

Thèse de Doctorat

Raphaëlle RIOU

*Mémoire présenté en vue de l'obtention du
grade de Docteur de l'Université de Nantes
sous le sceau de l'Université Bretagne Loire*

École doctorale : Biologie-Santé Nantes-Angers

Discipline : Sciences de la Vie et de la Santé

Spécialité : Immunologie

Unité de recherche : EA4271 – Immunovirologie et polymorphisme génétique
Etablissement Français du Sang

Soutenue le 26 septembre 2016

Thèse N° :

Contribution à l'étude du rôle des cellules Natural Killer dans le contrôle de l'infection à cytomégalovirus

JURY

Président du jury:	Sophie CAILLAT-ZUCMAN , PU-PH, Université Paris-Diderot
Rapporteurs :	Delphine SAUCE-LARSEN , Chargée de recherche, HDR, Université Pierre et Marie Curie Nabila JABRANE-FERRAT , Directrice de recherche, HDR, Université Toulouse Purpan
Examineur :	Berthe-Marie IMBERT-MARCILLE , PU-PH, Université de Nantes
Directeur de Thèse :	Christelle RETIERE , Directrice de recherche, HDR, Etablissement Français du Sang, Nantes
Co-directeur de Thèse :	Céline BRESSOLLETTE-BODIN , MCU-PH, Université de Nantes

Remerciements

Je tiens tout d'abord à adresser mes sincères remerciements au Dr Christelle Retière pour m'avoir accueillie dans son laboratoire. Merci de m'avoir accordé ta confiance, apporté ton soutien et prodigué tes conseils tout au long de ces trois années de thèse. J'adresse également mes vifs remerciements au Dr Céline Bressollette pour le co-encadrement de ce travail de thèse, pour m'avoir initiée au versant clinique qu'a impliqué ce travail et pour son expertise CMV. Soyez assurées de ma profonde gratitude.

Je tiens ensuite à remercier les membres du jury pour le temps accordé à l'examen de ce travail de thèse. A Madame Delphine Sauce-Larsen et Madame Nabila Jabrane-Ferrat en qualité de rapporteurs, Madame Sophie Caillat-Zucman et Madame Berthe-Marie Imbert-Marcille en qualité d'examineurs. Soyez assurées de mon profond respect.

Je remercie ensuite l'Etablissement Français du Sang, Monsieur Thierry Schneider, Monsieur Frédéric Dehaut, Madame Caroline Lefort, Monsieur Emmanuel Rivery, pour m'avoir accueillie en son sein et financé une partie des travaux afin de mener ce projet de thèse. Je remercie également la Région des Pays de la Loire pour avoir financé ces trois années de doctorat.

J'adresse ensuite mes remerciements :

- à Katia, pour ton ta gentillesse, ton humour et tes conseils.
- à Nolwenn, Catherine et Gaëlle, pour votre aide, votre soutien, votre présence et votre sympathie.
- à Bercelin, pour les échanges que nous avons eus, je te souhaite une belle réussite pour ta thèse.
- aux membres de l'EA4271, avec une pensée particulière pour Audrey, Marina, Monique et Cécile, notamment pour votre aide avec les échantillons biologiques.
- à Monsieur Xavier Saulquin, Monsieur David Boutolleau, Monsieur David Boutoille pour votre participation à mon comité de thèse et pour les échanges qui en ont découlé.

- aux différents services de l'EFS dont les laboratoires HLA, prélèvement et IUC ainsi qu'à la plateforme de génomique de Nantes qui m'ont permis de mener à bien ce travail.

- à l'équipe de Louvain qui m'a chaleureusement accueillie dans son laboratoire. En particulier, Steven, pour le temps que tu m'as accordé et les échanges très enrichissants que nous avons eu.

- aux donneurs de sang et aux patients, sans qui ce projet n'aurait pu être mené.

Et bien sûr, c'est avec émotion que je remercie :

Gwenn, pour le bout de chemin qui nous a menés de Brest jusqu'ici et pour tout ce qui nous attend ! Ces derniers mois n'ont pas été de tout repos mais ton soutien m'a aidé à surmonter les difficultés. Merci pour ton amour, ta présence, pour tout. Je t'aime.

Mes parents, qui m'avez toujours soutenue, qui avez toujours cru en moi, sans porter de jugement. Merci de m'avoir permis de parvenir jusqu'ici. Tanguy, pour les supers virées européennes et les sacrées tranches de rigolade!! Je te souhaite le meilleur pour la suite. A tous les trois, Merci du fond du cœur.

Ma belle-famille, pour m'avoir intégrée dans votre famille, pour votre soutien et votre gentillesse.

Aux personnes dont l'amitié m'est chère : la bande du Cap, les Lorientais, les Nantais et bien sûr Zakia.

A Gwenn,

A mes parents,

A Tanguy.

Sommaire

Liste des abréviations	4
PREAMBULE	6
INTRODUCTION	13
I. Les cellules NK	14
I.1. Biologie des cellules NK	14
I.1.a. Caractéristiques générales des cellules NK	14
I.1.b. Distribution et sous-populations NK	15
I.1.c. Ontogénie des cellules NK	17
I.1.d. Les récepteurs des cellules NK	20
• Les récepteurs Killer cell Immunoglobulin-like Receptor (KIR).....	21
- Les gènes KIR.....	22
- Les récepteurs KIR	25
- Les ligands KIR	27
• Les récepteurs Immunoglobulin-Like Transcripts (ILT).....	29
• La famille des Natural Cytotoxicity Receptors (NCR)	31
• Les récepteurs du groupe <i>Natural Killer Group 2</i> (NKG2)	35
- Les complexes CD94/NKG2	35
- Le récepteur NKG2D	37
• Le récepteur CD16.....	39
• Molécules de co-stimulation.....	40
- Le récepteur DNAX Accessory Molecule 1 (DNAM-1)	40
- Le récepteur 2B4	41
- Le récepteur CD160	42
- Le récepteur CD161 (NKR-P1A ou KLRB1).....	43
- Le récepteur NKp80.....	44
• Les TLR.....	44
• Les récepteurs aux cytokines et chimiokines	45
I.2. Les fonctions effectrices des cellules NK	46
I.2.a. La cytotoxicité	46
• La lyse spontanée.....	46
- Reconnaissance du soi manquant.....	46
- Reconnaissance du non-soi infectieux	47
- Reconnaissance du soi induit par le stress	47
- La cytotoxicité cellulaire dépendante des anticorps (ADCC).....	47
• Mécanismes effecteurs de la lyse	49
- Exocytose des granules lytiques	49
- L'engagement des récepteurs de mort cellulaire	50
I.2.b. La sécrétion de cytokines et chimiokines	51
I.3. Education, tolérance et mémoire des cellules NK	52
I.3.a. Education et tolérance au soi des cellules NK	52
I.3.b. Propriétés adaptatives des cellules NK	57

I.4. Les cellules NK dans un contexte physiopathologique	59
I.4.a. Les cellules NK et la placentation	59
I.4.b. Les cellules NK et cancer	60
I.4.c. Les cellules NK et transplantation	62
• Les cellules NK en greffe d'organe solide	62
• Les cellules NK en greffe de CSH.....	63
I.4.d. Les cellules NK et les maladies auto-immunes	64
I.4.e. Les cellules NK et les maladies infectieuses	65
• Les infections virales	65
• Les infections bactériennes.....	67
• Les infections parasitaires	68
• Les infections fongiques.....	69
II. Le cytomégalo virus humain	71
II.1. Taxonomie des herpesvirus	71
II.1.a. L'ordre des <i>Herpesvirales</i>	71
II.1.b. La famille des <i>Herpesviridae</i>	72
II.2. Généralités liées au CMV	75
II.2.a. Découverte et isolement du cytomégalo virus humain	75
II.2.b. Structure du virion	76
• Le génome viral	77
• La capside.....	81
• Le tégu ment	82
• L'enveloppe	83
II.2. c. Cycle répl icatif du CMV	84
• Attachement et entrée du CMV	84
• Translocation du génome viral vers le noyau	85
• Phase très précoce du cycle lytique	86
• Phase précoce du cycle lytique	86
• Phase tardive du cycle lytique	87
II.3. L'infection à CMV	89
II.3.a. Epidémiologie de l'infection à CMV	89
II.3.b. Transmission de l'infection à CMV	90
II.3.c. Tropisme cellulaire du CMV	90
II.3.d. Latence et réactivation du CMV	92
II.3.e. Pathogénèse de l'infection à CMV	93
• L'infection à CMV chez l'individu immunocompétent	93
• L'infection congénitale à CMV	94
• L'infection à CMV en transplantation.....	95
• L'infection à CMV chez le patient VIH	96
• L'infection à CMV chez le patient en soins intensifs.....	96
II.4. Le CMV et la réponse immunitaire	97
II.4.a. La réponse immunitaire innée.....	99
• Déclenchement d'un état antiviral	99

• Les cellules dendritiques	101
• La réponse NK.....	103
• La réponse lymphocytaire T $\gamma\delta$	106
II.4.b. La réponse immunitaire adaptative.....	108
• La réponse humorale	108
• La réponse médiée par les lymphocytes T.....	109
- Les lymphocytes T CD4 ⁺	111
- Les lymphocytes T CD8 ⁺	112
II.4.c. Mécanismes d'échappement du CMV à la réponse immunitaire	113
II.5. CMV et Physiopathologie	117
II.5.a. CMV et immunosénescence	117
II.5.b. CMV et cancer	118
II.5.c. Autres maladies associées au CMV	119
II.6. Traitement et prophylaxie de l'infection à CMV	120
OBJECTIFS DU TRAVAIL DE THESE.....	122
RESULTATS	127
PROJET N°1 : Etude du rôle des cellules NK dans le contrôle de l'infection à CMV dans un modèle d'infection des cellules endothéliales primaires	128
PROJET N°2 : La réponse lymphocytaire mise en place au cours de la primo-infection symptomatique à CMV chez l'adulte immunocompétent.....	Erreur ! Signet non défini.
PROJET N°3 : Le polymorphisme viral : impact de la variabilité génétique des souches cliniques de CMV sur la virulence de l'infection.....	Erreur ! Signet non défini.
DISCUSSION ET PERSPECTIVES	Erreur ! Signet non défini.
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	Erreur ! Signet non défini.
ANNEXE	Erreur ! Signet non défini.

Liste des abréviations

A

ADCC: Antibody-Dependent Cell-mediated Cytotoxicity

ADN: Acide désoxyribonucléique

ARN : Acide ribonucléique

B

β₂m: β₂-microglobuline

BCR: B-cell Receptor

C

CD: Cluster de différenciation

CMH : Complexe Majeur d'Histocompatibilité

CMV: Cytomégalo virus

CPA: Cellule Présentatrice d'Antigène

CSH: Cellules Souches Hématopoïétiques

D

DAMP: Danger Associated Molecular Pattern

DAP-10/12: DNAX-Activating Protein-10/12 kDalton

DNAM-1: DNAX Accessory Molecule 1

db: double brin

E

EBV: Epstein-Barr virus

ECP: Effet Cytopathogène

EGFR: Epidermal Growth Factor Receptor

G

G-CSF: Granulocyte Colony-Stimulating Factor

GM-CSF: Granulocyte Macrophage Colony-Stimulating Factor

gp: glycoprotéine

H

HHV: Human Herpes Virus

HLA: Human Leukocyte Antigen

HSP: Heat Shock Protein

HSV: Herpes Simplex Virus

I

IE: Immediate Early

IFN: Interféron

Ig: Immunoglobuline

IL: Interleukine

ILC: Innate Lymphoid Cells

ILT: Immunoglobulin-Like Transcript

IRL: Internal Repeat Long

IRS: Internal Repeat Short

ITAM: Immunoreceptor Tyrosine-based Activation Motif

ITIM: Immunoreceptor Tyrosine-based Inhibition Motif

K

KIR: Killer cell Immunoglobulin-like Receptor

KLRB1: Killer cell Lectin-like Receptor subfamily B member-1

L

LI(L)R: Leukocyte Immunoglobulin-like Receptor

LLT: Lectin-Like Transcript 1

LRC: Leukocyte Receptor Complex

M

MCMV: Cytomégalo­virus murin

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

N

NCAM: Neural Cell Adhesion Molecule

NCR: Natural Cytotoxicity Receptor

NF- κ B: Nuclear Factor-kappa B

NK: Natural Killer

NKC: Natural Killer Complex

NKG2: Natural-Killer Group 2

NKT: Natural Killer T

O

ORF: Open Reading Frame

oriLyt : Origine Lytique de réplication

P

PAMP: Pathogen Associated Molecular Patterns

pb: paires de base

PCR: Polymerase Chain Reaction

PDGFR α : Platelet-Derived Growth Factor Receptor, alpha

PI3-kinase: phosphoinositide 3-kinase

PLC: Progéniteur Lymphoïde Commun

PRR: Pattern Recognition Receptor

R

RE: Réticulum endoplasmique

S

sb: simple brin

SCID: Severe Combined Immunodeficiency

T

TCR: T-cell receptor

TGF: Tumor Growth Factor

TLR: Toll-like receptor

TNF: Tumor Necrosis Factor

TRL: Terminal Repeat Long

TRS: Terminal Repeat Short

U

U_L: Unique Long

ULBP: UL16 Binding Protein

U_S: Unique Short

V

VHC: Virus de l'Hépatite C

VIH: Virus de l'immunodéficience humaine

VEGF: Vascular Endothelial Growth Factor

VZV: Varicella-Zoster Virus

PREAMBULE

Le système immunitaire est un système complexe de défense de l'organisme apparu très tôt dans l'évolution. Le système immunitaire est dédié à la reconnaissance et à l'élimination des dangers qui menacent son hôte et cela de façon dynamique et coordonnée. Ces menaces peuvent être externes, exercées notamment par la diversité des microorganismes pathogènes existants, mais aussi internes par la transformation de cellules saines en cellules tumorales. Le système immunitaire exerce ses fonctions défensives grâce à la multitude de molécules et d'acteurs cellulaires qui le composent, capables de distinguer le « Soi » du « non Soi ». Classiquement, on distingue chez les Vertébrés l'immunité innée, qui réagit de façon précoce et non spécifique à un danger potentiel, de l'immunité adaptative qui se met en place de façon retardée et ciblée.

L'immunité innée constitue la première ligne de défense de l'organisme et permet d'éliminer la quasi-totalité des infections avant qu'elles ne se développent. Les premières défenses de l'hôte à franchir par les pathogènes sont les barrières anatomiques (peau, muqueuses). Les acteurs de l'immunité innée, cellulaires (neutrophiles, monocytes/macrophages, polynucléaires, cellules *Natural Killer* (NK), lymphocytes T gamma-delta ($\gamma\delta$), cellules dendritiques) mais aussi moléculaires (le système du complément) entrent ensuite en jeu. Certains contextes tels que la transformation tumorale peuvent s'accompagner de l'expression aberrante de molécules du soi, d'ordinaire intracellulaires, capables d'être reconnues par les acteurs de l'immunité innée. Ce sont les *Danger Associated Molecular Patterns* (DAMP). Par ailleurs, les effecteurs innés détectent les agents pathogènes de façon non spécifique par leur expression de motifs moléculaires structuraux conservés chez les microbes et absents chez l'hôte, ce sont les *Pathogen Associated Molecular Patterns* (PAMP). Les PAMP sont reconnus par les récepteurs *Pattern Recognition Receptors* (PRR), dont la diversité est limitée. Les récepteurs Toll-like (*Toll-like Receptor*, TLR) sont des PRR par excellence et sont exprimés par toutes les cellules de l'immunité innée. Les travaux de

Jules Hoffman et Bruno Lemaitre ont permis de mettre en évidence l'importance de la réponse immunitaire, médiée par la protéine Toll chez la drosophile, contre des agents pathogènes chez les Invertébrés. Les travaux de Bruce Beutler ont ensuite permis d'identifier les TLR comme un mécanisme à part entière de l'immunité chez les Mammifères. Jusqu'ici onze TLR ont été identifiés chez l'Homme (Figure 1). Chaque TLR détecte un répertoire particulier de motifs d'agent pathogène. Ils agissent comme des senseurs des molécules microbiennes qui, une fois engagés par leur ligand, activent des voies de transduction du signal qui aboutissent à l'expression de gènes qui codent pour des molécules pro-inflammatoires : interleukines 1 et 6 (IL-1, IL-6), *Tumor Necrosis Factor alpha* (TNF- α), interféron gamma (IFN- γ), etc.

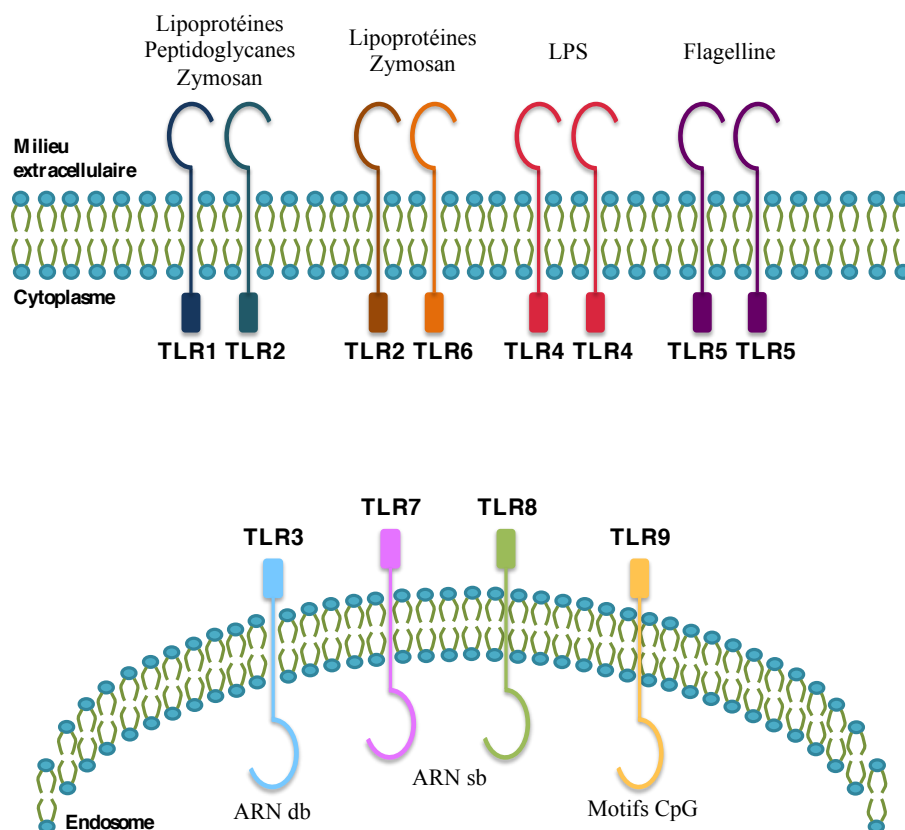


Figure 1 : Les TLR et leurs ligands identifiés chez l'Homme. Onze TLR ont été identifiés jusqu'à présents chez l'Homme. Les TLR reconnaissent des motifs conservés chez les micro-organismes pathogènes, ce qui leur permet d'agir en tant que senseurs des dangers potentiels et transmettre un signal activateur à la cellule qui les porte. Les TLR peuvent être exprimés sous forme de monomères, d'hétérodimères ou d'homodimères. Les ligands des TLR 10 et 11 n'ont pas encore été identifiés.

En plus de combattre le danger qui menace l'hôte de façon spécifique, l'immunité adaptative est dotée d'une mémoire antigénique qui se traduit par la persistance d'un pool lymphocytaire mémoire dans l'organisme, capable de réagir plus rapidement et fortement à une seconde exposition à un même danger. L'immunité adaptative fait intervenir les populations lymphocytaires B, responsables de la réponse humorale, et T $\alpha\beta$, responsables de l'immunité à médiation cellulaire. Elles sont capables de combattre la menace de façon antigène-spécifique. Ce pouvoir est conféré par la recombinaison somatique *et aléatoire* des gènes qui codent pour les récepteurs de reconnaissance de l'antigène, le *B-cell Receptor* (BCR) pour les lymphocytes B et *T-cell Receptor* (TCR) pour les lymphocytes T. Ces réarrangements génétiques sont à l'origine de l'extrême diversité des récepteurs exprimés par ces lymphocytes qui sont armés pour reconnaître et répondre aux multiples dangers qui menacent l'hôte. La rencontre directe du BCR avec son antigène induit la différenciation du lymphocyte B en plasmocyte, sécréteur d'immunoglobulines (Ig) clonales. L'activation des lymphocytes T est quant à elle gouvernée par l'interaction du TCR avec les molécules du complexe majeur d'histocompatibilité de classe I (CMH de classe I) et II (CMH de classe II) qui présentent des peptides immunogènes, complexe qui est exprimé par les cellules présentatrices d'antigènes (CPA). Aussi, les cellules dendritiques assurent le pont entre l'immunité innée et l'immunité adaptative puisque la maturation de celles-ci induite par l'internalisation de l'agent pathogène conduit à l'apprêtement et la présentation de peptides antigéniques par les molécules du CMH aux lymphocytes T.

Le CMH est un système présent chez les Mammifères voué à la présentation antigénique qui permet la distinction du Soi et du non Soi par les lymphocytes T. Chez l'Homme, le CMH est appelé *Human Leukocyte Antigen* (HLA). Il s'agit d'un complexe génique présent sur le chromosome 6 (Figure 2). Les molécules HLA de classe I, codées par les gènes de classe I, sont exprimées par presque toutes les cellules nucléées de l'organisme et

sont reconnues par les lymphocytes T cytotoxiques que sont les lymphocytes T $\alpha\beta$ CD8⁺ (T CD8). Les molécules HLA de classe I classiques (HLA-A, -B et -C) codées par les loci A, B et C, se distinguent des molécules HLA de classe I non classiques (HLA-E à -H). Les molécules HLA de classe I sont constituées d'une chaîne lourde α transmembranaire qui possède trois domaines ($\alpha 1$, $\alpha 2$, $\alpha 3$) et qui nécessite de s'associer avec la β_2 -microglobuline (β_2m) pour l'expression membranaire (Figure 2). Les gènes de classe II des régions DP, DQ et DR codent quant à eux pour les molécules HLA de classe II (HLA-DP, -DQ, -DR) exprimées par les CPA et reconnues par les lymphocytes T auxiliaires tels que les lymphocytes T $\alpha\beta$ CD4⁺ (T CD4). De la même façon que pour les molécules HLA de classe I, il existe des molécules de classe II non classiques qui ont aussi un rôle dans l'immunité. Les molécules HLA de classe II sont composées d'une chaîne α et d'une chaîne β transmembranaires associées de façon non covalente (Figure 2). Une dernière catégorie de gènes, les gènes HLA de classe III, est présent dans le complexe génique HLA et code pour des protéines solubles immunitaires (protéines du complément, TNF- α , etc.). Le complexe HLA est le système le plus polymorphe chez l'Homme. Cela s'explique par le nombre important d'allèles existant pour un même locus. Concernant par exemple le complexe HLA de classe I, 3399 allèles ont été identifiés à ce jour pour HLA-A, 4242 pour HLA-B et 2950 pour HLA-C (<http://www.ebi.ac.uk/ipd/imgt/hla>), ce qui donne un nombre considérable de combinaisons alléliques possibles. Un niveau supplémentaire de diversité du répertoire HLA est donné par la transmission en haplotype, groupe d'allèles portés par un chromosome, à la descendance, l'un provenant de la mère et l'autre du père.

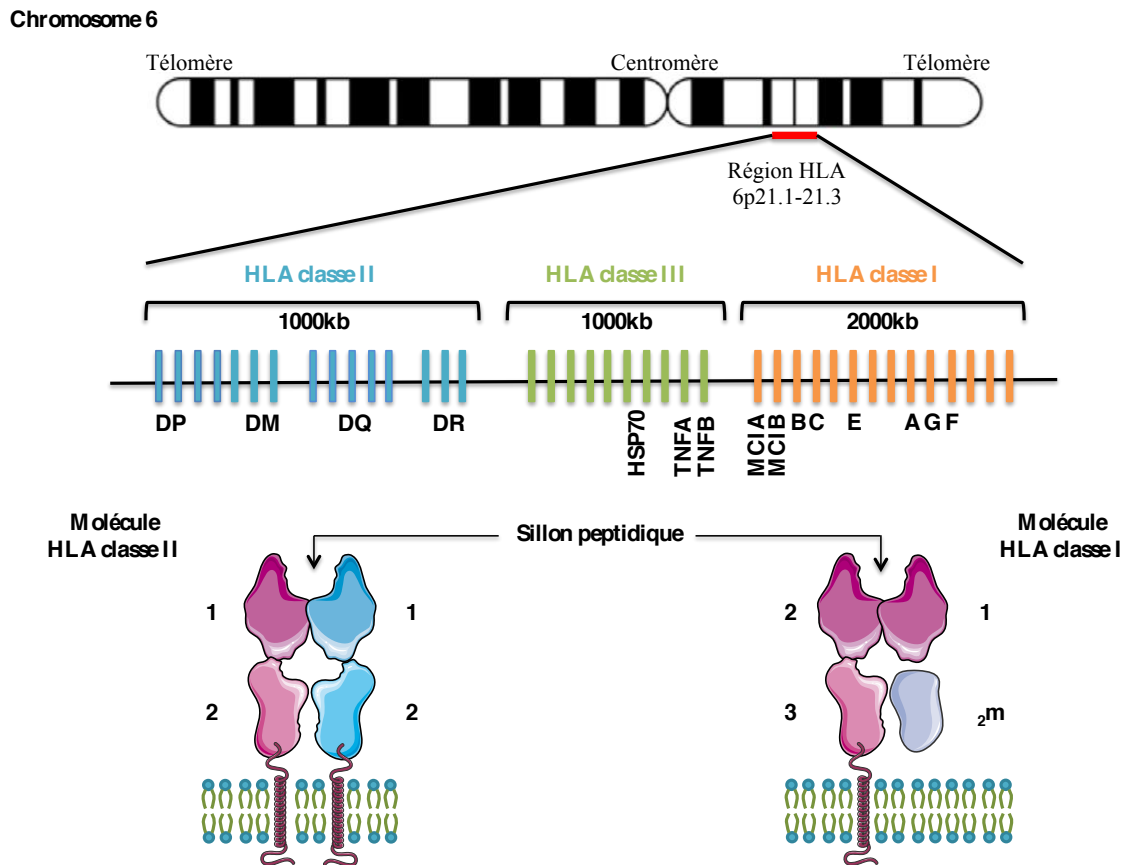


Figure 2 : Carte génomique du complexe HLA et représentation schématique de la structure des molécules HLA. Le complexe HLA est porté par le bras court du chromosome 6 et comporte trois régions dont la première code pour les molécules HLA de classe II (HLA-DP, -DQ et -DR), la seconde pour des protéines pro-inflammatoires telles que les protéines de choc thermique (*Heat Shock Protein*, HSP) et les *Tumor Necrosis Factor* (TNF), et la troisième pour les molécules HLA de classe I classiques (HLA-A, -B et -C) et non classiques (MICA/B, HLA-E, -F, -G, -H).

Dans le cadre de ce travail de thèse, nous nous sommes intéressées à la compréhension du fonctionnement des cellules NK, figure prépondérante de l'immunité innée, et de leur rôle dans la défense de l'organisme humain. De façon similaire aux lymphocytes T CD8⁺, la reconnaissance des molécules HLA de classe I est l'un des mécanismes senseurs employés par les cellules NK pour détecter et se défendre contre le non soi et le soi anormal. Nous nous sommes particulièrement focalisées sur la contribution des cellules NK au contrôle de l'infection à cytomégalo virus (CMV). En effet, le CMV témoigne d'une apparente innocuité chez l'individu sain, tant au niveau de la phase aigüe de l'infection comme au moment de la

primo-infection qu'au niveau de la phase latente qu'il parvient à instaurer malgré une forte mobilisation de l'ensemble des effecteurs immuns. De plus, le CMV semble subir une forte pression immunitaire qui protège l'organisme, comme en témoignent les graves manifestations cliniques qui surviennent dans un contexte d'immunosuppression ou d'infection congénitale. Cependant, l'infection à CMV induit de profondes modulations de la distribution cellulaire au sein des différents compartiments lymphocytaires et de profondes perturbations métaboliques des cellules dans lesquelles il établit sa latence. A travers cette introduction, nous allons aborder la biologie de chacun de ces protagonistes ainsi que certaines des relations qu'ils entretiennent.

INTRODUCTION

I. Les cellules NK

I.1. Biologie des cellules NK

I.1.a. Caractéristiques générales des cellules NK

Les cellules NK ont initialement été identifiées comme des effecteurs cytotoxiques distincts des lymphocytes B et T puisque capables de lyser des cellules tumorales sans sensibilisation antigénique préalable, d'où leur appellation de cellules « tueuses naturelles » (Kiessling *et al.*, 1975 ; Herberman *et al.*, 1975).

Au cours de l'hématopoïèse, le progéniteur lymphoïde commun (PLC) donne naissance aux cellules NK et aux lymphocytes B et T (Galy *et al.*, 1995 ; Kondo *et al.*, 1997). Les cellules NK sont de grands lymphocytes riches en granules lytiques qui, contrairement aux lymphocytes B et T, ne possèdent pas de récepteurs génétiquement réarrangés. Elles exercent une activité cytotoxique non spécifique envers les cellules infectées par des micro-organismes pathogènes ou des cellules néoplasiques et sont, de ce fait, considérées comme membres de l'immunité innée. Récemment, elles ont été classées comme membre du groupe I des cellules lymphoïdes innées (*Innate Lymphoid Cells*, ILC). Elles se distinguent des ILC du groupe II et III par leur capacité à sécréter des cytokines de type 1 (IFN- γ , TNF) mais pas de cytokines de type 2 (IL-4, IL-13) ou d'IL-17 ni IL-22 (Spits and Di Santo, 2011).

Les cellules NK ont la capacité d'induire l'apoptose de leurs cellules cibles par la libération de la perforine et des granzymes, contenus dans leurs granules cytoplasmiques, ou par l'engagement des récepteurs de mort exprimés par les cellules cibles (Lanier, 2005). Outre leur activité lytique envers leurs cellules cibles, les cellules NK ont également une activité d'immunomodulation par les cytokines (IFN- γ , TNF- α , IL-10), chimiokines (CCL2-5, XCL1, CXCL8) et facteurs de croissance (GM-CSF, G-CSF) qu'elles sécrètent (Walzer *et al.*, 2005).

Elles-mêmes sont régulées par leur environnement cytokinique : l'IL-2, -12, -15, -18 et les IFN de type I sont de puissants promoteurs des fonctions des cellules NK tandis que le TGF- β en est un inhibiteur. La prolifération, la cytotoxicité, la sécrétion de cytokines et la survie des cellules NK sont régulées par un répertoire sophistiqué de récepteurs qui implique différents mécanismes effecteurs.

I.1.b. Distribution et sous-populations NK

Les cellules NK constituent 5 à 20% des lymphocytes du sang périphérique et sont caractérisées d'un point de vue phénotypique par l'expression du récepteur CD56 (*Neural Cell Adhesion Molecule*, NCAM) et l'absence du marqueur CD3 (Lanier *et al.*, 1989; Ritz *et al.*, 1988), ce qui permet de distinguer les populations lymphocytaires circulantes par cytométrie en flux (Figure 3). Le renouvellement des cellules NK dans le sang s'effectue environ toutes les deux semaines (Zhang *et al.*, 2007). Bien que les cellules NK sont aussi présentes dans les organes lymphoïdes (ganglions lymphatiques, rate, amygdales, etc.) (Ferlazzo *et al.*, 2004) et dans certains tissus (foie, placenta, muqueuses, peau, etc.) (Shi *et al.*, 2011), nous nous intéresserons ici aux cellules NK circulantes.

Deux sous-populations NK sont classiquement définies chez l'Homme d'après leurs caractéristiques phénotypiques et fonctionnelles et leur distribution anatomique. Elles diffèrent par la densité de l'expression du marqueur CD56 à leur surface. On distingue ainsi les sous-populations NK CD56^{Bright} et CD56^{Dim}. Peu cytotoxique, la sous-population NK CD56^{Bright} qui compte environ 10% des NK périphériques est majoritaire dans les organes lymphoïdes secondaires et exerce une activité immunomodulatrice par la sécrétion de cytokines (IFN- γ , TNF- α , IL-10) après stimulation par l'IL-12 et 15 (Anfossi *et al.*, 2006; Cooper *et al.*, 2001). L'expression de la L-sélectine (CD62L) et du récepteur aux chimiokines CCR7 pourrait expliquer la distribution tissulaire des cellules NK CD56^{Bright}. Les NK

CD56^{Dim} représentent quant à elle environ 90% des NK circulantes et spléniques et sont minoritaires dans les tissus. Elles expriment de la perforine et des granzymes ainsi que le récepteur au fragment Fc des anticorps CD16 (FcγRIII), qui est impliqué dans la cytotoxicité cellulaire dépendante des anticorps (*Antibody-Dependant Cellular Cytotoxicity*, ADCC). Ces NK exercent une activité cytotoxique par la lyse des cellules cibles et la production d'IFN-γ. Les NK CD56^{Dim} expriment des récepteurs aux chimiokines tels que CXCR1 et CX3CR1 qui permettent leur recrutement au niveau des zones d'inflammation (Moretta, 2002; Vitale *et al.*, 2004). Ces molécules seront abordées ultérieurement dans un chapitre dédié aux récepteurs NK. Les NK CD56^{Bright} représenteraient un stade de différenciation intermédiaire des cellules NK et la sous-population CD56^{Dim} l'étape de maturation terminale (Béziat *et al.*, 2011).

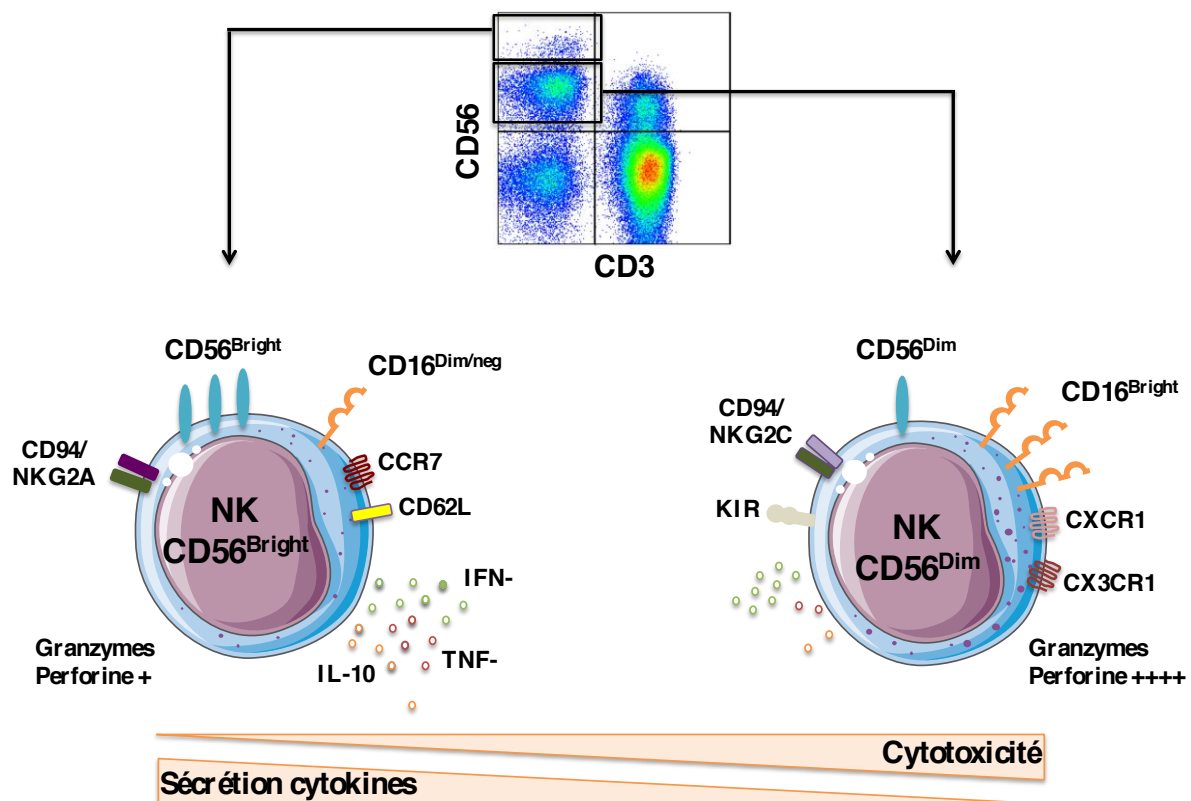


Figure 3 : Les sous-populations NK majoritaires. La sous-population NK CD56^{Dim}CD16^{Bright}, majoritaire en périphérie, est dotée d'une forte capacité cytotoxique et sécrète peu de cytokines. A l'inverse, la sous-population NK CD56^{Bright}CD16^{Dim/neg} est fortement représentée dans les organes

lymphoïdes secondaires, grâce notamment à l'expression du récepteur à la chimiokine CCR7. Elle exprime peu ou pas de CD16 et est peu cytotoxique mais peut sécréter de grandes quantités de cytokines.

I.1.c. Ontogénie des cellules NK

Le développement des cellules NK débute dans le foie fœtal puis dans la moelle osseuse après la naissance. Les cellules NK dérivent d'un progéniteur CD34⁺ commun aux lymphocytes B et T et se développent dans la moelle osseuse en grande partie avant d'achever leur maturation en périphérie. Contrairement aux lymphocytes T, les NK n'exigent pas d'étape de maturation thymique. D'autres sites de développement NK ont aussi été évoqués comme le foie (Pegram *et al.*, 2011), le thymus (Vosshenrich *et al.*, 2006) ou les ganglions lymphatiques (Freud *et al.*, 2005), sans que l'on ne sache s'il s'agit de voies ontogéniques distinctes ou de populations immatures dérivées de la moelle osseuse.

L'IL-15 est cruciale pour la différenciation, la maturation fonctionnelle et la survie NK. Le récepteur à l'IL-15 est composé de trois sous-unités : la chaîne α de forte affinité (CD215), la chaîne β (CD122) commune aux récepteurs à l'IL-15 et IL-2, et la chaîne γ_c (CD132) commune à différents récepteurs aux IL (IL-2, -4, -7, -9 et l'IL-15). Chez la souris, l'absence d'IL-15 ou la présence d'un récepteur à l'IL-15 non fonctionnel induit une déficience en cellules NK (Kennedy *et al.*, 2000; Lodolce *et al.*, 1998). De même, les individus qui portent une mutation dans le gène codant pour la chaîne γ_c ou β , voient leur nombre de cellules NK chuter drastiquement (Buckley, 2004; Gilmour *et al.*, 2001). Le signal délivré par l'IL-15 passe par un mécanisme de trans-présentation où l'IL-15, associée à la membrane plasmique de la cellule présentatrice grâce à la chaîne α , interagit avec le complexe formé par les chaînes β et γ_c exprimé par la cellule NK (Dubois *et al.*, 2002; Huntington *et al.*, 2009).

La différenciation des cellules NK a d'abord été documentée grâce à des études chez la souris. Chez l'Homme, des études *in vitro* menées à partir de cellules souches hématopoïétiques (CSH) ainsi qu'*in vivo* par le monitoring de la reconstitution NK après greffe de CSH ont permis d'étudier le développement NK. Cinq stades de différenciation ont été proposés par Freud et Caligiuri et reposent sur l'expression des marqueurs CD34, CD117 (c-kit), CD94, et CD16 (Freud and Caligiuri, 2006; Yu *et al.*, 2013) (Figure 4). Le développement des cellules NK est caractérisé par l'acquisition et la perte séquentielle de récepteurs à la surface cellulaire. Les capacités fonctionnelles des cellules NK sont acquises lors des derniers stades du développement.

Le progéniteur NK le plus précoce, le stade 1 ou pro-NK, est issu du PLC et est caractérisé par une forte expression du marqueur CD34 mais ne porte pas les marqueurs CD117, CD94 et CD16. Ces cellules n'expriment pas le CD122, la chaîne β des récepteurs à l'IL-2 et IL-15, et ne sont donc pas sensibles à l'IL-15. Les facteurs de transcription comme PU.1 et E4BP4 seraient impliqués dans l'engagement du PLC vers la différenciation NK.

Les cellules pro-NK se différencieraient ensuite en cellules pré-NK par l'interaction avec les ligands de Flt3, de l'IL-3 et de l'IL-7 (Freud *et al.*, 2006). Le phénotype des NK de stade 2 est marqué par l'acquisition du marqueur CD122, qui leur confère la sensibilité à l'IL-15, et du marqueur CD117. Le facteur de transcription Id2 jouerait un rôle important dans le passage des cellules pré-NK au stade suivant.

Le stade 3 correspond à la différenciation des cellules pré-NK en cellules NK immatures et marque l'engagement définitif des cellules dans la voie NK. En effet, les deux stades précédents seraient encore en mesure de s'engager vers la lignée T ou des cellules dendritiques *in vitro* (Freud *et al.*, 2006). Les NK immatures perdent l'expression du marqueur CD34 mais n'expriment pas encore le marqueur CD94. Certains récepteurs

caractéristiques des NK ou impliqués dans les réponses fonctionnelles commencent à apparaître : CD56, CD161, 2B4, NKp44. Les NK immatures expriment les facteurs de transcription T-bet et Eomes qui sembleraient conditionner la maturation NK (Di Santo, 2006).

Les derniers stades de différenciation de la lignée NK correspondent aux cellules NK CD56^{Bright}, stade 4, et cellules NK CD56^{Dim}, stade 5. Le stade 4 correspond à l'acquisition par les NK immatures des récepteurs CD94/NKG2A, NKp46 et NKG2D. Les granules lytiques sont détectables dans leur cytoplasme, tout comme la production d'IFN- γ . Les cellules NK CD56^{Dim} quant à elles expriment les récepteurs KIR et CD16. Le facteur de transcription Gata-3 a récemment été décrit comme indispensable à la phase terminale de maturation NK qui conditionne la sortie des cellules de la moelle osseuse (Ali *et al.*, 2016).

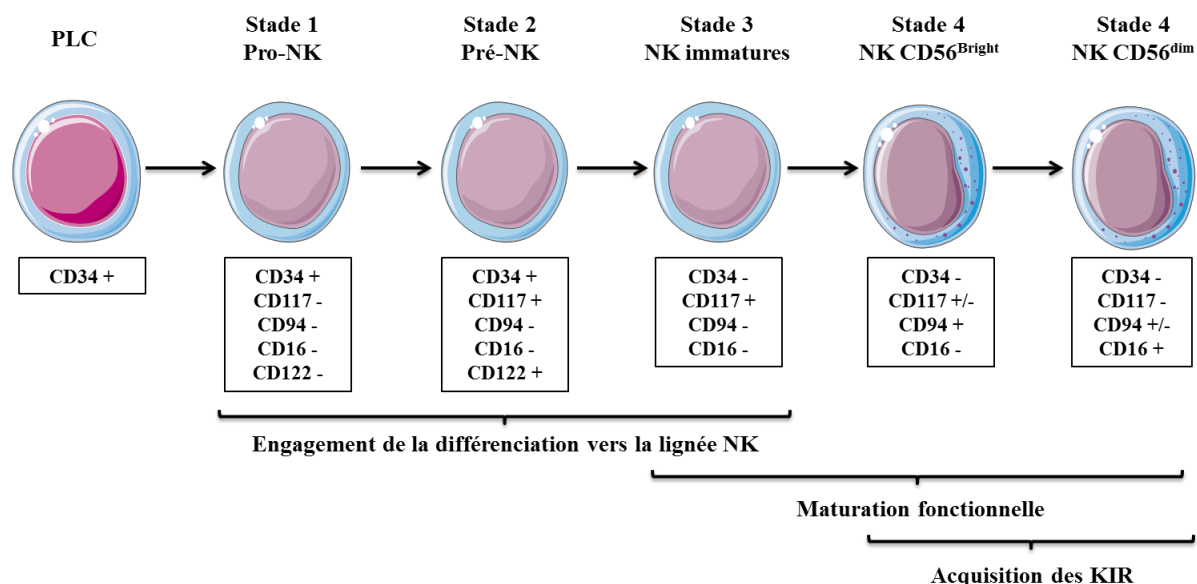


Figure 4 : Les cinq stades du développement des cellules NK proposés par Freud et Caliguri (2006). Comme les lymphocytes B et T, les cellules NK dérivent du PLC de la moelle osseuse. Les cellules NK acquièrent progressivement leurs capacités cytotoxiques jusqu'à l'acquisition des récepteurs KIR et du récepteur CD16 dans les derniers stades de la différenciation cellulaire.

I.1.d. Les récepteurs des cellules NK

Les cellules NK distinguent le soi du non soi par une multitude de récepteurs inhibiteurs et activateurs. Ces derniers peuvent aussi être exprimés par des populations lymphocytaires T, essentiellement T CD8 et T $\gamma\delta$, ainsi que par la population lymphocytaire non conventionnelle *Natural Killer T* (NKT). La réponse NK est initiée par son attachement à la cellule cible potentielle. L'intégration des signaux perçus par les récepteurs activateurs et inhibiteurs NK avec leurs ligands disponibles détermine l'issue du comportement NK. La balance de l'engagement des récepteurs avec leurs ligands et l'affinité de ces interactions conditionnent l'état d'activation, de prolifération et les fonctions effectrices des cellules NK. Les membres des différentes familles de récepteurs identifiés à la surface NK sont exprimés de façon aléatoire, donnant ainsi lieu à un répertoire NK très hétérogène. Une étude récente a estimé qu'entre 6000 à 35000 sous-populations NK de phénotype différent seraient présentes dans le sang circulant d'un même individu (Horowitz *et al.*, 2013). Deux grands complexes géniques codent pour la plupart des récepteurs NK : le *Leukocyte Receptor Complex* (LRC) et le *Natural Killer Complex* (NKC). Le premier est porté par le chromosome 19 (19q13) et contient les gènes qui codent pour des récepteurs de la superfamille Immunoglobulines (KIR, ILT, Nkp46). Le second, situé sur le chromosome 12 (12p13), comporte des gènes qui codent pour des récepteurs de la famille des lectines de type C (CD94, NKG2) (Figure 5).

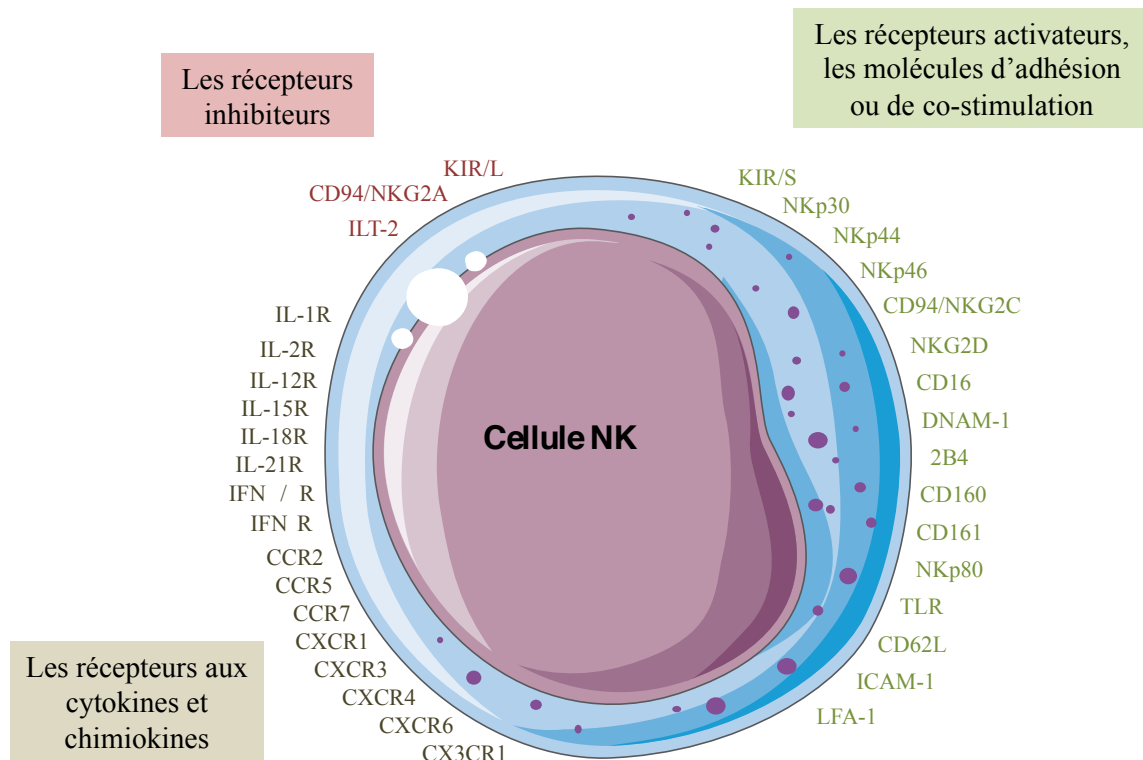


Figure 5 : Les récepteurs des cellules NK. Les cellules NK expriment de nombreux récepteurs à leur surface membranaire. Ces récepteurs gouvernent la biologie des cellules NK en contrôlant notamment la survie et les fonctions effectrices des cellules NK. Certains de ces récepteurs inhibiteurs, activateurs, d'adhésion, de co-stimulation ou encore des récepteurs aux cytokines et chimiokines sont illustrés ici.

- Les récepteurs Killer cell Immunoglobulin-like Receptor (KIR)

Les récepteurs KIR sont des glycoprotéines transmembranaires responsables de la transduction d'un signal activateur ou inhibiteur selon les motifs qu'ils portent au niveau de leur queue intracytoplasmique. Le complexe KIR a rapidement évolué chez l'humain et n'est pas retrouvé chez la souris. Cependant, des récepteurs de fonction similaire sont exprimés chez la souris, il s'agit du complexe Ly49 porté par le chromosome 12 murin. Grâce à la reconnaissance des molécules HLA de classe I, les récepteurs KIR sont impliqués dans le mécanisme de la reconnaissance du soi manquant, l'éducation et la tolérance des cellules NK. Les récepteurs KIR apparaissent à la surface des cellules NK à la fin de leur processus de

différenciation (Sivori *et al.*, 2003). Ils sont également exprimés par les lymphocytes T $\gamma\delta$ et certaines sous-populations mémoires T $\alpha\beta$ (Uhrberg *et al.*, 2001).

- Les gènes *KIR*

Il existe quinze gènes codant pour les récepteurs KIR (2DL1- 4, 2DL5A et B, 2DS1- 5, 3DL1- 3 et 3DS1) ainsi que 2 pseudo-gènes (2DP1, 3DP1). Ces gènes occupent une région de 100 à 200kpb du LRC (19q13.4). Les gènes KIR s'étendent sur 4 à 16kpb et comportent 4 à 9 exons. Les deux premiers exons codent pour la séquence signal de la protéine. Les exons 3, 4 et 5 codent respectivement pour les domaines Ig-like extracellulaires D0, D1 et D2. Les exons 6 à 9 codent quant à eux pour les segments transmembranaires et la queue cytoplasmique des récepteurs KIR (Figure 6). Trois types de gènes KIR se distinguent selon les propriétés structurales des protéines pour lesquelles ils codent. Les gènes KIR de type 1 codent pour des protéines composées de deux domaines extracellulaires Ig-like D1 et D2 (2DL1- 3, 2DS1- 5 et 2DP1). Ces gènes contiennent 8 exons et un pseudoxon 3, inactif. Les gènes KIR de type 2 codent quant à eux pour des protéines qui présentent les domaines D0 et D2 dans leur partie extracellulaire : ce sont les KIR2DL4 et 2DL5. L'exon 3 est exprimé dans ces gènes tandis que l'exon 4 est délété. Quant aux gènes KIR de type 3, les protéines pour lesquelles ils codent contiennent 3 domaines extracellulaires : D0, D1 et D2. Ces gènes incluent les KIR3DL1-3 et 3DS1 et comprennent 9 exons.

Le locus KIR présente un fort polymorphisme. En effet, le contenu en gènes KIR est soumis à une variabilité interindividuelle. Cela pourrait s'expliquer par la duplication de gènes ou par des *crossing-over* facilités par les similarités observées dans les séquences et la proximité des gènes au sein du LRC (Martin *et al.*, 2003). Ainsi, deux haplotypes KIR ont été identifiés, les haplotypes A et B, dont le nombre et la composition en gènes KIR varie d'un individu à l'autre. Quatre gènes sont toujours présents et délimitent deux régions variables

dans le contenu en gènes KIR, ce sont les KIR3DL3, à l'extrémité centromérique, puis les KIR3DP1 et KIR2DL4 en position centrale et le KIR3DL2 à l'extrémité télomérique. L'haplotype A présente en plus des 4 gènes cités ci-dessus les gènes KIR2DL1, 2DL3, 3DL1, 2DS4 et 2DP1. L'haplotype B témoigne d'une plus grande variabilité et présente un ou plusieurs des gènes suivants : 2DL2, 2DL5 A et B, 2DS1, 2DS2, 2DS3, 2DS5, 3DS1. Un degré supplémentaire de polymorphisme du locus KIR est conféré par les nombreux allèles que possède chaque gène KIR. Le polymorphisme allélique est d'ailleurs plus élevé pour les KIR inhibiteurs.

L'expression des récepteurs KIR est hautement variable selon les individus et dépend du contenu en gènes KIR, du nombre de copies de ces gènes et de leur polymorphisme. Leur expression est gouvernée par des mécanismes épigénétiques régulateurs de la transcription (Chan *et al.*, 2003; Santourlidis *et al.*, 2002). De plus, les récepteurs KIR sont exprimés de façon aléatoire et clonale à la surface des cellules NK (Cicone *et al.*, 1992; Moretta *et al.*, 1990). Ainsi, tous les gènes KIR contenus dans le génome d'un individu ne sont pas tous également distribués à la surface des cellules NK, ce qui génère un grand nombre de clones au sein de la population NK (Uhrberg *et al.*, 1997).

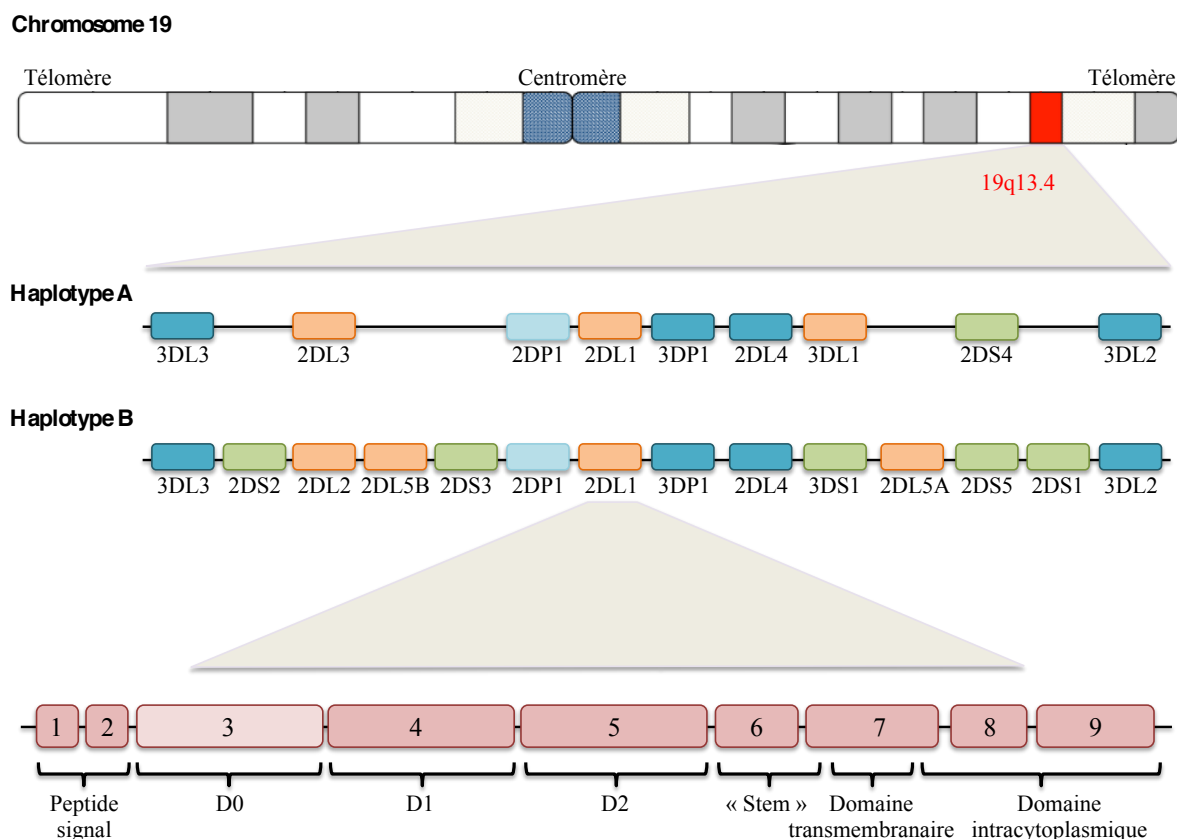


Figure 6 : Les gènes KIR. Les gènes KIR sont portés par le chromosome 19 et se situent dans le LRC. Les gènes KIR3DL3, 3DP1, 2DL4 et 3DL2 sont toujours présents et délimitent deux régions variables en gènes KIR (bleu foncé). Les gènes KIR2DP1 (bleu clair) et 3DP1 sont des pseudo-gènes. Deux haplotypes KIR, les haplotypes A et B, se distinguent selon leur contenu en gènes KIR. Un exemple de chaque haplotype est illustré ici. L'haplotype A possède un seul KIR activateur (vert), le KIR2DS4, et des KIR inhibiteurs (orange). L'haplotype B possède un contenu en gènes KIR inhibiteurs et activateurs plus variable, dont l'exemple le plus complet est illustré ici. Les gènes KIR contiennent 4 à 9 exons. Les 8 exons du gène KIR2DL1 figurent ici, ainsi que le pseudo-exon 3. Les deux premiers exons codent pour le peptide signal. Les exons 4 et 5 codent pour les domaines extracellulaires D1 et D2, le pseudo-exon 3 codant pour le domaine D0 lorsqu'il est présent. L'exon 6 et une partie de l'exon 7 codent pour la partie « stem » qui relie le domaine D2 à la région transmembranaire, elle-même codée par une partie de l'exon 7. Enfin, une portion de l'exon 7 et les exons 8 et 9 codent pour la partie intracytoplasmique de la protéine.

- Les récepteurs KIR

Selon la nomenclature internationale, les récepteurs KIR sont nommés d'après le nombre de domaines extracellulaires qu'ils portent : KIR2D ou KIR3D, et selon la longueur de leur queue cytoplasmique qui est longue (*Long*, L ; KIR2DL, KIR3DL) ou courte (*Short*, S ; KIR2DS, KIR3DS) (Figure 7). La longue queue cytoplasmique est pourvue de deux motifs *Immunoreceptor Tyrosine-based Inhibition Motif* (ITIM) qui confèrent une activité inhibitrice aux récepteurs KIR2DL et KIR3DL. Le motif ITIM contient des résidus tyrosines qui sont la cible des kinases de la famille Src. Les tyrosines phosphorylées permettent ensuite le recrutement de phosphatases *SH2 containing protein-tyrosine Phosphatase* (SHP) -1 ou SHP-2 *via* leur domaine SH2. Cela résulte en l'inactivation par déphosphorylation de différentes protéines de signalisation intracellulaire comme FcεRγ, ZAP70, Syk, etc. Ce mode d'inhibition du signal et des fonctions NK est employé par les autres récepteurs inhibiteurs NK. Au contraire, les récepteurs KIR pourvus d'une courte région cytoplasmique s'associent à la protéine adaptatrice DAP12 qui présente un motif *Immunoreceptor Tyrosine-based Activation Motif* (ITAM). Après la phosphorylation des résidus tyrosines du motif ITAM, les kinases Syk et ZAP70 sont recrutées par leur domaine SH2 et transduisent le signal activateur initié par la liaison du KIR à son ligand, qui se traduit par l'afflux de calcium intra cytoplasmique, la dégranulation et la sécrétion de cytokines. Cette voie de signalisation est également empruntée par les récepteurs activateurs NK qui peut être induite par d'autres protéines adaptatrices porteuses d'un motif ITAM telles que les chaînes CD3ζ et FcεRγ.

Le KIR2DL4 fait figure d'exception, avec la transduction d'un signal activateur malgré la présence d'un motif ITIM sur la longue queue cytoplasmique (Faure and Long, 2002; Yusa *et al.*, 2002). Le KIR2DL4 peut s'associer à la protéine adaptatrice FcεRγ qui porte des motifs ITAM. L'engagement du KIR2DL4 avec un anticorps spécifique agoniste

provoque la sécrétion d'IFN- γ par les cellules NK (Kikuchi-Maki *et al.*, 2003). Il s'agit également d'un récepteur exprimé de façon constitutive par les cellules NK CD56^{Bright}.

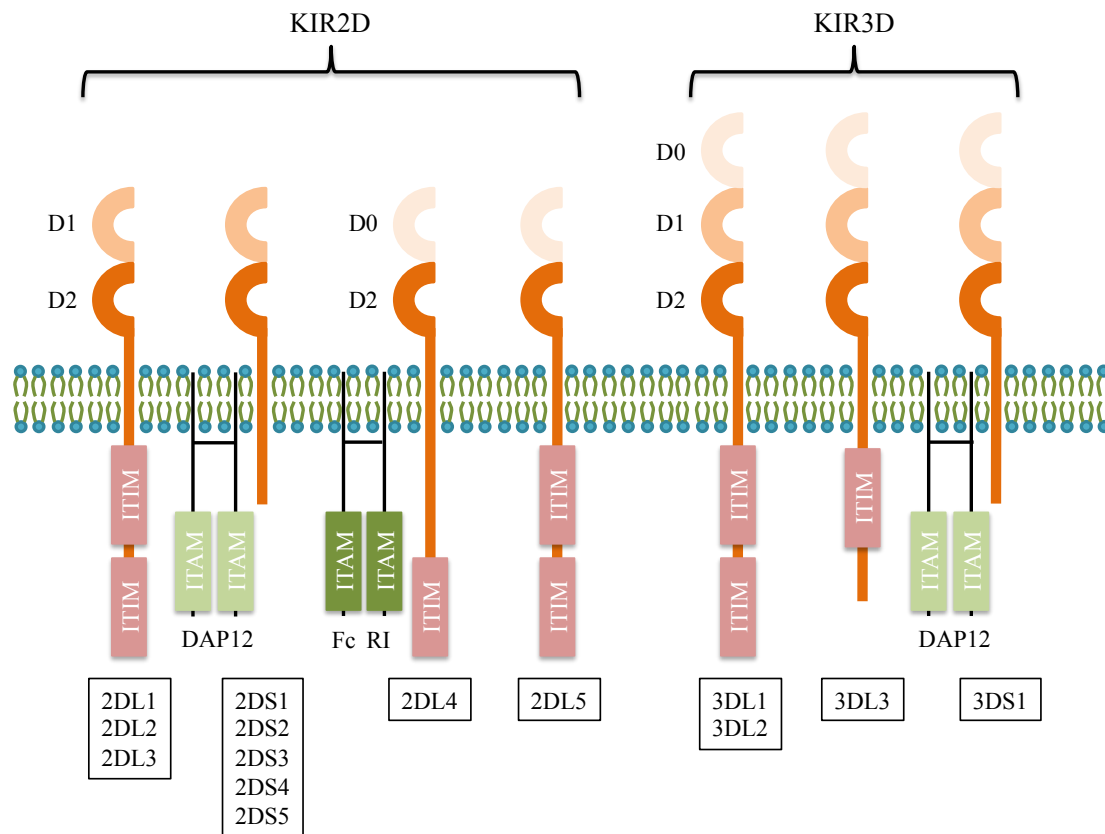


Figure 7: Structure des récepteurs KIR. Les récepteurs KIR comportent deux ou trois domaines extracellulaires (KIR2/3D). La longueur de la queue cytoplasmique détermine la fonction activatrice (courte, *short*, KIR2/3DS) ou inhibitrice (longue, *long*, KIR2/3DL) du récepteur. La partie intracytoplasmique des récepteurs KIR activateurs s'associe à des protéines adaptatrices (DAP12, FcRI) qui portent des motifs ITAM, à l'origine de la transmission d'un signal activateur. Les récepteurs KIR inhibiteurs portent, eux, un ou deux motifs ITIM, responsables de la transmission d'un signal inhibiteur.

- Les ligands KIR

Les récepteurs KIR inhibiteurs reconnaissent les molécules HLA de classe I et sont capables de les distinguer au niveau allélique. Les récepteurs KIR2D s'associent aux molécules HLA-Cw. Le KIR2DL1 reconnaît les molécules HLA-Cw du groupe C2, caractérisés par la présence d'un résidu asparagine en position 77 et d'une lysine en position 80 dans la séquence peptidique de la chaîne $\alpha 1$ de la molécule HLA-C. Les KIR2DL2 et 2DL3 reconnaissent quant à eux les molécules HLA-Cw du groupe C1, qui portent une sérine en position 77 et un résidu asparagine en position 80 (Colonna *et al.*, 1993) (Figure 8). Le KIR2DL2 aurait une meilleure affinité pour les molécules HLA-C que le KIR2DL3 (Moesta *et al.*, 2008; Schönberg *et al.*, 2011). Cela peut notamment s'expliquer par le polymorphisme allélique des gènes KIR à l'origine de variations dans la séquence en acides aminés (Frazier *et al.*, 2013). Par ailleurs, il a été montré que les récepteurs KIR2DL2 et 2DL3 peuvent aussi interagir avec certaines molécules HLA-Cw du groupe C2, comme celles codées par les allèles HLA-C*05:01 et HLA-C*02:02 (Moesta *et al.*, 2008). Notre groupe a également montré que les récepteurs KIR2DL2 et 2DL3 reconnaissent mieux la molécule codée par l'allèle HLA-C*04 :01, du groupe C2, que d'autres molécules HLA-Cw du groupe C1 (David *et al.*, 2013). Ces récepteurs présenteraient donc une spécificité plus large que le KIR2DL1. Quant au KIR2DL4, il reconnaît la molécule HLA de classe I non classique HLA-G (Rajagopalan and Long, 1999). Le KIR3DL1 réagit avec les molécules HLA-B et HLA-A qui portent un motif Bw4. Enfin, le KIR3DL2 reconnaît les molécules HLA-A3 et -A11 (Gumperz *et al.*, 1995; Pende *et al.*, 1996), mais est aussi impliqué dans la liaison aux motifs CpG (Sivori *et al.*, 2010). Le ligand du KIR3DL3 demeure inconnu.

L'homologie de séquence observée entre les gènes des KIR inhibiteurs et activateurs devrait prédire une spécificité de ligand similaire. Cependant, les ligands des récepteurs KIR activateurs sont moins bien caractérisés que ceux des KIR inhibiteurs. La reconnaissance

d'épitopes HLA-Cw a été démontrée pour les KIR2DS1 et KIR2DS4. De la même façon que le KIR2DL1, le KIR2DS1 reconnaît les molécules HLA-Cw du groupe C2 (Chewning *et al.*, 2007; Pende *et al.*, 2009). Cette interaction a également été confirmée par notre équipe (Morvan *et al.*, 2008). Au cours d'un précédent travail mené au sein de notre laboratoire, notre équipe a pu déterminer que le KIR2DS2 interagit avec les molécules HLA-Cw du groupe C1 (David *et al.*, 2013). Le KIR2DS4 lie différentes molécules HLA-Cw du groupe C1 et C2 et HLA-A11 (Graef *et al.*, 2009). Les ligands des récepteurs KIR2DS3, 2DS5 et 3DS1 ne sont pas encore déterminés.

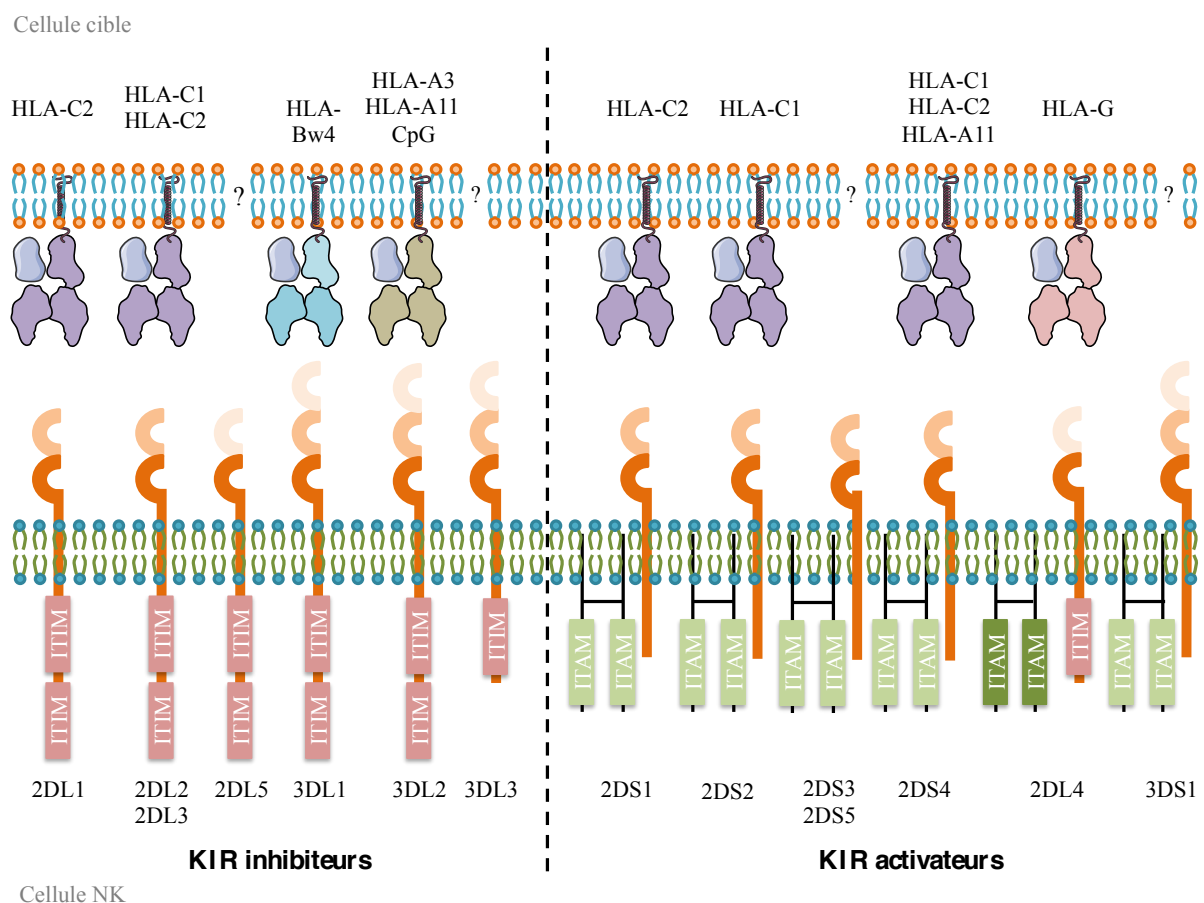


Figure 8 : Les ligands des récepteurs KIR. Les récepteurs KIR2DL1 et 2DS1 reconnaissent les molécules HLA-Cw du groupe C2. Les récepteurs KIR2DL2, 2DL3 et 2DS2 reconnaissent les molécules HLA-Cw du groupe C1. Il a également été mis en évidence que les récepteurs KIR2DL2 et 2DL3 pouvaient reconnaître des molécules HLA-Cw du groupe C2. Les récepteurs KIR3DL1

interagissent avec les molécules HLA de classe I qui portent un motif Bw4. Il a été observé que les molécules HLA-A3, HLA-A11 et les motifs CpG pouvaient être reconnus par le KIR3DL2. Le KIR activateur KIR2DS4 reconnaît certaines molécules HLA-Cw du groupe C1 et C2 ainsi que HLA-A11. Quant au récepteur KIR2DL4, il interagit avec la molécule HLA de classe I non classique HLA-G. Les ligands des récepteurs KIR2DL5, 3DL3, 2DS3, 2DS5 et 3DS1 n'ont pas encore été identifiés.

- Les récepteurs Immunoglobulin-Like Transcripts (ILT)

La famille des récepteurs ILT (LILR, LIR (*Leukocyte Immunoglobulin-like Receptor*), ou CD85) compte 13 membres, inhibiteurs ou activateurs, qui présentent une homologie structurale avec les KIR. En effet, ce sont également des récepteurs de la superfamille des Ig. De plus, les gènes codant pour les récepteurs ILT sont juxtaposés au locus KIR sur le chromosome 19q13.4. Seul le récepteur ILT-2 (LILRB1) est exprimé par les cellules NK. Il est aussi distribué sur les monocytes/macrophages, les polynucléaires, les cellules dendritiques, certaines sous-populations B et les macrophages décidaux (Colonna *et al.*, 1997; Katz, 2006). La molécule ILT-2 est un récepteur inhibiteur qui présente quatre domaines Ig extracellulaires et quatre motifs ITIM dans sa portion cytoplasmique (Borges *et al.*, 1997; Colonna *et al.*, 1997; Cosman *et al.*, 1997; Samaridis and Colonna, 1997). Les molécules HLA de classe I classiques et non classiques sont connues pour interagir avec ILT-2 avec une faible affinité (Lepin *et al.*, 2000; Shiroishi *et al.*, 2003; Willcox *et al.*, 2003). L'affinité est toutefois supérieure entre ILT-2 et HLA-(Gonen-Gross *et al.*, 2005; Shiroishi *et al.*, 2003), d'autant plus si ce dernier se présente sous forme d'un dimère (Shiroishi *et al.*, 2003). L'interaction inhibitrice entre ILT-2 et HLA-G au cours de la grossesse semble importante pour l'induction de la tolérance maternelle au fœtus (Petroff *et al.*, 2002; Ponte *et al.*, 1999). La structure cristallographique de l'interaction ILT-2/HLA-A2 a permis de montrer que le domaine D1 de ILT-2 interagit avec la sous-unité $\alpha 3$ des molécules HLA de classe I mais aussi avec la β_2m , de concert avec le domaine D2 (Willcox *et al.*, 2003) (Figure 9). Le récepteur ILT-2 est également capable de reconnaître des protéines homologues aux

molécules HLA de classe I, comme la protéine du CMV gpUL18 qui lie ILT-2 avec 1000 fois plus d'affinité que les autres ligands HLA de classe I (Chapman *et al.*, 1999a; Cosman *et al.*, 1997). L'activation de ILT-2 transduit un signal inhibiteur au sein de la cellule NK qui se traduit par l'inhibition de la polarisation des granules lytiques, par blocage de l'organisation du cytosquelette au niveau de la zone de contact avec la cellule cible, mais aussi par l'inhibition de la mobilisation du calcium intracellulaire et de la sécrétion d'IFN- γ (Favier *et al.*, 2010; Morel and Bellón, 2008). Enfin, ILT-2 pourrait coopérer avec d'autres récepteurs inhibiteurs tels que les KIR pour potentialiser la répression des fonctions NK (Kirwan and Burshtyn, 2005).

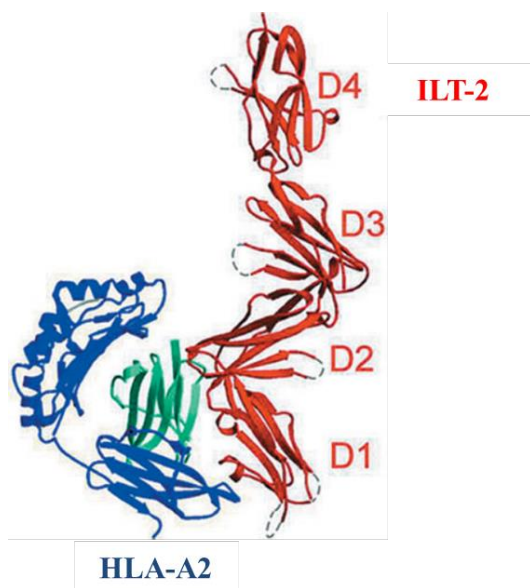


Figure 9 : Structure cristallographique du complexe ILT-2/HLA-A2. Le domaine D1 du récepteur ILT-2 interagit avec la sous-unité $\alpha 3$ de la molécule HLA-A2, tandis que le domaine D2 interagit avec la β_2 -microglobuline. D'après Willcox *et al.*, 2003.

- La famille des Natural Cytotoxicity Receptors (NCR)

Les NCR sont des glycoprotéines transmembranaires de la superfamille Ig-like. Ce sont des récepteurs généralement activateurs qui comportent trois membres chez l'Homme: le NKp30, NKp44 et NKp46. Le récepteur NKp46 est codé par un gène porté par le chromosome 6 tandis que les gènes qui codent pour les deux autres NCR sont situés sur le chromosome 19 (Cantoni *et al.*, 1999; Pende *et al.*, 1999; Pessino *et al.*, 1998). Les récepteurs NKp30 et NKp46 sont exprimés de façon constitutive par les cellules NK tandis que l'expression de NKp44 est dépendante de l'activation cellulaire. La densité de l'expression de ces trois récepteurs à la surface des cellules NK serait positivement corrélée à leur potentiel cytotoxique, l'efficacité à lyser des lignées tumorales étant associée au niveau d'expression des NCR et un faible niveau d'expression à la résistance à la lyse NK chez des patients atteints de leucémie (Costello *et al.*, 2002; Fauriat *et al.*, 2007). Il existe différentes isoformes des NCR générées par épissage alternatif. Par exemple, parmi les six isoformes NKp30 détectées, les variants NKp30a, NKp30b et NKp30c sont les plus communs. Tandis que les isoformes NKp30a et NKp30b sont responsables de la transduction d'un signal activateur, le variant NKp30c induit un signal inhibiteur. Les isoformes des NCR générées par épissage alternatif pourraient avoir une fonction propre (Delahaye *et al.*, 2011 ; Siewiera *et al.*, 2016). Les NCR sont particulièrement impliqués dans la reconnaissance des cellules tumorales et infectées (Moretta *et al.*, 2001). D'un point de vue structural, le NKp30 et NKp46 possèdent respectivement un et deux domaines extracellulaires Ig-like et s'associent en intracellulaire avec les protéines adaptatrices CD3 ζ et FcR γ (Mandelboim and Porgador, 2001) (Figure 10). Le récepteur NKp44 s'associe quant à lui à DAP12 (Moretta and Moretta, 2004).

