 21:829–39. doi: 10.1016/j.bbmt.2015.01.018

27. Pende D, Marcenaro S, Falco M, Martini S, Bernardo ME, Montagna D, et al. Anti-leukemia activity of alloreactive NK cells in KIR ligand-mismatched haploidentical HSCT for pediatric patients: Evaluation of the functional role of activating KIR and redefinition of inhibitory KIR specificity. *Blood* (2009) 113:3119–29. doi: 10.1182/blood-2008-06-164103

28. Venstrom JM, Pittari G, Gooley TA, Chewning JH, Spellman S, Haagenson M, et al. HLA-C–dependent prevention of leukemia relapse by donor activating KIR2DS1. *New Engl J Med* (2012) 367:805–16. doi: 10.1056/NEJMoa1200503

29. Hsu KC, Chida S, Geraghty DE, Dupont B. The killer cell immunoglobulin-like receptor (KIR) genomic region: Gene-order, haplotypes and allelic polymorphism. *Immunol Rev* (2002) 190:40–52. doi: 10.1034/j.1600-065X.2002.19004.x

30. Cooley S, Weisdorf DJ, Guethlein LA, Klein JP, Wang T, Le CT, et al. Donor selection for natural killer cell receptor genes leads to superior survival after unrelated transplantation for acute myelogenous leukemia. *Blood* (2010) 116:2411–9. doi: 10.1182/blood-2010-05-283051

31. *IPD - KIR sequence database| EBI*. Available at: https://www.ebi.ac.uk/ipd/kir/donor_b_content.html (Accessed September 22, 2019).

32. Shen M, Linn Y-C, Ren E-C. KIR-HLA profiling shows presence of higher frequencies of strong inhibitory KIR-ligands among prognostically poor risk AML patients. *Immunogenetics* (2016) 68:133–44. doi: 10.1007/s00251-015-0888-4

33. Boudreau JE, Giglio F, Gooley TA, Stevenson PA, Le Luduec J-B, Shaffer BC, et al. KIR3DL1/ HL a-b subtypes govern acute myelogenous leukemia relapse after hematopoietic cell transplantation. *J Clin Oncol* (2017) 35:2268–78. doi: 10.1200/JCO.2016.70.7059

34. Bari R, Bell T, Leung W-H, Vong QP, Chan WK, Das Gupta N, et al. Significant functional heterogeneity among KIR2DL1 alleles and a pivotal role of arginine245. *Blood* (2009) 114:5182–90. doi: 10.1182/blood-2009-07-231977

35. Hallner A, Bernson E, Hussein BA, Ewald Sander F, Brune M, Aurelius J, et al. The HLA-b −21 dimorphism impacts on NK cell education and clinical outcome of immunotherapy in acute myeloid leukemia. *Blood* (2019) 133:1479–88. doi: 10.1182/blood-2018-09-874990

36. Jagasia MH, Greinix HT, Arora M, Williams KM, Wolff D, Cowen EW, et al. National institutes of health consensus development project on criteria for clinical trials in chronic graft-versus-Host disease: I. the 2014 diagnosis and staging working group report. *Biol Blood Marrow Transplant* (2015) 21:389–401.e1. doi: 10.1016/j.bbmt.2014.12.001

37. Glucksberg H, Storb R, Fefer A, Buckner CD, Neiman PE, Clift RA, et al. Clinical manifestations of graft-versus-host disease in human recipients of marrow from HL-a-matched sibling donors. *Transplantation* (1974) 18:295–304. doi: 10.1097/00007890-197410000-00001

38. Hosokai R, Masuko M, Shibasaki Y, Saitoh A, Furukawa T, Imai C. Donor killer immunoglobulin-like receptor haplotype b/x induces severe acute graft-versus-Host disease in the presence of human leukocyte antigen mismatch in T cell-replete hematopoietic cell transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant* (2017) 23:606–11. doi: 10.1016/j.bbmt.2016.12.638

PARTIE III – L'ACTIVATION DES LYMPHOCYTES T DANS L'ALLO-HCT – INTÉRÊT DE L'IMMUNOPEPTIDOME

1. INTRODUCTION

Nous avons présenté dans l'introduction le rôle clé de l'activation du lymphocyte T dans la genèse de l'alloréactivité médiant à la fois l'effet GVL et l'effet GVH. Nous avons décrit comment cette activation dépend de l'interface de reconnaissance entre le TCR des lymphocytes T du donneur et un complexe [molécule HLA-peptide]. Dans le cadre de l'alloréactivité directe, ce sont les cellules dendritiques du receveur qui présentent le complexe [molécule HLA-peptide], alors que dans l'alloréactivité indirecte ce sont les cellules dendritiques émanant de la reconstitution immunitaire post-allogreffe, donc issues du donneur. Dans les deux cas, si le couple donneur/receveur est parfaitement HLA-compatible, l'incompatibilité responsable de l'activation des lymphocytes T ne peut être que celle des peptides enchâssés.

1. La présentation antigénique et l'immunopeptidome

Les peptides enchâssés dans les molécules HLA de classe I – présentes à la surface de toutes les cellules nucléées et des plaquettes – proviennent de la dégradation physiologique des protéines intracellulaires, plus ou moins rapide en fonction de leur demi-vie. Ces protéines nécessitent une régulation et/ou un renouvellement constant dont un des mécanismes consiste en la dégradation de la protéine en peptides par le protéasome après marquage par l'ubiquitine. Les peptides sont alors libres dans le cytosol et peuvent être captés par TAP (TAP, Transporter associated with Antigen Processing), une protéine de transport de la membrane du réticulum endoplasmique rugueux et qui prend en charge de façon active les peptides de 8 à 16 acides aminés pour les relocaliser à l'intérieur du réticulum. L'enzyme ERAP (ERAP, Endoplasmic Reticulum Amino-Peptidase) complète la dégradation en plus petits peptides, classiquement 9 acides aminés. L'assemblage de la chaine α avec la β2-microglobuline de la molécule HLA de classe I se fait en parallèle, et l'ensemble est stabilisé par l'enchâssement du peptide avant translocation à la membrane cellulaire.

Les molécules HLA de classe II sont présentes à l'état basal à la surface des cellules présentatrices de l'antigène professionnelles et à l'état activé sur d'autres cellules, comme les cellules épithéliales ou endothéliales. Elles présentent des peptides qui proviennent de la dégradation de protéines issues du micro-environnement. Brièvement, les cellules présentatrices de l'antigène professionnelles sont capables d'internaliser efficacement du contenu extra-cellulaire, par phagocytose ou par endocytose. Les vésicules endocytaires transitent de compartiment en compartiment tout en acidifiant leur pH ce qui active les enzymes protéolytiques. La protéolyse est souvent moins efficace que celle complétée par ERAP et les peptides restent plus longs. Les cellules présentatrices de l'antigène professionnelles possèdent des endosomes particuliers où se rencontrent les molécules HLA de classe II en provenance du réticulum endoplasmique et les peptides ainsi générés. La chaine invariante Ii, et plus particulièrement le peptide CLIP (CLIP, CLass II-associated Invariant Peptide), « occupent » le sillon peptidique jusqu'à ce que HLA-DM catalyse l'échange de CLIP avec les peptides antigéniques.

L'enchâssement d'un peptide dans une molécule HLA de classe I ou de classe II dépend *in fine* des propriétés physico-chimiques du peptide et de celles du sillon de la molécule HLA. Le set de peptides pouvant s'enchâsser dans une molécule HLA est décrit comme son immunopeptidome. L'immunopeptidome de classe I est hautement spécifique de chaque cellule nucléée ou plaquette. Il reflète le fonctionnement cellulaire aux lymphocytes T CD8+. En cas de programme cellulaire dégénéré – infection virale ou cancer par exemple – les lymphocytes T CD8+ vont s'activer et être responsables de la lyse de la cellule anormale, ce qui contribue au maintien de l'homéostasie de l'organisme.

L'immunopeptidome de classe II est lui plus spécifique de l'environnement cellulaire. La cellule exprimant cet immunopeptidome – souvent une cellule présentatrice de l'antigène professionnelle – est saine et n'est que le médiateur d'une information sur le milieu extérieur. Les lymphocytes T CD4+ vont dans ce cas préserver la cellule mais co-activer les lymphocytes B sécréteurs d'antigènes pouvant cibler les éléments anormaux extracellulaires (190).

2. L'identification des antigènes mineurs d'histocompatibilité et l'outil AlloPipe

Les peptides appartenant exclusivement à l'immunopeptidome du donneur sont les mHAgs d'intérêt au décours de la transplantation d'organe, tandis que ceux appartenant exclusivement à l'immunopeptidome du receveur sont d'intérêt dans l'allo-HCT **(figure 9).**
Les approches utilisées pour les caractériser ont évolué avec les technologies disponibles et les connaissances sur l'immunologie de la transplantation. Les premières identifications ont été réalisées par *reverse immunology* c'est-à-dire en identifiant les caractéristiques des clones lymphocytaires alloréactifs : élution des peptides enchâssés dans la molécule HLA, étude indirecte du transcriptome par le séquençage de l'ADN complémentaire. Plus tard, les mHAgs ont été décrits comme résultant (i) d'un polymorphisme génétique se traduisant par (ii) une différence d'acide aminé dans une protéine exprimée (iii) dont un des peptides issus de la dégradation possède une affinité suffisante pour le sillon d'une des molécules HLA en présence pour s'y enchâsser (191).

Dès lors, l'étude des différences génétiques dans le couple donneur/receveur est devenue la stratégie privilégiée pour l'étude des mHAgs. Deux méthodes existent : d'une part le génotypage – notamment à grande échelle via les puces de génotypage –, d'autre part le séquençage direct de très larges panels de gènes voire de l'exome. La première méthode a l'avantage d'être moins couteuse mais elle ne permet l'étude que de polymorphismes déjà décrits, dont nombre n'affectent pas les régions exoniques, excluant aussi les variants *de novo* ou rares – même si des procédés d'imputation bio-informatiques peuvent compenser une partie des variants qui ne sont pas détectés physiquement par la puce. Le séquençage de l'exome est plus onéreux mais bien plus exhaustif, permettant le catalogue des variants rares affectant toutes les protéines humaines. L'exome permet l'étude des polymorphismes donneur/receveur et variants rares sans *a priori.*

Le modèle le plus élégant décrit dans l'allo-HCT est sans doute celui publié récemment par Cieri *et al.* (192). A partir de données d'exome, les SNVs (SNV, Single Nucleotide Variation) responsables d'une variation d'acide aminé présente chez le receveur mais absente chez le donneur sont colligés. A ces SNVs sont appliqués de nombreux filtres d'expression tissulaire – déterminés à partir de plus de 350.000 données de single cell et plus de 15.000 échantillons GTEx (GTEx, Genotype-Tissue Expression Program), ainsi que de l'étude même du transcriptome du donneur et du receveur –, de contrôle statistique de la redondance des k-mers puis d'affinité pour les molécules HLA. La charge en mHAgs ainsi identifiée est associée à la survenue de GVHD aiguë et de GVHD pulmonaire chronique. Ce pipeline est cependant inadapté à la pratique clinique en raison des ressources qu'il demande. N'étant pas open source, une validation à plus large échelle ou sur d'autres cohortes est limitée.

Sur le même raisonnement mais dans une approche plus pratique, nous proposons l'outil AlloPipe et le web server allogenomics.com détaillés dans l'article suivant. Le « Allogenomic Mismatch Score » (AMS) a été développé par le Pr Mesnard pour la transplantation rénale (193). Dans la continuité de ces travaux, nous proposons une nouvelle version de l'outil intégrant de nouvelles fonctionnalités permettant: (i) de choisir la directionnalité pertinente pour le type de transplantation considéré (organe solide ou allo-HCT), (ii) d'utiliser un mode d'imputation pour les données génomiques manquantes, (iii) de soumettre les données au format de génotypage .VCF afin de traiter les scores en tant que cohorte, (iv) de restreindre le score à des régions génomiques, des variants réannotés par VEP (VEP, variant effect predictor), des gènes ou des transcrits d'intérêt particulier, (v) de reconstruire les peptides autour des variants d'intérêt, et finalement (vi) d'y associer l'affinité prédite par NetMHCpan (194) et

NetMHCIIpan (195) pour les molécules HLA du couple donneur/receveur afin d'aider à la prédiction des meilleurs mHAgs candidats. Le temps de calcul a été considérablement réduit depuis la dernière version et l'outil est open source, disponible en interface de commande sur GitHub. A noter que la prédiction de l'affinité n'est pas disponible sur l'interface web en raison des restrictions d'exploitation de NetMHCpan. Néanmoins NetMHCpan et NetMHCIIpan possèdent leur propre interface et la liste des peptides fournie par notre site peut y être traitée telle quelle.

A notre connaissance, AlloPipe est le seul outil open source à fournir (i) la liste des incompatibilités donneur/receveur à l'échelle de l'exome, (ii) la liste des peptides qui y sont relatifs et qui représentent les candidats mHAgs et (iii) leur affinité envers les molécules HLA, et ce en quelques minutes et avec un faible effort de calcul, c'est-à-dire dans un délai et un cadre matériel compatibles avec l'allocation des greffons et le choix des donneurs en pratique clinique.

2. ARTICLE

[en préparation pour re-soumission à « HLA – immune response » après rejet « Nuclear Acid Research » le 17/02/2025]

ALLOPIPE AND ITS WEB SERVER ALLOGENOMICS: FROM GENOMIC DATA TO MINOR HISTOCOMPATIBILITY ANTIGENS CANDIDATES

RUNNING TITLE:

Allogenomics for whole minor histocompatibility antigens candidates determination

AUTHORS

Adèle Dhuyser[1,2], Pierre Delaugère[3,4], Pierre Laville[5,6], Robert Clerc[3], Alice Aarnink[1,2], Laurent Mesnard[5,7*] and Hugues Richard[3,8*†]

[1] HLA and Histocompatibility Laboratory, CHRU de Nancy, 54500, Vandoeuvre-les-Nancy, France
[2] IMoPA, UMR7365 CNRS, Université de Lorraine, 54500, Vandoeuvre-les-Nancy, France
[3] Laboratory of Computational and Quantitative Biology (LCQB), UMR 7238 CNRS, Sorbonne Université, 75005, Paris, France
[4] Sorbonne Université Maison des Modélisations Ingénieries et Technologies (SUMMIT), Sorbonne Université, 75005, Paris, France
[5] CoRaKiD 1, INSERM UMR1155, Sorbonne Université, 75005, Paris, France.
[6] Eurofins-Biomnis, Lyon, France
[7] Soins Intensifs Néphrologiques et Rein Aigu (SINRA), Hôpital Tenon, Assistance Publique des Hôpitaux de Paris, 75020, Paris, France.
[8] Bioinformatics Units – Genome Competence Center (MF1), Robert Koch Institut, 13353, Berlin, Germany

* Joint Authors
† Corresponding author: RichardH@rki.de

AUTHORS' CONTRIBUTION

A.D. Conceptualization, Methodology, Validation, Formal analysis, Investigation, Data Curation, Writing - Original Draft. **P.D.** Validation, Formal analysis, Software, Data Curation, Writing - Review & Editing. **P.L.** Software. **R.C.** Software. **A.A.** Conceptualization, Methodology, Resources, Writing - Review & Editing, Funding acquisition. **L.M.** Conceptualization, Methodology, Resources, Writing - Review & Editing, Funding acquisition. **H.R.** Methodology, Software, Formal analysis, Writing - Review & Editing, Supervision, Project administration

KEYWORDS

Genomics, minor histocompatibility antigens, bioinformatic tool, web interface, transplantation

ABSTRACT

While transplantation outcomes are closely linked to HLA compatibility, minor histocompatibility antigens (mHAgs) — peptides embedded in HLA molecules bearing amino acid differences within the donor/recipient pair — also contribute to T-cell alloreactivity, especially in HLA-matched pairs. As mHAgs initially arise from non-synonymous genomic polymorphisms, we and others focused on genomic data to approximate mHAgs load. However, most teams based their strategies on genotyping data which only allow the study of polymorphisms that are already known and well described at the population level. We present AlloPipe, a bioinformatics tool designed to facilitate unbiased identification of mHAgs candidates from whole exome sequencing (WES) data. AlloPipe operates in two sequential steps: Allo-Count, which identifies directional amino acid mismatches, and Allo-Affinity, which reconstructs peptides around those mismatches returning the affinity of the latter towards HLA molecules thanks to NetMHCpan. With its ability to process large datasets rapidly in a clinically relevant timeframe, AlloPipe offers significant potential for improving donor selection, optimizing immunosuppressive therapy, and guiding post-transplant care. This open-source tool is available for use by clinicians and researchers via a web interface, making mHAgs prediction more accessible and actionable in clinical practice.

MAIN TEXT

INTRODUCTION

Alloreactivity and transplantation

Alloreactivity refers to the activation of specific immunity following an immunizing event – pregnancy, transfusion, transplantation. The activation of T lymphocytes during direct and indirect recognition processes is the cornerstone of the initiation of alloreactivity. It requires the recognition of an [HLA-peptide] complex that is eventually different from the self. The HLA molecule and/or its embedded peptide carrying this difference (1).

In solid organ transplantation (SOT), recipient's T lymphocytes – after having undergone negative and positive selection upon contact with [$HLA_{recipient}$-$peptide_{recipient}$] complexes – may first encounter the donor's dendritic cells from the graft and present [HLA_{donor}-$peptide_{donor/recipient}$] complexes in the context of direct alloreactivity. Then, as the graft dendritic cells are depleted and the recipient dendritic cells re-colonize the graft, the recipient T cells will encounter the [$HLA_{recipient}$- $peptide_{donor\ /recipient}$] complexes as part of indirect alloreactivity.

During an allogeneic stem cell transplantation (allo-HCT), if complete lymphodepletion in the recipient has occurred, the mechanism is reversed. The donor's T cells – having been negatively and positively selected upon contact with the [HLA_{donor}-$peptide_{donor}$] complexes – may first encounter the recipient's dendritic cells, which have [$HLA_{recipient}$-$peptide_{donor/recipient}$] complexes as part of direct alloreactivity.

Then, as the recipient's dendritic cells are depleted and replaced by the donor's dendritic cells, the donor T cells will encounter the [HLA_{donor}- $peptide_{donor/recipient}$] complexes as part of indirect alloreactivity.

Although alloreactivity itself is a physiological reaction, it is responsible for the adverse effects of allograft: graft rejection after SOT and the graft-versus-host (GVH) effect after allo-HCT. In this configuration, alloreactivity is also responsible for the beneficial GVL effect, a therapeutic principle that guides the use of the procedure in malignant indications, i.e. 80% of indications (2).The objective is to maintain the GVL effect on leukemic cells while protecting other cells from the GVH effect

HLA and donor choice

Given (i) the massive polymorphism of HLA molecules and (ii) the strength of the association between the number of HLA incompatibilities and the risk of rejection after SOT and GVH after allo-HCT, donor/recipient HLA-compatibility is crucial despite being approached differently. In SOT, the focus is on the absence of preformed donor specific antibodies (DSA) by the recipient against the HLA molecules of the donor, whereas in allo-HCT HLA compatibility is sought, ideally on the classical HLA molecules HLA-A, -B, -C, -DRB1, -DQB1 and -DPB1.

Nevertheless, transplants from intra-familial HLA-identical donors - which are assumed to have the same entire HLA regions - can still lead to graft rejection (3) or sometimes even severe GVHD (4). This indicate that other compatibility systems are involved in these alloreactivity processes. The KIR system and the MIC-A/MIC-B polymorphism have been particularly studied to support additional NK cells role in the alloreactivity (5,6). However, sticking to the lymphocyte T/B alloreactivity differences in HLA-embedded peptides can explain lymphocyte activation given that donor/recipient HLA molecules are indeed identical.

Minor histocompatibility antigens (mHAgs)

A minor histocompatibility antigen is defined as (i) a genetic polymorphism between donor and recipient, (ii) responsible for an amino acid variation in an expressed protein, and (iii) capable of being embedded into the HLA molecule groove (7). As there are ubiquitously expressed proteins and others whose expression is restricted to certain tissues, mHAgs are either ubiquitous or organ specific, therefore called tissue-related antigens (TRA) (8).

mHgs can be embedded in HLA class I molecules when they derive from the degradation of intra-cytoplasmic proteins; they are then presented to the TCRs of CD8+ T lymphocytes, whose activation is responsible for cytotoxicity. mHAgs can be alternatively embedded in HLA class II molecules, when they emerge from the microenvironment. In that case they are presented to the TCRs of CD4+ T lymphocytes, whose activation participates in alloreactivity (i) by synthesising cytokines that modulate the alloreactivity of CD8+ T lymphocytes, (ii) by participating in the activation of B lymphocytes, and (iii) by exerting cytotoxicity via the FAS/FASL system (9). Both class I and class II restricted mHAgs therefore contribute to alloreactivity. However, as HLA class II molecules are only expressed on a small subset of immune cells – antigen presenting cells such as dendritic cells, monocytes and B lymphocytes – class II mHAgs appear more relevant for humoral alloreactivity, in contrast with class I mHAgs trigerring cellular alloreactivity.

Thus, after SOT, the amount of mHAgs specifically expressed in the transplanted organ should allow accurate measurement of organ-specific alloreactivity and correlate with graft rejection. In allo-HCT, mHAgs restricted to haematopoietic tissues hold the promise of a GVL effect without a GVH effect. In a malignant context, it would be legitimate to question the relevance of mHAgs compared to tumour-specific antigens (TAAs), but it is accepted that mHAgs and eventually not TAAs mediate the GVL effect following allo-HCT (10).

Interestingly, non-permissive HLA mismatches – associated with excessive T cell alloreactivity compared to their low-risk or permissive counterparts – are dependent on the degree of immunopeptidome overlaps between the mismatched HLA alleles, reinforcing the role of mHAgs in transplantation (11,12).

Identification of mHAgs

Historically, mHAgs have been identified from alloreactive lymphocyte clones after transplantation, either by elution of peptides embedded in HLA molecules prior to identification by mass spectrometry (13) or by transcriptome screening (14). Once the constitutional genetic origin of mHAgs was understood, studies of large pedigrees allowed linkage association (GLA) (15). Genome wide association studies (GWAS) (16), also allowed the identification of some mHAgs. By studying 14,000 SNPs across the genome (DNA micro-array), Armistead *et al.* provided proof of concept that genomic and bioinformatic methods can predict and confirm mHAgs (17).