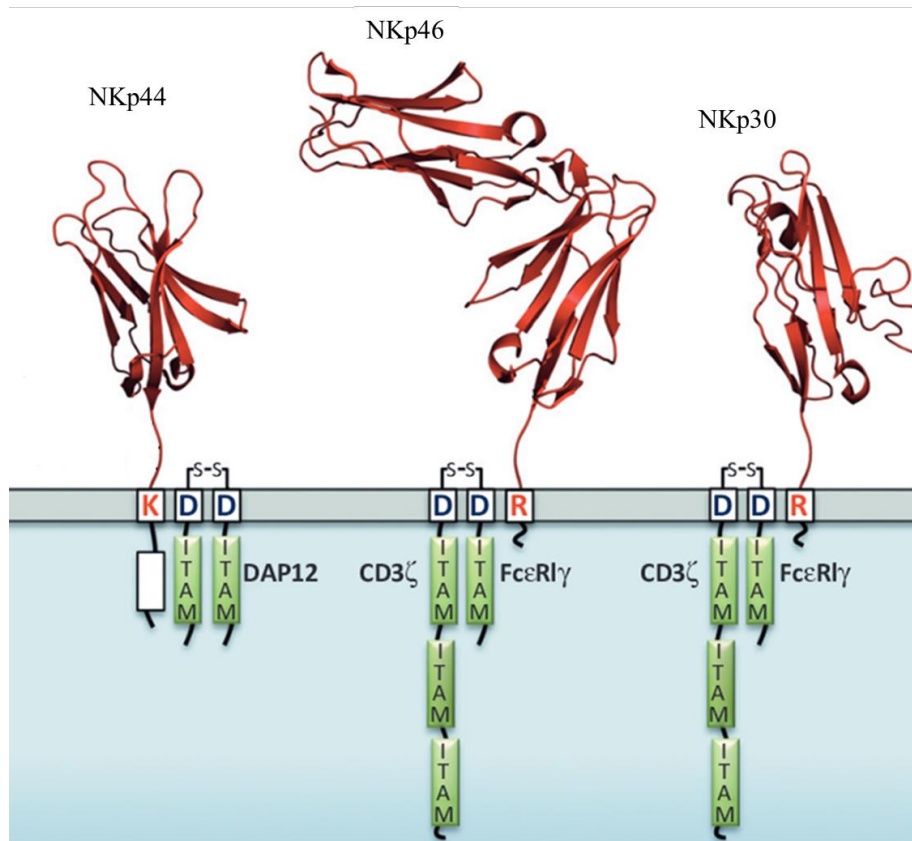


Figure 10 : Représentation schématique de la structure des NCR humains. Les récepteurs NKp44, et NKp30 possèdent un domaine extracellulaire de type immunoglobuline tandis que le récepteur NKp46 en possède deux. Le récepteur NKp44 est associé à la protéine adaptatrice DAP12 qui délivre un signal activateur intracellulaire *via* les motifs ITAM qu'elle porte. Le récepteur NKp44 porte également un motif ITIM non fonctionnel dans sa portion intracytoplasmique (rectangle blanc). Les récepteurs Nkp46 et NKp30 s'associent quant à eux aux protéines adaptatrices CD3ζ et FcεR1γ. D'après (Koch *et al.*, 2013).

Les ligands des NCR sont multiples, appartiennent au soi ou au non soi et ne sont pas encore bien définis. Le récepteur NKp30 interagit avec la molécule B7-H6 qui n'est pas exprimée dans les tissus sains mais dans un contexte tumoral (Brandt *et al.*, 2009). Il a aussi été montré que NKp30 était en mesure de reconnaître la protéine majeure du tégument du CMV, pp65 (Arnon *et al.*, 2005), des hémagglutinines virales (Jarahan *et al.*, 2011) ainsi qu'une protéine issue de *Plasmodium Falciparum* (Mavoungou *et al.*, 2007). Le récepteur NKp44 est également capable de lier des hémagglutinines virales, mais aussi des composants bactériens ainsi que la protéine PCNA, impliquée dans la réplication et les réparations de

l'ADN et particulièrement exprimée par les cellules tumorales (Rosental *et al.*, 2011). Le récepteur NKp46 a été proposé comme le récepteur le plus spécifique des marqueurs NK par sa conservation chez les Mammifères (Walzer *et al.*, 2007). Cependant, bien qu'exprimé par la grande majorité des cellules NK, certaines sous-populations ne possèdent pas le marqueur NKp46 et, au contraire, d'autres sous-populations lymphocytaires T l'expriment. Bien que les ligands de NKp46 n'aient pas été formellement identifiés, il serait capable d'interagir avec les protéoglycanes héparanes sulfates de la membrane plasmique (Bloushtain *et al.*, 2004; Hecht *et al.*, 2009) et avec des hémagglutinines virales (Jarahian *et al.*, 2011; Mandelboim *et al.*, 2001). Le tableau 1 résume les ligands identifiés des NCR.

Récepteur	Ligand	Source	Signal	Référence
NKp30	pp65	CMV	-	Arnon TI <i>et al.</i> , 2005
	Hémagglutinines virales	Virus de la vaccine, Poxvirus	-	Jaharian <i>et al.</i> , 2011
	B7-H6	Cellules tumorales, monocytes/neutrophiles	+	Brandt CS <i>et al.</i> , 2009 ; Matta <i>et al.</i> , 2013
	BAT3/BAG6	Cellules tumorales, DC	+	Pogge von Strandmann <i>et al.</i> , 2007 ; Simhadri <i>et al.</i> , 2008
	Héparine, héparanes sulfate	Cellules animales	+	Bloushtain <i>et al.</i> , 2004
	PfEMP1	<i>P. Falciparum</i>	+	Mavoungou <i>et al.</i> , 2007
NKp44	Hémagglutinines, neuraminidases virales	Virus Influenza, Sendai, Newcastle	+	Jarahian <i>et al.</i> , 2009 ; Arnon <i>et al.</i> , 2001
	Glycoprotéines d'enveloppe	Virus de la dengue, du Nil occidental	+	Hershkovitz <i>et al.</i> , 2009
	PCNA	Cellules tumorales	-	Rosental <i>et al.</i> , 2011
	MLL5	Cellules tumorales	+	Baychelier <i>et al.</i> , 2013
	Inconnu	<i>M. Tuberculosis</i> , <i>M. Bovis</i> , <i>P. aeruginosa</i>	?	Esin <i>et al.</i> , 2008, 2013
	Héparine, héparanes sulfate	Cellules animales	+	Hecht ML <i>et al.</i> , 2008
NKp46	Hémagglutinines, neuraminidases virales	Virus de lavaccine, Influenza, Sendai, Newcastle, Poxvirus	+	Mandelboim O <i>et al.</i> , 2001 ; Jarahian M <i>et al.</i> , 2009 ; Chrisolm <i>et al.</i> , 2006 ; Jarahian <i>et al.</i> , 2011
	PfEMP1	<i>P. Falciparum</i>	+	Mavoungou <i>et al.</i> , 2007
	Vimentine	Cellules infectées par <i>M. Tuberculosis</i>	+	Garg A, Ji, 2006
	Héparine, héparanes sulfate	Cellules animales	+	Bloushtain <i>et al.</i> , 2004 ; Hecht et al., 2008

Table 1 : Les ligands identifiés des récepteurs NCR. D'après (Kruse *et al.*, 2014) et (Sivori *et al.*, 2014).

- Les récepteurs du groupe *Natural Killer Group 2* (NKG2)

Les récepteurs de la famille NKG2 sont des glycoprotéines transmembranaires de type II de la famille lectine-C et sont présents chez l'Homme et la souris. Chez l'Homme, on compte sept membres protéiques : NKG2A, NKG2B, NKG2C, NKG2D, NKG2E, NKG2F, NKG2H. Ils sont codés par des gènes situés dans le complexe NK (*Natural Killer Complex*, NKC) porté par le chromosome 12 (Houchins *et al.*, 1991).

- *Les complexes CD94/NKG2*

Les molécules NKG2A, NKG2B, NKG2C, NKG2E, NKG2F et NKG2H nécessitent de s'associer, *via* un pont disulfure, avec la molécule CD94 pour former un complexe hétérodimérique stable à la surface NK. Le gène codant pour CD94 est également situé sur le chromosome 12 au niveau du NKC, en amont des gènes de la famille NKG2. Les hétérodimères CD94/NKG2 sont exprimés par la plupart des cellules NK ainsi que les lymphocytes $\gamma\delta$ et une sous-population T CD8⁺ (Aramburu *et al.*, 1990).

Le marqueur NKG2A porte deux motifs ITIM dans sa portion intracellulaire qui lui confèrent des propriétés d'inhibition du signal de transduction (Brooks *et al.*, 1997) (Figure 11). NKG2B est un variant protéique issu du même transcrit que NKG2A. A l'inverse, l'engagement de NKG2C, NKG2E, NKG2F et NKG2H avec leur ligand engendre un signal activateur grâce à leur association à la protéine adaptatrice DAP12 qui porte un motif ITAM (Lanier *et al.*, 1998) (Figure 11). NKG2F est cependant dépourvu de domaine extracellulaire de type lectine C et sa fonction n'est pas encore définie (Kim *et al.*, 2004).

Les hétérodimères CD94/NKG2A, NKG2B et NKG2C reconnaissent la molécule HLA de classe I non classique HLA-E (Braud *et al.*, 1998; Lee *et al.*, 1998). L'expression de HLA-E à la surface cellulaire est assurée par la présentation de peptides issus de la séquence

signal des molécules HLA de classe I classiques et de la molécule HLA de classe I non classique HLA-G (Braud *et al.*, 1998). Le polymorphisme allélique HLA-E est restreint par comparaison aux gènes HLA de classe I classiques (21 allèles sont actuellement décrits). Les complexes CD94/NKG2 semblent interagir avec HLA-E avec une affinité variable, CD94/NKG2A se liant plus fortement à HLA-E que CD94/NKG2C (Kaiser *et al.*, 2005; Valés-Gómez *et al.*, 1999). Grâce à l'obtention de la structure cristallographique de l'interaction entre HLA-E et les complexes CD94/NKG2, il a été montré que la spécificité de l'interaction avec HLA-E serait prodiguée par CD94 alors que l'affinité de l'interaction serait conférée par la sous-unité NKG2 (Petrie *et al.*, 2008). Le répertoire peptidique présenté par HLA-E ne semble pas restreint aux molécules HLA de classe I. Par exemple, HLA-E pourrait charger un peptide signal issu de la protéine de choc thermique hsp60 exprimée en condition de stress cellulaire, complexe qui ne serait alors pas reconnu par CD94/NKG2A et serait donc favorable à l'activation des cellules NK NKG2A⁺ (Michaëlsson *et al.*, 2002). Le CMV, dont l'un des mécanismes d'immunosubversion est l'inhibition de l'expression des molécules HLA de classe I à la surface cellulaire, code pour la protéine UL40 capable d'être apprêtée et présentée par HLA-E, cela afin d'éviter la lyse des cellules infectées par les cellules NK (Pietra *et al.*, 2003; Tomasec *et al.*, 2000).

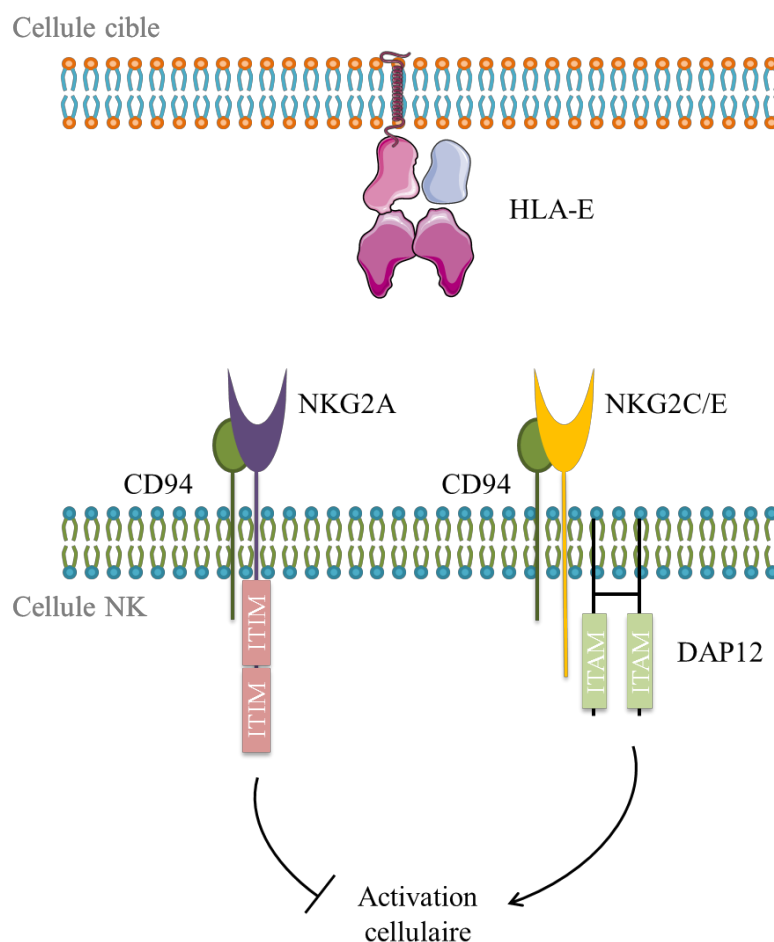


Figure 11 : Structure des récepteurs NKG2A et NKG2C/E. Les récepteurs NKG2A et NKG2C/E forment un complexe avec la molécule CD94 qui permet l'interaction avec la molécule HLA de classe I non classique HLA-E. Le récepteur NKG2A porte deux motifs ITIM dans sa portion intracytoplasmique et initie la transduction d'un signal inhibiteur des fonctions effectrices des cellules NK. Les récepteurs NKG2C et NKG2E s'associent à la protéine DAP12 qui transduit un signal activateur une fois le récepteur engagé avec son ligand.

- Le récepteur NKG2D

Bien qu'appartenant à la famille NKG2, le récepteur NKG2D ne présente que peu de similitudes avec le reste des récepteurs NKG2. Il ne s'associe pas au CD94 mais forme un homodimère lié par un pont disulfure exprimé à la surface des cellules NK (Wu *et al.*, 1999). Le gène *KLRK1* qui code pour NKG2D est peu polymorphe puisque seuls deux allèles qui codent pour deux variants protéiques différant seulement d'un acide aminé ont été identifiés

jusqu'à présent (Lanier, 2015). Le NKG2D est un récepteur activateur capable de reconnaître des ligands induits en condition de stress, de transformation ou d'infection cellulaire (Bauer *et al.*, 1999). Contrairement à la souris, où deux isoformes NKG2D ont été identifiées, le NKG2D humain n'en présente qu'une seule, dont la partie intracytoplasmique s'associe avec la protéine adaptatrice DAP10 qui stabilise le récepteur à la membrane cellulaire (Gilfillan *et al.*, 2002; Wu *et al.*, 1999) (Figure 12). Le récepteur NKG2D est exprimé par la plupart des cellules NK mais aussi par les lymphocytes T $\gamma\delta$ et $\alpha\beta$. L'environnement cytokinique influence l'expression de NKG2D, l'IL-15 et le TNF- α favorisent ainsi son expression tandis que l'IL-21 ou le TGF- β l'inhibe (Castriconi *et al.*, 2003; Roberts *et al.*, 2001).

Le récepteur NKG2D est capable d'interagir avec différents ligands, apparentés aux molécules HLA de classe I mais qui ne présentent pas de peptides. Les premiers identifiés ont été les protéines MICA et MICB (*MHC class I Chain-related A and B*) codées par des gènes appartenant à la région HLA de classe I, puis les protéines ULBP-1 à 6 (*UL16 Binding Protein*, ou *Retinoic Acid Early Transcript*, *RAET*) (Bacon *et al.*, 2004; Chalupny *et al.*, 2003; Cosman *et al.*, 1997; Eagle *et al.*, 2009). Contrairement au récepteur NKG2D quasi invariant, ses ligands sont plus polymorphes, d'autant plus pour les protéines MICA et MICB pour lesquelles 82 et 28 séquences protéiques différentes ont respectivement été décrites. Les ligands de NKG2D ne sont d'ordinaire que peu ou pas exprimés à la surface cellulaire. Leur densité augmente à la membrane plasmique en cas de transformation néoplasique, d'infection ou de stress (choc thermique, radiation aux ultraviolets, stress oxydatif, etc.), situations qui compromettent l'intégrité de l'ADN. L'engagement du NKG2D avec ses ligands aboutit à la polarisation et la dégranulation des granules lytiques de la cellule, à la production de cytokines et contribue à la survie cellulaire.

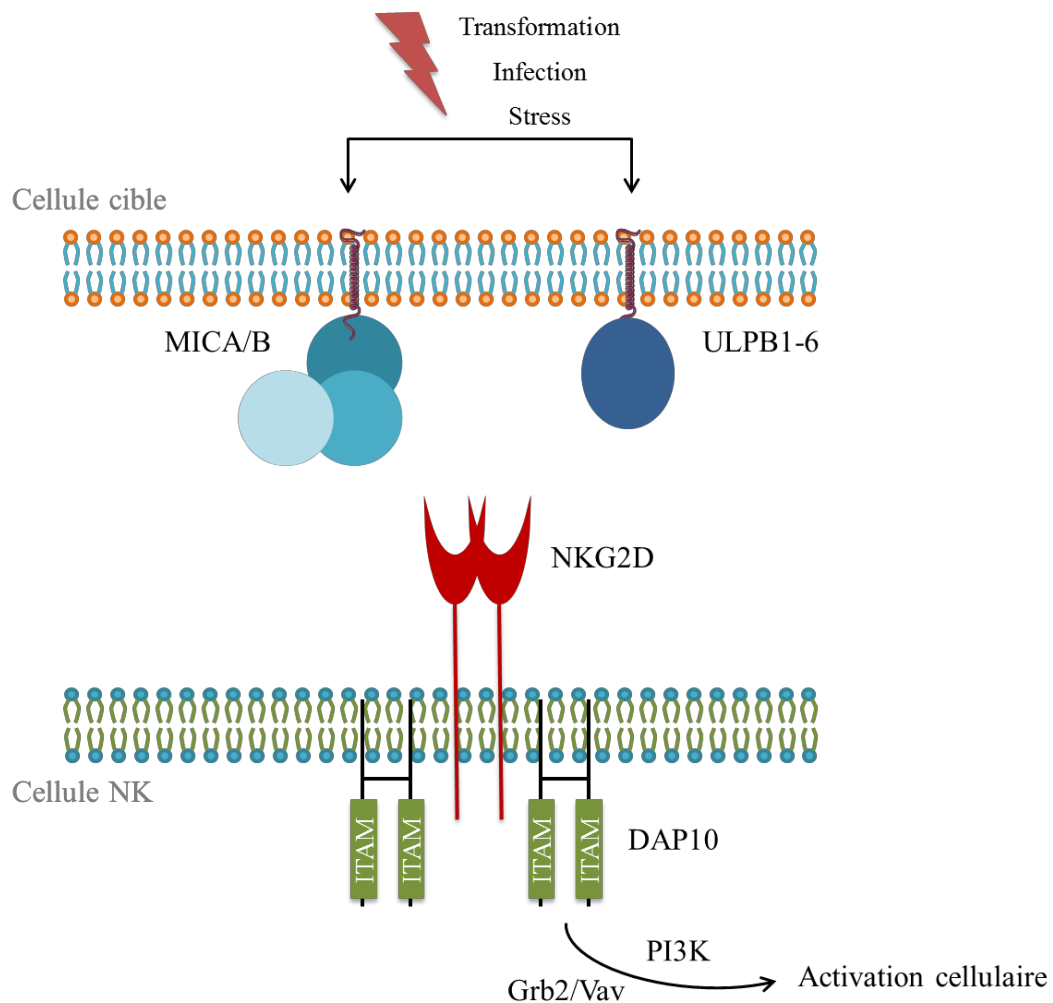


Figure 12 : Structure et ligands du récepteur activateur NKG2D. Exprimé sous forme d'homodimère à la surface des cellules NK, le récepteur NKG2D s'associe avec la protéine adaptatrice DAP10 à l'origine de la transduction d'un signal activateur via le recrutement de la phosphoinositide 3-kinase (PI3K) et des protéines *Growth factor Receptor-Bound protein 2* (Grb2) et Vav. Le récepteur NKG2D est capable de reconnaître des molécules du soi MICA, MICB et les ULBP-1 à 6 dont l'expression est induite en cas de transformation néoplasique, d'infection ou de stress cellulaire.

• Le récepteur CD16

Le récepteur CD16 (FcγRIII), de la superfamille Ig-like, est codé par un gène porté par le chromosome 1 et est exprimé par les cellules NK, en grande majorité CD56^{Dim}, les monocytes/macrophages, les neutrophiles et une fraction des lymphocytes T γδ. La forme exprimée par les cellules NK est le CD16A, dont la portion intracytoplasmique est colocalisée avec les chaînes CD3ζ et FcεRI (Lanier *et al.*, 1991) qui sont impliquées dans la transduction

du signal *via* des motifs ITAM. Le CD16 reconnaît avec une faible affinité le fragment Fc des Ig et permet ainsi aux cellules NK de détecter les anticorps opsonisants et d'exercer la lyse des cellules cibles par le mécanisme de l'ADCC.

- Molécules de co-stimulation

- *Le récepteur DNAX Accessory Molecule 1 (DNAM-1)*

Le récepteur DNAM-1 (CD226) est une protéine activatrice transmembranaire de la superfamille des Ig. Elle est codée par le gène *CD226* porté par le chromosome 18q22.3. La protéine DNAM-1 est non seulement exprimée par les cellules NK et lymphocytes B et T, mais aussi par les monocytes et les plaquettes (Scott *et al.*, 1989; Shibuya *et al.*, 1996). Deux ligands ont été identifiés : CD112 (Poliovirus Receptor, PVR) et CD155 (Nectine 2) (Bottino *et al.*, 2003; Tahara-Hanaoka *et al.*, 2004). Ces molécules sont souvent surexprimées par les cellules tumorales (Bottino *et al.*, 2003; Masson *et al.*, 2001; Tahara-Hanaoka *et al.*, 2004). L'engagement seul de DNAM-1 ne permet l'activation des fonctions NK, DNAM-1 agit plutôt en synergie avec d'autres récepteurs activateurs tels que 2B4, NKG2D et NKp46 pour induire l'activation des cellules NK (Long *et al.*, 2013).

Le récepteur DNAM-1 est composé d'un segment extracellulaire de deux domaines Ig-like, d'une partie transmembranaire et d'une portion cytoplasmique. Cette dernière comporte deux sites de phosphorylation - un résidu tyrosine et un résidu sérine - qui, avec l'aide de LFA-1 (*Lymphocyte Function-associated Antigen 1*), sont la cible de la tyrosine kinase Fyn à l'origine de la transduction du signal activateur (Enqvist *et al.*, 2015; Shibuya *et al.*, 1999, 2003). Celui-ci aboutit à la libération d'un flux calcique intracellulaire, à la réorganisation du cytosquelette et à la dégranulation et à la production de cytokines par les cellules NK (Kim and Long, 2012). Des éléments nouveaux suggèrent qu'en outre de l'induction des fonctions effectrices NK, DNAM-1 serait impliqué dans la différenciation et l'éducation des cellules

NK (Chan *et al.*, 2014; Hou *et al.*, 2014; Martinet *et al.*, 2015). Plus particulièrement, il a été montré récemment que DNAM-1 était nécessaire à la différenciation optimale des cellules NK au cours de l'infection à CMV murine (Nabekura *et al.*, 2014).

- Le récepteur 2B4

Le récepteur 2B4 (CD244) appartient à la sous-famille des molécules SLAM (*Signaling Lymphocyte Activation Molecule*), elle-même faisant partie de la famille des récepteurs CD2, qui est conservée entre l'Homme et la souris. La protéine 2B4 est un récepteur de la superfamille des Ig et est codé par un gène situé sur le chromosome 1 humain et murin. Le récepteur 2B4 est exprimé par quasiment toutes les cellules NK, la plupart des lymphocytes T $\gamma\delta$ et les lymphocytes T CD8 mémoires, ainsi que par les monocytes et les polynucléaires (Mathew *et al.*, 1993; Schuhmachers *et al.*, 1995; Valiante and Trinchieri, 1993). Le récepteur 2B4 a pour ligand CD48, qui appartient lui-même à la famille CD2 et codé par le chromosome 1 (Brown *et al.*, 1998). La molécule CD48 est exprimée par les cellules myéloïdes et lymphoïdes et est *up-régulée* par l'infection à virus Epstein-Barr (EBV) mais aussi par les IFN de type I et l'IFN- γ (Brown *et al.*, 1998; Yokoyama *et al.*, 1991). *In vitro*, le *cross-link* du récepteur 2B4 avec des anticorps spécifiques ou son engagement avec CD48 a été associé à la production d'IFN- γ et à la potentialisation de la lyse médiée par les cellules NK (Brown *et al.*, 1998; Mathew *et al.*, 1993).

Deux domaines Ig-like constituent la partie extracellulaire du récepteur. La queue cytoplasmique de la molécule 2B4 contient quatre motifs ISTM reconnus par les domaines SH2 de diverses protéines adaptatrices comme SAP qui permet ensuite la transmission d'un signal activateur grâce au recrutement de la tyrosine kinase Fyn (Nakajima and Colonna, 2000; Sayós *et al.*, 2000). Chez les patients atteints du syndrome lymphoprolifératif lié à l'X (XLP), la protéine SAP est non fonctionnelle et 2B4 est alors initiateur d'un signal inhibiteur,

probablement par le recrutement des protéines adaptatrices EAT-2 (Benoit *et al.*, 2000; Roncagalli *et al.*, 2005; Tangye *et al.*, 2000).

Il a récemment été suggéré que la coopération entre 2B4 et NKG2D ou DNAM-1 était requise pour l'activation du facteur de transcription NF- κ B à l'issue de la transduction du signal initiée par l'engagement du ligand avec son récepteur (Kwon *et al.*, 2016). A l'instar de DNAM-1, le signal activateur délivré seul par 2B4 est insuffisant pour induire les propriétés lytiques des cellules NK, 2B4 fonctionnerait plutôt comme un récepteur de co-activation (Sivori *et al.*, 2000).

- Le récepteur CD160

La molécule CD160 appartient à la superfamille des Ig dont le gène se trouve sur le chromosome 1 (Anumanthan *et al.*, 1998). Le récepteur CD160 est conservé chez la souris, le lapin et les primates ((Fons *et al.*, 2006; Huang *et al.*, 2008; Maeda *et al.*, 2005; Tsujimura *et al.*, 2006). L'isoforme majoritaire CD160 est exprimée par les cellules NK, lymphocytes $\gamma\delta$ et $\alpha\beta$ circulants mais aussi par les lymphocytes T intraépithéliaux intestinaux et les cellules endothéliales activées (Anumanthan *et al.*, 1998; Fons *et al.*, 2006; Nikolova *et al.*, 2002; Rey *et al.*, 2006). Par son domaine Ig-like extracellulaire, CD160 interagit avec un large spectre de molécules HLA de classe I classiques et non classiques avec une faible affinité (Agrawal *et al.*, 1999; Barakonyi *et al.*, 2004). Le récepteur CD160 interagit cependant préférentiellement avec les molécules HLA-Cw et la forme soluble de HLA-G (Le Bouteiller *et al.*, 2002; Fons *et al.*, 2006).

Le récepteur CD160 est exprimé par les cellules NK CD56^{Dim}CD16⁺ non activées et est *down-régulé* par clivage protéolytique après activation cellulaire (Agrawal *et al.*, 1999; Giustiniani *et al.*, 2009). Des expériences de *cross-link* de CD160 par des anticorps agonistes monoclonaux ou *via* son ligand physiologique ont montré que le récepteur active les fonctions

cytolytiques des cellules NK (Le Bouteiller *et al.*, 2002), ainsi que la production de cytokines comme l'IFN- γ , l'IL-6 et le TNF- α (Barakonyi *et al.*, 2004). Il a été montré récemment dans un modèle de souris *knock-out* pour le CD160 que la production de cytokines par les cellules NK activées était profondément impactée. Le récepteur CD160 assurerait ainsi un rôle de co-stimulation pour la promotion de la sécrétion de cytokines (Tu *et al.*, 2015).

La molécule CD160 contient un motif GPI (Glycosyl Phosphatidyl Inositol) qui permet l'ancrage à la membrane plasmique. L'engagement de CD160 avec son ligand permet le recrutement de Syk puis de la PI3K (Rabot *et al.*, 2007). La signalisation intracellulaire médiée par CD160 serait dépendante de la co-localisation avec d'autres molécules telles que CD2 présentes au niveau des radeaux lipidiques de la synapse immunologique (Rabot *et al.*, 2006). Une autre isoforme de CD160 générée par épissage alternatif a quant à elle été identifiée exclusivement exprimée par les cellules NK après activation (Giustiniani *et al.*, 2008). Ce variant protéique possède un domaine transmembranaire prolongé par une queue cytoplasmique.

- Le récepteur CD161 (NKR-PIA ou KLRB1)

Contrairement à la souris chez qui la famille de gènes *NKR-PI* code pour des marqueurs spécifiques des NK murines, seul un gène homologue, *KLRB1*, code pour le récepteur CD161 chez l'Homme (Lanier *et al.*, 1994). C'est un gène non polymorphe localisé dans le NKC sur le chromosome 12 (Arase *et al.*, 1997). De la famille des lectines C, le récepteur CD161 est exprimé par les cellules NK, de façon précoce au cours de leur développement, mais également par les lymphocytes T $\alpha\beta$ et $\gamma\delta$ circulants (Lanier *et al.*, 1994). Le ligand physiologique identifié est *Lectin-like Transcript-1* (LLT-1), codé par un gène dont la localisation est proche de *KLRB1* (Yokoyama and Plougastel, 2003). LLT-1 est exprimé par les lymphocytes B et les cellules dendritiques myéloïdes et plasmacytoïdes après

activation *via* les TLR (Rosen *et al.*, 2008). L'engagement de CD161 avec son ligand induit un signal inhibiteur dans les cellules NK mais activateur dans les lymphocytes T (Aldemir *et al.*, 2005; Rosen *et al.*, 2005). Il a été rapporté que l'interaction LLT-1/CD161 conduit à une diminution des fonctions cytotoxiques NK et réduit partiellement la production d'IFN- γ (Aldemir *et al.*, 2005 ; Rosen *et al.*, 2005).

- Le récepteur NKp80

Contrairement au nom qu'il porte, NKp80 n'appartient pas à la famille des NCR mais des NKR-P1, comme CD161. Il se présente sous forme d'un homodimère à la surface des cellules NK activées et non activées ainsi que par une sous-population T qui exprime le CD56 (Vitale *et al.*, 2001). Il s'agit d'un récepteur activateur de type lectine C qui reconnaît le ligand *Activation-Induced C-type Lectine* (AICL). AICL est un ligand endogène porté par les monocytes, les macrophages et les polynucléaires. NKp80 porte un motif semi-ITAM dans sa portion cytoplasmique, capable de recruter la kinase Syk (Dennehy *et al.*, 2011). L'engagement de NKp80 avec AICL induit la cytotoxicité NK face à des cellules myéloïdes tumorales et le dialogue réciproque entre les cellules NK et les monocytes (Welte *et al.*, 2006).

• Les TLR

Les cellules NK expriment certains des TLR et cela de façon indépendante au statut d'activation cellulaire. Les TLR présents en particulier à la surface des cellules NK sont les suivants : TLR2, TLR3, TLR5, TLR7-9 (Chiesa *et al.*, 2014). L'engagement des TLR avec leurs ligands induit les fonctions effectrices NK mais aussi un dialogue réciproque avec les cellules dendritiques (Sivori *et al.*, 2014). Par ailleurs, il est suggéré que le KIR3DL2 jouerait un rôle de protéine chaperonne dans la reconnaissance des motifs oligonucléotidiques CpG par le TLR9. En effet, le KIR3DL2 exprimé à la membrane plasmique serait capable de fixer

ces motifs et de les diriger vers les endosomes intracellulaires où sont situés les TLR9, aboutissant à la sécrétion d'IFN- γ (Sivori *et al.*, 2010).

- Les récepteurs aux cytokines et chimiokines

De nombreux récepteurs aux cytokines, chimiokines et facteurs de croissance solubles ou membranaires sont exprimés à la surface des cellules NK. Ces molécules sont différemment exprimées selon l'état de différenciation et d'activation des cellules NK. Ils interviennent dans le processus de développement et les fonctions effectrices et immunorégulatrices des cellules NK. Ils représentent également le dialogue instauré entre les différents compartiments immuns par exemple par le recrutement des cellules NK au niveau des sites inflammatoires.

Les récepteurs aux cytokines IL-1, -2, -12, -15, -18, -21 et le récepteur aux IFN de type I sont impliqués dans la prolifération, la cytotoxicité et la production de cytokines telles que l'IFN- γ par les cellules NK (Vivier *et al.*, 2011). Ces cytokines sont notamment sécrétées par les cellules dendritiques myéloïdes (IL-12, IL-15) et plasmacytoïdes (IFN α/β), les lymphocytes T (IL-2) et les monocytes/macrophages (IL-12/IL-18). L'engagement conjoint des récepteurs à l'IL-12 et IL-15 peut quant à lui induire la production de cytokines immunosuppressives : IL-10, TNF- α .

Le trafic des cellules NK est gouverné par l'engagement des chimiokines à leurs récepteurs, nécessaire à la migration des cellules NK vers les organes lymphoïdes ou vers les sites inflammatoires. Les cellules NK disposent par exemple des récepteurs CCR2, CCR5, CCR7, CXCR1, CXCR3, CXCR4, CXCR6, CX3CR1, S1P1, ce qui leur permet de répondre à un large panel de chimiokines inflammatoires (Grégoire *et al.*, 2007). Le ligand de CCR7 se trouve surtout au niveau des organes lymphoïdes et, au contraire, le ligand de S1P1 en périphérie. CXCR3 est quant à lui nécessaire au recrutement des cellules NK au niveau des

ganglions lymphoïdes en cas d'inflammation. La migration des cellules NK à travers les tissus et les vaisseaux sanguins et les contacts cellulaires avec les cellules cibles nécessitent l'expression de molécules d'adhésion par les cellules NK, notamment par les molécules de la famille des sélectines (CD62L) ou des intégrines (LFA-1, ICAM-1). Le récepteur CD2 serait également impliqué dans la formation de la synapse immunologique qu'établit la cellule NK avec sa cellule cible.

I.2. Les fonctions effectrices des cellules NK

I.2.a. La cytotoxicité

Grâce à la variété des récepteurs exprimés à la surface des cellules NK, celles-ci disposent de plusieurs mécanismes de reconnaissance et de réponse face à leurs cibles potentielles.

- La lyse spontanée

- Reconnaissance du soi manquant

Les observations de Klas Kärre quant à l'inhibition sélective de la réponse NK face à des lignées tumorales qui expriment des molécules CMH de classe I le mènent à émettre l'hypothèse de l'activation des cellules NK par la reconnaissance du *missing-self*, ou soi-manquant (Kärre *et al.*, 1986; Ljunggren and Kärre, 1990). D'après cette théorie, les cellules NK exercent une activité d'immunosurveillance de l'expression altérée des molécules HLA de classe I, phénomène qui intervient lors des processus de transformation tumorale ou lors d'infections virales. L'absence d'engagement des récepteurs inhibiteurs des cellules NK, en particulier les KIR, avec les molécules HLA de classe I du soi conduit à l'activation de la cellule NK. Cela explique également la tolérance des cellules NK face aux cellules saines du

soi qui expriment les molécules HLA de classe I. En réalité, l'activation des cellules NK ne résulte pas seulement en la perte de l'engagement des récepteurs inhibiteurs avec les molécules HLA de classe I, mais aussi en la combinaison des interactions entre récepteurs inhibiteurs et activateurs avec leurs ligands.

- Reconnaissance du non-soi infectieux

Les récepteurs des cellules NK sont également capables d'interagir directement avec les antigènes issus d'agents pathogènes présentés par les cellules infectées. Ce mode d'activation des cellules NK implique notamment les NCR, qui, comme nous l'avons vu précédemment, sont capables de reconnaître des hémagglutinines virales, mais aussi des antigènes bactériens ou parasitaires.

- Reconnaissance du soi induit par le stress

Un autre mécanisme d'activation de la cytotoxicité NK est la reconnaissance des molécules exprimées en situation de stress cellulaire. Cette situation peut être rencontrée lors d'infection par des agents pathogènes, de processus tumoraux ou encore de dommages tissulaires. La reconnaissance du soi induit par le stress fait intervenir en particulier le récepteur activateur NKG2D. Celui-ci détecte en effet des molécules du soi, les protéines MICA et MICB, les ULPB-1 à 6, dont l'expression est d'ordinaire quasi-indétectable mais est induite en condition de stress.

- La cytotoxicité cellulaire dépendante des anticorps (ADCC)

L'expression du récepteur CD16 par les cellules NK leur permet de reconnaître une cible recouverte d'anticorps spécifiques. S'ensuit la formation d'une synapse immunologique qui permet l'activation des cellules NK et l'induction de leurs fonctions cytotoxiques. Ce mécanisme d'activation cellulaire n'est pas restreint aux cellules NK puisqu'il est employé

par d'autres effecteurs de l'immunité innée. L'engagement du récepteur CD16 à la surface des cellules NK est un mécanisme puissant d'activation cellulaire. En effet, la seule interaction de ce récepteur avec son ligand est capable d'induire la cytotoxicité NK et la sécrétion de cytokines (Bryceson *et al.*, 2006). Récemment, le groupe de Katharine C. Hsu a montré l'impact modulateur du KIR3DL1 sur l'activation des cellules NK par l'ADCC. L'administration de l'anticorps monoclonal anti-GD2, un ganglioside exprimé par les cellules de neuroblastome, a en effet été associée à une meilleure issue de la maladie chez les patients pour lesquels l'interaction entre le KIR3DL1 et son ligand HLA-Bw4 était faible voire absente (Forlenza *et al.*, 2016; Tarek *et al.*, 2012). La figure 13 résume les mécanismes de l'activation des cellules NK.

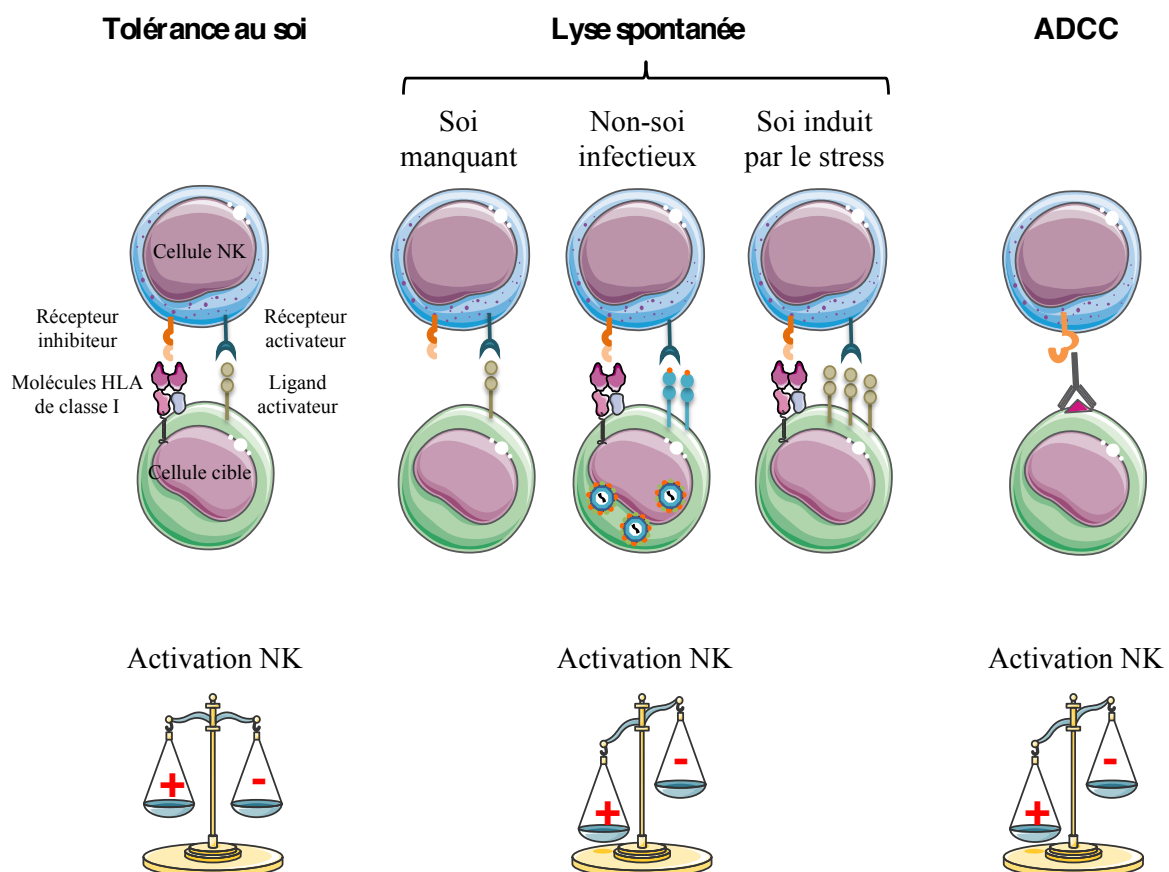


Figure 13 : Modalités d'activation des cellules NK. La balance entre les signaux inhibiteurs et activateurs perçus par les récepteurs exprimés par les cellules NK détermine l'état d'inhibition ou d'activation cellulaire. Cela permet la tolérance au soi lorsque les signaux sont à l'équilibre. Les cellules NK ont la capacité de reconnaître et de lyser leurs cibles de façon spontanée dans plusieurs cas

de figure. Lorsque l'expression des molécules HLA de classe I est compromise à la surface des cellules cibles, les récepteurs inhibiteurs spécifiques de ces molécules ne sont plus engagés, ce qui induit l'activation NK par le mécanisme de la reconnaissance du soi manquant. Dans un contexte infectieux, des récepteurs activateurs NK peuvent interagir avec des molécules issues de l'agent pathogène, provoquant ainsi l'activation des cellules NK. En cas de stress cellulaire, des protéines du soi sont exprimées à la membrane cellulaire ce qui les rend disponibles à l'interaction avec des récepteurs activateurs NK. Enfin, les cellules NK expriment le récepteur CD16, à l'origine de la cytotoxicité médiée par les anticorps (ADCC), grâce à sa capacité à lier le fragment Fc des anticorps opsonisants.

- Mécanismes effecteurs de la lyse

Lorsque la balance des signaux perçus par la cellule NK engagée avec sa cellule cible pèse en faveur d'une activation NK, celle-ci réplique par la sécrétion de granules lytiques ou par l'interaction avec les ligands des récepteurs de mort cellulaire. Ces fonctions cytotoxiques sont exercées au niveau de la zone de contact étroit entre la cellule NK et sa cible, la synapse immunologique. Il s'agit d'une région dynamique où se côtoient des molécules d'adhésion, des récepteurs d'activation et d'inhibition, des récepteurs de co-stimulation ou encore des protéines de transduction du signal. Les cellules NK exercent aussi une fonction de régulation de la réponse immunitaire par la sécrétion des cytokines et chimiokines. Bien que les modes de reconnaissance des cellules cibles par les cellules NK soient divers, les cellules NK disposent des mêmes mécanismes effecteurs que partagent les lymphocytes T CD8⁺ cytotoxiques.

- *Exocytose des granules lytiques*

Le cytoplasme des cellules NK contient des lysosomes sécrétoires chargés en enzymes impliquées dans la lyse des cellules cibles : granzymes (A et B en majorité), perforine et la granulysine. La lumière de ces granules est tapissée par la protéine *Lysosome-Associated Membrane Protein 1* (LAMP-1) (CD107a). Les stocks de molécules lytiques permettent aux cellules NK de médier leurs fonctions cytotoxiques sans transcription génique ni de traduction

protéique *de novo*. Le pH acide des granules inhibe l'activité enzymatique de ces molécules et protège ainsi la cellule NK de leur toxicité. Une fois que la cellule NK est engagée avec sa cellule cible et activée, les granules lytiques sont polarisées vers la synapse immunologique par réorganisation du cytosquelette. Il s'agit d'un mécanisme dépendant de l'afflux de calcium cytosolique. Les granules sécrétoires fusionnent avec la membrane cellulaire et relarguent les enzymes lytiques au niveau de la synapse. La présence de LAMP-1 à la surface de la membrane plasmique à l'issue de la fusion avec les lysosomes assure la protection de la cellule NK contre l'attaque des molécules cytotoxiques. Par ailleurs, la détection de LAMP-1 par cytométrie en flux permet d'évaluer la dégranulation des cellules NK lors de tests de cytotoxicité. La perforine est impliquée dans la perméabilisation de la membrane plasmique de la cellule cible grâce à la formation de pores organisés en complexes de 20 à 50 monomères. Ces pores sont ensuite empruntés par les granzymes qui induisent la mort cellulaire par apoptose. Le granzyme B est notamment responsable du clivage protéolytique et de l'activation des molécules pro-apoptotiques telles que les caspases ou Bid (Afonina *et al.*, 2010).

- *L'engagement des récepteurs de mort cellulaire*

Les cellules NK sont également capables d'éliminer leurs cellules cibles grâce à l'engagement des récepteurs de mort cellulaire de la famille du TNF tels que le *TNF-Related Apoptosis-Inducing Ligand* (TRAIL) (TRAIL-R1 et TRAIL-R2) et Fas (Falschlehner *et al.*, 2009) exprimés par les cellules cibles. Ce processus n'implique pas la sécrétion de granules lytiques et est indépendant du relargage de calcium intracytoplasmique. La reconnaissance de TRAIL et de FasL (*Fas Ligand*, FasL) exprimés par les cellules NK par la cellule cible induit sa mort par apoptose. Ce mécanisme de mort cellulaire n'est pas spécifique de l'élimination de cellules néoplasiques ou infectées mais est aussi impliquée dans le maintien de l'homéostasie des cellules immunitaires. Par ailleurs, l'IFN- γ est connu pour stimuler

l'expression de TRAIL à la surface des cellules NK mais aussi des monocytes et des cellules dendritiques. La figure 14 schématise les mécanismes cytotoxiques dont disposent les cellules NK pour lyser leurs cellules cibles.

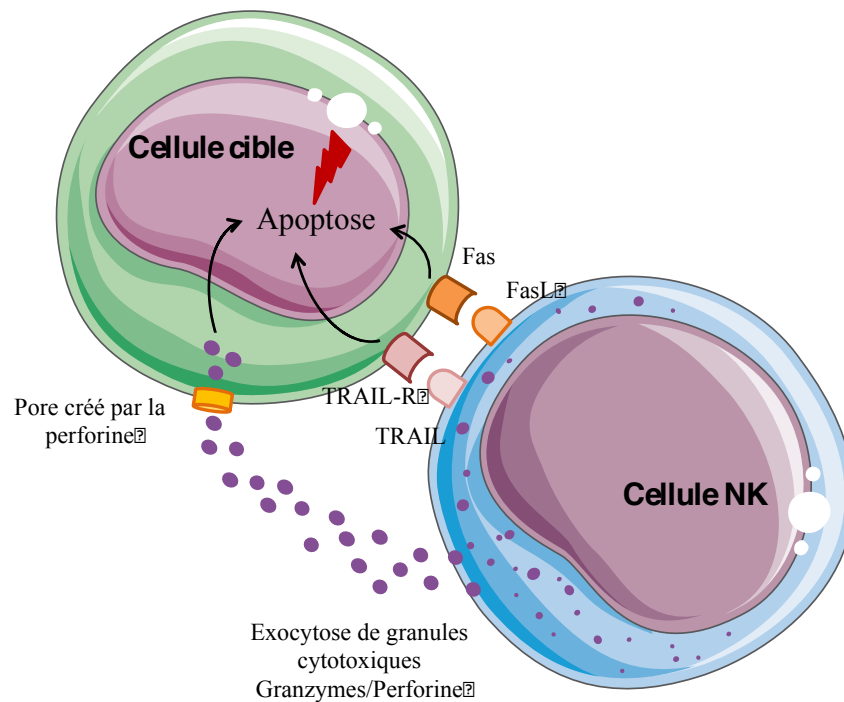


Figure 14 : La cytotoxicité médiée par les cellules NK. Les cellules NK contiennent des granules contenant des granzymes et de la perforine prêts à être relâchés dans le milieu intercellulaire en cas d'activation cellulaire. La perforine crée des pores au sein de la membrane plasmique de la cellule cible. Les granzymes pénètrent ensuite dans la cellule et induisent sa mort par apoptose. Les cellules NK expriment également les ligands FasL et TRAIL pour les récepteurs de mort Fas et TRAIL-R portés par les cellules cibles. L'engagement des récepteurs de mort avec leurs ligands provoque la mort cellulaire par apoptose.

I.2.b. La sécrétion de cytokines et chimiokines

Après activation, les cellules NK sécrètent des cytokines pro-inflammatoires telles que l'IFN- γ et le TNF- α mais aussi immunosuppressives comme l'IL-10 ou le TGF- β . Par la sécrétion de telles cytokines, les cellules NK exercent une influence sur l'orientation de la réponse immunitaire à la fois innée et adaptative. Le profil cytokinique sécrété par les cellules NK dépend des conditions de stimulation. Ainsi, l'IFN- γ , préférentiellement produit en

réponse à l'IL-12 et l'IL-18, induit la maturation des cellules dendritiques et l'activation et la phagocytose des macrophages. Il est aussi impliqué dans l'activation et l'orientation de la réponse T vers un profil Th1 (Martín-Fontecha *et al.*, 2004). L'IFN- γ réprime aussi la prolifération des cellules tumorales ou infectées. La stimulation par l'IL-12 et 15 quant à elle favorise la sécrétion des cytokines immunosuppressives comme l'IL-10. La sécrétion du facteur de croissance GM-CSF par les cellules NK, surtout en réponse à l'IL-15 combinée à l'IL-18, est essentielle pour la prolifération des polynucléaires neutrophiles et joue un rôle dans la maturation des cellules dendritiques (Tarr, 1996).

Les chimiokines sécrétées par les cellules NK permettent le recrutement d'autres effecteurs de l'immunité au site de l'inflammation. Les cellules NK sécrètent en particulier les chimiokines suivantes : MCP-1 (CCL2), MIP-1 α (CCL3), MIP-1 β (CCL4), RANTES (CCL5), IL-8 (CXCL8) et IP-10 (CXCL10) (Fauriat *et al.*, 2010a; Robertson, 2002). Ces chimiokines sont notamment impliquées dans le recrutement des monocytes/macrophages, des cellules dendritiques, des neutrophiles et des lymphocytes T .

I.3. Education, tolérance et mémoire des cellules NK

I.3.a. Education et tolérance au soi des cellules NK

Nous avons vu précédemment que la réponse NK est gouvernée par la balance des signaux perçus par les récepteurs inhibiteurs et activateurs exprimés par les cellules NK. Parmi les récepteurs inhibiteurs des cellules NK, les KIR, ILT-2 et le complexe CD94/NKG2A reconnaissent les molécules HLA de classe I du soi conférant ainsi une protection contre l'attaque du soi par les cellules NK. La théorie de l'éducation des cellules NK est issue d'observations chez la souris et l'humain de l'absence d'autoréactivité NK dans

un contexte de défaut d'expression des molécules CMH de classe I. Chez des souris dont l'expression des molécules CMH de classe I a été supprimée, telles que les souris homozygotes β_2m déficientes, les cellules NK sont présentes et tolérantes au soi mais ne sont pas capables de s'attaquer à des lignées tumorales ou à induire le rejet de greffe (Höglund *et al.*, 1998; Liao *et al.*, 1991). Chez l'Homme, ce type de cellules est rencontré chez des patients TAP-déficients qui présentent un défaut d'expression des molécules HLA classe I (Zimmer *et al.*, 1998). De plus, chez la souris et l'humain, il existe dans un contexte physiologique des sous-populations NK circulantes dépourvues de récepteurs inhibiteurs spécifiques des molécules CMH de classe I (Anfossi *et al.*, 2006; Fernandez *et al.*, 2005; Kim *et al.*, 2005). Bien que de phénotype mature, ces cellules se montrent tolérantes au soi et témoignent d'une réactivité réduite, en terme de lyse spontanée, d'ADCC et de sécrétion d'IFN- γ (Gasser and Raulet, 2006; Raulet and Vance, 2006), face à différents stimuli expérimentaux. Il a donc été émis l'hypothèse que l'acquisition terminale des propriétés effectrices NK dépend de l'interaction de récepteurs inhibiteurs avec leurs ligands spécifiques CMH de classe I du soi. Il s'agit de l'éducation des cellules NK. Il existe quatre modèles selon lesquels les cellules NK pourraient être éduquées à la tolérance au soi (Figure 15).

1. Disarming : d'après ce modèle, les cellules NK seraient hautement fonctionnelles par défaut. Cependant, leur rencontre avec des cellules dépourvues de ligands pour les récepteurs inhibiteurs NK les rendrait inactives (désarmement des cellules NK). Lors de ce type d'interaction, les cellules NK percevraient une stimulation permanente sans opposition par des signaux inhibiteurs. Cela pourrait s'apparenter au phénomène de l'anergie observée chez les lymphocytes B et T, où une stimulation antigénique continue résulte en une perte de fonctionnalité lymphocytaire.

2. Arming : contrairement au premier modèle, les cellules NK sont inactives par défaut. L'engagement des récepteurs inhibiteurs NK avec leurs ligands spécifiques CMH de classe I

conduit à l'acquisition des propriétés effectrices NK. L'interaction entre récepteurs inhibiteurs et molécules de CMH de classe I permet la maturation fonctionnelle NK de façon active. Ce modèle s'apparente à celui du « licensing » décrit par Yokoyama (Kim S *et al.*, 2005).

3. Le modèle du rhéostat : il s'agit d'un concept quantitatif selon lequel la réactivité NK est calibrée par l'intensité des signaux inhibiteurs et activateurs (Brodin *et al.*, 2009; Johansson *et al.*, 2005). Le degré d'inhibition des cellules NK est en effet proportionnel au taux d'expression des molécules CMH classe I à la surface des cellules cibles potentielles et au nombre de récepteurs inhibiteurs exprimés par les cellules NK (Joncker *et al.*, 2009). De plus, des niveaux d'affinité variable ont été mis en évidence entre certains récepteurs inhibiteurs et leurs ligands CMH de classe I. Chez la souris et l'humain il a été mis en évidence une corrélation entre la diminution de la réactivité NK et la diminution du nombre de récepteurs inhibiteurs (Béziat *et al.*, 2013; Brodin *et al.*, 2009; Fauriat *et al.*, 2010b; Joncker *et al.*, 2009). Ce modèle propose qu'un fort signal activateur sans opposition par un signal inhibiteur conduit à un état de réactivité NK réduit alors qu'un signal activateur plus faible induit des capacités fonctionnelles maximales. Le concept du rhéostat est compatible avec les deux premiers modèles.

4. Le modèle d'interaction en cis : un autre mécanisme impliqué dans l'éducation des cellules NK a été proposé d'après des observations menées chez la souris. Les membres de la famille des récepteurs Ly49 ont la capacité de fixer leurs ligands CMH de classe I par une interaction en *cis*, c'est-à-dire une interaction des récepteurs/ligands adjacents sur la même cellule NK (Doucey *et al.*, 2004). Cette interaction conduirait à la séquestration des récepteurs inhibiteurs dans le cytoplasme des cellules NK. La perte d'un signal inhibiteur qui compense les signaux activateurs rendrait les cellules plus réactives (Chalifour *et al.*, 2009).

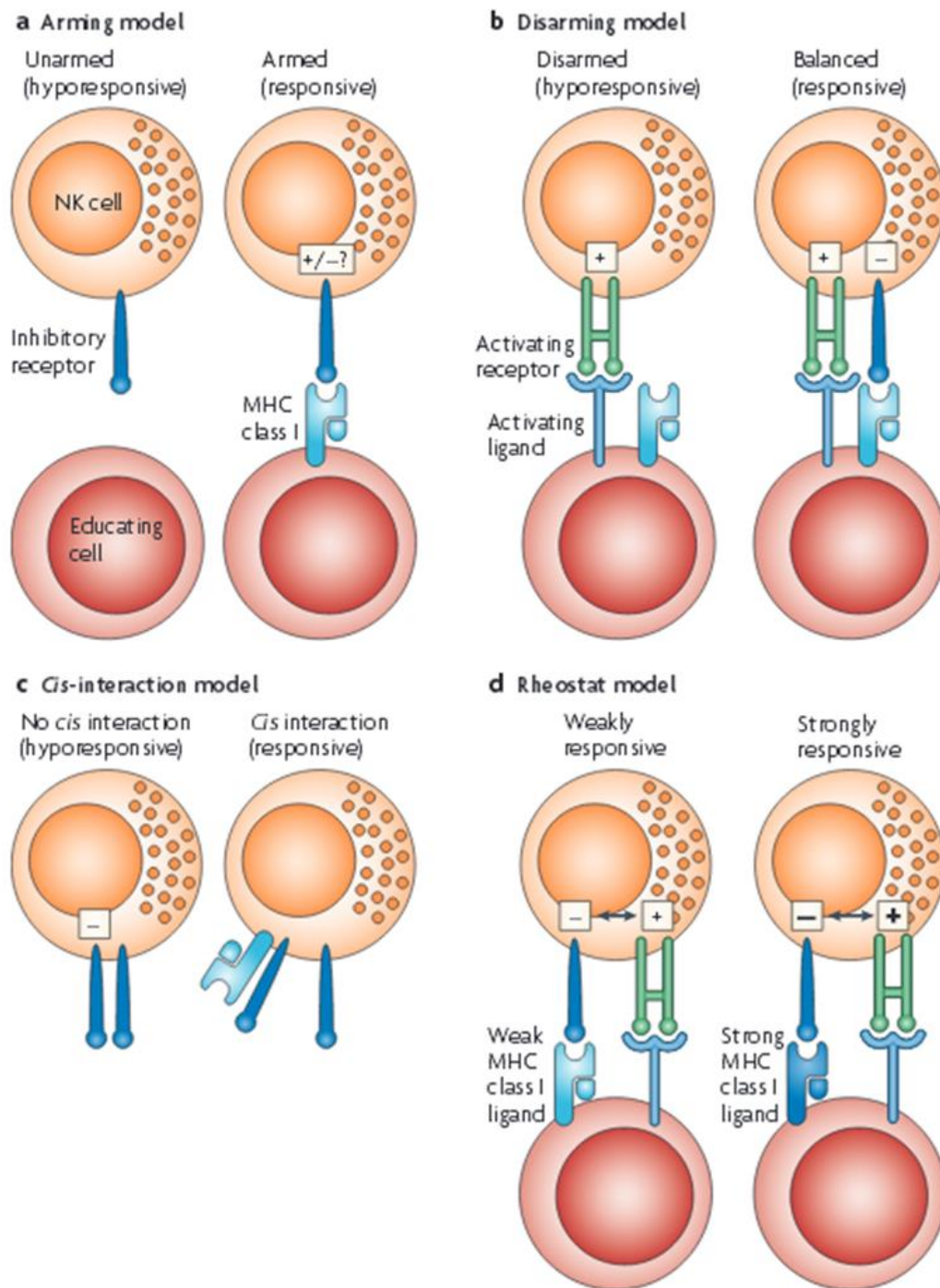


Figure 15 : Les modèles d'éducation NK. a) Le modèle de l'*arming* stipule que l'engagement des récepteurs inhibiteurs des cellules NK avec leurs molécules HLA de classe I spécifiques permet l'acquisition de la compétence fonctionnelle NK. b) Le modèle de *disarming* propose que les cellules NK sont fonctionnelles par défaut et que leur rencontre avec des cibles dépourvues de ligands pour leurs récepteurs inhibiteurs induit leur inactivation. c) Dans le modèle de l'interaction en *cis*, les cellules NK deviennent réactives *via* l'interaction des récepteurs inhibiteurs avec leurs ligands du CMH de classe I situés sur la même membrane cellulaire. d) Le modèle du rhéostat est basé sur la force du signal perçu à l'issue de l'interaction entre les récepteurs inhibiteurs des cellules NK et leurs ligands. D'après (Höglund and Brodin, 2010).

Les récepteurs KIR inhibiteurs 2DL1, 2DL2/2DL3 et 3DS1 et le NKG2A joueraient un rôle prépondérant dans l'éducation NK (Andersson *et al.*, 2009; Anfossi *et al.*, 2006; Fauriat *et al.*, 2010b; Yawata *et al.*, 2008). Les cellules NK porteuses de ces récepteurs sont plus réactives à la stimulation par la lyse spontanée et l'ADCC. Bien que mal définis, les récepteurs activateurs des cellules NK joueraient également un rôle dans leur processus d'éducation. Par exemple, l'expression du KIR2DS1 par les cellules NK réprime la réponse cellulaire dans un contexte où le ligand HLA-Cw du groupe C2 est présent (Fauriat *et al.*, 2010b).

Il semblerait que la réactivité des cellules NK issue du processus d'éducation soit modulable. En effet, des expériences de transfert adoptif de cellules NK éduquées chez des souris de contexte CMH de classe I différent ou chez qui l'expression des molécules CMH de classe I est abrogée ont montré une diminution de la réponse de ces cellules NK. Cette perte de fonctionnalité s'accompagne de l'acquisition de la tolérance vis-à-vis de cellules cibles dépourvues de molécules CMH de classe I. A l'inverse, des cellules NK non éduquées infusées à des souris d'environnement CMH de classe I adéquat voient leurs capacités fonctionnelles se développer (Elliott *et al.*, 2010; Joncker *et al.*, 2010). La plasticité de l'éducation des cellules NK et donc la modulation de leur potentiel effecteur a aussi été démontrée dans un contexte inflammatoire. Ainsi, chez des souris dépourvues des molécules CMH de classe I, les cellules NK sont capables de défendre l'organisme contre l'infection à cytomégalovirus murin (Kim *et al.*, 2008). Dans l'infection à *Listeria monocytogenes* chez la souris C57BL/6, les cellules NK n'exprimant pas de récepteurs inhibiteurs spécifiques des molécules CMH de classe I sont capables de sécréter de fortes quantités d'IFN- γ (Fernandez *et al.*, 2005). Enfin, il a été montré que l'environnement cytokinique des cellules NK non éduquées pouvait induire l'acquisition de leurs propriétés fonctionnelles. Ainsi, l'IL-15 et l'IL-18 permettraient l'acquisition de fonctions effectrices optimales (Chaix *et al.*, 2008;

Lucas *et al.*, 2007) et l'IL-2 et le poly I:C rendraient les cellules NK non éduquées fonctionnellement compétentes (Sungjim Kim *et al.*, 2005). Cela pourrait expliquer le gain de réactivité observé en cas d'infection où les conditions inflammatoires sont propices à la sécrétion de cytokines.

La réactivité NK qui dépend du processus d'éducation semble donc modulable selon le contexte physiopathologique, permettant ainsi la tolérance au soi en condition physiologique mais aussi l'activation des cellules NK en cas d'infection de façon indépendante du CMH.

I.3.b. Propriétés adaptatives des cellules NK

Les cellules NK sont traditionnellement considérées comme membre de l'immunité innée, par leur capacité à tuer rapidement des cellules cibles en l'absence d'une sensibilisation antigénique préalable associée à une expansion clonale, leur absence de mémoire antigénique et par leur courte durée de vie. Cependant, les cellules NK constituent le troisième compartiment lymphocytaire, à l'instar des lymphocytes B et T. Contrairement à ces deux derniers, les cellules NK ne possèdent pas de récepteur unique dédié à la reconnaissance antigénique dont la diversité de spécificité dépend de la recombinaison somatique des gènes qui le codent. De nouvelles données disponibles dans la littérature viennent cependant contredire la stricte appartenance des cellules NK à l'immunité innée.

La première évidence de l'existence de propriétés adaptatives chez les cellules NK provient d'expériences de réaction d'hypersensibilité médiée par les cellules NK après contact spécifique avec des haptènes chez des souris *Rag2^{-/-}* (O'Leary *et al.*, 2006). De plus, ces cellules NK étaient présentes jusqu'à un mois après le challenge antigénique, résidant préférentiellement dans le foie. Le transfert adoptif de cellules NK, ayant préalablement réagi aux haptènes, à des souris naïves a permis l'observation d'une réaction d'hypersensibilité après la même stimulation. Les propriétés adaptatives des cellules NK ont aussi été fortement

suggérées dans le contexte d'infections virales, et notamment au cours de l'infection à cytomégalo virus murin (*Murine Cytomegalovirus*, MCMV). Chez la souris C57BL/6, le récepteur activateur Ly49H interagit directement avec la protéine virale m157 exprimée à la surface des cellules infectées (Arase *et al.*, 2002). Il a été montré que la présence de cellules NK Ly49H⁺ était nécessaire au contrôle de l'infection à MCMV (Arase *et al.*, 2002; Brown *et al.*, 2001). Après l'infection, cette sous-population NK connaît une rapide expansion clonale dans la rate et le foie (Sun *et al.*, 2009). De plus, la prolifération des cellules NK Ly49H⁺ est spécifique de m157, comme en témoigne l'absence d'expansion lors d'une infection à MCMV délété de cette protéine (Sun *et al.*, 2009). La sous-population Ly49H⁺ entame ensuite une phase de contraction et un pool de cellules de longue durée de vie est détecté dans les organes lymphoïdes et le foie. Ces cellules NK « mémoires » sont fonctionnelles et capables de sécréter de l'IFN- γ *ex vivo* en réponse à divers stimuli. Après une seconde expansion antigénique, la sous-population Ly49H⁺ est capable de répondre de façon plus rapide et plus robuste à l'infection (Sun *et al.*, 2009). Le transfert adoptif de telles cellules à des souris Ly49H déficientes ainsi qu'à des souriceaux, chez qui la réponse NK est immature, permet le contrôle de l'infection virale et l'expansion de cellules NK Ly49H⁺ (Sun *et al.*, 2009). De façon similaire, il a été observé lors de l'infection à CMV chez l'Homme l'expansion spécifique rapide et de longue durée de la sous-population NK NKG2C⁺ de phénotype mature (Lopez-Vergès *et al.*, 2011; Foley B *et al.*, 2012b). Enfin, le transfert adoptif de cellules NK préalablement activées par des cytokines *in vitro* à des souris naïves a montré la capacité de migration de ces cellules NK vers les organes lymphoïdes et le foie et leur persistance jusqu'à un mois après infusion (Sun *et al.*, 2009).

Ces observations suggèrent que l'activation des cellules NK leur confère des propriétés durables qui s'apparenteraient à celles jusqu'ici restreintes aux effecteurs de l'immunité adaptative.

I.4. Les cellules NK dans un contexte physiopathologique

I.4.a. Les cellules NK et la placentation

La muqueuse utérine joue un rôle actif dans l'implantation embryonnaire et passe notamment par un stade de spécialisation tissulaire, nommé décidualisation, qui permet le développement et le fonctionnement du placenta. Lors du premier trimestre de la grossesse, les cellules NK constituent 50 à 70% de la population immunitaire de l'endomètre décidual et 30 à 40% des cellules du stroma décidual (Bulmer and Lash, 2005). Les cellules NK utérines contribuent au remodelage tissulaire qui s'opère lors de la placentation, à la néoangiogenèse et au remodelage vasculaire des artères spiralées déciduales, grâce à la sécrétion notamment de *Vascular Endothelial Growth Factor* (VEGF), de *Placental Growth factor* (PlGF), SCF1-1 d'IL-8 et IP-10 (Vacca *et al.*, 2011a). Les cellules NK utérines, de phénotype CD56^{bright}CD16^{neg}, diffèrent de leur pendant circulant par le profil d'expression des récepteurs inhibiteurs et activateurs et la présence de granules lytiques dans leur cytoplasme bien qu'elles soient peu cytotoxiques (Geiselhart *et al.*, 1995; Jabrane-Ferrat and Siewiera, 2014; Moffett and Shreeve, 2015). Elles pourraient dériver de précurseurs CD34⁺ résidant dans l'utérus ou des cellules NK CD56^{Bright} circulantes (Hanna *et al.*, 2003; Vacca *et al.*, 2011b). L'importance des cellules NK déciduales a été démontrée chez la souris *Rag2^{-/-} Il2rg^{-/-}*, dépourvues de lymphocytes B, T et NK, chez qui l'angiogenèse de l'endomètre décidual est retardée. La greffe de moelle osseuse issue de souris *Rag2^{-/-}*, déficientes en lymphocytes B et T mais pourvues de cellules NK, permet de rétablir une implantation embryonnaire normale (Hofmann *et al.*, 2014). Dans un autre modèle murin, la déplétion de cellules NK a coïncidé avec un défaut de remodelage des artères spiralées et une implantation embryonnaire anormale. Cela serait dû à l'absence de sécrétion d'IFN- γ par les NK déciduales (Ashkar *et*

al., 2000). Chez l'Homme, le défaut de remodelage vasculaire est lié à des avortements spontanés à répétition, à la pré-éclampsie et à la restriction de la croissance fœtale.

Les cellules NK participent non seulement aux événements précoces de la placentation mais sont aussi impliquées dans la tolérance maternelle de la greffe semi-allogénique que constitue le fœtus. La rupture de cette tolérance est également associée à des complications pendant la grossesse: pré-éclampsie, avortements récurrents (Redman and Sargent, 2010; Wilczyński, 2006). L'invasion de la membrane déciduale par le trophoblaste, étape cruciale pour le bon déroulement de la grossesse, semble ainsi dépendre des cellules NK déciduales. Certaines des cellules NK déciduales expriment des récepteurs inhibiteurs tels que les KIR, le CD94/NKG2A ou l'ILT-2, dont les ligands respectifs HLA-Cw, HLA-E et HLA-G sont exprimés par l'embryon. Certaines combinaisons génétiques HLA-C/KIR ont été associées à des risques de pré-éclampsie tandis que l'association KIR2DS1 et molécules HLA-Cw du groupe C2 serait favorable à la placentation (Hiby *et al.*, 2010; Xiong *et al.*, 2013). Les cellules NK utérines participent également à la régulation d'autres acteurs de l'immunité innée et adaptative qui se trouvent à l'interface materno-fœtale que constitue le placenta, contribuant ainsi à la tolérance fœtale.

I.4.b. Les cellules NK et cancer

Les cellules NK sont impliquées dans l'immunosurveillance des cancers. L'activité cytotoxique des cellules NK a initialement été démontrée à l'encontre de lignées tumorales *in vitro* (Diefenbach and Raulet, 2002; Herberman *et al.*, 1975; Kiessling *et al.*, 1975; Seaman *et al.*, 1987). Cette activité anti-tumorale a ensuite été démontrée *in vivo* chez la souris, où des expériences de délétion ou d'inactivation de cellules NK ont montré leur implication dans le rejet de tumeurs transplantées ou le contrôle de tumeurs spontanées (Gorelik *et al.*, 1982; Talmadge *et al.*, 1980). L'implication des cellules NK dans la surveillance des cancers chez

l'Homme a d'abord été suggérée par l'observation d'une incidence plus forte de cancers chez des patients atteints du syndrome Chediak-Higashi, dans lequel un gène régulateur du trafic des lysosomes est muté et résulte en un défaut de fonctionnalité NK (Roder *et al.*, 1980). Ensuite, une faible activité cytotoxique des cellules NK a été associée à un faible pronostic chez des patients atteints de cancer (Pross and Lotzová, 1993). L'infiltration du site tumoral par les cellules NK est quant à elle un marqueur de pronostic favorable dans certains carcinomes (Ishigami *et al.*, 2000; Villegas *et al.*, 2002). Une étude conduite sur une cohorte de 3600 individus sur une période de 11 ans a montré la corrélation d'un fort potentiel cytotoxique des NK circulantes avec une plus faible incidence de divers cancers (Imai *et al.*, 2000).

Nous avons vu précédemment que les cellules NK expriment un large panel de récepteurs inhibiteurs et activateurs qui contrôlent leur état d'activation. Parmi ces récepteurs, le NKG2D apparaît comme crucial dans la surveillance des tumeurs puisque ses ligands, MICA, MICB et les ULBP, sont particulièrement exprimés lors des processus de transformations cellulaires. Des souris chez qui l'expression de NKG2D est abrogée sont plus susceptibles au développement de tumeurs primaires (Diefenbach and Raulet, 2002; Guerra *et al.*, 2008). Le rôle des NCR a aussi été mis en évidence dans le contrôle du développement tumoral. Le NKp30 est ainsi capable de reconnaître la molécule B7-H6 préférentiellement exprimée par les cellules tumorales (Brandt *et al.*, 2009). L'absence du NKp46 a été associée au développement de lymphomes, carcinomes et mélanomes chez la souris (Glasner *et al.*, 2012; Halfteck *et al.*, 2009). Par ailleurs, les cellules tumorales ont développé des mécanismes d'échappement au système immunitaire qui impactent notamment les cellules NK, telles que la sécrétion de cytokines immunosuppressives (TGF- β , IL-10) ou l'inhibition de l'engagement des récepteurs activateurs (induction de la sécrétion de ligands solubles NKG2D).

Bien que le potentiel anti-tumoral des cellules NK soit encore mal défini, des stratégies d'immunothérapie basées sur les cellules NK sont envisagées. Le blocage des récepteurs inhibiteurs NK ou l'infusion de cellules NK pré-activées à des souris dans le but de promouvoir l'activation des cellules NK ont par exemple été évalués dans divers modèles *in vitro* et *in vivo* (Morvan and Lanier, 2016).

I.4.c. Les cellules NK et transplantation

- Les cellules NK en greffe d'organe solide

Afin de prévenir la présentation des antigènes du donneur par les CPA aux lymphocytes T alloréactifs du receveur et donc limiter la destruction du greffon, un traitement immunosuppresseur est administré au receveur. Les cellules NK témoignent d'un intérêt particulier puisqu'elles sont souvent moins sensibles aux drogues immunosuppressives que les lymphocytes T. Les cellules NK apparaissent comme des membres actifs de la réponse immunitaire dans le contexte de la transplantation, à la fois impliquées dans le rejet aigu et chronique mais aussi dans la tolérance du greffon.

Des modèles murins dépourvus de lymphocytes B et T ont permis de mettre en évidence le rôle des cellules NK dans le rejet de greffes cardiaques ou cutanées allogéniques (Kroemer *et al.*, 2008; Maier *et al.*, 2001). L'alloréactivité médiée par les cellules NK peut s'expliquer par leur activation par le mécanisme de la reconnaissance du soi manquant, dans le cas où l'environnement HLA de classe I du receveur diffère de celui du donneur et ne permet plus l'engagement des récepteurs KIR inhibiteurs, doublée de la reconnaissance par le NKG2D de molécules de stress dont l'expression peut être induite par les conditions inflammatoires ou même infectieuses qui suivent la transplantation. Le rejet du greffon est aussi induit par l'environnement cytokinique, tel que la sécrétion d'IFN- γ ou de TNF- α par

les cellules NK activées, qui favorise la maturation des CPA *via* la stimulation de l'expression des molécules CMH et de co-stimulation et donc l'activation de la réponse T.

A l'inverse, les cellules NK présentent des propriétés immunorégulatrices qui contribuent à la tolérance du greffon. Elles sont ainsi capables de s'attaquer aux CPA non matures allogéniques et autologues et donc limiter l'alloréactivité T (Yu *et al.*, 2006). La sécrétion de cytokines immunosuppressives IL-10 et TGF- β contribue également à inhiber la réponse lymphocytaire T.

- Les cellules NK en greffe de CSH

L'importance des cellules NK a particulièrement été mise en évidence dans la greffe de CSH, chez des patients atteints d'hémopathies malignes ou de désordres immuns. Afin de prévenir le rejet de greffe et maladie du greffon contre l'hôte (*Graft versus Host Disease*, GvHD), un traitement immunosuppresseur est administré au receveur, ce qui le rend d'ailleurs plus susceptible aux infections. Les cellules NK jouent alors un rôle important dans l'immunité du receveur, d'autant que ces cellules réapparaissent plus précocement que les membres du compartiment adaptatif (Chklovskaja *et al.*, 2004). Les incompatibilités KIR/HLA entre le receveur et le donneur peuvent donner lieu à une alloréactivité de la part des cellules NK du donneur envers le receveur, par le mécanisme de la reconnaissance du soi manquant. Les incompatibilités KIR/HLA ont été décrites comme bénéfiques grâce aux cellules NK alloréactives du donneur qui contribueraient au phénomène appelé « greffe versus leucémie » (*Graft-versus-Leukemia*, GvL) (Ruggeri *et al.*, 1999). La participation des cellules NK à l'effet GvL, phénomène qui concourt à l'éradication des cellules tumorales chez le receveur, a notamment été mise en évidence chez des patients atteints de leucémie myéloïde aigüe (Ruggeri *et al.*, 2002). Les cellules NK alloréactives favoriseraient également la prise de la greffe et protégeraient contre l'effet GvHD (Giebel *et al.*, 2003; Ruggeri *et al.*, 2002). Il

semblerait cependant que l'effet bénéfique des cellules NK alloréactives sur le devenir de la greffe ne soit pas constant et demeure controversé (Hsu *et al.*, 2005; Schaffer *et al.*, 2004; Schellekens *et al.*, 2014).

I.4.d. Les cellules NK et les maladies auto-immunes

La tolérance au soi est d'ordinaire assurée par le système immunitaire et l'autoréactivité est ainsi contrôlée. Lorsque cette protection est compromise, le système immunitaire peut s'attaquer à des auto-antigènes et engendrer des désordres auto-immuns, spécifiques d'organes ou systémiques, aigus ou chroniques. Parmi les maladies auto-immunes (MAI) les plus étudiées se trouvent par exemple la sclérose en plaque (SEP), la polyarthrite rhumatoïde (PR), le lupus systémique érythémateux (LSE) ou le diabète de type I. Les maladies auto-immunes sont généralement attribuées à l'autoréactivité des lymphocytes B et T, cependant des données issues de la littérature suggèrent l'implication des cellules NK, tant dans la protection contre la rupture de la tolérance au soi que dans sa promotion.

Dans certaines maladies auto-immunes humaines, il a été observé la diminution du nombre des cellules NK circulantes, généralement associée à une perte de cytotoxicité (Aramaki *et al.*, 2009; Yabuhara *et al.*, 1996). Dans la lymphocytose NK chronique, les cellules NK, de phénotype immature et de potentiel fonctionnel limité, se trouvent en excès dans la circulation et des manifestations auto-immunes sont constatées (Bareau *et al.*, 2010; Lamy and Loughran, 2003). Cela suggère que la perturbation de l'homéostasie NK et de leurs fonctions cytotoxiques participent au déclenchement de l'autoréactivité. Le rôle protecteur des cellules NK contre l'auto-immunité pourrait s'expliquer, comme dans le cas de la tolérance au greffon, par la lyse des CPA immatures qui limite ainsi la présentation d'auto-antigènes aux lymphocytes T, ou la production de cytokines immunosuppressives.

L'infiltration dans le liquide synovial de cellules NK de phénotype CD56^{Bright} capables de sécréter de fortes quantités d'IFN- γ a été documentée chez des patients souffrant de PR (Dalbeth and Callan, 2002). La rupture de la tolérance au soi des cellules NK pourrait impliquer un défaut d'inhibition des cellules NK ou une activation excessive. L'expression aberrante des ligands de NKG2D dans certains contextes pourrait contribuer à des manifestations auto-immunes : PR, maladie céliaque, diabète de type I (Caillat-Zucman, 2006). Certaines combinaisons génétiques KIR/HLA ont été associées à une susceptibilité accrue aux MAI : génotype KIR2DS1⁺/2DS2⁻ dans la SLE, KIR2DS2/HLA-C du groupe C1 dans le diabète, KIR3DS1/HLA-B Bw4 et SLE, diabète de type 1, PR, etc (Flodström-Tullberg *et al.*, 2009; Fogel *et al.*, 2013). La contribution des cellules NK aux MAI peut aussi s'expliquer par la promotion de la maturation des cellules dendritiques et l'activation des macrophages.

I.4.e. Les cellules NK et les maladies infectieuses

Contrairement au rôle des cellules NK dans le contrôle des infections virales qui est clairement établi, des éléments mettant en évidence leur participation à la clairance des infections bactériennes, fongiques et parasitaires commencent seulement à émerger. La localisation de sous-populations NK au niveau des muqueuses contribue à la surveillance et au contrôle de l'invasion de tels agents pathogènes.

- Les infections virales

A l'instar de leur rôle dans l'immunosurveillance tumorale, le contrôle des infections virales par les cellules NK a été intensivement documenté. De plus, nous avons vu que les cellules NK disposent d'un arsenal pour reconnaître et détruire les cellules infectées grâce à la multitude de récepteurs de spécificité différente qu'elles expriment. Certains sont d'ailleurs capables d'interagir directement avec certains motifs viraux, tels que les NCR et les virus

Influenza, Sendai ou encore le CMV. Nous aborderons ici seulement les cas du Virus de l'Immunodéficience Humaine (VIH) et du Virus de l'Hépatite C (VHC). Par ailleurs, l'infection à CMV qui mobilise particulièrement la réponse NK sera détaillée dans le chapitre suivant.

L'infection par le VIH module la distribution des sous-populations NK périphériques, qui voient leur potentiel fonctionnel altéré. Un accroissement de la population CD56^{Bright} au détriment de la population CD56^{Dim}CD16⁺, puis l'accumulation d'une population CD56⁺CD16⁺, peu réactive à la stimulation par l'ADCC, sont observés lors de la phase aiguë et chronique de l'infection (Björkström *et al.*, 2010; Mavilio *et al.*, 2005; Ripa *et al.*, 2015). La perte de fonctionnalité NK résulte d'une expression diminuée des KIR activateurs et des NCR ainsi que par l'augmentation des KIR inhibiteurs doublée d'une sécrétion réduite des cytokines IFN- γ , TNF- α et du GM-CSF (Alter *et al.*, 2005; De Maria *et al.*, 2003; Mavilio *et al.*, 2003). Ces perturbations du phénotype et de la fonction NK sont directement associées à la virémie et semblent réversibles après administration d'antirétroviraux (Brunetta *et al.*, 2010). Des études génétiques ont mis en évidence que la présence du KIR3DL1 et/ou du 3DS1 dans certains contextes Bw4 était associée à la fois à la résistance contre le VIH et à une progression plus lente de la maladie (Martin *et al.*, 2007).

Dans l'infection par le VHC, outre la reconnaissance, la lyse directe des hépatocytes infectés et la production d'IFN- γ par les cellules NK (Stegmann *et al.*, 2010), plusieurs combinaisons génétiques KIR/HLA ont été corrélées à une évolution favorable ou défavorable de la maladie. Khakoo et ses collaborateurs ont notamment montré dans une cohorte de 1037 individus que la présence du gène *KIR2DL3* dans un environnement spécifique HLA-Cw du groupe C1 homozygote était associée à la résolution spontanée de l'infection (Khakoo *et al.*, 2004; Knapp *et al.*, 2010). Le KIR2DL3 qui se lie avec une moindre affinité aux molécules HLA-Cw du groupe C1 par comparaison au KIR2DL2 engendrerait un signal inhibiteur plus

facile à surpasser par les signaux activateurs et permettrait une activation NK plus aisée aux individus porteurs de cette combinaison. Il a été montré récemment que la nature du peptide issu du VHC présenté dans un contexte HLA-C*03 :04 pouvait influencer la stabilité membranaire de cette molécule HLA-Cw du groupe C1 (Lunemann *et al.*, 2016). Cela jouerait également sur l'interaction de la molécule HLA-Cw avec le récepteur KIR2DL3 et modulerait ainsi la réponse NK. Un rôle protecteur du KIR3DS1 en association avec certaines molécules HLA-Bw4⁺ a aussi été suggéré contre l'évolution de l'hépatite chronique vers un carcinome hépatocellulaire (López-Vázquez *et al.*, 2005). A l'inverse, l'homozygotie HLA-C2 et la combinaison KIR2DS3/HLA-C2 ont été plus fréquemment observées chez des patients porteurs d'une infection chronique à VHC (Dring *et al.*, 2011; Khakoo *et al.*, 2004).

- Les infections bactériennes

Il a été montré que le NKp44 de cellules NK humaines purifiées pouvait interagir directement avec des composants issus de la paroi de *Nocardia farcinica* et de *Pseudomonas aeruginosa*, agents responsables d'infections pulmonaires, et de la souche vaccinale atténuée *Mycobacterium bovis* (Bacille de Calmette-Guérin, BCG), et ainsi potentialiser l'activation des cellules NK (Esin *et al.*, 2008). La reconnaissance du BCG, qui pourrait faire intervenir le TLR2, induit la sécrétion d'IFN- γ et de TNF- α par les cellules NK et la lyse des cellules dendritiques infectées (Marcenaro *et al.*, 2008). La participation du NKp46 à la lyse des monocytes infectés *in vitro* par *Mycobacterium bovis* a aussi été démontrée (Vankayalapati *et al.*, 2002). De plus, chez des patients atteints de tuberculose ne parvenant pas à contrôler l'infection, un défaut d'expression de NKp46 et des fonctions cytotoxiques NK à l'encontre des monocytes infectés a été mis en évidence. D'autres modèles ont montré l'induction des fonctions effectrices NK grâce à l'activation des cellules dendritiques et des monocytes dans l'infection à *Listeria monocytogenes*, *Mycobacterium tuberculosis* et BCG, *Staphylococcus aureus*. La reconnaissance des agents pathogènes par les cellules dendritiques et les

monocytes provoque la sécrétion d'IL-12, IL-18 et des IFN de type I prompts à activer les cellules NK qui à leur tour orientent une réponse T de type Th1 (Vankayalapati *et al.*, 2005). Le relargage des granules cytotoxiques permettent la lyse des cellules infectées. Une étude récente chez la souris a montré que la granulysine, qui rompt préférentiellement les parois pauvres en cholestérol des bactéries, agents fongiques et parasites, de concert avec la perforine et certains granzymes, permet la destruction des bactéries invasives (Walch *et al.*, 2014).

- Les infections parasitaires

L'implication des cellules NK dans la défense contre des protozoaires parasites responsables de problèmes majeurs de santé publique (toxoplasmose, trypanosomiase, leishmaniose, paludisme, etc.) a été mise en évidence. Nous prendrons ici l'exemple de la leishmaniose et du paludisme.

La déplétion des cellules NK chez la souris a été associée à un accroissement de la sévérité de l'infection à *Leishmania major* (*L. major*) (Laskay *et al.*, 1993; Scharon and Scott, 1993). Au contraire, chez des souris SCID, pour *Severe Combined Immunodeficiency*, chez qui les lymphocytes T sont absents mais les cellules NK présentes, la dissémination de l'infection dans l'organisme est contenue (Laskay *et al.*, 1995). Le contrôle de l'infection serait plutôt attribué à la production de cytokines, notamment l'IFN- γ , plutôt qu'à une cytotoxicité directe (Scharon and Scott, 1993; Scharon-Kersten and Scott, 1995). L'activation NK est généralement indirecte et médiée par les cytokines mais le lipophosphoglycane (LPG) que présente *L. major* pourrait stimuler le TLR2 et induire la production d'IFN- γ et de TNF- α (Becker *et al.*, 2003).

Dans un modèle murin d'infection à *Plasmodium chabaudi*, la déplétion des cellules NK a été associée à l'augmentation de la charge parasitaire sanguine et à la mortalité

(Kitaguchi *et al.*, 1996). Puis, il a été montré qu'au cours de l'infection par *Plasmodium falciparum* (*P. falciparum*) chez l'humain naïf, les cellules NK sécrètent rapidement de forts taux d'IFN- γ . *In vitro*, cette réponse IFN- γ intervient au contact d'érythrocytes infectés et de façon dépendante aux cytokines IL-12 et 18 (Artavanis-Tsakonas and Riley, 2002; Artavanis-Tsakonas *et al.*, 2003; Baratin *et al.*, 2005). La cytotoxicité directe des cellules NK envers les érythrocytes infectés a aussi été démontrée, faisant intervenir la perforine et le granzyme B (Korbel *et al.*, 2005). Plus récemment, dans un modèle de souris humanisée, la déplétion des cellules NK, mais pas des macrophages, a été associée à une parasitémie élevée. Dans ce modèle, les cellules NK interagissent par contact direct, notamment via LFA-1 et dans une moindre mesure DNAM-1, avec les érythrocytes infectés ce qui mène à leur élimination (Chen *et al.*, 2014). Par ailleurs, dans une cohorte thaïlandaise, la présence du gène KIR2DL3 dans son environnement HLA-C spécifique C1 a été associée au développement du paludisme cérébral, qui est une complication majeure de l'infection (Hirayasu *et al.*, 2012).

- Les infections fongiques

Des modèles animaux et des données *in vitro* suggèrent une activité antifongique des cellules NK (Schmidt *et al.*, 2013). Peu d'éléments sont cependant disponibles quant à leur importance en santé humaine. Les cellules NK exercent notamment une activité cytotoxique envers les espèces *Aspergillus* et *Candida*, qui sont parfois responsables d'invasion massive de l'organisme pouvant entraîner le décès des patients infectés. Cette activité est médiée de façon directe par l'endommagement du pathogène infectieux et de façon indirecte via la sécrétion de cytokines permettant de mobiliser d'autres acteurs immuns. Dans un modèle d'infection invasive à *Aspergillus fumigatus* chez la souris, les cellules NK se sont révélées être la source majeure d'IFN- γ dans la phase précoce de l'infection, contribuant ainsi à l'attaque de l'agent fongique par les macrophages (Park *et al.*, 2009). Les mécanismes de

reconnaissance des pathogènes fongiques par les cellules demeurent à identifier, bien que les TLR2, 4 et 9 pourraient être impliqués.

II. Le cytomégalovirus humain

II.1. Taxonomie des herpesvirus

II.1.a. L'ordre des *Herpesvirales*

Les herpesvirus sont présents de façon abondante à l'échelle mondiale et sont caractérisés par une architecture commune du virion. Les herpesvirus infectent l'ensemble du spectre des Vertébrés, puisque les poissons, amphibiens, reptiles, oiseaux et mammifères en sont la cible (Davison, 2002). Des herpesvirus ont également été caractérisés chez les bivalves (Davison *et al.*, 2005) et gastéropodes (Savin *et al.*, 2010), ce qui témoigne de leur origine lointaine. Chaque herpesvirus est associé en grande majorité de façon spécifique à une seule espèce, à laquelle il est souvent très bien adapté et chez qui il n'occasionne qu'une faible pathogénicité. Cela témoigne d'une forte co-évolution hôte-virus qui s'est poursuivie sur des millions d'années (Davison, 2002; McGeoch *et al.*, 2000). Du point de vue morphologique, les herpesvirus présentent un génome à ADN linéaire double brin, de 125 à 290kpb, intégré dans une capside icosaédrique entourée d'une matrice protéique que constitue le tégument. Celui-ci est surmonté d'une enveloppe lipidique associée à des glycoprotéines, conférant au virion un diamètre allant de 200 à 250nm. La structure commune du virion a constitué le critère historique d'attribution des virus au groupe Herpès jusqu'aux années 1980s. Cependant, l'avènement des techniques de séquençage de l'ADN a permis de mettre en exergue la diversité de ces virus à l'échelle génétique occasionnant par-là même un remaniement des critères de classification taxonomique. Il a ainsi pu être mis en évidence que l'ensemble des herpesvirus partage une similitude de séquence uniquement au niveau de la séquence en acides aminés de deux gènes, le premier codant pour l'ADN polymérase et le deuxième pour la sous-unité ATPase de la terminase (Davison, 2011; McGeoch *et al.*, 2006). Les herpesvirus sont désormais regroupés au sein de l'ordre des *Herpesvirales* lui-même

divisé en trois familles (Davison *et al.*, 2009). La première, *Alloherpesviridae*, comporte des virus spécifiques des poissons et amphibiens. La seconde famille, *Herpesviridae*, contient les virus qui infectent les reptiles, oiseaux et mammifères tandis que la troisième, *Malacoherpesviridae*, regroupe les virus spécifiques des Invertébrés.

II.1.b. La famille des *Herpesviridae*

L'arbre phylogénétique de la famille des *Herpesviridae* s'apparente à celui de leurs espèces hôtes, contribuant ainsi à l'hypothèse d'une spéciation virale en parallèle de celle de leurs hôtes sur une très longue échelle de temps (Davison *et al.*, 2011) (Figure 16). Les *Herpesviridae* sont composés de trois sous-familles dont chacune contient au moins deux herpesvirus spécifiques de l'Homme (Tableau 2). La sous-famille des *Alphaherpesvirinae* compte les virus Herpès Simplex de type 1 et de type 2 (HSV-1 et HSV-2) ainsi que le virus Varicelle-Zona (*Varicella-Zoster Virus*, VZV). La sous-famille des *Betaherpesvirinae* comporte le CMV ainsi que les herpesvirus de type 6 et de type 7 (HHV-6 et HHV-7). La dernière sous-famille, *Gammaherpesvirinae*, comprend quant à elle le virus Epstein-Barr (EBV) et l'herpesvirus humain de type 8 (HHV-8). Les herpesvirus humains sont associés à un large éventail de symptômes lors de l'infection primaire, bien que le plus souvent de faible pouvoir pathogène chez l'individu immunocompétent. Les *Herpesviridae* humains ont pour caractéristique de persister à vie dans l'organisme hôte à l'issue de la primo-infection, sous forme de latence dont les sites sont propres à chaque virus (Tableau 2). Une faible activité de réplication de l'ADN viral, qui se trouve sous forme épisomale, est exercée par l'ADN polymérase cellulaire sans qu'il y ait de production de nouveaux virions. L'expression des gènes viraux est réprimée par des mécanismes épigénétiques cellulaires, probablement afin d'échapper à la surveillance du système immunitaire. Des épisodes de réactivation virale, induits par des phénomènes plus ou moins connus selon les herpesvirus humains, entraînent la synthèse de néo-virions par l'activité de l'ADN polymérase virale.

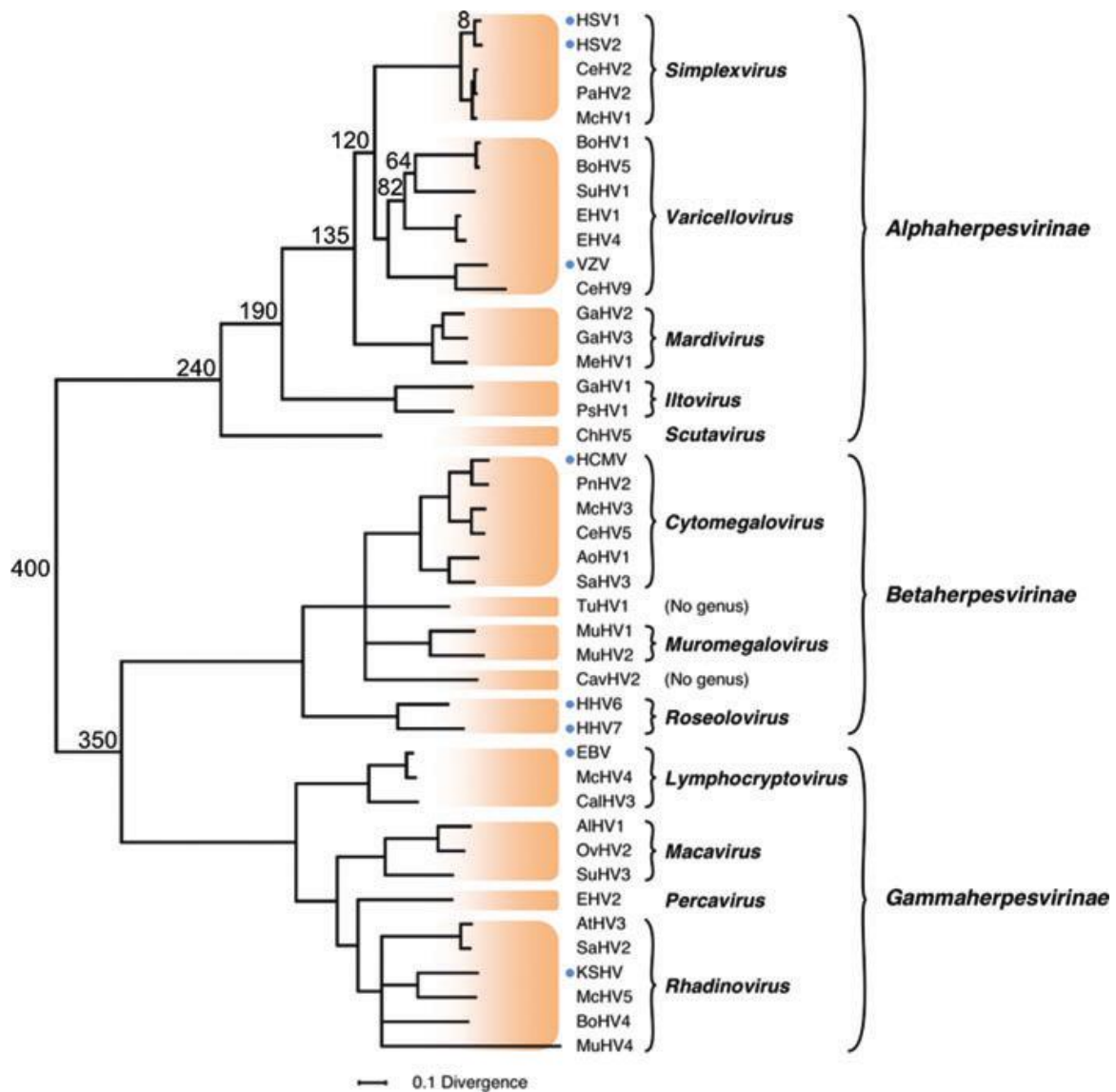


Figure 16 : Arbre phylogénétique de la famille des *Herpesviridae*. La construction de l'arbre est basée sur l'alignement des séquences en acides aminés issues des gènes UL15, UL19, UL27, UL28, UL29 et UL30. L'échelle représente le nombre de substitutions par site. Les nombres figurant à certains nœuds de l'arbre représentent l'estimation des dates de divergence en millions d'années à partir du présent. Les genres et familles auxquelles appartiennent les herpesvirus sont indiqués sur la droite de la figure. Les points bleus illustrent les herpesvirus humains. D'après Davison *et al.*, 2011.

<i>Herpesvirinae</i>	Genre	Nom courant et acronyme	Nom formel	Taille du génome (kpb)	Pathologies et symptômes associés	Principaux sites de latence
α	<i>Simplexvirus</i>	Herpes Simplex Virus-1 (HSV-1)	Human herpesvirus 1	152	Lésions vésiculaires et ulcérations des muqueuses oro-pharyngées, oculaires (HSV-1) et génitales (HSV-2), kératite, encéphalite	Noyaux cellulaires des ganglions sensitifs (ganglion du nerf trijumeau)
	<i>Simplexvirus</i>	Herpes Simplex Virus-2 (HSV-2)	Human herpesvirus 2	155		Noyaux cellulaires des ganglions sensitifs (ganglions sacrés)
	<i>Varicellovirus</i>	Varicella Zoster Virus (VZV)	Human herpesvirus 3	125	Varicelle, Zona	Noyaux cellulaires des ganglions sensitifs (ganglions rachidiens et des paires crâniennes)
β	<i>Cytomegalovirus</i>	Cytomegalovirus (CMV)	Human herpesvirus 5	227-236	Syndrome mononucléosique, fièvre prolongée, atteintes tissulaires	Cellules CD34 ⁺ de la moelle, monocytes/macrophages, cellules endothéliales
	<i>Roseolovirus</i>	Roseola Virus (HHV-6)	Human herpesvirus 6A et 6B	159-162	Roséole infantile	Monocytes/macrophages, cellules CD34 ⁺ de la moelle
	<i>Roseolovirus</i>	Roseola Virus (HHV-7)	Human herpesvirus 7	144-153	Roséole infantile	Leucocytes circulants, cellules épithéliales
γ	<i>Lymphocryptovirus</i>	Epstein-Barr Virus (EBV)	Human herpesvirus 4	172-173	Mononucléose infectieuse, lymphome de Burkitt, Carcinome du nasopharynx (Chine)	Lymphocytes B mémoires
	<i>Rhadinovirus</i>	Kaposi's sarcoma-associated virus (HHV-8)	Human herpesvirus 8	134-138	Sarcome de Kaposi, maladie multicentrique de Castelman, lymphome primitif des séreuses	Lymphocytes B

Tableau 2: Classification et description des herpesvirus humains.

II.2. Généralités liées au CMV

II.2.a. Découverte et isolement du cytomégalovirus humain

Les premières descriptions anatomopathologiques de cellules de taille anormale à inclusions intranucléaires, caractéristiques de l'infection à cytomégalovirus, datent de la fin du XIXe - début XXe siècle. En 1881, le Pr Hugo Ribbert observa pour la première fois de larges cellules dans des sections de reins issues d'un enfant mort-né suspecté de syphilis, ainsi qu'au niveau des glandes parotides d'enfants. Ce n'est qu'en 1904 que Ribbert put interpréter ses observations grâce aux travaux de Jesionek et Kiolemenoglou faisant état de la présence de grandes cellules à inclusions intranucléaires, celles-ci étant surmontées d'un halo clair, dans les poumons, les reins et le foie d'un fœtus atteint de syphilis. Les auteurs interprétèrent ces corps d'inclusion comme la présence de protozoaires. En 1921, Goodpasture et Talbot employèrent le terme de « cytomégalie » pour désigner ces lésions cytopathologiques et suggérèrent l'implication d'un virus plutôt qu'un protozoaire. L'hypothèse d'une étiologie virale est appuyée en 1925 par Von Glahn et Pappenheimer d'après les observations de Lipschütz en 1921 de larges cellules à inclusions intranucléaires chez un homme infecté par le VZV et le HSV. L'origine virale des inclusions cytomégaliennes s'impose notamment avec les travaux expérimentaux de Cole et Kuttner en 1926 sur la transmission de l'agent pathogène, baptisé « virus des glandes salivaires », chez le cochon d'Inde. Par ailleurs, les expérimentations de Cole et Kuttner dévoilèrent les premières indications quant à la spécificité d'espèce du cytomégalovirus.

C'est en s'appuyant sur le développement des techniques de culture de cellules humaines *in vitro* au début des années 50 que le Dr Margaret Smith parvint à isoler pour la première fois le cytomégalovirus humain à partir des glandes salivaires d'un enfant. Dans le même temps, le CMV fut isolé de façon fortuite par deux autres groupes. A Bethesda, Rowe

et al, intéressés par l'étude du groupe des adénovirus, isolèrent le cytomégalovirus à partir du tissu adénoïdien de trois enfants ayant subi une amygdalectomie, donnant notamment lieu à la propagation de la souche AD169 (Rowe *et al.*, 1956). Le second groupe, dirigé par le Dr Weller, isola la souche Davis du CMV à partir d'une biopsie hépatique d'un nourrisson, en tentant d'isoler *in vitro* l'agent responsable de la toxoplasmose dont l'enfant présentait les symptômes caractéristiques (Craig *et al.*, 1957). Weller suggéra en 1960 le terme de « cytomégalovirus » pour désigner le virus responsable de la maladie à inclusions cytomégaliennes.

II.2.b. Structure du virion

La particule virale du CMV humain mesure environ 230nm, taille conférée par la capsid qui enferme le génome viral, elle-même entourée d'un tégument enveloppé par une membrane d'origine cellulaire (Figure 17).

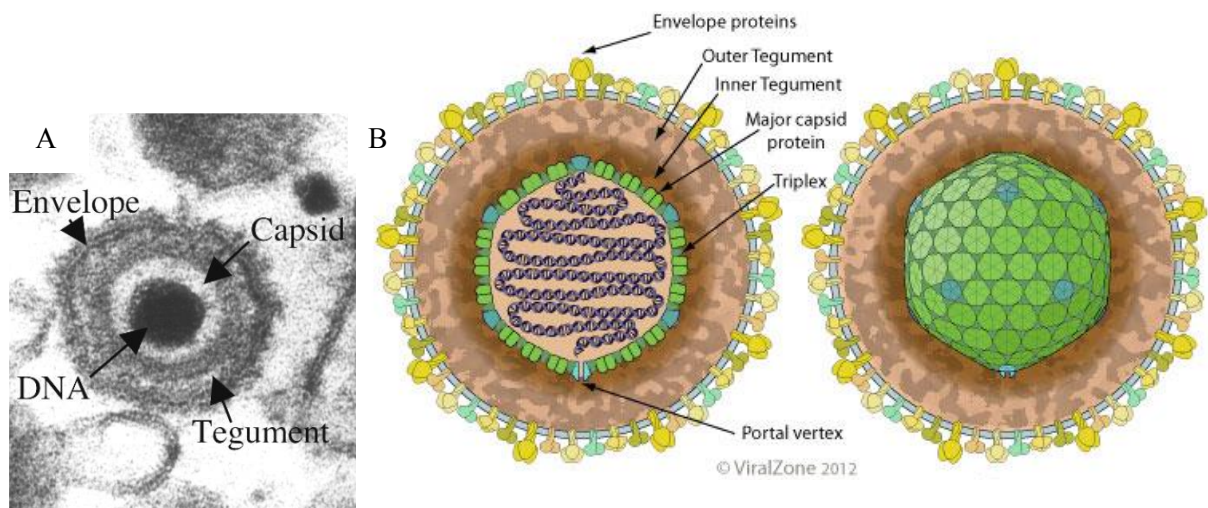


Figure 17 : Structure du virion CMV. (A) Image de microscopie électronique du virion (Gibson, 2008). (B) Représentation schématique du virion (ViralZone, Swiss Institute of Bioinformatics). L'ADN viral double brin est enfermé dans une capsid icosaédrique. La capsid est entourée du tégument lui-même enveloppé dans une bicouche lipidique qui porte de nombreuses protéines.

- Le génome viral

Le cytomégaloherpesvirus est pourvu d'un génome à ADN double brin linéaire d'environ 235kpb, ce qui en fait le plus grand des herpesvirus humains connus (Dolan *et al.*, 2004). Parmi les cinq types de génomes que l'on retrouve chez les herpesvirus, classés de A à E, le génome du CMV possède l'architecture la plus complexe, de classe E (Davison, 2007). Elle consiste en deux régions uniques, l'une longue (U_L , Unique Long), qui représente 82% du génome, et l'autre courte (U_S , Unique Short) (Figure 18). Celles-ci sont flanquées à leurs extrémités terminales et internes de séquences inversées et répétées baptisées TRL/IRL (Terminal Repeat Long/Internal Repeat Long), qui bordent la région U_L , et IRS/TRS (Internal Repeat Short/Terminal Repeat Short) qui encadrent la région U_S . Les segments répétés terminaux TRL et TRS partagent une région commune de plusieurs centaines de paires de bases, la séquence *a*, qui comporte notamment les séquences *pac1* et *pac2* (*cis-acting packaging elements*) (Kemble and Mocarski, 1989) impliquées dans la circularisation de l'ADN viral après son entrée dans la cellule, le clivage de l'ADN lors de la réplication puis son encapsidation (Bogner *et al.*, 1998; Gibson, 2008; Spaete and Mocarski, 1985). La séquence *a* se trouve en nombre variable de copies selon les souches virales mais aussi selon le nombre de passages qu'elles ont subi *in vitro*. Les autres régions comprises dans les segments répétés TRL/IRL et IRS/TRS sont nommées *b* et *c*. Le génome du CMV suit donc l'arrangement suivant : $ab-U_L-b'a'c'-U_S-ca$, où a' , b' et c' possèdent une orientation inversée par rapport aux séquences *a*, *b* et *c* (Murphy and Shenk, 2008; Sijmons *et al.*, 2012). L'inversion des segments U_L et U_S , par la recombinaison des séquences terminales *a* et internes a' , donne lieu à la formation de quatre isomères que l'on retrouve de façon équimolaire dans les particules virales isolées (Murphy and Shenk, 2008).

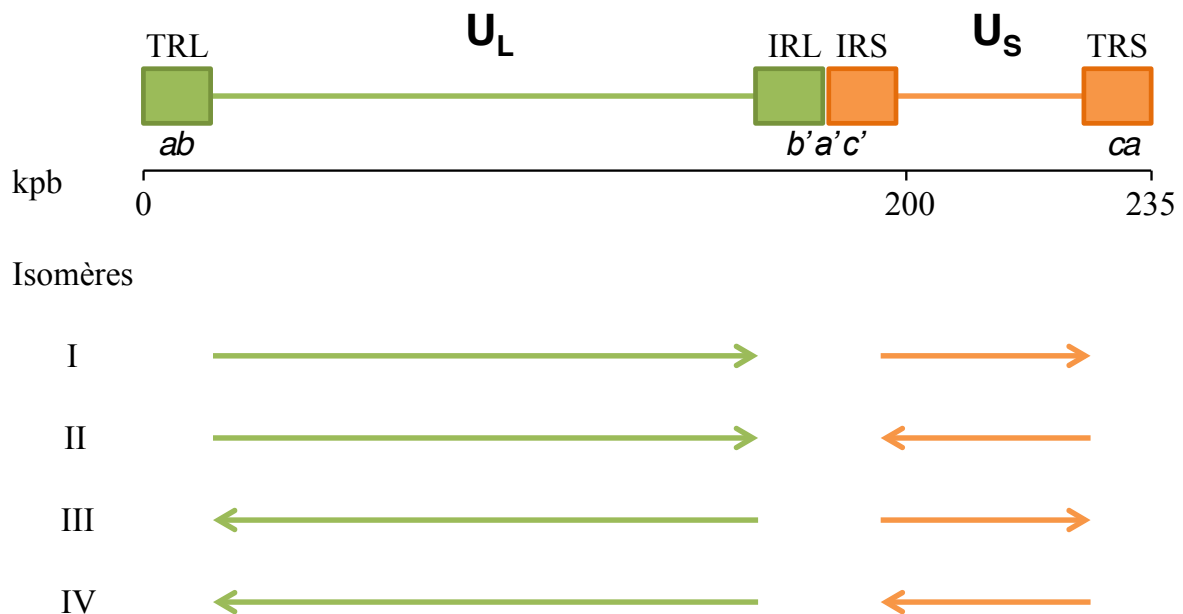


Figure 18 : Représentation schématique de la structure du génome du CMV. Deux régions uniques, U_L et U_S , composent le génome du CMV. Elles sont chacune bordées par les segments répétés TRL/IRL et IRS/TRS. Eux-mêmes contiennent des séquences nommées a , b (TRL), b' , a' (IRL), a' , c' (IRS) et a , c (TRS). Les séquences b' , a' , c' sont en orientation inversée par rapport aux séquences a , b et c . La recombinaison des séquences a génère la formation de quatre isomères génomiques. Schéma inspiré de Sijmons *et al.*, 2012.

Le génome du CMV contiendrait 165 à 252 cadres ouverts de lecture (*Open Reading Frame*, ORF) (Davison *et al.*, 2003; Murphy *et al.*, 2003). Une étude récente en a même identifié plus de 700 grâce à l'analyse du transcriptome du CMV, doublée d'un profilage ribosomique (Stern-Ginossar *et al.*, 2012). Tous les gènes du CMV ne codent pas pour des protéines et pour une grande majorité leur produit n'est pas connu (Murphy *et al.*, 2008). On dénombre également 14 ORF qui codent pour des micro-ARN (miARN) non-codants (Fannin Rider *et al.*, 2008). Par convention, les gènes codés par le CMV sont nommés en fonction de leur position dans le génome (UL1, UL2, US1, US2, etc.) (Figure 19), dénomination précédée d'un p lorsque l'on fait référence à la protéine. Des analyses de comparaison de séquence ont permis de mettre en évidence la forte variabilité génomique observée d'une souche à l'autre. Ainsi, une délétion de 15kpb et de 13kpb, respectivement, au niveau de la jonction U_L/b' dans les souches de laboratoire AD169 et Towne a été mise en évidence par comparaison au

génomique de la souche Toledo (Prichard *et al.*, 2001). Cette dernière a subi moins de passages *in vitro* que les précédentes et son pouvoir pathogène est conservé (Quinnan *et al.*, 1984). On estime que 19 ORF sont contenus dans cette région U_L/b', notamment impliqués dans le tropisme cellulaire et la virulence (Cha *et al.*, 1996). En 2004, le groupe de Dolan *et al* publie la séquence complète du génome de la souche Merlin, isolée à partir d'une infection congénitale et ayant subi peu de passages *in vitro* (Dolan A *et al.*, 2004). Il s'agit de la séquence de référence en terme de souche sauvage du CMV, pour laquelle 165 gènes ont été initialement définis et l'annotation régulièrement mise à jour (Figure 19). La plupart des gènes sont alignés les uns après les autres et il y a peu de séquences non codantes. Plusieurs sets de gènes partagent des similarités de séquence, probablement dues à des phénomènes de duplication puis ont divergé en termes de structure et de fonction. Ces gènes sont répartis dans 15 familles.

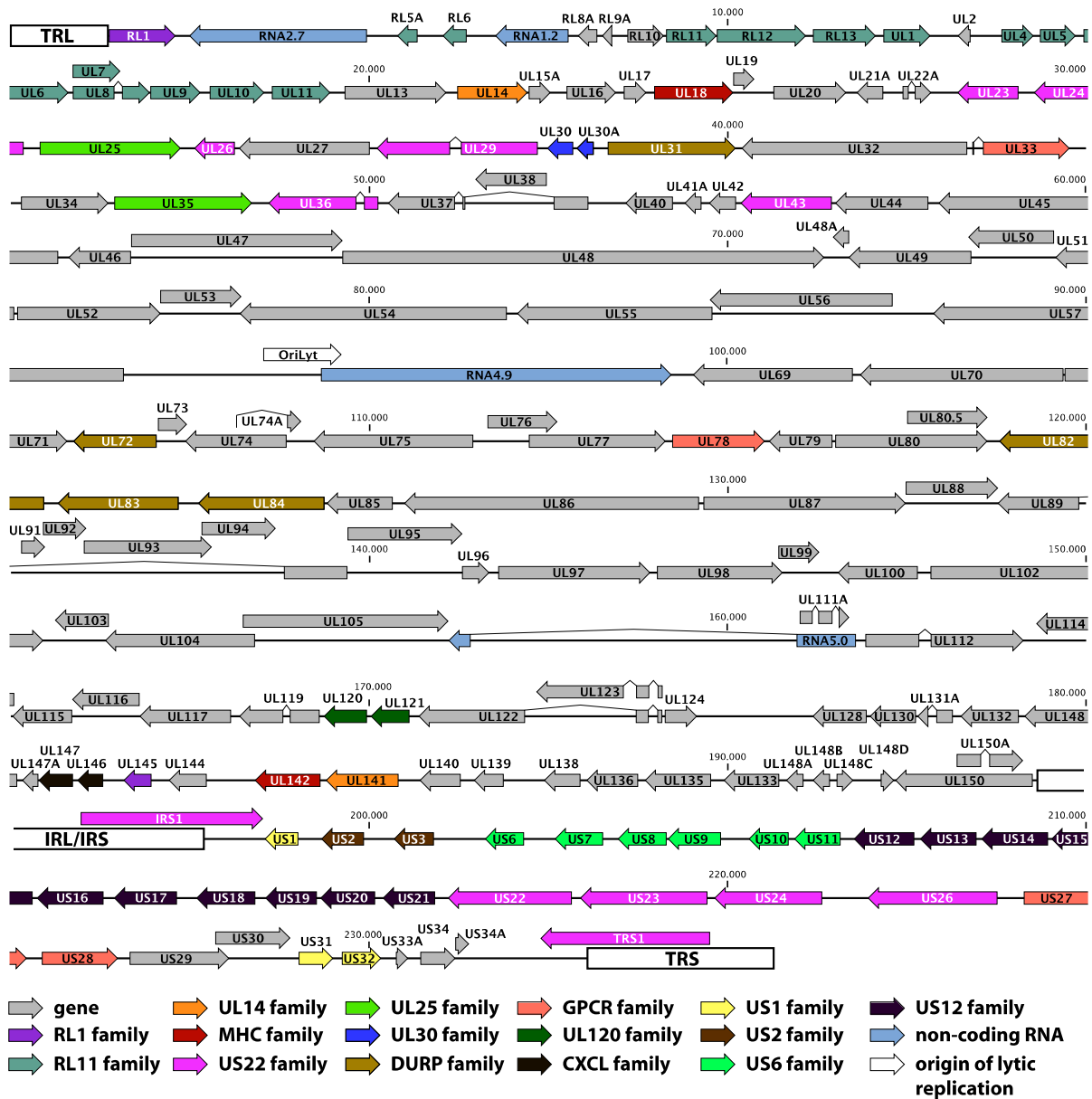


Figure 19 : Carte génomique de la souche Merlin. L'ADN est représenté de façon simple brin, en kpb. Chaque gène est indiqué par une flèche et est attribué à une famille de gènes suivant le code couleur. La séquence de la souche Merlin est accessible sur GenBank via le numéro NC_006273. D'après Sijmons *et al.*, 2014.

- La capside

La capside du CMV présente une symétrie icosaédrique dont les faces sont constituées de 162 capsomères. Ceux-ci contiennent 150 hexamères et 12 pentamères qui définissent respectivement les parois triangulaires et les axes de la capside. Des trimères, au nombre de 320 sont localisés entre les capsomères (Figure 20). L'un des douze sommets de la capside comporte un portail par lequel l'ADN viral est encapsidé ou relâché (Gibson, 2008). Quatre protéines conservées chez les herpesvirus sont présentes en abondance dans la capside. La protéine pUL86 (*Major Capsid Protein*, MCP) en est le principal composant, avec 960 copies qui forment les hexamères et pentamères (Britt, 2007). La petite protéine de la capside (*Smallest Capsid Protein*, SCP), pUL48A (900 copies), coiffe le sommet de chaque hexamère. Les protéines mineures de la capside, un dimère de pUL85 (*Minor Capsid Protein*, MnCP) et un monomère de pUL46 (*Minor Capsid-B inding Protein*, MnC-BP), s'associent pour former les trimères qui bordent les capsomères. La protéine pUL85 assure l'ancrage de l'ADN à la capside. La protéine pUL104 s'assemble en dodécamère pour former un tunnel par lequel transite l'ADN viral (Holzenburg *et al.*, 2009). Enfin, la protéine précurseur d'assemblage pUL80.5 (*Assembly Protein precursor*, pAP) et la protéase précurseur pUL80a (*maturational Protease precursor*, pPR), produits de deux clivages post-traductionnels de la protéine pUL80, coordonnent l'assemblage et le maintien de la structure de la capside (Nguyen *et al.*, 2008).

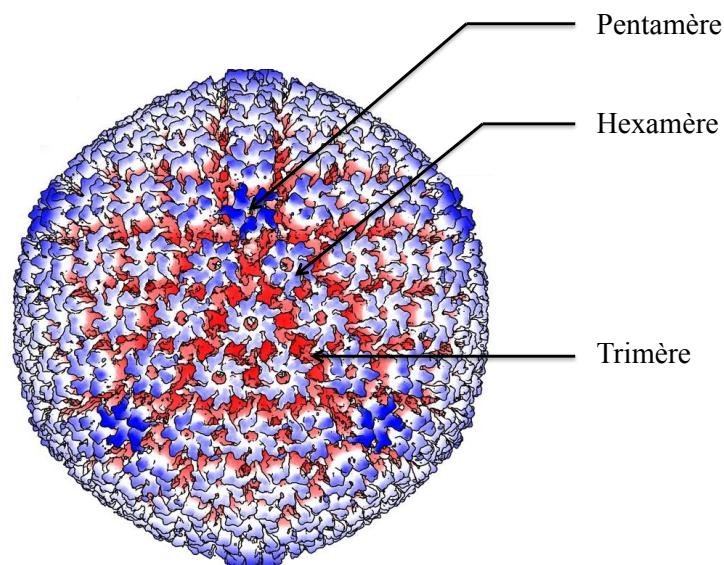


Figure 20 : Reconstruction de cryo-microscopie électronique de la structure de la capside du CMV. De structure icosaédrique, la capside du CMV contient 162 capsomères composés de 150 hexamères et 12 pentamères de la protéine pUL86 (MCP). Des trimères composés d'un dimère de pUL85 et d'un monomère pUL46 bordent les capsomères. D'après Dai XH *et al.*, 2014, (<http://www.virology.wisc.edu>).

- Le tégument

Des observations de microscopie électronique ont montré que le tégument est une structure amorphe dont certaines protéines sont associées à la capside (Chen *et al.*, 1999; Grünewald *et al.*, 2003). Beaucoup des protéines du tégument sont phosphorylées, d'où l'attribution du préfixe pp dans leur dénomination. Parmi les nombreuses protéines du tégument, la protéine pp65 codée par le gène UL83 est la plus abondante. Elle est également le composant principal des particules virales (Irmier and Gibson, 1983). Après l'entrée du virion dans la cellule, pp65 est délivrée au noyau où elle exerce une activité d'échappement à la réponse immunitaire de l'hôte. Elle prévient notamment la reconnaissance des produits des gènes très précoces du CMV par le système immunitaire et inhibe la synthèse de certains composants de la réponse immunitaire de la cellule hôte (Odeberg *et al.*, 2003). La seconde protéine majoritaire du tégument, pp150, codée par le gène UL32, est indispensable à la réplication virale *in vitro*, contrairement à pp65 (Dunn *et al.*, 2003; Schmolke *et al.*, 1995). La

protéine pp150 est nécessaire à l'intégration de la nucléocapside dans les particules virales en formation et maintient l'organisation de la capsid lors de la maturation des néo-virions (Baxter and Gibson, 2001; Tandon and Mocarski, 2008). Les protéines pUL47 et pUL48 s'assemblent avec la protéine majeure de la capsid pUL86, formant un complexe qui joue un rôle prédominant dans l'entrée, la maturation et la sortie du virus (Gibson, 2008). Le gène UL82 code pour la protéine pp71 qui facilite l'expression des gènes très précoces du CMV lors de l'initiation du cycle viral, notamment par l'inhibition de la protéine cellulaire Daxx, régulatrice de la transcription (Tomtishen, 2012). La protéine pp71 est également impliquée dans l'évasion virale à la surveillance du système immunitaire. Enfin, la protéine pp28 (UL99), hautement immunogène, participe à l'assemblage des néo-virions (Kalejta, 2008). Parmi les éléments du tégument se trouvent des protéines cellulaires dont certaines font partie du cytosquelette ou sont impliquées dans le trafic vésiculaire au sein du réticulum endoplasmique ou de l'appareil de Golgi (Varnum *et al.*, 2004). Des ARN cellulaires et viraux font également partie du tégument (Terhune *et al.*, 2004).

- L'enveloppe

L'enveloppe du CMV est une bicouche lipidique dérivée des membranes de la cellule hôte. Il s'agit d'une structure complexe dont la structure n'est pas tout à fait définie. Cinq glycoprotéines que l'on retrouve en abondance au sein de l'enveloppe ont des homologues fonctionnels chez les autres herpesvirus: gB, gH, gM, gL et gN (Britt, 2007). Elles sont codées par les gènes suivants : UL55, UL75, UL100, UL115 et UL73, respectivement. Ces glycoprotéines sont essentielles à la synthèse de particules virales infectieuses. La glycoprotéine gB forme un homodimère, les protéines gH, gL et gO (UL74) un complexe trimérique tandis que gM et gN sont associées entre elles. Ces oligomères sont liés par des ponts disulfures dont la formation a lieu dans le réticulum endoplasmique. Ces glycoprotéines possèdent une séquence signal qui leur permet d'emprunter les voies de sécrétion au cours de

leur trafic intracellulaire. De par leur localisation à la surface du virion, elles sont la cible de nombreux anticorps neutralisants, gB et gH étant particulièrement immunogènes. D'autres protéines spécifiques du CMV sont contenues dans l'enveloppe, telles que gTRL10, gUL132 et gTRL11 (Britt and Boppana, 2004).

II.2. c. Cycle réplcatif du CMV

Le cycle naturel du CMV débute par une phase de réplication lytique lors de la primo-infection. S'ensuit une phase de latence où la réplication de l'ADN et l'expression des gènes viraux sont réprimées. Les cycles de réplication lytique et les cycles de latence alternent au cours de la vie de l'hôte, entrecoupés d'épisodes de réactivation virale. Le cycle de réplication lytique est un processus organisé dont les événements surviennent en cascade et qui compte des stades cytoplasmiques et nucléaires. Trois phases d'expression génique sont observées à l'issue de l'entrée du virus dans la cellule hôte : les phases très précoce, précoce et tardive.

• Attachement et entrée du CMV

De nombreux types cellulaires sont la cible du CMV du fait de son très large tropisme *in vivo*, ils seront notamment abordés au cours du chapitre traitant du tropisme cellulaire du CMV. L'attachement initial du CMV à la cellule cible se fait par l'adsorption des protéines gB et gM aux protéoglycanes héparanes sulfate de la membrane plasmique (Compton *et al.*, 2003). Le CMV pénètre ensuite dans la cellule par la fusion des membranes virales et cellulaires. L'entrée peut aussi être médiée par endocytose induite par l'engagement d'un récepteur (Isaacson *et al.*, 2008). Plusieurs molécules ont été identifiées en tant que récepteurs médiateurs de l'entrée du CMV dans la cellule bien que les mécanismes impliqués ne soient pas bien établis. Ainsi, la contribution de l'EGFR (*Epidermal Growth Factor*) à l'entrée du virus initialement décrit comme indispensable, notamment par son interaction avec gB, s'avère contradictoire (Isaacson *et al.*, 2007; Wang *et al.*, 2003). De plus, bien que largement

représenté, l'EGFR n'est pas exprimé par tous les types cellulaires qu'infecte le CMV. Le récepteur PDGFR α (*Platelet-Derived Growth Factor Receptor alpha*) serait nécessaire à l'entrée et au cycle de réplication du virus (Soroceanu *et al.*, 2008). Le CMV s'associerait avec DC-SIGN (*Dendritic Cell-Specific Intercellular adhesion molecule-3-Grabbing Non-integrin*) par l'intermédiaire de gB pour infecter les cellules dendritiques et participer à la dissémination du virus dans l'organisme par trans-infection (Halary *et al.*, 2002). Les intégrines membranaires $\alpha 2\beta 1$, $\alpha 6\beta 1$ et $\alpha V\beta 3$ sont aussi proposées comme récepteurs à l'entrée du virus (Feire *et al.*, 2004). La protéine gB possède un domaine de liaison pour $\beta 1$, dont l'absence induite lors d'expériences de neutralisation entraîne une diminution de la pénétration du virus (Isaacson *et al.*, 2008). $\alpha V\beta 3$ interagirait quant à elle avec gH. L'attachement du virus à la membrane perturbe le métabolisme cellulaire comme l'illustre l'afflux transitoire de calcium intracellulaire (une des conséquences de l'engagement de l'EGFR) et l'activation de voies de signalisation telles que celle de NF- κ B (*Nuclear Factor-kappa B*), de l'acide arachidonique ou de la PI3 kinase. Ces voies sont notamment impliquées dans l'expression génique et la prolifération cellulaire.

- Translocation du génome viral vers le noyau

La fusion des membranes virales et cellulaires conduit à la translocation de la nucléocapside et quelques protéines du tégument dans le cytoplasme où elle est rapidement acheminée vers le noyau. Le CMV détourne ainsi la machinerie de transport intracellulaire en empruntant les microtubules et filaments d'actine du cytosquelette jusqu'aux pores nucléaires par lesquels le génome viral est délivré dans le noyau. La protéine pp65 peut y être détectée moins d'une heure après l'infection. L'ADN viral est circularisé, ce qui est facilité par la présence d'une base non appariée à chaque extrémité du génome. Cette forme sert de modèle à la réplication et à l'expression des gènes viraux (Kalejta, 2008).

- Phase très précoce du cycle lytique

Les gènes très précoces (*Immediate Early*, IE) sont les premiers à être transcrits dès la pénétration de l'ADN viral dans le noyau, sans qu'il y ait de synthèse *de novo* des protéines virales. Certaines sont détectées dès 2h post-infection (Ahn and Hayward, 1997). Cinq loci sont transcrits très rapidement: UL36-38, UL115-119, UL122-123, US3 et IRS1/TRS1, dont les mécanismes de régulation transcriptionnels et post-transcriptionnels multiplient les produits (épissage alternatif, initiation de la traduction). Ces gènes ont pour rôle d'induire et d'optimiser l'expression des gènes viraux précoces et tardifs et la réplication de l'ADN. Ils ont aussi pour rôle d'inhiber les réponses cellulaires intrinsèques induites par l'infection, comme l'apoptose (US36-US38), la voie de signalisation STAT induite par les IFN de type I (IE1) ou la synthèse des molécules HLA de classe I (US3) (Jones *et al.*, 1996 ; Paulus *et al.*, 2006). Les gènes IE majeurs sont UL123 (IE1) et UL122 (IE2) qui codent respectivement pour IE72 et IE86, sous contrôle de la puissante région promotrice MIE (*Major Immediate Early*) qui contient des éléments enhancers arborant de nombreux sites reconnus par des facteurs de transcription (NK- κ B, CREB/ATF...) (Stinski and Meier, 2007). Les protéines IE72 et IE86 sont entièrement dédiées au bon déroulement du cycle réplcatif par l'activation de la transcription des gènes viraux, de la synthèse de l'ADN viral et la neutralisation des mécanismes de défense mis en place par la cellule.

- Phase précoce du cycle lytique

Les gènes précoces (*Early*, E), dont les premiers produits peuvent être détectés 8h post-infection, requièrent la synthèse des protéines IE et de protéines cellulaires pour leur transcription (White and Spector, 2007). Certaines protéines précoces sont impliquées dans la synthèse de l'ADN viral, dépendante de l'origine lytique de réplication *oriLyt*. IE86 intervient avec la protéine précoce pUL84 dans l'activation du promoteur d'*oriLyt*. L'ADN polymérase

virale, pUL54, est stabilisée par la protéine accessoire ppUL44 (Gibson, 2008). L'ADN viral est répliqué selon le modèle du cercle roulant de façon à générer de multiples copies assemblées du génome formant ainsi un concatémère d'ADN. Celui-ci est ensuite clivé par unité de génome délimitée par les séquences *pac1* et *pac2* (Gibson, 2008). D'autres protéines de la phase précoce sont nécessaires à l'encapsidation du génome ainsi qu'à l'assemblage des nouvelles particules virales. D'autres encore assurent le maintien des conditions optimales de réplication et d'expression génique virales par la modulation des facteurs de contrôle de la synthèse d'ADN et l'altération des défenses cellulaires (Anders *et al.*, 2007).

- Phase tardive du cycle lytique

Les gènes de la phase tardive (*Late*, L) sont les derniers à être exprimés, entre 24 et 48h post-infection, et codent principalement pour des protéines de structure du virion. Les gènes tardifs sont exprimés après la réplication de l'ADN. L'assemblage des protéines de la capsid débute dans le cytoplasme et se poursuit à l'intérieur du noyau où l'ADN est empaqueté (Gibson, 2008). L'encapsidation de l'ADN est médiée par les terminases pUL56, qui possède un domaine de liaison aux séquences *pac1* et *pac2*, et pUL89 qui interagissent avec la protéine de portail pUL104. Les protéines du tégument s'associent ensuite à la nucléocapside mature sans que les mécanismes d'assemblage soient encore bien connus. Puis, les néo-virions en formation migrent vers le cytoplasme par bourgeonnement à travers la membrane nucléaire grâce au complexe d'export nucléaire, le *nuclear egress complex*, formé par les protéines virales p97, p50 et p53 (Tandon and Mocarski, 2012). Il est probable que de nouvelles protéines du tégument s'ajoutent aux particules virales à ce moment (Britt, 2007). L'acquisition de l'enveloppe finale demeure mal définie mais elle serait issue de composants du système endosomal. Enfin, les particules virales matures sont libérées dans le milieu extracellulaire par bourgeonnement à la membrane plasmique. La figure 21 résume les étapes du cycle de réplication du CMV.

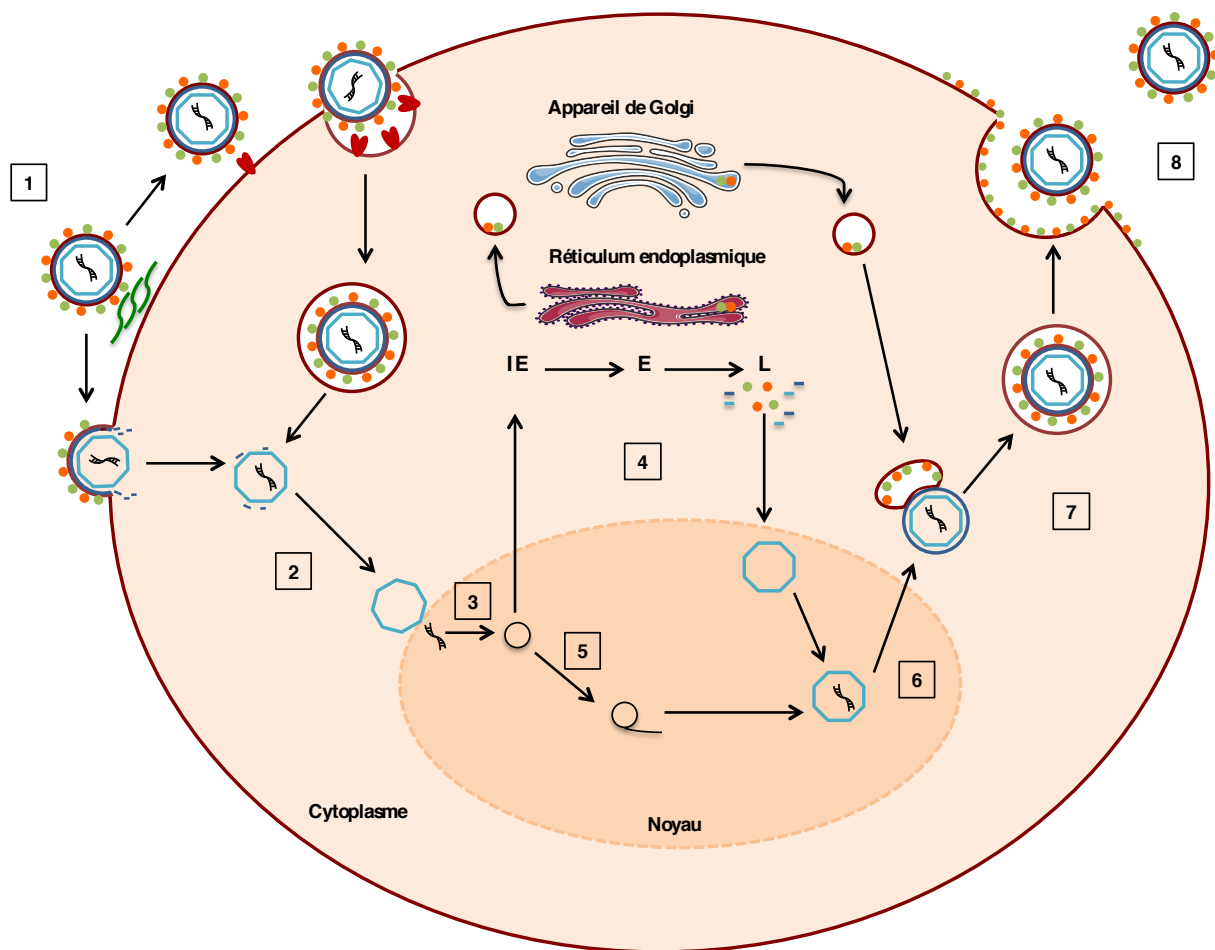


Figure 21 : Représentation schématique du cycle réplcatif du CMV. 1. Attachement et pénétration du virion. 2. Translocation du génome viral vers le noyau. 3. Circularisation de l'ADN viral. 4. Expression des gènes viraux très précoces (IE), précoces (E) et tardifs (L). 5. Réplication de l'ADN viral par le mécanisme du cercle roulant. 6. Assemblage de la capsid et encapsidation de l'ADN viral clivé par unité de génome. 7. Translocation de la nucléocapside mature vers le cytoplasme, tégumentation et acquisition de l'enveloppe virale. 8. Libération des néo-virions par exocytose.

II.3. L'infection à CMV

II.3.a. Épidémiologie de l'infection à CMV

Le CMV est un virus ubiquitaire qui évolue de façon endémique dans de nombreuses régions à l'échelle mondiale, sans influence saisonnière. La prévalence de l'infection à CMV est très élevée puisque l'on estime qu'entre 30 à 100% de la population est porteuse du virus, dès le plus jeune âge. Les conditions socio-économiques, les zones géographiques et l'âge constituent des facteurs qui influencent la dissémination du virus (Cannon *et al.*, 2010). Aux Etats-Unis, près de 50% de la population globale est infectée par le virus dès l'âge de 6 ans. La prévalence des anticorps augmente progressivement avec l'âge et est corrélée aux origines ethniques, au sexe et au statut socio-économique des individus (Bate *et al.*, 2010; Staras *et al.*, 2006). En France, une enquête séro-épidémiologique publiée en 2013 a ainsi montré que 45,6% des femmes contre 39,3% des hommes de 15 à 49 ans sont séropositifs pour le CMV et que la séroprévalence augmente avec l'âge et des conditions sociales défavorisées (Lepoutre *et al.*, 2013). Dans certains pays en voie de développement, la présence d'anticorps spécifiques du CMV peut être détectée chez 90 à 100% de la population dès l'âge de 6 ans (Chen *et al.*, 2012). La promiscuité, les conditions sanitaires mais aussi les pratiques culturelles concernant l'allaitement et le soin des enfants sont autant de facteurs pouvant expliquer les variations de séroprévalence entre des populations d'une même zone géographique ou d'un pays plus ou moins favorisé à l'autre.

II.3.b. Transmission de l'infection à CMV

Le CMV se transmet de façon strictement interhumaine par contact direct et étroit avec les sécrétions corporelles où sont excrétés les néo-virions. Le CMV est en effet un virus fragile de par sa structure enveloppée, ce qui limite sa survie en milieu extérieur. La transmission peut ainsi s'effectuer par voie salivaire, via les gouttelettes et sécrétions oropharyngées, par voie sexuelle, par voie sanguine, en cas de transfusion sanguine non déleucocytée, par l'intermédiaire d'une greffe de CSH ou d'organe, ou encore par voie materno-foetale, par transfert placentaire, et néo-natale lors de l'allaitement (Crough and Khanna, 2009). Deux pics de séroconversion sont observés au cours de la vie. Le premier correspond à l'acquisition du virus au cours de la petite enfance, qui peut d'abord s'expliquer par la transmission verticale du virus de la mère vers le nourrisson lors de l'alimentation par le lait maternel. Il s'agit également d'une période pendant laquelle les enfants infectés excrètent de façon prolongée de grandes quantités de virus dans la salive et les urines, dont la propagation est favorisée en collectivité (Söderberg-Nauclér, 2006). Le second pic d'incidence du CMV est observé à l'adolescence et chez le jeune adulte, coïncidant avec le développement d'une vie sexuelle active (Sissons *et al.*, 2002).

II.3.c. Tropisme cellulaire du CMV

Malgré sa stricte spécificité d'espèce, le CMV humain est capable d'infecter une très large variété de types cellulaires dont beaucoup sont ubiquitaires. Le large tropisme du CMV est à l'origine de la diversité des manifestations cliniques parfois graves observées chez les patients infectés. Les cellules épithéliales, cellules dendritiques, fibroblastes, cellules musculaires lisses et les cellules endothéliales sont autant de types cellulaires susceptibles d'être infectés par le CMV (Sinzger *et al.*, 2008) (Tableau 3). L'épithélium muqueux serait la première cible de l'infection virale de par sa proximité et son interaction avec le milieu

extérieur, comme l'illustre le tractus intestinal de l'enfant exposé aux particules virales excrétées par la mère lors de l'allaitement (Landolfo *et al.*, 2003). Les cellules épithéliales des glandes (salivaires, lacrymales) et des muqueuses (oropharyngées, génitales) contribuent fortement à la transmission du virus d'un organisme à l'autre par l'excrétion prolongée du virus dans les fluides corporels (Revello and Gerna, 2010). L'infection des cellules endothéliales tapissant les vaisseaux de la circulation sanguine permettrait la dissémination du virus dans l'organisme et sa propagation vers divers organes (tels que les poumons, foie, reins) mais serait aussi responsable des dommages vasculaires que l'on observe chez certains individus. Certains gènes codés par le CMV sont impliqués dans le tropisme viral comme UL16, UL128, UL130 et UL131, qui semblent impacter le tropisme pour les cellules endothéliales (Bronzini *et al.*, 2012; Hahn *et al.*, 2004; Patrone *et al.*, 2005). L'ADN viral persistant est détecté dans les cellules d'origine myéloïde et les cellules endothéliales (Tableau 3).

Sites de réplication active du CMV	
<i>In vivo</i>	<i>In vitro</i>
- Cellules épithéliales (glandes salivaires, foie, reins, tractus gastro-intestinal, poumons) - Cellules musculaires lisses (tractus gastro-intestinal, endothélium vasculaire) - Rétinocytes - Fibroblastes - Cellules endothéliales - Monocytes/Macrophages/Neutrophiles - Cellules du trophoblaste - Cardiomyocytes	- Fibroblastes (peau, poumons, tractus gastro-intestinal) - Cellules endothéliales vasculaires - Cellules musculaires lisses vasculaires - Cellules épithéliales (rétine, reins, poumons, tractus gastro-intestinal) - Cellules du trophoblaste - Hépatocytes - Cellules neuronales et gliales - Monocytes/Macrophages - Cellules dendritiques dérivées des monocytes
Sites de latence du CMV	
- Cellules CD34⁺ de la moelle - Monocytes - DC immatures - Cellules endothéliales	

Tableau 3 : Tropisme cellulaire *in vivo* et *in vitro* du CMV. Ce tableau représente de façon non exhaustive les cellules cibles du CMV au cours des phases lytique et latente de l'infection. NB : le CMV est capable d'entrer dans les lymphocytes et granulocytes mais pas de s'y répliquer. Ces cellules, notamment les polynucléaires neutrophiles, peuvent transmettre le virus à d'autres cellules cibles, par l'intermédiaire de leurs déplacements dans l'organisme. D'après Sinzger *et al.*, 2008.

II.3.d. Latence et réactivation du CMV

L'infection primaire mobilise fortement le système immunitaire qui parvient à contrôler la réplication virale sans toutefois réussir à éradiquer le virus de l'organisme. A l'issue du cycle de réplication lytique, le CMV entre dans une phase de latence, dont beaucoup de mécanismes restent à élucider, sous laquelle il persiste à vie. On retrouve deux à

dix copies du génome viral sous forme épisomale dans les sites de persistance (Slobedman and Mocarski, 1999). La région promotrice MIE est réprimée, tout comme la transcription des gènes IE, et la réplication de l'ADN est très faible (Reeves and Sinclair, 2008). L'expression de certains gènes du CMV est maintenue afin de détourner à son avantage le métabolisme et le cycle cellulaire ainsi que les mécanismes d'apoptose et de surveillance immunitaire (Gibson, 2008).

La différenciation des cellules CD34⁺ en cellules dendritiques (Murphy *et al.*, 2002; Reeves *et al.*, 2005) ou celle des monocytes en macrophages serait l'un des mécanismes de réactivation du CMV (Chan *et al.*, 2008). *In vitro*, la réactivation virale peut être induite au sein des cellules myéloïdes par des facteurs pro-inflammatoires tels que le TFN- α (*Tumor necrosis Factor alpha*) (Cook *et al.*, 2006; Söderberg-Nauclér *et al.*, 2001). Il semble également que malgré les divers mécanismes d'échappement mis en place par le virus, le système immunitaire exerce une pression sur le virus latent comme l'illustrent les réactivations dans un contexte d'immunosuppression.

II.3.e. Pathogenèse de l'infection à CMV

- L'infection à CMV chez l'individu immunocompétent

L'infection primaire à CMV n'occasionne que peu ou pas de symptômes chez le sujet immunocompétent et passe le plus souvent inaperçue. Dans environ 10% des cas de primo-infection, une fièvre prolongée et un syndrome mononucléosique parfois associés à des myalgies, une lymphoadénopathie ou une hépatomégalie peuvent être observés. Plus rarement, des symptômes sont plus sévères peuvent se manifester, témoins d'une atteinte tissulaire: colite ulcéraire, pneumonie, hépatite, myocardite, rétinite, thrombose vasculaire, encéphalite. La faible incidence d'une maladie invasive à CMV ainsi que la diversité des manifestations cliniques, non spécifiques de l'infection à CMV, rendent parfois le diagnostic

de la primo-infection difficile. Bien que de nombreux cas cliniques soient décrits, il n'existe quasiment aucune littérature quant aux mécanismes biologiques favorisant le développement de tels symptômes (Lancini *et al.*, 2014; Rafailidis *et al.*, 2008).

- L'infection congénitale à CMV

Le CMV est l'infection virale congénitale la plus fréquente et la première cause non-génétique de surdité chez l'enfant. Le CMV est également responsable d'une mortalité fœtale non négligeable (Iwasenko *et al.*, 2011). L'infection congénitale résulte en grande majorité de la contraction d'une primo-infection maternelle. Elle est plus rarement observée en cas de réactivation ou d'une infection par une nouvelle souche virale au cours de la grossesse. Le risque est également moins élevé pour le fœtus dans le cas d'une réactivation virale en raison de l'immunité humorale maternelle préexistante (Kenneson and Cannon, 2007). Cela concerne 0,2 à 2,2% des naissances. L'incidence de la primo-infection chez la femme enceinte séronégative varie de 0,64 à 4% selon les populations et le risque de transmission au fœtus par voie placentaire est de 30 à 40%. L'infection maternelle passe le plus souvent inaperçue et l'infection congénitale est découverte à la naissance. Parmi les nouveaux nés qui ont contracté le CMV *in utero*, 10 à 15% sont symptomatiques. Les manifestations cliniques sont sévères et variables: retard de croissance, ictère, hépatosplénomégalie, pneumonie, atteinte du système nerveux central (microcéphalie, calcifications intracérébrales, perte d'audition neurosensorielle). Le taux de mortalité est d'environ 10 à 30% dans ce cas et pour les autres enfants les séquelles neurologiques sont importantes: déficit auditif, troubles visuels, infirmité motrice cérébrale. Parmi les nouveau-nés asymptomatiques, 10 à 17% développent un défaut d'audition ou portent des anomalies neurologiques. L'infection des progéniteurs neuronaux par le CMV serait à l'origine de ces séquelles neuronales. Il a été récemment suggéré *in vitro* que le CMV induirait l'expression et l'activité de la protéine PPAR γ (*Peroxisome Proliferator-Activated gamma*), un facteur de transcription déterminant

pour la neurogenèse, qui serait associée à un défaut de différenciation neuronale. *In vivo*, l'abondance de cette protéine était fortement augmentée dans les tissus cérébraux fœtaux dans un contexte d'infection congénitale par comparaison aux fœtus séronégatifs pour le CMV (Rolland *et al.*, 2016). Enfin, l'acquisition du CMV au cours de la vie fœtale entraîne une excrétion virale dans les urines jusqu'à cinq ans après la naissance, ce qui pourrait suggérer un contrôle limité de la réplication virale en bas âge (Huygens *et al.*, 2014).

- L'infection à CMV en transplantation

L'administration d'un traitement immunosuppresseur ainsi que la tempête cytokinique qui s'abat sur le patient transplanté favorisent la réplication du CMV à partir d'une infection exogène, d'une contamination par le greffon ou par réactivation d'une souche endogène (Reeves and Sinclair, 2008). Il s'agit d'une infection virale opportuniste majeure, associée à une forte morbidité et mortalité chez les patients receveurs d'organe solide ou de cellules souches hématopoïétiques. L'incidence de l'infection est d'environ 30% et dépend du type d'organe greffé, du conditionnement immunosuppresseur et de sa durée. Le statut sérologique du donneur influence également l'incidence (Razonable, 2010b). Ainsi, une greffe d'un donneur séropositif (D^+) vers un receveur séronégatif (R^-) peut donner lieu à une primo-infection chez le receveur *via* le greffon (D^+/R^-). Il s'agit de la population la plus vulnérable au développement d'une infection symptomatique à CMV. Un receveur séropositif (R^+) bénéficiant d'une greffe issue d'un donneur séropositif (D^+) ou séronégatif (D^-) peut être sujet à une réactivation virale ou à une réinfection par une souche exogène. L'incidence de l'infection symptomatique à CMV varie de 8% en transplantation rénale, 29% en transplantation cardiaque et hépatique, à 40% en transplantation pulmonaire (Roman *et al.*, 2014). La réplication lytique du CMV lors de l'infection aigüe occasionne des symptômes variés comme de la fièvre, une leucopénie, une arthralgie parfois accompagnée d'une invasion tissulaire (hépatite, pneumonie, colite, encéphalite, rétinite, néphrite, myocardite, etc.). Les

formes les plus sévères sont observées au cours de la greffe allogénique de moelle où une pneumonie interstitielle se développe jusque dans 20% des cas avec un taux de mortalité de 90% en l'absence de traitement. L'administration d'antiviraux permet de diminuer les symptômes d'une maladie à CMV, notamment par l'inhibition de l'ADN polymérase virale, et est largement prescrite en prophylaxie. L'infection à CMV est associée au rejet de greffe et occasionne également des effets indirects délétères comme la production de cytokines et chimiokines par le système immunitaire qui entretiennent l'inflammation, l'augmentation de la susceptibilité du receveur aux agents infectieux opportunistes ou du développement de désordres lymphoprolifératifs liés à l'EBV (Razonable *et al.*, 2001; Razonable *et al.*, 2010; Sagedal *et al.*, 2002).

- L'infection à CMV chez le patient VIH

Le CMV est une complication opportuniste majeure chez les patients infectés par le VIH chez qui le Syndrome d'Immunodéficience humain Acquis (SIDA) est déclaré (Britt, 2008). Il s'agit principalement de réactivations virales lorsque le taux de lymphocytes T CD4⁺ circulants est inférieur à 100/mm³. La rétinite est la principale manifestation clinique (environ 70% des cas), suivie d'atteintes du tractus gastro-intestinal (15 à 30%) et neurologiques (5 à 10%). L'administration des traitements antirétroviraux a fortement diminué l'incidence de l'infection à CMV chez ces patients. Elle demeure cependant un facteur associé à la progression de la phase SIDA (Griffiths *et al.*, 2006).

- L'infection à CMV chez le patient en soins intensifs

De nombreuses études font état de la réactivation virale chez des patients admis en soins intensifs, tels que les grands brûlés ou les patients en état de choc septique (Navarro, 2016). Un syndrome fébrile parfois associé à des atteintes tissulaires (pneumonie) sont observés. On estime qu'un tiers des patients déclarent une infection à CMV, ce qui est associé

à une durée prolongée de l'hospitalisation et de la ventilation mécanique assistées ainsi qu'un accroissement du risque de contraction d'infections nosocomiales et de la mortalité (Osawa and Singh, 2010). La réactivation virale pourrait être occasionnée par un déficit transitoire de la réponse immunitaire, de la présence de facteurs pro-inflammatoires ou par une altération de la réponse NK notamment par un défaut de production d'IFN- γ (Chiche *et al.*, 2012).

II.4. Le CMV et la réponse immunitaire

Dès les premiers instants, la pénétration du virus dans l'organisme hôte déclenche l'activation du système immunitaire inné puis du système adaptatif. L'infection à CMV génère une forte mobilisation de l'ensemble des acteurs immuns, dont les principaux sont décrits dans ce chapitre, au cours de la phase aigüe qui permet le plus souvent un contrôle efficace de la propagation virale (Figure 22). Le CMV est aussi à l'origine d'une profonde empreinte sur le système immunitaire, occasionnant une large réorganisation cellulaire au sein de différents compartiments lymphocytaires. De plus, le CMV est doté d'innombrables mécanismes lui permettant d'échapper à la réponse immunitaire.

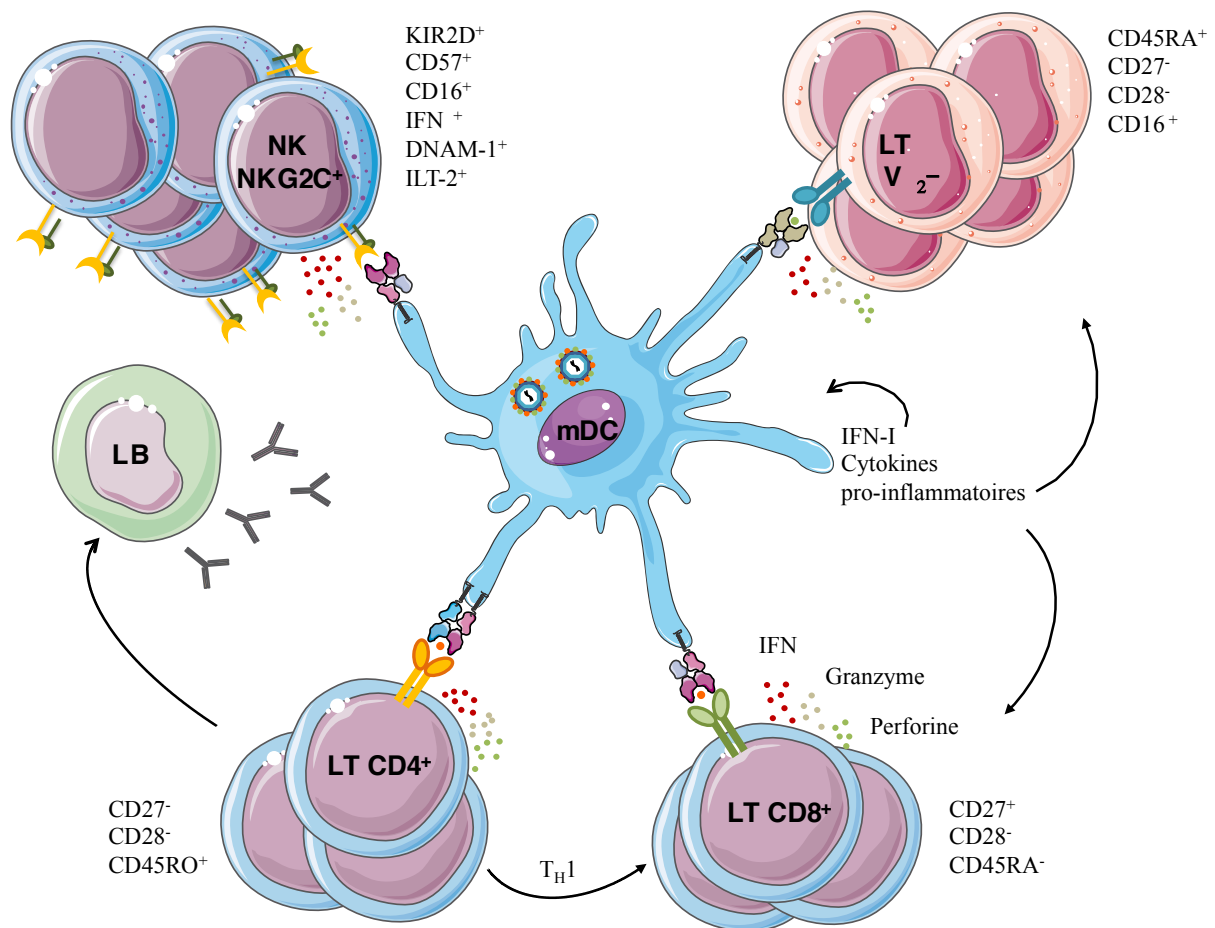


Figure 22 : Les principaux effecteurs immuns mobilisés lors de l'infection à CMV. Les cellules dendritiques myéloïdes (mDC) sont sensibles à l'infection par le CMV. Ce sont aussi des CPA qui permettent l'activation des lymphocytes T CD4⁺ et T CD8⁺ dans les organes lymphoïdes secondaires. L'infection à CMV déclenche d'abord un état antiviral au sein des cellules infectées, matérialisé par la sécrétion d'IFN de type I et de cytokines pro-inflammatoires qui permettent le recrutement et l'activation des acteurs immuns. L'une des signatures de l'infection à CMV est l'expansion de la sous-population NK NKG2C⁺ qui co-exprime les récepteurs KIR2D, CD57, CD16, DNAM-1 et ILT-2 et qui sécrète de fortes quantités d'IFN γ . L'infection à CMV est aussi caractérisée par l'amplification des sous-populations de lymphocytes T $\gamma\delta$ V δ_2 . Elles présentent un phénotype de différenciation tardive. L'infection à CMV engendre une réponse humorale, bien qu'encore mal comprise, principalement dirigée contre les glycoprotéines d'enveloppe du CMV. Les lymphocytes T CD4⁺ et CD8⁺ contribuent également fortement au contrôle de l'infection. Les lymphocytes T CD4⁺ orientent la réponse immunitaire de type T_H1 et contribuent à l'activation de la réponse humorale. La cytotoxicité des effecteurs cellulaires immuns est notamment médiée par la sécrétion d'IFN γ , de granzymes et de perforine.