Since then, studies have reported extensively on the benefits of genotyping using DNA microarrays covering more and more SNPs. Martin *et al.* assessed a *"genome-wide mismatch"* of over 19,000 SNP within donor/recipient pairs for allo-HCT (18), while Reindl-Schwaighofer *et al.* processed nearly 60,000 SNP within kidney transplant pairs (19). In both cases, the number of SNP mismatches within the pair correlated with the adverse effects of alloreactivity, i.e. GVHD and graft rejection, respectively. However, DNA microarrays only allow the study of polymorphisms that are already known and well described, which might be responsible for a signal distortion.

Therefore, we and others performed whole exome sequencing (WES) as unbiased approaches for SNP enumeration within a donor/recipient pair. Mesnard *et al.* reported the correlation between nsSNP directional mismatches and chronic graft rejection after kidney transplantation (20). More recently, Cieri *et al.* nicely reported the impact of mHAgs identified from WES but integrating organ-specific transcriptomes single-cell resourced and proteome expression (21)

The tool presented here makes best use of data and resources readily available in medical routine. AlloPipe is divided into two sequential parts, Allo-Count and Allo-Affinity. After a first step of stringent data cleaning to ensure sufficient control over the called genotypes, Allo-Count immediately returns the directional amino acid mismatches extracted from D/R exome-to-exome comparison. Allo-Affinity then returns the mHAgs based on NetMHCpan predictions for a given HLA typing (22,23) within a few hours. At each stage of the pipeline, AlloPipe provides both quantitative and qualitative insight into the compatibility profile between the Donor and Recipient.

MATERIAL AND METHODS

The AlloPipe tool

AlloPipe is a bioinformatics tool designed to evaluate candidate mHAgs from two whole exome sequenced samples. Nevertheless, gene panels can also serve as an input. AlloPipe is divided into two sequential steps and module, Allo-Count and Allo-Affinity, which provide insight into the directional amino acid mismatches and then the candidate mHAgs expected from the pair of samples, respectively (Figure 1). **(Figure 1, upper panel).**

AlloPipe takes as input two genotype files saved in .VCF format. The files must also contain information about the expected amino acid changes at positions with non-synonymous polymorphisms (nsSNP). Such a file can be generated using the Variant Effect Predictor (VEP) tool, either on the command line or via the web interface (24). By default, Allo-Count expects amino acid changes to be provided in the VEP format.

AlloCount first performs a stringent data cleaning step, the parameters of which can be defined by the user **(Appendix 1).** The extraction of information on the retained variant allows for a directional comparison of the samples **(Figure 2).** Finally, Allo-Count returns the Allogenomic Mismatch Score (AMS), which is a discrete quantitative variable that measures the directional amino acid mismatches together with the AMS table that contains the information related to these differences in a tabular format (CSV).

Allo-Affinity module takes the AMS table as input. Peptides of required length are reconstructed around each previously detected amino acid change using a 'sliding. The affinity of these peptides towards the HLA molecules present in the pair is obtained thanks to NetMHCpan-4.1 (22) for the HLA class I molecules, and NetMHCIIpan-4.3 (23) for the HLA class II molecules. Finally, Allo-Affinity returns the af-AMS table containing the reconstructed peptides and related information implemented with affinity scores in a tabular format (CSV).

AlloPipe therefore produces four main outputs for each donor/recipient pair consisting of two scores (AMS, and af-AMS) together with their corresponding tables (**Figure 1, bottom panel**, and **Appendices 2** and **3** for more details about the tables).

The allogenomics web server

The allogenomics.com webserver performs exactly the same steps described above within a user-friendly web interface, despite omitting the affinity prediction due to proprietary rights. The final output is a peptide list, which can be directly processed by one of the online affinity prediction tools, allowing more flexibility in the choice of the affinity predictor.

The web server offers additional functionalities such as: (i) restriction to genomic regions of interest by specifying a bedfile; (ii) restriction to rsIDs list – i.e. to retrieve the described mHAgs; and (iii) restriction to transcript IDs – i.e. to focus on tissue-restricted mHAgs. Finally, the distribution of AMS calculated for related and unrelated pair is available as a mean of comparison for users' samples.

Available data and exome sequencing

To evaluate our tool, we performed the whole exome sequencing in three different cohorts of BMT patients. One of 48 related HLA-matched pairs (Cohort 1), then 23 additional related HLA-matched pairs (Cohort 2) and 40 additional related semi-HLA-matched pairs (Cohort 3). For cohorts 1 and 2, exons were captured using the Human Twist Exome Refseq 40 Mb (Twist Biosciences, San Francisco, CA) followed by 150-bp paired-end sequencing performed on Ilumina NovaSeq 6000 instrument (Illumina Inc, San Diego, CA). For cohort 3, exons were captured using the Human Twist Comprehensive Exome 42.2Mb (Twist Biosciences, San Francisco, CA) followed by 100-bp paired-end sequencing performed on Illumina NextSeq 2000 instrument (Illumina Inc, San Diego, CA). In cohort 2, we also added one patient from the two previous cohorts to assess inter-platform variability (with Cohort 3) and batch effect or the impact of a potential change in sequencing practice over time (with Cohort 1). Details of the secondary analyses are to find in **Supplementary data 1 and 2**.

AMS generation

AMS were first calculated for the 111 pairs using the tool's default quality parameters (see **Appendix 1**), then the gnomADe threshold was set to 0% to assess the contribution of rare variants. We calculated the AMS for a fourth artificial cohort in which we simulated unrelated pairs by shuffling the previously described donor/recipient pairs.

Statistics

Normality of the AMS distribution was assessed using the Shapiro-Wilk test with a significance threshold set at $\alpha = 0.05$. When the data followed a normal distribution, a one-way analysis of variance (ANOVA) was performed to compare the means across the groups. Alternatively, the Kruskal-Wallis test was employed when the distributions did not meet the assumption of normality.

RESULTS

Description of cohorts

The parameters of interest are limited to degrees of parenthood and the sex mismatch of the BMT pairs. While related HLA-matched individuals can only be siblings, different degrees of relatedness can be found in haploidentical cohorts. In most cases, haploidentical donors are the recipient's children or siblings (42.5% and 50% respectively), while other pairings – parent or cousins for example – rarely occurs. The proportion of sex mismatch, which has been described as unfavorable (female-to-male) for chronic graft-versus-host disease (cGVHD) represented a minority of patient (15.3%), especially in the haploidentical population, reflecting current donor selection recommendations.

Variant features annotated by variant effect predictor (VEP)

VEP annotation allows to characterize the nature of the variants observed in our cohorts. First, SNPs are the most frequently detected type of variation: 94.1%, and 90.1% and 93.4% in cohorts 1, 2 and 3, respectively. Secondly, the majority of variants are constantly divided into missense and synonymous variants across the three cohorts. Thirdly, there is a significant proportion of novel variants in each cohort: 3.8%, 10.9% and 6.4% respectively.

Taken together, these figures demonstrate that – in our cohorts – (i) a tool that would efficiently process SNPs would capture 90% of the exome variation and (ii) a proportion of rare variants which can reach 10% of the total variants which could contribute to significant proportion of the AMS within a D/R pair.

AMS distribution

The mean value of the AMS is 2577 in Cohort 1 and 2587 in Cohort 2 – both geno-identical – with no significant difference (**Figure 3**). The mean value of AMS in Cohort 3 – haplo-identical – is higher but includes three outliers' values corresponding to the two pairs of cousins and one child-to-parent pair. After the exclusion of the aforementioned outlier pairs, a comparable distribution was observed between the geno-identical and the haplo-identical pairs (**Supplementary figure 1**). As expected, the AMS values are significantly higher in the shuffled pairs simulating the unrelated couples compared to the related pairs – mean values 4834 and 2723, respectively. (**Figure 4**). Moreover, rare variations (AF less than 0.01) represented a proportion of the AMS estimated in average at 8% of the score. (**Figure 5**).

Tool validation

To evaluate the performance of AlloPipe, we aimed to retrieve some of the mHAgs described in the literature from our output. Based on the list provided by Oostvogels and al (ref), we listed the rsID corresponding to 46 mHAgs and screened them in Cohort 1 (**Figure 6**). We were able to find at least one pair exhibiting each mHAgs, except for the following: rs9945924, rs3745526, rs4703, rs187416296, rs61552325, rs2298668. As rs9945924 and rs3745526 are non-coding variants, and rs4703 is a synonymous variant, our tool does not aim to catch those signals. rs187416296 is a rare missense variant (AF=0.0006) making its observation in our cohort unlikely. Finally, rs61552325 and rs2298668 are not even present in gnomAD.

Accessibility and calculation time

AlloPipe is open source and can be downloaded from our GitHub (https://github.com/huguesrichard/Allopipe). The tool is available as a command line interface but also accessible from a user-friendly web server (https://allogenomics.com/) with the same functionalities except the affinity prediction – due to usage restrictions associated with NetMHCpan and NetMHCIIpan licences. However, the latter provides their own web server with which the outputs of allogenomics.com are directly compatible.

In this new version of the AlloPipe tool, the calculation time has been optimized to generate a score for a pair of VEP-annotated exomes in less than half a minute.

DISCUSSION

T-cell allorecognition is a cornerstone of post-transplant alloreactivity. Even in fully HLA-matched donor/recipient pair, acute or chronic rejection can occur after solid organ transplantation (SOT). Similarly, during geno-identical hematopoietic cell transplantation (allo-HCT) graft-versus-host-disease (GVHD) can occur. We and others have previously validated the interest of minor histocompatibility antigens (mHAgs) - peptides derived from any expressed proteins secondary embedded in HLA molecules that appear different between donor and recipient - to gain insight into non-HLA compatibility landscape.

While some mHAgs are widely distributed, every genomic non-synonymous polymorphism can potentially lead to a relevant mHAgs. The frequence of polymorphism accounting for the load of mHAg is not indicative of its dangerousness and should be scrutinized in regard of the donor/recipient compatibility. Therefore, exhaustive mHAgs inference for a particular donor/recipient pair ideally requires (i) robust exome data, (ii) unambiguous HLA typing at the allelic level, and (iii) powerful and robust bioinformatic tools to combine these data. The two first points have been successfully addressed during the past years, in some medical laboratories. Other teams have successfully addressed the third point and the complexity of mHAgs prediction from genomic data (21). However, they do not provide any open-source tool that allow practical implementation and associated resource datasets are currently not available.

We previously demonstrated the efficiency of the Allogenomic Mismatch Score (AMS) as a conceptual approach for mHAgs description that correlates with long-term graft function after kidney transplantation. Unlike most studies done in the field, our genomic mismatches are assessed from whole exome sequencing (WES) data and not from DNA microarray genotyping, allowing a more exhaustive detection of polymorphisms or rare variants in coding regions (20) accounting for up to 10% of the score.

We have further developed the tool by adding new functionalities, so the user can: (i) address directionality from solid organ transplantation to hematopoietic stem cell transplantation, (ii) use an imputation mode for missing genomic data, (iii) input data as a joint .VCF file containing multiple donor/recipient pairs allowing the scores to be processed as a cohort, (iv) easily restrict the score to genomic regions, variants, genes or transcripts of particular interest, (v) reconstruct peptides of any length, and (vi) retrieve the affinity of the latter peptides towards the HLA groove thanks to validated algorithms that is NethMHCpan to sort the best mHAgs candidate by affinity. Calculation time has been dramatically decreased since the last version and AMS is available is less than a minute.

The tool and the aforementioned functionalities are available as a web server interface – excepted in this case of allo affinity calculation given ownership rights, as NetMHCpan already has its own web interface. However, the peptides list retrieved from our website can be processed "as is" by any affinity prediction tool.

To the best of our knowledge, AlloPipe is the first tool to provide robust and reliable calculation of (i) amino acid mismatches of interest, (ii) related peptides that are mHAgs candidates and (iii) their affinity towards HLA molecules within a few minutes and minimal computational effort, i.e. in a timeframe and material setting compatible with graft allocation. The webserver allogenomics.com aims to make mHAgs imputation accessible to clinicians without bioinformatics background at the time of graft

allocation to provide insights into donor selection, adjustment of immunosuppressive therapies and post-transplant follow-up. AlloPipe is filling the technological gap of assessing the mHAgs within a donor/recipient pair from their genomic data. The dramatic improvement of high throughput sequencing (25) technologies, together with better accessibility of the platforms, timing and costs will encourage its use.

We are open source and the AlloPipe code is available on GitHub: https://github.com/huguesrichard/Allopipe

ACKNOWLEDGMENT

The authors thank: Yann Merlet (Twist Bioscience), Sandra Clément, Julie Menet and Justine Cottet (CHRU Nancy) for their expertise in molecular biology; Xavier Vanhoye and Laure Raymond (Biomnis) for bioinformatic and data management support; the sequencing platforms Genomax (Strasbourg) and ICM (Paris) ; Bérenger Piedagnel for the web site development

REFERENCES

1. Marino J, Paster J, Benichou G. Allorecognition by T Lymphocytes and Allograft Rejection. *Front Immunol* (2016) 7:582. doi: 10.3389/fimmu.2016.00582

2. Passweg JR, Baldomero H, Atlija M, Kleovoulou I, Witaszek A, Alexander T, Angelucci E, Averbuch D, Bazarbachi A, Ciceri F, et al. The 2023 EBMT report on hematopoietic cell transplantation and cellular therapies. Increased use of allogeneic HCT for myeloid malignancies and of CAR-T at the expense of autologous HCT. *Bone Marrow Transplant* (2025) doi: 10.1038/s41409-025-02524-2

3. Bentata Y, ElKabbaj D, Bahadi A, Rhou H, Laouad I, Sqalli T, Bouattar T, Ouzeddoun N, Bayahia R, Ramdani B. HLA-identical living related kidney transplantation: Outcomes of a national multicenter study. *Int J Urol Off J Jpn Urol Assoc* (2022) 29:519–524. doi: 10.1111/iju.14827

4. Morishima Y, Kashiwase K, Matsuo K, Azuma F, Morishima S, Onizuka M, Yabe T, Murata M, Doki N, Eto T, et al. Biological significance of HLA locus matching in unrelated donor bone marrow transplantation. *Blood* (2015) 125:1189–1197. doi: 10.1182/blood-2014-10-604785

5. Ruggeri L, Capanni M, Urbani E, Perruccio K, Shlomchik WD, 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. doi: 10.1126/science.1068440

6. Neuchel C, Fürst D, Tsamadou C, Schrezenmeier H, Mytilineos J. Extended loci histocompatibility matching in HSCT—Going beyond classical HLA. *Int J Immunogenet* (2021) 48:299–316. doi: 10.1111/iji.12545

7. Oostvogels R, Lokhorst HM, Mutis T. Minor histocompatibility Ags: identification strategies, clinical results and translational perspectives. *Bone Marrow Transplant* (2016) 51:163–171. doi: 10.1038/bmt.2015.256

8. de Bueger M, Bakker A, Van Rood JJ, Van der Woude F, Goulmy E. Tissue distribution of human minor histocompatibility antigens. Ubiquitous versus restricted tissue distribution indicates heterogeneity among human cytotoxic T lymphocyte-defined non-MHC antigens. *J Immunol Baltim Md 1950* (1992) 149:1788–1794.

9. Blazar BR, Hill GR, Murphy WJ. Dissecting the biology of allogeneic HSCT to enhance the GvT effect whilst minimizing GvHD. *Nat Rev Clin Oncol* (2020) 17:475–492. doi: 10.1038/s41571-020-0356-4

10. Vincent K, Roy D-C, Perreault C. Next-generation leukemia immunotherapy. *Blood* (2011) 118:2951–2959. doi: 10.1182/blood-2011-04-350868

11. Crivello P, Zito L, Sizzano F, Zino E, Maiers M, Mulder A, Toffalori C, Naldini L, Ciceri F, Vago L, et al. The impact of amino acid variability on alloreactivity defines a functional distance predictive of permissive HLA-DPB1 mismatches in hematopoietic stem cell transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant J Am Soc Blood Marrow Transplant* (2015) 21:233–241. doi: 10.1016/j.bbmt.2014.10.017

12. Fleischhauer K, Shaw BE, Gooley T, Malkki M, Bardy P, Bignon J-D, Dubois V, Horowitz MM, Madrigal JA, Morishima Y, et al. Effect of T-cell-epitope matching at HLA-DPB1 in recipients of unrelated-donor haemopoietic-cell transplantation: a retrospective study. *Lancet Oncol* (2012) 13:366–374. doi: 10.1016/S1470-2045(12)70004-9

13. van Bergen CAM, Kester MGD, Jedema I, Heemskerk MHM, van Luxemburg-Heijs SAP, Kloosterboer FM, Marijt WAE, de Ru AH, Schaafsma MR, Willemze R, et al. Multiple myeloma-

reactive T cells recognize an activation-induced minor histocompatibility antigen encoded by the ATP-dependent interferon-responsive (ADIR) gene. *Blood* (2007) 109:4089–4096. doi: 10.1182/blood-2006-08-043935

14. Slager EH, Honders MW, van der Meijden ED, van Luxemburg-Heijs SAP, Kloosterboer FM, Kester MGD, Jedema I, Marijt WAE, Schaafsma MR, Willemze R, et al. Identification of the angiogenic endothelial-cell growth factor-1/thymidine phosphorylase as a potential target for immunotherapy of cancer. *Blood* (2006) 107:4954–4960. doi: 10.1182/blood-2005-09-3883

15. Warren EH, Otterud BE, Linterman RW, Brickner AG, Engelhard VH, Leppert MF, Martin PJ, Riddell SR. Feasibility of using genetic linkage analysis to identify the genes encoding T cell-defined minor histocompatibility antigens. *Tissue Antigens* (2002) 59:293–303. doi: 10.1034/j.1399-0039.2002.590407.x

16. Spaapen RM, Lokhorst HM, van den Oudenalder K, Otterud BE, Dolstra H, Leppert MF, Minnema MC, Bloem AC, Mutis T. Toward targeting B cell cancers with CD4+ CTLs: identification of a CD19-encoded minor histocompatibility antigen using a novel genome-wide analysis. *J Exp Med* (2008) 205:2863–2872. doi: 10.1084/jem.20080713

17. Armistead PM, Liang S, Li H, Lu S, Van Bergen CAM, Alatrash G, St John L, Hunsucker SA, Sarantopoulos S, Falkenburg JHF, et al. Common minor histocompatibility antigen discovery based upon patient clinical outcomes and genomic data. *PloS One* (2011) 6:e23217. doi: 10.1371/journal.pone.0023217

18. Martin PJ, Levine DM, Storer BE, Warren EH, Zheng X, Nelson SC, Smith AG, Mortensen BK, Hansen JA. Genome-wide minor histocompatibility matching as related to the risk of graft-versus-host disease. *Blood* (2017) 129:791–798. doi: 10.1182/blood-2016-09-737700

19. Reindl-Schwaighofer R, Heinzel A, Kainz A, Setten J van, Jelencsics K, Hu K, Loza B-L, Kammer M, Heinze G, Hruba P, et al. Contribution of non-HLA incompatibility between donor and recipient to kidney allograft survival: genome-wide analysis in a prospective cohort. *The Lancet* (2019) 393:910–917. doi: 10.1016/S0140-6736(18)32473-5

20. Mesnard L, Muthukumar T, Burbach M, Li C, Shang H, Dadhania D, Lee JR, Sharma VK, Xiang J, Suberbielle C, et al. Exome Sequencing and Prediction of Long-Term Kidney Allograft Function. *PLoS Comput Biol* (2016) 12:e1005088. doi: 10.1371/journal.pcbi.1005088

21. Cieri N, Hookeri N, Stromhaug K, Li L, Keating J, Díaz-Fernández P, Gómez-García de Soria V, Stevens J, Kfuri-Rubens R, Shao Y, et al. Systematic identification of minor histocompatibility antigens predicts outcomes of allogeneic hematopoietic cell transplantation. *Nat Biotechnol* (2024) doi: 10.1038/s41587-024-02348-3

22. Reynisson B, Alvarez B, Paul S, Peters B, Nielsen M. NetMHCpan-4.1 and NetMHCIIpan-4.0: improved predictions of MHC antigen presentation by concurrent motif deconvolution and integration of MS MHC eluted ligand data. *Nucleic Acids Res* (2020) 48:W449–W454. doi: 10.1093/nar/gkaa379

23. Nilsson JB, Kaabinejadian S, Yari H, Kester MGD, van Balen P, Hildebrand WH, Nielsen M. Accurate prediction of HLA class II antigen presentation across all loci using tailored data acquisition and refined machine learning. *Sci Adv* (2023) 9:eadj6367. doi: 10.1126/sciadv.adj6367

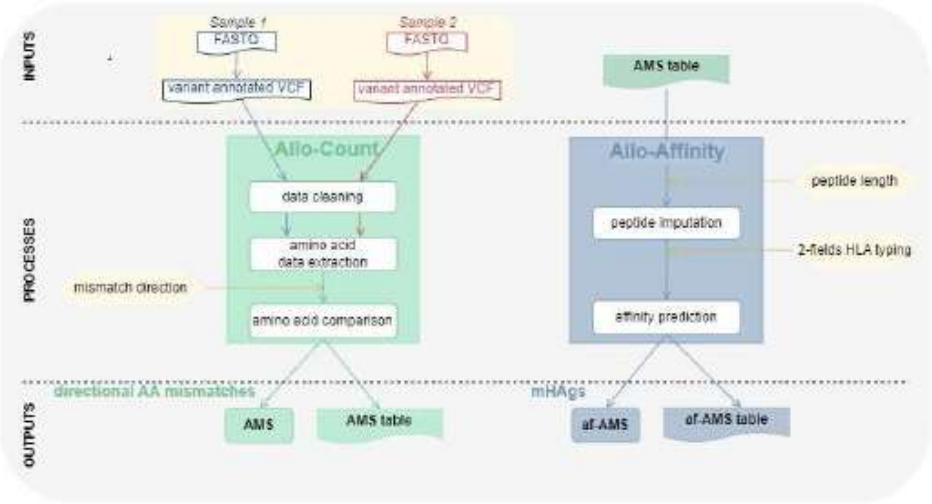
24. Dyer SC, Austine-Orimoloye O, Azov AG, Barba M, Barnes I, Barrera-Enriquez VP, Becker A, Bennett R, Beracochea M, Berry A, et al. Ensembl 2025. *Nucleic Acids Res* (2025) 53:D948–D957. doi: 10.1093/nar/gkae1071

25. Gorzynski JE, Goenka SD, Shafin K, Jensen TD, Fisk DG, Grove ME, Spiteri E, Pesout T, Monlong J, Baid G, et al. Ultrarapid Nanopore Genome Sequencing in a Critical Care Setting. *N Engl J Med* (2022) 386:700–702. doi: 10.1056/NEJMc2112090

FIGURES

Figure 1

Title: Global overview of the AlloPipe tool.