II.4.a. La réponse immunitaire innée

- Déclenchement d'un état antiviral

L'attachement et l'entrée du virus activent des voies intracellulaires de transduction du signal qui aboutissent à la sécrétion de molécules pro-inflammatoires, à l'augmentation de l'expression des molécules de co-stimulation (CD80, CD86) par les CPA et à l'élaboration d'une réponse IFN de type I (IFN α/β) (Crough and Khanna, 2009). Le déclenchement des mécanismes de défense innés se fait de façon immédiate, avant toute réplication virale et synthèse protéique. L'activation de voies de signalisation intracellulaires par la fixation et l'entrée du virus dans la cellule comme celle du métabolisme de l'acide arachidonique sont à l'origine de la sécrétion de médiateurs de l'inflammation tels que les leucotriènes ou les prostaglandines. Les TLR, de surface et intracellulaires, semblent jouer un rôle important dans la réponse immunitaire innée au CMV. L'attachement des glycoprotéines d'enveloppe virales aux récepteurs cellulaires, comme gB et gH au TLR-2, déclenche l'activation du facteur de transcription NF- κ B (Boehme *et al.*, 2006; Compton *et al.*, 2003; Juckem *et al.*, 2008). Celui-ci induit la sécrétion de cytokines (IL-1, -6, -8, -12, -18, TNF- α , etc.) et chimiokines pro-inflammatoires (CXCL1-3, -8, -10, CCL2, CCL5 etc.) dont les effets biologiques sont très variés. Elles favorisent notamment l'infiltration des effecteurs immuns au site infectieux. La voie NF- κ B pourrait aussi être induite directement par la kinase caséine 2, protéine cellulaire intégrée au virion lors de son assemblage (Nogalski *et al.*, 2007). La reconnaissance de motifs viraux par les TLR conduit également à l'activation de la réponse IFN, qui débute par l'induction des facteurs de transcription IRF (*Interferon Regulatory Factor*). Ceux-ci régulent l'expression des gènes codant pour l'IFN- α (IRF7) et l'IFN- β (IRF3) et d'un ensemble de gènes portant des fonctions antivirales (ISG, *Interferon-Stimulated Genes*) (Figure 23). Les IFN- α/β nouvellement synthétisés agissent de façon autocrine et paracrine par l'activation de

la voie JAK/STAT qui aboutit à son tour à la transcription des ISG (*Janus Kinase/Signal Transducers and Activators of Transcription*) (DeFilippis *et al.*, 2010). Le rôle des TLR en tant que senseurs du CMV a été renforcé par l'observation de l'association de polymorphismes nucléotidiques au niveau de la séquence des TLR-2, TLR-4 et TLR-9 avec le développement d'une infection à CMV chez l'enfant et le patient transplanté (Brown *et al.*, 2009; Kang *et al.*, 2012; Kijpittayarit *et al.*, 2007; Wujcicka *et al.*, 2015).

L'ensemble de ces mécanismes permet l'établissement d'un état antiviral cellulaire dont le but est d'empêcher la propagation du virus aux cellules voisines. Ils permettent de limiter la réplication virale à un stade très précoce, de recruter les phagocytes et autres acteurs de l'immunité innée (macrophages, neutrophiles, cellules dendritiques, cellules NK) au site de l'infection et de promouvoir et contrôler la réponse immunitaire adaptative.

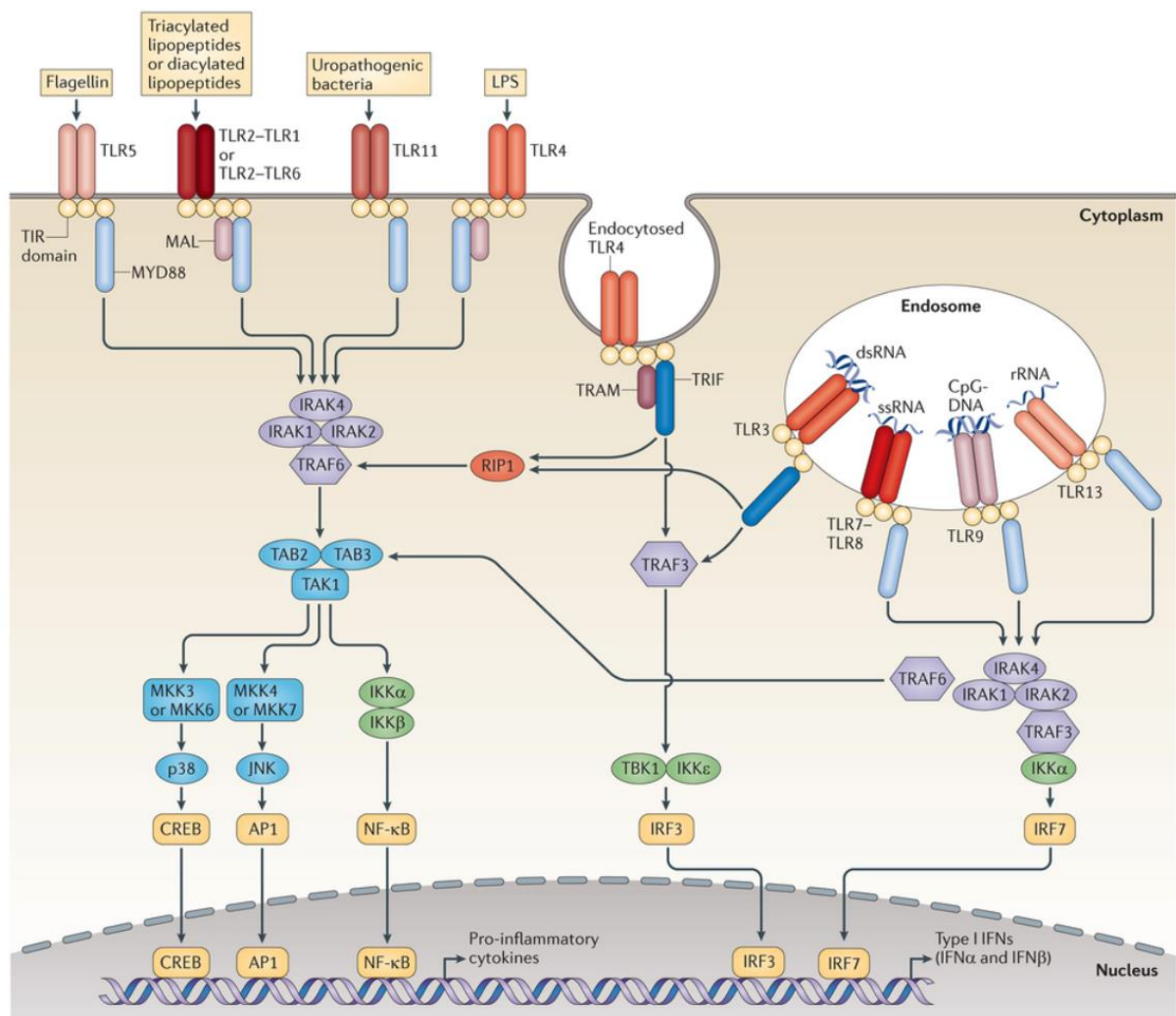


Figure 23 : Les voies de signalisations intracellulaires activées par les TLR des Mammifères. La première voie induit l'activation du facteur de transcription NF- κ B qui permet l'expression des gènes codant pour des cytokines et chimiokines pro-inflammatoires. La seconde voie implique les facteurs de transcription IRF3 et IRF7 qui activent l'expression des gènes codant pour les IFN de types I (α et β). D'après O'Neill *et al.*, 2013.

• Les cellules dendritiques

Les cellules dendritiques constituent un réseau de cellules sentinelles dans l'organisme, capables d'être recrutées rapidement au niveau d'un site inflammatoire. Elles sont responsables de la capture et de la présentation d'antigènes et assurent un pont entre l'immunité innée et adaptative. L'infection à CMV déclenche l'activation des lymphocytes T $CD4^+$ et T $CD8^+$ au niveau des organes lymphoïdes secondaires par la présentation de

peptides viraux par les molécules HLA respectivement de classe II et I des cellules dendritiques. Les cellules dendritiques sécrètent également des cytokines pro-inflammatoires de type IFN- γ ou TNF- α . Plusieurs sous-populations de cellules dendritiques se distinguent, dont les cellules dendritiques plasmacytoïdes (pDC) et les cellules dendritiques myéloïdes (mDC). Les pDC, classiquement considérées comme spécialisées dans la réponse antivirale, sécrètent de fortes quantités d'IFN de type I. Elles ne sont pas sensibles à l'infection par le CMV. Les mDC, plutôt considérées comme des CPA professionnelles, sont sensibles à l'infection par le CMV. Contrairement aux cellules dendritiques dérivées de monocytes *in vitro*, l'infection à CMV induit la maturation des pDC et des mDC (Farkas *et al.*, 2006).

Les cellules dendritiques jouent un rôle important dans le *cross-talk* avec les cellules NK (Walzer *et al.*, 2005). La sécrétion par les cellules dendritiques de cytokines pro-inflammatoires (IFN de type I, IFN- γ , etc.) et de certaines cytokines essentielles à la biologie des cellules NK (IL-12, IL-18, IL-15, etc.), mais aussi les contacts cellulaires entre cellules dendritiques et cellules NK, contribuent à la prolifération, aux capacités cytotoxiques, à la survie et à la sécrétion de cytokines par les cellules NK (Figure 24). Les cellules NK sont également impliquées dans la modulation des cellules dendritiques. En particulier, selon le ratio cellules NK : cellules dendritiques immatures, les cellules NK sont capables de lyser ou de promouvoir la maturation et les fonctions effectrices des cellules dendritiques immatures (Carbone *et al.*, 1999; Piccioli *et al.*, 2002; Wilson *et al.*, 1999). Ces interactions dépendent notamment des récepteurs NKp30, NKG2A et des récepteurs KIR (Ferlazzo *et al.*, 2002; Vitale *et al.*, 2005).

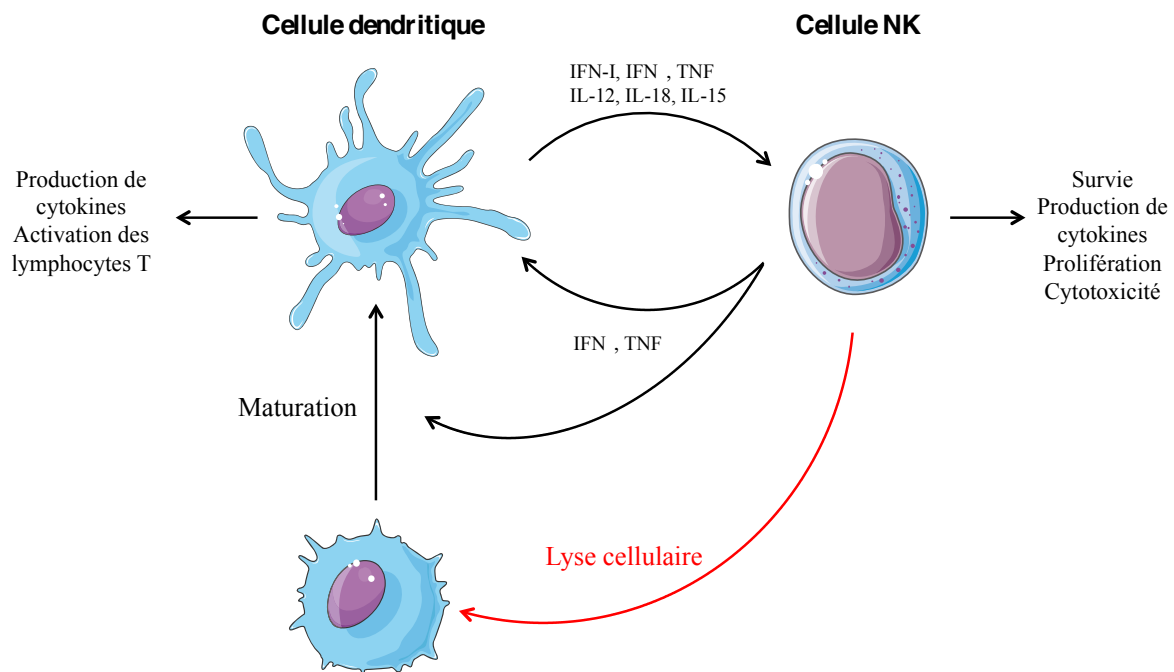


Figure 24 : Les interactions entre cellules dendritiques et cellules NK. Les cytokines et chimiokines sécrétées par les cellules dendritiques, ainsi que les contacts cellulaires, favorisent l'activation des cellules NK. Les cellules NK activées participent également à la maturation des cellules dendritiques. *In vitro*, il a été montré qu'en cas de fort ratio cellules NK : cellules dendritiques, les cellules NK étaient capables de lyser les cellules dendritiques.

• La réponse NK

La contribution des cellules NK au contrôle de l'infection à CMV a initialement été démontrée dans des modèles expérimentaux murins. Ainsi, de forts titres viraux tissulaires, une incapacité à limiter la réplication virale associée à une mortalité accrue ont été observés chez des souris dépourvues en cellules NK (Bukowski *et al.*, 1983; Shellam *et al.*, 1981). Le transfert adoptif de cellules NK à des souris SCID a permis le rétablissement du contrôle de l'infection (Welsh *et al.*, 1991). Des souris C57BL/6, résistantes au CMV murin (MCMV, *Murine Cytomegalovirus*), sont devenues sensibles à l'infection après déplétion sélective des cellules NK (Scalzo *et al.*, 1990, 1992). La résistance des souris C57BL/6 au MCMV est prodiguée par le récepteur Ly49H exprimé par les cellules NK, qui a la capacité d'interagir avec la protéine virale m157. L'expression de Ly49H par les NK murines suffit non

seulement à contrôler l'infection mais confère des propriétés « mémoires » aux cellules NK : l'interaction avec m157 induit la prolifération de la population NK Ly49H⁺ qui persiste après une phase de contraction, capable d'une nouvelle expansion accompagnée d'un potentiel effecteur accru lors d'une seconde expansion au virus (Sun *et al.*, 2009).

Chez l'Homme, l'importance des cellules NK a été mise en évidence chez des patients qui présentent une déficience sélective en cellules NK et chez qui des infections sévères récurrentes à herpesvirus, dont le CMV, sont observées (Biron *et al.*, 1989; Orange, 2002). L'association entre le développement des fonctions cytotoxiques NK et la capacité à guérir de l'infection à CMV a également été observée chez des patients receveurs de moelle osseuse (Quinnan *et al.*, 1982). *In vitro*, les cellules NK activées par l'IL-2 sont capables d'inhiber la réplication virale dans des fibroblastes infectés par le CMV (Iversen *et al.*, 2005). Les cellules NK ont également un rôle dans la prévention de la transmission materno-fœtale du CMV. Au cours du premier trimestre de grossesse, la majorité des lymphocytes présents dans l'utérus sont des cellules NK, nommées NK déciduales. Celles-ci présentent des capacités cytotoxiques réduites, semblables aux cellules NK CD56^{Bright} circulantes. Elles seraient impliquées dans le mécanisme de tolérance immunitaire afin d'éviter le rejet de l'allogreffe fœtale. Il a récemment été mis en évidence que les NK déciduales pouvaient développer un potentiel cytotoxique *ex vivo* après exposition à des fibroblastes autologues infectés par le CMV (Siewiera *et al.*, 2013).

Les cellules NK constituent l'une des premières lignes de défense contre l'infection à CMV, dont l'interaction aboutit à une profonde reconfiguration du répertoire cellulaire NK. Il a ainsi été observé une fréquence accrue de cellules NK circulantes exprimant de façon dense le récepteur activateur NKG2C chez les individus infectés par le CMV et cela de façon stable au cours du temps. Cette observation a initialement été faite *ex vivo* chez l'adulte et l'enfant sains séropositifs pour le CMV (Gumá *et al.*, 2004; Monsiváis-Urendá *et al.*, 2010). Dans un

modèle de co-culture *in vitro*, l'amplification préférentielle des NK NKG2C⁺ a été observée en réponse à des fibroblastes infectés par le CMV (Gumá *et al.*, 2006). Elle a ensuite été confirmée dans des contextes physiopathologiques de primo-infection ou de réactivation chez la femme enceinte, lors de l'infection congénitale, chez des receveurs de greffe d'organe solide ou de CSH (Foley *et al.*, 2012a; Lopez-Vergès *et al.*, 2011). Cette amplification a également été reportée chez des patients infectés par le VIH, le Chikungunya, l'Hantavirus, les virus de l'hépatite B et C ou encore l'EBV. Cependant, ces patients étaient tous séropositifs pour le CMV. Les cellules NK NKG2C⁺ amplifiées présentent un phénotype mature marqué par l'absence de NKG2A, la présence de KIR et du marqueur de différenciation tardive CD57 (Lopez-Vergès *et al.*, 2010; Lopez-Vergès *et al.*, 2011). Les récepteurs KIR préférentiellement exprimés chez les individus CMV⁺ sont les KIR2D dont les ligands HLA sont présents chez l'hôte, ce qui suggère que la population amplifiée est éduquée (Béziat *et al.*, 2013; Djaoud *et al.*, 2013; Foley *et al.*, 2012a). Il a été reporté que la population NK NKG2C⁺ était capable de sécréter de fortes quantités d'IFN- γ par comparaison aux populations NKG2C⁻, bien que cela soit sujet à controverse (Foley *et al.*, 2012b; Zhang *et al.*, 2013), probablement par des modifications épigénétiques du locus *IFNG* (Luetke-Eversloh *et al.*, 2014). L'expansion durable, la forte propension à produire de l'IFN- γ , accentuée après une seconde exposition au CMV, confèrent à la population NK NKG2C des propriétés « mémoire » (Foley *et al.*, 2012 ; Rölle *et al.*, 2013). Les mécanismes d'amplification de ce sous-compartiment NK et son rôle dans le contrôle de l'infection demeurent obscures bien que l'interaction avec les monocytes sécréteurs d'IL-12 et l'engagement de HLA-E, ligand de NKG2C, aient été suggérés dans leur développement (Djaoud *et al.*, 2016; Rölle *et al.*, 2014). L'amplification NK NKG2C n'apparaît cependant pas fondamentale pour le contrôle de l'infection à CMV. En effet, environ 4% de la population japonaise et européenne porte une délétion homozygote du gène *NKG2C*, sans que leur susceptibilité au CMV ne soit augmentée

(Noyola *et al.*, 2012). L'expression du NKG2C permettrait de promouvoir le développement de populations NK « adaptatives », mais son absence n'empêche pas la génération de telles populations. En effet, celles-ci ont été observées après réactivation du CMV chez des receveurs de greffe de CSH porteurs d'une délétion homozygote du gène *NKG2C* (Della Chiesa *et al.*, 2014). Ces populations ont été identifiées chez des individus sains CMV⁺ porteurs du gène *NKG2C* mais aussi ceux chez qui le gène est délété. Qu'elles expriment ou non le NKG2C, les populations NK « mémoire » partagent des propriétés fonctionnelles similaires. Elles possèdent ainsi un phénotype hautement différencié marqué par l'expression préférentielle de certains KIR, du CD57, de DNAM-1 ou de l'ILT-2 et témoignent d'une activation réduite induite par les cytokines ou par la lyse spontanée (Béziat *et al.*, 2013 ; Liu *et al.*, 2016). Ces NK « adaptatives » seraient particulièrement activées par l'engagement du CD16 avec des cellules opsonisées infectées par le CMV, à l'origine d'une forte sécrétion d'IFN- γ et de TNF- α . Cette voie serait notamment favorisée par certaines altérations dans l'expression de protéines adaptatrices de signalisation (Fc ϵ R γ , Syk, EAT-2), au profit de l'expression de la chaîne CD3 ζ associée au CD16 qui possède un fort potentiel activateur. Ces modifications sont induites par de profondes régulations épigénétiques qui surviendraient au sein des NK adaptatrices au cours de leur différenciation (Schlums *et al.*, 2015). Plus récemment, le CD2 a été évoqué comme étant un fort récepteur de co-stimulation pour la réponse fonctionnelle NK dépendante du CD16 (Liu *et al.*, 2016).

- La réponse lymphocytaire T $\gamma\delta$

Par comparaison aux lymphocytes conventionnels $\alpha\beta$, les lymphocytes T $\gamma\delta$ possèdent une forme alternative de TCR composée des produits des réarrangements somatiques des gènes codant pour les chaînes γ et δ . Les lymphocytes T $\gamma\delta$ se trouvent à la frontière entre immunité innée et adaptative. Leur TCR n'est pas restreint à la reconnaissance d'un complexe

spécifique HLA/peptide mais est plutôt engagé par des antigènes phosphorylés non peptidiques dérivés du soi ou portés par les micro-organismes (Constant *et al.*, 1994). Les ligands des TCR $\gamma\delta$ demeurent méconnus mais certains reconnaissent aussi des molécules HLA non classiques (CD1d, CD1c) ou des molécules de stress (MICA, MICB, ULBP) (Vantourout and Hayday, 2013). Les lymphocytes T $\gamma\delta$ sont peu fréquents dans la circulation sanguine, 0,5 à 6% des lymphocytes, mais sont fortement concentrés au niveau des zones exposées au milieu extérieur comme les muqueuses et la peau. Chez l'adulte, la majorité des lymphocytes T $\gamma\delta$ circulants portent les chaînes $V\gamma_9V\delta_2$ (Bonneville and Scotet, 2006).

La mobilisation du compartiment lymphocytaire T $\gamma\delta$ périphérique au cours de l'infection à CMV a d'abord été suggérée par l'observation d'une expansion rapide, forte et de longue durée de la population $\gamma\delta$ chez des receveurs de greffe allogénique de rein souffrant d'une infection primaire ou d'une réactivation à CMV (Déchanet *et al.*, 1999a, 1999b). Le retard à l'expansion des lymphocytes T $\gamma\delta$, notamment au cours de l'infection primaire, est associé à une infection plus sévère et plus longue. Cette expansion intervient en parallèle de la résolution de la virémie, ce qui évoque un rôle de protection contre l'infection (Lafarge *et al.*, 2001). Au cours de l'infection à CMV, seules les populations $\gamma\delta$ dont le TCR portent les chaînes $V\delta_1$, $V\delta_3$ et $V\delta_5$, appelées populations $V\delta_{2-}$, sont amplifiées, par opposition à la population circulante majoritaire $V\delta_{2+}$, qui elle ne l'est pas. L'expansion $V\delta_{2-}$ est associée à un répertoire restreint, oligoclonal, qui suggère une sélection antigénique. Ces populations sont activées, comme en témoigne l'expression des molécules HLA-DR, CD69 et CD38. Elles présentent un phénotype effecteur-mémoire $CD45RA^+CD27^-CD28^-$ (Déchanet *et al.*, 1999b). *In vitro*, les lymphocytes T $\gamma\delta$ $V\delta_{2-}$ sont capables de reconnaître spécifiquement les fibroblastes infectés par le CMV, ce qui active leurs fonctions cytotoxiques médiées par le granzyme B et la perforine ainsi que par l'IFN- γ et qui permet de limiter la propagation de

l'infection (Halary *et al.*, 2005). Les populations V δ_2 sont capables de répondre plus rapidement à une seconde exposition au CMV (Pitard *et al.*, 2008). Il a également été reporté que les populations V δ_2 qui se développent au cours de l'infection à CMV expriment de façon constitutive le CD16 (Couzi *et al.*, 2012). *In vitro*, l'engagement du CD16 induit l'activation des lymphocytes T $\gamma\delta$ V δ_2 ainsi que leur potentiel de dégranulation et de sécrétion d'IFN- γ , sans toutefois conduire à la lyse des fibroblastes infectés et opsonisés, excluant ainsi l'implication de la voie d'ADCC. Le CD16 jouerait plutôt un rôle de stimulation de l'activation, indépendamment du TCR. L'amplification de la population V δ_2 a également été reportée chez les individus sains séropositifs pour le CMV (Pitard *et al.*, 2008) et au cours de la primo-infection chez la femme enceinte (Roux *et al.*, 2013). Au cours de l'infection congénitale, les populations $\gamma\delta$ qui se développent sont celles dépourvues de chaîne V γ_9 , indépendamment de la chaîne δ . Elles sont également activées, différenciées et oligoclonales (Vermijlen *et al.*, 2010).

Bien que le compartiment lymphocytaire $\gamma\delta$ soit fortement mobilisé et impacté par le CMV, les mécanismes de leur contribution au contrôle de l'infection à CMV restent à élucider.

II.4.b. La réponse immunitaire adaptative

- La réponse humorale

L'infection primaire à CMV engendre la synthèse d'anticorps dirigés contre différentes protéines du virus. Ces anticorps sont notamment dirigés contre des protéines du tégument (pp65, pp150), les protéines de l'enveloppe (gB, gH, gM/gN) ou des protéines non structurales comme IE1. La plupart des anticorps observés chez les individus séropositifs pour le CMV sont dirigés contre les glycoprotéines d'enveloppe et plus de 50% d'entre eux sont

des anticorps neutralisants qui reconnaissent un épitope de gB (Macagno *et al.*, 2010). L'importance de l'immunité humorale spécifique du CMV demeure mal comprise mais elle semble restreindre la dissémination virale et limiter la sévérité des manifestations cliniques. Ainsi, des souris déficientes en lymphocytes B ont une sensibilité accrue à l'infection au MCMV lors d'épisodes récurrents. A l'inverse, le transfert adoptif de lymphocytes B à des souris Rag^{-/-} est suffisant pour la protection contre une dose létale de MCMV (Klenovsek *et al.*, 2007). L'importance de l'immunité humorale a aussi démontrée chez l'Homme au cours de l'infection congénitale. Chez la femme enceinte, le risque de transmission du CMV au fœtus est augmenté en cas de primo-infection par comparaison à la réactivation virale. L'immunisation passive au cours de la primo-infection à CMV lors de la grossesse confère une protection accrue contre la transmission materno-fœtale et un degré de sévérité moindre de la maladie chez le fœtus (Nigro *et al.*, 2005, 2012). De plus, la probabilité de la transmission intra-utérine est augmentée si les anticorps anti-CMV maternels sont de faible affinité et exercent une faible activité neutralisante. Par ailleurs, la primo-infection à CMV est plus fréquente et plus sévère chez les patients transplantés séronégatifs pour le CMV dont le donneur est séropositif. Le rôle bénéfique des anticorps spécifiques du CMV a aussi été démontré par l'immunisation de patients avec la souche atténuée Towne ou par l'administration d'IgG anti-CMV avant transplantation, chez qui la maladie à CMV a été atténuée (Plotkin *et al.*, 1994; Snyderman *et al.*, 1987). La compréhension des mécanismes de l'immunité humorale dirigée contre le CMV est fondamentale dans le but d'élaborer une stratégie vaccinale efficace destinée à la prévention de l'infection congénitale et en transplantation.

- La réponse médiée par les lymphocytes T

Le compartiment lymphocytaire T conventionnel, incluant les lymphocytes T CD4⁺ et T CD8⁺, est fortement sollicité au cours de l'infection à CMV mais aussi profondément

remanié. L'ampleur de la réponse cellulaire spécifique du CMV est considérable puisqu'elle représente jusqu'à 10% des lymphocytes T CD8⁺ et 9% des lymphocytes T CD4⁺ mémoires circulants (Sylwester *et al.*, 2005), ce qui est bien plus élevé que pour d'autres virus. Ces fréquences augmentent au cours de la vie, même en l'absence de virémie détectable. Les lymphocytes T CD4⁺ et T CD8⁺ dirigés contre le CMV reconnaissent une très large gamme d'épitopes, puisque jusqu'à 213 ORF présumés du CMV peuvent générer une réponse T (Figure 25). Les spécificités immunodominantes sont toutefois dirigées contre gB, pp65 et pUL86 pour les T CD4⁺ et pUL48, pp65 et IE1 pour les T CD8⁺.

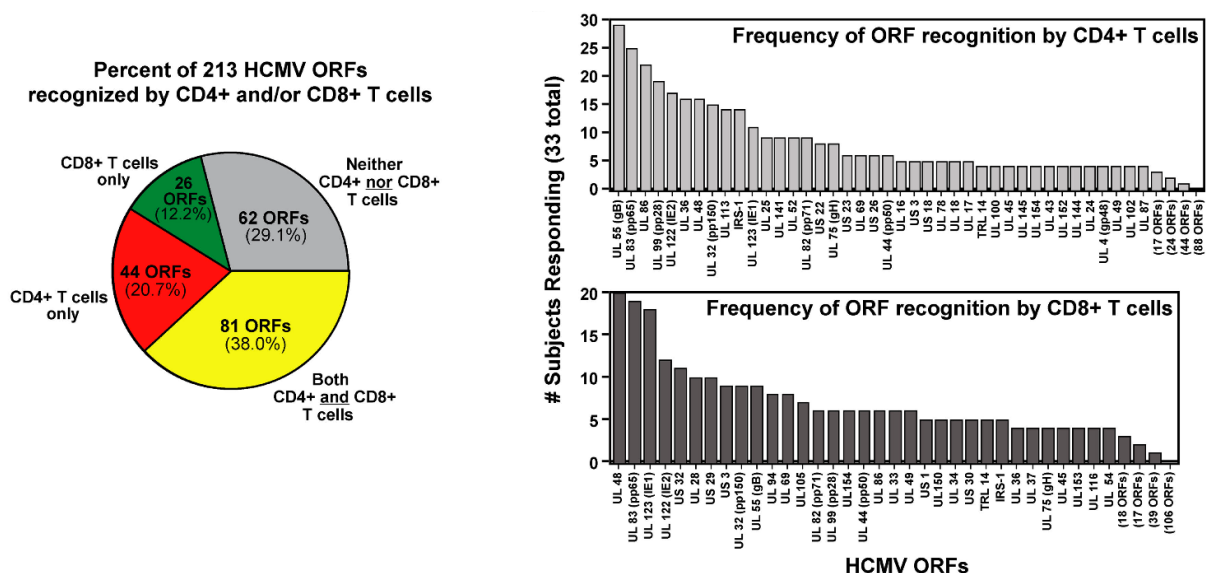


Figure 25 : La spécificité anti-CMV de la réponse lymphocytaire T. Identification de 213 ORFs immunogènes reconnus par les lymphocytes T CD4⁺ et/ou T CD8⁺ chez des individus sains séropositifs pour le CMV (graphique de gauche), parmi lesquels se trouvent des épitopes immunodominants (graphique de droite). D'après Sylwester *et al.*, 2005.

- Les lymphocytes T CD4⁺

Les lymphocytes T CD4⁺ jouent un rôle central dans le contrôle de l'infection primaire à CMV puisqu'ils orchestrent le développement de la réponse humorale et activent la réponse cytotoxique médiée par les lymphocytes T CD8⁺. La contribution des lymphocytes T CD4⁺ dans la lutte contre le CMV a été mise en évidence chez la souris par la récurrence de l'infection à CMV murin suite à la déplétion sélective de cette population lymphocytaire (Polić *et al.*, 1998). Chez l'Homme, l'excrétion virale prolongée dans les glandes et les urines chez les jeunes enfants sains ayant acquis le CMV a été corrélée à une déficience fonctionnelle T CD4⁺ sélective et durable (Tu *et al.*, 2004). Dans un contexte de transplantation, la faible fréquence de T CD4⁺ est associée à une difficulté de clairance du virus (Sester *et al.*, 2005). Enfin, l'infusion de T CD4⁺ spécifiques du CMV à des receveurs de greffe de CSH, chez qui la réponse CD4⁺ était inexistante et le virus résistant aux antiviraux, a permis la reconstitution d'une réponse effectrice CD4 et CD8 dirigée contre le CMV associée à la baisse de la virémie (Einsele H *et al.*, 2002).

L'activation des lymphocytes T CD4⁺ par l'engagement de leur TCR avec un épitope du CMV présenté par les molécules HLA de classe II exprimées par les CPA conduit à l'induction d'une réponse T_H1 (*T Helper 1*) caractérisée par la production d'IL-2, -12, d'IFN- γ et de TNF- α □Rentenaar *et al.*, 2000 ; van de Berg *et al.*, 2010), ce qui permet l'activation d'une réponse T CD8⁺ cytotoxique. Chez les individus séropositifs pour le CMV, il a été observé l'expansion d'une sous-population de lymphocytes T CD4⁺ de phénotype effecteur mémoire de différenciation terminale (CD28⁻CD27⁻CD45RO⁺) (Figure 26). Cette sous-population est capable d'exercer une activité cytolytique directe médiée par l'IFN- γ , le granzyme A et la perforine (Appay *et al.*, 2002).

- Les lymphocytes T CD8⁺

L'importance des lymphocytes T CD8⁺ dans la clairance de l'infection à CMV a d'abord été démontrée chez la souris chez qui la suppression spécifique de ce compartiment lymphocytaire coïncidait avec l'augmentation des récurrences et de la dissémination virale. Au contraire, le transfert adoptif de lymphocytes T CD8⁺ cytotoxiques confère une protection contre une dose virale létale (Mutter W *et al.*, 1998). Chez l'Homme, le transfert adoptif de clones cytotoxiques T CD8⁺ spécifiques du CMV chez des patients immunodéprimés receveurs de greffe de CSH a été corrélée avec l'apparition d'une immunité anti-CMV durable, jusqu'alors indétectable chez ces patients (Riddell *et al.*, 1992). Dans le contexte de l'infection congénitale, les lymphocytes sont fonctionnels et capables de proliférer de façon semblable à la réponse CD8 qui se met en place chez l'adulte (Marchant *et al.*, 2003).

Les premiers lymphocytes T CD8⁺ à apparaître au cours de la primo-infection à CMV présentent un phénotype CD27⁺CD45RA⁻CCR7⁻, ce dernier étant un récepteur de *homing* vers les organes lymphoïdes secondaires, et expriment le granzyme B et de la perforine qui leur permettent d'exercer une activité lytique face à des cellules infectées par le CMV (Gamadia *et al.*, 2003). Dans les mois qui suivent l'épisode aiguë de l'infection, les lymphocytes T CD8⁺ perdent graduellement l'expression du CD27 et ré-expriment le CD45RA tout en conservant leur propriétés fonctionnelles (Appay *et al.*, 2002; van Lier *et al.*, 2003) (Figure 26). Ils acquièrent également l'expression du CD57. Ce phénotype effecteur mémoire de différenciation terminale est le prototype des lymphocytes T CD8⁺ anti-CMV que l'on retrouve chez les individus sains infectés de façon latente par le CMV. Cette large sous-population est connue pour s'amplifier avec l'âge (Klenerman and Oxenius, 2016).

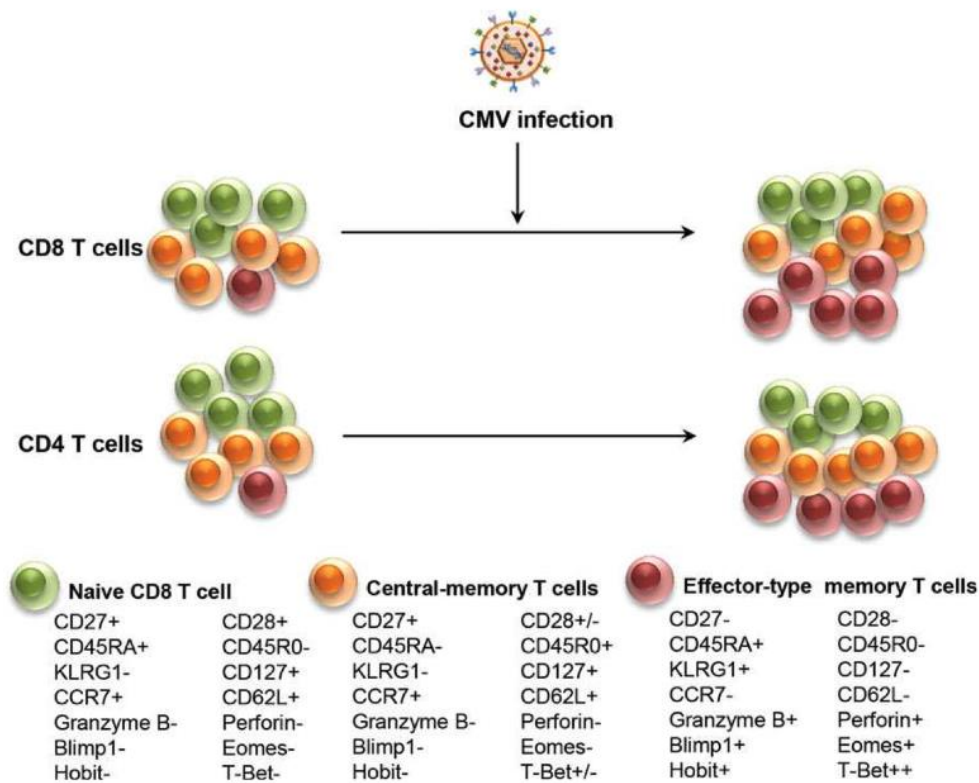


Figure 26 : Différenciation des lymphocytes T CD4⁺ et CD8⁺ en réponse à l'infection à CMV. L'infection à CMV induit l'expansion des lymphocytes de phénotype mémoire intermédiaire et tardif au cours du temps. D'après Arens *et al.*, 2015.

II.4.c. Mécanismes d'échappement du CMV à la réponse immunitaire

Face à la forte mobilisation du système immunitaire qu'il suscite, le CMV dispose d'un vaste arsenal de mécanismes qui lui permettent de persister sous forme latente de façon durable.

Le CMV semble capable de contrer les premiers mécanismes de défense cellulaire notamment par l'inhibition de IRF3 par pp65, contrecarrant ainsi la synthèse des IFN de type I (Abate DA *et al.*, 2004). La protéine IE86 aurait quant à elle un rôle dans l'inhibition de la synthèse d'IFN- β en bloquant la voie de signalisation de NF- κ B. Le CMV serait aussi capable d'interférer dans la transduction du signal des IFN par l'inactivation des protéines JAK/STAT

(Marshall and Geballe, 2009). Récemment le miARN UL112 a été impliqué dans la modulation de la voie NF- κ B par le ciblage du TLR-2 (Landais *et al.*, 2015).

Les protéines du tégument gp68 (UL119-118) et gp34 (TRL11/IRL11) possèdent une homologie de structure avec les récepteurs au fragment Fc des anticorps et sont capables de lier les IgG avec une affinité plus ou moins forte selon les allotypes, ce qui pourrait permettre au CMV d'échapper à la lyse par l'ADCC (Corrales-Aguilar *et al.*, 2014).

L'un des dispositifs les plus conséquents mis en place par le CMV pour échapper à la réponse immunitaire est l'interférence avec l'apprêtement et la présentation des antigènes viraux par les molécules HLA de classe I et II des cellules infectées. L'échappement à la reconnaissance des lymphocytes T CD4⁺ est notamment médiée par la protéine codée par le gène US2 qui se lie aux molécules HLA de classe II afin de les exporter vers le cytoplasme où elles seront dégradées par le protéasome (Tomazin *et al.*, 1999). La protéine gpUS3 retient les molécules HLA de classe II dans le RE et pp65 est responsable de leur accumulation au sein des lysosomes, entraînant leur dégradation (Hegde *et al.*, 2002; Odeberg *et al.*, 2003). Afin d'échapper aux lymphocytes T CD8⁺, le CMV entrave également l'expression des molécules HLA de classe I à la surface cellulaire, par leur rétention dans le RE (gpUS3, gpUS8, gpUS10) (Jones *et al.*, 1996; Tirabassi and Ploegh, 2002; del Val *et al.*, 1992), l'inhibition du chargement peptidique (gpUS3, gpUS6) (Park *et al.*, 2004 ; Lehner *et al.*, 1997, Hewitt *et al.*, 2001) ou leur orientation vers le cytosol pour être dégradées par le protéasome (gpUS2, gpUS11) (Ahn *et al.*, 1996 ; Wiertz, Jones *et al.*, 1996). Le CMV code également pour un homologue de l'interleukine immunosuppressive IL-10 (cmvIL-10, UL111a) qui inhibe l'expression des molécules HLA de classe I et II et la prolifération des lymphocytes (Kotenko *et al.*, 2000 ; Jenkins *et al.*, 2008).

La diminution de l'expression des molécules HLA de classe I à la surface des cellules infectées ainsi induite par le CMV devrait les rendre vulnérables à la lyse par les cellules NK, par le mécanisme de la reconnaissance du soi manquant. Mais le CMV possède différentes stratégies pour échapper à la reconnaissance NK, notamment par l'expression du gène UL18 codant pour une protéine homologue des molécules HLA de classe I, qui s'associe avec la β_2m et fixe le récepteur inhibiteur ILT-2 (Browne *et al.*, 1990; Chapman *et al.*, 1999b). Ce récepteur reconnaît dans un contexte physiologique les molécules HLA de classe I classiques et non classiques, contribuant ainsi au *monitoring* de l'expression de ces molécules et à la modulation de la fonction des cellules NK. L'expression membranaire de la molécule HLA de classe I non classique HLA-E est d'ordinaire stabilisée par le chargement d'un peptide issu de la séquence signal des molécules HLA de classe I. Elle devrait donc être impactée par l'inhibition de l'expression des molécules HLA de classe I induite par le CMV. Or celui-ci maintient l'expression membranaire de HLA-E grâce à un peptide dérivé de la protéine UL40 qui présente une séquence homologue à celle du peptide signal HLA de classe I (Tomasec, Science, 2000)(Tomasec *et al.*, 2000). HLA-E peut ainsi interagir avec le complexe inhibiteur CD94/NKG2A exprimé à la surface des cellules NK. Un autre mécanisme d'échappement à l'activation NK par le CMV est l'inhibition de l'expression à la membrane plasmique de la cellule infectée des protéines de stress comme les ULPB (ULBP1, -2 et -6) et MICB par gpUL16 (Cosman *et al.*, 2001; Eagle *et al.*, 2009). Cette dernière maintient leur rétention au niveau du RE ou de l'appareil de Golgi, évitant ainsi leur liaison au récepteur activateur NKG2D (Dunn *et al.*, 2003 ; Rölle *et al.*, 2003). Le miARN UL112 supprime également l'expression membranaire de MICB en inhibant la traduction de ses transcrits (Stern-Ginossar *et al.* 2007). Il a également été montré que la gpUL142 pouvait fixer et retenir l'ULBP3 dans le cytoplasme et inhiber l'expression de MICA (Bennett *et al.*, 2010 ; Chalupny *et al.*, 2006). La gpUL141 est aussi un puissant suppresseur de la lyse médiée par les cellules NK par la

réretention intracellulaire de CD155, ligand de DNAM-1, au niveau du RE (Tomasec *et al.*, 2000) et de MICA (Wills *et al.*, 2005). De plus, la gpUL141 bloque les récepteurs de mort TRAIL, permettant donc l'échappement à une autre voie de cytotoxicité NK (Smith *et al.*, 2013). La protéine virale pp65 peut aussi se lier au récepteur NKp30 et l'inhiber par la dissociation de la chaîne de transduction CD3 ζ (Arnon *et al.*, 2005). La figure 27 résume les mécanismes d'immunosubversion mis en place par le CMV afin d'échapper à la réponse immunitaire.

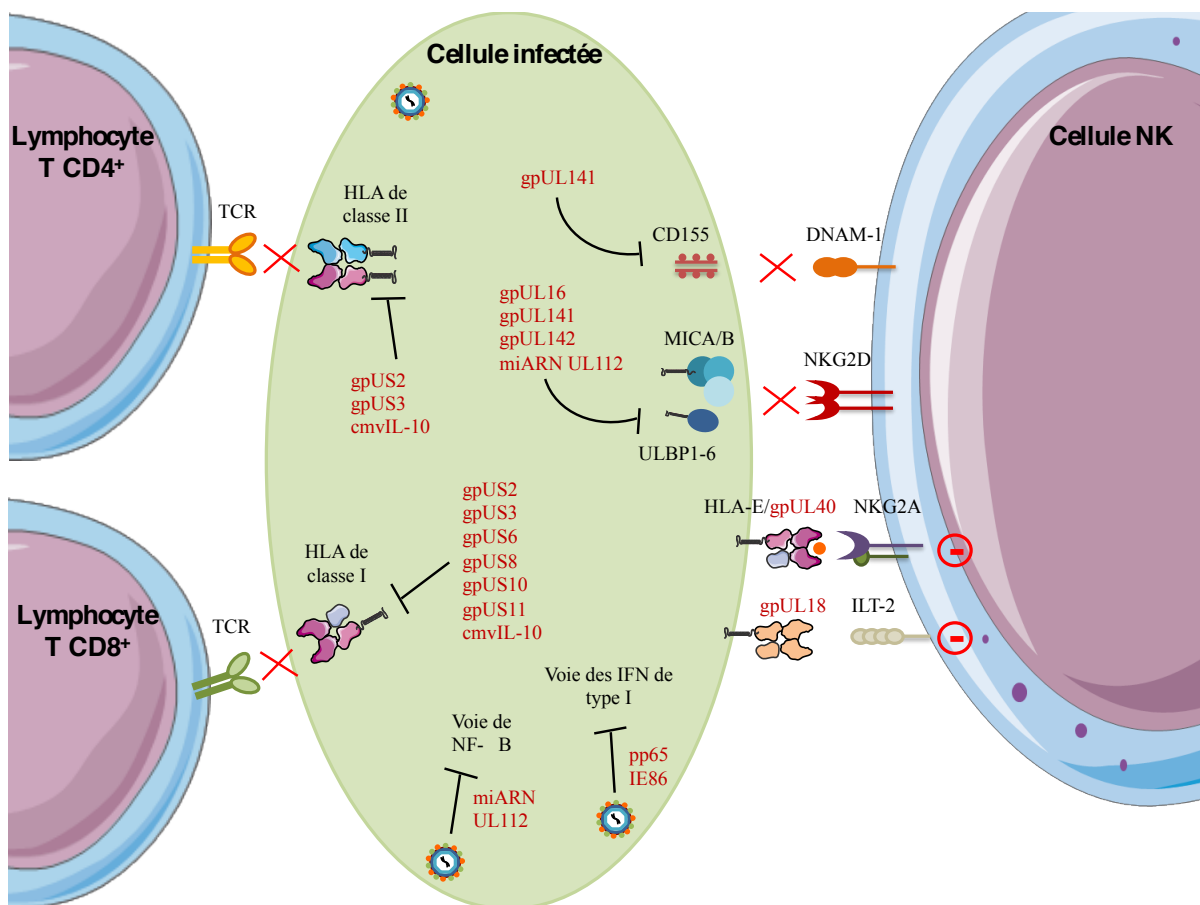


Figure 27 : Les principaux mécanismes d'échappement à la réponse immunitaire mis en place par le CMV. Le CMV inhibe précocement le déclenchement de l'état antiviral par la cellule infectée qui se traduit par la synthèse et la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires et des IFN de type I. Les cellules infectées par le CMV échappent à la reconnaissance par le TCR des lymphocytes T par l'inhibition, qui inclue divers mécanismes, de l'expression membranaire des molécules HLA de classe I et II. La *down-régulation* de l'expression des molécules HLA de classe I à la surface des cellules

infectées devrait permettre leur lyse par les cellules NK *via* le mécanisme de la reconnaissance du soi manquant. Cependant, le CMV code pour une protéine homologue aux molécules HLA de classe I, gpUL18, qui est reconnue par le récepteur inhibiteur ILT-2 exprimé à la surface des cellules NK. La protéine virale gpUL40 permet le maintien de la molécule HLA-E à la surface de la cellule infectée et son engagement avec le récepteur inhibiteur NKG2A. D'autres protéines virales inhibent l'expression membranaire des protéines de stress comme MICA/B et les ULBP1 à 6, empêchant ainsi leur interaction avec le récepteur activateur NKG2D. Le ligand du récepteur activateur DNAM-1, CD155, est retenu au niveau du cytoplasme de la cellule infectée par la protéine virale gpUL141.

II.5. CMV et Physiopathologie

II.5.a. CMV et immunosénescence

Avec l'âge, l'Homme est confronté à la détérioration de la qualité de sa réponse immunitaire, par le vieillissement cellulaire et l'histoire de son exposition antigénique. Il s'agit de l'immunosénescence. Elle s'illustre par exemple par une plus faible activation immunitaire suite à la rencontre de nouveaux antigènes ou après vaccination (Dorshkind *et al.*, 2009; Nikolich-Zugich, 2014). Le pool de lymphocytes T naïfs est diminué alors que les lymphocytes mémoires sont augmentés (Pawelec, 2012; Sauce *et al.*, 2012). L'infection à CMV contribuerait à l'immunosénescence notamment par l'accumulation de lymphocytes T spécifiques du CMV au cours de la vie, phénomène que l'on appelle inflation mémoire. Parmi les lymphocytes T effecteurs, trois phénotypes sont communément décrits selon leur profil fonctionnel et l'expression de marqueurs de surface. On distingue ainsi les lymphocytes T mémoires centraux (*Central Memory*, CM), qui ont une plus forte sensibilité à la stimulation par de nouveaux antigènes et qui ont une capacité rapide de différenciation en cellules effectrices. Les lymphocytes T effecteurs mémoires (*Effector Memory*, EM) seraient générés à partir des lymphocytes CM et ont des fonctions effectrices encore plus rapides. La réexpression du CD45RA par les lymphocytes EM (*Effector Memory T cells reexpressing CD45RA*, TEMRA) marque le dernier stade de différenciation des lymphocytes T mémoires. L'infection à CMV a été associée avec l'amplification des lymphocytes T CD8⁺ anti-CMV

EM et TEMRA (Derhovanessian *et al.*, 2013; Litjens *et al.*, 2011; Strindhall *et al.*, 2012) chez les personnes âgées. Les lymphocytes T CD8⁺ spécifiques du CMV observés chez ces personnes présentent une augmentation de l'expression du CD57 et une diminution de l'expression de CD28, phénotype qui caractérise les stades de différenciation les plus tardifs. De plus, une inversion du ratio CD4 :CD8 a été rapportée dans plusieurs études (Strindhall *et al.*, 2013 ; Alonson-Arias *et al.*, 2013). L'ensemble de ces observations constitue un phénomène baptisé *Immune Risk Profile* (IRP), qui serait associé à une mortalité plus élevée chez les personnes les plus âgées (Wikby *et al.*, 2005; Derhovanessian *et al.*, 2013).

II.5.b. CMV et cancer

La présence du génome et d'antigènes du CMV a été détectée dans plusieurs types de tumeurs malignes comme le cancer du côlon, le glioblastome, le lymphome de Hodgkin non associé à l'EBV ou encore le cancer de la prostate (Harkins *et al.*, 2002 ; Mitchell *et al.*, 2008 ; Huang *et al.*, 2002 ; Samanta *et al.*, 2003). Dans ces études, les marqueurs d'infection n'étaient pas détectés dans les cellules non cancéreuses situées dans l'environnement tumoral. Ces observations soulèvent la question de l'induction de la transformation tumorale par l'infection. *In vitro*, le CMV n'induit pas la transformation tumorale de lignées cellulaires humaines et n'est pour cela pas considéré comme oncogène. Il présenterait plutôt des propriétés oncomodulatrices à l'origine de la modification de la biologie de la tumeur sans induire directement la transformation (Johnsen *et al.*, 2011). Le CMV assurerait ainsi la promotion du processus oncogénique de plusieurs façons. L'infection à CMV perturbe les voies de signalisation intracellulaires qui aboutissent à l'inhibition de l'apoptose via les protéines codées par les gènes IE1, IE2, UL36-37. IE86 a notamment la capacité d'interagir avec la protéine suppresseur de tumeur p53. Le CMV maintient l'état prolifératif cellulaire par la promotion des proto-oncogènes c-myc, c-fos, c-jun et des cyclines. Par ailleurs, l'infection à CMV favoriserait l'angiogenèse par la stimulation de la synthèse de VEGF

(*Vascular Endothelial Growth Factor*) et de la cyclo-oxygénase 2, Cox 2 (Maussang *et al.*, 2006, 2009). Le CMV serait également impliqué dans la perturbation de l'expression des molécules d'adhésion, participant ainsi à l'acquisition des propriétés migratoires des cellules malignes. Grâce à ces nombreux mécanismes dédiés à la modulation du système immunitaire, le CMV assisterait les cellules tumorales dans l'échappement à la surveillance immune. L'inhibition de l'expression des molécules HLA à la membrane plasmique ou la synthèse d'homologues des cytokines immunosuppressives (TGF- β , cmvIL-10) en sont des exemples. Les homologues des récepteurs aux chimiokines codés par le CMV, UL33, UL78, US27 et US28 sont aussi capables de séquestrer les chimiokines pour limiter le recrutement des effecteurs immuns.

II.5.c. Autres maladies associées au CMV

Certaines maladies inflammatoires chroniques ou associées à l'inflammation (pathologies cardiovasculaires, auto-immunes) peuvent conduire à la réactivation du virus latent qui, par ses mécanismes de détournement de la machinerie cellulaire et de la réponse immunitaire, contribue au maintien voire même à l'aggravation de l'état inflammatoire. Il a, par exemple, été montré récemment que l'infection des macrophages par le CMV potentialise les réponses inflammatoires en maintenant l'expression du CD14 et de certains TLR et l'activation de la voie NF- κ B (Smith *et al.*, 2014). Les antigènes du CMV entretiennent également l'environnement inflammatoire par le recrutement et l'activation des leucocytes. Le CMV, par l'infection des cellules endothéliales et musculaires lisses qui constituent la paroi des vaisseaux sanguins, contribuerait ainsi à l'athérosclérose, à la sclérose vasculaire post-transplantation, notamment par la promotion de l'angiogenèse, mais aussi à la formation de thromboses responsables de symptômes ischémiques aigus (Streblow *et al.*, 2008; Shimamura, 2013). Le CMV a aussi été identifié dans plusieurs désordres auto-immuns : psoriasis, arthrite rhumatoïde, syndrome de Sjögren, lupus érythémateux disséminé et

colopathie fonctionnelle (syndrome du côlon irritable) (Asadullah *et al.*, 1999; Esposito *et al.*, 2014; Lawlor and Moss, 2010; Mehraein *et al.*, 2004).

II.6. Traitement et prophylaxie de l'infection à CMV

Diverses molécules antivirales exercent une activité anti-CMV, lorsque celui-ci est en cours de réplication. Ces molécules thérapeutiques ne sont pas spécifiques du CMV et sont actives sur d'autres herpesvirus et parfois sur d'autres virus à ADN ou ARN. Parmi celles qui bénéficient d'une autorisation de mise sur le marché, il existe des analogues nucléosidiques, tels que le Valaciclovir, le Ganciclovir ou sa pro-droge orale le Valganciclovir. Le Cidofovir est un analogue nucléotidique tandis que le Foscarnet est un analogue des pyrophosphates. Ces molécules inhibent l'activité de l'ADN polymérase virale et sont utilisées de façon préventive ou curative chez les patients transplantés ou atteints de SIDA. Elles peuvent aussi être administrées au sujet immunocompétent en cas de primo-infection symptomatique sévère. Ces antiviraux ne sont pas dénués de toxicité puisque leur utilisation est accompagnée d'effets indésirables non négligeables (troubles digestifs, neurotoxicité, néphrotoxicité, etc.). De nouveaux agents anti-CMV sont en cours de développement, dans le but d'améliorer la biodisponibilité et de réduire la toxicité des molécules antivirales.

L'infection à CMV demeure la première infection virale congénitale et est à l'origine de graves séquelles chez l'enfant. De plus, l'administration des traitements antiviraux disponibles n'est pas indiquée chez la femme enceinte, du fait de leur potentiel tératogène. Par ailleurs, l'infection à CMV demeure associée à une forte morbidité chez les patients immunodéprimés. Malgré d'intenses investigations, il n'existe à ce jour aucune stratégie vaccinale visant à prévenir l'infection à CMV. Des essais cliniques encourageants sont cependant en cours (Plotkin, 2015). Les premiers essais de vaccination ont été réalisés dans

les années 1970 à partir de souches vivantes atténuées du CMV, telles que les souches AD169 ou Towne dont les passages successifs sur fibroblastes *in vitro* ont altéré leur virulence (Wang and Fu, 2014). Des vaccins inertes entiers ou sous-unitaires ont aussi été testés. Plusieurs études se sont notamment basées sur la glycoprotéine d'enveloppe gB du CMV, cible de nombreux anticorps neutralisants. En particulier, dans un essai clinique de phase II visant à tester l'efficacité du vaccin recombinant gB/MF-59, il a été observé une diminution de 50% de la survenue de la primo-infection à CMV chez la femme enceinte (Pass *et al.*, 2009). Des résultats similaires ont été observés dans une cohorte de patients transplantés rénaux (Griffiths *et al.*, 2011).

OBJECTIFS

DU TRAVAIL DE THESE

L'une des thématiques de recherche de notre équipe porte sur l'étude des mécanismes de compatibilité immuns mobilisés au cours de la transplantation allogénique. Notre groupe s'intéresse particulièrement à la réponse des cellules NK mise en place dans le contexte de la greffe allogénique de CSH et à la contribution des interactions KIR/HLA au devenir de la greffe. En plus de leur rôle anti-leucémique, les cellules NK sont impliquées dans le contrôle de l'infection à CMV qui constitue une complication majeure post-greffe. C'est dans ce dernier axe de recherche que ce travail de thèse se positionne. Ce projet s'inscrit dans un programme de financement régional, l'Alliance de Recherche sur les Maladies Infectieuses Nantes-Angers (ARMINA), qui vise à fédérer les équipes de recherche dont la thématique porte sur les interactions hôte-pathogène. L'objectif de ce projet de thèse a été d'étudier les interactions CMV/immunité en se concentrant particulièrement sur les cellules NK, au cours de l'infection virale. L'infection à CMV génère en effet une forte mobilisation du système immunitaire qui permet le contrôle de l'infection et prévient l'apparition de symptômes chez l'individu immunocompétent. De plus, l'infection à CMV engendre un profond remaniement de différents compartiments lymphocytaires sur le long terme. Cependant, le CMV demeure associé à de graves complications lorsque le système immunitaire est compromis ou immature. Cellules primordiales de la réponse antivirale, l'identification des sous-populations NK majeures dans le contrôle de l'infection à CMV est importante dans la perspective de développer de nouvelles approches thérapeutiques et vaccinales.

Au cours de ce travail de thèse, nous avons d'abord exploré l'équilibre hôte/virus par une première approche *in vitro*, basée sur un modèle de co-culture des cellules NK avec l'une des cibles du CMV, les cellules endothéliales. L'objectif était d'investiguer le rôle de différentes sous-populations NK face aux cellules infectées (projet n°1). Une seconde approche a été conduite *ex vivo*, afin d'étudier les interactions entre le système immunitaire et le virus au cours de l'histoire naturelle de l'infection. Ce second volet a associé l'analyse du

polymorphisme de la réponse immunitaire de l'hôte et du polymorphisme génétique du CMV (projets n°2 et 3).

L'expansion de la sous-population NK NKG2C⁺ est associée à l'infection à CMV aussi bien chez l'individu immunocompétent que dans un contexte de transplantation ou d'infection congénitale (Guma *et al.*, 2004; Monsivais-Urendo *et al.*, 2010; Lopez-Botet *et al.*, 2011; Foley *et al.*, 2012). Cette sous-population co-exprime des récepteurs KIR (Foley *et al.*, 2012; Béziat *et al.*, 2012 Béziat *et al.*, 2013). Cependant, ni le rôle du récepteur NKG2C ni celui des récepteurs KIR n'est encore bien défini dans le contrôle de l'infection à CMV. C'est dans ce contexte que notre équipe a établi un modèle *in vitro* de co-culture de cellules NK avec des cellules dendritiques (*Dendritic Cells*, DC) dérivées de monocytes infectées par le CMV. Ce travail, mené par le Dr Zakia Djaoud au cours de sa thèse de doctorat, a montré que la sous-population NK NKG2C⁺ induite par le CMV exprime préférentiellement des récepteurs KIR2D (Djaoud *et al.*, 2013, annexe). De plus, les sous-populations NK KIR2D⁺ présentent un potentiel de dégranulation supérieur en réponse à des DC infectées par le CMV que la sous-population NK NKG2C⁺KIR2D⁻. Ce modèle a donc permis de démontrer l'implication des cellules NK KIR⁺ dans le contrôle de l'infection à CMV. Cependant, la pertinence de ce modèle a été questionnée quant à l'étude de la sous-population NK NKG2C⁺. En effet, les DC n'expriment que très peu la molécule HLA de classe I non classique HLA-E, le ligand du complexe CD94/NKG2C. C'est pourquoi nous avons mis en place un nouveau modèle *in vitro* de co-culture cellulaire, qui a fait l'objet de l'approche *in vitro* de l'étude des interactions entre les cellules NK et le CMV au cours de ce projet de thèse (projet n°1). Ce travail a été mené en collaboration avec l'équipe du Dr Béatrice Charreau (UMR 1064, Nantes) et a été initié par le Dr Zakia Djaoud au cours de sa thèse de doctorat. Cette étude a visé à évaluer la fonction de sous-populations NK, dont les cellules NK NKG2C⁺, en réponse à des cellules endothéliales (*Endothelial Cells*, EC) primaires isolées à partir de donneurs de

reins et infectées par le CMV. Cette approche expérimentale a eu pour but de mieux comprendre les interactions NK-EC puisque ces dernières sont un site privilégié de la réplication virale et expriment de façon constitutive la molécule HLA-E. Ce modèle présente également un intérêt pour l'étude des interactions entre cellules NK et EC infectées dans un contexte de transplantation rénale, où l'infection à CMV demeure une complication à risque.

Nous avons ensuite conduit une approche *ex vivo* de l'étude de l'infection à CMV dont l'objectif a été d'évaluer non seulement le comportement de la réponse immunitaire de l'hôte face à la primo-infection à CMV mais aussi du polymorphisme viral face à la pression immunitaire. Pour cela, nous avons établi une cohorte rare et originale d'individus adultes immunocompétents souffrant d'une primo-infection symptomatique à CMV, en collaboration avec le service des maladies infectieuses et tropicales du CHU de Nantes. Afin de mieux comprendre pourquoi ces patients étaient symptomatiques, alors que la majorité des cas de primo-infection à CMV passe inaperçue, nous avons d'abord réalisé une caractérisation phénotypique et fonctionnelle de la réponse lymphocytaire (projet n°2). En effet, le développement de symptômes pourrait s'expliquer par un défaut de la réponse immunitaire. Afin de renforcer ces données cellulaires, une étude du profil transcriptomique des lymphocytes circulants a été menée. Notre attention s'est particulièrement portée sur l'expression des gènes impliqués dans l'immunité. Nous avons formulé en parallèle l'hypothèse selon laquelle l'apparition des manifestations cliniques sévères au cours de la primo-infection à CMV pourrait également s'expliquer par une virulence particulière des souches virales impliquées (projet n° 3). En effet, l'absence de contrôle de la réplication et de la dissémination virale pourrait être due aux nombreux mécanismes d'échappement au système immunitaire que possède le CMV. A cela s'ajoute la forte variabilité génétique dont témoigne le génome du CMV, qui pourrait contribuer à l'état de virulence virale. Afin d'explorer cette hypothèse, nous avons analysé, par séquençage à haut débit, des souches

virales isolées à partir de notre cohorte de patients. Pour mener à bien ce travail, nous avons collaboré avec l'équipe du Pr M. Van Ranst (Rega Institute, Louvain, Belgique), qui possède l'expertise du séquençage du génome du CMV. Au cours d'un travail préliminaire, nous avons analysé la variabilité inter et intragénomique de ces souches par comparaison à des souches de CMV de laboratoire ou d'isolats cliniques. Nous avons ensuite étudié l'impact de ce polymorphisme génétique sur la séquence peptidique de protéines virales impliquées dans l'échappement au système immunitaire.

Grâce à diverses approches expérimentales, ce travail de thèse a permis d'explorer les relations hôte-virus à différents niveaux. Nous avons d'abord abordé de façon fondamentale la réponse cellulaire NK face à l'infection à CMV. Ce travail devrait contribuer à la compréhension du développement et du rôle des cellules NK NKG2C⁺ et du rôle des cellules NK KIR⁺ au cours de l'infection à CMV. Les données récoltées *ex vivo* apportent de nouveaux éléments quant aux événements lymphocytaires précoces qui interviennent au cours de la primo-infection à CMV. Le séquençage des souches cliniques isolées à partir des patients chez qui la primo-infection est symptomatique à la recherche de mécanismes de virulence particuliers devrait contribuer à la compréhension de la variabilité génétique du CMV et son impact sur la santé de l'hôte.

RESULTATS

RESULTATS

PROJET N°1 : Etude du rôle des cellules NK dans le contrôle de l'infection à CMV dans un modèle d'infection des cellules endothéliales primaires

Cytomegalovirus-infected primary endothelial cells trigger NKG2C⁺ Natural Killer cells

Zakia Djaoud, Raphaëlle Riou, Pierre-Jean Gavlovsky, Souad Mehlal, Céline Bressollette,
Nathalie Gérard, Katia Gagne, Béatrice Charreau, Christelle Retière

Etude du rôle des cellules NK dans le contrôle de l'infection à CMV dans un modèle d'infection des cellules endothéliales primaires

Les cellules endothéliales, siège de la réplication et probablement de la latence du CMV, expriment de façon constitutive la molécule HLA de classe I non classique HLA-E. Or, de nombreux travaux ont décrit l'expansion spécifique des cellules NK qui expriment le récepteur NKG2C, dont le ligand est la molécule HLA-E, dans un contexte d'infection par le CMV. Les cellules endothéliales, présentes à la face interne de la paroi des vaisseaux sanguins, se trouvent continuellement exposées aux cellules NK circulantes. De plus, dans un contexte de transplantation rénale, la primo-infection ou la réactivation du CMV est une complication majeure qui menace la survie du greffon et du receveur.

Dans un précédent modèle de co-culture cellulaire, notre équipe a montré la meilleure mobilisation des cellules NK KIR2DL⁺ aux dépens des cellules NK NKG2C⁺ face à des cellules dendritiques dérivées de monocytes infectées par le CMV (Djaoud *et al.*, 2013). Bien que ce modèle ait permis de montrer le rôle des cellules NK KIR⁺ dans le contrôle de l'infection à CMV, les DC expriment très faiblement la molécule HLA-E et pourraient ne pas représenter un modèle adéquat pour l'étude des fonctions NK NKG2C⁺.

L'ensemble de ces observations a donc conduit notre équipe à mettre au point un modèle de co-culture *in vitro* des cellules NK avec des cellules endothéliales aortiques humaines issues de donneurs de rein infectées ou non par la souche endothélotrope du CMV, VHL/E. Il s'agit d'un projet mené en collaboration avec l'équipe du Dr Béatrice Charreau (UMR1064, Nantes) et initié par le Dr Zakia Djaoud au cours de sa thèse de doctorat au sein de notre équipe. Le but a été d'étudier les interactions des sous-populations NK NKG2C⁺, NK

NKG2A⁺ et NK KIR⁺ avec les cellules endothéliales infectées par la souche de laboratoire endothéliotrope du CMV VHL/E.

Nous avons vu précédemment que l'un des mécanismes d'échappement au système immunitaire dont dispose le CMV repose sur l'inhibition de l'expression des molécules HLA de classe I à la surface des cellules infectées. Celles-ci deviennent alors insensibles à la cytotoxicité médiée par les lymphocytes T CD8⁺ mais deviennent vulnérables à la lyse par les cellules NK, par le mécanisme de la reconnaissance du soi manquant. Afin d'échapper à la reconnaissance NK, le CMV code pour la protéine gpUL40 dont une portion du peptide signal est capable de se loger dans le sillon peptidique de la molécule HLA-E et ainsi stabiliser son expression à la membrane cellulaire. La molécule HLA-E est alors disponible pour l'engagement avec le récepteur inhibiteur NKG2A exprimé par les cellules NK, dont l'affinité d'interaction est supérieure à celle de NKG2C. Au cours de cette étude, nous avons montré que le maintien de l'expression de la molécule HLA-E à la surface membranaire dépend du type cellulaire infecté. Les EC voient l'expression de la molécule HLA-E maintenue au cours de l'infection à CMV tandis que les DC subissent une diminution drastique de son expression. Nous montrons également que les cellules NK NKG2C⁺ dégranulent fortement en réponse aux EC infectées. Cet état d'activation dépend bien de l'expression de la molécule HLA-E par la cellule cible, comme le montre la co-culture de cellules NK avec la lignée 721.221, dépourvue de molécules HLA de classe I, transfectée avec la molécule HLA-E. La variabilité allélique HLA-E ne semble pas moduler l'activation des cellules NK NKG2C⁺. Enfin, nous observons que l'activation des cellules NK NKG2C⁺ fluctue selon la co-expression ou non des récepteurs KIR, évoquant ainsi un rôle immunorégulateur des récepteurs KIR dans l'activation des cellules NK NKG2C⁺.

Au final, cette étude suggère que les EC pourraient être à l'initiative de l'amplification des cellules NK NKG2C⁺, grâce à leur sensibilité pour le CMV, leur localisation et leur

expression constitutive de la molécule HLA-E. Dans le contexte de la transplantation rénale, ces résultats laissent à penser que les individus qui développent une amplification cellulaire NK NKG2C⁺KIR⁻ seraient en meilleure capacité de contrôler l'infection à CMV. Cela pourrait constituer un marqueur prédictif de l'issue de l'infection virale et donc de la survie du greffon et de l'hôte.

Cytomegalovirus-Infected Primary Endothelial Cells Trigger NKG2C⁺ Natural Killer Cells

Zakia Djaoud^{a, b} Raphaëlle Riou^{a, b} Pierre-Jean Gavlovsky^d
Souad Mehlal^b Céline Bressollette^{b, e, f} Nathalie Gérard^d Katia Gagne^{a, b, g}
Béatrice Charreau^{c–e} Christelle Retière^{a, b}

^aEtablissement Français du Sang, ^bEquipe d'Accueil 4271, ImmunoVirologie et Polymorphisme Génétique, Université de Nantes, ^cFaculté de Médecine, L'Université Nantes Angers Le Mans (LUNAM), ^dINSERM UMR1064, Centre de Recherche en Transplantation et Immunologie, LabEx IGO, Centre Européen des Sciences de la Transplantation et Immunothérapie, and ^eInstitut de Transplantation-Urologie-Néphrologie (ITUN) and ^fService de Virologie, Centre Hospitalier Universitaire (CHU), Nantes, and ^gLabExTransplantex, Université de Strasbourg, Strasbourg, France

Key Words

NKG2C · Human leukocyte antigen E · Natural killer cells · Endothelial cells · Cytomegalovirus

Abstract

Among innate cells, natural killer (NK) cells play a crucial role in the defense against cytomegalovirus (CMV). In some individuals, CMV infection induces the expansion of NKG2C⁺ NK cells that persist after control of the infection. We have previously shown that KIR2DL⁺ NK cells, in contrast to NKG2C⁺ NK cells, contribute to controlling CMV infection using a CMV-infected monocyte-derived dendritic cell (MDDC) model. However, the nature of CMV-infected cells contributing to the expansion of the NKG2C⁺ NK cell subset remains unclear. To gain more insight into this question, we investigated the contribution of NKG2C⁺ NK cell activation by CMV-infected primary human aortic endothelial cells (EC) isolated from kidney transplant donors, which constitutively express the human leukocyte antigen (HLA)-E molecule. Here, we show

that, although classic HLA class I expression was drastically downregulated, nonclassic HLA-E expression was maintained in CMV-infected EC. By comparing HLA expression patterns in CMV-infected EC, fibroblasts and MDDC, we demonstrate a cell-dependent modulation of HLA-E expression by CMV infection. NKG2C⁺ NK cell degranulation was significantly triggered by CMV-infected EC regardless of the nature of the HLA-E allele product. EC, predominantly present in vessels, may constitute a privileged site for CMV infection that drives a 'memory' NKG2C⁺ NK cell subset.

© 2016 S. Karger AG, Basel

Introduction

Human cytomegalovirus (CMV) infection is highly prevalent worldwide. In immunocompetent individuals, CMV infection is usually asymptomatic and immune cells rapidly control its multiplication. Among the different cellular immune components, natural killer (NK)

cells constitute a major effector of the innate immune system in controlling viral infections. Indeed, it has been reported that some rare individuals who are selectively deficient in NK cells are susceptible to herpesviruses, including CMV [1, 2]. Like all herpesviruses, CMV remains latent in the host after the primary infection, and persists for life. CMV adapts to maintain a replicatively dormant state at infected sites, and is controlled by host immune surveillance, resulting in host/virus coexistence. This common virus causes major damaging effects in newborns and immunocompromised individuals such as organ- or cell-transplanted recipients as well as HIV patients. Moreover, this virus has recently been linked to immunosenescence [3].

CMV is a large, double-stranded DNA virus encoding more than 200 immunogenic proteins. To escape innate and adaptive cell immune recognition, it displays a wide arsenal of evasion strategies, notably targeting the down-regulation of human leukocyte antigen (HLA) protein expression. Indeed, CMV peptide-loaded classic HLA class I molecules are directly recognized by CMV-specific T lymphocytes. Several CMV-derived viral immunoevasins (e.g. the US2 and US11 regions) counteract HLA class I molecule trafficking, inducing their cell surface downregulation on CMV-infected cells, thus rendering them resistant to T cell lysis [4]. However, HLA class I molecules constitute the primary signature of innate immune self-restriction, and are recognized by NK cells via inhibitory receptors known as KIR. As a consequence, decreased expression of HLA class I molecules on CMV-infected cells limits the engagement of inhibitory KIR, triggering NK cell function. CMV-infected cells express a late UL18 protein that is stably associated at the cell surface with $\beta 2$ microglobulin. This allows subsequent engagement with the inhibitory immunoglobulin-like transcript 2 (ILT2) receptor [5], which counters the absence of KIR engagement. Moreover, nonclassic HLA class I molecules that normally engage with functional NK receptors are particularly targeted by CMV evasion. The downregulation of HLA class I molecule expression impacts directly on HLA-E expression, which is dependent on the presentation of HLA class I leader sequences. HLA-E is recognized by the lectin-like CD94/NKG2A heterodimer receptor and inhibits NK cell responses [6]. UL40 is a late CMV protein which contains a signal peptide similar in its sequence to the signal peptide of HLA class I molecules and can restore cell surface HLA-E expression [7]. Moreover, two CMV proteins, UL142 [8] and UL16 [9], respectively, retain the MHC class I-related chain A (MICA) and chain B (MICB) proteins in the cytoplasm of CMV-infected

cells, thus limiting NKG2D⁺ NK cell attack. In addition, US18 and US20 target MICA for lysosomal degradation [10]. Finally, the viral miRNA miR-UL112 acts in synergy with cellular miRNAs to inhibit MICB expression in CMV-infected cells [11], and MICA expression is regulated by at least two RNA-binding proteins [12].

Recent studies have shown an expansion of NK cells expressing the activating NKG2C receptor at high levels in CMV-seropositive but not CMV-seronegative individuals [13–16]. NKG2C associates with CD94 and recognizes HLA-E as its inhibitory counterpart NKG2A. The interaction of the CD94/NKG2C receptor with HLA-E leads to NK cell activation [17]. We have previously shown that these amplified NKG2C⁺ NK cells preferentially express KIR2DL receptors that contribute to NK cell activation in CMV infection [18]. However, the role played by NKG2C receptors in the immune responses against CMV infection remains an open issue. Recently, it has been shown that CMV induces HLA-E on infected fibroblasts and triggers CD14⁺ monocytes to secrete IL-12 [19]. The authors suggested that, in concert, these factors drive the expansion of NKG2C⁺ NK cell subset in CMV infection. This observation based on CMV-infected fibroblasts seems to be limited to this type of cells since CMV does not induce HLA-E on infected monocyte-derived dendritic cells (MDDC), known to produce IL-12.

Endothelial cells (EC) are ubiquitously present at the internal surface of blood vessels. They are a site of CMV replication, a potential site of latency [20], and are continually exposed to circulating NK cells. Moreover, EC constitutively express the non-classical HLA-E molecule and may constitute pivotal target cells in driving NKG2C⁺ NK cell expansion. In a previous study, we showed that CMV-infected MDDC, which express very low levels of HLA-E weakly triggered NKG2C⁺ NK cell degranulation in contrast to the KIR2D⁺ NK cell counterpart [18]. In the light of this, we have established an *in vitro* model using CMV-infected primary human aortic EC, and measured the changes in HLA class I and HLA-E molecule expression. Furthermore, we sought to determine whether NKG2C⁺ NK cells can mount effector responses against these CMV-infected cells.

Materials and Methods

Cells

Peripheral blood mononuclear cells (PBMC) were isolated from citrate-phosphate-dextrose blood from healthy adult volunteers by gradient centrifugation on Ficoll-Hypaque (Lymphoprep, Axis-Shield, PoC AS, Oslo, Norway). All blood donors were re-

cruited at the Blood Transfusion Center (Etablissement Français du Sang, Nantes, France) and informed consent was obtained from all individuals. Human CMV serological status was determined using the chemiluminescent immunoassay LIAISON® CMV IgG II (DiaSorin, Saluggia, Italy). Primary EC, isolated from kidney transplant donors, were characterized and cultured as previously described [21, 22]. Briefly, primary EC cultures are prospectively isolated at the time of transplant surgery from deceased transplant donors (French Health Minister project No. 02G55). Cells are isolated from small vascular pieces by collagenase digestion and purification using anti-CD31-coated magnetic beads. For each donor, initial cell culture is grown up for 10 days to reach passage 1 and to allow the long-term storage in liquid nitrogen of several samples by donor at an early passage. Phenotyping of the cell culture is routinely performed before freezing to ensure both the endothelial phenotype and the ability of ECs to respond to cytokine stimulation by the regulation of a set of activation markers including CD31, E-selectin, ICAM-1, VCAM-1 and HLA class I molecules. Freezing the EC cultures at a distance from the isolation step also avoids immediate changes due to cell death and the harvesting process. Our experiments were performed using at least 4 independent cell cultures.

These cells were used between passages 2 and 5. HLA-E*01:01 (EC101), HLA-E*01:03 EC (EC103) were characterized as previously described [22]. MRC5 fibroblasts (RD-Biotech, Besançon, France) were cultured in MEM medium containing penicillin-streptomycin and supplemented with 10% FBS. The HLA class I-deficient 721.221(221) cell line and the HLA-E-transfected 221 cell line (kindly provided by Dr V. Braud, CNRS/UNSA UMR 7275, Valbonne, France) were cultured in RPMI 1640 medium containing glutamine and penicillin-streptomycin, and supplemented with 10% FBS (all from Life Technologies, Paisley, UK). The HLA-E-transfected 221 cell line expresses a chimeric molecule (GLS-B*5801) containing the HLA-G leader sequence, extracellular transmembrane and cytoplasmic domains of the HLA-B*5801 molecule as previously described [6]. Mycoplasma tests performed by PCR were negative for all cell lines.

Isolation of Monocytes and Generation of Infected MDDC

Monocytes were separated from lymphocytes by using a high-density hyper-osmotic Percoll density gradient (Sigma) [23] and cultured for 6 days in RPMI 1640 medium containing glutamine, penicillin-streptomycin and supplemented with 10% human AB serum (all from Gibco, Paisley, UK), interleukin 4 (IL-4; 200 U/ml, CellGenix) and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF; 1,000 U/ml, CellGenix).