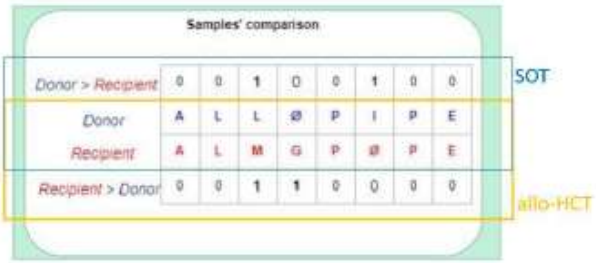
SUMMARY

	ALLO-COUNT	ALLO-AFFINITY
Primary input	Two variant annotated samples	AMS table
Requested information	Mismatch direction	Peptide length 2-fields HLA typing
Output	directional AA mismatch	mHAgs candidates
Quantitative	Allogenomic Mismatch Score (AMS)	Affinity AMS (af-AMS)
Qualitative	AMS tables	af-AMS tables

Caption: **Top panel:** The AlloPipe tool runs from the .VCF variant annotated file from each sample. Allo-Count first performs a stringent data cleaning then compares the amino acid sequence of both samples in the direction of interest. Allo-Count returns the number of directional amino acid mismatches as the Allogenomic Mismatch Score – AMS – with qualitative information in the AMS tables. Allo-Affinity takes the AMS tables as input and then reconstructs the set of peptides being different between the two samples based on the method of "sliding window". The affinity of each of these peptides for the given HLA molecules is then retrieved using NetMHCpan to generate the 'affinity AMS' (af-AMS) table featuring the imputed peptides and their affinity toward the HLA molecules. From this table, the user can set the affinity threshold above which peptides are considered as mHAgs and which will be counted within the af-AMS. **Bottom panel:** Table summarizing the inputs and outputs of each AlloPipe module.

Figure 2

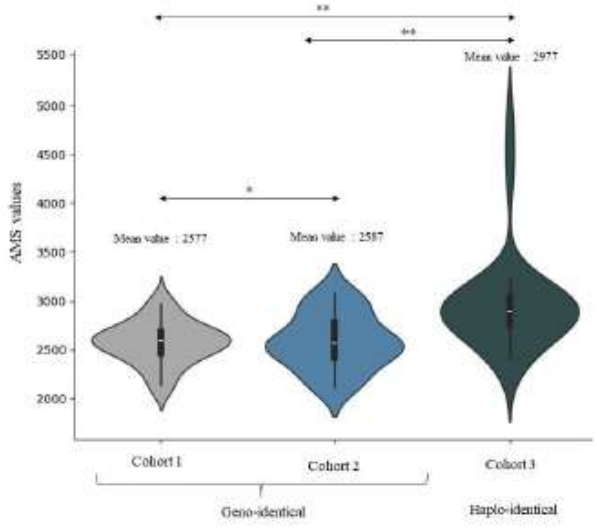
Title: Mismatch directionality



Caption: Allo-Count compares the donor's and the recipient's information about the amino acid changes expected at positions with non-synonymous polymorphisms. The sample comparison is directional and accounts for either the amino acids that are present in the donor but absent in the recipient (mHAgs of interest after solid organ transplantation) or that are present in the recipient but absent in the donor (mHAgs of interest after hematopoietic stem cell transplantation).

Figure 3

Title: AMS distribution across the three related cohorts



Caption: * indicates a non-significative / ** indicates a significative difference – with the appropriate tests

Figure 4

Title : AMS distribution for related and unrelated pairs

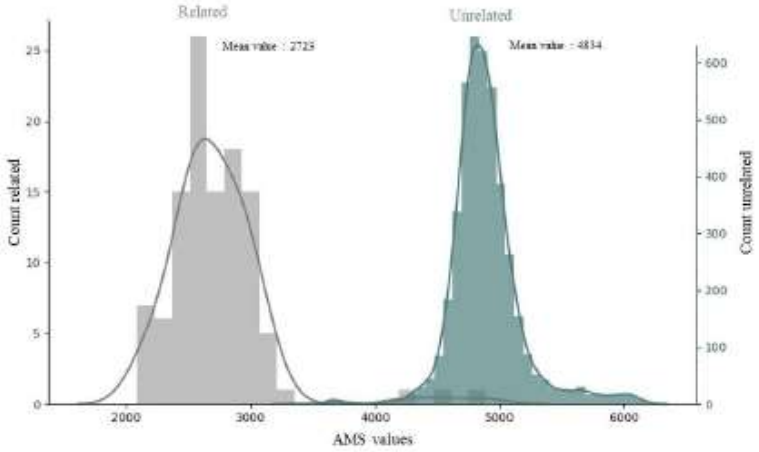
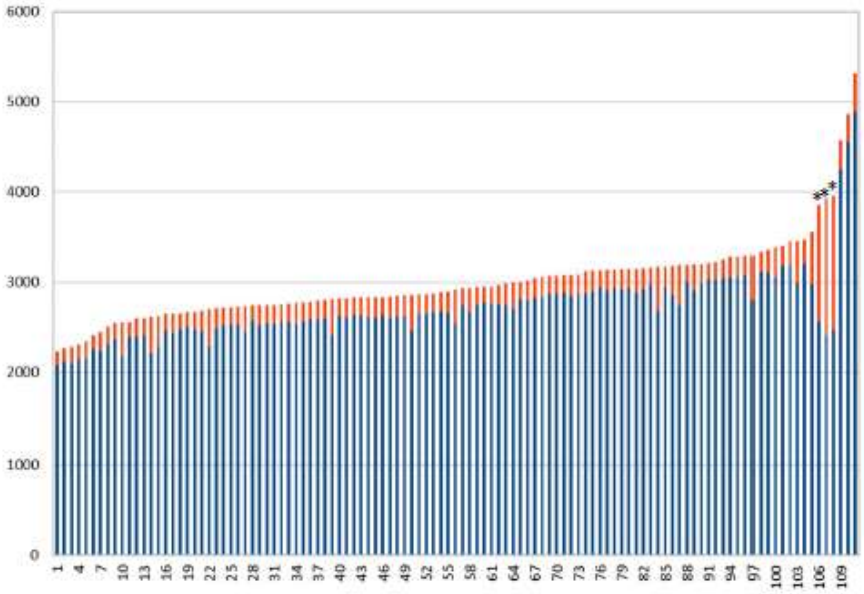


Figure 5

Title: Contribution of rare variants to AMS

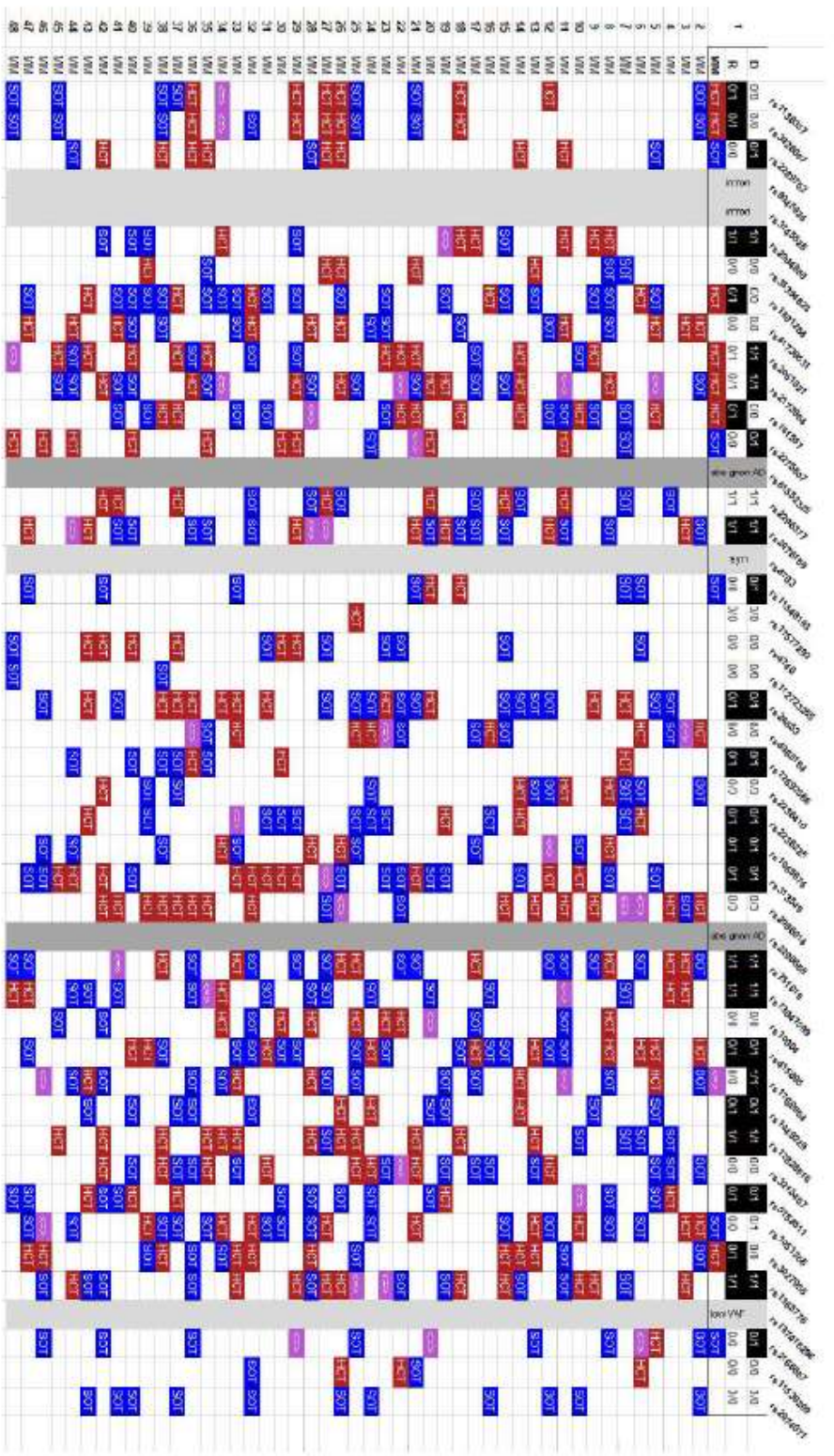


Caption: Each bar represents one pair. Blue bars represent the AMS values obtained with the default parameters, i.e. gnomADe_AF threshold set at 1%. Red bars represent the number of additional variants retrieved with the gnomADe_AF threshold set at 0% defined as rare variants.

Figure 6

Title: Representation of the described mHAgs retrieved in Cohort 1

Caption: Blue boxes indicate that the mHAg is retrived in the SOT directionality (present by the donor but absent by the recipient). Red boxes indicate that the mHAg is retrived in the allo-HCT directionality (present by the recipient but absent by the donor). Pink boxes indicate that the mHAg is retrived in both directions. Light grey highlight mHAgs that are not responsible for coding alternations. Dark grey highlights the two variants that are not present in gnomADe.



TABLES

Table 1

Title: Cohorts' characteristics

	Cohort 1 (n=48 pairs)	Cohort 2 (n=23 pairs)	Cohort 3 (n=40 pairs)	Total
Relatedness				
Siblings	48 (100%)	23 (100%)	20 (50%)	91 (82%)
Parent-to-child			1 (2.5%)	1 (0.9%)
Child-to-parent			17 (42.5%)	17 (15.3%)
Cousins			2 (5%)	2 (1.8%)
Sex-mismatch				
Female-to-Male	9 (18.7%)	6 (26.1%)	2 (5%)	17 (15.3%)
Others	39 (81.3%)	17 (73.9%)	38 (95%)	94 (84.7%)

Table 2

Title : Summary of variant features annotated by VEP

	Cohort 1 (n=96)	Cohort 2 (n=48)	Cohort 3 (n=80)
Total variants	152,726	109,005	125,594
Novel/existing variant			
Novel variants	**5,804 (3.8%)**	**11,858 (10.9%)**	**8,096 (6.4%)**
Existing variants	146,922 (96.2%)	97,147 (89.1%)	117,498 (93.6%)
Variant classes			
SNP	**143,694 (94.1%)**	**98,160 (90.1%)**	**117,291 (93.4%)**
Deletion	4,045 (2.6%)	5,245 (4.8%)	3,759 (3%)
Insertion	2,496 (1.6%)	4,256 (3.9%)	2,851 (2.3%)
Sequence alteration	2,223 (1.5%)	1,186 (1.1%)	1,498 (1.2%)
Indel	268 (0.2%)	158 (0.1%)	195 (0.2%)
Consequences			
Total consequences	144,147	102,349	119,300
Missense variants	**71,203 (49.4%)**	**48,411 (47.3%)**	**59,531 (49.9%)**
Syn variants	**60,888 (42.3%)**	**41,128(40.2%)**	**48,433 (40.6%)**
Stop gained	1,070 (0.7%)	779 (0.8%)	1,084 (0.9%)
Others	10,986 (7.6%)	12031 (11,76%)	10,252 (8.6%)

APPENDICES

Appendix 1

Title: Quality filters with default parameters

Parameter (per position)	Default	Meaning
minimal depth	20	Variant must be covered by *at least* [minimal depth] reads to be kept.
maximal depth	400	Variant must be covered by *at most* [maximal depth] reads to be retained.
minimal allelic depth	5	Allele must be covered by at least [allelic depth] reads to be retained
homozygosity threshold	0.2	Maximum ratio between the REF call and the 'Depth' for the variant. If the estimated ratio is above 'htr' (or below 1-'htr'), the call is not considered
genotype quality	0	Lowest accepted value for the predicted genotype quality.
maximal indels length	3	Variants longer than this value are not considered.
gnomADe allele frequency threshold	1%	Minimal frequency of existing variant in gnomAD exomes combined population

Appendix 2

Title: AMS table format

VCF informations		
CHROM	string	Chromosome of the variant
POS	int	Position on the chromosome
ID_{x, y}	string	Reference SNP cluster ID for the donor (x) or recipient (y)
REF, ALT	string	REF and ALT alleles at the given position
QUAL {x, y}	float	Phred-scaled quality score for the assertion made in ALT
FILTER {x, y}	string	PASS if this position has passed all filters
FORMAT_{x, y}	list	Format of the sample column post AlloPipe processing
Sample_{x, y}	string	Sample information regarding the position. Note that the column name is the one provided in the original VCF
Sample information		
GT_{x, y}	string	Predicted genotype of the sample
GQ {x, y}	float	Score of quality of the predicted genotype
AD {x, y}	string	Allelic depth
FT_{x, y}	string	Sample genotype filter indicating if this genotype was "called"
phased_{x, y}	string	Predicted genotype containing phased information (if provided in the sample column)
DP_{x, y}	int	Sequencing Depth at position
TYPE_{x, y}	string	Type of genotype (homozygous, heterozygous)
VEP information		
consequences_{x,y}	int	All the columns with a consequence with the number of times it is recorded in transcripts for the variant
transcripts {x, y}	string	Transcripts recorded for the variant
genes {x, y}	string	Genes recorded for the variant
aa_REF, aa_ALT	string	Amino-acid for REF and ALT alleles for the variant
gnomADe_AF_{x, y}	float	Frequency of existing variant in gnomAD exomes combined population
aa_ref_indiv_{x, y}, aa_alt_indiv {x, y}	string	REF and ALT amino-acids recorded for the sample (x and y)
aa_indiv {x, y}	string	REF and ALT amino-acids combined in one column
AlloCount informations		
Diff	string	Difference between the amino-acids of both samples
Mismatch	int	Number of mismatches in the diff field
Mismatch_type	String	Type of mismatch (homozygous, heterozygous)

Appendix 3

Title : af-AMS table format

NetMHCpan information		
hla_peptides	string	Potential ligand peptide built from VEP information and Ensembl information
Gene_id	string	Ensembl Gene ID
NB	int	Number of Weak Binding/Strong Binding peptides accross given HLA
EL-score	float	Raw prediction score
EL_Rank	float	Rank of the predicted EL-score compared to a set of random natural peptides
BA-score	float	Binding-Affinity score
BA_Rank	float	Rank of the predicted BA-score
HLA	string	Specified MHC molecule / Allele name
Transcript_id	string	Ensembl Transcript ID
Peptide_id	string	Ensembl Peptide ID

SUPPLEMENTARY DATA

Supplementary data 1:Workflow Sentieon

Map reads to reference with BWA-MEM
Sort into CRAM format (sentieon bwa mem)
Mark duplicates and generate deduplicated CRAM
Call SNPs, INDELs, and BNDs
Apply machine learning model to refine variant calls
Solve structural variants (SV) with SVSolver algorithm

Genome reference : GRCh38
dbSNP : v156

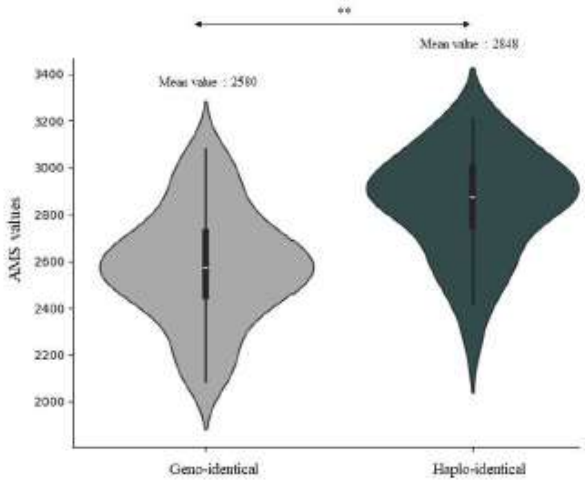
Supplementary data 2: Parameters for VEP annotation

VEP v113
--af_gnomade --assembly GRCh38 --cache --coding_only --pick_allele --use_given_ref --vcf

Supplementary figure 1

Title: Distribution of AMS scores after exclusion of the three outliers' pairs

** indicate a significative difference with the ANOVA test (AMS distribution after exclusion)



PARTIE IV – DISCUSSIONS AUTOUR DES TRAVAUX, CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

Nous avons, dans ce manuscrit, développé que les incompatibilités donneur/receveur sont nécessaires à la génération de l'alloréactivité, et que le niveau de compatibilité HLA – bien qu'incontournable – n'est pas suffisant pour l'expliquer étant donné la proportion des couples géno-identiques présentant une GVHD aiguë pouvant être sévère. Dans les indications malignes, la meilleure compréhension de l'alloréactivité pour tenter de découpler celle génératrice d'un effet GVL de celle génératrice d'un effet GVH est un défi que de très nombreuses équipes essaient de relever.

Nous nous sommes particulièrement intéressés à deux systèmes pouvant être générateurs d'alloréactivité : l'alloréactivité des cellules NK à travers le KIR mismatch et l'alloréactivité des lymphocytes T à travers les antigènes mineurs d'histocompatibilité. Nos objectifs étaient (i) de tester si l'un ou l'autre des systèmes pouvait intervenir dans la prédiction de l'alloréactivité mais aussi (ii) d'évaluer la faisabilité de l'étude de ces systèmes de compatibilité donneur/receveur autres que le HLA, dans un laboratoire HLA. Nous discutons ici les difficultés rencontrées au cours de nos projets, les limites de nos travaux et les perspectives qu'offrent nos résultats.

1. La nécessité de l'établissement d'une biobanque

Dans la cadre de la transplantation d'organe solide et de l'allo-HCT ou plus rarement à l'occasion de problèmes transfusionnels, les laboratoires HLA accrédités EFI ont l'autorisation de réaliser des typages HLA par biologie moléculaire afin d'établir la compatibilité immunologique donneur/receveur, et ce sans devoir apporter la preuve du consentement. A l'inverse, le typage HLA par biologie moléculaire des allèles de susceptibilité aux pathologies ou dans le cadre de la pharmacogénétique – hypersensibilité ou indication thérapeutique – requiert la preuve du consentement après information éclairée par le moyen d'une autorisation signée du patient ou de son représentant légal. Cette autorisation porte la mention de « l'utilisation à des fins de recherche » qui est laissée à la discrétion du signataire.

Au début de nos travaux, l'absence de consentement dédié spécifiquement à l'utilisation des données génétiques à des fins de recherche pour le receveur et le donneur a été un obstacle conséquent au recrutement des couples pour nos études. Avec l'aide du service clinique d'hématologie du CHRU de Nancy, nous avons introduit la signature de ces consentements dans la pratique médicale. Sur la base de ces consentements, nous avons déclaré une biobanque contenant les ADN pseudonymisés de couples donneur/receveur pouvant être utilisés pour des travaux de recherche. Au moment de la déclaration, plus d'une centaine de couples donneur/receveur apparentés avaient signé un consentement pour l'utilisation de leurs données génétiques, mais dont le format n'a pas été validé pour permettre leur inclusion rétrospective. Nous les avons recontactés afin de recueillir leur non-opposition après ré-information et finalement les intégrer à la biobanque.

A ce jour, la biobanque contient les ADN de plus de 220 patients ayant reçu une allo-HCT, associés à ceux de leur donneur apparenté. L'inclusion n'a été possible que lorsque le receveur et son donneur ont été intégralement pris en charge au CHRU de Nancy et y ont signé les consentements spécifiques à la biobanque. En raison de la nécessité de ce consentement spécifique, il nous est impossible de stocker et d'utiliser à des fins de recherche les couples dont le donneur n'a pas été pris en charge à Nancy, rendant notamment impossible l'étude des couples non-apparentés.

L'établissement « en pratique » de la biobanque a été un vrai challenge impliquant à la fois le personnel administratif pour la gestion des consentements, le personnel technique pour la prise en charge des échantillons et le personnel encadrant pour le contrôle de ces deux étapes. A la paillasse, nous avons

mis en place un parcours pré-analytique permettant de séparer la fraction des échantillons à destination du soin ou de la recherche – quand le consentement est disponible – puis de pseudonymiser les échantillons estampillés « recherche » afin de les stocker en biobanque.

2. Les travaux sur le système KIR

1. Les difficultés inhérentes au séquençage des gènes KIR par NGS

Les gènes KIR ne sont pas séquencés en routine clinique dans les laboratoires HLA français, à l'exception des rares possédant une solide expérience en la matière, souvent longue de plusieurs décennies. Nous avions pu tester dans le cadre d'un « *Early Access Agreement* » les kits de séquençage KIR que développait une société commerciale en 2019 – avant donc le début des travaux présentés ici. Les performances de l'époque n'étaient pas satisfaisantes : chacun des huit gènes alors disponibles au typage– *KIR2DL1, -2DL2, -2DL3, -2DL4, -3DL1, 3DL2, -3DL3* et *-3DS1* – devait être amplifié de façon indépendante imposant un (bien trop) grand nombre d'amplifications. Les produits de PCR (PCR, polymerase chain reaction) devaient ensuite être quantifiés puis poolés en quantités équimolaires, un processus difficilement automatisable dans notre laboratoire clinique. Nous avions de plus constaté de nombreux trous d'amplification révélant sans doute la faiblesse des amorces utilisées. Côté interprétation, le logiciel mis à disposition – bien qu'intuitif – ne permettait pas de pallier les faiblesses constatées à la paillasse.

Notre expérience serait sans doute différente en 2025 avec la démocratisation du séquençage par Nanopore. En effet, la longueur des *reads* lève probablement un grand nombre d'ambigüités de *mapping* ou de *phasing*. Cependant, nous constatons que les études publiées en France et à l'étranger restent l'apanage des laboratoires ayant développé leurs propres algorithmes pour le séquençage des KIR (196–198).

2. Les limitations de nos travaux

La limite des travaux présentés est d'abord d'ordre statistique, avec un grand nombre de modèles appliqués à de très modestes effectifs auxquels s'appliquent les facteurs confondants des paramètres de l'allogreffe (détaillés **partie I, chapitre 4**). Par ailleurs, la nomenclature KIR est encore jeune et mouvante comparativement à la nomenclature HLA et il est probable qu'une réanalyse des *reads* acquis requalifierait certains des typages obtenus, surtout au niveau allélique.

Néanmoins, puisque la majorité des modèles présentés sont basés sur la présence ou l'absence des gènes KIR et que nous concluons à une opposition conceptuelle de certains modèles établis dans la littérature, ces faiblesses ne devraient pas récuser les résultats obtenus.

3. Etat de l'art actualisé

Lorsque nous avons présenté ces travaux au congrès EFI 2022, nous avons été questionnés sur le modèle que nous recommanderions, si nous ne devions en choisir qu'un. La réponse semble être qu'il n'y a pas de bon ou de mauvais modèles, mais plutôt différentes modélisations de l'activation – très complexe – des cellules NK à partir des typages KIR de la paire donneur/receveur. Une étude publiée en 2024 et reprenant ces modèles sur un très grand nombre couples donneur/receveur (plus de 5.000 !) non-apparentés ne réplique cependant aucune des corrélations cliniques obtenues précédemment et conclut que « malgré la disponibilité du génotype KIR pour plus de 3 millions de donneurs [d'allo-HCT], aucun algorithme basé sur le génotype KIR du donneur ne peut être recommandé pour la pratique clinique [pour la sélection des donneurs non apparentés] » (199).

Cette même étude énonce notamment les difficultés suivantes pour la création d'un score univoque qui régirait l'activation des cellules NK au décours de l'allo-HCT : (i) l'importance de la plasticité des cellules NK, (ii) l'absence de modèle animal pour l'étude fonctionnelle in-vivo, (iii) la diversité allélique des gènes KIR, (iv) les incertitudes de séquençage, (v) la multiplicité des interactions [KIR-HLA] et (vi) l'impact du conditionnement ou de la prophylaxie de la GVHD.

Enfin, l'immunopeptidome a probablement son rôle à jouer – aussi ici !– dans la prédiction de l'alloréactivité des cellules NK car les propriétés du peptide enchâssés modifient la liaison [KIR-HLA](200).

3. Le projet AlloPipe

1. Les difficultés liées à l'acquisition de données génomiques homogènes

Côté paillasse, la réalisation des librairies pour le séquençage des exomes par NGS s'est révélée étonnamment robuste alors que nous l'expérimentions pour la première fois au laboratoire HLA. Nous avons bénéficié de la grande expertise de Yann Merlet, responsable technico-commercial de la société Twist Bioscience, mais également de l'extrême rigueur des techniciennes ayant réalisé ces séquençages (Julie Menet et Justine Cottet), ainsi que de celle de l'ingénieure de notre plateforme, Sandra Clément. Nous avons produit les librairies pour 40 des 111 couples étudiés dans le cadre du projet « AlloPipe » qui ont ensuite été séquencées par NGS sur la plateforme strasbourgeoise Genomax en mai 2022.
Pour les 71 autres couples du projet, les librairies et le séquençage par NGS ont été réalisés sur la plateforme de l'Institut du Cerveau et de la Moelle épinière (ICM), à Paris. 48 couples ont été séquencés en janvier 2020 et 23 couples supplémentaires en août 2023.

Sans reprendre ici les principes du séquençage NGS par Illumina, les données brutes acquises par le séquenceur sont des signaux de fluorescence qu'il faut traiter afin d'obtenir les informations de séquençage. Classiquement, le traitement des données est subdivisé en trois types d'analyse **(figure 16)** : (i) l'analyse primaire – en bleu – dépend du séquenceur et permet d'obtenir les séquences nucléotidiques (*reads*) avec leur qualité associée dans un fichier FASTQ, (ii) l'analyse secondaire – en orange – est dépendante des pratiques de la plateforme et permet de colliger les variants de l'individu dans un fichier VCF et (iii) l'analyse tertiaire – en vert – dépend des besoins de l'interprétateur.

L'outil « AlloPipe » est un outil d'analyse tertiaire : il est donc dépendant des méthodes avec lesquelles sont générés les fichiers d'amont. Parce que les exomes ont été séquencés sur des séquenceurs différents et sur des plateformes différentes, les analyses primaires et secondaires sont conduites avec des paramètres différents. La variabilité induite par les analyses primaires semble négligeable par rapport à celle induite par les analyses secondaires. Il est impossible d'énoncer ici l'ensemble des outils et leurs paramètres utilisés par l'une et l'autre des plateformes mais un élément en particulier a posé problème : le format VCF obtenu à la fin de la seconde étape.

De la plateforme strasbourgeoise, nous avons récupéré des VCF individuels, un pour chaque individu séquencé, alors que de la plateforme parisienne, nous avons récupéré des joint VCF colligeant les données de chacune des cohortes (96 individus dans le joint VCF correspondant au séquençage de janvier 2020 et 48 individus dans le joint VCF correspondant au séquençage d'août 2023 – 23 couples et deux repeta des cohortes précédentes.

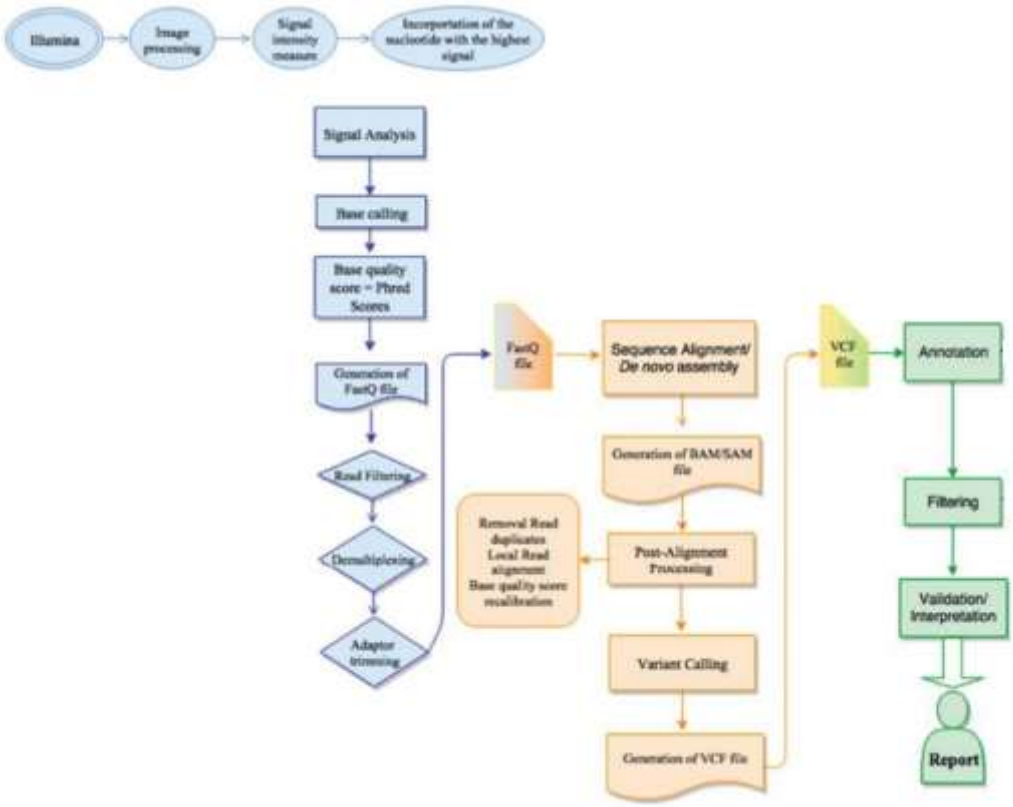


Figure 16 : Illustration des principales étapes de traitement bioinformatique après séquençage NGS, technologie Illumina.
Adapté de "Bioinformatics and Computational Tools for Next-Generation Sequencing Analysis in Clinical Genetics" (201)

La différence dans le système de collection des variants entre un VCF individuel *versus* joint VCF est apparue cruciale pour la suite de nos analyses. Brièvement, un fichier VCF (VCF, Variant Calling Format) individuel ne contient – comme son nom l'indique – que les variants de l'individu, c'est-à-dire les positions génomiques où au moins un des allèles comporte un nucléotide alternatif. Les positions génomiques ne comportant pas de variant – lorsque l'individu est homozygote pour l'allèle de référence – n'apparaissent pas dans le VCF, sans qu'on puisse faire la distinction entre (i) une position séquencée qui ne présente pas de variant ou (ii) l'absence d'information de séquençage par défaut de couverture de l'exome. Lorsque le laboratoire possède la pleine maitrise de la partie « wet lab », la deuxième option est peu probable, mais pour mémoire les VCF individuels obtenus correspondaient aux exomes séquencés dans notre laboratoire qui n'en possédait alors aucune expertise particulière, raison pour laquelle nous avons beaucoup mis en cause la qualité de ces derniers.

Sous l'impulsion du Pr Mesnard et de la possibilité qui lui était offerte de tester les outils génomiques de la compagnie Sentieon, nous avons regénéré en décembre 2024 les joint VCF pour chacune des trois cohortes. Cela a permis de s'affranchir des probables autres différences existantes entre l'analyse secondaire réalisée sur la plateforme strasbourgeoise comparativement à la plateforme parisienne.

Entre temps, même si la problématique posée par la différence entre VCF individuels d'une part et joint d'autre part a représenté une des plus grandes difficultés rencontrées sur le projet « AlloPipe », elle a été l'opportunité d'appréhender certaines limites de l'outil et de les repousser, notamment en implémentant le module dédié à l'imputation des données absentes des VCF individuels. L'ajout de cette fonctionnalité a permis d'élargir le type de données acceptées par l'outil.

2. Les limites conceptuelles de l'outil

Nous avons détaillé dans **la partie III - paragraphe 1.1.,** la présentation antigénique. La **figure 17** résume les principaux facteurs de variabilité (en orange) des différentes étapes impliquées dans cette dernière.

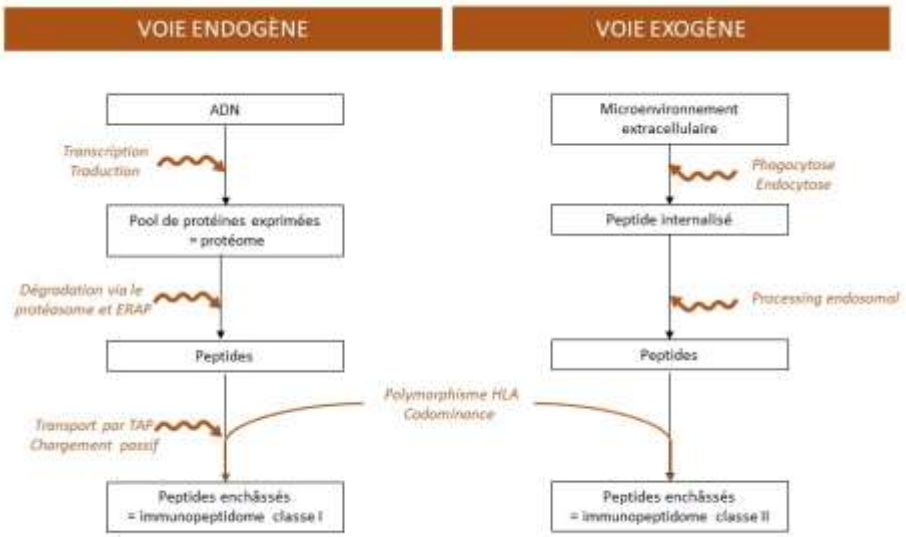


Figure 17 : Représentation des principaux facteurs de variabilité au cours de la présentation antigénique.

L'outil « Allopipe » omet la modélisation de plusieurs de ces facteurs de variabilité, notamment la régulation de la transcription et la dégradation par le protéasome pour lesquelles il serait *a priori* possible d'inclure des données à travers (i) l'utilisation plus approfondie des annotations de variants fournies par VEP (VEP, variant effect predictor) et (ii) l'intégration des prédictions de clivage protéosomal de l'outil NetChop (116). En revanche, l'outil permet l'intégration des données d'expression tissulaire grâce au filtre portant sur les transcrits de gènes ainsi que de l'affinité des peptides pour le sillon des molécules HLA grâce à NetMHCpan et NetMHCIIpan.
Pour les facteurs de variabilité restants, il n'existe à ce jour pas d'outil prédictif que nous aurions pu ajouter au pipeline.

Dans l'optique d'une utilisation compatible avec la puissance de calcul qui pourrait être disponible dans la plupart des laboratoires HLA, nous pensons néanmoins avoir trouvé le meilleur compromis.

3. Le défi de l'interprétation de la quantité de données générées

Dans ce manuscrit, les données obtenues avec « AlloPipe » pour les 111 paires donneur/receveur ne sont pas rapprochées des données cliniques des receveurs dont nous disposons pourtant. Nous avons généré une grande quantité de données, dont la synthèse s'avère être un vrai défi.

- <u>Concernant le module « Allo-Count »</u>

La grande flexibilité dans les seuils de qualité applicables pourrait permettre la génération d'une quantité infinie de scores AMS. En l'absence d'un outil similaire disponible et validé pour la transplantation auquel nous pourrions comparer notre outil, qu'appellerait-on « meilleurs paramètres » si ce ne sont pas ceux qui permettent de reproduire le *gold standard* ? La tentation de choisir les seuils en fonction des corrélations clinico-biologiques constatées est grande, mais elle expose à des résultats qui ne seraient ni

reproductibles ni validables, donc vains. Nous recommandons donc de rester proche des paramètres par défaut qui reposent sur des seuils de qualité communément acceptés.
A ce jour, la piste privilégiée pour l'extraction d'un signal à partir du score AMS est la restriction du score aux transcrits exprimés dans les tissus touchés par la GVHD aiguë ou chronique. L'objectif serait d'obtenir un score AMS « par tissu » plus pertinent sur le plan immunologique qu'un AMS global. La faisabilité technique est excellente car l'outil prévoit un module de restriction du score sur la base des transcrits, et la liste des transcrits exprimés par les tissus est accessible sur des portails comme GTEx. Le principal obstacle réside dans le niveau de détail des données cliniques dont nous disposons.

Notons que notre cheminement nous a amenés à développer une fonction de normalisation qui visait à prendre en compte la qualité du séquençage de l'exome, notamment lorsque nous doutions de celle des exomes réalisés dans notre laboratoire. Il s'agit d'une régression linéaire basée sur le quotient :

$$\frac{\text{nombre de positions réf/réf}}{\text{nombre de positions alt}}$$

- Concernant le module « Allo-Affinity »

De nombreuses questions subsistent, parmi lesquelles :

- La longueur des peptides à reconstruire pour la classe I et la classe II

Comme discuté dans la **partie I - chapitre 2.2.**, la longueur des peptides pouvant être enchâssés dans les molécules HLA classe I et II n'est pas univoque. Pour la classe I, les peptides pouvant s'enchâsser sont compris entre 8 et 16 acides aminés, alors que pour la classe II ils mesurent entre 12 et 25 acides aminés. S'il existe un consensus autour de l'utilisation de nonamères pour l'immunopeptidome de classe I, aucune donnée ne permet de privilégier un peptide d'une longueur par rapport à une autre dans la classe II. Faut-il donc reconstruire l'ensemble des peptides théoriquement acceptés par le sillon de la molécule HLA de classe I et II – et donc générer encore plus de données dont il sera peut-être plus ardu d'extraire un signal – ou assumer un parti pris sur la longueur des peptides à reconstruire ? Nous laissons la possibilité aux utilisateurs de l'outil « AlloPipe » de trancher cette question en laissant le choix de la taille des peptides à reconstruire.

- La transdimérisation des chaines α et β pour les molécules HLA de classe II

Les molécules HLA de classe II sont les hétérodimères des chaines α et β. Le plus souvent la molécule HLA résulte d'une association en *cis*, c'est-à-dire de l'association de la chaine α et la chaine β du même haplotype, et ce en raison d'affinités structurelles supérieures liées à la co-évolution des gènes. Cependant, les chaines α et β peuvent s'associer en *trans*, c'est-à-dire l'association de la chaine α d'un haplotype et la chaine β de l'autre haplotype, modifiant les propriétés de la poche à peptides et donc les peptides pouvant y être enchâssés (202). Comment appréhender ce polymorphisme supplémentaire ?

- La priorisation des mHAgs

Les algorithmes de prédiction – NetMHCpan et MixMHCpred (203) – retournent les affinités des peptides pour le sillon des molécules HLA sous la forme d'un *ranking* donné en pourcentage. Pour NetMHCpan en classe I par exemple, les peptides ayant un *ranking* <0.5% sont considérés comme « strong binder » et les peptides ayant une affinité entre 0.5% et 2% sont considérés comme « weak binder ». On sait cependant qu'il existe des molécules HLA dites superprésentatrices d'antigénes, parmi lesquelles certaines sont fréquentes. Pour ces molécules, reste-il pertinent de se baser sur le ranking ou serait-il plus judicieux d'établir un top 50 ou un top 100 des peptides à considérer ?

- La pondération des mHAgs par le niveau d'expression

Enfin, étant donné que les molécules HLA ne sont pas toutes exprimées avec la même intensité (voir **partie I, paragraphe 2.5**.), faudrait-il tenir compte du niveau d'expression de la molécule HLA dans lequel le peptide est enchâssé pour mieux prédire sa contribution à l'alloréactivité ?

Nous continuons nos efforts pour essayer de répondre à ces questions.

4. Conclusions finales et perspectives

1. Conclusions

Finalement, les deux systèmes de prédiction de l'alloréactivité que nous avons étudiés, à savoir (i) le système KIR et (ii) les antigènes mineurs d'histocompatibilité sont-ils (a) accessibles dans un laboratoire HLA accrédité EFI et ont-ils (b) démontré un impact suffisant pour encourager leur utilisation en clinique pour la prédiction de l'alloréactivité au décours de l'allo-HCT ?

Dans la littérature, le séquençage des gènes KIR par NGS ou par Nanopore semble rester – en France et à l'étranger– l'apanage des laboratoires ayant développé une expertise particulière dans ce domaine, majoritairement à l'aide de leurs propres algorithmes. Cependant, la plupart des modèles prédictifs ne requiert que la notion de la présence ou de l'absence des gènes ; ces modèles seraient donc accessibles en pratique clinique grâce à des techniques plus rudimentaires mais néanmoins robustes comme la PCR-SSO.
En revanche, la pertinence clinique de l'établissement de la compatibilité KIR – quel que soit le modèle – a été mise à mal avec les dernières études cliniques, dont certaines menées sur de très larges effectifs (plus de 5.000 paires). A ce jour, il ne semble pas raisonnable pour un laboratoire HLA sans expérience particulière dans le typage des gènes KIR – comme le nôtre ou d'autres en France – de poursuivre ses efforts dans ce domaine.

Au sujet des antigènes mineurs d'histocompatibilité, nous avons montré l'excellente faisabilité de la capture des exomes dans notre laboratoire, rendant crédible sur le plan technique le recours à ce type d'analyses dans un laboratoire HLA « lambda ». Dans ce cas, les limitations seraient plutôt d'ordre bioinformatique avec la mise en place d'un pipeline d'analyse secondaire ou sa sous-traitance. Les besoins de maintenance seraient *a priori* moindres.
L'état actuel de nos travaux ne permettent pas d'alimenter la discussion de la pertinence clinique des antigènes mineurs d'histocompatibilité dans l'allo-HCT. Cependant, l'état de l'art actuel encourage à poursuivre des efforts dans cette direction.

2. Perspectives

Nous aimerions conclure ce manuscrit en proposant une analyse positionnant les laboratoires HLA accrédités EFI dans la perspective de l'élargissement des caractéristiques génétiques utiles à l'établissement de la compatibilité donneur/receveur **(tableau 7)**.