CMV Preparation and Cell Infection

Stock suspensions of CMV strain VHL/E (provided by Prof. James Waldman, Columbus, Ohio, USA) were produced as previously described [18, 24]. CMV VHL/E was first inoculated onto confluent and low-passaged human umbilical vein EC (HUVEC; PromoCell, Heidelberg, Germany) monolayers in 25-cm² gelatin-coated culture flasks. Cells were cultured in EC growth medium supplemented with 10% FBS and appropriate EC supplements (EGM-2 BulletKit Medium; Lonza, Basel, Switzerland). When 50% of HUVEC exhibited a cytopathic effect, they were harvested, washed and frozen in EGM + 20% FBS. MRC-5 fibroblasts were grown to 80% confluence in 25-cm² flasks in MEM medium containing 10% FBS. They were then inoculated with VHL/E-infected

HUVEC diluted with serum-free MEM. After 12 h, fresh medium supplemented with 10% FBS was added. When a cytopathic effect of 80% was reached, the MRC-5 fibroblasts were washed, trypsinized, suspended in serum-free MEM and inoculated into PBS-washed MRC-5 monolayers in 75-cm² flasks. After 12 h, fresh medium supplemented with 10% FBS was added. Cell cultures were incubated for 6–8 days and frozen when a 90% cytopathic effect was observed. CMV VHL/E was then harvested from the MRC5-supernatant after a freeze-thaw step and ultracentrifugation (2 h at 28,000 rpm) in a sucrose density gradient. Pellets containing virions were resuspended in serum-free RPMI medium and stored at –80°C.

Infectivity was checked and titrated on the infected MDDC, primary EC and fibroblasts (MRC-5) grown to confluence in 6-well plates. Cells were washed and inoculated (or not) with increasing volumes of CMV VHL/E stock in serum-free medium. After 12 h, cells were washed and fresh medium containing 10% FBS was added. Two days after infection, cells were harvested and stained with immediate-early 1 (IE1) specific antibody (8B1.2; Millipore) to assess the percentage of infected cells and to determine the optimal volume of CMV suspension to use in all designed experiments. An optimal multiplicity of infection (MOI) of 0.2–0.3 was determined, based on VHL-E-infected fibroblast cultures.

Functional Assays and Flow Cytometry

PBMC were preincubated with anti-CD107a (H4A3; BD Biosciences, San Jose, Calif., USA). NK cell degranulation was assessed after incubation for 5 h alone (negative control) with target cells.

PBMC were stained with antibodies (Abs) against CD3 (SK7), ILT2 (GHI/75), DNAM-1 (DX11), CD161 (DX12) (BD Biosciences), NKG2C (134591; R&D Systems), NKG2A (Z199), KIR2DL1/S1 (EB6), KIR2DL2/3/2DS2 (GL183) and KIR3DL1/S1 (Z27) (Beckman Coulter), NKp46 (9E2), 2B4 (2-69), CD16 (NKP15) (Becton Dickinson, Franklin Lakes, N.J., USA) and KIR2DL1/2/3/S1/S2 (1A6) [25]. EC were stained with Abs against HLA-A, HLA-B, HLA-C (NaM41-1E3; EFS) [26] and HLA-E molecules (3D12; MiltenyiBiotec). Flow cytometry was performed using a FACS-Calibur apparatus with CellQuest software (BD Biosciences) and analyzed using FlowJo 7.6.1 software (Tree Star, Ashland, Oreg., USA).

HLA-E Genotyping

Total RNA was isolated from 1×10^6 CMV⁺ PBMC using a Nucleospin® RNA kit (Macherey Nagel GmbH, Düren, Germany). Primers used to amplify the HLA-E gene were: 5'-GGCTGGGATCATGGTAGATG-3' (forward) and 5'-GAAGCCAGAGTCCCCTAAGA-3' (reverse). HLA-E cDNA sequencing was performed by the Sequencing Core Facility (SFR François Bonamy, Nantes, France) using an ABI 3730 automatic system (Applied Biosystems, Carlsbad, Calif., USA). HLA-E cDNA sequence alignment was performed using a Codon Code Aligner. The sequence was then aligned against the reference HLA-E sequences.

VHL/E UL40 Sequencing

Total RNA was purified from VHL/E-infected MDDC using the NucleoSpin RNA kit RNA. Primers to amplify the UL40 gene were designed using the sequences for human herpesvirus 5 strain AD169 and wild-type strain Merlin as previously described [27] and were 5'-GGCTCTGTCTCGTCGTCATT-3' (forward) and 5'-CGACACCGATCGATTTTCTT-3' (reverse) (Geneworks,

Hindmarsh, S.A., Australia). UL40 cDNA sequencing was performed as previously described for HLA-E genotyping. The sequence was then aligned against the human herpesvirus 5 strains, AD169, Toledo, Town and Merlin.

Statistical Analysis

All statistical analyses were performed with GraphPad Prism v6.0 (GraphPad software). Intergroup comparisons were assessed with the one-way analysis of variance (ANOVA) test from all independent groups of experiments. $p < 0.05$ was considered to be statistically significant (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ and **** $p < 0.0001$).

Results

CMV Fails to Downregulate HLA-E on EC

Because EC constitutively express higher levels of HLA-E compared to conventional antigen-presenting cells and since CMV immunoevasins interfere with HLA molecule trafficking, we evaluated the modulation of both HLA class I and HLA-E molecules on EC infected with CMV, 48 h after infection in comparison to MDDC and fibroblasts by flow cytometry. Infection was performed with the endotheliotropic VHL/E strain. CMV-infected cells express the nuclear IE1 viral protein and a low level of HLA class I molecules compared to mock-infected cells (fig. 1a). Thus, CMV-infected cells can be selected based on the fact that they express lower levels of HLA class I compared to mock-infected cells. $43 \pm 19\%$ of EC were IE1⁺ 48 h after infection with VHL-E. Similar rates of infection were observed for the MDDC ($41 \pm 6.5\%$) [18] and fibroblasts ($63 \pm 5.3\%$) using the same protocol of CMV infection.

The constitutive HLA class I expression was not significantly higher on EC compared to MDDC (fold change = 0.81) and fibroblasts (fold change = 1.85) but was significantly higher on MDDC compared to fibroblasts (fold change = 2.28; a mean of 479 ± 49 on MDDC and 210 ± 54 on fibroblasts; $p = 0.02$; fig. 1c, d).

Interestingly, HLA class I expression was strongly decreased on EC (fold change = 4.18; a mean of 387 ± 48 on mock-infected EC and 93 ± 19 on CMV⁺ EC; $p < 0.0001$) after CMV infection (fig. 1c, d). In contrast, the effect was less pronounced on fibroblasts that express a lower level of HLA class I on mock-infected cells (fold change = 2.78; a mean of 210 ± 54 on mock-infected fibroblasts and 75.4 ± 36 on CMV⁺ fibroblasts; $p = \text{n.s.}$), and even less pronounced in MDDC (fold change = 1.64; a mean of 479 ± 49 on mock-infected MDDC and 292 ± 72 on CMV⁺ MDDC; $p = \text{n.s.}$; fig. 1c, d). After CMV infection, the expression level of HLA class I molecule was higher on

Table 1. UL40-encoded HLA-E binding peptide from VHL/E CMV strain

CMV strain	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8	P9
AD169	V	M	A	P	R	T	L	I	L
Merlin	V	M	A	P	R	T	L	I	L
Toledo	V	M	A	P	R	T	L	V	L
Towne	V	M	A	P	R	T	L	L	L
VHL/E	V	M	A	P	R	T	L	L	L

MDDC than EC (292 ± 72 on CMV⁺ MDDC and 93 ± 19 on CMV⁺ EC; $p = 0.0053$) or fibroblasts (fig. 1c, d). Neither the nature of the HLA class I molecule nor the KIR ligand HLA-C subtype (C1 or C2) impacted the HLA class I expression pattern (data not shown). However, although HLA-E expression was significantly decreased on MDDC (mean of 5.3 ± 0.88 on mock-infected MDDC and 2.2 ± 0.14 on CMV⁺ MDDC; $p = 0.02$), little or no change in HLA-E level expression was observed on EC (a mean of 7.4 ± 0.69 on mock-infected EC and 6.5 ± 0.95 on CMV⁺ EC; n.s.) and seemed to be slightly higher on fibroblasts (a mean of 3.5 ± 0.84 on mock-infected fibroblasts and 4.78 ± 0.24 on CMV⁺ fibroblasts; $p = \text{n.s.}$; fig. 1d, e). Thus, the modulation of HLA-E expression after CMV infection seems to depend not only on the constitutive level of HLA-E but also on the nature of the target cells. Although the HLA class I expression was drastically decreased on CMV-infected EC, the HLA-E expression level was unaltered.

Identification of UL40-Encoded HLA-E Binding Peptide from VHL/E CMV Strain

The sharp downregulation of HLA class I molecule expression on CMV-infected EC should impact directly on HLA-E expression which is dependent on the presentation of HLA class I leader sequences. Only some CMV strains provide UL40 peptides that stabilize HLA-E on the cell surface and are involved in the interaction with the heterodimers CD94/NKG2A and CD94/NKG2C. To test the hypothesis that the maintenance of HLA-E expression on infected EC could be due to the loading of the UL40 peptide on HLA-E molecule, we sequenced the UL40 gene from VHL/E-infected cells. Indeed, an amino acid sequence alignment of VHL/E UL40 peptide (VMAPRTLIL) with previously published ones [27] highlighted a full homology between the VHL/E and Towne strains (table 1). It has been published that the UL40 peptide from the Towne strain leads to HLA-E expression and its functional engagement with CD94/

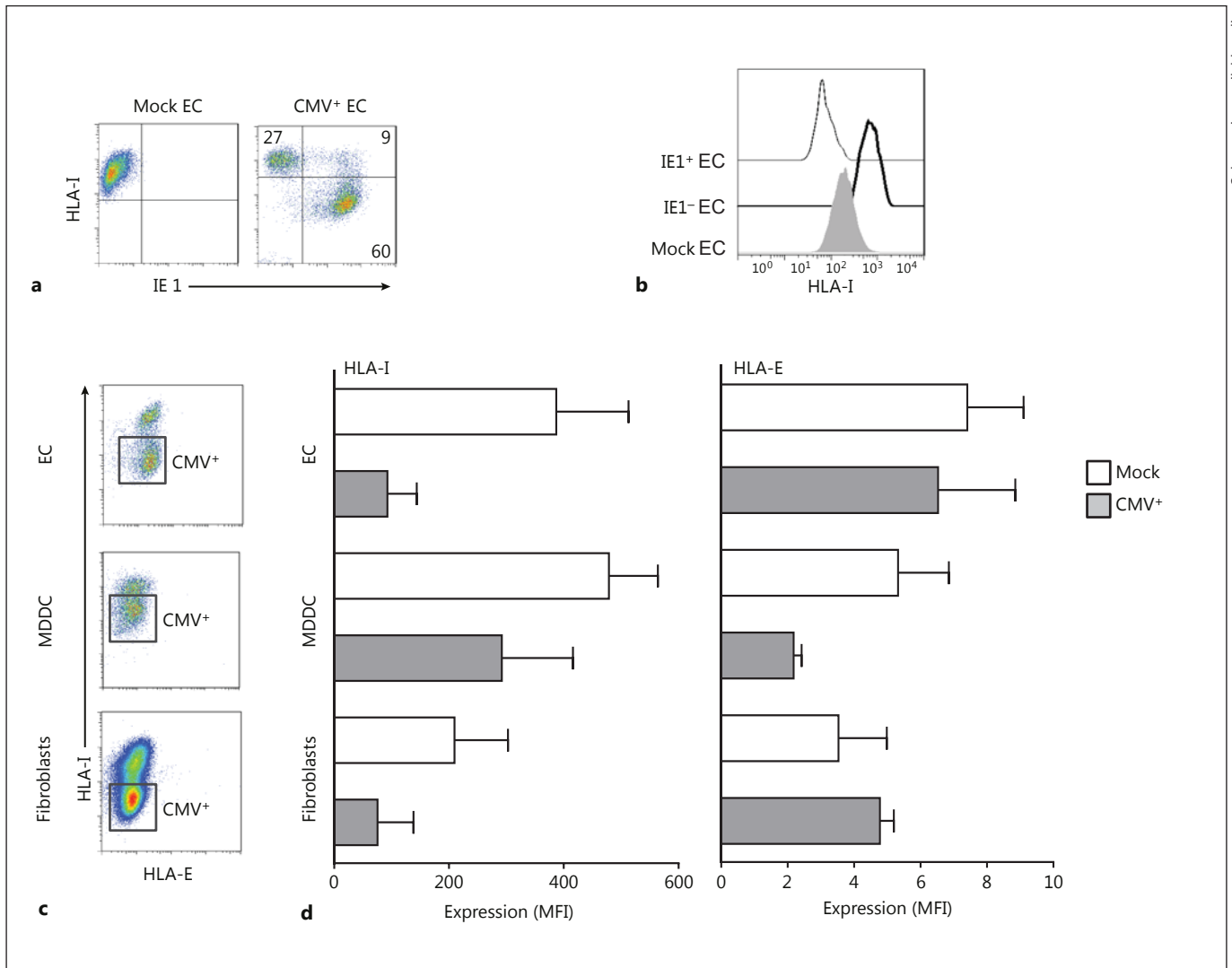


Fig. 1. CMV fails to downregulate HLA-E on EC. **a** FACS analysis of HLA class I expression on mock and CMV-infected EC. CMV-infected cells were targeted following a lower HLA class I expression pattern after checking that these cells expressed nuclear IE1 viral protein. EC, MDDC and fibroblasts were infected for 48 h with VHL/E CMV strain. **b** Histogram representing HLA class I expression (HLA-I) on mock-infected EC, CMV-infected EC and CMV-exposed but not infected EC after 48 h of CMV infection. **c** Density plots illustrating the phenotype of CMV-infected cells

(EC, MDDC and fibroblasts) using HLA-E- and HLA-I-specific monoclonal Abs (staining performed by flow cytometry). **d** FACS analysis comparing HLA-I (left) and HLA-E (right) expression at the cell surface (EC, MDDC and fibroblasts) on mock-infected and CMV-infected (for 48 h) cells. Results are expressed as a quantitative analysis of HLA-I or HLA-E geometric mean fluorescent intensity (MFI) minus IgG control geometric MFI for 7 experiments for EC, 3 for MDDC and 3 for fibroblasts. Histograms represent the mean $\pm$ SEM for each condition.

NKG2A and CD94/NKG2C receptors [27]. Thus, in accordance with these published results, we suggest that the UL40 signal peptide from VHL/E is processed and loaded specifically in the groove of HLA-E, maintaining its membrane expression.

The NKG2C⁺ NK Cell Subset Is Triggered by CMV-Infected EC

We have previously shown [18] that in accordance with the low expression of HLA-E on CMV-infected MDDC, CMV-infected MDDC weakly triggered NKG2C⁺ NK cell degranulation, in contrast to its KIR2D⁺ NK cell counterpart. We therefore evaluated the degranu-

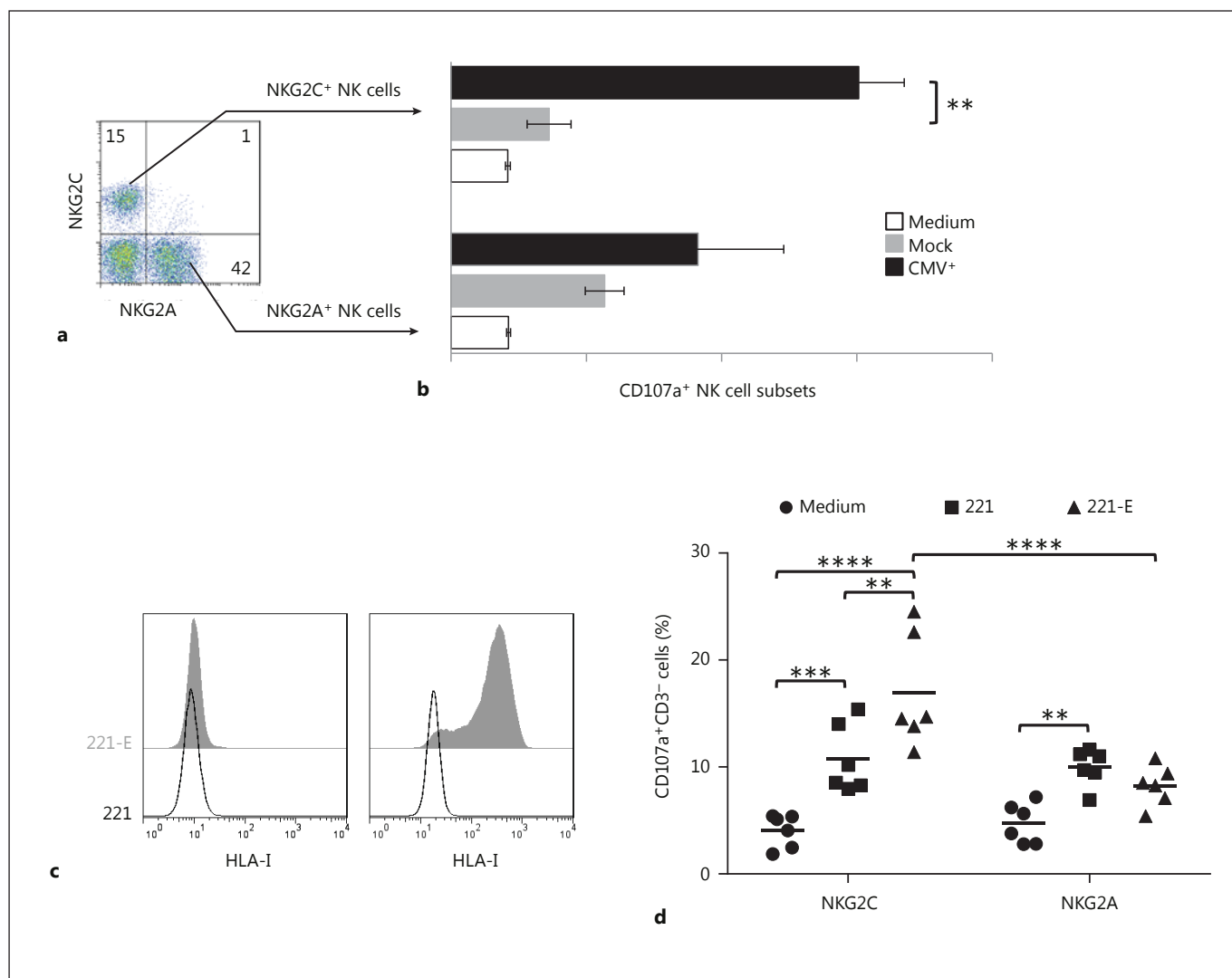


Fig. 2. CMV-infected EC triggered the degranulation of the NKG2C⁺ NK cell subset. **a** Density plot illustrating NKG2C⁺ NKG2A⁻ and NKG2C⁻ NKG2A⁺ NK cell subsets targeted with a combination of NKG2C- and NKG2A-specific monoclonal Abs in CD3⁻ cell population from ex vivo PBMC of CMV⁺ individuals. **b** Frequency of NKG2A⁺ and NKG2C⁺CD3⁻ cell subsets expressing CD107a after 5 h of incubation with mock- or CMV-infected EC at an effector:target ratio of 50:1. Results are shown as mean $\pm$ SEM of 4 independent experiments. **c** Histograms showing an

overlay of HLA class I (HLA-I, left) and HLA-E (right) expression on 221 and 221-E cell lines determined by flow cytometry using HLA-I- and HLA-E-specific monoclonal Abs. **d** Dot representation of CD107a⁺CD3⁻ cell frequencies in NKG2C⁺ NKG2A⁻ and NKG2C⁻ NKG2A⁺ cell subsets after incubation with medium, 221 and HLA-E⁺ 221 cells for 6 independent experiments. Statistical significance (** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$) between both groups was determined using ANOVA.

lation of NKG2C⁺ NK after stimulation with CMV-infected EC on which HLA-E expression is maintained after 48 h of CMV infection. For this, using flow cytometry, we gated on NKG2C⁺ NKG2A⁻ and NKG2C⁻ NKG2A⁺ NK cell subsets from the PBMC of patients presenting an expansion of NKG2C⁺ NK cells in the peripheral blood (fig. 2a). Indeed, NKG2C associated with CD94 recog-

nizes HLA-E, as does its inhibitory counterpart NKG2A. Thus, the discrimination between NKG2A and NKG2C allows us to compare their impact on NK cell response to stimulation with HLA-E⁺ target cells. Of note, we observed an exclusive expression of NKG2A or NKG2C on NK cells and a very small frequency of NK cells expressing both markers. The degranulation of both NKG2A⁺ and

NKG2C⁺ NK cell subsets was determined by measuring the frequency of CD107a⁺ cells after incubation with mock- or CMV-infected EC. CMV-infected EC significantly triggered NKG2C⁺ NK cell subset (a mean of $7.25 \pm 1.4\%$ with EC and $30.1 \pm 6.3\%$ with CMV⁺ EC; $p = 0.01$) and triggered, to a lesser extent, the NKG2A⁺ NK cell subset (a mean of $11.35 \pm 1.6\%$ with EC and $18.25 \pm 3.3\%$ with CMV⁺ EC; n.s.; fig. 2b). In order to validate the assumption that NKG2C⁺ and NKG2A⁺ NK cell subsets are respectively activated and inhibited by HLA-E⁺ target cells, we evaluated their degranulation against the HLA class I-deficient cell line, 721.221 (221) and the HLA-E-expressing 221 cell line (221-E) (fig. 2c). In this setup, the degranulation of NKG2C⁺ NK cells was significantly enhanced by HLA-E expression on 221-E target cells, underlying the functional impact of this triggering interaction (fig. 2d). In parallel, HLA-E expression on 221-E target cells weakly inhibited NKG2A⁺ NK cell degranulation. Thus, the CMV-infected EC which maintained an expression level of membrane HLA-E after 48 h of CMV infection significantly triggered NKG2C⁺(NKG2A⁻) NK cells.

KIR Inhibition of NKG2C⁺ NK Cell Degranulation against CMV-Infected EC

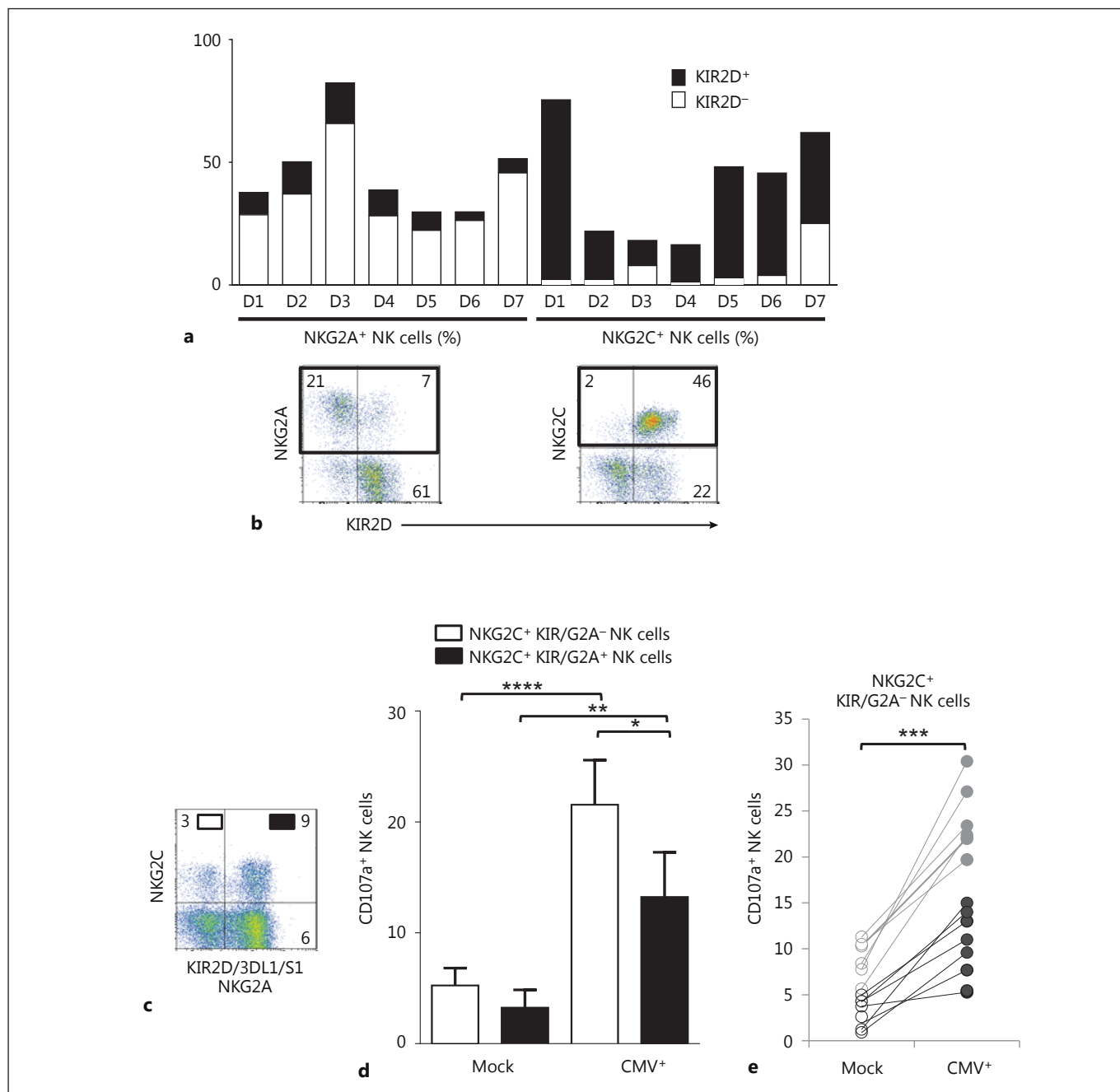
Like other study groups [13, 28], we have shown that NKG2C is mainly coexpressed with inhibitory KIR on NK cells [18]. Indeed, KIR2D (KIR2DL1/S1, KIR2DL2/3/2DS2) are mainly coexpressed with NKG2C, and slightly with NKG2A on NK cells from CMV⁺ individuals with peripheral blood NKG2C⁺ NK cell expansion (fig. 3a) as illustrated for 1 representative CMV⁺ individual (fig. 3b). To further evaluate the impact of KIR on NKG2C⁺ NK cells in our CMV⁺ EC model, we focused on the NKG2C⁺KIR2D/3DL1/S1/NKG2A⁻ (named NKG2C⁺KIR/NKG2A⁻) NK cell subset in comparison to NKG2C⁺KIR/NKG2A⁺ NK cell subsets from ex vivo CMV⁺ PBMC (fig. 3c). Of note, the NKG2C⁺KIR/NKG2A⁺ population is mainly made up of the NKG2C⁺KIR⁺ NK cell subset as NKG2C and NKG2A were not coexpressed in all studied individuals (fig. 2a). Although both NK cell subsets present a similar degranulation pattern against K562 (data not shown) and mock-infected EC, KIR expression on NKG2C⁺ NK cells significantly limited the degranulation against CMV⁺ EC (mean of 13 ± 1.4) in comparison to the NKG2C⁺KIR/NKG2A⁻ NK cell subset (a mean of 22 ± 4 ; $p = 0.03$; fig. 3d). Of note, HLA class I expression decreased on CMV-infected EC, but remaining levels were high enough to ensure the functional engagement of inhibitory KIR. Moreover, HLA class I expression increased on CMV-exposed but

uninfected EC (IE1⁻) (fig. 1b). As around 50% of EC were infected in our culture, the increased expression of HLA class I molecules on CMV-exposed EC (IE1⁻) may contribute to inhibit NK cell activation via HLA-specific inhibitory KIR. The NKG2C⁺KIR/NKG2A⁻ NK cell degranulation was significantly increased by CMV-infected EC compared to mock-infected cells (a respective mean of 22 ± 4 and $5.3 \pm 1.6\%$, $p < 0.0001$) at an effector:target ratio of 50:1, and remained significantly increased at 10:1 ($p = 0.0002$) (fig. 3e). Finally, we studied the phenotype of the NKG2C⁺ NK cell subset in comparison to the NKG2A⁺ NK cell subset in focusing on inhibitory ILT2 and activating NK receptors like DNAM-1 (DNAX accessory molecule-1), NKR1A (CD161), 2B4 (CD244) and CD16, known to modulate NK cell functions (online suppl. fig. 1; www.karger.com/doi/10.1159/000445320). All activating DNAM-1, CD161, 2B4 and CD16 were similarly expressed on the NKG2C⁺ and NKG2A⁺ NK cell subsets. However, inhibitory ILT2 was expressed on all NKG2C⁺ NK cell subsets but not on the NKG2A⁺ NK cell subset. CMV escapes to ILT2⁺ NK cell recognition via the UL18 protein which mimics HLA class I molecules [5]. Depending on the time point during the CMV replicative cycle, ILT2 interaction with UL18 protein may contribute to inhibiting NKG2C⁺ NK cell functions. Overall, KIR expressed on a high proportion of NKG2C⁺ NK cells modulates NKG2C⁺ NK cell functional abilities against CMV-infected EC.

EC Triggered NKG2C⁺ NK Cell Degranulation

Regardless of the Nature of the HLA-E Allele Product

HLA-E, as with other unclassic HLA class I molecules, is characterized by a poor allelic polymorphism. Indeed, only 17 alleles and 6 corresponding proteins have been reported (<http://www.ebi.ac.uk/ipd/imgt/hla>) [29]. However, it has been previously described that the membrane stability of the HLA-E molecule can depend on the nature of the HLA-E allele [30, 31]. Moreover, the impact of the HLA-E polymorphism on effector cell function expressing the HLA-E receptor is poorly documented. Thus, we evaluated the expression of the more frequent HLA-E*01:01 and HLA-E*01:03 allele products (<http://www.allelefrequencies.net>) [32] on mock- and CMV-infected EC. On CMV-infected cells (HLA^{low}), despite a strong downregulation of HLA class I expression, this was maintained at a similar level to those observed on mock-infected cells, regardless of the nature of HLA-E allele product (fig. 4a). Interestingly, the expression of HLA-E and classic HLA class I was upregulated on CMV-exposed but uninfected EC (HLA^{high}) (fig. 4b) as previ-



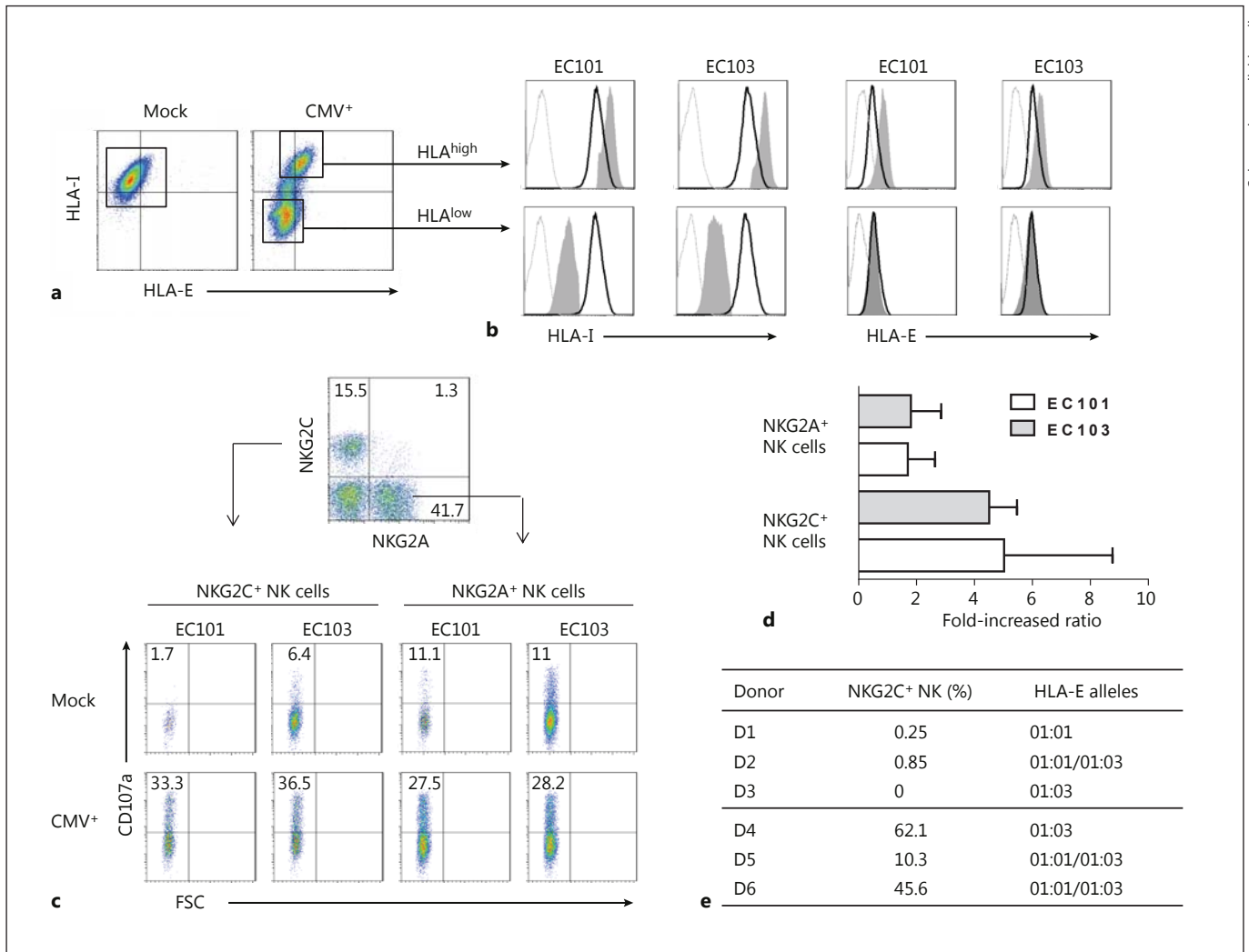


Fig. 4. NKG2C⁺ NK cell degranulation is triggered by CMV-infected EC regardless of the HLA-E allele product. **a** Density plots illustrating the staining of mock- and CMV-infected EC with HLA class I (HLA-I)-specific and HLA-E-specific monoclonal Abs. **b** HLA expression was determined on mock- (heavy black line) and CMV-infected HLA-E*01:01 homozygous EC (EC101) and HLA-E*01:03 homozygous EC (EC103). Mock-infected (black line) and CMV+ EC (filled grey) were targeted, respectively, following their high and low HLA-I level expression (defined in fig. 1a). Isotype IgG control was included (grey line). **c** Density plot

illustrating NKG2A⁺ and NKG2C⁺ NK cell degranulation (CD107a %) after stimulation with mock and CMV-infected EC101 or EC103 cell lines. **d** CD107a⁺ NK cell frequency fold induction (percentage of CD107a⁺ NK cells observed against CMV+ EC/percentage of CD107a⁺ NK cells observed against mock-infected EC) determined for 6 experiments. **e** Nature of HLA-E alleles in 6 CMV+ individuals with or without NKG2C⁺ NK cell expansion. The percentage of NKG2C⁺ NK cells without an NK cell population (CD3- CD56⁺) is indicated.

ously described [18, 33] regardless of the nature of the HLA-E allele product. Cytokines produced by CMV-infected cells such as type 1 IFN seems to contribute to this effect. In accordance with the HLA-E phenotype of CMV-infected EC (EC101 and EC103), NKG2C⁺ NK cell degranulation was strongly triggered by both CMV-infected primary EC (EC101 and EC103) (fig. 4c: a repre-

sentative experiment; fig. 4d: a summary) with the fold-increased ratio of CD107a⁺ NK cells observed with CMV-infected EC. Lastly, the CMV+ individuals with an NKG2C⁺ NK expansion in their NK cell repertoire did not harbor a specific HLA-E allele product as documented in 6 CMV seropositive individuals with or without NKG2C⁺ NK cell expansion (fig. 4e).

Discussion

EC constitutively express the nonclassic HLA-E molecule, are ubiquitously present in the blood circulatory system and are therefore continually exposed to circulating NK cells. We set up an *in vitro* model using CMV-infected primary EC isolated from kidney transplant donors. We then explored the modulation of HLA class I molecule expression on CMV-infected EC and sought to determine whether NKG2C⁺ NK cells can mount an effector response against these CMV-infected cells. We showed that HLA class I expression was strongly reduced on EC but that little or no change was observed in HLA-E level expression. Our results corroborate those obtained by Odeberg et al. [34], showing a disparity in HLA class I modulation by CMV infection on macrophages and EC. Moreover, a reduced HLA-E expression can be observed following prolonged infections, which is probably due to miRNA editing which results in the downregulation of HLA-E [35].

The majority of studies measuring CMV evasion strategies have been determined using transfected cells and CMV-infected immortalized fibroblast strains. Overall, it is difficult to evaluate the hierarchy and kinetics of the different interactions involved in the engagement of CMV-infected target cells and NK cells. This issue seems to be strongly dependent on the nature of the infected cells and their own cellular machinery. Indeed, after 48 h of infection with the endotheliotropic VHL/E strain, we observed some obvious differences in HLA expression patterns (i.e. in MDDC and EC) that were cell type-dependent.

It has been previously shown that HLA-E expression is maintained on CMV-infected fibroblasts, thus facilitating their escape from CD94/NKG2A⁺ NK-mediated cell lysis [36]. Recently, different study groups have highlighted the strong association of NKG2C⁺ NK cells with CMV infection, suggesting an activation of this population during acute CMV infection [15, 37]. Using CMV-infected MDDC, we were not able to demonstrate a contribution of NKG2C⁺ NK cells in controlling CMV infection, due to the weak HLA-E expression on infected MDDC; however, in this MDDC model, we showed that KIR2DL⁺ NK cells are involved in the control of CMV infection [18]. New insights have been provided into the shaping of the NK cell repertoire by CMV infection; nonetheless, many questions remain concerning the cell/CMV location that drives and maintains the 'memory'-like NKG2C⁺ NK cell subset. We demonstrated the contribution of NKG2C⁺ NK cells in measuring their degranulation after stimula-

tion with CMV-infected EC on which HLA-E expression is maintained after 48 h of CMV infection. Interestingly, NKG2C⁺KIR⁻ NK cells were more significantly triggered than NKG2C⁺KIR⁺ NK cells against CMV-infected EC, suggesting an inhibitory impact of KIR on NKG2C⁺ NK cell functional abilities. Of note, our study presents some technical limitations that should be considered for a balanced interpretation of the results. Indeed, the whole population of CMV-exposed EC contained both IE1⁺ and IE1⁻ cells. The nuclear localization of IE1 in CMV-infected EC did not allow us to sort the IE1⁺ cells.

It is probably true that the sum of molecular events, including CMV immunoevasins and UL40 kinetic expression, basal HLA class I level expression, HLA polymorphism (i.e. MICA) and the general cellular machinery, results in different HLA phenotypic patterns of CMV-infected cells. This is very important, since it would explain that the nature of the infected cells can drive the HLA-specific receptor phenotype of NK cells that mount a response to control CMV infection. It explains, in part, the dichotomy observed in CMV⁺ healthy individuals for whom the NK cell repertoire is marked either by an NKG2C phenotype or activating KIR expansion [13]. Recently, Rölle et al. [19] have shown that HLA-E contributes in controlling CMV-driven NKG2C⁺ NK cell expansion. In line with this, we hypothesized that NKG2C⁺ NK cell expansion can be driven preferentially by highly expressed HLA-E⁺ on CMV-infected cells as EC, which are predominantly present in vessels. In contrast, MDDC do not express HLA-E after CMV infection and would be more likely to mount a KIR⁺ NK cell response. Furthermore, both viral and cellular polymorphisms contribute to drive the immune response in CMV⁺ individuals. Thus, it is conceivable that different CMV strain infections may differ in their cytopathic effects based on EC viral genetic determinants [38]. In this study, we showed that in contrast to MDDC, CMV-infected primary EC significantly trigger NKG2C⁺ NK cells regardless of the nature of HLA-E allele product, suggesting that EC may constitute a privileged site for CMV infection that drives a 'memory' NKG2C⁺ NK cell subset. It is conceivable that this 'memory'-like NK cell subset is maintained life-long, due to a continuous EC CMV replication which is balanced by host immune responses. As previously demonstrated, soluble factors like IL-12 appear essential for driving the expansion of an NKG2C⁺ NK cell subset [19, 39]. CMV seems to establish a persistent noncytopathic infection in aortic EC, suggesting that EC can represent a potential infection site for latency [40]. Moreover, the primary EC used in this study were unmanipulated cells iso-

lated from donor grafts. They constitute an interesting CMV cell target, allowing improved knowledge of the NK cell subsets which efficiently control this infection. In the context of kidney transplantation, our data raise the question of whether, in CMV⁺ patients with peripherally expanded NKG2C⁺ NK cells, CMV reactivation could be efficiently controlled in the EC of a kidney graft.

Acknowledgments

We are grateful to all the blood donors for participating in this study. We thank Britt House (France) for help with editing. This work was financially supported by the EFS Pays de la Loire, Leucémie Espoir Atlantique Famille (LEAF) and by grants from the 'Etablissement Français du Sang 2010-06' and NAGMO. Z.D. is a

PhD student supported by a CIFRE grant (No. 447/2011). R.R. is a PhD student supported by the Région des Pays de la Loire (ARMINA project). This work was realized in the context of the IHU-Cesti, LabEx IGO and LabEx Transplantex projects, which received French government financial support managed by the National Research Agency (ANR) via the 'Investment into the Future' programs ANR-10-IBHU-005, ANR-11-LABX-0016-01 and ANR-11-LABX-0070. The IHU-Cesti project is also supported by the Nantes metropole and the Pays de la Loire region. This study was also supported by the 'Fondation Centaure' (RTRS) which supports a French transplantation research network.

Disclosure Statement

The authors declare no financial or commercial conflicts of interest.

References

- 1 Biron CA, Byron KS, Sullivan JL: Severe herpesvirus infections in an adolescent without natural killer cells. *N Engl J Med* 1989;320:1731–1735.
- 2 Orange JS: Human natural killer cell deficiencies and susceptibility to infection. *Microbes Infect Inst Pasteur* 2002;4:1545–1558.
- 3 Sansoni P, Vescovini R, Fagnoni FF, Akbar A, Arens R, Chiu Y-L, et al: New advances in CMV and immunosenescence. *Exp Gerontol* 2014;55:54–62.
- 4 Wilkinson GWG, Tomasec P, Stanton RJ, Armstrong M, Prod'homme V, Aicheler R, et al: Modulation of natural killer cells by human cytomegalovirus. *J Clin Virol* 2008;41:206–212.
- 5 Beck S, Barrell BG: Human cytomegalovirus encodes a glycoprotein homologous to MHC class-I antigens. *Nature* 1988;331:269–272.
- 6 Braud VM, Allan DS, O'Callaghan CA, Söderström K, D'Andrea A, Ogg GS, et al: HLA-E binds to natural killer cell receptors CD94/NKG2A, B and C. *Nature* 1998;391:795–799.
- 7 Tomasec P, Braud VM, Rickards C, Powell MB, McSharry BP, Gadola S, et al: Surface expression of HLA-E, an inhibitor of natural killer cells, enhanced by human cytomegalovirus gpUL40. *Science* 2000;287:1031.
- 8 Chalupny NJ, Rein-Weston A, Dosch S, Cosman D: Down-regulation of the NKG2D ligand MICA by the human cytomegalovirus glycoprotein UL142. *Biochem Biophys Res Commun* 2006;346:175–181.
- 9 Cosman D, Müllberg J, Sutherland CL, Chin W, Armitage R, Fanslow W, et al: ULBPs, novel MHC class I-related molecules, bind to CMV glycoprotein UL16 and stimulate NK cytotoxicity through the NKG2D receptor. *Immunity* 2001;14:123–133.
- 10 Fielding CA, Aicheler R, Stanton RJ, Wang EY, Han S, Seirafian S, et al: Two novel human cytomegalovirus NK cell evasion functions target MICA for lysosomal degradation. *PLoS Pathog* 2014;10:e1004058.
- 11 Nachmani D, Lankry D, Wolf DG, Mandelboim O: The human cytomegalovirus microRNA miR-UL112 acts synergistically with a cellular microRNA to escape immune elimination. *Nat Immunol* 2010;11:806–813.
- 12 Nachmani D, Gutschner T, Reches A, Diedrichs S, Mandelboim O: RNA-binding proteins regulate the expression of the immune activating ligand MICB. *Nat Commun* 2014;5:4186.
- 13 Béziat V, Liu LL, Malmberg J-A, Ivarsson MA, Sohlberg E, Björklund AT, et al: NK cell responses to cytomegalovirus infection lead to stable imprints in the human KIR repertoire and involve activating KIRs. *Blood* 2013;121:2678–2688.
- 14 Gumá M, Angulo A, Vilches C, Gómez-Lozano N, Malats N, López-Botet M: Imprint of human cytomegalovirus infection on the NK cell receptor repertoire. *Blood* 2004;104:3664–3671.
- 15 Gumá M, Budt M, Sáez A, Brckalo T, Hengel H, Angulo A, et al: Expansion of CD94/NKG2C⁺ NK cells in response to human cytomegalovirus-infected fibroblasts. *Blood* 2006;107:3624–3631.
- 16 Lopez-Vergès S, Milush JM, Schwartz BS, Pando MJ, Jarjoura J, York VA, et al: Expansion of a unique CD57⁺NKG2Chi natural killer cell subset during acute human cytomegalovirus infection. *Proc Natl Acad Sci USA* 2011;108:14725–14732.
- 17 Lanier LL, Corliss B, Wu J, Phillips JH: Association of DAP12 with activating CD94/NKG2C NK cell receptors. *Immunity* 1998;8:693–701.
- 18 Djaoud Z, David G, Bressollette C, Willem C, Rettman P, Gagne K, et al: Amplified NKG2C⁺ NK cells in cytomegalovirus (CMV) infection preferentially express killer cell Ig-like receptor 2DL: functional impact in controlling CMV-infected dendritic cells. *J Immunol* 2013;191:2708–2716.
- 19 Rölle A, Pollmann J, Ewen E-M, Le VTK, Halenius A, Hengel H, et al: IL-12-producing monocytes and HLA-E control HCMV-driven NKG2C⁺ NK cell expansion. *J Clin Invest* 2014;124:5305–5316.
- 20 Jarvis MA, Nelson JA: Human cytomegalovirus tropism for endothelial cells: not all endothelial cells are created equal. *J Virol* 2007;81:2095–2101.
- 21 Coupel S, Leboeuf F, Bouliday G, Soullou J-P, Charreau B: RhoA activation mediates phosphatidylinositol 3-kinase-dependent proliferation of human vascular endothelial cells: an alloimmune mechanism of chronic allograft nephropathy. *J Am Soc Nephrol* 2004;15:2429–2439.
- 22 Tonnerre P, Gérard N, Chatelais M, Poli C, Allard S, Cury S, et al: MICA variant promotes allosensitization after kidney transplantation. *J Am Soc Nephrol* 2013;24:954–966.
- 23 Repnik U, Knezevic M, Jeras M: Simple and cost-effective isolation of monocytes from buffy coats. *J Immunol Methods* 2003;278:283–292.
- 24 Garrett JS, Narus JC, Bohnsack JF, Carling DE, Grieves KG, Waldman WJ, et al: Effects of cytomegalovirus infection on growth factor production in endothelial cells and fibroblasts. *Pediatr Res* 1995;38:1003–1008.

- 25 David G, Morvan M, Gagne K, Kerdudou N, Willem C, Devys A, et al: Discrimination between the main activating and inhibitory killer cell immunoglobulin-like receptor positive natural killer cell subsets using newly characterized monoclonal antibodies. *Immunology* 2009;128:172–184.
- 26 Navenot JM, Merghoub T, Ducrocq R, Muller JY, Krishnamoorthy R, Blanchard D: New method for quantitative determination of fetal hemoglobin-containing red blood cells by flow cytometry: application to sickle-cell disease. *Cytometry* 1998;32:186–190.
- 27 Heatley SL, Pietra G, Lin J, Widjaja JML, Harpur CM, Lester S, et al: Polymorphism in human cytomegalovirus UL40 impacts on recognition of human leukocyte antigen-E (HLA-E) by natural killer cells. *J Biol Chem* 2013;288:8679–8690.
- 28 Béziat V, Dalgard O, Asselah T, Halfon P, Bedossa P, Boudifa A, et al: CMV drives clonal expansion of NKG2C⁺ NK cells expressing self-specific KIRs in chronic hepatitis patients. *Eur J Immunol* 2012;42:447–457.
- 29 Robinson J, Halliwell JA, McWilliam H, Lopez R, Parham P, Marsh SGE: The IMGT/HLA database. *Nucleic Acids Res* 2013;41:D1222–D1227.
- 30 Strong RK, Holmes MA, Li P, Braun L, Lee N, Geraghty DE: HLA-E allelic variants. Correlating differential expression, peptide affinities, crystal structures, and thermal stabilities. *J Biol Chem* 2003;278:5082–5090.
- 31 Lauterbach N, Wieten L, Popeijus HE, Vanderlocht J, van Zon PMH, Voorter CEM, et al: Peptide-induced HLA-E expression in human PBMCs is dependent on peptide sequence and the HLA-E genotype. *Tissue Antigens* 2015;85:242–251.
- 32 Gonzalez-Galarza FF, Christmas S, Middleton D, Jones AR: Allele frequency net: a database and online repository for immune gene frequencies in worldwide populations. *Nucleic Acids Res* 2011;39:D913–D919.
- 33 Moutaftsi M, Mehl AM, Borysiewicz LK, Tabi Z: Human cytomegalovirus inhibits maturation and impairs function of monocyte-derived dendritic cells. *Blood* 2002;99:2913–2921.
- 34 Odeberg J, Cerboni C, Browne H, Kärre K, Möller E, Carbone E, et al: Human cytomegalovirus (HCMV)-infected endothelial cells and macrophages are less susceptible to natural killer lysis independent of the downregulation of classical HLA class I molecules or expression of the HCMV class I homologue, UL18. *Scand J Immunol* 2002;55:149–161.
- 35 Nachmani D, Zimmermann A, Oiknine Djian E, Weisblum Y, Livneh Y, Khanh Le VT, et al: MicroRNA editing facilitates immune elimination of HCMV infected cells. *PLoS Pathog* 2014;10:e1003963.
- 36 Wang ECY, McSharry B, Retiere C, Tomasec P, Williams S, Borysiewicz LK, et al: UL40-mediated NK evasion during productive infection with human cytomegalovirus. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002;99:7570–7575.
- 37 Gumá M, Cabrera C, Erkizia I, Bofill M, Clotet B, Ruiz L, et al: Human cytomegalovirus infection is associated with increased proportions of NK cells that express the CD94/NKG2C receptor in aviremic HIV-1-positive patients. *J Infect Dis* 2006;194:38–41.
- 38 Kahl M, Siegel-Axel D, Stenglein S, Jahn G, Sinzger C: Efficient lytic infection of human arterial endothelial cells by human cytomegalovirus strains. *J Virol* 2000;74:7628–7635.
- 39 O'Sullivan TE, Sun JC: Generation of natural killer cell memory during viral infection. *J Innate Immun* 2015;7:557–562.
- 40 Ricotta D, Alessandri G, Pollara C, Fiorentini S, Favilli F, Tosetti M, et al: Adult human heart microvascular endothelial cells are permissive for non-lytic infection by human cytomegalovirus. *Cardiovasc Res* 2001;49:440–448.

RESULTATS

PROJET N°2 : La réponse lymphocytaire mise en place au cours de la primo-infection symptomatique à CMV chez l'adulte immunocompétent

Severe symptomatic primary HCMV infection despite effective innate and adaptive immune responses

Raphaëlle Riou, Céline Bressollette-Bodin, David Boutoille, Katia Gagne, Audrey Rodallec, Maeva Lefebvre, François Raffi, David Senitzer, Berthe-Marie Imbert-Marcille, Christelle Retière

Soumis

La réponse lymphocytaire mise en place au cours de la primo-infection symptomatique à CMV chez l'adulte immunocompétent

La primo-infection à CMV chez le sujet sain est généralement bien tolérée, n'occasionnant que peu ou pas de symptômes. Malgré le contrôle de l'infection par le système immunitaire, celui-ci ne parvient cependant pas à éradiquer le virus de l'organisme, qui persiste à vie chez l'hôte. Le cycle viral alterne entre des phases de réplication virale active et des phases de latence, sans que les mécanismes qui les gouvernent ne soient encore bien définis. La primo-infection ou la réactivation du CMV demeurent cependant un problème de santé publique, puisqu'elles sont associées à une forte morbidité et mortalité chez les patients dont le système immunitaire est affaibli, notamment chez les patients coinfecteds par le VIH et les patients transplantés. De plus, l'infection à CMV persiste en tant que réelle menace pour le fœtus lorsqu'elle est contractée au cours de la grossesse.

Bien que la réponse immunitaire au CMV soit relativement bien documentée dans les contextes physiopathologiques que constituent la greffe ou la transmission materno-fœtale, peu de données sont disponibles quant à l'infection primaire chez le sujet immunocompétent. Cependant, malgré la rareté ou la faible sévérité des manifestations symptomatiques de la primo-infection à CMV chez l'individu immunocompétent, de nombreuses descriptions de cas cliniques de sévérité variable sont disponibles dans la littérature. A notre connaissance, une seule étude, basée sur l'environnement KIR/HLA, aborde le statut immunologique de l'hôte qui pourrait contribuer à l'apparition de symptômes lors de la primo-infection à CMV chez l'adulte sain (Di Bona *et al.*, 2014).

C'est dans ce contexte que notre équipe, en collaboration avec le service des maladies infectieuses et tropicales et du laboratoire de virologie du CHU de Nantes, a constitué une

biothèque à partir d'une cohorte rare de 20 patients immunocompétents admis au CHU pour une primo-infection à CMV symptomatique (*Primary HCMV-infected patients*, PHIP). L'objectif a été de tenter d'identifier les mécanismes moléculaires ou cellulaires à l'origine de l'apparition d'une primo-infection symptomatique. Les manifestations cliniques observées chez ces patients nous ont d'abord conduites à émettre l'hypothèse d'un dysfonctionnement dans la réponse immunitaire qui retarde le bon contrôle de l'infection. En parallèle, nous avons formulé une seconde hypothèse selon laquelle le polymorphisme génétique viral pourrait aussi être associé à une virulence particulière, notamment *via* des mécanismes d'immunosubversion. Cette dernière a fait l'objet d'un travail préliminaire exposé dans le projet n°3.

Les patients intégrés dans notre cohorte présentent un tableau clinique varié, de plus ou moins forte sévérité. Outre un syndrome fébrile et une altération de l'état général observé chez les patients, certaines atteintes tissulaires et manifestations auto-immunes à risque ont été reportées. La primo-infection contractée par ces patients a conduit à leur hospitalisation dans la plupart des cas. Ces patients sont considérés comme immunocompétents du fait de leur histoire clinique sans antécédents de troubles immunologiques.

Nous avons vu précédemment que l'infection à CMV mobilise particulièrement le système immunitaire tant inné qu'adaptatif. Au sein du compartiment NK, la sous-population NK NKG2C⁺ de phénotype mature et qui exprime des récepteurs KIR2D spécifiques du soi est préférentiellement amplifiée chez les individus séropositifs pour le CMV par comparaison aux individus séronégatifs. Les lymphocytes T $\gamma\delta$ sont marqués par l'expansion d'une sous-population V δ 2-. Les lymphocytes T CD8 spécifiques du CMV sont fortement amplifiés et acquièrent un phénotype de différenciation tardif qui pourrait être associé à l'immunosénescence. Afin d'explorer la qualité de la réponse immunitaire mise en place chez les PHIP, nous avons analysé le phénotype de ces effecteurs immuns et nous l'avons comparé

à celui d'individus contrôles séronégatifs ou séropositifs pour le CMV. Une forte lymphocytose, constatée à l'hémogramme et confirmée par le calcul en nombre absolu, est observée chez les PHIP, qui touche aussi bien les cellules NK que les lymphocytes T $\alpha\beta$ et T $\gamma\delta$. Nous avons ensuite confirmé l'amplification précoce de la sous-population NK NKG2C⁺ et T $\gamma\delta$ V δ_2 - chez les PHIP. Le potentiel fonctionnel des cellules NK des PHIP, en réponse à la reconnaissance du soi manquant ou à l'ADCC *in vitro*, est similaire à celui rencontré dans les cohortes contrôles. La réponse lymphocytaire T CD8⁺ se met également en place chez les PHIP. De façon intéressante, nous n'avons rapporté aucun dysfonctionnement apparent parmi les populations lymphocytaires observées mais un phénotype de différenciation précoce qui évolue vers un statut de maturation tardive à distance de l'épisode aiguë de l'infection.

L'étude phénotypique des lymphocytes périphériques réalisée par cytométrie en flux nous a permis d'évaluer l'expression membranaire des principaux récepteurs lymphocytaires impliqués dans la réponse immunitaire. Cependant, cette approche est restreinte à un nombre limité de protéines et ne permet pas d'avoir une évaluation large de l'expression génique associée aux réponses immunitaires mais aussi à d'autres fonctions cellulaires. Par conséquent, en collaboration avec la plateforme génomique de Nantes dirigée par le Dr Richard Redon, nos données cellulaires ont été renforcées par l'analyse du profil transcriptomique des lymphocytes circulants des PHIP par comparaison aux cohortes contrôles. Le profil d'expression génique des PHIP suggère l'activation des gènes impliqués dans l'immunité et surtout l'immunité adaptative.

En parallèle, nous avons mené une étude immunogénétique des combinaisons KIR/HLA présentes chez les PHIP. Les polymorphismes KIR et HLA sont très vastes et sont associés à différentes pathologies et infections virales. Certaines interactions ont été décrites comme favorables ou défavorables au contrôle de l'infection à CMV. L'équipe de Di Bona *et*

al. a d'ailleurs récemment rapporté l'association de la présence du génotype KIR AA ou du motif Bw4 au développement d'une primo-infection symptomatique chez l'adulte immunocompétent. Il s'agit, à notre connaissance, de la seule étude conduite dans une telle cohorte. Nos résultats ne nous ont cependant pas permis de confirmer cette association.

Finalement, les résultats de cette étude devraient contribuer à une meilleure compréhension de la réponse lymphocytaire qui s'installe chez l'adulte sain lors de la primo-infection par le CMV. Il s'agit des premiers éléments immunologiques disponibles dans un tel contexte. L'absence de défaut dans la réponse immunitaire explorée nous a conduites à nous interroger quant à la virulence des souches cliniques de CMV impliquées, bien qu'un dysfonctionnement ciblant d'autres effecteurs immuns, tels que les monocytes ou les cellules dendritiques, ne peut être exclu. Cependant, l'histoire naturelle des patients ne corrobore pas la présence d'un déficit immunitaire, soutenant l'hypothèse d'une potentielle variabilité génétique virale responsable d'une réponse immunitaire retardée favorable à l'apparition d'un tableau clinique sévère.

Severe symptomatic primary HCMV infection despite effective innate and adaptive immune responses

Raphaëlle Riou^{ab}, Céline Bressollette-Bodin^{bc}, David Boutoille^d, Katia Gagne^{abef}, Audrey Rodallec^{bd}, Maeva Lefebvre^d, François Raffi^{bd}, David Senitzer^g, Berthe-Marie Imbert-Marcille^{bc}, Christelle Retière^{ab#}

^aEtablissement Français du Sang, Nantes, France ; ^bEquipe d'Accueil 4271, ImmunoVirologie et Polymorphisme Génétique, Université de Nantes, France ; ^cService de Virologie, Centre Hospitalo-Universitaire Hôtel-Dieu, Nantes, France ; ^dService des Maladies Infectieuses et Tropicales, Centre Hospitalo-Universitaire Hôtel-Dieu, Nantes, France ; ^eLaboratoire d'Histocompatibilité et d'Immunogénétique, EFS Nantes, France ; ^fLabEx Transplantex, Université de Strasbourg, France; ^gDivision of Hematology and Bone Marrow Transplantation, City of Hope, National Medical Center, Duarte, CA, USA.

Running head: Immune responses to primary symptomatic HCMV infection

#Address correspondence to Dr Christelle Retière, christelle.retiere@efs.sante.fr.

ABSTRACT

Primary human cytomegalovirus (HCMV) infection usually goes unnoticed, causing mild or no symptoms in immunocompetent individuals. Some rare severe clinical cases have however been reported without investigation of host immune responses or viral virulence. In this present study, we investigate, for the first time, phenotypic and functional features together with gene expression profiles in immunocompetent adults experiencing a severe primary HCMV infection. Twenty PHIP were enrolled as well as 26 HCMV-seronegative and 39 HCMV-seropositive healthy controls. PHIP had a huge lymphocytosis marked by massive expansion of NK and T cell compartments. Interestingly, PHIP mounted efficient innate and adaptive immune responses with a deep HCMV imprint, revealed mainly by the expansion of NKG2C⁺ NK cells, CD16⁺ Vδ₂- γδ T cells and conventional HCMV-specific CD8⁺ T cells. The main effector lymphocytes were activated and displayed an early immune phenotype that developed toward a more mature differentiated status. This extensive study shows that during the symptomatic stage of acute HCMV infection, PHIP mounted appropriate immune responses that did not efficiently limit lytic viral replication associated with serious disease. Taken together, these findings bring new insights into the comprehensive understanding of immune mechanisms involved during primary HCMV-infection in immunocompetent individuals.

1 **IMPORTANCE**

2 HCMV specific immune responses have been extensively documented in
3 immunocompromised patients and during *in utero* acquisition. While it usually goes
4 unnoticed, some rare severe clinical cases of primary HCMV-infection have been reported in
5 immunocompetent patients. However, host immune responses or HCMV virulence in these
6 patients have not been so far investigated. In this present study, we show a massive expansion
7 of NK and T cell compartments during the symptomatic stage of acute HCMV infection. The
8 patients mounted efficient innate and adaptive immune responses with a deep HCMV imprint
9 that did not efficiently limit lytic viral replication associated with serious disease. The
10 massive lymphocytosis could be the result of non-adapted or not controlled immune responses
11 limiting the effectiveness of specific mounted responses. Furthermore, we cannot exclude that
12 the apparition of symptoms could be also the consequence of a delayed immune response
13 caused by HCMV strains particularly involved in immune escape.

1 INTRODUCTION

2 Human cytomegalovirus (HCMV) is a member of the β -herpesvirus sub-family and is
3 prevalent worldwide. Following primary infection HCMV establishes latency, thereby
4 exerting a life-long influence on the host immune system (1). With the exception of a
5 mononucleosis-like syndrome, it is generally believed that HCMV does not cause disease in
6 immunocompetent individuals. However, in a context of immunosuppression or acquisition in
7 early life, HCMV infection is associated with high mortality and morbidity rates (2). The host
8 immune response features described following HCMV primary infection or reactivation have
9 mostly been described in the context of hematopoietic stem cell or solid organ transplantation,
10 acquisition during fetal development or in early life.

11 Following primary infection, HCMV replicates and disseminates concomitantly with the
12 development of a robust immune response involving Natural Killer (NK) cells, neutralizing
13 antibodies, $\gamma\delta$ T cells and a high frequency of HCMV-specific $CD4^+$ and $CD8^+$ T cells.
14 Coordinated innate and adaptive immune responses lead to the control of viral replication and
15 to the resolution of the infection. NK cells constitute the first line of defense against viral
16 infections and are preponderant in the early control of viral infections. This is supported by
17 the increased susceptibility to herpesvirus infections, including HCMV, in NK cell-deficient
18 individuals (3)(4). NK cell functions are tightly tuned by numerous inhibitory and activating
19 cell surface molecules. Many inhibitory receptors display specificity for HLA class I
20 molecules, allowing the discrimination of self from non-self by NK cells. These include Killer
21 cell Immunoglobulin-like Receptors (KIRs), ILT-2 and the heterodimer CD94/NKG2A.
22 Among inhibitory KIRs, KIR2DL2 and KIR2DL3 receptors recognize HLA-C allotypes with
23 an asparagine at position 80 (C1 group), whereas KIR2DL1 receptors recognize HLA-C
24 allotypes with a lysine at position 80 (C2 group). ILT-2 is able to recognize a broader

spectrum of HLA class I molecules. CD94/NKG2A and its activating CD94/NKG2C counterpart, recognize HLA-E molecules presenting leader peptides derived from classical HLA class I molecules. These receptors are involved in the detection of “missing self”, which occurs when HLA class I molecule expression is down-regulated following viral infection or tumor induction (5). Activating receptors also modulate NK cell functions, and include the activating Natural Cytotoxic Receptors (NCR; NKp30, NKp44, Nkp46, NKp80), DNAM-1, NKG2D and CD161. Inhibitory and activating receptor expression is strongly associated with the differentiation and maturation status of NK cells. Thus, KIR2D⁺NKG2C⁺ NK cells expressing the late marker of differentiation CD57, defines the late mature NK cell subset (6), which has been shown to expand during HCMV infection (7) (8) (9) (10). Another major functional property of NK cells is their ability to perform the Antibody-Dependent Cell-mediated Cytotoxicity (ADCC) via the recognition of the Fc fragment of opsonic antibodies by CD16. The diversity of NK cell receptors displaying a stochastic expression, together with the modulation of their expression during the course of NK cell differentiation, defines the diversity of NK cell subsets found among the NK cell compartment.

The role of the innate-like $\gamma\delta$ T cell compartment during HCMV infection has been clearly demonstrated in healthy HCMV-seropositive subjects (11) and during acute infection in pregnant women (12), in children (13) and in transplant recipients (14)(15)(16). HCMV has also been associated with an expansion of the V δ_2^- $\gamma\delta$ T cell subset (15) (17) (18). Similar to NK cells, T cells are particularly important in the defense against HCMV infection. This includes robust CD4⁺ and CD8⁺ T cell responses targeting a broad range of HCMV proteins, during acute episodes, followed by their commitment toward a late mature phenotype, a feature found in latently infected individuals.

HCMV counteracts host immune defenses by eliciting numerous sophisticated immune evasion mechanisms (19) to escape CD8⁺ T and NK cell recognition. In most cases, despite

1 the numerous immune evasion strategies employed by HCMV, host immune responses
2 mounted against primary HCMV infection are effective at controlling CMV replication and
3 dissemination. A broad literature on clinical cases has depicted severe symptoms associated
4 with primary HCMV infection in immunocompetent individuals without investigations on
5 host immune responses or HCMV virulence (20)(21). As both host and viral polymorphisms
6 may contribute to severe symptomatic HCMV infection, we focused our study on the cellular
7 immune responses from a rare cohort of immunocompetent patients undergoing severe
8 symptomatic primary HCMV infection. For this, we performed a broad phenotypic and
9 functional analysis of main lymphocyte subsets and characterized the gene expression profiles
10 from these patients. This study should provide new insights in the comprehensive
11 understanding of the immune responses in immunocompetent hosts undergoing acute primary
12 HCMV infection.

MATERIALS AND METHODS

Study groups. HCMV serological status of healthy volunteers was assessed using the chemiluminescent immunoassay LIAISON® CMV IgG II (Diasorin, Saluggia, Italy). Thus, 26 HCMV-negative (HCMV⁻) and 39 HCMV-positive (HCMV⁺) individuals were included in the study.

Twenty adult patients (mean age 38 ± 13 years; 12 men and 8 women) diagnosed with acute HCMV-primary infection at the Nantes University Hospital were prospectively enrolled between 2009 and 2015 (Table I). EDTA blood samples were collected during the acute phase of HCMV infection. HCMV serology was performed using the LIAISON® CMV IgG; LIAISON® CMV IgM and LIAISON® CMV IgG Avidity tests. Additional evidence of active HCMV replication was examined using an in-house real time HCMV PCR in whole blood, adapted from Bressollette-Bodin et al (22).

Symptomatic primary HCMV infection was defined as a mononucleosis-like syndrome with fever, malaise, lymphocytosis ($>4.0 \times 10^9/\text{ml}$) and/or presence of activated lymphocytes, combined with a serology compatible with HCMV primary infection (positive HCMV IgM and/or IgG with low avidity) (Table I). All patients displayed general symptoms such as fever, arthralgia/myalgia, asthenia, headache, hepatosplenomegaly. Six patients displayed organ disease (two pneumoniae, one meningoradiculopathy, one hepatitis, two vascular thromboses). Two out of 20 patients (P16 and P20) received a curative therapy using IV ganciclovir (5mg/kg, twice daily) or PO valganciclovir (900mg, twice daily). HCMV viremia was determined in 17/20 patients and was positive in 14/17 of them.

Ethics Statement. Healthy volunteers were recruited at the Blood Transfusion Center (Etablissement Français du sang, Nantes, France) and informed written consent was obtained for all blood donors. Adult patients diagnosed with acute HCMV-primary infection were

enrolled after giving informed written consent in accordance to the Declaration of Helsinki (CNIL declaration n°1779686).

PBMC and cell lines. Peripheral blood mononuclear cells (PBMC) were isolated from citrate-phosphate-dextrose blood samples from healthy volunteers and primary HCMV-infected patients (PHIP) using a Ficoll-Hypaque density gradient centrifugation (Lymphoprep, Axis-Shield, Oslo, Norway) and cryopreserved. The HLA class-I deficient lymphoblastoid cell line 721.221, referred as 221 cells (ATCC[®] CRL-1855[™]), as well as the murine mastocytoma cell line P815 (ATCC[®] TIB-64[™]) were used to determine the degranulation potential and IFN γ production of NK cells. Both 221 and P815 cell lines were cultured in RPMI 1640 medium (Life Technologies, Paisley, UK) containing glutamine (Life Technologies) and penicillin-streptomycin (Life Technologies) supplemented with 10% heat-inactivated FCS (Life Technologies) or human serum (EFS, Nantes) for P815 cell line. Mycoplasma tests performed by PCR were negative for these two cell lines.

KIR and HLA typing. Genomic DNA was extracted from PBMC using a classical salting-out method (23). High resolution typing for HLA-A, HLA-B and HLA-C loci was carried out on all studied individuals by a Sequence Based Typing kit (Abbott Molecular Park, IL, USA). All DNAs were typed for KIR2DL1, 2DL2, 2DL3, 2DL4, 2DL5A/B, 3DL1, 3DL2, 3DL3, 2DS1, 2DS2, 2DS3, 2DS4/1D, 2DS5, 3DS1 using a KIR multiplex PCR-SSP method as previously described (24). KIR genotypes were determined based on the presence or absence of activating KIR, KIR AA genotype presenting only KIR2DS4 as activating KIR, and KIR B⁺ genotype presenting several activating KIR. KIR ligand C1, C2, Bw4 and Bw6 were defined based on allelic HLA class I typing.

Phenotypic analysis by flow cytometry. The (NK and T) lymphocyte surface phenotype was determined by four-color flow cytometry using the following anti-human

mAbs: anti-CD3-PerCP (SK7; BD Bioscience, San Jose, CA, USA), anti-CD4-FITC (RPA-T4; BD Biosciences), anti-CD8-PE (HIT8a; BD Biosciences), anti-CD16-FITC (NKP15; BD Biosciences), anti-CD27-PerCP (O323; Biolegend, San diego, CA, USA), anti-CD28-FITC (CD28.2; eBioscience, San Diego, CA, USA) , anti-CD38-FITC (HB7; eBioscience), anti-CD45RA-FITC (MEM-56; Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), anti-CD56-APC (NCAM16.2; BD Biosciences), anti-CD57-FITC (HNK-1; BD Biosciences), anti-CD69-PE (FN50; BD Biosciences), anti-CD226-FITC (DNAM-1) (DX11; BD Biosciences), anti-granzyme A-FITC (CB9; BD Biosciences), anti-KIR2DL1-FITC (143211; RD Systems, Minneapolis, MN, USA), anti-KIR2DL1/S1-FITC (EB6; Beckman Coulter, Brea, CA, USA), anti-KIR2DL2/S2/2DL3-PE (GL183; Beckman Coulter), anti-KIR2DL1/L2/L3/2DS1/2-FITC (1A6), anti-KIR3DL1/S1-PE (Z27), anti-KIR3DL1-FITC (DX9; Beckman Coulter), anti-NKG2A-PE (Z199; Beckman Coulter), anti-NKG2C-PE (134591; R&D Systems), anti-NKG2D-PE (ID11; BD Biosciences), anti-PD-1-PE (CD279) (J105; eBioscience), $\gamma\delta$ TCR-FITC (B1.1; eBioscience) and $\gamma\delta$ TCR V δ_2 -PE (B6; BD Biosciences). HLA-A*02⁺ HCMV⁺ healthy individuals and patients were selected to assess HCMV specific CD8⁺ T cell phenotype. PBMC were stained with HLA-A*02/HCMVpp65₄₉₅₋₅₀₄ pentamer-PE (ProImmune, Oxford, UK), anti-CD3-PerCP, anti-CD27, anti-CD28, anti-CD45RA-FITC monoclonal antibodies. Data were collected using a FACSCalibur (BD Biosciences) and analyzed using FlowJo software (TreeStar, Ashland, OR, USA).

CD107a mobilization assay and IFN γ secretion assay detected by flow cytometry.

Cytotoxic and cytokinic functions were respectively measured via CD107a (LAMP-1) and IFN γ production by NK cells in a 5-hour functional assay. PBMCs were pre-incubated with FITC-conjugated anti-CD107a (H4A3; BD Biosciences) and co-cultured to an effector : target ratio of 1:1 with medium (negative control) or 721.221 cell line in order to assess spontaneous activity, or with Fc⁺ P815 cell line after pre-incubation with CD16 specific antibody (3G8;

Beckman Coulter) or IgG₁ (MOPC-21; BD Biosciences) control to assess reverse ADCC. After 1h of incubation, brefeldin A (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA) was added at 10mg/mL to block trans-Golgi transport and allow the intracellular accumulation of IFN γ . PBMC cell surface was stained and then permeabilized before intracellular staining with PE-conjugated anti-IFN γ (B27; BD Biosciences).

RNA extraction – Microarrays. Total RNA from 13 HCMV⁻, 12 HCMV⁺NKG2C⁻, 12 HCMV⁺ NKG2C⁺ healthy individuals and 11 PHIP was extracted from 1 million PBMC using the NucleoSpin® RNA XS kit (Macherey Nagel, Düren, Germany). RNA quality and quantity were checked by NanoDrop 2000 UV-spectrophotometer (ThermoScientific, Waltham, MA, USA) and by 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA). RNA pre-amplification, labeling and hybridization on HuGene 2.1 ST 24 array (Affymetrix, Santa Clara, CA, USA) were performed from 100ng total RNA according to the manufacturer's instructions.

Microarray analysis and heatmap generation. Samples from 12 HCMV⁻ individuals, 12 HCMV⁺2C⁻, 13 HCMV⁺2C⁺ individuals and 11 PHIP were included in the transcriptional study. Raw data were quality-control checked using R statistical software (<http://www.r-project.org>). Expression data were normalized according to the Robust-Multi-array-Average (RMA) method based on a quantile-normalization algorithm. Then, data were filtered to remove probes with low intensity values. Thus, 28402 probes out of 53617 were filtered for the analysis. Unsupervised hierarchical clustering was computed on median-gene-centered and log-transformed data using average linkage and uncentered correlation distances with the Cluster 3.0 program (25). The biological significance for each cluster was determined using GOMiner software. GO ontology (GO) categories with an enrichment >1.5, a False Discovery Rate (FDR) <0.01 and a number of changed genes >5 were selected for further analysis. A differential analysis was then performed in order to highlight the most differentially expressed

1 genes (DEG). For that, differentially expressed probes were determined using the R “Limma”
2 package (Bioconductor) based on a Bayesian model. P-values were then corrected with the
3 Benjamini-Hochberg in order to control false positive rate. A probe was considered
4 differentially expressed when its corrected p-value < 0.05. These sets of genes were then
5 annotated for biological significance using GOMiner.

6 Raw microarray data were deposited in the Gene Expression Omnibus database
7 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>) and are accessible through GEO Series accession number
8 GSE81246.

9 **Statistics.** All statistical analyses were performed using GraphPad Prism 6 software
10 (GraphPad Software, La Jolla, CA). The one-way or two-way analysis of variance (ANOVA)
11 tests were used to compare multiple groups. Student’s *t*-test was performed for comparisons
12 between two groups. χ^2 test was used to analyze 2x2 contingency tables for frequency
13 comparisons. Spearman’s rank correlation coefficients were calculated and indicated when a
14 significant *p*-value was observed. *p*-values <0.05 were considered as statistically significant.

RESULTS

Early NKG2C NK cell expansion in PHIP. The rare occurrence of symptomatic primary HCMV infections raises the question of the role of both host and HCMV polymorphisms. In this study, we investigated immune responses of 20 symptomatic primary HCMV-infected patients (PHIP) (Table I), in comparison to HCMV⁻ (n=26) and HCMV⁺ (n=39) healthy individuals. All PHIP presented a lymphocytosis ($10.3.10^9 \pm 2.2. 10^9$ WBC/L, n=18) (Table 1) with an average about 10 fold more than this observed in healthy blood donors ($1.10^9 \pm 0.1.10^9$ WBC/L, n=57) except for patients P3 and P5 (<4 WBC/L). Of note, despite the time delay around 80 days after the onset of symptom appearance, two patients (P10 and P14) presented a high number of WBC/L and a maintained CMV viral load. While CD3⁺CD56⁺ NK cell frequencies determined for all three groups were similar (Fig.1A), the Mean Fluorescence Intensity (MFI) of CD56 expressed on NK cells was significantly higher in PHIP compared to HCMV⁻ (p=0.027) and HCMV⁺ (p=0.026) individuals suggesting an activated state of NK cells (Fig.1A). In accordance with the substantial lymphocytosis observed in PHIP, the absolute number of NK cells in PHIP was also significantly higher compared to HCMV⁻ (p<0.0001) and HCMV⁺ (p<0.0001) individuals (Fig.1A) except for 3 PHIP (P3, P5 and P11) who presented a low NK cell frequency and/or low WBC/L. To further investigate how the HCMV shapes the NK cell compartment, we analyzed the distribution of main NK cell subsets implicated in HCMV control. Peripheral blood NKG2C⁺ NK cell expansion has been described as the hallmark of HCMV infection (7)(8)(9). Thus, we discriminated HCMV⁺ healthy individuals according to the presence (HCMV⁺2C⁺) or absence (HCMV⁺2C⁻) of NKG2C⁺ NK cells (Fig. 1B). Interestingly, a significant NKG2C⁺ NK cell expansion was observed in PHIP compared to HCMV⁻ (p=0.0002) and HCMV⁺2C⁻ (p=0.0001) individuals and similar to these of HCMV⁺2C⁺ healthy individuals (Fig. 1C). The frequencies of both KIR2D⁻ and KIR2D⁺ NKG2C⁺ NK cell subsets in PHIP were similar to these of HCMV⁺2C⁺

1 healthy individuals and significantly higher than these observed in HCMV⁻ (respectively
 2 p=0.01 and p=0.002) and HCMV⁺2C⁻ healthy individuals (respectively p=0.002 and p=0.002)
 3 (Fig. 1C). PHIP displayed a decreased frequency of KIR2D⁺ NK cells compared to HCMV⁻
 4 (p=0.006), HCMV⁺2C⁻ (p=0.01) and HCMV⁺2C⁺ (p=0.002) individuals (Fig. 1C). Only
 5 KIR2D⁺NKG2C⁻ NK cell subset frequency in PHIP was significantly lower than these of
 6 HCMV⁻ (p<0.0001), HCMV⁺2C⁻ (p<0.0001) and HCMV⁺2C⁺ (p=0.02) individuals (Fig. 1C).
 7 We observed a reduced frequency of KIR2DL2/S2/L3 NK cells in PHIP compared to
 8 HCMV⁺ individuals (p=0.01) (Fig. 1D). No significant change was observed when compared
 9 to HCMV⁻ individuals (p=0.4) (Fig. 1D). The frequency of the KIR2DL1/S1 compartment
 10 was also decreased in PHIP compared to HCMV⁻ (p=0.003) and HCMV⁺ (p=0.001)
 11 individuals (Fig. 1D). These features were independent of the HLA-C environment (data not
 12 shown). PHIP displayed a similar frequency of KIR3DL1/3DS1⁺ NK cells to HCMV⁻ and
 13 HCMV⁺ individuals (data not shown). Moreover, based on recent observations showing an
 14 increased susceptibility to develop symptomatic primary HCMV infection in
 15 immunocompetent adults carrying an AA haplotype or the HLA-Bw4^T allele (26), all studied
 16 PHIP were KIR and HLA typed (Supplemental Table I). Compared to the HCMV⁻ and
 17 HCMV⁺ (NKG2C⁻ and NKG2C⁺) control cohorts, we did not confirm the previous results
 18 observed by Di Bona et al. (26). Nonetheless, we observed a lower proportion of HLA-Bw4^I
 19 in PHIP (29%) in contrast to HCMV⁻ individuals (61%, p=0.01, OR=0.1), and an increased
 20 proportion of HLA-Bw4^T in PHIP (53%) in contrast to HCMV⁺2C⁻ individuals (18%,
 21 p=0.039, OR=5.06) (Supplemental Table II). However, because the number of individuals in
 22 each group was limited it is difficult to ascertain a particular genetic profile in our PHIP
 23 cohort, both in terms of the number of activating or inhibitory KIR genes, the presence or
 24 absence of HLA ligands or KIR-HLA combinations (Supplemental Table II). Taken together
 25 these results demonstrate a massive proliferation of NK cell compartment during symptomatic

primary infection in immunocompetent adults with the early expression of NKG2C and a delayed acquisition of KIR receptors that is not related to a particular KIR genotype or HLA environment.