	Impact positif	Impact négatif
Interne	- Excellence dans la connaissance de l'histocompatibilité et des mécanismes de l'alloréactivité - Processus d'accréditation EFI robuste - Harmonisation performante des pratiques des laboratoires	- Manque de ressources humaines (bioinformaticiens) - Manque de ressources technologiques (stockage des données, puissance de calcul)
Externe	Technologies de séquençage à haut débit : - Disponibles - Efficientes - Moindre cout - Robustes	- Généralisation des outils bioinformatiques permettant la détermination du typage HLA à partir des données génétiques (exomes, génome) produites à d'autres fins

Tableau 7 : Forces, faiblesses, opportunités et menaces des laboratoires HLA accrédités EFI au regard de l'élargissement des caractéristiques génétiques impliquées dans l'histocompatibilité

L'histocompatibilité est une discipline qui évolue rapidement avec les technologies et les connaissances disponibles. Nous relevons plusieurs défis potentiels pour les années à venir :

- **Le développement d'outils libres et open source, ainsi que leur maintien**

Le développement de l'outil « AlloPipe » souligne bien l'ensemble des problématiques affrontées, le coût humain et les ressources technologiques nécessaires au développement de nouveaux outils bioinformatiques. Pour les équipes développant ces outils, la propriétarisation peut être un moyen de rentabiliser ces coûts. Pour la communauté médicale et scientifique, cela signifie (i) un accès payant aux algorithmes de prédiction et (ii) la non-maitrise du code source. Notre équipe défend les principes de la science ouverte et open source mais elle a un prix, celui de la recherche académique.

- **La collaboration des différents acteurs autour des données de séquençage**

Les indications du séquençage de l'exome ou du génome ne cessent de s'élargir. Non seulement les individus atteints de pathologies dont on suspecte une étiologie génétique, mais aussi parfois les individus sains – par exemple pour aider à la ségrégation des variants pathogènes au sein de familles – peuvent bénéficier d'un séquençage incluant les gènes relatifs à l'histocompatibilité. Dans ce contexte, la mutualisation des données de séquençage pourrait s'envisager, mais elle soulèverait de nombreuses questions éthiques, pratiques et techniques.

- **La définition réglementaire du périmètre de l'histocompatibilité et son encadrement**

L'établissement de la compatibilité dans le système HLA s'est étendu de quatre loci (*HLA-A, -B, -C, -DRB1*), à cinq (*HLA-DQB1*) puis six (*HLA-DPB1*) et inclut désormais souvent les gènes associés à *HLA-DRB1* que sont *HLA-DRB3, -DRB4 et -DRB5* et les gènes *HLA-DQA1* et *HLA-DPA1* pour un total de onze loci. En parallèle, de nouveaux gènes d'histocompatibilité ont été décrits et notamment la famille de gènes KIR et les gènes *MIC-A/B*, sans qu'ils soient clairement intégrés à l'exemption de consentement dont bénéficient les typages HLA en vue de l'allogreffe.

Nous pensons que nos travaux soulignent le caractère évolutif du champ de l'histocompatibilité et le potentiel des laboratoires HLA accrédités EFI pour redéfinir et repousser les limites de notre discipline.

BIBLIOGRAPHIE

1. Niederwieser D, Baldomero H, Bazuaye N, Bupp C, Chaudhri N, Corbacioglu S, Elhaddad A, Frutos C, Galeano S, Hamad N, et al. One and a half million hematopoietic stem cell transplants: continuous and differential improvement in worldwide access with the use of non-identical family donors. *Haematologica* (2021) 107:1045–1053. doi: 10.3324/haematol.2021.279189

2. Passweg JR, Baldomero H, Atlija M, Kleovoulou I, Witaszek A, Alexander T, Angelucci E, Averbuch D, Bazarbachi A, Ciceri F, et al. The 2023 EBMT report on hematopoietic cell transplantation and cellular therapies. Increased use of allogeneic HCT for myeloid malignancies and of CAR-T at the expense of autologous HCT. *Bone Marrow Transplant* (2025) doi: 10.1038/s41409-025-02524-2

3. de Latour RP, Risitano A, Kulasekararaj A, Dufour C. "Acquired Bone Marrow Failure: Severe Aplastic Anemia and Paroxysmal Nocturnal Hemoglobinuria.," In: Sureda A, Corbacioglu S, Greco R, Kröger N, Carreras E, editors. *The EBMT Handbook: Hematopoietic Cell Transplantation and Cellular Therapies*. Cham: Springer International Publishing (2024). p. 707–715 doi: 10.1007/978-3-031-44080-9_78

4. Peters C, Locatelli F, Bader P. "Acute Lymphoblastic Leukaemia in Children and Adolescents.," *The EBMT Handbook: Hematopoietic Cell Transplantation and Cellular Therapies*. Cham: Springer International Publishing (2024) doi: 10.1007/978-3-031-44080-9_73

5. Stelljes M, Marks DI, Giebel S. "Acute Lymphoblastic Leukemia in Adults.," In: Sureda A, Corbacioglu S, Greco R, Kröger N, Carreras E, editors. *The EBMT Handbook: Hematopoietic Cell Transplantation and Cellular Therapies*. Cham: Springer International Publishing (2024). p. 649–657 doi: 10.1007/978-3-031-44080-9_72

6. Gibson BES, Sauer MG, Ramanathan S, Amrolia PJ. "Acute Myeloid Leukaemia in Children.," In: Sureda A, Corbacioglu S, Greco R, Kröger N, Carreras E, editors. *The EBMT Handbook: Hematopoietic Cell Transplantation and Cellular Therapies*. Cham: Springer International Publishing (2024). p. 633–648 doi: 10.1007/978-3-031-44080-9_71

7. Niemeyer CM, Strahm B. "Allogeneic Hematopoietic Cell Transplantation in Pediatric MDS Including Refractory Cytopenia of Childhood and in Juvenile Myelomonocytic Leukemia.," In: Sureda A, Corbacioglu S, Greco R, Kröger N, Carreras E, editors. *The EBMT Handbook: Hematopoietic Cell Transplantation and Cellular Therapies*. Cham: Springer International Publishing (2024). p. 679–683 doi: 10.1007/978-3-031-44080-9_75

8. Versluis J, Cornelissen JJ, Craddock C, Sanz MÁ, Nagler A. "AML in Adults.," In: Sureda A, Corbacioglu S, Greco R, Kröger N, Carreras E, editors. *The EBMT Handbook: Hematopoietic Cell Transplantation and Cellular Therapies*. Cham: Springer International Publishing (2024). p. 617–631 doi: 10.1007/978-3-031-44080-9_70

9. Alexander T, Sharrack B, Rovira M, Saccardi R, Farge D, Snowden JA, Greco R. "Autoimmune Disease.," In: Sureda A, Corbacioglu S, Greco R, Kröger N, Carreras E, editors. *The EBMT Handbook: Hematopoietic Cell Transplantation and Cellular Therapies*. Cham: Springer International Publishing (2024). p. 825–836 doi: 10.1007/978-3-031-44080-9_92

10. Schetelig J, Dreger P. "Chronic Lymphocytic Leukemia.," In: Sureda A, Corbacioglu S, Greco R, Kröger N, Carreras E, editors. *The EBMT Handbook: Hematopoietic Cell Transplantation and Cellular Therapies*. Cham: Springer International Publishing (2024). p. 771–775 doi: 10.1007/978-3-031-44080-9_85

11. Martínez C, Bazarbachi A, Sureda A. "Classical Hodgkin's Lymphoma,." In: Sureda A, Corbacioglu S, Greco R, Kröger N, Carreras E, editors. *The EBMT Handbook: Hematopoietic*

Cell Transplantation and Cellular Therapies. Cham: Springer International Publishing (2024). p. 799–808 doi: 10.1007/978-3-031-44080-9_89

12. Diaz-de-Heredia C, Bierings M, Dalle J-H, Fioredda F, Strahm B. "Fanconi Anemia and Other Hereditary Bone Marrow Failure Syndromes.," In: Sureda A, Corbacioglu S, Greco R, Kröger N, Carreras E, editors. *The EBMT Handbook: Hematopoietic Cell Transplantation and Cellular Therapies*. Cham: Springer International Publishing (2024). p. 717–724 doi: 10.1007/978-3-031-44080-9_79

13. Cappelli B, Gluckman E, Corbacioglu S, de la Fuente J, Abboud MR. "Hemoglobinopathies (Sickle Cell Disease and Thalassemia).," In: Sureda A, Corbacioglu S, Greco R, Kröger N, Carreras E, editors. *The EBMT Handbook: Hematopoietic Cell Transplantation and Cellular Therapies*. Cham: Springer International Publishing (2024). p. 725–739 doi: 10.1007/978-3-031-44080-9_80

14. Albert MH, Lankester A, Gennery A, Neven B. "Inborn Errors of Immunity.," In: Sureda A, Corbacioglu S, Greco R, Kröger N, Carreras E, editors. *The EBMT Handbook: Hematopoietic Cell Transplantation and Cellular Therapies*. Cham: Springer International Publishing (2024). p. 809–817 doi: 10.1007/978-3-031-44080-9_90

15. Wynn R, Schulz A. "Inborn Errors of Metabolism and Osteopetrosis.," In: Sureda A, Corbacioglu S, Greco R, Kröger N, Carreras E, editors. *The EBMT Handbook: Hematopoietic Cell Transplantation and Cellular Therapies*. Cham: Springer International Publishing (2024). p. 819–824 doi: 10.1007/978-3-031-44080-9_91

16. Serroukh Y, Montoto S. "Indolent Lymphoma.," In: Sureda A, Corbacioglu S, Greco R, Kröger N, Carreras E, editors. *The EBMT Handbook: Hematopoietic Cell Transplantation and Cellular Therapies*. Cham: Springer International Publishing (2024). p. 763–769 doi: 10.1007/978-3-031-44080-9_84

17. Bento L, Glass B, Schmitz N. "Large B-Cell Lymphoma.," In: Sureda A, Corbacioglu S, Greco R, Kröger N, Carreras E, editors. *The EBMT Handbook: Hematopoietic Cell Transplantation and Cellular Therapies*. Cham: Springer International Publishing (2024). p. 777–785 doi: 10.1007/978-3-031-44080-9_86

18. Baermann B-N, Dietrich S. "Mantle Cell Lymphoma.," In: Sureda A, Corbacioglu S, Greco R, Kröger N, Carreras E, editors. *The EBMT Handbook: Hematopoietic Cell Transplantation and Cellular Therapies*. Cham: Springer International Publishing (2024). p. 787–790 doi: 10.1007/978-3-031-44080-9_87

19. Mohty M, Bruno B, Gagelmann N, Mateos M-V. "Multiple Myeloma.," In: Sureda A, Corbacioglu S, Greco R, Kröger N, Carreras E, editors. *The EBMT Handbook: Hematopoietic Cell Transplantation and Cellular Therapies*. Cham: Springer International Publishing (2024). p. 741–749 doi: 10.1007/978-3-031-44080-9_81

20. Robin M, Gurnari C. "Myelodysplastic Neoplasms/Syndromes (MDS).," In: Sureda A, Corbacioglu S, Greco R, Kröger N, Carreras E, editors. *The EBMT Handbook: Hematopoietic Cell Transplantation and Cellular Therapies*. Cham: Springer International Publishing (2024). p. 669–677 doi: 10.1007/978-3-031-44080-9_74

21. Onida F, Chalandon Y. "Myelodysplastic/Myeloproliferative Neoplasms.," In: Sureda A, Corbacioglu S, Greco R, Kröger N, Carreras E, editors. *The EBMT Handbook: Hematopoietic Cell Transplantation and Cellular Therapies*. Cham: Springer International Publishing (2024). p. 685–694 doi: 10.1007/978-3-031-44080-9_76

22. Kröger N, McLornan DP, Chalandon Y. "Myeloproliferative Neoplasms.," In: Sureda A, Corbacioglu S, Greco R, Kröger N, Carreras E, editors. *The EBMT Handbook: Hematopoietic*

Cell Transplantation and Cellular Therapies. Cham: Springer International Publishing (2024). p. 695–705 doi: 10.1007/978-3-031-44080-9_77

23. Hübel K, Montoto S, Güven M, Duarte RF. "Other B- and T-Aggressive Lymphomas and Lymphomas Associated with HIV.," In: Sureda A, Corbacioglu S, Greco R, Kröger N, Carreras E, editors. *The EBMT Handbook: Hematopoietic Cell Transplantation and Cellular Therapies*. Cham: Springer International Publishing (2024). p. 791–797 doi: 10.1007/978-3-031-44080-9_88

24. Cook G, Rovira M. "Poems Syndrome and Disease Produced by Other Monoclonal IGs.," In: Sureda A, Corbacioglu S, Greco R, Kröger N, Carreras E, editors. *The EBMT Handbook: Hematopoietic Cell Transplantation and Cellular Therapies*. Cham: Springer International Publishing (2024). p. 757–761 doi: 10.1007/978-3-031-44080-9_83

25. Minnema M, Schönland S. "Systemic Light Chain Amyloidosis.," In: Sureda A, Corbacioglu S, Greco R, Kröger N, Carreras E, editors. *The EBMT Handbook: Hematopoietic Cell Transplantation and Cellular Therapies*. Cham: Springer International Publishing (2024). p. 751–755 doi: 10.1007/978-3-031-44080-9_82

26. Chalandon Y, Sbianchi G, Gras L, Koster L, Apperley J, Byrne J, Salmenniemi U, Sengeloev H, Aljurf M, Helbig G, et al. Allogeneic hematopoietic cell transplantation in patients with chronic phase chronic myeloid leukemia in the era of third generation tyrosine kinase inhibitors: A retrospective study by the chronic malignancies working party of the EBMT. *Am J Hematol* (2023) 98:112–121. doi: 10.1002/ajh.26764

27. Krämer I, Stilgenbauer S, Dietrich S, Böttcher S, Zeis M, Stadler M, Bittenbring J, Uharek L, Scheid C, Hegenbart U, et al. Allogeneic hematopoietic cell transplantation for high-risk CLL: 10-year follow-up of the GCLLSG CLL3X trial. *Blood* (2017) 130:1477–1480. doi: 10.1182/blood-2017-04-775841

28. Loschi M, Porcher R, Barraco F, Terriou L, Mohty M, de Guibert S, Mahe B, Lemal R, Dumas P-Y, Etienne G, et al. Impact of eculizumab treatment on paroxysmal nocturnal hemoglobinuria: a treatment versus no-treatment study. *Am J Hematol* (2016) 91:366–370. doi: 10.1002/ajh.24278

29. Kulasekararaj AG, Hill A, Rottinghaus ST, Langemeijer S, Wells R, Gonzalez-Fernandez FA, Gaya A, Lee JW, Gutierrez EO, Piatek CI, et al. Ravulizumab (ALXN1210) vs eculizumab in C5-inhibitor-experienced adult patients with PNH: the 302 study. *Blood* (2019) 133:540–549. doi: 10.1182/blood-2018-09-876805

30. Mussetti A, Bento L, Bastos-Oreiro M, Rius-Sansalvador B, Albo C, Bailen R, Barba P, Benzaquén A, Briones J, Caballero AC, et al. Role of allogeneic hematopoietic cell transplant for relapsed/refractory aggressive B-cell lymphomas in the CART era. *Bone Marrow Transplant* (2023) 58:673–679. doi: 10.1038/s41409-023-01949-x

31. Iacoboni G, Rejeski K, Villacampa G, van Doesum JA, Chiappella A, Bonifazi F, Lopez-Corral L, van Aalderen M, Kwon M, Martínez-Cibrian N, et al. Real-world evidence of brexucabtagene autoleucel for the treatment of relapsed or refractory mantle cell lymphoma. *Blood Adv* (2022) 6:3606–3610. doi: 10.1182/bloodadvances.2021006922

32. Wang M, Munoz J, Goy A, Locke FL, Jacobson CA, Hill BT, Timmerman JM, Holmes H, Jaglowski S, Flinn IW, et al. Three-Year Follow-Up of KTE-X19 in Patients With Relapsed/Refractory Mantle Cell Lymphoma, Including High-Risk Subgroups, in the ZUMA-2 Study. *J Clin Oncol* (2023) 41:555–567. doi: 10.1200/JCO.21.02370

33. Robinson SP, Boumendil A, Finel H, Schouten H, Ehninger G, Maertens J, Crawley C, Rambaldi A, Russell N, Anders W, et al. Reduced intensity allogeneic stem cell transplantation for follicular lymphoma relapsing after an autologous transplant achieves durable long-term disease control: an analysis from the Lymphoma Working Party of the EBMT†. *Ann Oncol Off J Eur Soc Med Oncol*

(2016) 27:1088–1094. doi: 10.1093/annonc/mdw124

34. Passweg JR, Baldomero H, Ciceri F, de la Cámara R, Glass B, Greco R, Hazenberg MD, Kalwak K, McLornan DP, Neven B, et al. Hematopoietic cell transplantation and cellular therapies in Europe 2022. CAR-T activity continues to grow; transplant activity has slowed: a report from the EBMT. *Bone Marrow Transplant* (2024) 59:803–812. doi: 10.1038/s41409-024-02248-9

35. Granot N, Storb R. History of hematopoietic cell transplantation: challenges and progress. *Haematologica* (2020) 105:2716–2729. doi: 10.3324/haematol.2019.245688

36. Giralt S, Estey E, Albitar M, van Besien K, Rondón G, Anderlini P, O'Brien S, Khouri I, Gajewski J, Mehra R, et al. Engraftment of allogeneic hematopoietic progenitor cells with purine analog-containing chemotherapy: harnessing graft-versus-leukemia without myeloablative therapy. *Blood* (1997) 89:4531–4536.

37. Besse K, Maiers M, Confer D, Albrecht M. On Modeling Human Leukocyte Antigen-Identical Sibling Match Probability for Allogeneic Hematopoietic Cell Transplantation: Estimating the Need for an Unrelated Donor Source. *Biol Blood Marrow Transplant J Am Soc Blood Marrow Transplant* (2016) 22:410–417. doi: 10.1016/j.bbmt.2015.09.012

38. Slade M, Fakhri B, Savani BN, Romee R. Halfway there: the past, present and future of haploidentical transplantation. *Bone Marrow Transplant* (2017) 52:1–6. doi: 10.1038/bmt.2016.190

39. Ballen KK, Gluckman E, Broxmeyer HE. Umbilical cord blood transplantation: the first 25 years and beyond. *Blood* (2013) 122:491–498. doi: 10.1182/blood-2013-02-453175

40. Notarantonio AB, D'Aveni-Piney M, Pochon C, Rubio M-T. Document de travail interne - Traité d'immunologie. (2024)

41. Bader P, Kreyenberg H, Bacigalupo A. "Documentation of Engraftment and Chimerism After HCT.," In: Sureda A, Corbacioglu S, Greco R, Kröger N, Carreras E, editors. *The EBMT Handbook: Hematopoietic Cell Transplantation and Cellular Therapies*. Cham: Springer International Publishing (2024). p. 183–188 doi: 10.1007/978-3-031-44080-9_21

42. Averbuch D, Orasch C, Cordonnier C, Livermore DM, Mikulska M, Viscoli C, Gyssens IC, Kern WV, Klyasova G, Marchetti O, et al. European guidelines for empirical antibacterial therapy for febrile neutropenic patients in the era of growing resistance: summary of the 2011 4th European Conference on Infections in Leukemia. *Haematologica* (2013) 98:1826–1835. doi: 10.3324/haematol.2013.091025

43. D'Aveni-Piney M, Notarantonio AB, Pochon C, Rubio M-T. "Immunology of Hematopoietic Stem Cell Transplantation.," In: Rezaei N, editor. *Encyclopedia of Infection and Immunity*. Oxford: Elsevier (2022). p. 571–585 doi: 10.1016/B978-0-12-818731-9.00229-9

44. Hill GR, Betts BC, Tkachev V, Kean LS, Blazar BR. Current Concepts and Advances in Graft-Versus-Host Disease Immunology. *Annu Rev Immunol* (2021) 39:19–49. doi: 10.1146/annurev-immunol-102119-073227

45. Harris AC, Young R, Devine S, Hogan WJ, Ayuk F, Bunworasate U, Chanswangphuwana C, Efebera YA, Holler E, Litzow M, et al. International, Multicenter Standardization of Acute Graft-versus-Host Disease Clinical Data Collection: A Report from the Mount Sinai Acute GVHD International Consortium. *Biol Blood Marrow Transplant J Am Soc Blood Marrow Transplant* (2016) 22:4–10. doi: 10.1016/j.bbmt.2015.09.001

46. Pasquini M, Wang Z. Current use and outcome of hematopoietic stem cell transplantation: CIBMTR Summary Slides, 2013 Web site. (2014)

47. Ferrara JLM, Levine JE, Reddy P, Holler E. Graft-versus-Host Disease. *Lancet* (2009) 373:1550–1561. doi: 10.1016/S0140-6736(09)60237-3

48. Zeiser R, Blazar BR. Acute Graft-versus-Host Disease - Biologic Process, Prevention, and Therapy. *N Engl J Med* (2017) 377:2167–2179. doi: 10.1056/NEJMra1609337

49. Zeiser R, Blazar BR. Pathophysiology of Chronic Graft-versus-Host Disease and Therapeutic Targets. *N Engl J Med* (2017) 377:2565–2579. doi: 10.1056/NEJMra1703472

50. Maziarz RT, Devine S, Garrison LP, Agodoa I, Badaracco J, Gitlin M, Perales M-A. Estimating the Lifetime Medical Cost Burden of an Allogeneic Hematopoietic Cell Transplantation Patient. *Transplant Cell Ther* (2023) 29:637.e1-637.e9. doi: 10.1016/j.jtct.2023.06.013

51. Dictionnaire médical de l'Académie de Médecine. https://www.academie-medecine.fr/le-dictionnaire/index.php?q=ALLOREACTIVITE [Accessed March 3, 2025]

52. Owen J, Punt J, Stranford S. "Activation, différenciation et mémoire des lymphocytes T.," *Immunologie - Le cours de Janis Kuby*. Dunod. p. 357–384

53. Gros F, Fournel S, Liégeois S, Richard D, Soulas-Sprauel P. "Fiche 40. Immunité adaptative chez les Agnathes.," *Atlas d'immunologie*. Dunod (2018). p. 85–86 doi: 10.3917/dunod.gros.2018.01.0085

54. Trowsdale J, Knight JC. Major histocompatibility complex genomics and human disease. *Annu Rev Genomics Hum Genet* (2013) 14:301–323. doi: 10.1146/annurev-genom-091212-153455

55. HLA | biorigami. http://www.biorigami.com/?tag=hla [Accessed July 28, 2019]

56. Kropshofer H, Hämmerling GJ, Vogt AB. The impact of the non-classical MHC proteins HLA-DM and HLA-DO on loading of MHC class II molecules. *Immunol Rev* (1999) 172:267–278. doi: 10.1111/j.1600-065x.1999.tb01371.x

57. Carapito R, Bahram S. Genetics, genomics, and evolutionary biology of NKG2D ligands. *Immunol Rev* (2015) 267:88–116. doi: 10.1111/imr.12328

58. SIMON M. De l'immunité innée à l'immunité adaptative & Complexe majeur d'histocompatibilité. *Cours Pharm* (2009) https://www.cours-pharmacie.com/immunologie/de-limmunite-innee-a-limmunite-adaptative-et-complexe-majeur-d%e2%80%99histocompatibilite.html [Accessed July 28, 2019]

59. Hassan C, Chabrol E, Jahn L, Kester MGD, de Ru AH, Drijfhout JW, Rossjohn J, Falkenburg JHF, Heemskerk MHM, Gras S, et al. Naturally Processed Non-canonical HLA-A*02:01 Presented Peptides*. *J Biol Chem* (2015) 290:2593–2603. doi: 10.1074/jbc.M114.607028

60. Neefjes J, Jongsma MLM, Paul P, Bakke O. Towards a systems understanding of MHC class I and MHC class II antigen presentation. *Nat Rev Immunol* (2011) 11:823–836. doi: 10.1038/nri3084

61. Shiina T, Hosomichi K, Inoko H, Kulski JK. The HLA genomic loci map: expression, interaction, diversity and disease. *J Hum Genet* (2009) 54:15–39. doi: 10.1038/jhg.2008.5

62. HLA Nomenclature @ hla.alleles.org. http://hla.alleles.org/nomenclature/stats.html [Accessed July 25, 2018]

63. Parham P, Norman P, Abi-Rached L, Guethlein L. Human-specific evolution of killer cell immunoglobulin-like receptor recognition of major histocompatibility complex class I molecules. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* (2012) 367:800–11. doi: 10.1098/rstb.2011.0266

64. Owen J, Punt J, Stranford S. “L’immunité innée,.” *Immunologie - Le cours de Janis Kuby*. p. 141–186

65. Reche PA, Reinherz EL. Sequence Variability Analysis of Human Class I and Class II MHC Molecules: Functional and Structural Correlates of Amino Acid Polymorphisms. *J Mol Biol* (2003) 331:623–641. doi: 10.1016/S0022-2836(03)00750-2

66. Mak TW, Saunders ME, Jett BD eds. “Chapter 6 - The Major Histocompatibility Complex.,” *Primer to the Immune Response (Second Edition)*. Boston: Academic Cell (2014). p. 143–159 doi: 10.1016/B978-0-12-385245-8.00006-6

67. Robinson J, Barker DJ, Marsh SGE. 25 years of the IPD-IMGT/HLA Database. *HLA* (2024) 103:e15549. doi: 10.1111/tan.15549

68. Efi-Web | Standards Committee. https://efi-web.org/committees/standards-committee [Accessed March 3, 2025]

69. Dubois V, Amokrane K, Crocchiolo R, Fort M, Guillaume N, Kennel A, Michiels S, Ralazamahaleo M, Rouzaire P-O, Yakoub-Agha I, et al. Définition et standardisation des bilans d’histocompatibilité en fonction du parcours du patient et du type de donneur : recommandations de la Société francophone de greffe de moelle et de thérapie cellulaire (SFGM-TC) et de la Société Francophone d’Histocompatibilité et Immunogénétique (SFHI). *Bull Cancer (Paris)* (2021) 108:S45–S52. doi: 10.1016/j.bulcan.2021.01.024

70. Nunes E, Heslop H, Fernandez-Vina M, Taves C, Wagenknecht DR, Eisenbrey AB, Fischer G, Poulton K, Wacker K, Hurley CK, et al. Definitions of histocompatibility typing terms. *Blood* (2011) 118:e180-183. doi: 10.1182/blood-2011-05-353490

71. Dubois V, Blandin L, Duclaut M, Duquesne A, Faivre L, Ferru-Clement R, Roy J, Walencik A, Magro L, Garnier F. Mise à jour des recommandations pour le choix des unités de sang placentaire en greffe de cellules souches hématopoïétiques (SFGM-TC). *Bull Cancer (Paris)* (2025) 112:S68–S77. doi: 10.1016/j.bulcan.2024.01.009

72. Cornillon J, Crocchiolo R, Dubois V, Guidicelli G, Jorge-Cordeiro D, Meunier M-C, Michiels S, Timmermans A, Villemonteix J, Yakoub-Agha I, et al. Choix d’un donneur non apparenté en vue d’une allogreffe de cellules souches hématopoïétiques : recommandations de la Société francophone de greffe de moelle et de thérapie cellulaire (SFGM-TC). *Bull Cancer (Paris)* (2024) 111:S1–S13. doi: 10.1016/j.bulcan.2023.07.008

73. Shaw BE, Logan BR, Spellman SR, Marsh SGE, Robinson J, Pidala J, Hurley C, Barker J, Maiers M, Dehn J, et al. Development of an Unrelated Donor Selection Score Predictive of Survival after HCT: Donor Age Matters Most. *Biol Blood Marrow Transplant J Am Soc Blood Marrow Transplant* (2018) 24:1049–1056. doi: 10.1016/j.bbmt.2018.02.006

74. Dehn J, Spellman S, Hurley CK, Shaw BE, Barker JN, Burns LJ, Confer DL, Eapen M, Fernandez-Vina M, Hartzman R, et al. Selection of unrelated donors and cord blood units for hematopoietic cell transplantation: guidelines from the NMDP/CIBMTR. *Blood* (2019) 134:924–934. doi: 10.1182/blood.2019001212

75. Hönger G, Fornaro I, Granado C, Tiercy J-M, Hösli I, Schaub S. Frequency and determinants of pregnancy-induced child-specific sensitization. *Am J Transplant Off J Am Soc Transplant Am Soc Transpl Surg* (2013) 13:746–753. doi: 10.1111/ajt.12048

76. Hyun J, Park KD, Yoo Y, Lee B, Han BY, Song EY, Park MH. Effects of different sensitization events on HLA alloimmunization in solid organ transplantation patients. *Transplant Proc* (2012) 44:222–225. doi: 10.1016/j.transproceed.2011.12.049

77. Morales-Buenrostro LE, Terasaki PI, Marino-Vázquez LA, Lee J-H, El-Awar N, Alberú J. "Natural" human leukocyte antigen antibodies found in nonalloimmunized healthy males. *Transplantation* (2008) 86:1111–1115. doi: 10.1097/TP.0b013e318186d87b

78. Sicard A, Amrouche L, Suberbielle C, Carmagnat M, Candon S, Thervet E, Delahousse M, Legendre C, Chatenoud L, Snanoudj R. Outcome of kidney transplantations performed with preformed donor-specific antibodies of unknown etiology. *Am J Transplant Off J Am Soc Transplant Am Soc Transpl Surg* (2014) 14:193–201. doi: 10.1111/ajt.12512

79. Zhou W, Longmate J, Lacey SF, Palmer JM, Gallez-Hawkins G, Thao L, Spielberger R, Nakamura R, Forman SJ, Zaia JA, et al. Impact of donor CMV status on viral infection and reconstitution of multifunction CMV-specific T cells in CMV-positive transplant recipients. *Blood* (2009) 113:6465–6476. doi: 10.1182/blood-2009-02-203307

80. Kaito S, Nakajima Y, Hara K, Toya T, Nishida T, Uchida N, Mukae J, Fukuda T, Ozawa Y, Tanaka M, et al. Heterogeneous impact of cytomegalovirus reactivation on nonrelapse mortality in hematopoietic stem cell transplantation. *Blood Adv* (2020) 4:1051–1061. doi: 10.1182/bloodadvances.2019000814

81. Fukuda M, Hattori J, Ohkubo R, Watanabe A, Maekawa S. Real-World Safety and Effectiveness of Letermovir in Patients Undergoing Allogenic Hematopoietic Stem Cell Transplantation: Final Results of Post-Marketing Surveillance in Japan. *Clin Drug Investig* (2024) 44:527–540. doi: 10.1007/s40261-024-01376-w

82. Kim HT, Zhang M-J, Woolfrey AE, Martin AS, Chen J, Saber W, Perales M-A, Armand P, Eapen M. Donor and recipient sex in allogeneic stem cell transplantation: what really matters. *Haematologica* (2016) 101:1260–1266. doi: 10.3324/haematol.2016.147645

83. Lee SJ, Klein J, Haagenson M, Baxter-Lowe LA, Confer DL, Eapen M, Fernandez-Vina M, Flomenberg N, Horowitz M, Hurley CK, et al. High-resolution donor-recipient HLA matching contributes to the success of unrelated donor marrow transplantation. *Blood* (2007) 110:4576–4583. doi: 10.1182/blood-2007-06-097386

84. Loiseau P, Busson M, Balere M-L, Dormoy A, Bignon J-D, Gagne K, Gebuhrer L, Dubois V, Jollet I, Bois M, et al. HLA Association with Hematopoietic Stem Cell Transplantation Outcome: The Number of Mismatches at HLA-A, -B, -C, -DRB1, or -DQB1 Is Strongly Associated with Overall Survival. *Biol Blood Marrow Transplant* (2007) 13:965–974. doi: 10.1016/j.bbmt.2007.04.010

85. Passweg JR, Schanz U, Chalandon Y, Güngör T, Baldomero H, Heim D, Nair G, Medinger M, Masouridi-Levrat S, de Faveri GN, et al. High-resolution HLA matching in unrelated donor transplantation in Switzerland: differential impact of class I and class II mismatches may reflect selection of nonimmunogenic or weakly immunogenic DRB1/DQB1 disparities. *Bone Marrow Transplant* (2015) 50:1201–1205. doi: 10.1038/bmt.2015.129

86. Lin Z, Bashirova AA, Viard M, Garner L, Quastel M, Beiersdorfer M, Kasprzak WK, Akdag M, Yuki Y, Ojeda P, et al. HLA class I signal peptide polymorphism determines the level of CD94/NKG2–HLA-E-mediated regulation of effector cell responses. *Nat Immunol* (2023) 24:1087–1097. doi: 10.1038/s41590-023-01523-z

87. Petersdorf EW, Gooley T, Volt F, Kenzey C, Madrigal A, McKallor C, Querol S, Rafii H, Rocha V, Tamouza R, et al. Use of the HLA-B leader to optimize cord blood transplantation. *Haematologica* (2021) 106:3107–3114. doi: 10.3324/haematol.2020.264424

88. Petersdorf EW, Stevenson P, Bengtsson M, De Santis D, Dubois V, Gooley T, Horowitz M, Hsu K, Madrigal JA, Malkki M, et al. HLA-B leader and survivorship after HLA-mismatched unrelated donor transplantation. *Blood* (2020) 136:362–369. doi: 10.1182/blood.2020005743

89. Sajulga R, Bolon Y-T, Maiers MJ, Petersdorf EW. Assessment of *HLA-B* genetic variation with an *HLA-B* leader tool and implications in clinical transplantation. *Blood Adv* (2022) 6:270–280. doi: 10.1182/bloodadvances.2021004561

90. Fernández-Viña MA, Klein JP, Haagenson M, Spellman SR, Anasetti C, Noreen H, Baxter-Lowe LA, Cano P, Flomenberg N, Confer DL, et al. Multiple mismatches at the low expression HLA loci DP, DQ, and DRB3/4/5 associate with adverse outcomes in hematopoietic stem cell transplantation. *Blood* (2013) 121:4603–4610. doi: 10.1182/blood-2013-02-481945

91. Zino E, Frumento G, Marktel S, Sormani MP, Ficara F, Di Terlizzi S, Parodi AM, Sergeant R, Martinetti M, Bontadini A, et al. A T-cell epitope encoded by a subset of HLA-DPB1 alleles determines nonpermissive mismatches for hematologic stem cell transplantation. *Blood* (2004) 103:1417–1424. doi: 10.1182/blood-2003-04-1279

92. Crivello P, Zito L, Sizzano F, Zino E, Maiers M, Mulder A, Toffalori C, Naldini L, Ciceri F, Vago L, et al. The impact of amino acid variability on alloreactivity defines a functional distance predictive of permissive HLA-DPB1 mismatches in hematopoietic stem cell transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant J Am Soc Blood Marrow Transplant* (2015) 21:233–241. doi: 10.1016/j.bbmt.2014.10.017

93. Fleischhauer K, Shaw BE, Gooley T, Malkki M, Bardy P, Bignon J-D, Dubois V, Horowitz MM, Madrigal JA, Morishima Y, et al. Effect of T-cell-epitope matching at HLA-DPB1 in recipients of unrelated-donor haemopoietic-cell transplantation: a retrospective study. *Lancet Oncol* (2012) 13:366–374. doi: 10.1016/S1470-2045(12)70004-9

94. Fleischhauer K, Ahn KW, Wang HL, Zito L, Crivello P, Müller C, Verneris M, Shaw BE, Pidala J, Oudshorn M, et al. Directionality of non-permissive HLA-DPB1 T-cell epitope group mismatches does not improve clinical risk stratification in 8/8 matched unrelated donor hematopoietic cell transplantation. *Bone Marrow Transplant* (2017) 52:1280–1287. doi: 10.1038/bmt.2017.96

95. Petersdorf EW, Malkki M, O'hUigin C, Carrington M, Gooley T, Haagenson MD, Horowitz MM, Spellman SR, Wang T, Stevenson P. High HLA-DP Expression and Graft-versus-Host Disease. *N Engl J Med* (2015) 373:599–609. doi: 10.1056/NEJMoa1500140

96. Mytilineos D, Tsamadou C, Neuchel C, Platzbecker U, Bunjes D, Schub N, Wagner-Drouet E, Wulf G, Kröger N, Murawski N, et al. The Human Leukocyte Antigen-DPB1 Degree of Compatibility Is Determined by Its Expression Level and Mismatch Permissiveness: A German Multicenter Analysis. *Front Immunol* (2021) 11: doi: 10.3389/fimmu.2020.614976

97. Sajulga R, Bolon Y-T, Maiers MJ, Petersdorf EW. Assessment of HLA-DPB1 genetic variation using an HLA-DP tool and its implications in clinical transplantation. *Blood Adv* (2023) 7:4809–4821. doi: 10.1182/bloodadvances.2022009554

98. Tsamadou C, Engelhardt D, Platzbecker U, Sala E, Valerius T, Wagner-Drouet E, Wulf G, Kröger N, Murawski N, Einsele H, et al. HLA-DRB3/4/5 Matching Improves Outcome of Unrelated Hematopoietic Stem Cell Transplantation. *Front Immunol* (2021) 12:771449. doi: 10.3389/fimmu.2021.771449

99. Ducreux S, Dubois V, Amokrane K, Yakoub-Agha I, Labalette M, Michallet M, Rubio M-T, Kennel A, Forcade E, Lafarge X, et al. HLA-DRB3/4/5 mismatches are associated with increased risk of acute GVHD in 10/10 matched unrelated donor hematopoietic cell transplantation. *Am J Hematol* (2018) doi: 10.1002/ajh.25133

100. Crocchiolo R, Rombolà G. Human Leucocyte Antigen System and Selection of Unrelated Hematopoietic Stem Cell Donors: Impact of Patient–Donor (Mis)matching and New Challenges with the Current Technologies. *J Clin Med* (2023) 12:646. doi: 10.3390/jcm12020646

101. Fürst D, Müller C, Vucinic V, Bunjes D, Herr W, Gramatzki M, Schwerdtfeger R, Arnold R, Einsele H, Wulf G, et al. High-resolution HLA matching in hematopoietic stem cell transplantation: a retrospective collaborative analysis. *Blood* (2013) 122:3220–3229. doi: 10.1182/blood-2013-02-482547

102. Heemskerk MBA, Cornelissen JJ, Roelen DL, van Rood JJ, Claas FHJ, Doxiadis IIN, Oudshoorn M. Highly diverged MHC class I mismatches are acceptable for haematopoietic stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant* (2007) 40:193–200. doi: 10.1038/sj.bmt.1705721

103. Rodey GE, Neylan JF, Whelchel JD, Revels KW, Bray RA. Epitope specificity of HLA class I alloantibodies. I. Frequency analysis of antibodies to private versus public specificities in potential transplant recipients. *Hum Immunol* (1994) 39:272–280. doi: 10.1016/0198-8859(94)90270-4

104. Wade JA, Hurley CK, Takemoto SK, Thompson J, Davies SM, Fuller TC, Rodey G, Confer DL, Noreen H, Haagenson M, et al. HLA mismatching within or outside of cross-reactive groups (CREGs) is associated with similar outcomes after unrelated hematopoietic stem cell transplantation. *Blood* (2007) 109:4064–4070. doi: 10.1182/blood-2006-06-032193

105. Duquesnoy RJ. HLAMatchmaker: a molecularly based algorithm for histocompatibility determination. I. Description of the algorithm. *Hum Immunol* (2002) 63:339–352. doi: 10.1016/S0198-8859(02)00382-8

106. Duquesnoy RJ, Marrari M. HLAMatchmaker: a molecularly based algorithm for histocompatibility determination. II. Verification of the algorithm and determination of the relative immunogenicity of amino acid triplet-defined epitopes. *Hum Immunol* (2002) 63:353–363. doi: 10.1016/S0198-8859(02)00381-6

107. Duquesnoy RJ, Witvliet M, Doxiadis IIN, de Fijter H, Claas FHJ. HLAMatchmaker-based strategy to identify acceptable HLA class I mismatches for highly sensitized kidney transplant candidates. *Transpl Int Off J Eur Soc Organ Transplant* (2004) 17:22–30. doi: 10.1007/s00147-003-0641-z

108. O'Rafferty C, Rooney G, Hagan R, Woolfson M, O'Donghaile D, Fitzgerald J. HLAMatchmaker is effective for selecting appropriate platelet units for alloimmunised thrombocytopaenic patients who are refractory to random donor platelets. *Transfus Med Oxf Engl* (2017) 27 Suppl 5:369–374. doi: 10.1111/tme.12409

109. Duquesnoy R, Spellman S, Haagenson M, Wang T, Horowitz MM, Oudshoorn M. HLAMatchmaker-defined triplet matching is not associated with better survival rates of patients with class I HLA allele mismatched hematopoietic cell transplants from unrelated donors. *Biol Blood Marrow Transplant J Am Soc Blood Marrow Transplant* (2008) 14:1064–1071. doi: 10.1016/j.bbmt.2008.07.001

110. Elsner H-A, DeLuca D, Strub J, Blasczyk R. HistoCheck: rating of HLA class I and II mismatches by an internet-based software tool. *Bone Marrow Transplant* (2004) 33:165–169. doi: 10.1038/sj.bmt.1704301

111. Shaw BE, Barber LD, Madrigal JA, Cleaver S, Marsh SGE. Scoring for HLA matching? A clinical test of HistoCheck. *Bone Marrow Transplant* (2004) 34:367–368. doi: 10.1038/sj.bmt.1704586

112. Spellman S, Klein J, Haagenson M, Askar M, Baxter-Lowe LA, He J, Hsu S, Blasczyk R, Hurley C. Scoring HLA Class I Mismatches by HistoCheck Does Not Predict Clinical Outcome in Unrelated Hematopoietic Stem Cell Transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant* (2012) 18:739–746. doi: 10.1016/j.bbmt.2011.09.008

113. Sidney J, Peters B, Frahm N, Brander C, Sette A. HLA class I supertypes: a revised and updated classification. *BMC Immunol* (2008) 9:1. doi: 10.1186/1471-2172-9-1

114. Camacho-Bydume C, Wang T, Sees JA, Fernandez-Viña M, Abid MB, Askar M, Beitinjaneh A, Brown V, Castillo P, Chhabra S, et al. Specific Class I HLA Supertypes but Not HLA Zygosity or Expression Are Associated with Outcomes following HLA-Matched Allogeneic Hematopoietic Cell Transplant: HLA Supertypes Impact Allogeneic HCT Outcomes. *Transplant Cell Ther* (2021) 27:142.e1-142.e11. doi: 10.1016/j.bbmt.2020.10.010

115. Geneugelijk K, Thus KA, Spierings E. Predicting Alloreactivity in Transplantation. *J Immunol Res* (2014) 2014:159479. doi: 10.1155/2014/159479

116. Keşmir C, Nussbaum AK, Schild H, Detours V, Brunak S. Prediction of proteasome cleavage motifs by neural networks. *Protein Eng* (2002) 15:287–296. doi: 10.1093/protein/15.4.287

117. Nielsen M, Lundegaard C, Blicher T, Lamberth K, Harndahl M, Justesen S, Røder G, Peters B, Sette A, Lund O, et al. NetMHCpan, a method for quantitative predictions of peptide binding to any HLA-A and -B locus protein of known sequence. *PloS One* (2007) 2:e796. doi: 10.1371/journal.pone.0000796

118. Nielsen M, Lund O. NN-align. An artificial neural network-based alignment algorithm for MHC class II peptide binding prediction. *BMC Bioinformatics* (2009) 10:296. doi: 10.1186/1471-2105-10-296

119. Geneugelijk K, Thus KA, van Deutekom HWM, Calis JJA, Borst E, Keşmir C, Oudshoorn M, van der Holt B, Meijer E, Zeerleder S, et al. Exploratory Study of Predicted Indirectly ReCognizable HLA Epitopes in Mismatched Hematopoietic Cell Transplantations. *Front Immunol* (2019) 10: doi: 10.3389/fimmu.2019.00880

120. Rimando J, Slade M, DiPersio JF, Westervelt P, Gao F, Liu C, Romee R. The Predicted Indirectly Recognizable HLA Epitopes (PIRCHE) Score for HLA Class I Graft-versus-Host Disparity Is Associated with Increased Acute Graft-versus-Host Disease in Haploidentical Transplantation with Post-Transplantation Cyclophosphamide. *Biol Blood Marrow Transplant* (2020) 26:123–131. doi: 10.1016/j.bbmt.2019.09.024

121. Gil-Etayo FJ, Niño-Ramírez JE, Fonseca-Santos M, Arroyo-Sánchez D, Navarro-Bailón A, Vicente Parra A, Jiménez Hernaz I, Terradillos Sánchez P, Boix F, Alcoceba M, et al. Quantifying HLA Mismatches at Epitope Level in Haplo-HSCT: Impact in the Outcome in Strategies Using PTCy. *HLA* (2024) 104:e15738. doi: 10.1111/tan.15738