Activation and partial differentiation of NK cells in PHIP. To extend the investigation of NK cell responses occurring in PHIP, we evaluated their activation level and the expression of NK cell related markers. PHIP NK cells were highly activated as illustrated by the strong increased expression of the CD38 activation marker at the surface of NK cells compared to HCMV⁻ ($p<0.0001$) and HCMV⁺ ($p<0.0001$) individuals (Fig. 2A). Similarly, the expression level of the activating receptor NKG2D was increased, although at variable levels, at the NK cell surface of PHIP compared to HCMV⁻ ($p=0.005$) and HCMV⁺ ($p=0.0005$) individuals (Fig. 2B). Interestingly, the frequency of NK cells expressing the early activation marker CD69 was similar between the three groups (Fig. 2C), suggesting that NK cells from PHIP had already completed the first step of activation. We observed an increased frequency of NKG2A⁺ NK cells in PHIP compared to HCMV⁻ ($p=0.0005$) and HCMV⁺ ($p<0.0001$) individuals (Fig. 2C). On the contrary, a lower frequency of CD57⁺ expressing NK cells was observed in PHIP compared to HCMV⁻ ($p<0.0001$) and HCMV⁺ ($p<0.0001$) individuals (Fig. 2C) and a lower CD8⁺ NK cell frequency in PHIP compared to HCMV⁻ ($p<0.0001$) and HCMV⁺ ($p<0.0001$) individuals (Fig. 2C). Other markers investigated such as DNAM-1, NKp30, NKp44, NKp46, CD16, CD161, 2B4, ILT-2, granzyme A and perforin showed no significant differences between the studied groups (data not shown).

We next assessed by flow cytometry the functional potential of NK cells from PHIP in terms of cytotoxicity (determined by CD107a expression, a marker of degranulation) and IFN γ production using an *in vitro* model for spontaneous effector functions and for reverse

ADCC (Fig 2D). NK cells from PHIP exhibited a similar degranulation potential as well as a similar IFN γ production compared to HCMV $^{-}$ and HCMV $^{+}$ healthy individuals (Fig. 2D). Taken together, our findings suggest that although NK cells from PHIP do not appear to be fully mature, as shown by increased proportions of NKG2A hi , KIR2D lo and CD57 lo NK subsets, they are activated and functional effectors.

Early differentiation of CD3 $^{+}$ CD56 $^{-}$ T cells in PHIP. T lymphocyte repertoire modulation has been extensively documented during HCMV infection. Our phenotypic analysis of the CD3 $^{+}$ CD56 $^{-}$ T cell subset revealed a significantly higher frequency of CD3 $^{+}$ CD56 $^{-}$ T cells in PHIP compared to HCMV $^{-}$ ($p < 0.0001$) and HCMV $^{+}$ ($p = 0.0017$) individuals (Fig.3A). The absolute number of CD3 $^{+}$ CD56 $^{-}$ T cells was also significantly higher in PHIP compared to HCMV $^{-}$ ($p < 0.0001$) and HCMV $^{+}$ ($p < 0.0001$) individuals (Fig.3A). We observed a strong contraction of the CD4 $^{+}$ T lymphocyte frequency in PHIP compared to HCMV $^{-}$ ($p < 0.0001$) and HCMV $^{+}$ ($p < 0.0001$) and increased frequency of CD8 $^{+}$ T lymphocytes compared to HCMV $^{-}$ ($p < 0.0001$) and HCMV $^{+}$ individuals ($p < 0.0001$) (Fig. 3B). This could be explained by the mobilization of the latter compartment due to the ongoing infection. We also observed an approximately 2-fold decrease in CD45RA expressing CD3 $^{+}$ lymphocytes in PHIP compared to HCMV $^{-}$ ($p < 0.0001$) and to HCMV $^{+}$ ($p < 0.0001$) and expansion of PD-1 $^{+}$ T lymphocytes in PHIP compared to HCMV $^{-}$ ($p < 0.0001$) and to HCMV $^{+}$ individuals ($p < 0.0001$) (Fig. 3B).

We further focused on HCMV-specific CD8 $^{+}$ T cells from HLA-A2 $^{+}$ PHIP using a HLA-A2/pp65 pentamer. The proportion of HCMV-specific CD8 $^{+}$ T cells was slightly increased in PHIP compared to HCMV $^{+}$ ($p = 0.002$) healthy individuals (Fig. 3C). CD28 expressing HCMV-specific CD8 $^{+}$ T cells were strongly diminished in PHIP compared to

HCMV⁺ individuals ($p<0.0001$), as well as for CD45 expressing HCMV-specific CD8⁺ T cells ($p<0.02$) (Fig. 3D). On the contrary, HCMV-specific CD8⁺ T cells from PHIP expressed high levels of granzyme A compared to HCMV⁺ individuals ($p<0.0001$) (Fig. 3D). Altogether, our observations suggest that HCMV infection in PHIP leads to a substantial proliferation of T lymphocytes and the establishment of an adaptive immune response with CD27^{lo}CD28^{lo}CD45RA^{lo}GzmA^{hi}CD8⁺ T cells displaying early effector features.

HCMV signature on $\gamma\delta$ T cell compartment. Numerous studies have implicated the $\gamma\delta$ T cell compartment during the course of HCMV infection (15) (14) (16) (11). As HCMV infection in kidney transplant recipients (15) or congenital infection (13), we observed a significant expansion of $\gamma\delta$ T cells in PHIP (data not shown) with a preferential proliferation of V δ_2 ⁻ $\gamma\delta$ T cells in PHIP compared to HCMV⁻ and HCMV⁺ individuals observed from the frequencies ($p<0.004$ and $p<0.005$ respectively) and the absolute numbers ($p<0.0001$ and $p<0.0001$ respectively) (Fig. 4A). Of note, for 3 PHIP (P6, P9 and P11), we did not observe an expansion of V δ_2 ⁻ $\gamma\delta$ T cells (Fig. 4A). We observed an increased proportion of V δ_2 ⁻ $\gamma\delta$ T cells expressing CD16, at variable levels, in HCMV⁺ individuals ($p<0.05$) and PHIP ($p<0.05$) compared to HCMV⁻ individuals (Fig. 4B). Interestingly, the three patients for whom a weak V δ_2 ⁻ $\gamma\delta$ T cell frequency was detected displayed the lowest CD16⁺ V δ_2 ⁻ $\gamma\delta$ T cell frequencies. Within the V δ_2 ⁺ $\gamma\delta$ T cell compartment, an increased frequency of CD16 expressing cells was observed only in PHIP compared to HCMV⁻ ($p<0.002$) and HCMV⁺ ($p<0.002$) individuals (Fig. 4B). As previously described in a cohort of primary HCMV-infected pregnant women (17), both V δ_2 ⁻ $\gamma\delta$ T cell and V δ_2 ⁺ $\gamma\delta$ T cell subsets displayed higher CD38⁺ cell frequencies in PHIP (mean=64.4 $\pm$ 11.9 for V δ_2 ⁻ $\gamma\delta$ T cells; mean=16.4 $\pm$ 5.9 for V δ_2 ⁺ $\gamma\delta$ T cells) compared to HCMV⁻ ($p<0.001$) or HCMV⁺ ($p<0.001$) individuals, with an emphasis on the V δ_2 ⁻ $\gamma\delta$ T

cell subset (Fig. 4B). The two patients for whom CD38⁺ Vδ₂⁻ γδ T cell frequency was very low (P6 and P11) also showed the lowest CD16 expression on Vδ₂⁻ γδ T subsets. Finally, we noticed an interesting feature when comparing Vδ₂⁻ γδ T cell expansion and the proportion of NKG2C⁺ NK cells in healthy HCMV⁺ individuals or in PHIP (Fig. 4C). While Vδ₂⁻ γδ T cell expansion was not systematic in HCMV⁺ NKG2C⁻ individuals, we found on the contrary that all HCMV⁺2C⁺ healthy individuals displayed a Vδ₂⁻ γδ T cell expansion (Fig. 4C). PHIP presented the same profile as the latter group, except for the two out of three patients (P6 and P11) who did not expand Vδ₂⁻ γδ T cells. Interestingly, significant positive correlations were observed when we assessed NKG2C⁺ T cell and NKG2C⁺ NK cell frequencies (p=0.038) (Fig. 4C) as well as for CD57⁺ T cell and CD57⁺ NK cell frequencies (p=0.001) (Fig. 4C). We also observed a significant correlation between increased frequencies of CD57⁺ NK cells and the diminution of PD-1⁺ T cell frequencies (p=0.017) (Fig. 4C). This could reflect the diminution of T cell activation whilst NK cells move into a differentiation process. These results confirm that primary HCMV infection drives γδ T cell proliferation and mobilization as illustrated by the expansion of the activated Vδ₂⁻ γδ T subset. Moreover, acute HCMV infection leads to coordinated changes in innate and acquired lymphocyte compartments.

Activation of CD3⁺CD56⁺ T cells in PHIP. Several studies have described the CD56⁺ T implication during HCMV infection (27) (28) (29) (30). Similar to NK, conventional and γδ T lymphocytes in PHIP, CD56⁺ T cells appear to be activated as shown by the strong increase in CD38 expressing CD56⁺ T cells in PHIP compared to HCMV⁻ (p<0.0001) and HCMV⁺ (p<0.0001) individuals (Supplemental Fig. 1A). NKG2A⁺ CD56⁺ T cell frequencies were significantly higher in PHIP compared to HCMV⁺ (p=0.03) individuals, with no significant change for NKG2C⁺ CD56⁺ T cell frequencies. PHIP displayed reduced CD57⁺CD56⁺ T cells frequencies compared to HCMV⁻ individuals (p<0.0001) (Supplemental

Fig. 1A). Interestingly, we found the highest frequencies of CD57⁺CD56⁺ T cells in HCMV⁺ individuals compared to HCMV⁻ (p<0.0001) individuals and PHIP (p<0.0001). Expression of CD161 and ILT-2 appeared to be similarly expressed in PHIP and HCMV⁻ healthy controls and the KIR2D frequency was similar between the three groups (Supplemental Fig. 1B). However, HCMV⁺ individuals were characterized by a significantly lower frequency of CD161⁺ CD56⁺ T cells in contrast to PHIP (p<0.0001) or HCMV⁻ individuals (p=0.008), and a significantly higher frequency of ILT2⁺ CD56⁺ T cells in comparison to PHIP (p<0.0001) and HCMV⁻ individuals (p<0.0001) (Supplemental Fig. 1B) as previously observed in children (31).

Dynamics of the immune responses in PHIP. We investigated the immune response evolution kinetic from the onset of the disease to the resolution of the infection in PHIP from a qualitative standpoint. As PHIP were sampled at different times after the onset of symptoms, we followed the evolution of the different cell subsets from phenotypic markers on all lymphocyte populations at the time after appearance of the first symptoms. We first noticed the recovery of normal CD56 surface expression levels on NK cells, with the distinction between CD56^{bright} and CD56^{dim} cells (Fig. 5A). In patient 20, we observed a decrease in the total NK cell frequency 4 months after the onset of the disease. NK cells also displayed reduced expression of CD38 (Fig. 5A) as T lymphocytes (data not shown) early as 4 months after the onset of the infection, testifying the dampened activation level. NKG2C NK cell expansion persisted for several months, and KIR2D⁺ NK cells tended to increase, mostly in association with NKG2C (Fig. 5A). Finally, whilst NKG2D⁺ NK cell frequencies slightly decreased (Fig. 5A) in accordance with the lower activated phenotypic level, the CD57⁺ NK cell frequency increased from the 4th month (Fig. 5A) matching levels observed in healthy individuals. These results reflect an evolution of the NK cell maturation status during

the course of HCMV infection, from the onset of the disease to the resolution as observed for NKG2A and CD57 on NK cells (Fig 5B). For conventional $\alpha\beta$ T lymphocytes, we observed in the late phenotype an increased frequency of CD4⁺ T cells (data not shown) and decrease in CD8⁺ T cells (Fig. 5C). We observed the persistence of the V δ_2 ⁻ $\gamma\delta$ T subset with no change in CD16 expressing V δ_2 ⁻ $\gamma\delta$ T cell frequencies (Fig. 5C). Interestingly, the proportion of CD45RA⁺ T cells increased (Fig. 5C-D) and PD-1⁺ T cells frequencies decreased from the 4th month after infection onset (Fig. 5D). NKG2D expression, which is particularly high on activated T cells at the onset of HCMV infection, decreased with time as well as for CD27⁺ and CD38⁺ T cell frequencies (Fig. 5D). In contrast, CD57⁺ T lymphocyte frequency increased from the onset of the disease to the resolution (Fig. 5D). These results show commitment of T lymphocytes toward differentiation.

Profound genetic modulation induced by HCMV in PHIP. Flow cytometry analysis is useful to investigate different populations using characterized phenotypic markers but presents some limitations to investigate a wide range of cellular molecules for which the expression can be modulated by HCMV infection. To further investigate the immune repertoire modulations during primary HCMV infection, we performed a transcriptional analysis. We discriminated HCMV⁺ individuals according to the presence (HCMV⁺2C⁺) or not (HCMV⁺2C⁻) of NKG2C⁺ NK cell expansion. The strong homogeneity of lymphocyte phenotype profiles of PHIP and the limited cell availability prompted us to perform the analysis from total PBMC with a strong representation of conventional T lymphocytes (mean=80.1%±1.5). The principal component analysis (PCA) demonstrated superposed genetic profiles of HCMV-seronegative or -seropositive healthy individuals (Fig. 6A). On the contrary the distinct genetic profile of PHIP highlighted the genetic modulations occurring

1 during acute infection. Gene expression profiles were first subjected to an unsupervised
2 hierarchical clustering, in order to highlight gene sets with similar differential expression.
3 While no clusters were detected between each control group (data not shown), heatmaps
4 revealed five clusters of differentially expressed genes (DEG) between HCMV⁻ or
5 HCMV⁺2C⁻ healthy individuals (data not shown) and PHIP, and four clusters between
6 HCMV⁺2C⁺ healthy individuals and PHIP (Fig. 6B). Submission to GOMiner to assess
7 biological significance showed clusters 1 to 5 were identical between HCMV⁻, HCMV⁺2C⁻
8 and HCMV⁺2C⁺ healthy individuals and PHIP, except for cluster 2 which was absent in the
9 HCMV⁺2C⁺ healthy individuals versus PHIP comparison. The most differentially modulated
10 Gene Ontology (GO) categories (number of genes per GO categories >5; enrichment >1.5;
11 False Discovery Rate (FDR) <0.01) were then classified according to immune response, cell
12 cycle or other cell functions (Fig. 6B). From this first analysis, we showed that PHIP present
13 an activated gene expression profile mainly related to immune responses corroborating the
14 previous cellular results.

15 A second analysis was performed to compare PHIP transcription profiles to all control
16 groups in order to individually detect differentially expressed genes. Approximately 2000 to
17 3000 genes were differentially regulated between PHIP and healthy individuals. In order to
18 manage the data sets we applied a cutoff of 3-Fold Change (FC) with a corrected p-value <
19 0.01 (Fig 6C). Genes encoding chemokines involved in lymphocyte adhesion and migration
20 were up-regulated in PHIP including *CXCL10* and its receptor *CXCR3*, *CCL2* and *CCR5*.
21 Transcription of the $\beta 1$ sub-unit of the IL-12 receptor was also increased in PHIP. Moreover,
22 genes encoding proteins displaying antiviral properties were up-regulated in PHIP such as
23 *OASL* and *APOBEC3C*, *D* and *H*. Among transcripts encoding T cell regulation proteins, the
24 transcription factor *EOMES* which drives specific CD8⁺ effector T cells during viral infection,
25 was highly up-regulated in PHIP. *THEMIS*, which is specific to T-cell lineages and is required

for TCR-signal regulation, was also significantly increased. We also observed higher levels of *JAKMIP1* transcripts in PHIP, for which the protein Jakmip1 is highly expressed in Ag-experienced T cells (32). Moreover, we observed elevated *GZMA*, *GZMB* and *GZMH* transcripts in PHIP in accordance with the activated lymphocyte status and the high intracellular expression of granzyme A in HLA-A2-pp65-specific CD8⁺ T lymphocytes. These data support an efficient lytic phenotype of HCMV-specific T lymphocytes in PHIP. On the other hand, several PHIP up-regulated genes supported inhibitory regulation following T lymphocyte activation and their commitment toward cell exhaustion. Finally, most of the phenotypic markers including NKG2C, NKG2A, CD27, CD38, CD45RA, PD-1, Granzyme A, CD4, CD19 and CD28 evaluated could be detected as differentially expressed at the transcriptional level in PHIP compared to HCMV⁻ transcripts (Fig. 6D). Similar results were observed in comparing PHIP to HCMV⁺2C⁻ and HCMV⁺2C⁺ healthy individuals (data not shown). Gene expression profiling of circulating PBMCs provided a global overview of differential gene expression between HCMV free or latently HCMV infected individuals and PHIP.

DISCUSSION

Extensive studies have reported the strong immune effector mobilization during HCMV infection and its consecutive imprint on the immune repertoire. However, these reports were restricted to primary infection or reactivation in immature or immunodeficient individuals (20). Here we provide the first characterization of cellular and gene expression profiles of innate and adaptive immune repertoire modulations occurring in symptomatic primary HCMV infection in immunocompetent adults. PHIP were represented by a broad range of clinical features, from viral syndrome to tissue injuries. Ideally, immunocompetent adults undergoing asymptomatic primary HCMV infection would have been better for comparison than latently infected individuals, but hardly manageable by definition. The first observation in PHIP was the huge lymphocytosis (NK, conventional and $\gamma\delta$ T lymphocytes) associated or not with a CMV viral load and maintained around day 80 after the onset of symptom appearance for two patients. Interestingly, Jayasooriya et al have recently reported the case of one asymptomatic EBV-infected Gambian children who carried a virus load equivalent to that seen in acute infectious mononucleosis (AIM) patients but who lack significant expansion of global T-cell numbers despite substantial activation of EBV-specific CD8⁺ T cells (33). In our study, PHIP mount frequencies of HCMV-specific T lymphocytes comparable to those previously observed in primary HCMV-infected pregnant women and newborns (34) (35) (36) (37). We cannot exclude the hypothesis, suggested in AIM, that the development of heterologous immunity where an existing response to an epitope coded by a previously encountered pathogen cross reacts with another from CMV, amplifying the pool of T-cells responsive to CMV challenge and potentially inducing an exaggerated response.

NK cells have been described as potent effectors during HCMV infection, as illustrated by the mature NKG2C⁺CD57⁺KIR2D⁺ NK cell subset expansion during HCMV infection in healthy individuals or in transplant recipients (7)(8)(9). Although NKG2C NK cell expansion

1 has been described in other viral infections, i.e. Hantavirus (38), Chikungunya (39), and HIV
2 (40), these patients were always HCMV seropositive. We detected the early expansion of
3 NKG2C⁺ NK cells in PHIP, while KIR2D co-expression was delayed. Several studies have
4 reported an association between the KIR and HLA genotype and the development of CMV
5 infection following hematopoietic stem cell (41) and solid organ transplantation (42)(43).
6 Moreover, a recent study (26) showed an increased susceptibility to developing symptomatic
7 primary CMV infection in the immunocompetent adult carrying an AA haplotype or the
8 HLA-Bw4^T allele. However, by comparing KIR and HLA genotypes of the HCMV⁻ and
9 HCMV⁺ control groups, we could not identify a specific combination. The number of
10 activating or inhibitory KIR genes was similar between groups, as well as the frequency of
11 each KIR gene. In the same way, no singular HLA class I profile could be highlighted, either
12 in terms of the presence or the absence of cognate KIR ligands. In parallel, we were able to
13 distinguish the highly activated status of NK cells in PHIP, illustrated by their strong cell
14 surface expression of CD38. Although increased in PHIP, variable levels of NKG2D
15 expression could be explained by the time between the onset of the disease and when patients
16 were sampled. These observations together with the high frequency of NKG2A⁺ NK cells and
17 the low proportion of CD57⁺ NK cells could suggest that NK cells from PHIP are undergoing
18 differentiation but are not fully mature yet. Indeed, when comparing NK cell phenotypes from
19 a PHIP from the onset of the disease to 4 months later, KIR2D receptors and CD57 expression
20 tended to rise. Interestingly, this mirrors a feature recently described in acute primary EBV
21 infection (44), where early differentiated NKG2A⁺KIR⁻ NK cells were predominant during
22 acute infectious mononucleosis (IM) while CD57 expression was delayed and increased at the
23 same time as expansion of the NKG2A⁻KIR⁺ NK cell subset several months after acute IM.
24 Furthermore, functional assays performed to investigate the degranulation and IFN γ

1 production capacities of NK cells demonstrated a similar potential between PHIP and the
2 control groups.

3 Analysis of the $\gamma\delta$ T cell compartment revealed expansion of a V δ 2⁻ $\gamma\delta$ T cell subset in
4 HCMV⁺ healthy and PHIP individuals as previously observed in immature or
5 immunodeficient individuals (11)(12)(13)(14)(15)(18). Because these cells were activated in
6 PHIP, especially V δ 2⁻ $\gamma\delta$ CD16⁺ T cells, and these were not significantly detected in latent
7 HCMV⁺ donors when compared to HCMV⁻ individuals, we hypothesize that CD16 expression
8 follows $\gamma\delta$ T cell activation, as suggested by Couzi et al (18). Finally, we observed a joint
9 NKG2C⁺ NK and V δ 2⁻ $\gamma\delta$ T cell expansion corresponding to the imprint of HCMV on
10 immune responses in PHIP.

11 Major changes were also observed in T lymphocyte phenotypes in PHIP, including
12 lymphocytosis accompanied with an inversion of the CD4:CD8 ratio. This was supported by
13 the gene expression profile analysis whereby numerous cell cycle genes were up-regulated.
14 The decreased frequency of CD45RA⁺ T cells and increased proportions of PD-1⁺ T cells are
15 consistent with an immune mobilization. PHIP mount a HCMV-specific CD8⁺ T cell response
16 with an effector phenotype characterized by CD45RA^{lo} CCR7⁻ CD27^{lo} CD28⁻ GzmA^{hi} profile
17 with a high transcription level of *EOMES* in accordance with the recent through
18 characterization of all specific T cell subsets in HCMV⁺ individuals (45). In addition, several
19 genes involved in T cell regulation were up-regulated in PHIP. Up-regulation of *CXCL10*,
20 *CXCR3*, *CCR5*, *CCL2*, *IL-12RB1* suggests their ability to migrate to inflammatory sites,
21 including HCMV-infected endothelial cells from blood vessel (46), and interact with other
22 immune effectors. Furthermore, it has been recently reported that IL-12 produced by
23 monocytes is essential to control HCMV-driven NKG2C⁺ NK cell expansion (47). In
24 addition, we observed a strong increase in *APOBEC3C*, *D* and *H* transcripts in PHIP

1 suggesting a role for these enzymes in HCMV replication and the activation of antiviral
2 immunity. APOBEC3 has been reported to be a restriction factor for some DNA viruses
3 including human herpesviruses such as herpes simplex-1 (HSV-1) and Epstein Barr virus
4 (EBV) (48). Interestingly, the CD56⁺ T cell phenotype displayed similar features between the
5 HCMV⁻ control group and PHIP by comparison to latently HCMV infected individuals,
6 suggesting a maturation status in progress. An interesting finding was the observation of the
7 down-regulation of *CD1D* in PHIP (data not shown), a non-classical HLA class-I molecule
8 that recognizes NKT TCR. HCMV has been shown to downregulate CD1d at the
9 transcriptional level thereby acting as an immune escape mechanism (49).

10 This extensive study shows that during the symptomatic stage of acute HCMV
11 infection, PHIP mounted appropriate cellular immune responses, but that these immune
12 responses did not efficiently limit lytic viral replication associated with serious disease. We
13 cannot exclude the dysfunction of a particular subset as monocytes, not investigated in this
14 cohort. Moreover, the symptomatic HCMV infection was associated with a huge
15 lymphocytosis that can be the result of non-adapted or not controlled immune responses
16 limiting the effectiveness of specific mounted responses. The apparition of symptoms could
17 be also the consequence of a delayed immune response caused by HCMV strains particularly
18 involved in immune escape. Although the immune evasion mechanisms employed by HCMV
19 *in vitro* are very well documented, their effectiveness during primary infection *in vivo* is not
20 absolutely clear and perhaps may be better seen as viral functions which allow the pathogen to
21 initially overcome host immune responses and thus create a window for the virus to replicate
22 efficiently and disseminate towards different organs. This hypothesis relies on several studies
23 (50) suggesting HCMV virulence variation is due to genome diversity. A more thorough
24 characterization of molecular HCMV strains isolated from PHIP samples is in progress, and

will allow evaluation of the immune escape mechanisms resulting from specific viral genetic polymorphisms.

ACKNOWLEDGMENTS

We are grateful to all the blood donors and patients for participating in this study. We thank Dr. Zakia Djaoud (Department of Structural Biology and Microbiology & Immunology, Stanford University School of Medicine, Stanford, USA) for reviewing, Nicolas Dulphy (Université Paris Diderot, Sorbonne Paris Cité, Institut Universitaire d'Hématologie, Paris, France) for advices in the transcriptomic analysis and Britt House (France) for help in the editing of the manuscript.

Conflict-of-interest disclosure: The authors declare no competing financial interests.

FUNDING INFORMATION

This work was financially supported by the Etablissement Français du Sang (EFS)/Pays de la Loire and by grants from EFS 2014-11, Région des Pays de la Loire (ARMINA project), Leucémie Espoir Atlantique Famille (LEAF) and Nantes Atlantique Greffe de Moelle Osseuse (NAGMO). RR is a PhD student supported by Région des Pays de la Loire (ARMINA project). We are most grateful to the Genomics and Bioinformatics Core Facility of Nantes (Biogenouest) for its technical support.

REFERENCES

1. **van de Berg PJEJ, van Stijn A, Ten Berge IJM, van Lier RAW.** 2008. A fingerprint left by cytomegalovirus infection in the human T cell compartment. *J Clin Virol Off Publ Pan Am Soc Clin Virol* **41**:213–217.
2. **Sissons JGP, Wills MR.** 2015. How understanding immunology contributes to managing CMV disease in immunosuppressed patients: now and in future. *Med Microbiol Immunol (Berl)* **204**:307–316.
3. **Biron CA, Byron KS, Sullivan JL.** 1989. Severe herpesvirus infections in an adolescent without natural killer cells. *N Engl J Med* **320**:1731–1735.
4. **Orange JS.** 2002. Human natural killer cell deficiencies and susceptibility to infection. *Microbes Infect Inst Pasteur* **4**:1545–1558.
5. **Saunders PM, Vivian JP, O'Connor GM, Sullivan LC, Pymm P, Rossjohn J, Brooks AG.** 2015. A bird's eye view of NK cell receptor interactions with their MHC class I ligands. *Immunol Rev* **267**:148–166.
6. **Björkström NK, Riese P, Heuts F, Andersson S, Fauriat C, Ivarsson MA, Björklund AT, Flodström-Tullberg M, Michaëlsson J, Rottenberg ME, Guzmán CA, Ljunggren H-G, Malmberg K-J.** 2010. Expression patterns of NKG2A, KIR, and CD57 define a process of CD56dim NK-cell differentiation uncoupled from NK-cell education. *Blood* **116**:3853–3864.
7. **Gumá M, Angulo A, Vilches C, Gómez-Lozano N, Malats N, López-Botet M.** 2004. Imprint of human cytomegalovirus infection on the NK cell receptor repertoire. *Blood* **104**:3664–3671.
8. **Lopez-Vergès S, Milush JM, Schwartz BS, Pando MJ, Jarjoura J, York VA, Houchins JP, Miller S, Kang S-M, Norris PJ, Nixon DF, Lanier LL.** 2011. Expansion of a unique CD57⁺NKG2Chi natural killer cell subset during acute human cytomegalovirus infection. *Proc Natl Acad Sci U S A* **108**:14725–14732.

9. **Foley B, Cooley S, Verneris MR, Pitt M, Curtsinger J, Luo X, Lopez-Vergès S, Lanier LL, Weisdorf D, Miller JS.** 2012. Cytomegalovirus reactivation after allogeneic transplantation promotes a lasting increase in educated NKG2C⁺ natural killer cells with potent function. *Blood* **119**:2665–2674.
10. **Béziat V, Liu LL, Malmberg J-A, Ivarsson MA, Sohlberg E, Björklund AT, Retière C, Sverremark-Ekström E, Traherne J, Ljungman P, Schaffer M, Price DA, Trowsdale J, Michaëlsson J, Ljunggren H-G, Malmberg K-J.** 2013. NK cell responses to cytomegalovirus infection lead to stable imprints in the human KIR repertoire and involve activating KIRs. *Blood* **121**:2678–2688.
11. **Pitard V, Roumanes D, Lafarge X, Couzi L, Garrigue I, Lafon M-E, Merville P, Moreau J-F, Déchanet-Merville J.** 2008. Long-term expansion of effector/memory Vdelta2-gammadelta T cells is a specific blood signature of CMV infection. *Blood* **112**:1317–1324.
12. **Fornara C, Lilleri D, Revello MG, Furione M, Zavattoni M, Lenta E, Gerna G.** 2011. Kinetics of effector functions and phenotype of virus-specific and $\gamma\delta$ T lymphocytes in primary human cytomegalovirus infection during pregnancy. *J Clin Immunol* **31**:1054–1064.
13. **Vermijlen D, Brouwer M, Donner C, Liesnard C, Tackoen M, Van Rysselberge M, Twité N, Goldman M, Marchant A, Willems F.** 2010. Human cytomegalovirus elicits fetal gammadelta T cell responses in utero. *J Exp Med* **207**:807–821.
14. **Déchanet J, Merville P, Lim A, Retière C, Pitard V, Lafarge X, Michelson S, Méric C, Hallet MM, Kourilsky P, Potaux L, Bonneville M, Moreau JF.** 1999. Implication of gammadelta T cells in the human immune response to cytomegalovirus. *J Clin Invest* **103**:1437–1449.
15. **Déchanet J, Merville P, Bergé F, Bone-Mane G, Taupin JL, Michel P, Joly P, Bonneville M, Potaux L, Moreau JF.** 1999. Major expansion of gammadelta T lymphocytes following cytomegalovirus infection in kidney allograft recipients. *J Infect Dis* **179**:1–8.

- 1 16. **Lafarge X, Merville P, Cazin MC, Bergé F, Potaux L, Moreau JF, Déchanet-Merville J.**
2 2001. Cytomegalovirus infection in transplant recipients resolves when circulating gammadelta
3 T lymphocytes expand, suggesting a protective antiviral role. *J Infect Dis* **184**:533–541.
- 4 17. **Roux A, Mourin G, Larsen M, Fastenackels S, Urrutia A, Gorochov G, Autran B, Donner**
5 **C, Sidi D, Sibony-Prat J, Marchant A, Stern M, Sauce D, Appay V.** 2013. Differential
6 impact of age and cytomegalovirus infection on the $\gamma\delta$ T cell compartment. *J Immunol Baltim*
7 *Md* 1950 **191**:1300–1306.
- 8 18. **Couzi L, Pitard V, Sicard X, Garrigue I, Hawchar O, Merville P, Moreau J-F, Déchanet-**
9 **Merville J.** 2012. Antibody-dependent anti-cytomegalovirus activity of human $\gamma\delta$ T cells
10 expressing CD16 (Fc γ RIIIa). *Blood* **119**:1418–1427.
- 11 19. **Wilkinson GWG, Tomasec P, Stanton RJ, Armstrong M, Prod'homme V, Aicheler R,**
12 **McSharry BP, Rickards CR, Cochrane D, Llewellyn-Lacey S, Wang ECY, Griffin CA,**
13 **Davison AJ.** 2008. Modulation of natural killer cells by human cytomegalovirus. *J Clin Virol*
14 *Off Publ Pan Am Soc Clin Virol* **41**:206–212.
- 15 20. **Rafailidis PI, Mourtzoukou EG, Varbobitis IC, Falagas ME.** 2008. Severe cytomegalovirus
16 infection in apparently immunocompetent patients: a systematic review. *Virol J* **5**:47.
- 17 21. **Lancini D, Faddy HM, Flower R, Hogan C.** 2014. Cytomegalovirus disease in
18 immunocompetent adults. *Med J Aust* **201**:578–580.
- 19 22. **Bressollette-Bodin C, Coste-Burel M, Besse B, André-Garnier E, Ferre V, Imbert-Marcille**
20 **B-M.** 2009. Cellular normalization of viral DNA loads on whole blood improves the clinical
21 management of cytomegalovirus or Epstein Barr virus infections in the setting of pre-emptive
22 therapy. *J Med Virol* **81**:90–98.
- 23 23. **Miller SA, Dykes DD, Polesky HF.** 1988. A simple salting out procedure for extracting DNA
24 from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res* **16**:1215.

- 1 24. **Sun JY, Gaidulis L, Miller MM, Goto RM, Rodriguez R, Forman SJ, Senitzer D.** 2004.
2 Development of a multiplex PCR-SSP method for Killer-cell immunoglobulin-like receptor
3 genotyping. *Tissue Antigens* **64**:462–468.
- 4 25. **Yang YH, Dudoit S, Luu P, Lin DM, Peng V, Ngai J, Speed TP.** 2002. Normalization for
5 cDNA microarray data: a robust composite method addressing single and multiple slide
6 systematic variation. *Nucleic Acids Res* **30**:e15.
- 7 26. **Di Bona D, Scafidi V, Plaia A, Colomba C, Nuzzo D, Occhino C, Tuttolomondo A,**
8 **Giammanco G, De Grazia S, Montalto G, Duro G, Cippitelli M, Caruso C.** 2014. HLA and
9 killer cell immunoglobulin-like receptors influence the natural course of CMV infection. *J Infect*
10 *Dis* **210**:1083–1089.
- 11 27. **Chan WK, Rujkijyanont P, Neale G, Yang J, Bari R, Das Gupta N, Holladay M, Rooney B,**
12 **Leung W.** 2013. Multiplex and genome-wide analyses reveal distinctive properties of KIR⁺ and
13 CD56⁺ T cells in human blood. *J Immunol Baltim Md 1950* **191**:1625–1636.
- 14 28. **Almehmadi M, Hammad A, Heyworth S, Moberly J, Middleton D, Hopkins MJ, Hart IJ,**
15 **Christmas SE.** 2015. CD56⁺ T cells are increased in kidney transplant patients following
16 cytomegalovirus infection. *Transpl Infect Dis Off J Transplant Soc* **17**:518–526.
- 17 29. **Almehmadi M, Flanagan BF, Khan N, Alomar S, Christmas SE.** 2014. Increased numbers
18 and functional activity of CD56⁺ T cells in healthy cytomegalovirus positive subjects.
19 *Immunology* **142**:258–268.
- 20 30. **Davis ZB, Cooley SA, Cichocki F, Felices M, Wangen R, Luo X, DeFor TE, Bryceson YT,**
21 **Diamond DJ, Brunstein C, Blazar BR, Wagner JE, Weisdorf DJ, Horowitz A, Guethlein**
22 **LA, Parham P, Verneris MR, Miller JS.** 2015. Adaptive Natural Killer Cell and Killer Cell
23 Immunoglobulin-Like Receptor-Expressing T Cell Responses are Induced by Cytomegalovirus
24 and Are Associated with Protection against Cytomegalovirus Reactivation after Allogeneic

Donor Hematopoietic Cell Transplantation. Biol Blood Marrow Transplant J Am Soc Blood Marrow Transplant **21**:1653–1662.

31. **Monsiváis-Urenda A, Noyola-Cherpitel D, Hernández-Salinas A, García-Sepúlveda C, Romo N, Baranda L, López-Botet M, González-Amaro R.** 2010. Influence of human cytomegalovirus infection on the NK cell receptor repertoire in children. Eur J Immunol **40**:1418–1427.

32. **Libri V, Schulte D, van Stijn A, Ragimbeau J, Rogge L, Pellegrini S.** 2008. Jakmip1 is expressed upon T cell differentiation and has an inhibitory function in cytotoxic T lymphocytes. J Immunol Baltim Md 1950 **181**:5847–5856.

33. **Jayasooriya S, de Silva TI, Njie-jobe J, Sanyang C, Leese AM, Bell AI, McAulay KA, Yanchun P, Long HM, Dong T, Whittle HC, Rickinson AB, Rowland-Jones SL, Hislop AD, Flanagan KL.** 2015. Early virological and immunological events in asymptomatic Epstein-Barr virus infection in African children. PLoS Pathog **11**:e1004746.

34. **Marchant A, Appay V, van der Sande M, Dulphy N, Liesnard C, Kidd M, Kaye S, Ojuola O, Gillespie GMA, Vargas Cuero AL, Cerundolo V, Callan M, McAdam KPWJ, Rowland-Jones SL, Donner C, McMichael AJ, Whittle H.** 2003. Mature CD8+ T lymphocyte response to viral infection during fetal life. J Clin Invest **111**:1747–1755.

35. **Miles DJC, van der Sande M, Jeffries D, Kaye S, Ojuola O, Sanneh M, Cox M, Palmero MS, Touray ES, Waight P, Rowland-Jones S, Whittle H, Marchant A.** 2008. Maintenance of large subpopulations of differentiated CD8 T-cells two years after cytomegalovirus infection in Gambian infants. PloS One **3**:e2905.

36. **Miles DJC, van der Sande M, Jeffries D, Kaye S, Ismaili J, Ojuola O, Sanneh M, Touray ES, Waight P, Rowland-Jones S, Whittle H, Marchant A.** 2007. Cytomegalovirus infection in Gambian infants leads to profound CD8 T-cell differentiation. J Virol **81**:5766–5776.

37. **Huygens A, Lecomte S, Tackoen M, Olislagers V, Delmarcelle Y, Burny W, Van Rysselberge M, Liesnard C, Larsen M, Appay V, Donner C, Marchant A.** 2015. Functional Exhaustion Limits CD4+ and CD8+ T-Cell Responses to Congenital Cytomegalovirus Infection. *J Infect Dis.*
38. **Björkström NK, Lindgren T, Stoltz M, Fauriat C, Braun M, Evander M, Michaëlsson J, Malmberg K-J, Klingström J, Ahlm C, Ljunggren H-G.** 2011. Rapid expansion and long-term persistence of elevated NK cell numbers in humans infected with hantavirus. *J Exp Med* **208**:13–21.
39. **Petitdemange C, Becquart P, Wauquier N, Béziat V, Debré P, Leroy EM, Vieillard V.** 2011. Unconventional repertoire profile is imprinted during acute chikungunya infection for natural killer cells polarization toward cytotoxicity. *PLoS Pathog* **7**:e1002268.
40. **Brunetta E, Fogli M, Varchetta S, Bozzo L, Hudspeth KL, Marcenaro E, Moretta A, Mavilio D.** 2010. Chronic HIV-1 viremia reverses NKG2A/NKG2C ratio on natural killer cells in patients with human cytomegalovirus co-infection. *AIDS Lond Engl* **24**:27–34.
41. **Cook M, Briggs D, Craddock C, Mahendra P, Milligan D, Fegan C, Darbyshire P, Lawson S, Boxall E, Moss P.** 2006. Donor KIR genotype has a major influence on the rate of cytomegalovirus reactivation following T-cell replete stem cell transplantation. *Blood* **107**:1230–1232.
42. **Hadaya K, de Rham C, Bandelier C, Bandelier C, Ferrari-Lacraz S, Jendly S, Berney T, Buhler L, Kaiser L, Seebach JD, Tiercy JM, Martin PY, Villard J.** 2008. Natural killer cell receptor repertoire and their ligands, and the risk of CMV infection after kidney transplantation. *Am J Transplant Off J Am Soc Transplant Am Soc Transpl Surg* **8**:2674–2683.
43. **Stern M, Elsässer H, Hönger G, Steiger J, Schaub S, Hess C.** 2008. The number of activating KIR genes inversely correlates with the rate of CMV infection/reactivation in kidney transplant recipients. *Am J Transplant Off J Am Soc Transplant Am Soc Transpl Surg* **8**:1312–1317.

44. **Azzi T, Lünemann A, Murer A, Ueda S, Béziat V, Malmberg K-J, Staubli G, Gysin C, Berger C, Münz C, Chijioke O, Nadal D.** 2014. Role for early-differentiated natural killer cells in infectious mononucleosis. *Blood* **124**:2533–2543.
45. **van Aalderen MC, Remmerswaal EBM, Verstegen NJM, Hombrink P, ten Brinke A, Pircher H, Kootstra NA, ten Berge IJM, van Lier RAW.** 2015. Infection history determines the differentiation state of human CD8⁺ T cells. *J Virol* **89**:5110–5123.
46. **Vieira Braga FA, Hertoghs KML, van Lier RAW, van Gisbergen KPJM.** 2015. Molecular characterization of HCMV-specific immune responses: Parallels between CD8(+) T cells, CD4(+) T cells, and NK cells. *Eur J Immunol* **45**:2433–2445.
47. **Rölle A, Pollmann J, Ewen E-M, Le VTK, Halenius A, Hengel H, Cerwenka A.** 2014. IL-12-producing monocytes and HLA-E control HCMV-driven NKG2C⁺ NK cell expansion. *J Clin Invest* **124**:5305–5316.
48. **Moris A, Murray S, Cardinaud S.** 2014. AID and APOBECs span the gap between innate and adaptive immunity. *Front Microbiol* **5**.
49. **Han J, Rho SB, Lee JY, Bae J, Park SH, Lee SJ, Lee SY, Ahn C, Kim JY, Chun T.** 2013. Human cytomegalovirus (HCMV) US2 protein interacts with human CD1d (hCD1d) and down-regulates invariant NKT (iNKT) cell activity. *Mol Cells* **36**:455–464.
50. **Sijmons S, Thys K, Mbong Ngwese M, Van Damme E, Dvorak J, Van Loock M, Li G, Tachezy R, Busson L, Aerssens J, Van Ranst M, Maes P.** 2015. High-throughput analysis of human cytomegalovirus genome diversity highlights the widespread occurrence of gene-disrupting mutations and pervasive recombination. *J Virol*.

FIGURE LEGENDS

FIG 1 Early NKG2C NK cell expansion but reduced expression of KIR2D in PHIP. (A) Scatter plots representing the percentages of CD3⁺CD56⁺ NK cells and mean fluorescence intensity (MFI) of CD56 assessed by flow cytometry in HCMV⁻ (n=26) or HCMV⁺ (n=39) individuals and PHIP (n=17). The intensity of fluorescence is indicated as the difference between the mean fluorescence intensity of CD56 positive cells against CD56 negative cells (Δ MFI). Frequency results are shown as mean $\pm$ SEM. (B) Representative density plots of CD3⁺CD56⁺ NK cells expressing KIR2D and NKG2C in HCMV⁻, HCMV⁺2C⁺, HCMV⁺2C⁻ individuals and PHIP. (C) Frequencies of total NKG2C⁺, KIR2D⁺ NK, KIR2D⁺NKG2C⁺, KIR2D⁺NKG2C⁻ and KIR2D⁻NKG2C⁺ NK cells for 26 HCMV⁻, 22 HCMV⁺2C⁻, 17 HCMV⁺2C⁺ individuals and 16 PHIP. Results are represented as mean $\pm$ SEM. (D) Frequencies of KIR2DL2/S2/L3⁺ and KIR2DL1/S1⁺ NK cells for 34 HCMV⁻, 36 HCMV⁺ individuals and 11 PHIP. Statistical significance (*p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001, ****p<0.0001) between more than two groups was determined using the one-way ANOVA test.

FIG 2 Activation and partial differentiation of NK cells in PHIP. (A) CD38 expression (MFI) on NK cells shown for representative HCMV⁻, HCMV⁺ individuals and PHIP. Scatter plots representing CD38 MFI on NK cells from 26 HCMV⁻, 34 HCMV⁺ individuals and 17 PHIP after deduction of MFI obtained with isotype control (Δ MFI). (B) NKG2D level expression (Δ MFI) on NK cells shown for representative HCMV⁻, HCMV⁺ individuals and PHIP. Scatter plots representing NKG2D level expression (Δ MFI) on NK cells for 23 HCMV⁻, 39 HCMV⁺ individuals and 16 PHIP. (C) Representative histograms of CD69, NKG2A, CD57 and CD8 expression on NK cells. Scatter plots representing the frequencies of NK cells expressing CD69 (n=26 HCMV⁻; n=39 HCMV⁺; n=17 PHIP), NKG2A (n=26 HCMV⁻; n=38 HCMV⁺;

n=11 PHIP), CD57 (n=26 HCMV⁻; n=39 HCMV⁺; n=16 PHIP) and CD8 (n=25 HCMV⁻; n=39 HCMV⁺; n=10 PHIP). (D) Histogram bars representing degranulation and IFN γ secretion capacities of NK cells from 6 HCMV⁻, 14 HCMV⁺ and 5 PHIP PBMCs, assessed by flow cytometry after PBMCs co-culture with medium alone or 721.221 for spontaneous activity measurement or P815, for reverse ADCC measurement. Statistical significance (*p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001, ****p<0.0001) between more than two groups was determined using the one-way ANOVA test.

FIG 3 Early differentiation of CD3⁺CD56⁻ T cells in PHIP. (A) Scatter plots representing the frequencies of CD3⁺CD56⁻ T lymphocytes. Frequency results are shown as mean $\pm$ SEM. (B) Histograms of CD4⁺, CD8⁺, CD45RA⁺ and PD-1⁺ T cell (CD3⁺ CD56⁻) frequencies from representative HCMV⁻, HCMV⁺ individuals and PHIP. Scatter plots representing the frequencies of CD3⁺ CD56⁻ T lymphocytes expressing CD4 (n=24 HCMV⁻; n=39 HCMV⁺; n=10 PHIP), CD8 (n=25 HCMV⁻; n=39 HCMV⁺; n=10 PHIP), CD45RA (n=25 HCMV⁻; n=38 HCMV⁺; n=10 PHIP), PD-1 (n=24 HCMV⁻; n=39 HCMV⁺; n=15 PHIP). (C) Density plots illustrating HLA-A2/pp65 pentamer stained CD3⁺ T lymphocytes from representative HCMV⁺ individual and PHIP. Scatter plots representing the frequencies of HLA-A2-pp65-specific CD3⁺ T cells from HCMV⁺ healthy individuals (n=13) and PHIP (n=6). (D) Scatter plots representing the frequencies of CD27⁺, CD28⁺, CD45RA⁺ T (CD3⁺ CD56⁻) cells in HCMV⁺ individuals (n=14) and PHIP (n=6) and Gzm A⁺ (granzyme A) T cells in HCMV⁺ individuals (n=12) and PHIP (n=5). Statistical significances (*p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001, ****p<0.0001) between more than two groups were determined using the one-way ANOVA test and were determined between two groups using the unpaired t-test.

FIG 4 HCMV signature on $\gamma\delta$ T cell compartment. (A) Representative histogram illustrating $\gamma\delta$ T cells stained with V δ 2 $\gamma\delta$ TCR monoclonal antibody. Scatter plots representing the

frequencies of V δ 2⁻ $\gamma\delta$ T cells in 17 HCMV⁻, 27 HCMV⁺ individuals and 15 PHIP. (B) Scatter plots representing CD16⁺ (n=16 HCMV⁻; n=26 HCMV⁺; n=15 PHIP) and CD38⁺ (n=17 HCMV⁻; n=26 HCMV⁺; n=10 PHIP) frequencies observed in V δ 2⁺ and V δ 2⁻ $\gamma\delta$ T subsets. (C) Qualitative representation of NKG2C⁺ NK cell frequency in function of the corresponding V δ 2⁻ $\gamma\delta$ T cell frequency for each individual for 16 HCMV⁺2C⁻, 11 HCMV⁺2C⁺ and 13 PHIP. Correlation graphs representing NKG2C⁺ NK cell and NKG2C⁺ T cell frequencies, CD57⁺ NK cell and CD57⁺ T cell frequencies and CD57⁺ NK cell and PD-1⁺ T cell frequencies in 15 PHIP. Statistical significance (*p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001, ****p<0.0001) between more than two groups was determined using the one-way ANOVA test. Spearman's rank correlation coefficient was calculated and indicated in C when a significant *p*-value was observed (*p*<0.05).

FIG 5 Dynamics of NK, $\gamma\delta$ and T cell subsets following the primary HCMV infection. (A) Density plots illustrating all lymphocyte frequencies using CD3/CD56 marker combinations at different time points: acute infection (P20), month 4 (M4) (P20) and month 9 (M9) (P19). Histograms representing CD38 expression on NK cells (CD3⁻ CD56⁺) at all 3 kinetic points (acute, M4 and M9) and density plots illustrating KIR2D⁺, NKG2C⁺, CD57⁺ and NKG2D⁺ NK cells. (B) Correlation graphs representing NKG2A⁺ NK cell and CD57⁺ NK cell frequencies and post-infection days for 17 PHIP. (C) Density plots representing CD8⁺ and CD45RA⁺ $\alpha\beta$ T lymphocytes at all 3 kinetic points (acute, M4 and M9). Histograms representing V δ 2⁻ T lymphocytes and CD16⁺ $\gamma\delta$ T cells among V δ 2⁻ T lymphocytes at all 3 kinetic points. (D) Correlation graphs representing CD38⁺, NKG2D⁺, CD45RA⁺, PD-1⁺, CD27⁺ and CD57⁺ T cell frequencies and post-infection days for 17 PHIP. Spearman's rank correlation coefficient was calculated and indicated in C when a significant *p*-value was observed (*p*<0.05).

FIG 6 Profound genetic modulation induced by HCMV in PHIP. (A) Principal Component Analysis (PCA) illustrating genetic profile variability in two-dimension scale after quality control and data normalization. Each dot in this plot represents each studied individual (HCMV⁻ n=13 in red, HCMV⁺2C⁻ n=12 in green, HCMV⁺2C⁺ n=12 in blue and PHIP n=11 in purple). (B) Heatmaps generated after hierarchical clustering using Cluster 3.0 and Treeview for HCMV⁻ (n=13, pink squares) versus PHIP (n=11, red squares) and HCMV⁺2C⁺ (n=12, blue squares) versus PHIP data set comparisons. Down-regulated clusters in PHIP are shown in red, and up-regulated clusters in PHIP are indicated in green. Bars indicate the number of GO categories belonging to immune response, cell cycle and other cell functions in each cluster for each data set comparison, after submission to GOMiner software to assess biological significance. GO categories were selected with a cut-off of an enrichment >1.5, a FDR <0.01 and a number of changed genes >5. (C) Bars indicate the FC for all up-regulated genes with a FC>3 involved in immune response in PHIP compared to HCMV⁻ healthy individual gene expression profile (FC>10 in dark green, FC>4 in green and 3<FC>4 in light green). (D) Bars indicate the FC for differentially expressed genes (DEG) between HCMV⁻ healthy individuals and PHIP for which protein expression was assessed by flow cytometry. Up-regulated and down-regulated genes are indicated respectively in green and red. The p-value observed for each gene is indicated.

TABLE 1 Clinical and biological characteristics of PHIP cohort.

Patient	Age	Sex	Time from the onset (days)	HCMV-IgM UI/mL	HCMV-IgG UI/mL	Avidity %	CMV viral load (log10UI/mL)	WBC x109/L	Ly %	Activated Ly %	Platelets x109/L	AST μ kat/L	ALT μ kat/L	Fever >38.5°C >7 days	Lymphadenopathy, hepatomegaly, splenomegaly	Myalgia, arthralgia	Asthenia	Other clinical symptoms or disease
P1	47	M	14	2.9	Positive	8	3.6	16.13	-	-	293	1	0.97	yes			yes	Pneumonia
P2	57	F	-	-	-	-	2.4							yes			yes	
P3	22	F	10	4.8	199	10	5.7	2.3	38	6	<i>aggregates</i>	1.16	1.39	yes				Diarrhea
P4	27	M	18	4.3	>240	24	4.5	15.34	47	12	<i>aggregates</i>	3.55	4.93	yes				Diarrhea, vomiting
P5	25	F	21	3.3	146	6	negative	3.59	40.5	2.5	157	0.58	0.39	yes	yes		yes	
P6	38	M	24	-	-	-	negative	-	-	8	-			yes	yes	yes	yes	
P7	67	M	27	3	147	7	3.7	18.63	42	18	249	1.58	0.87	yes				Diarrhea, vomiting, Pulmonary embolism
P8	31	M	27	1.5	135	16	Negative	7.28	45	1	225	1.83	2.02	yes				
P9	41	M	19	2.1	137	-	4.8	9.52	57	6	130	1.64	3.05	yes			yes	
P10	27	F	80	2.4	93	10	3.4	12.07	56	4	230	0.76	0.63	yes	yes		yes	Abdominal pain
P11	53	M	14	0.3	132	14	<2.5	6.27	38	4	106	1.9	1.65	yes			yes	
P12	59	F	-	1.9	147	-	4	9.75	59.5	4	193	3.11	4.64	yes			yes	
P13	29	M	11	7.2	50.4	-	3.4	13.52	39.5	1	498	0.98	1.2	yes		yes	yes	
P14	30	F	86	44	39.8	-	4.2	4.56	-	-	233	-	-	yes			yes	Abdominal pain, hepatitis
P15	26	F	30	<12	93.3	<5	4.5	8.76	46	6	126	0.85	1.17	yes	yes		yes	
P16	24	F	10	62.1	Positive	-	4	9.23	60	6	227	1.17	1.5					Diarrhea, vomitis, meningoradiculitis
P17	47	M	34	20.5	59.4	<5	4.3	8.11	35	6	<i>aggregates</i>	1.6	1.93	yes	yes		yes	
P18	33	M	13	48.7	>150	12	5.4	13.42	41	8	245	1.58	4.9	yes	yes	yes	yes	
P19	43	M	15	55.8	97.1	-	3.2	13.96	59	14	219	2.3	3.64	yes	yes			Cough
P20	38	M	24	30	>140	-	6.2	13.26	40	8.5	87	2.59	4.25	yes	yes		yes	Portal vein thrombosis, macrophage activation syndrome

WBC (white blood cells) N 4-10x10⁹/L. Ly (lymphocytes). Platelets N150-400 x109/L. AST (alanine transaminase) N<0.5 μ kat/L. ALT (aspartate transaminase) N<0.5 μ kat/L.

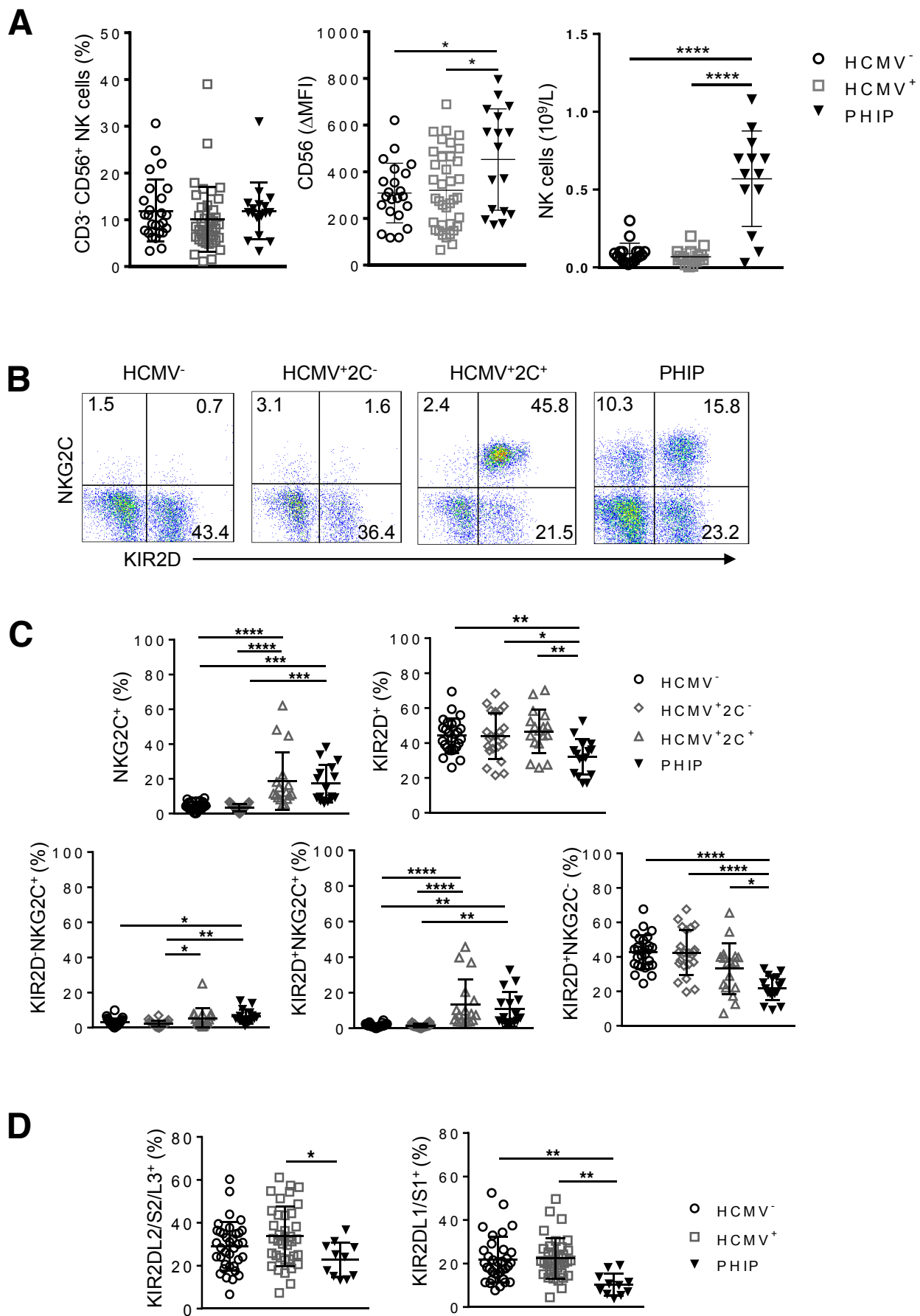
FIG 1

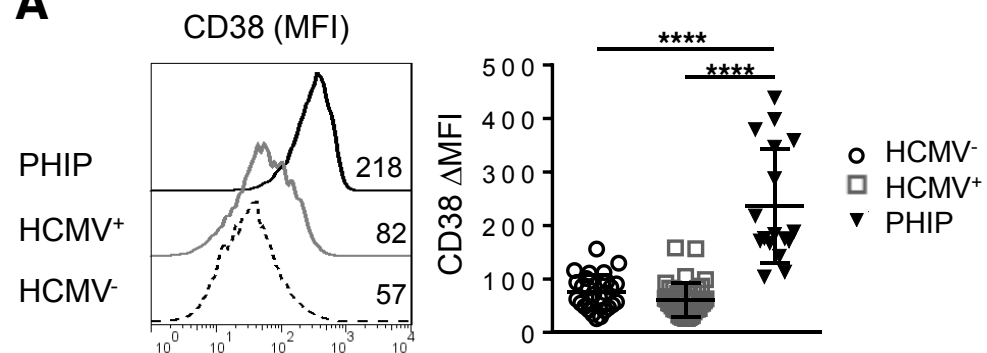
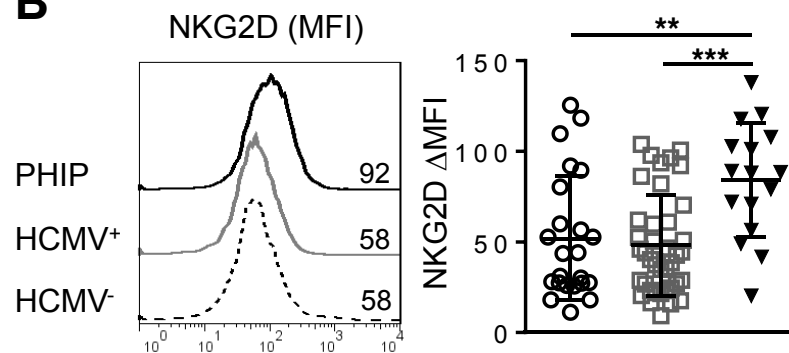
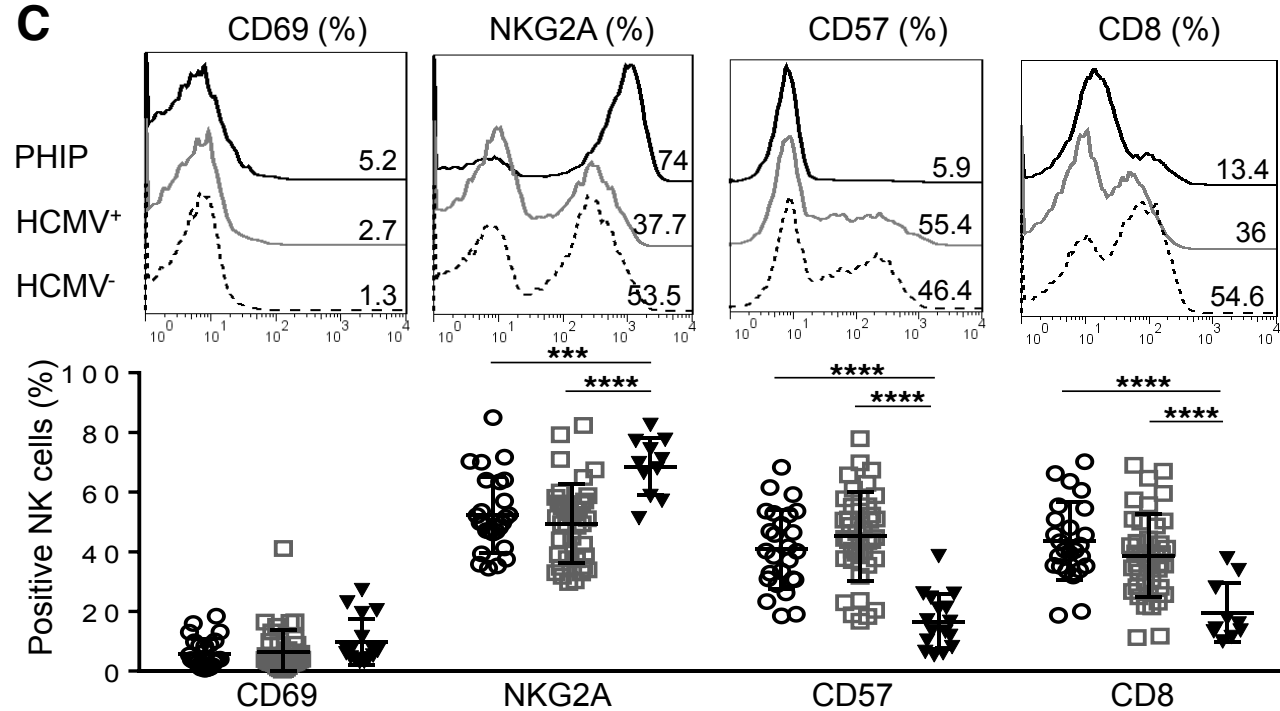
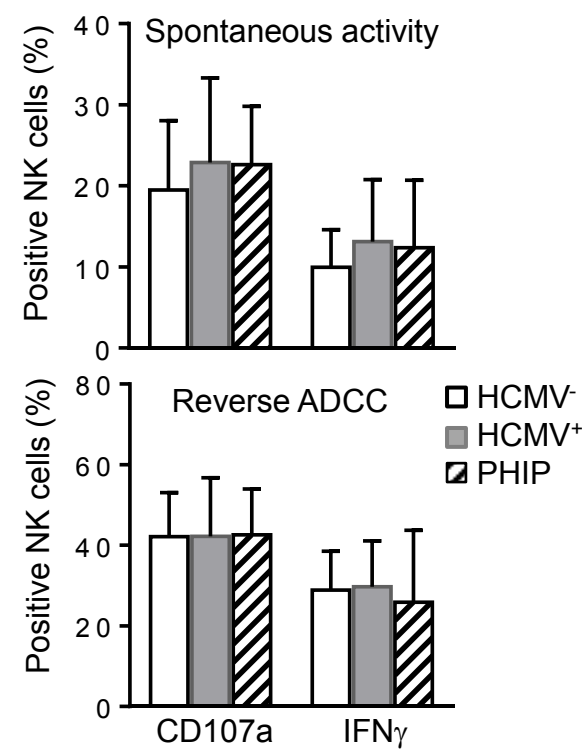
FIG 2**A****B****C****D**

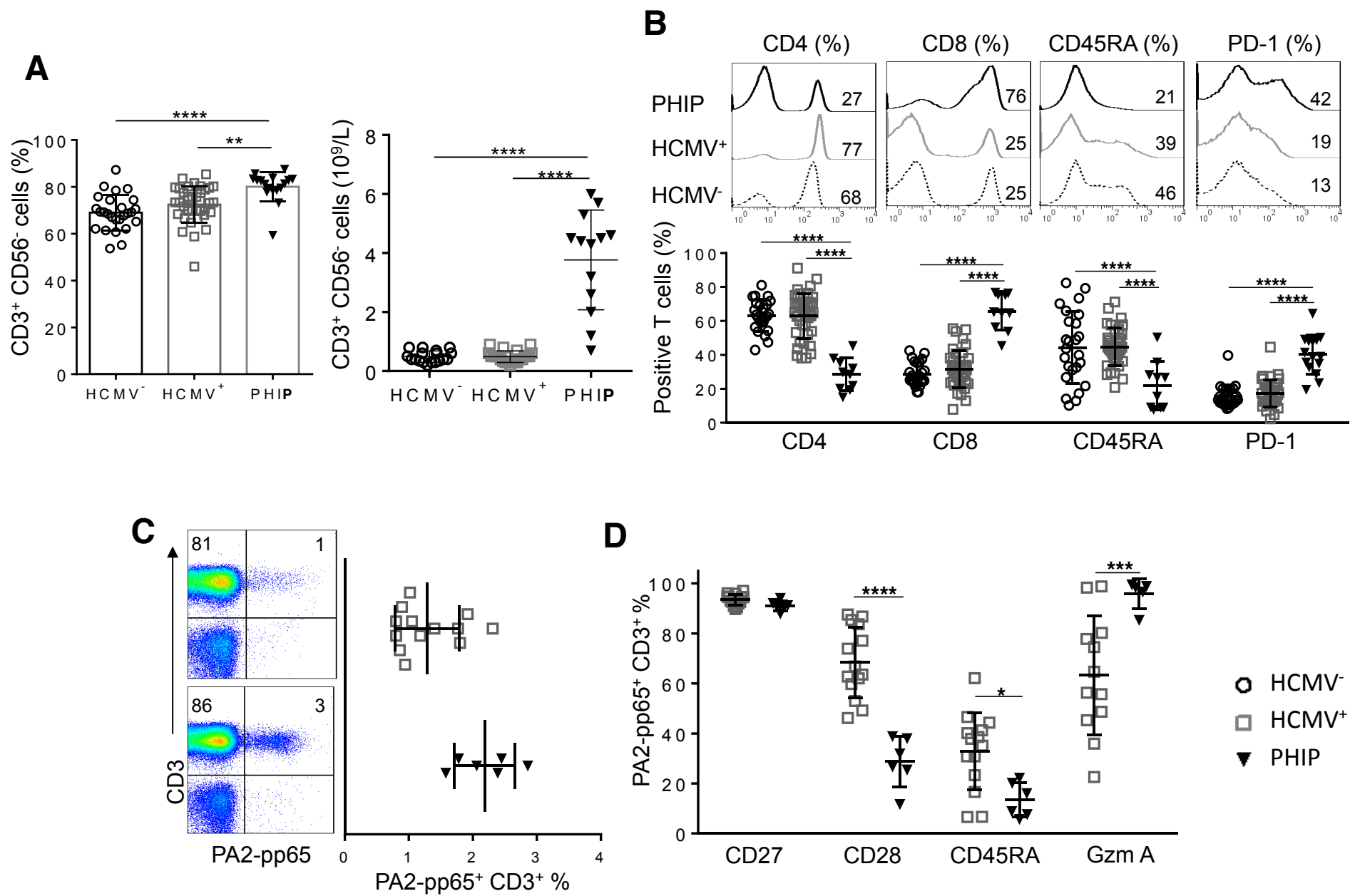
FIG 3

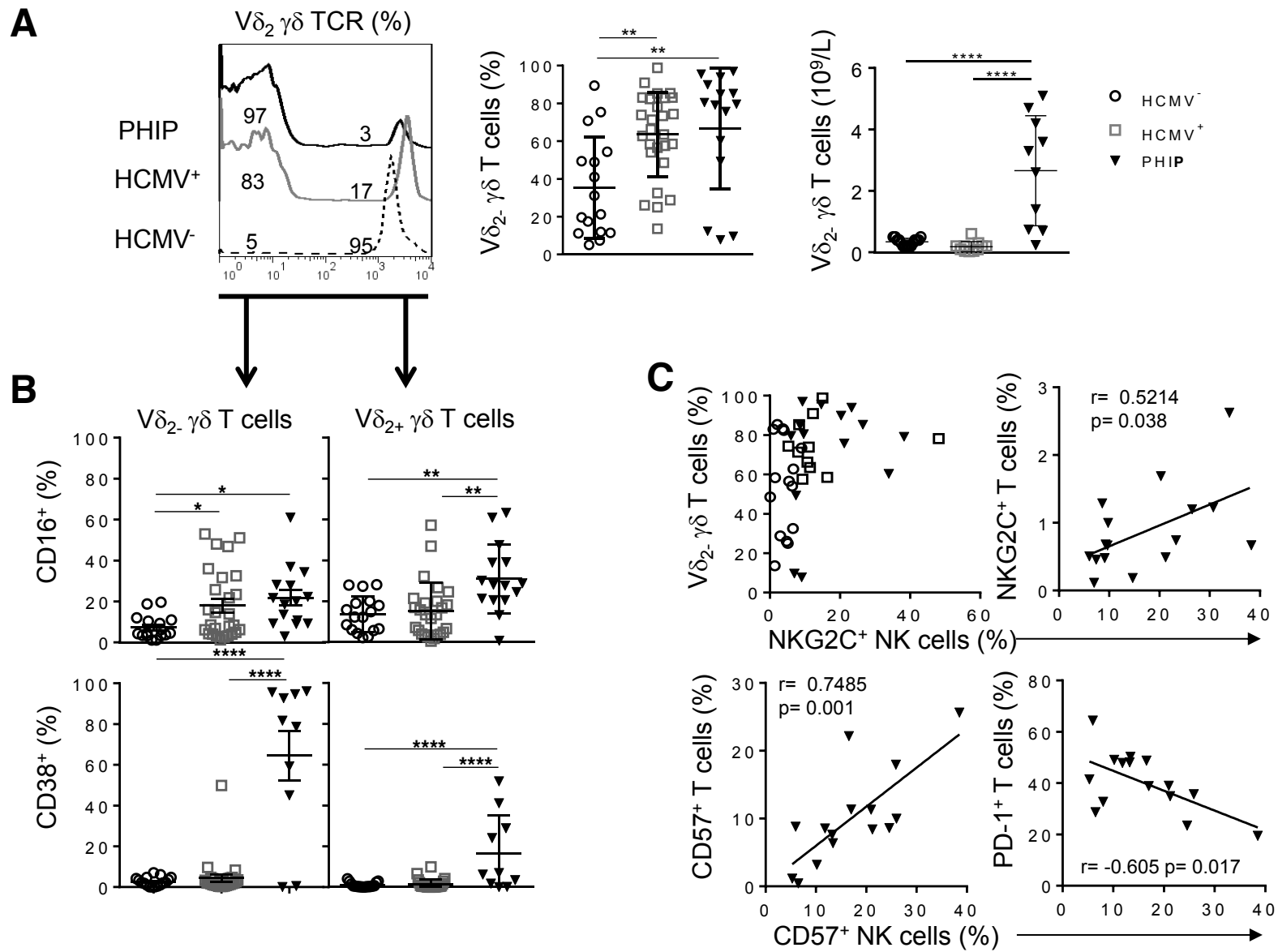
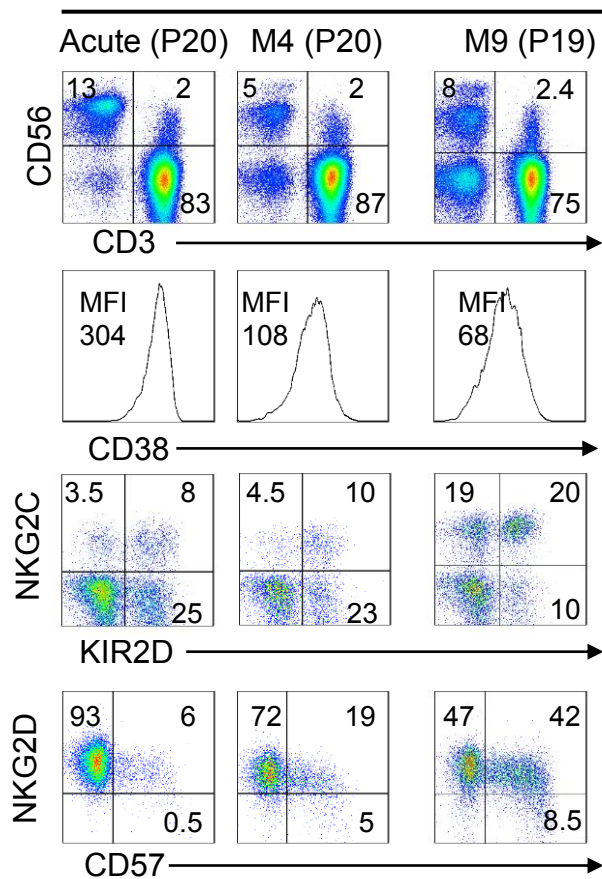
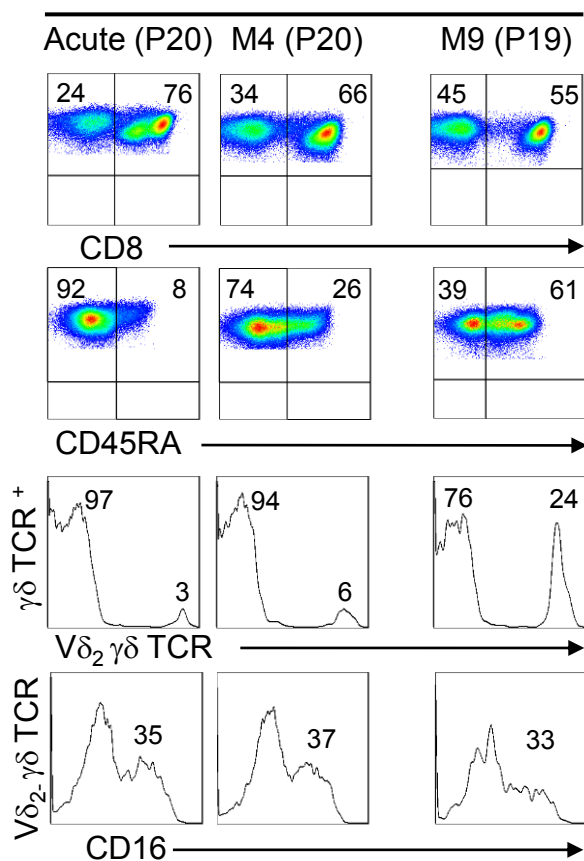
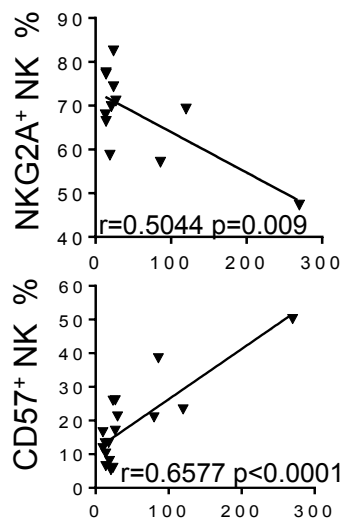
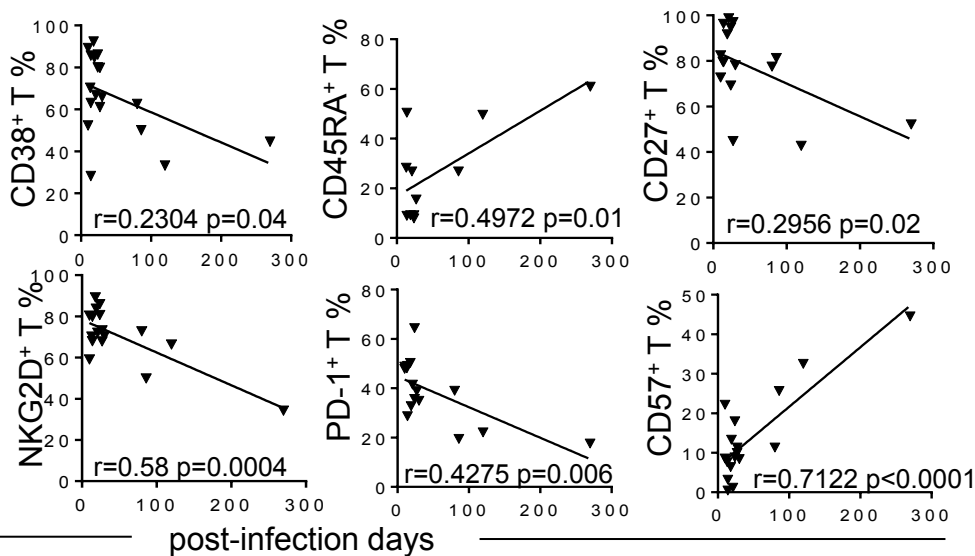
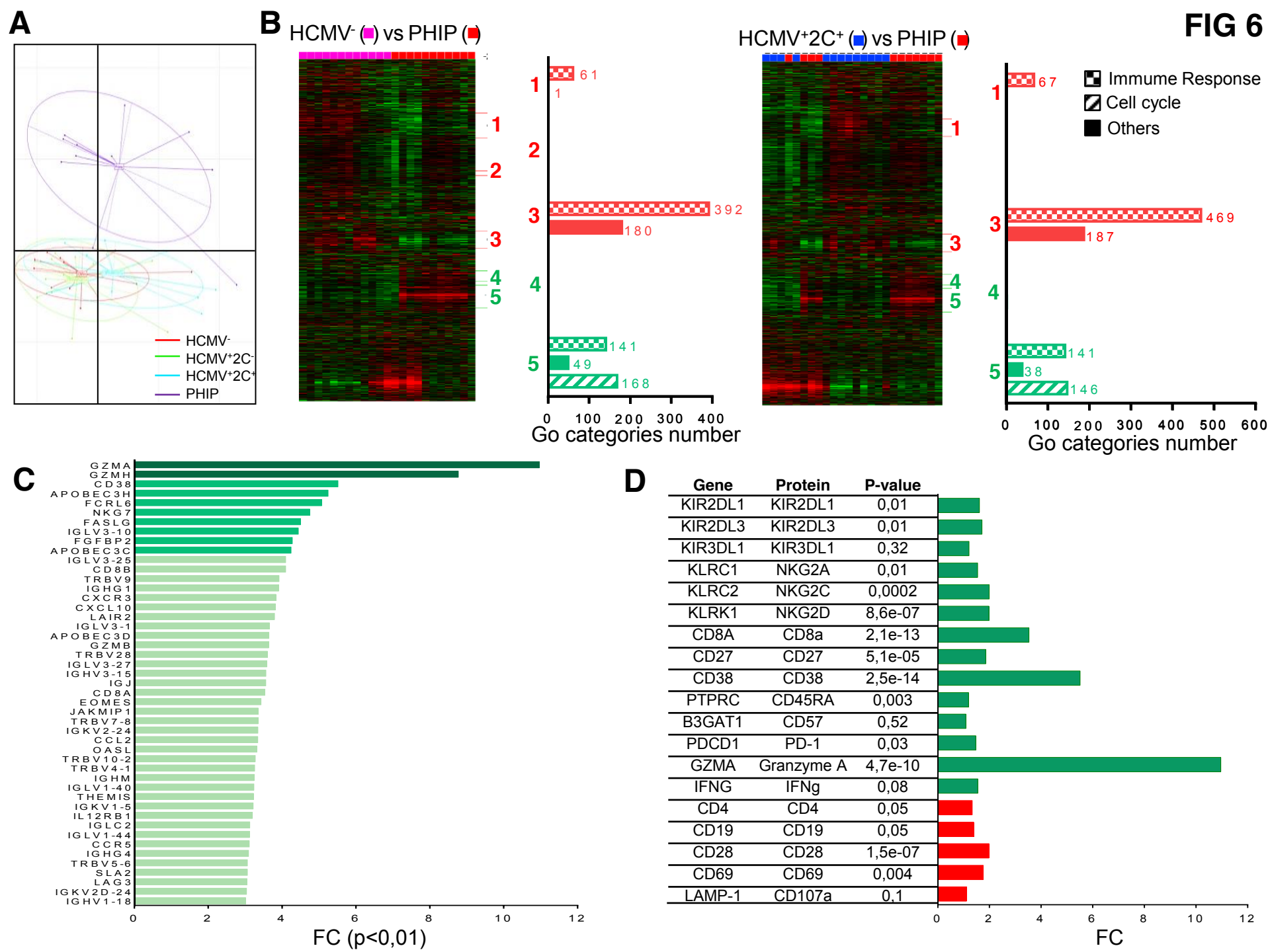
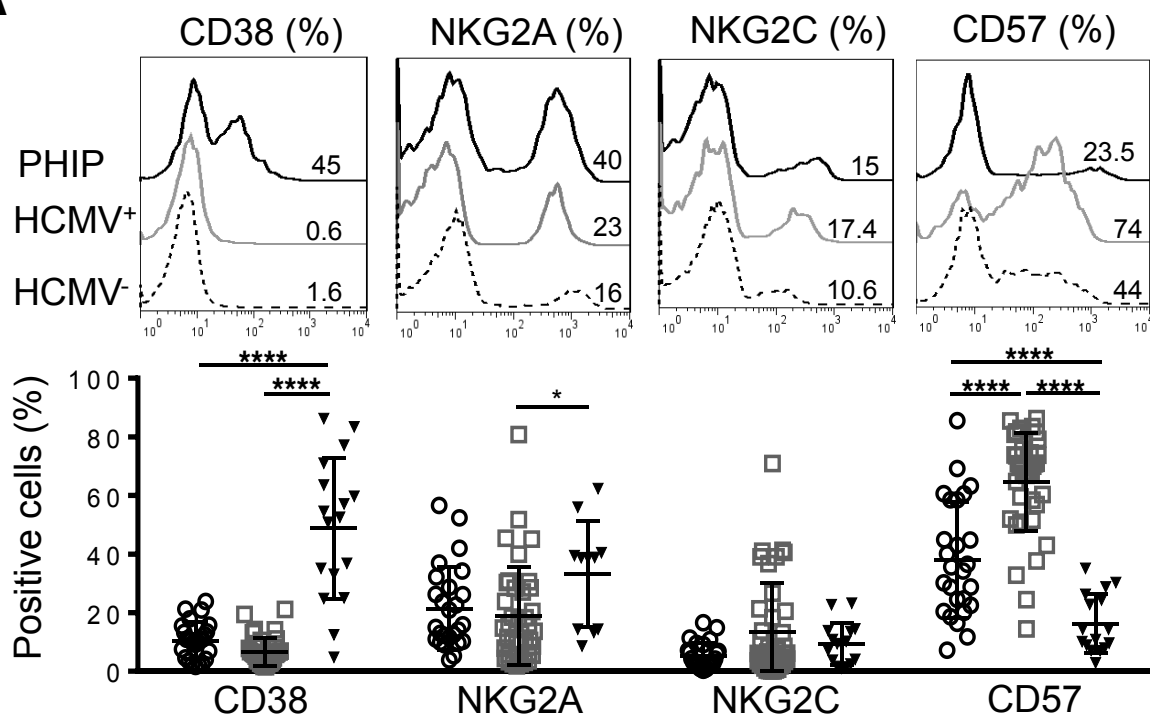
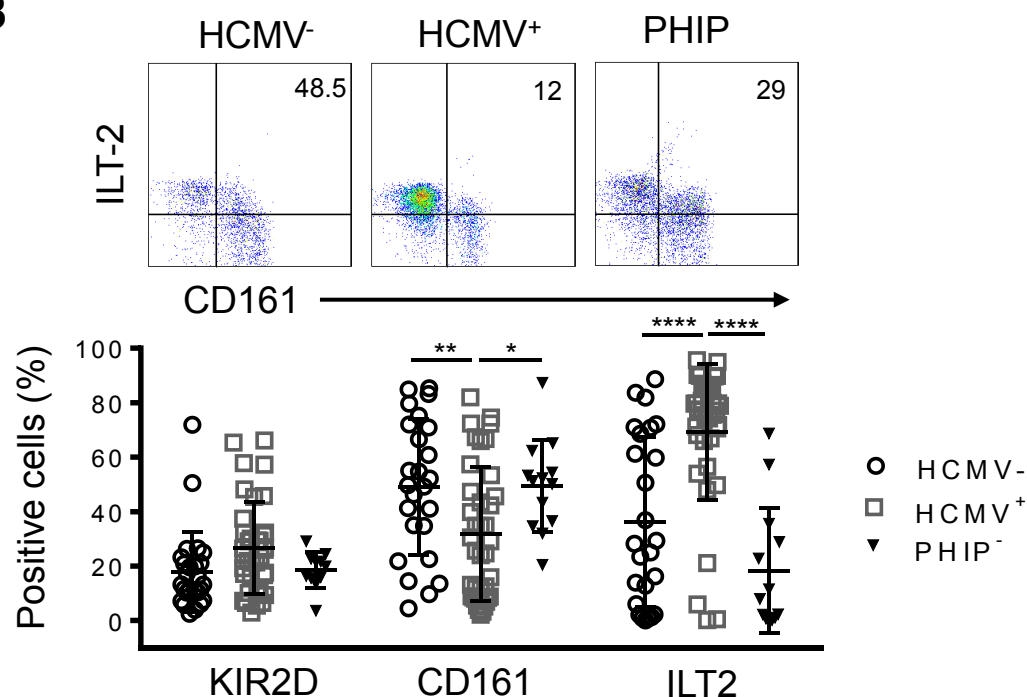
FIG 4

FIG 5**A**

NK cells

**C**CD3⁺ CD56⁻ T cells**B****D**



A**B**

Supplemental Figure 1. Phenotypic characterization of CD3⁺CD56⁺ T cells. **(A)** Representative histograms illustrating CD38, NKG2A, NKG2C and CD57 expression on CD3⁺ CD56⁺ T lymphocytes. Scatter plots representing the frequencies of CD38 (n=26 HCMV⁻; n=39 HCMV⁺; n=10 PHIP), NKG2A (n=26 HCMV⁻; n=38 HCMV⁺; n=17 PHIP), NKG2C (n=25 HCMV⁻; n=39 HCMV⁺; n=14 PHIP) and CD57 (n=26 HCMV⁻; n=39 HCMV⁺; n=16 PHIP) CD3⁺ CD56⁺ T lymphocytes. **(B)** Representative density plots illustrating CD161 and ILT-2 expression on CD56⁺ T lymphocytes (n=26 HCMV⁻; n=37 HCMV⁺; n=11 PHIP). Scatter plots representing the frequencies of KIR2D, CD161 and ILT-2 on CD56⁺ T lymphocytes in HCMV⁻, HCMV⁺ individuals and PHIP.