122. Uhrberg M, Valiante NM, Young NT, Lanier LL, Phillips JH, Parham P. The repertoire of killer cell Ig-like receptor and CD94:NKG2A receptors in T cells: clones sharing identical alpha beta TCR rearrangement express highly diverse killer cell Ig-like receptor patterns. *J Immunol Baltim Md 1950* (2001) 166:3923–3932. doi: 10.4049/jimmunol.166.6.3923

123. Gavlovsky P-J, Tonnerre P, Guitton C, Charreau B. Expression of MHC class I-related molecules MICA, HLA-E and EPCR shape endothelial cells with unique functions in innate and adaptive immunity. *Hum Immunol* (2016) 77:1084–1091. doi: 10.1016/j.humimm.2016.02.007

124. Groh V, Bahram S, Bauer S, Herman A, Beauchamp M, Spies T. Cell stress-regulated human major histocompatibility complex class I gene expressed in gastrointestinal epithelium. *Proc Natl Acad Sci U S A* (1996) 93:12445–12450. doi: 10.1073/pnas.93.22.12445

125. Siemaszko J, Marzec-Przyszlak A, Bogunia-Kubik K. NKG2D Natural Killer Cell Receptor—A Short Description and Potential Clinical Applications. *Cells* (2021) 10:1420. doi: 10.3390/cells10061420

126. Neuchel C, Fürst D, Tsamadou C, Schrezenmeier H, Mytilineos J. Extended loci histocompatibility matching in HSCT—Going beyond classical HLA. *Int J Immunogenet* (2021) 48:299–316. doi: 10.1111/iji.12545

127. Makrigiannakis A, Karamouti M, Drakakis P, Loutradis D, Antsaklis A. Fetomaternal immunotolerance. *Am J Reprod Immunol N Y N 1989* (2008) 60:482–496. doi: 10.1111/j.1600-0897.2008.00655.x

128. Duneton C, Winterberg PD, Ford ML. Activation and regulation of alloreactive T cell immunity in solid organ transplantation. *Nat Rev Nephrol* (2022) 18:663–676. doi: 10.1038/s41581-022-00600-0

129. Montano-Loza AJ, Rodríguez-Perálvarez ML, Pageaux G-P, Sanchez-Fueyo A, Feng S. Liver transplantation immunology: Immunosuppression, rejection, and immunomodulation. *J Hepatol* (2023) 78:1199–1215. doi: 10.1016/j.jhep.2023.01.030

130. Shepherd HM, Gauthier JM, Kreisel D. Tolerance, immunosuppression, and immune modulation: impacts on lung allograft survival. *Curr Opin Organ Transplant* (2021) 26:328–332. doi: 10.1097/MOT.0000000000000871

131. Lubetzky M, Tantisattamo E, Molnar MZ, Lentine KL, Basu A, Parsons RF, Woodside KJ, Pavlakis M, Blosser CD, Singh N, et al. The failing kidney allograft: A review and recommendations for the care and management of a complex group of patients. *Am J Transplant Off J Am Soc Transplant Am Soc Transpl Surg* (2021) 21:2937–2949. doi: 10.1111/ajt.16717

132. Burrows SR, Silins SL, Khanna R, Burrows JM, Rischmueller M, McCluskey J, Moss DJ. Cross-reactive memory T cells for Epstein-Barr virus augment the alloresponse to common human leukocyte antigens: degenerate recognition of major histocompatibility complex-bound peptide by T cells and its role in alloreactivity. *Eur J Immunol* (1997) 27:1726–1736. doi: 10.1002/eji.1830270720

133. Ali JM, Bolton EM, Bradley JA, Pettigrew GJ. Allorecognition pathways in transplant rejection and tolerance. *Transplantation* (2013) 96:681–688. doi: 10.1097/TP.0b013e31829853ce

134. Marino J, Paster J, Benichou G. Allorecognition by T Lymphocytes and Allograft Rejection. *Front Immunol* (2016) 7:582. doi: 10.3389/fimmu.2016.00582

135. Geneugelijk K, Spierings E. PIRCHE-II: an algorithm to predict indirectly recognizable HLA epitopes in solid organ transplantation. *Immunogenetics* (2020) 72:119–129. doi: 10.1007/s00251-019-01140-x

136. Rogers NJ, Lechler RI. Allorecognition. *Am J Transplant* (2001) 1:97–102. doi: 10.1034/j.1600-6143.2001.10201.x

137. Warrens AN, Lombardi G, Lechler RI. Presentation and recognition of major and minor histocompatibility antigens. *Transpl Immunol* (1994) 2:103–107. doi: 10.1016/0966-3274(94)90036-1

138. Amir AL, van der Steen DM, Hagedoorn RS, Kester MGD, van Bergen CAM, Drijfhout JW, de Ru AH, Falkenburg JHF, van Veelen PA, Heemskerk MHM. Allo-HLA-reactive T cells inducing graft-versus-host disease are single peptide specific. *Blood* (2011) 118:6733–6742. doi: 10.1182/blood-2011-05-354787

139. Weiden PL, Flournoy N, Thomas ED, Prentice R, Fefer A, Buckner CD, Storb R. Antileukemic Effect of Graft-versus-Host Disease in Human Recipients of Allogeneic-Marrow Grafts. *N Engl J Med* (1979) 300:1068–1073. doi: 10.1056/NEJM197905103001902

140. Wagner JE, Thompson JS, Carter SL, Kernan NA, Unrelated Donor Marrow Transplantation Trial. Effect of graft-versus-host disease prophylaxis on 3-year disease-free survival in recipients of unrelated donor bone marrow (T-cell Depletion Trial): a multi-centre, randomised phase II-III trial. *Lancet Lond Engl* (2005) 366:733–741. doi: 10.1016/S0140-6736(05)66996-6

141. Michallet A-S, Nicolini F, Michallet M. [Alloreactive donor lymphocytes (DLI) after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation (HSCT): study of toxicity and efficacy]. *Bull Cancer (Paris)* (2003) 90:758–762.

142. Vincent K, Roy D-C, Perreault C. Next-generation leukemia immunotherapy. *Blood* (2011) 118:2951–2959. doi: 10.1182/blood-2011-04-350868

143. Sharma N, Liesveld JL. NPM 1 Mutations in AML—The Landscape in 2023. *Cancers* (2023) 15:1177. doi: 10.3390/cancers15041177

144. Liso A, Colau D, Benmaamar R, De Groot A, Martin W, Benedetti R, Specchia G, Martelli MP, Coulie P, Falini B. Nucleophosmin leukaemic mutants contain C-terminus peptides that bind HLA class I molecules. *Leukemia* (2008) 22:424–426. doi: 10.1038/sj.leu.2404887

145. Ruggeri L, Capanni M, Urbani E, Perruccio K, Shlomchik WD, 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. doi: 10.1126/science.1068440

146. Vivier E, Tomasello E, Baratin M, Walzer T, Ugolini S. Functions of natural killer cells. *Nat Immunol* (2008) 9:503–510. doi: 10.1038/ni1582

147. Tarazona R, Lopez-Sejas N, Guerrero B, Hassouneh F, Valhondo I, Pera A, Sanchez-Correa B, Pastor N, Duran E, Alonso C, et al. Current progress in NK cell biology and NK cell-based cancer immunotherapy. *Cancer Immunol Immunother* (2020) 69:879–899. doi: 10.1007/s00262-020-02532-9

148. Holler E, Greinix H, Zeiser R. "Acute Graft-Versus-Host Disease.," In: Sureda A, Corbacioglu S, Greco R, Kröger N, Carreras E, editors. *The EBMT Handbook: Hematopoietic Cell Transplantation and Cellular Therapies*. Cham (CH): Springer (2024) http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK608233/ [Accessed March 3, 2025]

149. Zeiser R, Blazar BR. Acute Graft-versus-Host Disease — Biologic Process, Prevention, and Therapy. *N Engl J Med* (2017) 377:2167–2179. doi: 10.1056/NEJMra1609337

150. Rafei H, Jenq RR. Microbiome-intestine cross talk during acute graft-versus-host disease. *Blood* (2020) 136:401–409. doi: 10.1182/blood.2019000950

151. Matte CC, Liu J, Cormier J, Anderson BE, Athanasiadis I, Jain D, McNiff J, Shlomchik WD. Donor APCs are required for maximal GVHD but not for GVL. *Nat Med* (2004) 10:987–992. doi: 10.1038/nm1089

152. Kim TD, Terwey TH, Zakrzewski JL, Suh D, Kochman AA, Chen ME, King CG, Borsotti C, Grubin J, Smith OM, et al. Organ-derived dendritic cells have differential effects on alloreactive T cells. *Blood* (2008) 111:2929–2940. doi: 10.1182/blood-2007-06-096602

153. Rubio M-T, Moreira-Teixeira L, Bachy E, Bouillié M, Milpied P, Coman T, Suarez F, Marcais A, Sibon D, Buzyn A, et al. Early posttransplantation donor-derived invariant natural killer T-cell recovery predicts the occurrence of acute graft-versus-host disease and overall survival. *Blood* (2012) 120:2144–2154. doi: 10.1182/blood-2012-01-404673

154. Jagasia MH, Greinix HT, Arora M, Williams KM, Wolff D, Cowen EW, Palmer J, Weisdorf D, Treister NS, Cheng G-S, et al. National Institutes of Health Consensus Development Project on Criteria for Clinical Trials in Chronic Graft-versus-Host Disease: I. The 2014 Diagnosis and Staging Working Group report. *Biol Blood Marrow Transplant J Am Soc Blood Marrow Transplant* (2015) 21:389-401.e1. doi: 10.1016/j.bbmt.2014.12.001

155. Zeiser R, Sarantopoulos S, Blazar BR. B-cell targeting in chronic graft-versus-host disease. *Blood*

(2018) 131:1399–1405. doi: 10.1182/blood-2017-11-784017

156. Zeiser R, Vago L. Mechanisms of immune escape after allogeneic hematopoietic cell transplantation. *Blood* (2019) 133:1290–1297. doi: 10.1182/blood-2018-10-846824

157. Vago L, Perna SK, Zanussi M, Mazzi B, Barlassina C, Stanghellini MTL, Perrelli NF, Cosentino C, Torri F, Angius A, et al. Loss of mismatched HLA in leukemia after stem-cell transplantation. *N Engl J Med* (2009) 361:478–488. doi: 10.1056/NEJMoa0811036

158. Tarafdar A, Hopcroft LEM, Gallipoli P, Pellicano F, Cassels J, Hair A, Korfi K, Jørgensen HG, Vetrie D, Holyoake TL, et al. CML cells actively evade host immune surveillance through cytokine-mediated downregulation of MHC-II expression. *Blood* (2017) 129:199–208. doi: 10.1182/blood-2016-09-742049

159. Steidl C, Shah SP, Woolcock BW, Rui L, Kawahara M, Farinha P, Johnson NA, Zhao Y, Telenius A, Neriah SB, et al. MHC class II transactivator CIITA is a recurrent gene fusion partner in lymphoid cancers. *Nature* (2011) 471:377–381. doi: 10.1038/nature09754

160. Cloppenborg T, Stanulla M, Zimmermann M, Schrappe M, Welte K, Klein C. Immunosurveillance of childhood ALL: polymorphic interferon-γ alleles are associated with age at diagnosis and clinical risk groups. *Leukemia* (2005) 19:44–48. doi: 10.1038/sj.leu.2403553

161. Mathew NR, Baumgartner F, Braun L, O'Sullivan D, Thomas S, Waterhouse M, Müller TA, Hanke K, Taromi S, Apostolova P, et al. Sorafenib promotes graft-versus-leukemia activity in mice and humans through IL-15 production in FLT3-ITD-mutant leukemia cells. *Nat Med* (2018) 24:282–291. doi: 10.1038/nm.4484

162. Jaiswal S, Jamieson CHM, Pang WW, Park CY, Chao MP, Majeti R, Traver D, van Rooijen N, Weissman IL. CD47 Is Upregulated on Circulating Hematopoietic Stem Cells and Leukemia Cells to Avoid Phagocytosis. *Cell* (2009) 138:271–285. doi: 10.1016/j.cell.2009.05.046

163. Casey SC, Tong L, Li Y, Do R, Walz S, Fitzgerald KN, Gouw AM, Baylot V, Gütgemann I, Eilers M, et al. MYC regulates the antitumor immune response through CD47 and PD-L1. *Science* (2016) 352:227–231. doi: 10.1126/science.aac9935

164. Horgan C, Valcárcel D. "Selection of Stem Cell Source.," In: Sureda A, Corbacioglu S, Greco R, Kröger N, Carreras E, editors. *The EBMT Handbook: Hematopoietic Cell Transplantation and Cellular Therapies*. Cham (CH): Springer (2024) http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK608319/ [Accessed March 3, 2025]

165. Gorin NC, Carreras E, Fernández-Sojo J, Villa J. "Bone Marrow Harvesting for HCT.," In: Sureda A, Corbacioglu S, Greco R, Kröger N, Carreras E, editors. *The EBMT Handbook: Hematopoietic Cell Transplantation and Cellular Therapies*. Cham (CH): Springer (2024) http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK608245/ [Accessed March 3, 2025]

166. Worel N, Bilgin YM, Wuchter P. "Mobilization and Collection of HSC.," In: Sureda A, Corbacioglu S, Greco R, Kröger N, Carreras E, editors. *The EBMT Handbook: Hematopoietic Cell Transplantation and Cellular Therapies*. Cham (CH): Springer (2024) http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK608247/ [Accessed March 3, 2025]

167. Xu Z, Huang X. Optimizing allogeneic grafts in hematopoietic stem cell transplantation. *Stem Cells Transl Med* (2021) 10:S41–S47. doi: 10.1002/sctm.20-0481

168. Lang P, Schumm M, Pierini A, Handgretinger R. "Graft Manipulation.," In: Sureda A, Corbacioglu S, Greco R, Kröger N, Carreras E, editors. *The EBMT Handbook: Hematopoietic Cell Transplantation and Cellular Therapies*. Cham (CH): Springer (2024) http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK608261/ [Accessed March 3, 2025]

169. Vriesendorp HM. Aims of conditioning. *Exp Hematol* (2003) 31:844–854. doi: 10.1016/s0301-472x(03)00229-7

170. Anchoo C, Lev A, Simon AJ, Levy S, Mandola A, Frizinsky S, Somekh I, NaserEddin A, Adwan RSA, Toren A, et al. Outcome of hematopoietic stem cell transplantation for severe combined immunodeficiency and impact of newborn screening on overall survival: A single referral center study. *J Allergy Clin Immunol* (2025)S0091-6749(25)00118–6. doi: 10.1016/j.jaci.2025.01.029

171. Bacigalupo A, Ballen K, Rizzo D, Giralt S, Lazarus H, Ho V, Apperley J, Slavin S, Pasquini M, Sandmaier BM, et al. DEFINING THE INTENSITY OF CONDITIONING REGIMENS : working definitions. *Biol Blood Marrow Transplant J Am Soc Blood Marrow Transplant* (2009) 15:1628–1633. doi: 10.1016/j.bbmt.2009.07.004

172. Marks DI, Forman SJ, Blume KG, Pérez WS, Weisdorf DJ, Keating A, Gale RP, Cairo MS, Copelan EA, Horan JT, et al. A comparison of cyclophosphamide and total body irradiation with etoposide and total body irradiation as conditioning regimens for patients undergoing sibling allografting for acute lymphoblastic leukemia in first or second complete remission. *Biol Blood Marrow Transplant J Am Soc Blood Marrow Transplant* (2006) 12:438–453. doi: 10.1016/j.bbmt.2005.12.029

173. Shouval R, Fein JA, Cho C, Avecilla ST, Ruiz J, Tomas AA, Sanchez-Escamilla M, Flores NC, Yáñez L, Barker JN, et al. The Simplified Comorbidity Index: a new tool for prediction of nonrelapse mortality in allo-HCT. *Blood Adv* (2022) 6:1525–1535. doi: 10.1182/bloodadvances.2021004319

174. Sorror ML, Maris MB, Storer B, Sandmaier BM, Diaconescu R, Flowers C, Maloney DG, Storb R. Comparing morbidity and mortality of HLA-matched unrelated donor hematopoietic cell transplantation after nonmyeloablative and myeloablative conditioning: influence of pretransplantation comorbidities. *Blood* (2004) 104:961–968. doi: 10.1182/blood-2004-02-0545

175. Hegenbart U, Niederwieser D, Sandmaier BM, Maris MB, Shizuru JA, Greinix H, Cordonnier C, Rio B, Gratwohl A, Lange T, et al. Treatment for acute myelogenous leukemia by low-dose, total-body, irradiation-based conditioning and hematopoietic cell transplantation from related and unrelated donors. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol* (2006) 24:444–453. doi: 10.1200/JCO.2005.03.1765

176. Mielcarek M, Martin PJ, Leisenring W, Flowers MED, Maloney DG, Sandmaier BM, Maris MB, Storb R. Graft-versus-host disease after nonmyeloablative versus conventional hematopoietic stem cell transplantation. *Blood* (2003) 102:756–762. doi: 10.1182/blood-2002-08-2628

177. Spyridonidis A, Labopin M, Savani BN, Niittyvuopio R, Blaise D, Craddock C, Socié G, Platzbecker U, Beelen D, Milpied N, et al. Redefining and measuring transplant conditioning intensity in current era: a study in acute myeloid leukemia patients. *Bone Marrow Transplant* (2020) 55:1114–1125. doi: 10.1038/s41409-020-0803-y

178. Shimoni A, Radici V, Nagler A. “Conditioning.,” In: Sureda A, Corbacioglu S, Greco R, Kröger N, Carreras E, editors. *The EBMT Handbook: Hematopoietic Cell Transplantation and Cellular Therapies*. Cham (CH): Springer (2024) http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK608297/ [Accessed March 3, 2025]

179. Blancho G, Dantal J, Taupin JL. “Cibles et mécanismes d’action des immunosuppresseurs,.” *Immunologie fondamentale et immunopathologie - Collège des Enseignants en Immunologie*. Elsevier-Masson (2023)

180. Cronstein BN, Aune TM. Methotrexate and its mechanisms of action in inflammatory arthritis. *Nat Rev Rheumatol* (2020) 16:145–154. doi: 10.1038/s41584-020-0373-9

181. Blaise D, Nguyen S, Bay J-O, Chevallier P, Contentin N, Dhédin N, Duléry R, Eliaou J-F, Rubio M-T, Suarez F, et al. [Allogeneic stem cell transplantation from an HLA-haploidentical related donor: SFGM-TC recommendations (Part 1)]. *Pathol Biol (Paris)* (2014) 62:180–184. doi: 10.1016/j.patbio.2014.05.004

182. Notarantonio AB, Morisset S, Piucco R, Pérès M, Boulangé L, Alitcher A, Brouard J, Monchablon L, Campidelli A, El Ouahabi S, et al. Differential Clinical and Immunological Impacts of Anti–T-Lymphocyte Globulin (ATLG) vs. Anti-Thymocyte Globulin (ATG) in Preventing Graft-Versus-Host Disease Post-Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplantation: A Comparative Study. *Am J Hematol* n/a: doi: 10.1002/ajh.27619

183. Nowak J. Role of HLA in hematopoietic SCT. *Bone Marrow Transplant* (2008) 42:S71–S76. doi: 10.1038/bmt.2008.288

184. Dickinson AM, Middleton PG, Rocha V, Gluckman E, Holler E, Members E. Genetic polymorphisms predicting the outcome of bone marrow transplants. *Br J Haematol* (2004) 127:479–490. doi: 10.1111/j.1365-2141.2004.05216.x

185. Gam R, Shah P, Crossland RE, Norden J, Dickinson AM, Dressel R. Genetic Association of Hematopoietic Stem Cell Transplantation Outcome beyond Histocompatibility Genes. *Front Immunol* (2017) 8: doi: 10.3389/fimmu.2017.00380

186. Admiraal R, Nierkens S, de Witte MA, Petersen EJ, Fleurke G, Verrest L, Belitser SV, Bredius RGM, Raymakers RAP, Knibbe CAJ, et al. Association between anti-thymocyte globulin exposure and survival outcomes in adult unrelated haemopoietic cell transplantation: a retrospective, pharmacodynamic cohort analysis. *Lancet Haematol* (2017) 4:e183–e191. doi: 10.1016/S2352-3026(17)30029-7

187. Admiraal R, Nierkens S, Bierings MB, Bredius RGM, van Vliet I, Jiang Y, Lopez-Yurda M, Versluijs AB, Zwaan CM, Lindemans CA, et al. Individualised dosing of anti-thymocyte globulin in paediatric unrelated allogeneic haematopoietic stem-cell transplantation (PARACHUTE): a single-arm, phase 2 clinical trial. *Lancet Haematol* (2022) 9:e111–e120. doi: 10.1016/S2352-3026(21)00375-6

188. Lima BA. Calculated Human Leucocyte Antigens Evolutionary Divergence (cHED). *OBM Transplant* (2024) 8:1–11. doi: 10.21926/obm.transplant.2401208

189. Roerden M, Nelde A, Heitmann JS, Klein R, Rammensee H-G, Bethge WA, Walz JS. HLA Evolutionary Divergence as a Prognostic Marker for AML Patients Undergoing Allogeneic Stem Cell Transplantation. *Cancers* (2020) 12:1835. doi: 10.3390/cancers12071835

190. Owen J, Punt J, Stranford S. "Complexe majeur d'histocompatibilité et présentation de l'antigène,." *Immunologie - Le cours de Janis Kuby*. Dunod. p. 261–298

191. Oostvogels R, Lokhorst HM, Mutis T. Minor histocompatibility Ags: identification strategies, clinical results and translational perspectives. *Bone Marrow Transplant* (2016) 51:163–171. doi: 10.1038/bmt.2015.256

192. Cieri N, Hookeri N, Stromhaug K, Li L, Keating J, Díaz-Fernández P, Gómez-García de Soria V, Stevens J, Kfuri-Rubens R, Shao Y, et al. Systematic identification of minor histocompatibility antigens predicts outcomes of allogeneic hematopoietic cell transplantation. *Nat Biotechnol* (2024) doi: 10.1038/s41587-024-02348-3

193. Mesnard L, Muthukumar T, Burbach M, Li C, Shang H, Dadhania D, Lee JR, Sharma VK, Xiang J, Suberbielle C, et al. Exome Sequencing and Prediction of Long-Term Kidney Allograft Function. *PLoS Comput Biol* (2016) 12:e1005088. doi: 10.1371/journal.pcbi.1005088