SUPPLEMENTAL TABLE 1 HLA and KIR genotyping of PHIP cohort.

Patients	HLA typing						HLA-B, HLA-C KIR ligands	KIR typing															Haplotype
	A*	A*	B*	B*	C*	C*		2DL1	2DL2	2DL3	2DL4	2DL5	3DL1	3DL2	3DL3	2DS1	2DS2	2DS3	2DS4	1D	2DS5	3DS1	
P1	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
P2	24:02	24:02	18:01	51:01	07:01	14:02	Bw6Bw4, C1C1	+	-	+	-	-	+	+	+	-	-	+	+	+	-	-	AB
P3	02:01	02:01	44:02	44:02	05:01	05:01	Bw4(T)Bw4(T), C2C2	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	AB
P4	02:01	02:01	39:01	44:02	05:01	12:03	Bw6Bw4(T), C1C2	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	+	-	+	AB
P5	11:01	24:02	15:01	44:03	01:02	16:01	Bw6Bw4(T), C1C1	+	-	+	+	-	+	+	+	-	-	-	-	+	-	-	AA
P6	02:01	03:01	40:02	40:02	02:02	05:01	Bw6Bw6, C2C2	+	+	-	+	+	* Null	+	+	+	+	+	+	+	+	+	AB
P8	01:01	24:02	15:01	37:01	03:04	06:02	Bw6Bw4(T), C1C2	+	-	+	+	+	* Null	+	+	+	-	+	-	+	+	+	AB
P9	02:01	30:01	39:01	53:01	04:01	07:02	Bw6Bw4, C1C2	+	-	+	+	+	* Null	+	+	+	-	+	-	-	+	+	BB
P10	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	AB
P11	02:01	24:02	14:02	18:01	08:02	12:03	Bw6Bw6, C1C1	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+	-	+	+	-	-	AB
P12	02:01	31:01	14:01	44:02	05:01	08:02	Bw6Bw4(T), C1C2	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	-	-	AA
P13	36:01	80:01	18:01	35:01	02:02	04:01	Bw6Bw6, C2C2	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	AB
P14	02:01	24:02	39:01	40:01	03:04	12:03	Bw6Bw6, C1C1	+	-	+	+	-	+	+	-	-	-	-	+	+	-	-	AA
P15	11:01	30:01	35:01	44:02	04:01	05:01	Bw6Bw4(T), C2C2	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-	+	-	-	AB
P16	11:01	29:02	07:02	56:01	01:02	07:02	Bw6Bw6, C1C1	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
P17	03:01	03:01	14:02	40:01	03:04	08:02	Bw6Bw6, C1C1	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-	+	-	-	AB
P18	24:03	68:02	35:02	49:01	04:01	07:01	Bw6Bw4(T), C1C2	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	-	-	AB
P19	32:01	32:01	13:02	40:02	02:02	06:02	Bw4(T)Bw6, C2C2	+	-	+	+	-	+	+	+	-	-	-	+	+	-	-	AA
P20	02:01	03:02	44:02	44:02	07:04	16:04	Bw4(T)Bw4(T), C1C1	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	-	-	AB

* Null allele deduced by phenotypic profile. Nd, not determined.

SUPPLEMENTAL TABLE 2 Frequencies of KIR, HLA and KIR-HLA combinations among PHIP, HCMV- and HCMV+ individuals

	PHIP vs HCMV ⁻				PHIP vs HCMV ⁺ 2C ⁻			PHIP vs HCMV ⁺ 2C ⁺			PHIP vs HCMV ⁺		
	PHIP N=17 N(%)	HCMV ⁻ N=26 N(%)	OR (95% CI)	p-value	HCMV ⁺ 2C ⁻ N=22 N(%)	OR (95% CI)	p-value	HCMV ⁺ 2C ⁺ N=17 N(%)	OR (95% CI)	p-value	HCMV ⁺ N=39 N(%)	OR (95% CI)	p-value
Haplotype AA	4 (23)	8 (31)	0.69	0.7	5 (23)	1.05	1	7 (41)	0.44	0.5	12 (31)	0.69	0.7
Haplotype B+	13 (76)	18 (69)	1.44	0.7	17 (77)	0.95	1	10 (59)	2.27	0.5	27 (69)	1.44	0.7
2DS2	8 (47)	15 (58)	0.65	0.5	13 (59)	0.61	0.5	8 (47)	1	1	21 (54)	0.76	0.8
HLA-C1	12 (70)	24 (92)	0.2	0.09	17 (77)	0.7	0.7	15 (88)	0.32	0.4	32 (82)	0.52	0.5
HLA-C2	10 (59)	14 (54)	1.22	1	12 (54)	1.19	1	11 (65)	0.78	1	23 (59)	0.99	1
HLA-C1C1	7 (41)	12 (46)	0.82	1	10 (45)	0.84	1	6 (35)	1.28	1	16 (41)	1	1
HLA-C1C2	5 (29)	12 (46)	0.49	0.3	7 (32)	0.89	1	9 (53)	0.37	0.3	16 (41)	0.6	0.5
HLA-C2C2	5 (29)	2 (8)	5	0.09	5 (23)	1.42	0.7	2 (12)	3.12	0.4	7 (18)	1.9	0.5
2DL2 + HLA-C1	4 (23)	13 (50)	0.31	0.1	9 (41)	0.44	0.3	7 (41)	0.44	0.5	16 (41)	0.44	0.2
2DL3 + HLA-C1	11 (65)	22 (85)	0.33	0.1	15 (68)	0.85	1	15 (88)	0.24	0.2	30 (77)	0.55	0.3
2DS2 + HLA-C1	4 (23)	13 (50)	0.31	0.1	9 (41)	0.44	0.3	7 (41)	0.44	0.5	16 (41)	0.44	0.2
2DL2 + HLA-C1C1	3 (18)	8 (31)	0.48	0.5	4 (18)	0.96	1	2 (12)	1.6	1	6 (15)	1.18	1
2DL3 + HLA-C1C1	6 (35)	11 (42)	0.74	0.7	9 (41)	0.79	0.7	6 (35)	1	1	15 (38)	0.87	1
2DS2 + HLA-C1C1	3 (18)	8 (31)	0.48	0.5	4 (18)	0.96	1	3 (18)	1	1	7 (18)	0.98	1
2DL1 + HLA-C2	10 (59)	14 (54)	1.22	1	10 (45)	1.71	0.5	11 (65)	0.78	1	21 (54)	1.22	0.8
2DS1 + HLA-C2	5 (29)	9 (35)	0.79	1	6 (27)	1.25	1	2 (12)	3.12	0.4	8 (20)	1.61	0.5
2DL1 + HLA-C2C2	5 (29)	2 (8)	5	0.09	4 (18)	1.87	0.46	2 (12)	3.12	0.4	6 (15)	2.29	0.28
2DS1 + HLA-C2C2	4 (23)	2 (8)	3.69	0.2	2 (9)	3.08	0.4	1 (6)	4.92	0.3	3 (8)	3.69	0.2
HLA-Bw4T	9 (53)	11 (42)	1.53	0.5	4 (18)	5.06	0.039*	6 (35)	2.06	0.5	10 (26)	3.26	0.07
HLA-Bw4I	5 (29)	16 (61)	0.1	0.01*	11 (50)	0.42	0.32	7 (41)	0.59	0.7	18 (46)	0.48	0.4
HLA-Bw4TT	2 (12)	0 (0)	NA	NA	0 (0)	7.26	0.2	1 (6)	2.1	1	1 (2)	5.07	0.2
HLA-Bw4TI	0 (0)	2 (8)	NA	NA	2 (9)	NA	NA	0 (0)	NA	NA	2 (5)	NA	NA
HLA-Bw4II	2 (12)	0 (0)	NA	NA	1 (4)	2.8	0.6	3 (18)	0.62	1	4 (10)	NA	NA
3DL1 + HLA-Bw4T	9 (53)	11 (42)	1.53	0.5	4 (18)	5.06	0.039*	6 (35)	2.06	0.5	10 (26)	3.26	0.07
3DL1 + HLA-Bw4TT	2 (12)	0 (0)	NA	NA	0 (0)	NA	NA	1 (6)	2.13	1	1 (2)	5.07	0.2
3DL1 + HLA-Bw4I	4 (23)	10 (38)	0.37	0.2	11 (50)	0.31	0.1	7 (41)	0.44	0.5	18 (46)	0.36	0.1
3DL1 + HLA-Bw4II	2 (12)	0 (0)	NA	NA	1 (4)	2.8	0.57	3 (18)	0.62	1	4 (10)	1.17	1
3DS1 + HLA-Bw4I	1 (6)	5 (19)	0.34	0.6	5 (23)	0.21	0.2	2 (12)	0.47	1	7 (18)	0.42	0.6
3DS1 + HLA-Bw4II	0 (0)	0 (0)	NA	NA	0 (0)	NA	NA	2 (12)	NA	NA	2 (5)	NA	NA

NA, Not applicable. The Bw4 motifs have been identified from HLA-A and HLA-B molecules.

RESULTATS

PROJET N°3 : Le polymorphisme viral : impact de la variabilité génétique des souches cliniques de CMV sur la virulence de l'infection

Raphaëlle Riou, Steven Sijmons, Piet Maes, Monique Girard, Audrey Rodallec, Céline Bressollette-Bodin, Berthe-Marie Imbert-Marcille, Christelle Retière

Projet en cours

Le polymorphisme viral : impact de la variabilité génétique des souches cliniques du CMV sur la virulence de l'infection

I. Introduction

Afin d'étudier les interactions du CMV avec le système immunitaire lors de l'histoire naturelle de l'infection, nous avons établi une cohorte rare, décrite dans le projet n°2, de patients immunocompétents souffrant d'une primo-infection symptomatique à CMV (*Primary HCMV-infected Patient, PHIP*). Au cours de ce précédent projet, nous avons exploré la réponse lymphocytaire des PHIP, par comparaison à celle d'individus séronégatifs ou séropositifs pour le CMV. La primo-infection à CMV induit une forte lymphocytose chez les PHIP, comme en témoignent les nombres absolus élevés des cellules NK, lymphocytes T $\alpha\beta$ et T $\gamma\delta$ chez les PHIP par rapport aux cohortes contrôles. Nous avons observé des acteurs immuns activés et nous avons retrouvé les caractéristiques phénotypiques spécifiques de l'infection à CMV préalablement décrites dans la littérature, telles que l'amplification des sous-populations NK NKG2C⁺ et T $\gamma\delta$ V δ_2 -. Malgré cela, nous avons observé un phénotype effecteur précoce des effecteurs cellulaires NK et TCD8. Ce phénotype tend à évoluer vers un profil de différenciation tardive à distance de l'épisode aiguë de la primo-infection. Ces données nous laissent à penser que bien qu'une réponse immunitaire efficace semble s'établir chez les PHIP, celle-ci pourrait être retardée, entrouvrant ainsi une fenêtre pour l'apparition de symptômes. Grâce à cette cohorte, notre objectif était de déterminer la mesure dans laquelle le polymorphisme de l'hôte ou le polymorphisme viral, ou bien les deux à la fois, était à l'origine de la perturbation de l'équilibre hôte/virus, à l'origine du développement d'une infection symptomatique chez les PHIP. Nous émettons l'hypothèse d'un

polymorphisme génétique particulier du virus qui pourrait interférer avec la dynamique de la mise en place de la réponse immunitaire.

Le CMV possède un génome à ADN double brin linéaire d'environ 235kpb. Son génome est composé d'une région unique longue (U_L) et d'une région unique courte (U_S). Celles-ci sont flanquées aux extrémités de segments répétés inversés, *Terminal Repeat Long/Internal Repeat Long* (TRL/IRL) et *Internal Repeat Short/ Terminal Repeat Short* (IRS/TRS), qui bordent respectivement les séquences U_L et U_S . Le premier génome du CMV à avoir été séquencé entièrement est celui de la souche de laboratoire AD169 (Chee *et al.*, 1990). Depuis, de nombreux isolats cliniques ont été séquencés complètement, en plus des souches utilisées en laboratoire ayant subi plus ou moins de passages *in vitro*. Par comparaison à des virus à ARN tels que les virus Influenza ou le VIH, le génome à ADN du CMV est globalement stable au cours de la vie de son hôte (Lurain *et al.*, 2006; Stanton *et al.*, 2005). *In vivo*, des mutations de résistance aux antiviraux peuvent cependant émerger chez certains patients à risque (Lurain *et al.*, 2002; Smith *et al.*, 1997). De plus, le virus peut s'adapter rapidement aux conditions de culture dans lequel il se trouve. Les souches de laboratoires AD169 et Towne l'illustrent parfaitement, avec la délétion d'un fragment de 15kpb et 13kpb respectivement au sein de la région U_L de leur génome. Cette région gouverne notamment le tropisme cellulaire et les propriétés d'évasion au système immunitaire. Ces souches, après de nombreux passages sur fibroblastes, ont ainsi perdu leur tropisme endothéiotrope et leur virulence *in vivo* dans des expériences de vaccination (Neff *et al.*, 1979; Quinnan *et al.*, 1984). Il a été montré que les gènes UL128-131, qui conditionnent le tropisme endothéiotrope du CMV, sont absents des souches AD169 et Towne (Dolan *et al.*, 2004). A l'inverse, les isolats cliniques séquencés présentent tous cette région au sein de leur séquence génomique. La délétion d'une portion de la région U_L des souches AD169 et Towne n'affecte pas la taille de leur génome, puisque des séquences répétées y sont insérées.

D'autres altérations ont été identifiées dans la séquence des souches AD169 et Towne. Ainsi, la souche AD169 possède des mutations qui affectent le cadre ouvert de lecture des gènes RL5A, RL13, UL36 et UL131A. Les gènes RL13, UL1, UL40, UL130, US1 et US9 sont altérés dans la souche Towne (Bradley *et al.*, 2009). Actuellement, le génome de la souche de laboratoire Merlin, isolée à partir d'une infection congénitale et ayant subi un faible nombre de passages *in vitro*, sert de séquence de référence du CMV *wild-type*, avec 165 cadres ouverts de lecture (*Open Reading Frame*, ORF) et 15 familles de gènes décrits (Dolan *et al.*, 2004) (Figure 1).

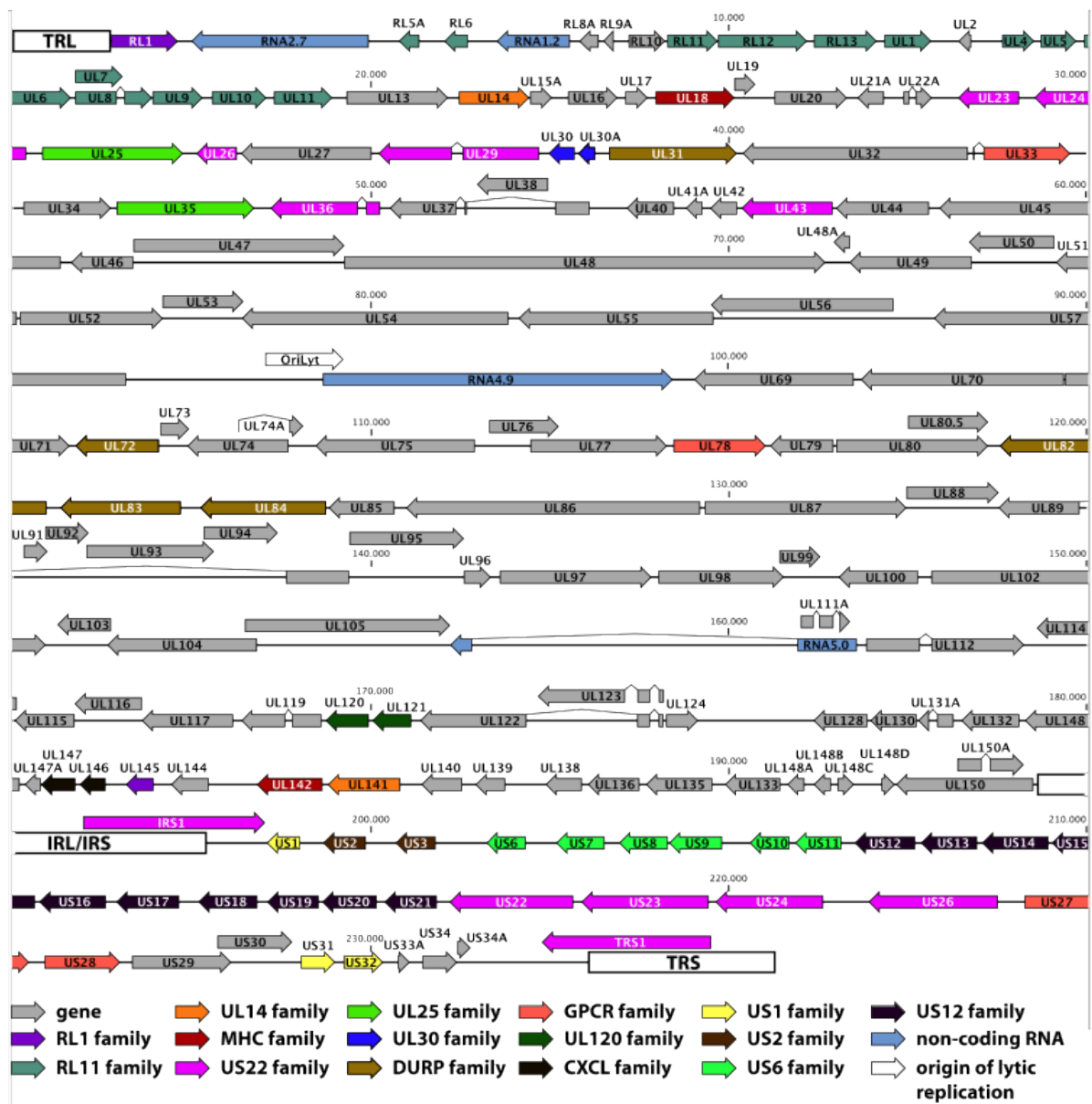


Figure 1 : Carte génomique de la souche de référence du CMV Merlin. Le génome à ADN du CMV, représenté ici de façon simple brin, est composé d'une région unique longue, U_L, et d'une région unique courte, U_S. La première est flanquée aux extrémités des régions inversées répétées TRL/IRL et la seconde des régions IRS/TRS. Les gènes sont représentés par des flèches selon leur famille d'appartenance. D'après Sijmons S *et al*, 2014.

En plus de sa capacité à s'adapter à son environnement *in vitro*, l'hétérogénéité génétique du CMV a été mise en évidence par le séquençage d'isolats cliniques (Cunningham *et al.*, 2010; Murphy *et al.*, 2003; Rasmussen *et al.*, 2002). Cette variabilité génétique suggère une pression d'évolution nécessaire à l'adaptation à l'hôte. Par ailleurs, nos connaissances concernant la capacité codante du CMV sont encore incomplètes. Il apparaît donc nécessaire

d'implémenter notre compréhension du génome du CMV et de sa variabilité génétique *in vivo*. L'utilisation des nouvelles technologies de séquençage de nouvelle génération (*Next Generation Sequencing*, NGS) pour l'étude des souches virales a considérablement modifié la portée et la dynamique de la recherche en génomique virale, dont celle du CMV. Le séquençage à haut débit permet ainsi de mieux appréhender la diversité des génomes viraux circulants. Cette technologie permet également la recherche de nouveaux marqueurs de pathogénicité à grande échelle. Il est notamment bien décrit pour le CMV que les interactions entre le virus et le système immunitaire sont complexes et variées. Il est probable que la modulation de ces interactions puisse influencer sur la virulence des souches virales. Comme nous l'avons évoqué au cours de l'introduction, le génome du CMV présente de nombreux gènes dédiés à l'évasion au système immunitaire. Le CMV code pour des protéines qui interfèrent avec l'expression membranaire des molécules HLA de classe I et II (gpUS2, gpUS3, gpUS6, gpUS11) afin d'échapper à la réponse lymphocytaire T (Tomazin *et al.*, 1999; Hegde and Johnson, 2002; del Val *et al.*, 1992; Jones *et al.*, 1996 ; Park *et al.*, 2004 ; Ahn *et al.*, 1996; Hewitt, Gupta, Lhner, 2001). La perturbation de l'expression des molécules HLA de classe I à la surface des cellules infectées devrait les rendre susceptibles à la lyse par les cellules NK par le mécanisme de la reconnaissance du soi manquant. Afin de se soustraire à la réponse NK, le CMV exprime d'une part une protéine homologue aux molécules HLA de classe I, gpUL18, capable de s'engager avec le récepteur inhibiteur ILT-2 exprimé par les cellules NK. D'autre part, le CMV exprime gpUL40 qui contient une séquence identique à celle des peptides dérivés des molécules HLA de classe I présentés par HLA-E. Ainsi, par le maintien de l'expression de la molécule HLA-E, ligand du récepteur inhibiteur CD94/NKG2A, à la surface des cellules infectées, la protéine virale gpUL40 permet l'échappement à la lyse des cellules infectées par les cellules NK CD94/NKG2A⁺. Grâce aux protéines gpUL116, gpUL142 et au miRNA miR-UL122, le CMV inhibe également l'expression des molécules de

stress (MICA, MICB, ULBP) à la surface des cellules infectées, empêchant ainsi leur reconnaissance par le récepteur activateur NKG2D. Enfin, le CMV produit sa propre cytokine immunosuppressive, cmvIL-10, capable de se lier au récepteur à l'IL-10 humaine (Kotenko, 2000). Plusieurs études ont décrit une association entre le polymorphisme viral et le degré de sévérité de l'infection à CMV. Ainsi, la présentation différentielle par les molécules HLA de peptides issus des protéines immunodominantes IE1 et pp65 et de la glycoprotéine d'enveloppe gB du CMV a été mise en évidence, comme la reconnaissance différentielle de ces complexes par les lymphocytes T CD4 et CD8 principalement chez les patients transplantés (Retière C, 2003 ; Prod'Homme V; Ameres S). Certaines mutations dans les gènes UL18 et UL40 ont aussi été associées à la modulation de la reconnaissance des cellules infectées par les cellules NK (Heatley *et al.*, 2013).

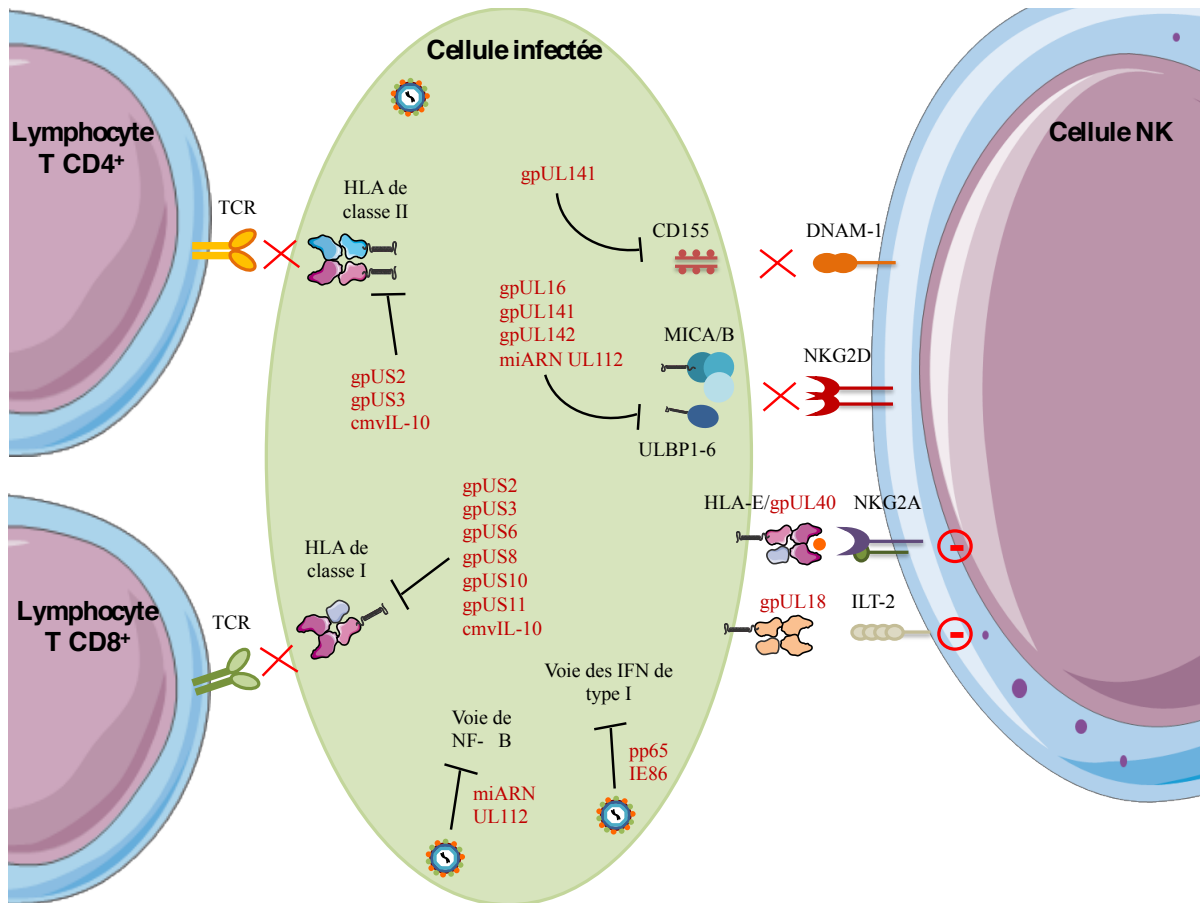


Figure 2 : Les principaux mécanismes d'échappement à la réponse immunitaire mis en place par le CMV.

C'est dans ce contexte que nous avons souhaité séquencer par NGS des souches de CMV isolées à partir de notre cohorte de PHIP, ainsi que la souche VHL/E utilisée au sein de notre laboratoire. Il s'agit d'une souche ayant subi peu de passages *in vitro* et qui a donc conservé son tropisme endothélotrope. Cette dernière n'a pas encore été séquencée et demeure peu caractérisée. Lors de ce projet, nous avons souhaité privilégier la technologie NGS, qui permet d'avoir accès de façon simple et rapide, par comparaison aux technologies traditionnelles de séquençage, à une quantité importante d'informations quant au génome viral séquencé. La technologie NGS étant encore peu développée en France pour le séquençage du CMV, nous avons établi une collaboration avec les Drs Piet Maes et Steven Sijmons, membres du groupe du Pr Marc Van Ranst du Rega Institute situé à Louvain en

Belgique. En effet, P. Maes et S. Sijmons ont récemment mis au point une méthode d'amplification et de purification de l'ADN viral adaptée au séquençage par NGS (Sijmons *et al.*, 2014b, annexe), méthode à laquelle j'ai eu l'opportunité d'être formée grâce à un séjour de trois semaines au sein de leur laboratoire. Grâce à ce protocole, le groupe de M. Van Ranst a largement contribué à l'augmentation du nombre de séquences génomiques complètes du CMV disponibles et répertoriées sur GenBank, avec plus de 100 génomes séquencés en un court laps de temps (Sijmons *et al.*, 2015, annexe). Ayant subi très peu de passages *in vitro*, ces séquences proviennent de souches cliniques, isolées à partir de femmes enceintes, de patients transplantés ou d'enfants infectés de façon congénitale.

Les souches cliniques ont été isolées à partir d'échantillon d'urine de quelques-uns des PHIP sur fibroblastes. Deux isolats cliniques issus de PHIP ainsi que la souche VHL/E ont pu être séquencés. Grâce à l'alignement des séquences obtenues par NGS, nous avons d'abord mené une analyse comparative des génomes des souches séquencées par rapport à des souches de laboratoires et d'isolats cliniques dont les séquences génomiques sont disponibles. Nous nous sommes ensuite attachées à l'étude des gènes précédemment décrits par le groupe de M. Van Ranst comme les plus conservés et les plus divergents au sein des souches du CMV (Sijmon S *et al.*, 2015). Puis, nous nous sommes intéressées aux conséquences de la variabilité génétique des souches du CMV sur la séquence en acides aminés des protéines gpUL18, gpUL40, gpUL142 et gpUL147, connues pour leur polymorphisme et leur interaction probable avec le système immunitaire. Enfin, nous avons également analysé le polymorphisme des épitopes issus des protéines IE1 et pp65, deux protéines immunodominantes du CMV, et présentés par les molécules HLA. Ce travail préliminaire devrait permettre, à terme, d'évaluer l'impact fonctionnel de la variabilité génétique du CMV qui pourrait contribuer au développement d'une primo-infection symptomatique chez l'adulte immunocompétent.

II. Matériels et méthodes

II. 1. Isolation et amplification des souches virales cliniques

Dix-sept échantillons d'urine ont été prélevés à partir de patients immunocompétents diagnostiqués avec une primo-infection sévère à CMV (PHIP) au service des maladies infectieuses et tropicales du CHU de Nantes. Le diagnostic reposait sur des critères sérologiques, comme la présence d'IgM, séroconversion IgM/IgG ou l'avidité faible des IgG (LIAISON® CMV IgG; LIAISON® CMV IgM and LIAISON® CMV IgG Avidity tests, Diasorin, Saluggia, Italie). Une PCR en temps réel à partir de sang total a également été réalisée (Bressollette-Bodin *et al.*, 2009), témoin d'une répllication virale active. Les échantillons ont été inoculés sur des fibroblastes MRC5 (Biomérieux, Marcy-L'étoile, France) confluent ensemencés à raison de 10^5 cellules/flasque de 25cm^2 et cultivés dans du milieu MEM (Life Technologies, Paisley, UK) contenant 8% de sérum de veau fœtal (Life Technologies), 3% de pénicilline-streptomycine (Life Technologies). Les flasques ont été placés à 37°C sous une atmosphère à 5% de CO_2 . Les cellules ont été dupliquées une fois toutes les deux semaines par dilution de la suspension cellulaire au $\frac{1}{2}$ dans deux flasques de 25cm^2 (deux passages au maximum). L'apparition d'un effet cytopathogène (ECP) a été contrôlée quotidiennement. Trois souches cliniques ont ainsi pu être propagées sur fibroblastes, à partir des urines des patients P7, P12 et P19. Elles ont été congelées puis adressées au laboratoire du Pr M. Van Ranst.

II. 2. Amplification de la souche VHL/E

La souche endothéiotrope VHL/E, fournie par le Pr J Waldman (Columbus, Ohio, USA), a d'abord été amplifiée sur des cellules endothéliales (Human Umbilical Vein Endothelial Cells, HUVEC) (Promocell, Heidelberg, Allemagne) confluentes ensemencées à raison de $1,5 \times 10^5$ cellules/flasque de 25cm^2 cultivées dans du milieu EBM-2 (Endothelial

Basal Medium) complémenté en facteurs de croissance (Lonza, Bâle, Suisse). Les HUVEC infectées sont congelées après sept jours d'incubation à 37°C, 5% CO₂. Le passage sur HUVEC permet de conserver le tropisme endothélial de la souche VHL/E. Le CMV VHL/E est ensuite propagé, à partir des HUVEC infectées, à plus grande échelle sur fibroblastes MRC5 (Biomérieux) cultivés en flasques de 75cm² comme décrit ci-dessus.

II. 3. Purification et amplification de l'ADN viral

En raison de la faible quantité de particules virales isolées dans le surnageant des cellules infectées, il est nécessaire de purifier l'ADN viral intracellulaire et de l'isoler de l'ADN cellulaire. Pour cela, l'équipe du Pr M Van Ranst a développé un protocole de purification et d'amplification de l'ADN du CMV, adapté de Singzer *et al* (Singzer *et al.*, 1999), en vue du séquençage par NGS (Sijmons *et al.*, 2014). Les souches cliniques qui ont été isolées sont amplifiées sur fibroblastes MRC5 confluents cultivés dans trois flasques de 75cm² (deux passages maximum). Les MRC5 sont récoltés puis poolés. Les cellules sont lysées à l'aide d'un tampon de perméabilisation Tris contenant du sucrose et du Triton X-100. L'ADN cellulaire est ensuite digéré à l'aide d'une nucléase micrococcalle (Thermo Fischer Scientific, Waltham, MA, USA), l'ADN viral étant toujours encapsidé. Celui-ci est ensuite extrait à l'aide du kit QIAmp DNA Blood Mini Kit (Qiagen, Venlo, Netherlands), puis amplifié par la méthode de déplacement multiple grâce au kit REPLI-g Mini Kit (Qiagen). Trois réactions d'amplification indépendantes sont réalisées par échantillon puis poolées. La quantité d'ADN viral et cellulaire est ensuite évaluée par PCR quantitative (qPCR), par amplification d'une portion du gène codant pour la protéine UL86 et d'une portion du gène codant pour la β -globine respectivement.

A l'issue de cette étape de purification et d'amplification de l'ADN viral, les souches cliniques P12 et P19 ainsi que VHL/E ont atteint une qualité permettant leur séquençage. La

figure 3 représente de façon schématique les étapes d'isolement et d'amplification des souches virales, suivies de la purification et de l'amplification de l'ADN viral.

II. 4. Séquençage par NGS de l'ADN viral

La préparation des librairies a été réalisée comme décrit précédemment (Sijmons S *et al.*, 2014) par l'équipe du Pr M. Van Ranst après mon départ de Louvain. Les librairies ont été séquencées sur un système Illumina NextSeq 500 (Illumina, San Diego, CA, USA) selon les instructions du fournisseur.

II. 5. Assemblage des séquences virales

L'ensemble des étapes d'assemblage des séquences virales a été réalisée grâce au logiciel CLC Genomics Workbench v8 (Qiagen). La qualité des *reads* a tout d'abord été évaluée afin d'éliminer les séquences présentant plus de deux ambiguïtés par position nucléotidique. Un assemblage *de novo* a ensuite été réalisé, donnant lieu à une liste de blocs de *reads* chevauchants, que sont les *contigs*. Chaque *contig* de plus de 1000pb a été testé sur le logiciel afin de sélectionner une séquence de référence répertoriée sur NCBI pour laquelle un maximum de similarité est observé. Dans notre étude, la souche BE/32/2010 (numéro accession GenBank : KP745634) a servi à l'alignement des souches P12, P19 et VHL/E. Les *contigs* ont ensuite été alignés à cette séquence de référence afin de générer une séquence hybride, où les zones d'absence de couverture de la souche séquencée sont complétées par la séquence de référence. L'ensemble des *reads* a alors été assemblé à cette séquence hybride afin d'extraire une séquence consensus. Ces deux dernières étapes ont été répétées jusqu'à ce qu'un maximum de *reads* soit aligné. La séquence consensus obtenue a ensuite été inspectée manuellement sur le logiciel Tablet v1.12.12.05. L'assemblage des séquences virales réalisé sous CLC Genomics Workbench est schématisé par la figure 4.

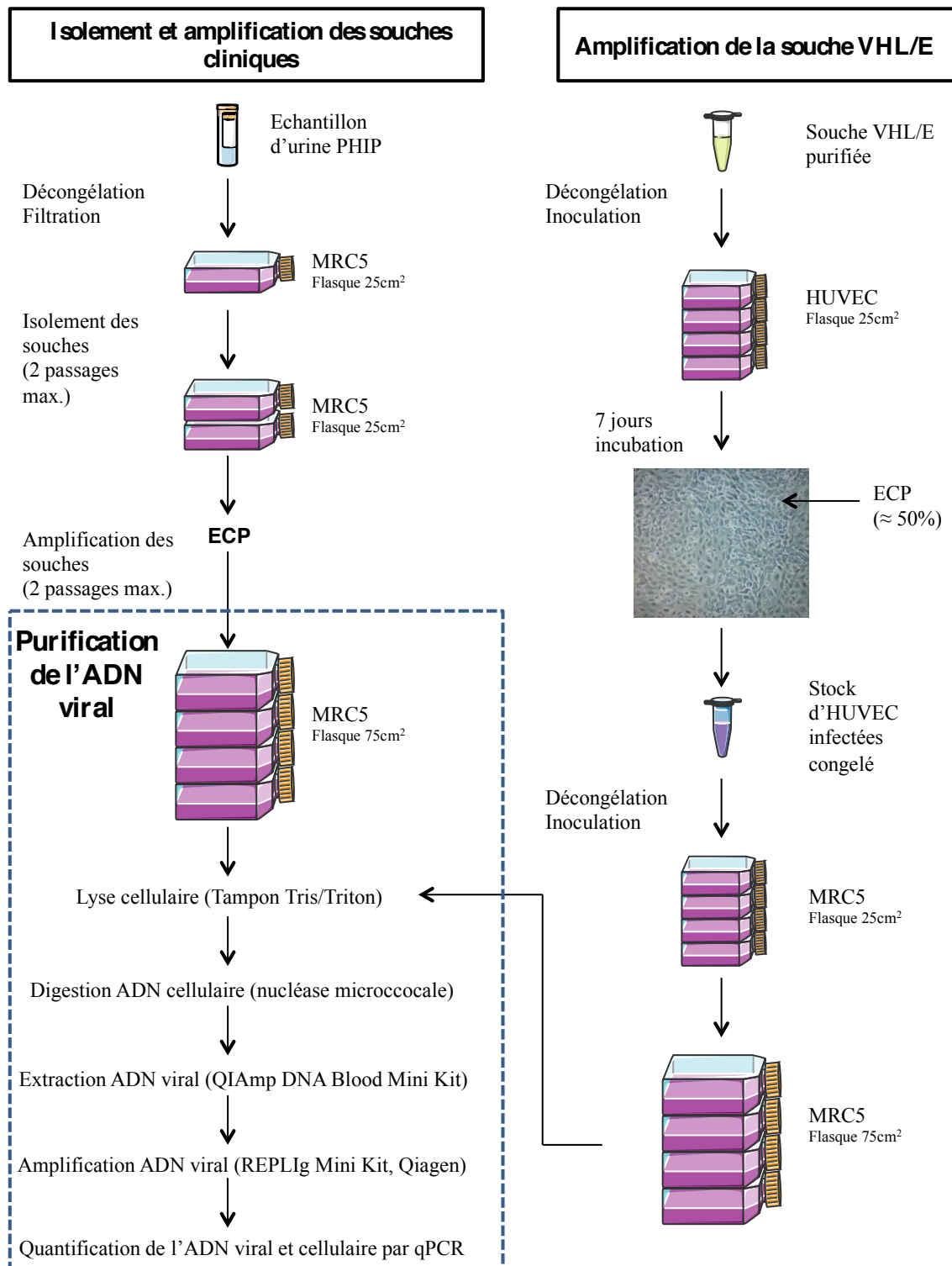


Figure 3 : Protocole d'isolement et d'amplification des souches cliniques du CMV et de VHL/E. Représentation schématique de l'isolement (pour les souches cliniques issues des PHIP) et l'amplification des souches cliniques et VHL/E, à partir de fibroblastes MRC5 infectés, suivies de la purification et de l'amplification de l'ADN viral. La partie du protocole réalisée à Louvain est indiquée dans l'encadré en pointillé. Les étapes préalables ont été réalisées au sein de notre laboratoire ou de celui de virologie du CHU de Nantes.

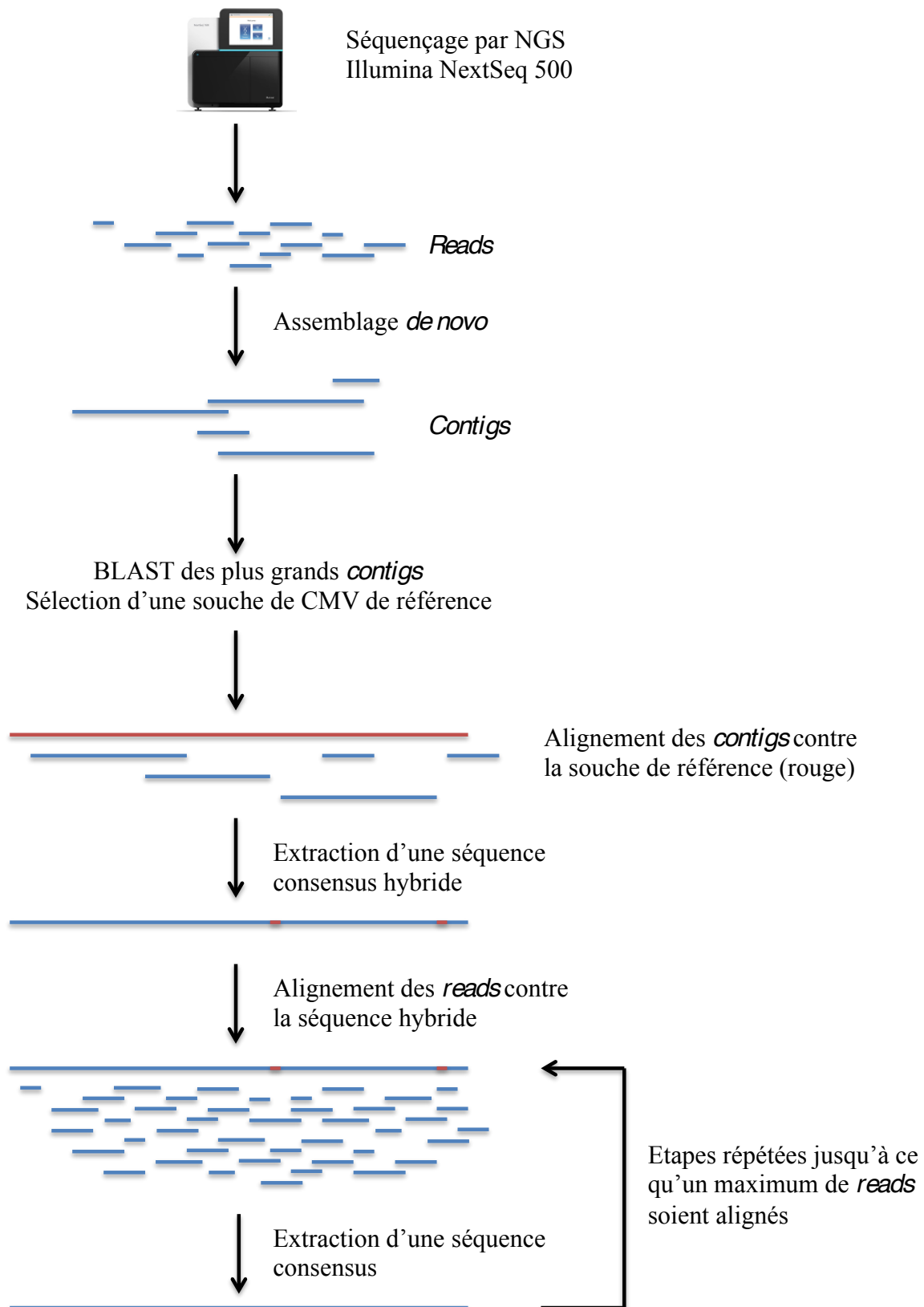


Figure 4 : Protocole d'alignement des séquences virales. Représentation schématique de la méthode d'alignement des séquences P12, P19 et VHL/E grâce au logiciel CLC Genomics Workbench. D'après Sijmons S *et al.*, 2014.

II. 6. Analyse de la variabilité génétique des souches séquencées

Les séquences génomiques des souches Merlin, AD169, Towne, Toledo et TB40/E et d'une sélection d'isolats cliniques ont été importées à partir de GenBank sur CLC Genomics Workbench (Tableau 1) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>).

Souche	Accession GenBank	Souche	Accession GenBank	Souche	Accession GenBank	Souche	Accession GenBank	Souche	Accession GenBank
Merlin	NC_006273	BE/2/2012	KP745710	BE/44/2011	KP745715	BE/15/2011	KP745720	BE/49/2011	KP745725
AD169	FJ527563	BE/24/2011	KP745711	BE/16/2010	KP745716	BE/14/2010	KP745721	BE/30/2010	KP745726
Towne	FJ616285	BE/19/2010	KP745712	BE/2/2010	KP745717	BE/40/2011	KP745722	BE/17/2010	KP745727
Toledo	GU937742	BE/35/2011	KP745713	CZ/1/2011	KP745718	BE/37/2011	KP745723	BE/4/2010	KP745728
TB40/E	KF297339	BE/29/2010	KP745714	BE/26/2010	KP745719	BE/4/2012	KP745724	BE/32/2010	KP745634

□

Tableau 1 : Liste des souches de CMV dont le génome est séquencé et disponible sur GenBank.

Ces séquences ont d'abord permis l'élaboration d'un arbre phylogénétique, afin de situer la variabilité des séquences des souches P12, P19 et VHL/E par rapport aux génomes dont la séquence est déjà disponible. Ensuite, la séquence des souches P12, P19 et VHL/E ont été alignées avec celles de Merlin et de l'AD169. A partir de ces alignements, nous avons inspecté manuellement les gènes précédemment décrits comme les plus conservés et les plus divergents par l'équipe du Pr M. Van Ranst (Sijmons *et al.*, 2015). Nous avons comparé la variabilité de ces gènes en termes de polymorphismes nucléotidiques ponctuels (*Single Nucleotide Polymorphism*, SNP), d'insertions et de délétions.

II. 7. Analyse de l'impact de la variabilité génétique des souches séquencées sur la séquence peptidique

A partir du résultat de l'alignement des souches P12, P19 et VHL/E, une recherche de variants génétiques a été réalisée *via* le logiciel Samtools. Cette dernière étape réalisée sous Linux a été effectuée par le Dr Benjamin Cogné (UMR1089, Nantes). Cette analyse permet d'identifier la conséquence des SNP sur la séquence en acides aminés des protéines codées par les souches P12, P19 et VHL/E par rapport à la souche BE/32/2010. Afin de déterminer l'impact des SNP observés au sein des gènes UL18, UL40, UL124, UL147, UL123 et UL83 sur les protéines qu'ils codent, leur séquence peptidique a été alignée manuellement à partir de celle de la souche BE/32/2010. Les séquences peptidiques ont aussi été comparées à celles de Merlin et de l'AD169.

Pour les protéines IE1 (UL123) et pp65 (UL83), les épitopes immunodominants connus ont été recherchés. Puis, une analyse de prédiction de nouveaux épitopes de forte affinité pour les molécules HLA de classe I présentes chez les patients P12 et P19 a été réalisée par la soumission des séquences peptidiques IE1 et pp65 au logiciel NetMCH (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetMHC/>).

III. Résultats

III. 1. Données générales sur la qualité et la quantité des *reads* obtenues

Lors de leur isolement, les souches P12 et P19 ont volontairement subi un nombre de passage limité sur fibroblastes *in vitro* afin d'éviter l'apparition de mutations précoces due à ces nouvelles conditions environnementales. L'exploitation du logiciel CLC Genomics Workbench nous a permis de réaliser l'assemblage des séquences des souches P12, P19 et VHL/E. Nous avons obtenu une séquence consensus pour chacune d'entre elles. La séquence de la souche clinique BE/32/2010 est apparue comme la plus proche des souches P12 et P19 et a servi de séquence de référence pour leur assemblage. Il s'agit d'une souche isolée en Belgique par l'équipe du Pr M. Van Ranst à partir de liquide amniotique. Cette souche a subi un seul passage sur fibroblastes *in vitro*. Elle a également servi à l'assemblage de la souche VHL/E dans un souci d'harmonisation.

A l'issue du séquençage des souches P12, P19 et VHL/E, 6973337 *reads* (de longueur moyenne de 128 paires de base, pb) ont été obtenus pour la souche P12, 5177125 *reads* (longueur moyenne 123pb) pour la souche P19 et 3843170 *reads* (longueur moyenne 128 pb) pour VHL/E (Tableau 2). L'alignement des *reads* lors de l'assemblage a varié de 6,2% pour P12, 42,2% pour P19 à 78,2% pour VHL/E. Nous notons qu'un faible pourcentage de *reads* a été aligné pour la souche P12, ce qui n'a cependant pas empêché l'obtention d'une séquence consensus. La profondeur de couverture moyenne, soit le nombre de *reads* chevauchants à une région donnée, des séquences a été de 1146,6 *reads* pour P12, 274,4 pour P19 et 1627,1 pour VHL/E. Les variations du pourcentage d'alignement des *reads* et de la profondeur de couverture sont retrouvées dans d'autres expériences de séquençage, dont celles de S. Sijmons et P. Maes (Sijmons S *et al.*, 2015). Malgré ces différences, nous avons obtenu des séquences exploitables et de bonne qualité.

	Nombre de reads	Longueur moyenne des reads (pb)	Nombre de reads alignés	Nombre de reads non alignés	Reads alignés (%)	Profondeur de couverture		
						Minimum	Maximum	Moyenne
P12	6973337	128	457040	6516297	6.5	0	10408	1146.6
P19	5177125	123	2187084	2990041	42.2	0	4185	274.4
VHL/E	3843170	128	3006437	836733	78.2	0	21023	1627.1

Tableau 2 : Données statistiques de l'assemblage des séquences P12, P19 et VHL/E.

L'assemblage des séquences P12, P19 et VHL/E nous a permis de déterminer la longueur potentielle des séquences génomiques de ces souches (Tableau 3). Par comparaison à la taille génomique des souches de laboratoire AD169, Merlin, Towne et Toledo, la séquence de la souche VHL/E figure parmi les plus longues, avec 235706kpb. La taille de la souche P12, 235225pb, est similaire à celle de la souche BE/32/2010, 235205pb, qui a servi de référence pour l'alignement des séquences. La taille de la séquence P19 est quant à elle diminuée d'environ 200pb, avec une longueur estimée à 235060pb.

	Accession Genbank	Longueur du génome (pb)
P12	-	235225
P19	-	235060
VHL/E	-	235706
AD169	FJ527563.1	231781
Merlin	NC_006273	235398
Towne	FJ616285.1	235147
Toledo	GU937742.1	235398
BE/32/2010	KP745634	235205

Tableau 3 : Taille des séquences génomiques des souches P12, P19 et VHL/E par comparaison à celle des souches de laboratoire AD169, Merlin, Towne et Toledo.

III. 2. Analyse comparative des génomes de différentes souches du CMV

Nous avons ensuite souhaité situer la variabilité des souches P12, P19 et VHL/E à l'échelle génomique par rapport à différentes souches de CMV dont la séquence est disponible sur GenBank. Nous les avons d'abord comparé aux souches de laboratoires AD169 et Towne, intensivement cultivées *in vitro* et porteuses de nombreuses altérations au sein de leur génome. Nous avons également voulu les comparer aux souches de laboratoire Toledo, TB40/E et Merlin, qui ont subi peu de passages *in vitro* et qui ont conservé leur tropisme endothélotrope. Enfin, nous avons également inclus une sélection arbitraire de 20 séquences issues d'isolats cliniques séquencés par le groupe de M. Van Ranst, très peu passés *in vitro*. Grâce au logiciel CLC Genomics Workbench, un arbre phylogénétique a été construit, basé sur l'alignement de l'ensemble de ces séquences virales et selon la méthode du *neighbour-joining* (Figure 5). Plus la distance entre deux souches est courte, plus leur séquence est similaire. Deux grandes branches semblent se démarquer, dans lesquelles sont répartis les isolats cliniques séquencés par le groupe belge. Dans la première, nous observons que la souche P19 partage le plus de similarités avec la souche de laboratoire Toledo. La souche P12 fait partie d'une branche voisine à P19, mais apparaît plus proche de la souche Towne. La souche BE/32/2010 appartient à la même sous-branche que nos deux isolats P12 et P19. La souche VHL/E fait partie quant à elle de la seconde branche, et semble partager le plus de similitudes avec la souche clinique BE/16/2010 (KP745716) et avec la souche Merlin dans une moindre mesure.

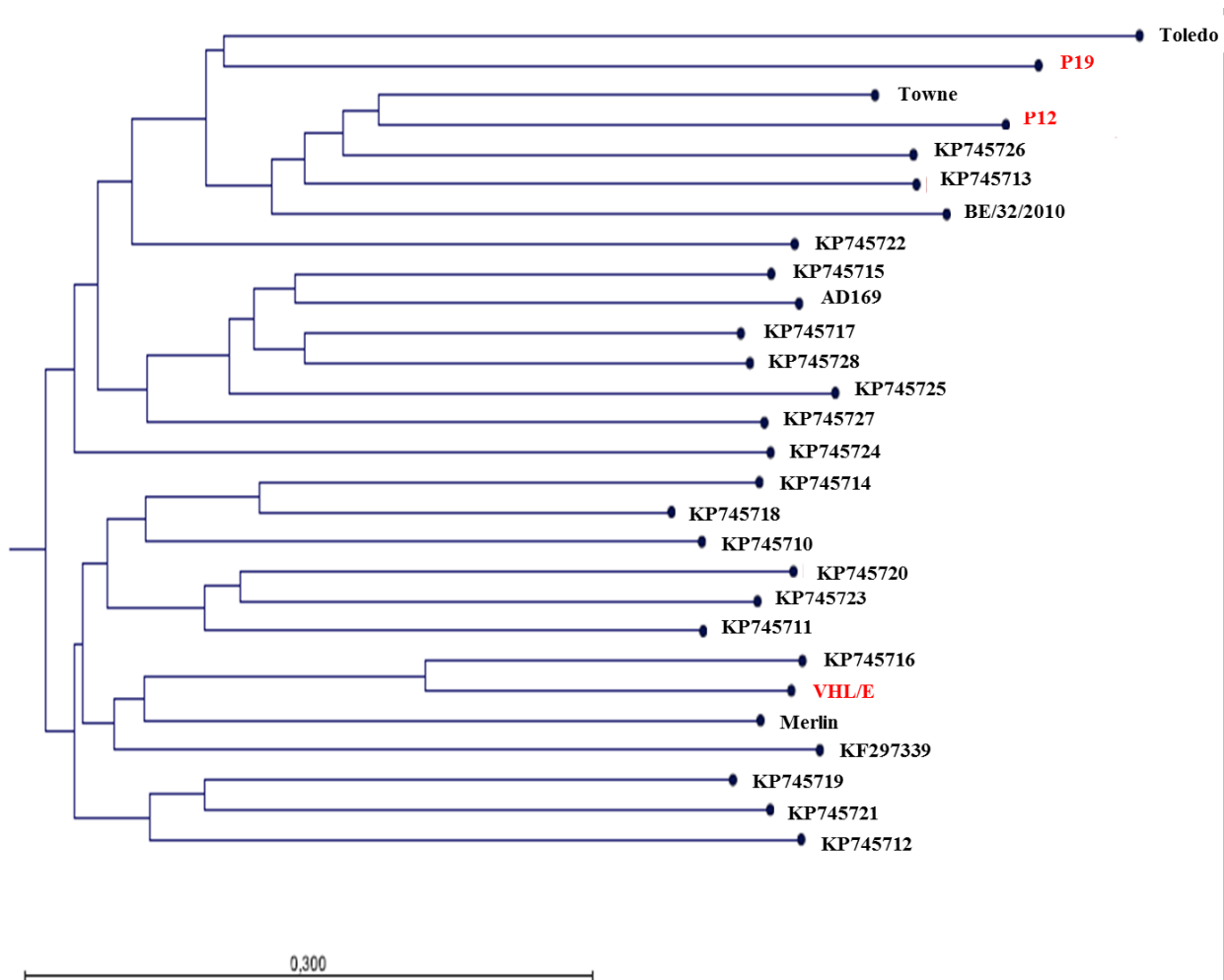


Figure 5 : Arbre phylogénétique issu de l'alignement des souches P12, P19 et VHL/E avec les souches de laboratoire Merlin, AD169, Toledo et Towne, la souche BE/32/2010 qui a servi à l'assemblage des souches séquencées ainsi qu'avec une sélection d'isolats cliniques. L'arbre a été construit selon la méthode du *neighbour-joining*.

Cette première analyse comparative nous renseigne de façon globale sur la variabilité intergénomique des souches que nous avons séquencées par rapport à des souches de laboratoire plus ou moins altérées et à des isolats cliniques très peu manipulés.

III. 3. Variabilité génétique des souches cliniques P12 et P19 et de la souche VHL/E

Au cours de cette analyse, nous nous sommes intéressées au polymorphisme de la séquence nucléotidique des souches P12, P19 et VHL/E. Pour cela, nous avons aligné *via* CLC Genomics Workbench chacune de ces souches face à la souche Merlin, considérée comme la souche de référence du CMV et peu manipulée *in vitro*. Chacun des 165 ORF actuellement décrits pour Merlin ont été identifiés dans la séquence des souches P12, P19 et VHL/E (non illustré ici). Nous avons également procédé à l'alignement des séquences P12, P19 et VHL/E comparativement à la souche AD169, dont la séquence est très altérée du fait du nombre intensif de passages *in vitro*. Enfin, nous avons aligné les séquences P12, P19 et VHL/E comparativement à la souche BE/32/2010, qui a servi à l'assemblage des séquences, en tant qu'isolat clinique témoin.

Grâce à l'analyse des variabilités génétiques menées sur environ 100 isolats cliniques, le groupe de M. Van Ranst a récemment identifié une liste des 30 gènes les plus divergents ainsi qu'une liste des 25 gènes les plus conservés du CMV (Sijmons *et al.*, 2015). Partant de ces données, nous nous sommes focalisées sur la séquence de ces gènes, en inspectant les polymorphismes nucléotidiques en termes de SNP, de délétions et d'insertions au sein des souches P12, P19 et VHL/E par comparaison aux souches Merlin et AD169 et à la souche BE/32/2010.

III.3.a. Analyse des gènes les plus divergents

Les gènes divergents identifiés par l'équipe de M. Van Ranst codent pour des protéines impliquées notamment dans l'immunomodulation, l'assemblage du virion, la latence, le tropisme et l'entrée du virus. L'analyse des séquences des gènes du CMV définis comme divergents d'une souche à l'autre a permis d'identifier des groupes de gènes pour les 2 isolats P12 et P19 ainsi que pour la souche VHL/E en comparaison aux souches de laboratoire Merlin et AD169 et l'isolat clinique BE/32/2010 qui a servi à l'alignement. Ainsi, la souche P12 présente un premier groupe de gènes CMV (UL37 à UL142) avec de nombreux SNP (plus de 50) en comparaison aux 3 souches de référence (Tableau 4a). Des délétions et insertions sont aussi observées par rapport à Merlin et AD169. A noter que les gènes UL37, UL74, UL6 et UL142 sont associés à l'immunomodulation.

Un second groupe de gènes CMV (UL4 à UL120) sont particulièrement divergents entre la souche P12 et les 2 souches de référence AD169 et Merlin. Le gène UL22A de la souche P12 se rapproche de l'AD169 et la souche BE/32/2010 mais diffère de la séquence issue de Merlin. Un troisième groupe de gènes CMV (UL11 à RL5A) présentent des divergences principalement avec la souche AD169 alors que la séquence du gène UL25 se rapproche plus de celles issues des souches de laboratoire. Le quatrième et dernier groupe est constitué de gènes CMV (UL139 à UL147) ayant un peu plus de similitude de séquences avec celles utilisées dans cette comparaison.

Gène	Famille	Fonction	P12								
			Merlin			AD169			BE/32/2010		
			SNP	D	I	SNP	D	I	SNP	D	I
UL37	?	Latence, réplication, apoptose, régulation gène, immunomodulation, croissance virale	+	-		+	+		-	-	-
UL74	?	Dissémination, assemblage, entrée, immunomodulation, protéine du virion	+	-		+	-		-	-	-
UL6	RL11	?	-	-		-	-		-	-	-
UL8	RL11	?	-	-		-	-		-	-	-
UL133	?	Assemblage, latence	-	+		-	+		-	-	-
UL150	?	Latence	-	-		+	+		-	-	-
UL142	MHC	Immunomodulation	-	+		*	*	*	-	-	-
UL4	RL11	Protéine virion, latence	+	-		+	-		38	-	-
UL144	?	Immunomodulation, latence	+	-		*	*	*	34	-	-
UL1	RL11	Protéine du virion, tropisme, assemblage	+	+		+	-		25	-	-
RL13	RL11	Tropisme, protéine du virion, immunomodulation, réplication	+	+		*	*	*	21	-	-
UL9	RL11	Multiplication virale	+	-		+	+		20	-	-
UL7	RL11	Immunomodulation	-	-		-	-		3	-	-
RL6	RL11	Latence	-	-		+	-		1	-	-
RL12	RL11	Protéine du virion, immunomodulation	+	-		+	+		#	-	-
UL120	UL120	?	+	-		+	-		#	-	-
UL22A	?	Immunomodulation, protéine virion	+	+		9	-	+	9	-	-
UL11	RL11	Immunomodulation	32	-	+	-	-		28	-	-
UL73	?	Entrée, protéine virion, latence	25	-	+	+	-		18	-	-
UL2	?	?	17	-	+	+	+		14	-	-
UL20	?	Immunomodulation	28	-	-	+	+		2	-	-
UL33	GPCR	Immunomodulation, Protéine virion, modulation hôte	2	-	-	-	+		7	-	-
UL146	CXCL	Immunomodulation	#	-	-	+	+		#	-	-
RL5A	RL11	?	15	+	-	*	*	*	#	§	-
UL25	UL25	Protéine virion	39	-	-	30	-	-	-	-	-
UL139	?	Immunomodulation	47	-	+	14	+	+	4	-	-
UL10	RL11	Croissance virale	24	-	+	26	-	-	11	-	-
UL148D	?	?	5	-	-	11	+	-	8	-	-
US34A	?	?	10	-	-	7	-	-	5	-	-
UL147	CXCL	Immunomodulation	4	-	-	6	-	-	5	-	-

Nombre de SNP

>50
41-50
31-40
21-30
11-20
6-10
0-5

Tableau 4a : Comparaison des SNP, délétions (D) et insertions (I) au sein des gènes les plus divergents du CMV, entre l'isolat clinique P12 et les souches de laboratoire Merlin et AD169 et la souche clinique BE/32/2010 ayant servi de référence pour l'alignement. La famille et la fonction des gènes sont indiquées. Le nombre de SNP est indiqué selon un code couleur allant du vert pour les nombres les plus faibles au rouge pour les plus élevés (>50 SNP) (le nombre de SNP est indiqué si <50). Les gènes sont classés selon leur comportement en terme de polymorphisme par rapport aux souches ayant servi de comparaison. * : gène muté dans AD169 ; # : séquence identique entre la souche P12 et BE/32/2010 ; § : délétion de 11 nucléotides dans la séquence du gène RL5A de la souche BE/32/2010.

Le second isolat P19 présente un groupe plus limité que la souche P12 de gènes du CMV (UL37 à UL33) très divergents des 3 souches de comparaison avec en commun les gènes UL37 et UL74 associés notamment à l'immunomodulation (Tableau 4b). A noter que les gènes UL6 et UL142 observés divergents pour la souche P12 ne sont pas retrouvés pour la souche P19. De même,

le gène UL33 associé à l'immunomodulation, très divergent pour la souche P19 n'est pas observé dans ce groupe pour la souche P12. Un second groupe de nombreux gènes du CMV (UL120 à RL12) sont divergents pour la souche P19 en comparaison aux 2 souches de laboratoire. Un troisième groupe est constitué de gènes du CMV (UL1 à UL22A) divergents entre la souche P19 et la souche Merlin. Un quatrième regroupe des gènes du CMV (UL7 à UL146) associés à l'immunomodulation qui divergent entre la P19 et la souche AD169. Un dernier groupe de gènes du CMV (UL25 à US34A) présentent un nombre de SNP réduit en comparaison aux 3 souches de référence.

Gène	Famille	Fonction	P19								
			Merlin			AD169			BE/32/2010		
			SNP	D	I	SNP	D	I	SNP	D	I
UL37	?	Latence, réplication, apoptose, régulation gène, immunomodulation, croissance virale	-	-	-	+	+	+	-	-	-
UL74	?	Dissémination, assemblage, entrée, immunomodulation, protéine du virion	+	-	-	+	+	+	-	-	-
UL10	RL11	Multiplication virale	-	-	-	-	-	-	-	-	-
UL33	GPCR	Immunomodulation, Protéine virion, modulation hôte	-	-	-	-	-	-	-	-	-
UL120	UL120	?	+	+	+	+	+	+	48	-	-
UL150	?	Latence	-	-	-	-	-	-	48	-	-
UL8	RL11	?	-	-	-	-	-	-	45	-	-
UL133	?	Assemblage, latence	-	-	-	+	+	+	39	-	-
UL144	?	Immunomodulation, latence	-	-	-	*	*	*	30	-	-
UL73	?	Entrée, protéine virion, latence	-	-	-	-	-	+	26	-	-
UL142	MHC	Immunomodulation	-	-	-	*	*	*	22	-	-
RL13	RL11	Tropisme, protéine du virion, immunomodulation, réplication	+	+	+	*	*	*	16	-	-
UL139	?	Immunomodulation	-	+	-	-	+	+	12	-	-
RL6	RL11	Latence	+	+	+	+	+	+	#	-	-
RL5A	RL11	?	+	+	-	*	*	*	#	§	-
RL12	RL11	Protéine du virion, immunomodulation	+	+	-	-	-	-	#	-	-
UL1	RL11	Protéine du virion, tropisme, assemblage	-	-	-	10	-	-	9	-	-
UL4	RL11	Protéine virion, latence	-	-	-	4	-	-	39	-	-
UL11	RL11	Immunomodulation	+	+	+	17	+	+	40	-	-
UL9	RL11	Croissance virale	+	-	-	16	-	+	25	-	-
UL22A	?	Immunomodulation, protéine virion	+	-	-	8	-	+	10	-	-
UL7	RL11	Immunomodulation	24	-	-	-	-	-	8	-	-
UL147	CXCL	Immunomodulation	11	-	-	-	-	-	9	-	-
UL20	?	Immunomodulation	29	-	-	+	+	+	3	-	-
UL146	CXCL	Immunomodulation	2	-	-	+	+	+	2	-	-
UL6	RL11	?	23	-	-	30	-	-	-	-	-
UL25	UL25	Protéine virion	36	-	-	36	-	-	22	-	-
UL2	?	?	29	-	-	1	-	-	9	-	-
UL148D	?	?	4	-	-	12	+	-	9	-	-
US34A	?	?	10	-	-	7	-	-	5	-	-

Nombre
de SNP
>50
41-50
31-40
21-30
11-20
6-10
0-5

Tableau 4B : Comparaison des SNP, délétions (D) et insertions (I) au sein des gènes les plus divergents du CMV, entre l'isolat clinique P19 et les souches de laboratoire Merlin et AD169 et la souche clinique BE/32/2010 ayant servi de référence pour l'alignement. * : gène muté dans AD169 ; # : séquence identique entre la souche P12 et BE/32/2010 ; § : délétion de 11 nucléotides dans la séquence du gène RL5A de la souche BE/32/2010.

La souche VHL/E présente un premier groupe de gènes CMV (UL37 à UL20) très divergents de ceux des 3 souches de référence. Il est à noter que l'on retrouve les gènes UL37 et UL74 dans ce premier groupe, de la même façon que pour les souches P12 et P19. Ensuite, le second groupe qui comprend des gènes du CMV RL13 à UL146 divergent surtout des deux souches

de laboratoire. Le gène UL33 de la souche VHL/E semble plus proche de la souche AD169 que des deux autres souches. Les gènes UL10 et UL150 de VHL/E sont eux plus divergents des souches AD169 et BE/32/2010 que Merlin. A l'inverse, les gènes UL11 et UL139 de VHL/E sont plus divergents de Merlin que des deux autres souches. Les gènes UL142 à UL8 de la souche VHL/E diffèrent le plus de AD169. Un seul gène VHL/E, UL6, présente de plus nombreux SNP par comparaison à BE/32/2010 qu'aux souches Merlin et AD169. Enfin, les gènes UL4 à UL147 apparaissent avoir le moins de divergence entre VHL/E et les trois souches ayant servi à la comparaison. Les gènes UL148D et US34A présentent d'ailleurs le moins de divergence dans leur séquence lorsque l'on compare les souches P12, P19 ou VHL/E avec les souches Merlin, AD169 et BE/32/2010.