194. Reynisson B, Alvarez B, Paul S, Peters B, Nielsen M. NetMHCpan-4.1 and NetMHCIIpan-4.0: improved predictions of MHC antigen presentation by concurrent motif deconvolution and integration of MS MHC eluted ligand data. *Nucleic Acids Res* (2020) 48:W449–W454. doi: 10.1093/nar/gkaa379

195. Nilsson JB, Kaabinejadian S, Yari H, Kester MGD, van Balen P, Hildebrand WH, Nielsen M. Accurate prediction of HLA class II antigen presentation across all loci using tailored data acquisition and refined machine learning. *Sci Adv* (2023) 9:eadj6367. doi: 10.1126/sciadv.adj6367

196. Maniangou B, Retière C, Gagne K. Next-generation sequencing technology a new tool for killer cell immunoglobulin-like receptor allele typing in hematopoietic stem cell transplantation. *Transfus Clin Biol J Soc Francaise Transfus Sang* (2018) 25:87–89. doi: 10.1016/j.tracli.2017.07.005

197. Marin WM, Hollenbach JA. Software update: Interpreting killer-cell immunoglobulin-like receptors from whole genome sequence data with PING. *HLA* (2023) 101:441–448. doi: 10.1111/tan.14949

198. Wagner I, Schefzyk D, Pruschke J, Schöfl G, Schöne B, Gruber N, Lang K, Hofmann J, Gnahm C, Heyn B, et al. Allele-Level KIR Genotyping of More Than a Million Samples: Workflow, Algorithm, and Observations. *Front Immunol* (2018) 9: doi: 10.3389/fimmu.2018.02843

199. Schetelig J, Baldauf H, Heidenreich F, Hoogenboom JD, Spellman SR, Kulagin A, Schroeder T, Sengeloev H, Dreger P, Forcade E, et al. Donor KIR genotype based outcome prediction after allogeneic stem cell transplantation: no land in sight. *Front Immunol* (2024) 15: doi: 10.3389/fimmu.2024.1350470

200. Hilton HG, Parham P. Missing or altered self: human NK cell receptors that recognize HLA-C. *Immunogenetics* (2017) 69:567–579. doi: 10.1007/s00251-017-1001-y

201. Pereira R, Oliveira J, Sousa M. Bioinformatics and Computational Tools for Next-Generation Sequencing Analysis in Clinical Genetics. *J Clin Med* (2020) 9:132. doi: 10.3390/jcm9010132

202. Tollefsen S, Hotta K, Chen X, Simonsen B, Swaminathan K, Mathews II, Sollid LM, Kim C-Y. Structural and functional studies of trans-encoded HLA-DQ2.3 (DQA1*03:01/DQB1*02:01) protein molecule. *J Biol Chem* (2012) 287:13611–13619. doi: 10.1074/jbc.M111.320374

203. Tadros DM, Racle J, Gfeller D. Predicting MHC-I ligands across alleles and species: How far can we go? (2024) doi: 10.1101/2024.05.08.593183

LISTE DES VALORISATIONS ACADÉMIQUES

Liste des publications

KIR in Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplantation: Need for a Unified Paradigm for Donor Selection. Front Immunol. 2022 Feb 15;13:821533. Dhuyser A, Aarnink A, Pérès M, Jayaraman J, Nemat-Gorgani N, Rubio MT, Trowsdale J, Traherne J. doi: 10.3389/fimmu.2022.821533.

Comparison of NK alloreactivity prediction models based on KIR-MHC interactions in haematopoietic stem cell transplantation. Front Immunol. 2023 Mar 2;14:1028162. Dhuyser A, Remen T, Pérès M, Chamberlain-Evans V, Nemat-Gorgani N, Campidelli A, Clément S, Rubio MT, Trowsdale J, Aarnink A, Traherne J. doi: 10.3389/fimmu.2023.1028162.

Efficacy of Wharton Jelly Mesenchymal Stromal Cells infusions in moderate to severe SARS-Cov-2 related acute respiratory distress syndrome: a phase 2a double-blind randomized controlled trial. Front Med (Lausanne). 2023 Aug 29;10:1224865. Pochon C, Laroye C, Kimmoun A, Reppel L, Dhuyser A, Rousseau H, Gauthier M, Petitpain N, Chabot JF, Valentin S, de Carvalho Bittencourt M, Peres M, Aarnink A, Decot V, Bensoussan D, Gibot S. doi: 10.3389/fmed.2023.1224865.

Leukemia relapse via genetic immune escape after allogeneic hematopoietic cell transplantation. Nat Commun. 2023 May 31;14(1):3153. Pagliuca S, Gurnari C, Hercus C, Hergalant S, Hong S, Dhuyser A, D'Aveni M, Aarnink A, Rubio MT, Feugier P, Ferraro F, Carraway HE, Sobecks R, Hamilton BK, Majhail NS, Visconte V, Maciejewski JP. doi: 10.1038/s41467-023-38113-4.

AlloPipe and its werbserver allogenomics.com : from genomic data to minor histocompatibility antigens. Dhuyser A., Laville P., Delaugère P., Clerc R., Aarnink A., Mesnard L., Richard H. *[en préparation pour re-soumission à « HLA – immune response » après rejet « Nuclear Acid Research » le 17/02/2025]*

Liste des communications orales

EFI Amsterdam – Mai 2022 : Application of the major predictive scoring strategies assessing KIR-based NK alloreactivity in donor/recipient couples. Adèle Dhuyser, Alice Aarnink, Michaël Pérès, Vitalina Chamberlain-Evans, Neda Nemat-Gorgani, Marie-Thérèse Rubio, John Trowsdale, James Traherne

JE SFHI Bordeaux – Octobre 2022 : Projet « AlloPipe », dans le cadre de l'obtention de la bourse de recherche de la SFHI

SFGM-TC Lille – Novembre 2023 : Allopipe provides new insights in alloreactivity and related immune processes. Adèle Dhuyser, Pierre Delaugère, Alice Aarnink, Laurent Mesnard, Hugues Richard

EFI Genève – Mai 2024 : AlloPipe provides new insights in alloreactivity and related immune processes. Adèle Dhuyser, Pierre Delaugère, Alice Aarnink, Laurent Mesnard, Hugues Richard

Liste des posters

young EFI Berlin – Novembre 2022 : Application of the major predictive scoring strategies assessing KIR-based NK alloreactivity in donor/recipient couples
Adèle Dhuyser, Alice Aarnink, Michaël Pérès, Vitalina Chamberlain-Evans, Neda Nemat-Gorgani, Marie-Thérèse Rubio, John Trowsdale, James Traherne

SFI/DGfI Strasbourg – Septembre 2023 :

- "Understand alloreactivity – an educational website to teach and learn alloreactivity"

Adèle Dhuyser, Cassandra Michel, Alice Aarnink

- "AlloPipe: from genomic data to minor histocompatibility antigens."

Adèle Dhuyser, Alice Aarnink, Pierre Delaugere, Pierre Laville, Laurent Mesnard, Hugues Richard

SFT Brest – Décembre 2023: Comprendre l'alloréactivité – un site internet pour apprendre et enseigner l'alloréactivité. Adèle Dhuyser, Cassandra Michel, Alice Aarnink

EFI Genève – Mai 2024 : Understand alloreactivity – an educational website to teach and learn alloreactivity. Adèle Dhuyser, Cassandra Michel, Alice Aarnink

COSTEM Berlin – Octobre 2024 : AlloPipe: from genomic data to minor histocompatibility antigens. Adèle Dhuyser, Alice Aarnink, Pierre Delaugere, Pierre Laville, Laurent Mesnard, Hugues Richard

LISTE DES VALORISATIONS NON ACADÉMIQUES

Création d'une biocollection

A la prise du poste d'AHU au laboratoire HLA de Nancy, et pour les besoins du projet « AlloPipe », nous avons initié l'ensemble des démarches nécessaires à la création d'une biocollection. Celle-ci a été déclarée auprès du ministère de la Recherche et de l'Enseignement Supérieur et est identifiée DC-2020-4068. Il s'agit d'une biocollection pseudonymisée qui permet de requalifier le surplus d'ADN extrait dans le cadre du soin en échantillons de recherche. Elle est destinée à héberger des paires donneur/receveur apparentées dans le cadre de l'allo-HCT. Nous avons traité l'ensemble des formalités administratives et réglementaires inhérentes à la création de cette biocollection et encadré les trois techniciennes qui nous ont épaulées dans ce travail. A ce jour, nous avons biobanqué environ 220 paires.

Création d'un webserver pour l'outil « AlloPipe »

Un des objectifs de la thèse était de prolonger le développement de l'outil bioinformatique appelé « AlloPipe ». L'utilisation en ligne de commande nécessite des bases en bioinformatiques dont manquent la plupart des professionnels de santé. Afin de promouvoir cet outil plus largement au sein de la communauté médicale, nous avons développé un site internet – webserver – permettant de lancer les analyses sur un serveur. J'ai conceptualisé le site internet et rédigé la documentation, tandis que Pierre Laville – bioinformaticien de l'équipe CoRaKiD – et Bérenger Piedagnel – développeur full-stack freelance – ont collaboré pour sa réalisation.
https://allogenomics.com/

Maintien du dépôt GitHub

Bonne pratique standard en bioinformatique, le code est disponible à tous en open-source. La plateforme hébergeant nos informations s'appelle GitHub : il s'agit d'un espace collaboratif où chacun peut évaluer notre outil, relever des comportements inattendus ou suggérer des améliorations.
https://github.com/huguesrichard/Allopipe

Organisation d'une rencontre nationale « allogenomics »

Nous avons organisé une rencontre nationale rassemblant en présentiel une vingtaine d'acteurs de la transplantation autour de la thématique « allogénomique ». Il s'agissait du premier rassemblement de ce type, permettant de faire interagir des biologistes spécialisés en HLA, des bioinformaticiens et des transplanteurs. Cette rencontre a permis de faire un tour d'horizon des différentes sensibilités des acteurs intervenant dans la transplantation, notamment concernant le partage, la mutualisation et la gestion des données produites. https://allogenomics.sciencesconf.org/

Réalisation d'exomes au laboratoire HLA du CHRU de Nancy

Toujours dans le cadre du projet « AlloPipe », nous avons produit au laboratoire HLA du CHRU de Nancy les librairies de 80 exomes. Après avoir mis en place la technique avec Sandra Clément, l'ingénieure de notre équipe, ce sont deux techniciennes de notre laboratoire, Justine Cottet et Julie Menet, qui ont réalisé ces manips. Cela a souligné la possibilité de réaliser ces analyses complexes dans l'environnement du laboratoire HLA et ce avec de très bonnes performances, malgré l'absence d'automate assistant habituellement la préparation de ces librairies.

Site internet Sanofi

Nous avons bénéficié du soutien financier de Sanofi pour la création d'un site internet pédagogique dédié à l'alloréactivité. Celui-ci est à destination des professionnels de santé en formation ou en dehors du domaine de l'allogreffe. Il a été pensé dans un premier temps pour la transplantation d'organes solides (orientation principalement rénale), en français puis traduit en anglais par les équipes de Sanofi. Ce site a pour vocation à être estampillé « formation SFHI ». La partie dédiée à l'allo-HCT est en cours de livraison. Nous avons rédigé les contenus, conçu les visuels et encadré plusieurs personnes pour leur réalisation. Nous avons travaillé en étroite collaboration avec l'agence de communication en santé Atout21, notamment Anselma Boulanger et Patrick Cathala, pour l'intégration de ces contenus sous la forme d'un site internet qui se veut interactif et ludique.
https://ressources.campus.sanofi.fr/transplantation/comprendre-l-alloreactivite/fr/
https://ressources.campus.sanofi.fr/transplantation/comprendre-l-alloreactivite/en/

Soumission des nouveaux allèles

Mon arrivée en tant qu'AHU a été l'occasion de mener une « campagne » de soumission des nouveaux allèles séquencés au laboratoire HLA de Nancy. Nous avons fait l'inventaire rétrospectif de tous les nouveaux allèles potentiels séquencés au laboratoire et procédé à un séquençage mono-allélique le cas échéant. Cela a permis au service de publier une trentaine de nouveaux allèles.

Awards et financements

Le Pr Aarnink a reçu 50.000€ de la part du GIRCI-Est dans le cadre de l'appel à projets Emergence 2021 « Jeune Chercheur » sur les résultats préliminaires du projet « AlloPipe » permettant le financement de nouveaux exomes (haplo-identiques).
A titre personnel, j'ai reçu une bourse DrEAM (4.000€) de l'université de Lorraine destinée à promouvoir la mobilité des doctorants à l'étranger. Le projet « AlloPipe » a également été récompensé de la 3éme place du concours IA du CHRU de Nancy ainsi que de la bourse de recherche SFHI attribuée à l'occasion des journées éducationnelles.

Réseaux collaboratifs

A travers les différents projets exposés dans ce manuscrit, nous avons développé des collaborations avec les équipes suivantes, couronnées de publications ou de soumission proches :

- Le "Department of pathology" de Cambridge (Cambridge, UK) dirigé par Dr John Trowsdale et Dr James Traherne dans le cadre du projet sur les KIR.

- L'hôpital Tenon et l'université de la Sorbonne, au travers du projet AlloPipe

- Le Robert Koch Institut

- Le "Department of hepatology and gastroenterology" de la Charité (Berlin, Allemagne) dirigé par Dr Adrien Guillot, dans le cadre du projet AlloPipe

- Le "Department of hepatobiliary and pancreatic surgery" du First hospital of Jilin University (Jilin, China), en particulier le Dr Lanlan Chen, également dans le cadre du projet AlloPipe

Compatibilité donneur/receveur en dehors du polymorphisme HLA au décours de l'allogreffe de cellules hématopoïétiques: les gènes KIR et les antigènes mineurs d'histocompatibilité (FR 4000 caractères)

L'alloréactivité au décours de l'allogreffe de cellules hématopoïétiques (allo-HCT) résulte d'incompatibilités donneur/receveur. Le typage HLA (*HLA, Human Leukocyte Antigen*) pour l'établissement de la compatibilité immunogénétique est au centre du processus du choix du donneur mais apparait insuffisant pour prédire l'alloréactivité. La possibilité de survenue d'une réaction du greffon contre l'hôte (GVH) parfois sévère dans les couples géno-identiques impose la considération d'autres systèmes de compatibilité dont ce travail explore deux axes. Premièrement, s'agissant de l'alloréactivité médiée par les cellules NK (*NK, Natural Killer*), nous avons identifié vingt-sept modèles de prédiction utilisés dans les différentes études, divisés en six catégories : trois dépendantes du typages HLA – les modèles ligand-ligand, récepteur-ligand et éducationnels – et trois indépendantes du HLA basées sur les haplotypes KIR (*KIR, Killer Immunoglobulin-like Receptor*), le contenu en gènes activateurs et inhibiteurs et le polymorphisme allélique. Nous avons appliqué ces modèles à des couples donneur/receveur géno-identiques et haplo-identiques et mesuré leur association, soulignant que certains de ces modèles pouvaient s'opposer. Cette « preuve de concept » originale a permis de mettre en perspective une littérature contradictoire sur l'effet favorable ou défavorable de l'activation supposée des cellules NK au travers du KIR-mismatch dans le couple donneur/receveur. Puis s'agissant de l'alloréactivité médiée par les lymphocytes T, nous avons contribué au développement d'un outil bioinformatique appelé « AlloPipe » et de son interface internet https://allogenomics.com. Cet outil propose de générer un score appelé Allogenomic Mismatch Score (AMS) comptabilisant les polymorphismes génomiques non-synonymes dans un couple donneur/receveur afin d'approximer la charge en antigènes mineurs d'histocompatibilité (mHAgs) pouvant être reconnus par les lymphocytes T au décours d'une allogreffe. Contrairement à la plupart des études réalisées dans ce domaine, le score est calculé sur la base du séquençage de l'exome entier (WES, whole exome sequencing) et non à partir de données de génotypage, ce qui permet une détection plus exhaustive des polymorphismes – notamment des variants rares – dans les régions codantes. L'outil est versatile puisqu'il peut être utilisé à la fois pour l'allo-HCT et la transplantation d'organe solide en modifiant la directionnalité des polymorphismes à considérer – présents chez le receveur mais absents du donneur pour l'effet GVH après allo-HCT, ou présents chez le donneur mais absents du receveur pour le rejet après une transplantation d'organe. Nos travaux ont permis notamment l'implémentation de nouvelles fonctionnalités permettant à l'utilisateur : (i) de choisir la directionnalité pertinente pour le type de transplantation considéré (organe solide ou allo-HCT), (ii) d'utiliser un mode d'imputation pour les données génomiques manquantes, (iii) de soumettre les données sous forme joint VCF afin de traiter les scores en tant que cohorte, (iv) de restreindre le score à des régions génomiques, des variants, des gènes ou des transcrits d'intérêt particulier, (v) de reconstruire les peptides autour des positions génomiques mismatchées, et finalement (vi) d'y associer leur affinité envers le sillon des molécules HLA pour prioriser les peptides avec le plus fort potentiel alloréactif. Nous avons montré qu'un laboratoire d'histocompatibilité était en mesure de réaliser la capture des librairies puis le séquençage d'exomes dans les conditions de la routine hospitalière pour déterminer le score AMS. Nos travaux sur les gènes KIR d'une part et les antigènes mineurs d'histocompatibilité d'autre part soulignent le caractère évolutif du champ de l'histocompatibilité et le potentiel des laboratoires HLA accrédités EFI pour redéfinir et repousser les limites de notre discipline.

Donor/recipient compatibility behind HLA polymorphism in allogeneic hematopoietic cell transplantation: KIR genes and minor histocompatibility antigens (EN, 4000 characters)

Alloreactivity after allogeneic hematopoietic cell transplantation (allo-HCT) results from donor/recipient incompatibilities. Human leukocyte antigen (HLA) typing to determine immunogenetic compatibility is a corner stone of the donor selection process but appears to be insufficient to predict alloreactivity. The possible occurrence of graft-versus-host disease (GVHD) – sometimes severe – in genoidentical couples requires consideration of other compatibility systems, two of which are explored in this work. First, regarding NK cell-mediated alloreactivity (NK, Natural Killer), we identified twenty-seven prediction models used in the different studies, divided into six categories: three dependents on HLA typing - ligand-ligand, receptor-ligand, and educational models - and three independents of HLA typing, based on KIR (Killer Immunoglobulin-like Receptor) haplotypes, activating and inhibitory gene content, and allelic polymorphism. We applied these models to both genoidentical and haploidentical donor/recipient pairs and measured their association, demonstrating that some of these models could oppose each other. This "proof of concept" shed a new light on the conflicting literature on the beneficial or detrimental effect of NK cells activation assumed through the KIR mismatch in the donor/recipient pair. Then, regarding T cell-mediated alloreactivity, we contributed to the development of a bioinformatics tool called "AlloPipe" and its web interface https://allogenomics.com. This tool proposes to generate a score called the Allogenomic Mismatch Score (AMS), which counts non-synonymous genomic polymorphisms in a donor/recipient pair to approximate the load of minor histocompatibility antigens (mHAgs) that can be recognized by T cells after an allograft. Unlike most studies in the field, the score is calculated on whole exome sequencing (WES) data rather than genotyping data, which allows for more comprehensive detection of polymorphisms - especially rare variants - in coding regions. The tool is versatile as it can be used for both allo-HCT and solid organ transplantation by modifying the directionality of the polymorphisms to be considered - present in the recipient but absent in the donor for GVH effect after allo-HCT, or present in the donor but absent in the recipient for rejection after organ transplantation. Our work has enabled the implementation of new functionalities that allow the user to: (i) select the relevant directionality for the type of transplant considered (solid organ or allo-HCT), (ii) use an imputation mode for missing genomic data, (iii) submit the data in joint VCF to process the scores as a cohort, (iv) restrict the score to genomic regions, variants, genes or transcripts of particular interest, (v) reconstruct the peptides around the mismatched genomic positions, and finally (vi) associate their affinity towards HLA binding grooves to prioritize the peptides with the highest alloreactive potential. We demonstrated that a histocompatibility laboratory is able to perform library capture and exome sequencing under routine hospital conditions, allowing the calculation of the AMS. Our work on both KIR genes and minor histocompatibility antigens underscores the evolving nature of the histocompatibility field and the potential of EFI-accredited HLA laboratories to redefine and push the boundaries of our discipline

Compatibilité donneur/receveur en dehors du polymorphisme HLA au décours de l'allogreffe de cellules hématopoïétiques : les gènes KIR et les antigènes mineurs d'histocompatibilité (FR vulgarisé, 1000 caractères)

La transplantation est une procédure visant à pallier une défaillance d'organe ou à remplacer un tissu dysfonctionnel. Parfois, alors même qu'il existe une compatibilité parfaite dans le système utilisé en routine pour l'appariement des donneurs et des receveurs, une activation délétère du système immunitaire reste possible, pouvant menacer le pronostic vital ou la qualité de vie. Nous avons exploré deux systèmes alternatifs pour établir la compatibilité donneur/receveur : les gènes KIR et les résidus protéiques présentés par les molécules HLA appelés « antigènes mineurs d'histocompatibilité ». Notre objectif était d'évaluer leur intérêt et la faisabilité de leur étude dans la pratique médicale. Nos travaux soulignent les limites de ces deux modèles mais valident la possibilité d'utiliser les antigènes mineurs d'histocompatibilité dans la pratique médicale, notamment grâce à un outil informatique que nous avons co-développé.

Donor/recipient compatibility behind HLA polymorphism in allogeneic hematopoietic cell transplantation: KIR genes and minor histocompatibility antigens (basic EN, 1000 characters)

Transplantation is a procedure to compensate for organ failure or to replace dysfunctional tissue. Despite perfect compatibility in the system routinely used to match donors and recipients, deleterious activation of the immune system remains possible, which can threaten vital prognosis or quality of life. We have investigated two alternative systems for establishing donor/recipient compatibility: KIR genes and protein residues presented by HLA molecules called "minor histocompatibility antigens". We aimed to evaluate their interest and the feasibility of their use in medical practice. Our work highlights the limitations of these two models but validates the possibility of using minor histocompatibility antigens in medical practice, thanks to a bioinformatic tool that we co-developed.