Gène	Famille	Fonction	VHL/E								
			Merlin			AD169			BE/32/2010		
			SNP	D	I	SNP	D	I	SNP	D	I
UL37	?	Latence, réplication, apoptose, régulation gène, immunomodulation, croissance virale		+	+		+	+		-	-
UL74	?	Dissémination, assemblage, entrée, immunomodulation, protéine du virion		+	-		-	-		-	-
UL9	RL11	Multiplication virale		-	+		+	+		-	-
UL20	?	Immunomodulation		+	+		-	+		-	-
RL13	RL11	Tropisme, protéine du virion, immunomodulation, réplication		+	+	*	*	*	25	-	-
UL1	RL11	Protéine du virion, tropisme, assemblage		-	+		+	+	13	-	-
RL6	RL11	Latence		+	+		+	+	#	-	-
RL5A	RL11	?		+	+	*	*	*	#	§	-
RL12	RL11	Protéine du virion, immunomodulation		+	+		+	+	#	-	-
UL144	?	Immunomodulation, latence		-	-	*	*	*	#	-	-
UL120	UL120	?		-	-		-	-	38	-	-
UL73	?	Entrée, protéine virion, latence		-	+		+	-	18	-	-
UL146	CXCL	Immunomodulation		+	+		-	+	#	-	-
UL33	GPCR	Immunomodulation, Protéine virion, modulation hôte		-	-	8	-	-		-	-
UL10	RL11	Croissance virale	10	-	+		+	+		-	-
UL150	?	Latence	40	-	-		-	-		-	-
UL11	RL11	Immunomodulation		+	+	14	+	+	46	-	-
UL139	?	Immunomodulation		-	+	14	+	+	#	-	-
UL142	MHC	Immunomodulation	36	-	+	*	*	*	39	-	-
UL133	?	Assemblage, latence	28	+	+		+	+	35	-	-
UL22A	?	Immunomodulation, protéine virion	6	-	-		+	-	6	-	-
UL7	RL11	Immunomodulation	20	-	-		-	-	1	-	-
UL8	RL11	?	18	-	-		-	-	9	-	-
UL6	RL11	?	3	-	-	22	-	-		-	-
UL4	RL11	Protéine virion, latence	26	-	-	22	-	-	43	-	-
UL25	UL25	Protéine virion	13	-	-	14	-	-	28	-	-
UL148D	?	?	20	-	-	6	-	-	10	-	-
UL2	?	?	15	-	+	6	+	+	12	-	-
US34A	?	?	10	-	-	7	-	-	5	-	-
UL147	CXCL	Immunomodulation	1	-	-	6	-	-	1	-	-

Nombre
de SNP

>50
41-50
31-40
21-30
11-20
6-10
0-5

Tableau 4c : Comparaison des SNP, délétions (D) et insertions (I) au sein des gènes les plus divergents du CMV, entre la souche VHL/E et les souches de laboratoire Merlin et AD169 et la souche clinique BE/32/2010 ayant servi de référence pour l'alignement. * : gène muté dans AD169 ; # : séquence identique entre la souche P12 et BE/32/2010 ; § : délétion de 11 nucléotides dans la séquence du gène RL5A de la souche BE/32/2010.

Nous observons donc au sein des gènes les plus divergents du CMV un degré variable de polymorphisme selon les souches P12, P19 et VHL/E par rapport aux souches Merlin, AD169 et

BE/32/2010. Les gènes qui pourraient potentiellement faire l'objet d'une étude approfondie pourraient être ceux dont le polymorphisme des souches P12 et P19 est moindre avec BE/32/2010, souche isolée lors d'une primo-infection, et fort avec les souches de laboratoire Merlin et AD169.

III.3.b. Analyse des gènes les plus conservés

Concernant les gènes les plus conservés, nous observons trois groupes de gènes selon leur degré de polymorphismes entre les souches P12, P19 ou VHL/E et les souches Merlin, AD169 et BE/32/2010 (Tableaux 5a-5c). Le premier groupe comprend les gènes pour lesquels des polymorphismes sont observés entre les souches P12, P19 ou VHL/E et les trois souches avec lesquelles elles sont comparées. Au sein de ces gènes, nous observons un nombre important de SNP au niveau du gène UL86 (qui code pour la protéine majeure de la capsid) des souches P12 et surtout P19 par comparaison à Merlin, AD169 et BE/32/2010. Le gène US31 est muté dans AD169, ce qui ne nous a pas permis de procéder à la comparaison de sa séquence avec les souches P12, P19 et VHL/E. Le deuxième groupe illustre les gènes de polymorphisme variable entre les souches comparées, pour lesquels nous observons un degré moindre de SNP et quasiment aucune insertion ou délétion nucléotidique. Enfin, le troisième groupe de chaque tableau représente les gènes pour lesquels un SNP minime est observé entre les souches P12, P19 ou VHL/E et les trois souches de comparaison.

Gène	Famille	Fonction	P12								
			Merlin			AD169			BE/32/2010		
			SNP	D	I	SNP	D	I	SNP	D	I
UL86	?	Assemblage		-	-		-	-	32	-	-
UL35	UL25	Régulation gènes, réplication, réparation ADN, assemblage, protéine virion	36	-	+	32	+	+	31	-	-
UL102	?	Réplication	27	-	-	28	+	+	13	-	-
UL29	US22	Protéine virion, régulation gènes, apoptose, tropisme,	25	-	+	23	-	-	13	-	-
UL104	?	Assemblage	19	-	-	22	-	-	16	-	-
US24	US22	Protéine virion, régulation gènes	13	-	-	22	-	-	19	-	-
UL31	DURP	Régulation gènes	12	-	-	23	-	-	9	-	-
UL57	?	Réplication	19	-	-	25	-	-	10	-	-
US31	US1	Inconnue	4	-	-	*	*	*	3	-	-
US18	US12	Inconnue	11	-	-	11	-	-	#	-	-
UL26	US22	Protéine virion, régulation gènes, stabilité virion	7	-	-	9	-	-	3	-	-
UL41A	?	Protéine virion	3	-	-	3	-	-	6	-	-
UL44	?	Modulation hôte, réplication, latence	13	-	-	11	-	-	10	-	-
UL46	?	Protéine virion	6	-	-	6	-	-	4	-	-
UL50	?	Protéine virion, latence, assemblage	17	-	+	2	-	-	12	-	-
UL79	?	Régulation gènes, latence	9	-	-	7	-	-	9	-	-
UL85	?	Assemblage	10	-	-	9	-	-	10	-	-
UL88	?	Protéine virion, assemblage	8	-	-	4	-	-	7	-	-
UL89	?	Croissance virale, assemblage	5	-	-	9	-	-	6	-	-
UL98	?	Réparation ADN, latence	9	-	-	14	-	-	9	-	-
UL103	?	Protéine virion, assemblage	6	-	-	12	-	-	2	-	-
UL105	?	Réplication, latence	20	-	-	16	-	-	7	-	-
UL114	?	Réparation nt, réplication, latence	6	-	-	4	-	-	7	-	-
US13	US12	Inconnue	3	-	-	4	-	-	5	-	-
UL96	?	Protéine virion, assemblage	2	-	-	2	-	-	1	-	-

Nombre
de SNP

>50

41-50

31-40

21-30

11-20

6-10

0-5

Tableau 5a : Comparaison des SNP, délétions (D) et insertions (I) au sein des gènes les plus conservés du CMV, entre l'isolat clinique P12 et les souches de laboratoire Merlin et AD169 et la souche clinique BE/32/2010 ayant servi de référence pour l'alignement. * : gène muté dans la souche AD169.

Gène	Famille	Fonction	P19								
			Merlin			AD169			BE/32/2010		
			SNP	D	I	SNP	D	I	SNP	D	I
UL86	?	Assemblage		-	-		-	-		-	-
UL57	?	Réplication	24	-	-	29	-	-	23	-	-
UL35	UL25	Régulation gènes, réplication, réparation ADN, assemblage, protéine virion	17	-	-	30	-	+	34	-	-
UL44	?	Modulation hôte, réplication, latence	23	-	+	19	-	+	16	-	-
UL31	DURP	Régulation gènes	14	-	-	26	-	-	13	-	-
US24	US22	Protéine virion, régulation gènes	12	-	-	21	-	-	1	-	-
UL102	?	Réplication	34	-	-	33	-	-	2	-	-
UL104	?	Assemblage	28	-	-	29	-	-	2	-	-
UL105	?	Réplication, latence	22	-	-	18	-	-	2	-	-
UL89	?	Croissance virale, assemblage	27	-	-	8	-	-	1	-	-
UL88	?	Protéine virion, assemblage	27	-	-	23	-	-	#	-	-
US31	US1	Inconnue	11	-	-	*	*	*	1	-	-
US18	US12	Inconnue	11	-	-	11	-	-	#	-	-
UL26	US22	Protéine virion, régulation gènes, stabilité virion	2	-	-	4	-	-	6	-	-
UL29	US22	Protéine virion, régulation gènes, apoptose, tropisme,	7	-	+	3	-	-	17	-	-
UL46	?	Protéine virion	7	-	-	7	-	-	5	-	-
UL50	?	Protéine virion, latence, assemblage	10	-	-	12	-	+	6	-	-
UL79	?	Régulation gènes, latence	13	-	-	11	-	-	13	-	-
UL85	?	Assemblage	7	-	-	6	-	-	5	-	-
UL98	?	Réparation ADN, latence	10	-	-	13	-	-	3	-	-
UL103	?	Protéine virion, assemblage	6	-	-	12	-	-	2	-	-
UL41A	?	Protéine virion	1	-	-	1	-	-	4	-	-
US13	US12	Inconnue	2	-	-	1	-	-	2	-	-
UL114	?	Réparation nt, réplication, latence	5	-	-	4	-	-	1	-	-
UL96	?	Protéine virion, assemblage	2	-	-	2	-	-	#	-	-

Nombre
de SNP

>50

41-50

31-40

21-30

11-20

6-10

0-5

Tableau 5b : Comparaison des SNP, délétions (D) et insertions (I) au sein des gènes les plus conservés du CMV, entre l'isolat clinique P19 et les souches de laboratoire Merlin et AD169 et la souche clinique BE/32/2010 ayant servi de référence pour l'alignement. * : gène muté dans la souche AD169.

Gène	Famille	Fonction	VHL/E								
			Merlin			AD169			BE/32/2010		
			SNP	D	I	SNP	D	I	SNP	D	I
UL35	UL25	Régulation gènes, réplication, réparation ADN, assemblage, protéine virion	30	-	-	31	-	+	32	-	-
UL102	?	Réplication	24	-	+	25	-	+	22	-	-
UL86	?	Assemblage	11	-	-	21	-	-	-	-	-
UL104	?	Assemblage	9	-	-	20	-	-	25	-	-
UL57	?	Réplication	21	-	-	13	-	-	23	-	-
UL29	US22	Protéine virion, régulation gènes, apoptose, tropsime,	28	-	+	26	-	-	14	-	-
UL31	DURP	Régulation gènes	3	-	-	22	-	-	14	-	-
US31	US1	Inconnue	3	-	-	*	*	*	2	-	-
US13	US12	Inconnue	5	-	-	6	-	-	7	-	-
US18	US12	Inconnue	13	-	-	13	-	-	2	-	-
US24	US22	Protéine virion, régulation gènes	7	-	-	17	-	-	20	-	-
UL26	US22	Protéine virion, régulation gènes, stabilité virion	6	-	-	7	-	-	8	-	-
UL44	?	Modulation hôte, réplication, latence	2	-	+	10	-	-	16	-	-
UL46	?	Protéine virion	9	-	-	9	-	-	9	-	-
UL50	?	Protéine virion, latence, assemblage	9	-	-	14	-	+	11	-	-
UL79	?	Régulation gènes, latence	6	-	-	4	-	-	10	-	-
UL85	?	Assemblage	5	-	-	6	-	-	7	-	-
UL88	?	Protéine virion, assemblage	12	-	-	7	-	-	10	-	-
UL89	?	Croissance virale, assemblage	1	-	-	13	-	-	10	-	-
UL98	?	Réparation ADN, latence	6	-	-	15	-	-	13	-	-
UL103	?	Protéine virion, assemblage	3	-	-	13	-	-	5	-	-
UL105	?	Réplication, latence	17	-	-	12	-	-	12	-	-
UL114	?	Réparation nt, réplication, latence	5	-	-	3	-	-	8	-	-
UL41A	?	Protéine virion	1	-	-	1	-	-	4	-	-
UL96	?	Protéine virion, assemblage	2	-	-	2	-	-	1	-	-

Nombre de SNP
>50
41-50
31-40
21-30
11-20
6-10
0-5

Tableau 4c : Comparaison des SNP, délétions (D) et insertions (I) au sein des gènes les plus divergents du CMV, entre la souche VHL/E et les souches de laboratoire Merlin et AD169 et la souche clinique BE/32/2010 ayant servi de référence pour l'alignement. * : gène muté dans AD169

Grâce à cette analyse des gènes décrits comme les plus conservés du CMV, nous constatons effectivement un polymorphisme limité dans leur séquence nucléotidique entre les souches P12, P19 ou VHL/E par comparaison aux souches Merlin, AD169 et BE/32/2010. Certains gènes semblent cependant soumis à une plus forte variabilité lorsque l'on compare les séquences P12 et P19 avec celles de Merlin et AD169.

III. 4. Impact du polymorphisme nucléotidique sur la séquence peptidique

Afin d'élucider si le polymorphisme de la séquence nucléotidique des gènes a un impact sur la séquence en acides aminés qu'elle code, nous nous sommes intéressées à la variabilité des gènes UL18, UL40, UL142 et UL147. Ceux-ci ont été décrits comme hautement divergents. Les deux premiers sont connus pour leurs fonctions d'évasion à la reconnaissance par les cellules NK. UL142 et UL147 codent respectivement pour une protéine homologue aux molécules HLA de classe I et une chimiokine soluble. Leur rôle n'est pas bien défini mais elles pourraient être impliquées dans

l'échappement à la reconnaissance NK. Nous avons également étudié la séquence peptidique codée par les gènes UL123 et UL83, qui codent pour les protéines immunodominantes IE1 et pp65.

La souche clinique BE/32/2010, qui a servi à l'assemblage des séquences P12, P19 et VHL/E, sert de référence dans cette partie de l'étude pour l'alignement des séquences en acides aminés d'intérêt de P12, P19 et VHL/E. Les séquences des souches Merlin et AD169 sont aussi indiquées.

III.4.a. Le gène UL40

Le CMV code pour la glycoprotéine gpUL40 qui contient une séquence identique à celle des peptides dérivés des molécules HLA de classe I et présentés par HLA-E. Ainsi, par le maintien à la surface des cellules infectées de l'expression de la molécule HLA-E, ligand du récepteur inhibiteur CD94/NKG2A, la protéine virale gpUL40 permet l'échappement à la lyse des cellules infectées par les cellules NK CD94/NKG2A⁺.

Le nonamère peptidique issu de la protéine gpUL40 (nUL40) est soumis à une variabilité génétique importante, essentiellement localisée au niveau du 8^e acide aminé. Il a été montré que selon l'acide aminé présent à cette position, l'affinité de l'interaction entre le complexe HLA-E/nUL40 et les récepteurs CD94/NKG2 varie (Heatley *et al.*, 2013; Prod'homme *et al.*, 2012). Les souches cliniques P12 et P19 possèdent ainsi une isoleucine en position 8, ce qui constitue la séquence VMAPRTLIL prédominante UL40, identique à la plupart des molécules HLA-Cw (Tableau 6). Cette séquence, une fois logée dans le sillon peptidique de la molécule HLA-E, induit une interaction de plus forte affinité avec le complexe CD94/NKG2A par rapport au complexe CD94/NKG2C. La souche VHL/E dispose quant à elle d'une leucine en position 8 du nonamère, de propriétés similaires à la séquence prédominante VMAPRTLIL. Nous l'avons déjà démontré comme mentionné dans le projet n°1.

Souche CMV	Nonamère peptidique								
	P1	<u>P2</u>	P3	P4	P5	P6	P7	P8	<u>P9</u>
BE/32/2010	V	M	A	P	R	T	L	I	L
P12	-	-	-	-	-	-	-	-	-
P19	-	-	-	-	-	-	-	-	-
VHL/E	-	-	-	-	-	-	-	L	-
Merlin	-	-	-	-	-	-	-	-	-
AD169	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Tableau 6 : Alignement de la séquence du nonapeptide de gpUL40 spécifique du sillon peptidique de HLA-E de différentes souches virales du CMV face à la séquence BE/32/2010. Pour chacune des souches, les acides aminés en position 1 à 9 (P1-P9) sont indiqués. Les acides aminés P2 et P9 soulignés correspondent aux sites d’ancrage du nonapeptide à HLA-E.

III.4.b. Le gène UL18

Un autre gène codé par le CMV dédié à l’échappement de la réponse NK par le mécanisme de la reconnaissance du soi manquant, est UL18. La glycoprotéine codée par UL18, gpUL18, possède une structure secondaire similaire à celle des molécules HLA de classe I (Chapman *et al.*, 1999). La gpUL18 s’associe à la β 2-microglobuline humaine. Le ligand identifié pour la gpUL18 est le récepteur inhibiteur ILT-2, exprimé notamment par les cellules NK et qui reconnaît d’ordinaire les molécules HLA de classe I (Cosman *et al.*, 1997). ILT-2 interagit toutefois avec gpUL18 avec 1000 fois plus d’affinité que son ligand physiologique (Chapman *et al.*, 1999). D’un point de vue structural, gpUL18 possède une courte queue cytoplasmique, un domaine transmembranaire et trois domaines extracellulaires (α 1, α 2 et α 3). Il a été mis en évidence que certaines mutations, qui affectent particulièrement les domaines α 1 et α 3, dans la séquence peptidique de gpUL18 peuvent altérer l’affinité d’interaction avec ILT-2 (Wagner *et al.*, 2007 ; Cerboni *et al.*, 2006). Par exemple, la mutation de l’histidine en position 210 de la séquence peptidique abroge l’interaction gpUL18/ILT-2, tout comme celle des cystéines en position 258 et 273 (Occhino *et al.*, 2008). De plus, le polymorphisme de la séquence en acides aminés en position

248-252, avec un motif NKAPD ou DKVPE, serait impliqué dans la variation de l'affinité de gpUL18 avec ILT-2 (Valés-Gómez *et al.*, 2005).

Partant de ces observations, nous avons analysé la séquence peptidique de gpUL18 de nos souches cliniques séquencées et de VHL/E. La figure 6 illustre l'alignement en acides aminés de la séquence gpUL18 de ces souches par comparaison à la souche BE/32/2010 (BE3210 sur le graphe). Les souches P12, P19 et VHL/E présentent respectivement 6, 5 et 14 mutations par comparaison à la souche BE/32/2010, dispersées sur les domaines $\alpha 1$, $\alpha 2$ et $\alpha 3$ de gpUL18. L'ensemble de ces séquences possèdent un résidu histidine en position 210 et deux cystéines en position 258 et 273. Nous observons également que les souches cliniques BE/32/2010, P12 et P19 et la souche AD169 présentent un polymorphisme DKVPE. La souche VHL/E possède elle une séquence NKAPD en position 248-252 de la séquence gpUL48, à l'instar de la souche Merlin. D'autres zones de polymorphisme sont identifiées mais n'ont jusqu'ici pas été décrites comme impliquées dans la modulation de l'interaction récepteur/ligand.

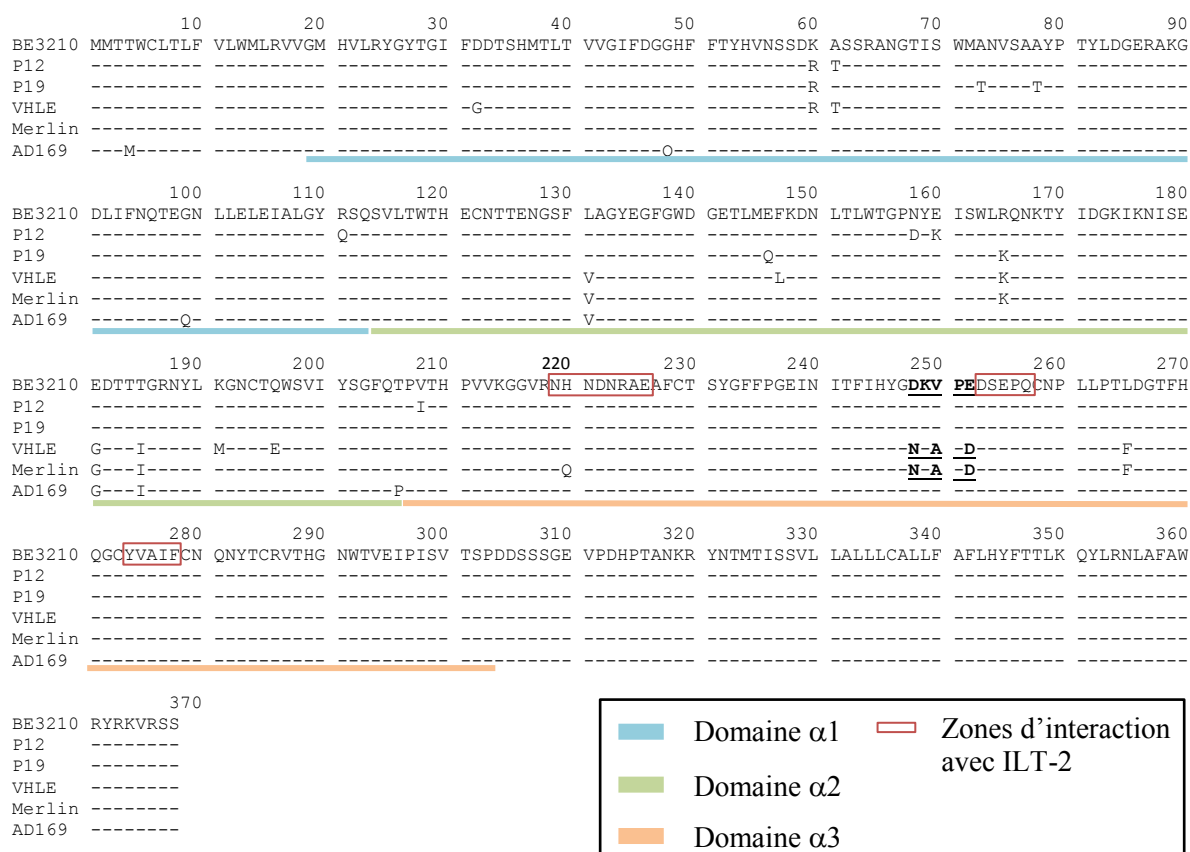


Figure 6: Alignement de la séquence peptidique gpUL18 des souches P12, P19, VHL/E, Merlin et AD169 face à celle de la souche BE/32/2010. La position 248-252 est soulignée.

III.4.c. Les gènes UL142 et UL147

Les gènes UL142 et UL147 font partie des gènes du CMV soumis à un fort polymorphisme (Sijmons *et al.*, 2015). Celui-ci a été associé dans certaines études au caractère symptomatique de l'infection à CMV bien que cela soit controversé (Arav-Boger *et al.*, 2008).

Afin de déterminer l'impact de la variabilité de la séquence nucléotidique de ces gènes sur la séquence en acides aminés qu'ils codent, nous avons comparé ces séquences portées par la souche clinique BE/32/2010, nos trois souches séquencées et les souches de laboratoire Merlin et AD169 (uniquement UL147 pour cette dernière, puisque le gène UL142 est muté). Des mutations ponctuelles sont identifiées dans la séquence en acides aminés de gpUL142 lorsque l'on compare BE/32/2010 avec nos trois souches séquencées (Figure 7). Mises à part les mutations A35T, S179N que l'on retrouve dans les souches P12 et P19, les zones polymorphes diffèrent d'une souche à l'autre. Nous observons une région dense de polymorphisme concernant les souches VHL/E et Merlin, de la position 209 à 229. Concernant gpUL147, nous observons une seule mutation pour chacune de nos trois souches séquencées par comparaison à BE/32/2010 (Figure 8). Elles ne sont pas situées à la même position. La souche AD169 témoigne d'une séquence en acides aminés plus variable que l'ensemble des autres souches alignées. Ces données se rapprochent de ce qui a été observé lors de la comparaison des séquences nucléotidiques des gènes UL142 et UL147. En effet, nous avons observé de plus nombreux SNP pour UL142 que UL147 lorsque les souches P12, P19 ou VHL/E ont été comparées à Merlin, AD169 et BE/32/2010. De plus, nous constatons qu'un certain nombre de SNP sont silencieux. Par exemple, 5 et 9 SNP ont été identifiés dans la séquence respective de P12 et P19 par comparaison à BE/32/2010, et seulement une mutation apparaît dans leur séquence en acides aminés.

	10	20	30	40	50	60	70	80	90
BE3210	MRIEWVWVLF	GYFVSSVGSE	RSLSYHYHLE	SNSSADVVCN	GNISVFNVT	LSVRYNITVG	ISSSLIGYL	TIQVLESWFT	PWVQNKSYIK
P12	-----L--	-----R-	-----	---T-----	---M-----	-----	-----V--	---I-----	-----
P19	-----	-----	-----	---T-----	-----	-----	-----	-----	---N-
VHL/E	-----W--	-----	---H-----	---D-----	---M-----	-----	-----	---V-----	---I-
Merlin	---AC---	-----	---R-----	---N-----	---G-----	-----	---H-----	---T-----	---S-
	100	110	120	130	140	150	160	170	180
BE3210	QPLGDTETLY	NIDSENIHRV	SQYFHTRWIK	SLQENHTCDL	TNSTPTYTYQ	VNVNNTNYLT	LTSSGWQDRL	NYTVINSTHF	NLTESNITSI
P12	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	---N-
P19	---S-----	-----I	-----	-----	-----	-----	-----	-----	---N-
VHL/E	---GD---	-----	-----	-----	-----	V-----	-----	---V-----	-----
Merlin	---ST---	-----	-----	-----	A-----	-----	-----	---A-----	-----
	190	200	210	220	230	240	250	260	270
BE3210	QKYLNTTCIE	RLRNYTLEPV	YTTTVPQNIT	TSQHVTTTLH	TTPRGTTQKD	TTQRHTVQTP	SFNDTHNVTE	HTLNISYVLS	QKTNNTTSPW
P12	-----	-----	H-----	---A-----	-I-PD----	-----	-----	-----	-----
P19	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----K	-----	-----
VHL/E	Q-----	-----	---T---I-	TSQHV--TLH	-T-RGT--Q-	---R-----	-----	-----	-----
Merlin	H-----	-----	---A---V-	PEHAI--LYT	-P-NAI-I--	---S-----	-----	-----	-----
	280	290	300						
BE3210	VYAIPMGATA	TIGAGLYIRK	HFPTPVRFVYE	VWRGQ					
P12	-----	-----	-----	-----					
P19	I-----	-----	-----	-----					
VHL/E	-----	-----R-	-----	-----					
Merlin	-----	-----G-	-----K----	-----					

Figure 7: Alignement de la séquence peptidique gpUL142 des souches P12, P19, VHL/E, Merlin et AD169 face à celle de la souche BE/32/2010.

	10	20	30	40	50	60	70	80	90
BE3210	MLLTWLHHPI	LNSRIKLLSV	RYLSLTAYML	LAICPIAVRL	LELEDYDKRC	RCNNQILLNT	LPVGTELLKP	IAASESCNRQ	EVLAILKDKG
P12	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
P19	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
VHL/E	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
Merlin	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
AD169	-M-----	S--H-----	-H-----	F-V--PV-H-	-----R--	-----	--I-----	-----	-----
	100	110	120	130	140	150			
BE3210	TKCLNPNAQA	VRRHINRLFF	RLVLDDEQRI	YDVVSTNIEF	GAWPVPTAYK	AFLWKYAKKL	NYHYFRLRW		
P12	-----	-----	-----	-----	-----	-----	---Q-----		
P19	-----	-----	---I-----	-----	-----	-----	-----		
VHL/E	-----	-----	-----	-----	-----	----F----	-----		
Merlin	-----	-----	---E----	-----	-----	-----	-----		
AD169	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----		

Figure 8 : Alignement de la séquence peptidique gpUL147 des souches P12, P19, VHL/E, Merlin et AD169 face à celle de la souche BE/32/2010.

III.4.d. Les gènes immunodominants UL123 et UL83

Un autre axe que nous avons exploré est le polymorphisme des épitopes immunodominants du CMV. L'infection à CMV engendre une forte réponse des lymphocytes T CD8 cytotoxiques, dont beaucoup sont spécifiques des protéines IE1 (UL123) et pp65 (UL83) du CMV. Ces lymphocytes reconnaissent plusieurs épitopes issus de ces antigènes (Babel *et al.*, 2009; Bao *et al.*, 2007; Bunde *et al.*, 2005). Par ailleurs, différents peptides immunogènes de restriction HLA variable ont été identifiés pour chacun de ces antigènes immunodominants (Ameres *et al.*, 2013; Elkington *et al.*, 2003; Khan *et al.*, 2007; Wiesner *et al.*, 2005). Il a aussi été montré que les lymphocytes T CD8 spécifiques d'épitopes IE1 et pp65 diffèrent dans l'amplitude de leur réponse immunitaire aux cellules infectées (Khan *et al.*, 2005; Manley *et al.*, 2004; Prod'homme *et al.*, 2003).

Ces données nous ont conduites à analyser les séquences peptidiques IE1 et pp65 de nos souches séquencées à la recherche d'épitopes immunodominants dans les contextes HLA des 2 patients étudiés (Tableau 7).

PHIP	Typage HLA					
	A*	A*	B*	B*	C*	C*
P1	nd	nd	nd	nd	nd	nd
P2	24:02	24:02	18:01	51:01	07:01	14:02
P3	02:01	02:01	44:02	44:02	05:01	05:01
P4	02:01	02:01	39:01	44:02	05:01	12:03
P5	11:01	24:02	15:01	44:03	01:02	16:01
P6	02:01	03:01	40:02	40:02	02:02	05:01
P8	01:01	24:02	15:01	37:01	03:04	06:02
P9	02:01	30:01	39:01	53:01	04:01	07:02
P10	nd	nd	nd	nd	nd	nd
P11	02:01	24:02	14:02	18:01	08:02	12:03
P12	02:01	31:01	14:01	44:02	05:01	08:02
P13	36:01	80:01	18:01	35:01	02:02	04:01
P14	02:01	24:02	39:01	40:01	03:04	12:03
P15	11:01	30:01	35:01	44:02	04:01	05:01
P16	11:01	29:02	07:02	56:01	01:02	07:02
P17	03:01	03:01	14:02	40:01	03:04	08:02
P18	24:03	68:02	35:02	49:01	04:01	07:01
P19	32:01	32:01	13:02	40:02	02:02	06:02
P20	02:01	03:02	44:02	44:02	07:04	16:04

Tableau 7 : Typage HLA des patients PHIP inclus dans l'étude. Les patients P12 et P19 pour lesquels la souche de CMV a pu être isolée sont indiqués en rouge.

Concernant la séquence IE1, nous avons observé respectivement 12, 2 et 15 zones de polymorphisme pour les souches P12, P19 et VHL/E par comparaison à la souche BE/32/2010 (Figure 9). Quant à pp65, seule la mutation D545E a été identifiée dans les souches P12 et VHL/E (Figure 10). Parmi les épitopes IE1 et pp65 de restriction HLA connue, nous observons la présence des épitopes IE1 ILEETSVML et KQIKVRVDMV qui possèdent respectivement une restriction allélique HLA-A*02:01, présentée par le patient P12, et HLA-C*06:02, présentée par le patient P19. Ces épitopes sont soulignés dans la figure 9.

	10	20	30	40	50	60	70	80	90
BE3210	MESSAKRRKMD	PDNPDEGPSS	KVPRPETPVT	KATTFQLQTML	RKEVNSQLSL	GDPLFPPELAE	ESLKTFEQVT	EDCNENPEKD	VLAELVKQIK
P12	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
P19	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
VHLE	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
Merlin	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	--T-----
AD169	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
	100	110	120	130	140	150	160	170	180
BE3210	VRVDMVRHRI	KEHMLKKYAQ	TEEKFTGAFN	MMGGCLQNAL	DILDKVHEPF	EEMKCIGLTM	QSMYENYIVP	EDKREMMWMA	IKELHDVSKG
P12	-----	-----T-	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----T-
P19	-----	-----T-	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----T-
VHLE	-----	-----T-	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----T-
Merlin	-----	-----T-	-----	-----	-D-----	-----	-----	-----	-----
AD169	-----	-----T-	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
	190	200	210	220	230	240	250	260	270
BE3210	AANKLGGALK	AKARAKKDEL	RRKMMYMCYR	NIEFFTCKNSA	FPKTTNGCSQ	AMAAALQNLFPQ	CSPDEIMAYA	QKIFKILDEE	RDKVLTHIDH
P12	-----	-----	K---I-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
P19	-----Q	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
VHLE	-----	-----	K---I-----	-----	-----	-----	-----I---	-----	-----
Merlin	-----Q	-----	-----	-----	-----	-----	-----S--	-----	-----
AD169	-----Q	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
	280	290	300	310	320	330	340	350	360
BE3210	IFMDILTTCV	ETMCNEYKVT	SDACMMTMYG	GISLLSEFCR	VLCCYVLEET	SVMLAKRPLI	TKPEVISVMK	RRIEEICMKV	FAQYILGADP
P12	-----	-----	-----	C-----	-----I---	-----	-----N---	-----	-----
P19	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
VHLE	-----	-----	-----	C-----	-----I---	-L-----	-----N---	-----	-----
Merlin	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
AD169	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
	370	380	390	400	410	420	430	440	450
BE3210	LRVCSPSVDD	LRAIAEESDE	EDAIVAYTLA	TAGASSDSL	VSPPESPVPA	TIPLSSVIVA	ENSDQEESEQ	SDEEEEEGAQ	EEREDTVSVK
P12	-----	-----	---A-----	-----	-----	-----	-----	---Q-----	-----
P19	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
VHLE	-----	-----	---A-----	-----	-----	-----	-----	--D-Q-----	--H-----
Merlin	-----	-----	-D-----	-----	-----	-----	-----	-Q-----	-----
AD169	-----	-----	-D-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
	460	470	480	490					
BE3210	SEPVSEIEEV	APEEEEDGAE	EPTASGGKST	HPMVTRSKAD	Q				
P12	-----Q-	-S-----	---T-----	-----	-				
P19	-----	-----	-----	-----	-				
VHLE	-----	-S-----	---T-----	-----	-				
Merlin	-----	-S-----	-----	-----	-				
AD169	-----	-----	-----	-----	-				

Figure 9: Alignement de la séquence peptidique IE1 des souches P12, P19, VHL/E, Merlin et AD169 face à celle de la souche BE/32/2010.

	10	20	30	40	50	60	70	80	90
BE3210	MESRGRRCPE	MISVLGPISG	HVLKAVFSRG	DTPVLPHETR	LLQTGIHVRV	SQPSLILVSQ	YTPDSTPCHR	GDNLQVQHT	YFTGSEVENV
P12	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
P19	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
VHLE	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
Merlin	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
AD169	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
	100	110	120	130	140	150	160	170	180
BE3210	SVNVHNPTGR	SICPSQEPMS	IYVYALPLKM	LNIPSINVHH	YPSAAERKHR	HLPVADAVIH	ASGKQMWQAR	LTVSGLAWTR	QQNQWKEPDV
P12	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
P19	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
VHLE	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
Merlin	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
AD169	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
	190	200	210	220	230	240	250	260	270
BE3210	YYTSAFVFPT	KDVALRHVVC	AHELVCSMEN	TRATKMQVIG	DQYVKVYLES	FCEDVPSGKL	FMHVTLGSDV	EEDLTMTRNP	QPFMRPHERN
P12	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
P19	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
VHLE	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
Merlin	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
AD169	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
	280	290	300	310	320	330	340	350	360
BE3210	GFTVLCPKNM	IIKPGKISHI	MLDVAFTSHE	HFGLLCPKSI	PGLSISGNLL	MNGQQIFLEV	QAIRETVELR	QYDPVAALFF	FDIDLLLQRG
P12	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
P19	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
VHLE	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
Merlin	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
AD169	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
	370	380	390	400	410	420	430	440	450
BE3210	PQYSEHPTFT	SQYRIQGKLE	YRHTWDRHDE	GAAQGGDDVW	TSGSDSDEEL	VTTERKTPRV	TGGGAMAGAS	TSAGRKRKSA	SSATACTAGV
P12	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
P19	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
VHLE	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
Merlin	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
AD169	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
	460	470	480	490	500	510	520	530	540
BE3210	MTRGRLKAES	TVAPEEDTDE	DSDNEIHNP	VFTWPPWQAG	ILARNLVPMV	ATVQGQNLKY	QEFFWDANDI	YRIFAELEGV	WQPAAQPKRR
P12	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
P19	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
VHLE	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
Merlin	-----	-----S-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
AD169	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
	550	560							
BE3210	RHRQDALPGP	CIASTPKKHR	G						
P12	---E---	-----	-						
P19	-----	-----	-						
VHLE	---E---	-----	-						
Merlin	-----	-----	-						
AD169	-----	-----	-						

Figure 10: Alignement de la séquence peptidique pp65 des souches P12, P19, VHL/E, Merlin et AD169 face à celle de la souche BE/32/2010.

Par ailleurs, afin d'explorer la variabilité des épitopes des protéines IE1 et pp65, nous avons soumis la séquence peptidique des souches P12 et P19 au logiciel NetMCH (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetMHC/>) pour calculer le score d'affinité théorique des épitopes IE1 et pp65 dans le contexte HLA des patients P12 et P19 (Tableau 8). Seuls les épitopes pour lesquels une affinité $\leq$ à 50nM ont été sélectionnés. Parmi eux, trois épitopes IE1 (SLLSEFCRV, TTFLQTMLR et KEVNSQLSL) et 5 épitopes pp65 (NLVPMVATV, RIFAELEGV, LMNGQQIFL, HVLKAVFSR et AIRETVELR) ont été décrits dans la

littérature comme de bons candidats à la réponse T CD8 cytotoxique (Elkington *et al.*, 2003; Khan *et al.*, 2002; Kondo *et al.*, 2004; Rist *et al.*, 2005).

	Génotype HLA	Antigène IE1	Affinité (nM)	Antigène pp65	Affinité (nM)
P12	HLA-A*0201	FMDILTTCV	6.58	NLVPMVATV	25.85
		SLLSEFCRV	11.41	YTSAFVFPT	29.81
		TMYGCISLL	13.96	RIFAELEGV	46.64
		MTMYGCISL	27.58	LMNGQQIFL	49.03
	HLA-A*3101	RKMIYMCYR	12.77	RIQ GKLEYR	4.66
		KSTHPMVTR	15.59	VTTERKTPR	21.38
		MAYA QKIFK	22.97	HVLKAVFSR	27.45
		TTFLQTMLR	46.53	AIRETVELR	49.02
	HLA-B*1401	-	-	-	-
	HLA-B*4402	-	-	-	-
	HLA-C*0501	FMDILTTCV	13.83	-	-
	HLA-C*0802	-	-	-	-
P19	HLA-A*3201	MTMYGGISL	47.76	-	-
	HLA-B*1302	-	-	-	-
	HLA-B*4002	KEVNSQLSL	24.00	HERNGFTVL	31.86
	HLA-C*0202	-	-	-	-
	HLA-C*0602	-	-	-	-

Tableau 8 : Identification des épitopes IE1 de forte affinité pour les molécules HLA de classe I présentes chez les patients P12 et P19. Seuls sont indiqués ceux dont l'affinité d'interaction théorique est $\leq$ à 50nM. Les épitopes indiqués en gras ont déjà été identifiés dans la littérature.

IV. Discussion

Au cours du projet n°2, nous avons montré que la réponse lymphocytaire développée par des patients immunocompétents souffrant d'une primo-infection à CMV symptomatique (PHIP) semblait appropriée. Sur un plan quantitatif, les patients présentaient une lymphocytose significative avec sur le plan qualitatif la présence de lymphocytes NK et T de phénotype précoce fonctionnellement efficaces. Par ailleurs, les acteurs associés à l'infection à CMV comme les cellules NK NKG2C⁺, les T $\alpha\beta$ conventionnels spécifiques du CMV et les T $\gamma\delta$ - étaient significativement représentés chez les PHIP suggérant une réponse immunitaire adaptée à l'infection virale. Cependant le caractère particulièrement symptomatique de l'infection chez ces patients immunocompétents nous a conduits à nous intéresser au polymorphisme viral et ses conséquences potentielles en termes d'immunosubversion. Dans ce projet n°3, nous avons ainsi débuté l'exploration de l'hypothèse selon laquelle l'apparition de manifestations cliniques lors de la primo-infection à CMV chez l'adulte immunocompétent pourrait être due à un polymorphisme viral particulier. Celui-ci pourrait être responsable d'un retard dans la mise en place d'une réponse immunitaire totalement efficace et permettre le développement de symptômes. Cette hypothèse est appuyée par la forte variabilité à laquelle est soumise le CMV. Des polymorphismes génétiques sont d'ailleurs associés à certains des nombreux gènes codés par le CMV dédiés à l'échappement au système immunitaire. D'autres polymorphismes affectent le tropisme cellulaire du virus. Afin de répondre à cette hypothèse, nous avons initié en collaboration avec le groupe de M. Van Ranst le séquençage par NGS des souches de CMV P12 et P19 que nous avons pu isoler à partir de notre cohorte de PHIP. Nous avons également séquençé en parallèle la souche VHL/E que nous utilisons au laboratoire et qui demeure peu caractérisée.

A l'issue du séquençage, nous avons obtenu pour chacune des souches une séquence consensus exploitable. Cela nous a permis d'entamer ce travail préliminaire au cours duquel nous avons débuté par sonder la variabilité génétique de nos souches séquencées par comparaison à des souches dont la séquence est accessible sur la base de données GenBank. D'une façon globale, la construction d'un arbre phylogénétique basé sur l'alignement de diverses séquences de CMV, issues de souches de laboratoire plus ou moins intensivement cultivées sur fibroblastes ou d'isolats cliniques, nous a montré que les souches cliniques P19 et P12 se rapprochent le plus des souches de laboratoire Toledo et Towne, respectivement. La souche VHL/E quant à elle semble plus proche de Merlin. Cet arbre nous permet de nous rendre compte de la diversité des souches circulantes de CMV, comme l'illustre la répartition des isolats cliniques. Nous avons ensuite exploré cette diversité génétique à l'échelle des gènes du CMV. Pour cela, nous nous sommes intéressées aux gènes du CMV préalablement décrits comme fortement divergents entre les souches virales ou comme les plus conservés (Sijmons S *et al.*, 2015). Nous observons effectivement une plus grande variabilité au sein des gènes les plus divergents qu'au niveau des gènes conservés lorsque nous comparons les souches P12, P19 ou VHL/E avec les souches Merlin, AD169 et BE/32/2010. Nous constatons que les souches P12 et P19 présentent moins de polymorphisme au niveau de ces gènes par comparaison à la souche BE/32/2010 que par rapport aux souches de laboratoire Merlin et AD169.

L'analyse du polymorphisme génétique nous a ensuite conduites à mesurer l'impact de cette variabilité des séquences nucléotidiques sur les protéines codées par l'analyse des gènes UL40, UL18, UL142, UL147, UL123 et UL83. Les quatre premiers ont été décrits comme étant soumis à une forte pression de sélection (Sijmons *et al.*, 2015). De plus, ils sont impliqués dans l'échappement à la réponse NK. Quant aux gènes UL123 et UL83, ils codent respectivement pour les protéines virales IE1 et pp65. Celles-ci sont fortement immunogènes

et la quantité de lymphocytes T CD8 spécifiques de ces protéines virales a été associée à un meilleur contrôle de l'infection à CMV en transplantation rénale (Bunde *et al.*, 2005 ; Nebbia *et al.*, 2008 ; Babel *et al.*, 2009 ; Bao *et al.*, 2007).

La séquence de la glycoprotéine UL40 présente dans les souches cliniques P12 et P19 fournit le peptide VMAPRTLIL qui, une fois complexé à HLA-E, forme un complexe de forte affinité pour l'interaction avec le récepteur CD94/NKG2A exprimé par les cellules NK et dans une moindre mesure avec CD94/NKG2C. Il en est de même pour VHL/E, bien que le nonapeptide diffère d'un acide aminé par rapport aux souches P12 et P19. Nous avons vu au cours de l'étude phénotypique que malgré l'expansion précoce de la sous-population NK NKG2C⁺ chez les PHIP, le pendant inhibiteur NK NKG2A⁺ est également fortement représenté. Il serait donc envisageable que le maintien de l'expression de HLA-E, induit par le CMV pour contrer la lyse NK due à l'expression altérée des molécules HLA de classe I, doublé de l'interaction de forte affinité avec le récepteur CD94/NKG2A pourrait contribuer à l'échappement du CMV à la reconnaissance NK dans notre cohorte de PHIP. Il est également intéressant de constater que la souche VHL/E fournit un peptide qui permet une interaction de forte affinité entre la molécule HLA-E et le complexe inhibiteur CD94/NKG2A. Nous avons d'ailleurs investigué cette propriété dans le projet n°1 (Djaoud *et al.*, 2016).

Par ailleurs, la séquence gpUL40 possède des propriétés immunogènes par la sollicitation d'une réponse T CD8 restreinte au HLA-E. Une telle population, phénotype effecteur mémoire, a été identifiée chez des individus sains séropositifs pour le CMV (Pietra *et al.*, 2001 ; Pietra *et al.*, 2003 ; Romagnani *et al.*, 2004 ; Mazzarino *et al.*, 2005). Leur TCR est capable de reconnaître avec une forte affinité les séquences VMAPRTLIL, VMAPRTLLL et VMAPRTLIL issues de la gpUL40 dans le contexte HLA-E (Pietra *et al.*, 2003 ; Allard M *et al.*, 2012). Ces séquences sont identiques à celles portées par de nombreuses molécules HLA-A et HLA-C. Les individus chez qui cette population T CD8 HLA-E/UL40 est

délectable sont dépourvus de molécules HLA de classe I présentant une séquence peptidique susceptible d'être reconnue par de tels lymphocytes, signe d'un mécanisme de prévention d'une potentielle autoréactivité (Pietra *et al.*, 2003 ; Romagnani *et al.*, 2004). De manière très intéressante, tous les PHIP inclus dans notre cohorte présentent, souvent de manière homozygote, soit un allèle HLA-A codant pour le motif VMAPRTLVL soit un allèle HLA-C codant pour le motif VMAPRTLIL, soit les deux. A partir de ces observations, nous pourrions donc en déduire l'absence des cellules T CD8⁺ restreintes au complexe HLA-E/UL40 chez les patients de notre étude. Cela pourrait constituer un nouveau champ d'investigation pour la suite afin d'évaluer si l'absence de cette population chez les PHIP pourrait être néfaste au contrôle de la primo-infection à CMV.

Malgré son polymorphisme, le gène UL18 apparaît hautement conservé dans la séquence du CMV puisqu'on le retrouve dans les souches intensivement cultivées en laboratoire, telle que AD169, et dans les souches cliniques. Nous avons vu que la protéine gpUL18, homologue des molécules HLA de classe I, interagit avec le récepteur inhibiteur ILT-2 exprimé par les cellules NK afin d'empêcher la lyse des cellules infectées par le mécanisme de la reconnaissance du soi manquant. *In vitro*, il a été montré que l'interaction gpUL18/ILT-2 permettait aux cellules infectées par le CMV d'échapper à la lyse médiée par les cellules NK ILT-2⁺ (Prod'Homme *et al.*, 2007). Nos données issues du séquençage montrent que les souches P12 et P19 possèdent le même polymorphisme, DKVPE, que la souche AD169 en position 248-252 du domaine $\alpha 3$ de gpUL18. Or, il a été montré qu'un isolat clinique et la souche de laboratoire Merlin, qui possèdent un polymorphisme NKAPD en position 248-252, présentent une affinité d'interaction 50 fois inférieure à celle de la souche AD169, qui possède le polymorphisme DKVPE à ce même endroit (Valés-Gomez *et al.*, 2005). Cette même équipe a également montré que le polymorphisme NKAPD est associé à une moins bonne protection des cellules infectées contre la lyse par les cellules NK ILT-2⁺.

Des données similaires ont été recueillies par un autre groupe (Cerdoni *et al.*, 2006). De plus, il a récemment été observé dans un modèle *in vitro* de dissémination virale, que la souche AD169 était capable de se propager plus facilement sur une monocouche de fibroblastes que les souches TB40/E et Merlin (Chen *et al.*, 2016). Ces données suggèrent que les souches P12 et P19 pourraient se comporter de la même façon que ce qui a été rapporté pour l'AD169, soit une protection accrue contre l'attaque des cellules NK ILT-2⁺ notamment par la forte affinité de l'interaction entre gpUL18 et ILT-2.

Par ailleurs, des expériences ont pu montrer l'influence de certains gènes du CMV à supprimer la reconnaissance des cellules infectées par les cellules NK, sans que les mécanismes sous-jacents ne soient encore décrits. Cela est illustré par exemple par le degré variable d'inhibition de la réponse des cellules NK induits par certaines gpUL142 d'isolats cliniques (Prod'homme *et al.*, 2007; Wills *et al.*, 2005). Bien que controversées, certaines études ont également associé certains polymorphismes UL142 et UL147 à l'infection symptomatique à CMV. Au cours de notre analyse, nous avons observé le fort polymorphisme de la séquence nucléotidique du gène UL142 et dans une moindre mesure du gène UL147 entre nos souches séquencées et les souches Merlin, AD169 et BE/32/2010. Nous avons constaté l'impact de ces mutations sur la séquence peptidique gpUL142 et gpUL147 de ces souches. Il est cependant difficile de conclure quant au rôle de ce polymorphisme dans la biologie du virus. Des expériences complémentaires pourraient être conduites en ciblant ces protéines pour pouvoir déterminer la conséquence de leur variabilité sur leur capacité à échapper au système immunitaire.

L'un des mécanismes contribuant à l'échappement de la réponse T présenté par le CMV est le polymorphisme des épitopes immunodominants. Dans la séquence des souches P12 et P19, nous avons noté la présence d'épitopes IE1 et pp65 déjà décrits dans la littérature. Ainsi, il a été montré que l'épitope IE1_{ILEETSVML} présenté dans le contexte HLA-A*0201

sollicite une réponse T CD8⁺ adéquate (Prod'Homme *et al.*, 2007). A l'inverse, le complexe entre l'épitope IE1_{KQIKVRVDMV} et la molécule codée par l'allèle HLA-C*0602 n'engendre pas une forte réponse TCD8 (Ameres *et al.*, 2014). Ce même article a montré que la faible réactivité T CD8⁺ spécifique de ce complexe était due à la forte inhibition de l'expression de molécule codée par l'allèle HLA-C*0602 par les protéines virales US3 et US11. Ces deux exemples illustrent les combinaisons protéines virales/contexte HLA présentes chez les patients P12 et P19. Au cours de l'étude phénotypique de la réponse immunitaire chez les PHIP, menée dans le projet précédent, nous avons sondé la réponse T CD8⁺ anti-CMV de cinq patients grâce au pentamère HLA-A*0201/pp65_{NLVPMVATV}. Nous avons effectivement observé l'expansion de ces lymphocytes T spécifiques chez les PHIP. Par ailleurs, nous avons identifié des épitopes prédictifs IE1 et pp65 de forte affinité pour les molécules HLA présentes chez les patients P12 et P19. Certains de ces épitopes ont été décrits dans d'autres contextes HLA. A partir de ces épitopes prédictifs, des tests fonctionnels pourront être conduits, basés sur l'utilisation de lymphocytes T CD8 des patients et de tétramères HLA/peptide viral pour identifier de nouveaux épitopes. Ces expériences permettraient également d'évaluer la réponse T CD8⁺ des patients face à ces épitopes. Il pourrait être envisagé de tester l'activité T CD8⁺ de ces patients *in vitro* en réponse aux épitopes déjà connus afin de vérifier leur bonne activation. L'exploration de la réponse T CD4⁺, importante dans le contrôle de l'infection à CMV, pourrait également renseigner sur la qualité de la réponse lymphocytaire.

Bien que le CMV présente de nombreuses régions polymorphes au sein de son génome, peu d'éléments sont disponibles quant à leur impact sur la pathogénicité des souches virales. Un intérêt croissant de la communauté scientifique porte sur l'association de variants génétiques à la pathogénicité des souches de CMV. En effet, l'un des facteurs qui pourrait contribuer aux variations de la pathogénèse de l'infection est la façon dont les différentes

souches de CMV pourraient interagir avec le système immunitaire. A travers ce projet, nous avons voulu explorer le polymorphisme génétique des souches cliniques isolées de PHIP. Le travail préliminaire exposé ici offre de nombreuses perspectives d'investigation. D'abord dans la compréhension de la variabilité intergénomique des populations de CMV circulantes. Ensuite, à l'échelle intragénomique, avec l'exploration du polymorphisme des gènes dédiés à l'échappement au système immunitaire et de son impact sur la pathogénicité du virus. Nous observons d'ailleurs que les souches P12 et P19 isolées à partir des PHIP présentent des polymorphismes qui se traduisent au niveau protéique par une capacité accrue à contourner la réponse immunitaire (gpUL40, gpUL18, polymorphisme des épitopes IE1). A ce stade, ces données corroborent l'hypothèse d'une variabilité génétique virale responsable d'un déséquilibre dans la relation du virus avec le système immunitaire, favorable au retard du contrôle efficace de l'infection et à l'émergence de manifestations cliniques. Il serait intéressant de constater si ces mutations sont conservées au sein des souches virales de notre cohorte de PHIP. Il est cependant fortement vraisemblable que la combinaison de plusieurs facteurs génétiques soit responsable de ce déséquilibre. En effet, un autre aspect qui pourrait contribuer au degré de virulence des souches virales est le tropisme cellulaire. Notamment, certains gènes codant pour les glycoprotéines d'enveloppe du CMV conditionnent le tropisme cellulaire du virus. Ainsi, selon le génotype de la glycoprotéine d'enveloppe gB du CMV, le virus infecte différemment les types cellulaires. Par exemple, le génotype gB1 n'infecte pas les lymphocytes *in vivo* (Puchhammer-Stöckl and Görzer, 2006). De plus, le génotype gB a été associé au développement de manifestations cliniques sévères chez le patient transplanté et le patient infecté par le VIH (Torok-Storb, 1997)(Torok-Storb *et al.*, 1997). Ces observations ont cependant été contredites par d'autres études et aucun consensus n'existe à ce jour quant à l'impact du génotype gB sur les complications liées à l'infection à CMV (Drew *et al.*, 2002; Sarcinella *et al.*, 2002).

La manipulation intensive de certaines souches de laboratoire telles que l'AD169 ou Towne a mené à un profond remodelage de leur génome. Ces souches pourraient donc ne pas forcément représenter un modèle pertinent quant à l'étude de l'infection à CMV. L'utilisation de souches moins altérées comme Merlin, TB40/E ou VHL/E pourrait être plus appropriée dans certains cas. Dans ce sens, nous avons également procédé au séquençage de la souche VHL/E dans le but d'approfondir nos connaissances sur le génome et la biologie de cette souche de laboratoire, que nous utilisons au laboratoire. La compréhension de son génome devrait permettre d'affiner le *design* et l'interprétation des expériences conduites *in vitro* avec cette souche.

**DISCUSSION
ET PERSPECTIVES**

La population lymphocytaire NK est un effecteur clé de l'immunité innée. Les cellules NK jouent un rôle prépondérant dans la défense de l'organisme contre les infections virales et notamment l'infection à CMV. Le CMV présente une forte prévalence à l'échelle mondiale. Le cycle de l'infection comporte trois phases : la primo-infection, la latence et la réactivation. Généralement bénigne chez le sujet immunocompétent, l'infection à CMV demeure une réelle menace pour les patients dans un contexte d'immunosuppression (transplantation, co-infection par le VIH) et pour les fœtus et nouveaux nés dans un contexte d'infection congénitale ou périnatale. L'infection à CMV génère une forte mobilisation des acteurs immuns et un profond remodelage de différents compartiments lymphocytaires. En particulier, l'expansion de la sous-population NK NKG2C⁺ est associée à l'infection à CMV. Cette sous-population présente un phénotype de maturation tardive et co-exprime préférentiellement des récepteurs KIR2D. L'amplification de cette sous-population est devenue l'une des signatures de l'infection à CMV, bien que son rôle ne soit encore bien compris. C'est dans ce contexte qu'à travers ce projet de thèse nous avons exploré les interactions entre le CMV et le système immunitaire et en particulier les cellules NK. Un premier modèle *in vitro* nous a permis d'étudier le rôle de différentes sous-populations NK dans le contrôle des cellules endothéliales infectées par le CMV. Ce modèle est intéressant dans le sens où les cellules endothéliales sont un site privilégié de la réplication virale, notamment dans le contexte de la transplantation rénale. Ensuite, nous avons investigué les interactions entre l'immunité et le CMV au cours de l'histoire naturelle de l'infection et cela dans un modèle original représenté par une cohorte d'individus adultes souffrant d'une primo-infection sévère à CMV. D'une part, nous avons étudié la réponse lymphocytaire qui se met en place de façon précoce chez ces patients. D'autre part, nous avons initié l'analyse de la variabilité génétique du CMV à la recherche d'éventuels polymorphismes viraux qui pourraient expliquer l'infection symptomatique chez ces patients.

Le rôle des cellules NK dans le contrôle de l'infection à CMV dans un contexte de greffe allogénique de CSH constitue la première ligne de défense de l'organisme puisque ce sont les premières cellules de l'immunité à reconstituer le système immunitaire après greffe. Dans ce cadre, un modèle de co-culture de cellules NK et de DC a précédemment été mis au point au laboratoire dans le but d'étudier le rôle des cellules NK dans un contexte allogénique d'infection à CMV (Djaoud *et al.*, 2013). Ce modèle a permis de mettre en évidence la coexpression préférentielle des récepteurs KIR2D inhibiteurs par la sous-population NK NKG2C⁺. Il a également permis de montrer que la sous-population NK KIR2D⁺NKG2C⁻ témoigne d'un fort potentiel cytotoxique au détriment de la sous-population NK NKG2C⁺ en réponse aux DC allogéniques infectées par le CMV. Bien que ce modèle ait permis de démontrer le rôle des cellules NK KIR⁺ dans le contrôle des DC infectées par le CMV, la faible expression de la molécule HLA-E, ligand du récepteur NKG2C, par les DC ne permettait pas d'étudier de façon convenable la contribution des cellules NK NKG2C⁺ à la réponse antivirale. Pour ce faire, le second modèle *in vitro* basé sur la co-culture des cellules NK avec des cellules endothéliales primaires isolées à partir de donneurs de rein est apparu plus pertinent. Les EC apparaissent en effet plus adaptées à l'étude du rôle des cellules NK NKG2C⁺ dans le contrôle de l'infection, puisqu'elles expriment plus intensément la molécule HLA-E que les DC. De plus, elles sont l'une des cibles de la réplication active du CMV. L'un des mécanismes d'échappement à la réponse lymphocytaire T développé par le CMV est l'inhibition de l'expression membranaire des molécules HLA de classe I. Cela devrait donc impacter l'expression membranaire de la molécule HLA-E, qui dépend du chargement d'un peptide dérivé de la séquence signal des molécules HLA de classe I au niveau de son sillon peptidique. Dans ce modèle, nous montrons que bien que la *down-régulation* des molécules HLA de classe I induite par le CMV affecte à la fois les EC, DC et fibroblastes, le maintien ou non de l'expression de la molécule HLA-E dépend du type cellulaire infecté. En particulier,

les EC conservent l'expression à leur surface de la molécule HLA-E. Cela s'explique probablement par l'expression de la glycoprotéine gpUL40 codée par le CMV qui permet le maintien de la molécule HLA-E à la surface cellulaire en cédant un peptide homologue à celui des molécules HLA de classe I qui se loge dans le sillon peptidique de la molécule HLA-E. Le maintien sélectif de l'expression de la molécule HLA-E selon le type de cellule infectée suggère cependant l'implication d'autres mécanismes. La conservation de l'expression de la molécule HLA-E à la surface des cellules infectées la rend disponible à l'interaction avec le complexe CD94/NKG2C mais aussi avec le complexe inhibiteur CD94/NKG2A, tous deux exprimés par les cellules NK. Le récepteur NKG2A reconnaît lui aussi la molécule HLA-E, avec une affinité supérieure à celle du récepteur NKG2C. Dans ce modèle, nous montrons que les cellules NK NKG2C⁺ dégranulent fortement au contact des EC infectées. De plus, la sous-population NK NKG2C⁺ ne co-exprime pas ou très peu le récepteur inhibiteur NKG2A, ce qui aurait pu interférer avec le signal activateur médié par le récepteur NKG2C. Nous en concluons que ces éléments pourraient constituer un terrain favorable à l'expansion des cellules NK NKG2C⁺. Par ailleurs, nous avons également montré le rôle immunomodulateur des récepteurs KIR dans la réponse des cellules NK NKG2C⁺. Grâce à ces deux modèles, NK/DC et NK/EC, nous montrons que différentes sous-populations cellulaires NK sont sollicitées selon le type cellulaire infecté. Ces modèles de co-culture allogénique miment également le contexte de la transplantation, en particulier la greffe de CSH et le greffe de rein, dans lequel nous l'avons vu l'infection à CMV demeure une complication majeure (Figure 28). Par ailleurs, nous avons récemment mené une étude visant à investiguer le répertoire des cellules NK issues de sang de cordon, par comparaison au répertoire NK circulant de l'adulte (Rettman *et al.*, 2016, annexe). La greffe de sang de cordon peut en effet constituer une alternative à la greffe de CSH de sang périphérique ou de moelle osseuse. Dans cette étude, nous avons observé que les cellules NK de sang de cordon expriment le récepteur NKG2C,

contrairement aux cellules NK circulantes de l'adulte séronégatif pour le CMV. Ces cellules NK NKG2C⁺ étaient fonctionnelles et pourraient donc être impliquées dans le contrôle de l'infection à CMV chez le receveur de sang de cordon. Ces résultats pourraient à terme avoir un intérêt pour la prise en charge thérapeutique de l'infection à CMV chez le patient transplanté. On pourrait également imaginer la prise en compte de l'environnement KIR/HLA chez le receveur post-greffe dans un souci de meilleur contrôle de l'infection à CMV. L'identification de sous-populations cellulaires NK et l'environnement HLA du receveur pourraient être considérés comme des marqueurs prédictifs du contrôle de l'infection à CMV.

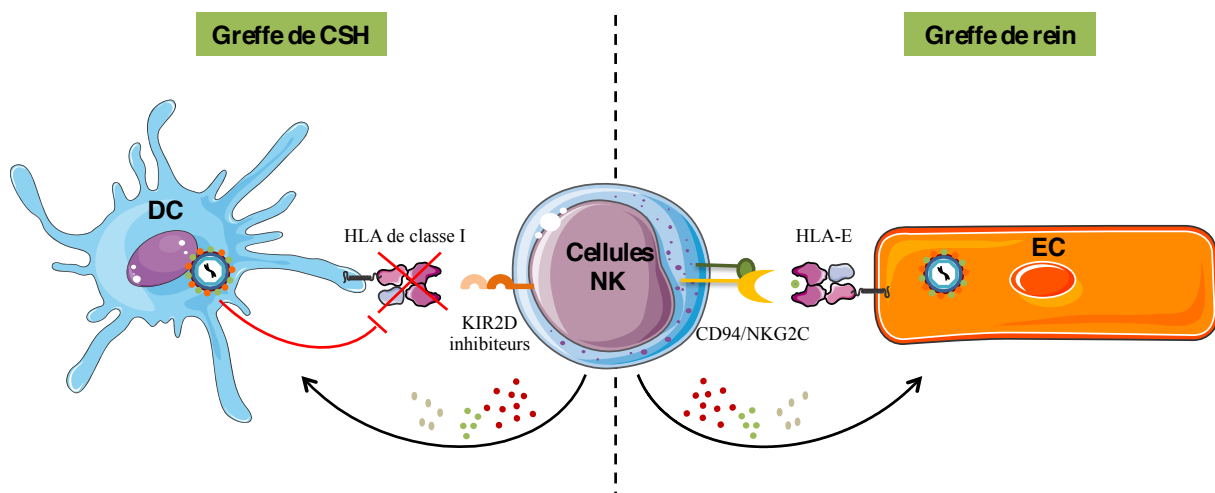


Figure 28 : Alloréactivité des sous-populations NK au cours de l'infection à CMV dans le contexte de la greffe de CSH et la greffe de rein. Selon le type d'interaction récepteur/ligand, différentes sous-populations NK pourraient être mobilisées au cours de l'infection à CMV selon la cible cellulaire infectée. D'après nos modèles de co-culture *in vitro*, les sous-populations NK KIR2D⁺ semblent préférentiellement impliquées dans l'élimination des DC infectées par le CMV qui induit la down-régulation des molécules HLA de classe I à la surface cellulaire. Au contraire, les EC semblent induire une réponse alloréactive NK NKG2C⁺.

Nous avons observé que les cellules NK KIR2DL3⁺ étaient inhibées par des DC exprimant le ligand C1 du KIR2DL3 (Djaoud Z *et al.*, 2013). Cependant dans notre modèle d'infection des DC avec la souche VHL/E, malgré une *down-régulation* de l'expression des molécules HLA de classe I sur les DC infectées, nous n'observions pas d'activation significative des cellules NK KIR2DL3⁺, suggérant un mécanisme d'échappement du CMV aux cellules NK KIR2DL3⁺. A la même période, le groupe de Moosman a démontré que le CMV *down-régulait* certaines molécules HLA de classe I mais maintenait l'expression de la molécule HLA-Cw7 à la surface cellulaire des cellules infectées, permettant ainsi de maintenir l'inhibition des cellules NK KIR2DL3⁺ (Ameres *et al.*, 2013). Cette observation a donné lieu à un projet initié par le Dr Zakia Djaoud au cours de sa thèse de doctorat au sein de notre équipe que j'ai poursuivi en parallèle à mes travaux de thèse. Ce projet a consisté en l'étude de l'impact de deux protéines immunodominantes du CMV, IE1 et pp65, sur les capacités fonctionnelles des cellules NK KIR⁺. Pour cela, des modèles de co-culture *in vitro* ont été mis en place, basés sur la stimulation de PBMC avec des lignées B-EBV (C1C2) transfectées avec l'une ou l'autre des protéines immunodominantes du CMV, IE1 et pp65. L'équipe avait précédemment validé ce modèle d'amplification des cellules NK afin d'étudier l'impact de l'environnement HLA en terme de ligand KIR sur la prolifération des sous-populations NK KIR (Morvan *et al.*, 2008). Par ailleurs, nous disposions au laboratoire des lignées B-EBV transfectées pour exprimer IE1 ou pp65, établies précédemment pour étudier la spécificité de reconnaissance des protéines IE1 et pp65 par les lymphocytes T conventionnels (Retière *et al.*, 2000). Grâce à cette approche, nous avons pu évaluer l'impact de IE1 et pp65 sur la prolifération des sous-populations NK KIR. Nous avons ainsi observé l'inhibition significative des cellules NK et de la sous-population NK KIR2DL3⁺ par la lignée B-EBV qui exprime pp65. Cet impact n'a pas été observé pour les autres sous-populations NK étudiées (KIR2DL1, KIR2DS1, KIR3DL1, KIR3DS1, KIR2DL2 et KIR2DS4). De même, IE1 n'a eu

aucun impact significatif sur la prolifération des sous-populations NK KIR étudiées. Nous avons ensuite montré que la dégranulation et la production d'IFN γ par les cellules NK KIR2DL3⁺ étaient aussi inhibées par l'expression de pp65 au niveau des cibles et de façon dépendante du HLA. Nous émettons l'hypothèse qu'un peptide issu de pp65 permettrait d'optimiser l'interaction entre le KIR2DL3 et son ligand HLA-C inhibant ainsi les fonctions effectrices des cellules NK KIR2DL3⁺. Des données similaires ont été observées pour le VHC et le VIH, ce qui suggère de potentiels mécanismes d'échappement de ces virus aux cellules NK KIR⁺ (Lunemann *et al.*, 2016 ; Holzemer *et al.*, 2015). Ce travail est non achevé et sera poursuivi au laboratoire. Il n'a pas été présenté en détails dans ce rapport de thèse mais contribue à la réflexion générale du projet.

Bien que les cellules NK contribuent au contrôle de l'infection à CMV, l'implication de nombreux acteurs cellulaires a été démontrée et étudiée chez les individus immunodéficients ou dans le contexte de l'infection congénitale. En effet, la primo-infection à CMV n'occasionne que peu ou pas de symptômes chez l'individu immunocompétent. Cependant, de nombreux cas cliniques disponibles dans la littérature décrivent un tableau symptomatique parfois sévère de la primo-infection chez l'individu immunocompétent. Les éléments de la réponse immunitaire qui se met en place contre l'infection active à CMV ont été mis en évidence dans des contextes physiopathologiques telles que l'infection congénitale ou l'infection chez l'individu immunodéprimé. A notre connaissance, aucune donnée immunologique n'a été rapportée chez l'adulte immunocompétent. Il est cependant difficile de détecter la primo-infection à CMV dans ce contexte puisque bien souvent silencieuse. Afin d'investiguer les événements précoces de la réponse immunitaire au cours de l'histoire naturelle de l'infection à CMV, nous avons établi une cohorte d'adultes immunocompétents (PHIP) dont la primo-infection à CMV est symptomatique. Deux hypothèses ont été formulées quant au bouleversement de l'équilibre hôte/virus observé chez ces patients

symptomatiques, l'une ciblant le polymorphisme de l'hôte et l'autre le polymorphisme viral. En effet, en cas de dysfonctionnement de sous-populations immunitaires et/ou en la présence de gènes de virulence associés à l'évasion au système immunitaire, la balance entre la pathogenèse et la clairance du virus peut être modifiée. Il est aussi fort probable que les deux protagonistes, l'hôte et le virus, contribuent tous deux à moduler cet équilibre.

La première hypothèse de ce projet était que malgré le statut apparent d'immunocompétence des PHIP, un éventuel « défaut » dans la réponse immunitaire de ces patients pouvait induire un retard dans le contrôle de la primo-infection. Cette hypothèse est notamment appuyée par la forte expansion des lymphocytes T CD8⁺ spécifiques de l'EBV associée à la mononucléose infectieuse aigüe, que l'on ne retrouve pas lors de la primo-infection asymptomatique (Callan *et al.*, 1996; Jayasooriya *et al.*, 2015). Nous émettions ainsi l'hypothèse d'un défaut potentiel de la réponse immunitaire tout aussi bien au niveau quantitatif des sous-compartiments lymphocytaires qu'au niveau qualitatif avec des sous-populations effectrices sur ou sous représentées. Pour cela, nous avons mené une analyse phénotypique et fonctionnelle des lymphocytes circulants. Nous avons observé une lymphocytose qui touche les cellules NK, les lymphocytes T $\alpha\beta$ et T $\gamma\delta$. L'expansion des sous-populations NK NKG2C⁺ et T $\gamma\delta$ V δ 2⁻, signature de l'infection à CMV, caractérise les PHIP. De plus, les effecteurs NK et T témoignent d'un phénotype effecteur précoce. Au cours de cette analyse, nous n'avons pas observé de populations lymphocytaires déficientes. Ce projet nous a permis de caractériser d'un point de vue phénotypique, fonctionnel et transcriptomique la réponse lymphocytaire qui se met en place chez l'adulte immunocompétent. A court terme, nous envisageons d'explorer d'autres mécanismes de la réponse immunitaire non abordés ici. En effet, nous avons vu précédemment que l'entrée du virus dans les cellules déclenchait un état antiviral avec la production d'IFN de type I. Nous avons également vu que le CMV a développé des mécanismes pour contourner la mise en

place de cet état antiviral. Les polynucléaires neutrophiles, membres de l'immunité innée, sont impliqués dans la dissémination du virus dans l'organisme sans être le siège d'une réplication virale active. Les monocytes et cellules dendritiques sont aussi des effecteurs cruciaux dans le contrôle précoce de l'infection virale et dans le développement de la réponse immunitaire adaptative. En particulier, la sous-population de cellules dendritiques plasmacytoïdes est impliquée dans la défense antivirale et sécrète de fortes quantités d'IFN de type I. Les facteurs solubles, telles que les cytokines et chimiokines, sont également primordiaux dans le recrutement et le dialogue des acteurs de l'immunité. De plus, l'emballement de la production de ces molécules, que l'on pourrait attribuer par extrapolation à la lymphocytose, pourrait également être à l'origine d'un processus inflammatoire de grande ampleur, responsable des symptômes observés chez les PHIP. Il a d'ailleurs été suggéré qu'un fort taux de la chimiokine CXCL16 (impliquée dans la chemoattraction des effecteurs TH1 au niveau des muqueuses) pouvait être un marqueur prédictif du développement d'une infection symptomatique à CMV après transplantation pulmonaire (Gorzer *et al.*, 2012). Malgré la difficulté que cela implique, il serait envisageable d'étudier les événements immunitaires précoces qui se développent au cours de la primo-infection asymptomatique à CMV chez l'adulte, comme cela a déjà été fait pour l'EBV (Jayasooriya *et al.*, 2015). Par ailleurs, nous avons également effectué un typage immunogénétique KIR/HLA des PHIP. Il a été rapporté par plusieurs groupes le rôle des récepteurs KIR activateurs dans le contrôle de la réactivation à CMV après greffe de rein ou de CSH (Cook *et al.*, 2006 ; Hadaya *et al.*, 2008 ; Stern *et al.*, 2008). Récemment, une étude a montré l'association de l'haplotype KIR AA (le seul gène activateur présent est le KIR2DS4) ou d'un allèle portant le motif HLA-Bw4^T avec le développement d'une primo-infection symptomatique à CMV chez l'adulte immunocompétent (Di Bona *et al.*, 2014). Nous ne confirmons cependant pas ces données dans notre étude. Cela pourrait s'expliquer par la taille de notre cohorte, inférieure à celle du

groupe de Di Bona *et al.* Cependant, il serait intéressant d'investiguer l'impact fonctionnel du polymorphisme allélique des récepteurs KIR tout comme la nature des peptides présentés par les molécules HLA de classe I. Par exemple, la nature de l'allèle qui code pour le récepteur KIR3DL1 influence l'expression protéique du récepteur. Le développement d'une technique de typage KIR par NGS est actuellement en cours de développement au laboratoire. Cela pourrait constituer un outil de choix dans l'étude de l'impact de la nature allélique KIR sur les interactions avec les molécules HLA de classe I au cours de l'infection à CMV, interactions qui demeurent peu renseignées dans la littérature. De plus, il a été montré que la nature des peptides viraux présentés par les molécules HLA de classe I pouvait moduler l'affinité de l'interaction du complexe HLA/peptide avec les récepteurs KIR, suggérant ainsi un mécanisme d'échappement à la pression immunitaire exercée par les cellules NK KIR⁺ (Fadda *et al.*, 2012 ; Lueneman *et al.*, 2016). Il s'agit d'ailleurs d'un champ que nous explorons au laboratoire, comme nous l'avons évoqué précédemment, avec l'étude de la potentielle fonction inhibitrice exercée par pp65 sur la sous-population NK KIR2DL3⁺.

Il est concevable que la conjonction du polymorphisme de l'hôte avec le polymorphisme du virus soit à l'origine d'un délai dans le développement d'une réponse immunitaire tout à fait efficace favorisant ainsi l'apparition de symptômes. C'est pourquoi nous avons débuté l'exploration de notre seconde hypothèse concernant ce projet. Nous avons formulé l'hypothèse qu'un polymorphisme particulier du virus pouvait interférer avec le développement adéquat de la réponse immunitaire. En effet, le CMV est soumis à un fort polymorphisme génétique et possède de nombreux mécanismes dédiés à l'échappement à la réponse immunitaire. De nombreuses études ont tenté d'imputer un tableau clinique symptomatique à des facteurs de virulence viraux, sans qu'un consensus n'ait été établi (UL73, UL142, UL144, UL146, UL147). Certaines variabilités génétiques du CMV ont cependant été associées *in vitro* à un profil de virulence potentiellement accru (UL18, UL40).

Grâce au séquençage par NGS de deux souches de CMV isolées à partir de PHIP, nous avons réalisé un travail préliminaire qui vise à explorer la variabilité inter et intragénomique du CMV. La technologie NGS nous offre la possibilité d'explorer la variabilité génétique du CMV à grande échelle de façon plus simple et rapide que les techniques de séquençage habituelles. Elle permet aussi d'avoir accès à la variabilité du génome entier quand de nombreuses études se sont focalisées sur le séquençage de seulement quelques gènes. Cela permet en effet d'étudier la combinaison de plusieurs polymorphismes et de leur impact sur la pathogenèse du virus. Nous avons également séquencé en parallèle et intégré à l'étude la souche de laboratoire endothéliotrope VHL/E que nous utilisons au laboratoire afin de mieux la caractériser. L'étude des altérations du génome des souches de laboratoire est essentielle pour la compréhension de leur impact dans nos modèles d'infection expérimentaux. Elle est aussi nécessaire pour analyser la pression de sélection qui peut s'exercer sur le génome du CMV notamment dans le contexte de l'adaptation à un nouveau milieu.

Au cours de ce travail préliminaire, nous avons observé une grande hétérogénéité génétique entre les souches que nous avons séquencées et les souches auxquelles nous les avons comparées. Les gènes soumis à un moindre polymorphisme sont surtout les gènes essentiels au virus, tels que les gènes de structure du virion. D'autres gènes, souvent non-essentiels au cycle du virus, sont soumis à un fort polymorphisme. Ils sont notamment impliqués dans l'immunomodulation et pourraient avoir un impact sur la pathogenèse de l'infection. En nous concentrant sur quelques gènes impliqués dans l'immunoévasion, nous avons observé des polymorphismes viraux au sein des souches isolées de PHIP qui vont dans le sens d'un potentiel d'échappement à la réponse NK et T. Ces données soulèvent de nombreuses questions qui pourront faire l'objet d'investigations plus poussées. Ainsi, le polymorphisme des gènes UL40 et UL18 a été associé *in vitro* à la résistance des cellules infectées à la reconnaissance par les cellules NK. Parfois, le génotype de certains gènes viraux

a été associé au développement de manifestations symptomatiques au cours de l'infection congénitale à CMV ou dans un contexte de transplantation, sans qu'une explication biologique n'ait été mise en évidence. Cela demeure cependant controversé, comme en témoignent les polymorphismes des gènes UL142 et UL147. Un autre exemple est le produit du gène UL144 qui est un homologue tronqué du récepteur au TNF- α . Trois génotypes dominants ont été identifiés A, B et C ainsi que deux génotypes recombinants A/B et A/C (Lurain *et al.*, 1999 ; Arav-Boger *et al.*, 2002). Dans un contexte d'infection congénitale, les génotypes A et C ont été retrouvés exclusivement chez les enfants symptomatiques (Adav-Roger *et al.*, 2002). D'autres études ne sont cependant pas parvenues aux mêmes conclusions (Nijman *et al.*, 2014). Au sein de nos souches cliniques, la souche P12 est de génotype C et la souche P19 de génotype recombinant A/C. De façon globale, bien que des polymorphismes soient observés dans les séquences virales issues des PHIP, il est cependant difficile de conclure à une quelconque association de virulence face à cette littérature jusqu'ici contradictoire. Grâce aux modèles cellulaires *in vitro* développés au laboratoire, basés sur l'infection de DC ou d'EC, nous comptons approfondir l'étude de la variabilité génétique des souches cliniques du CMV sur la réponse immunitaire, et particulièrement la réponse NK. La souche VHL/E pour laquelle nous avons défini la séquence constitue une référence de choix pour évaluer les isolats cliniques obtenus à partir de deux PHIP. Le CMV possède un large tropisme cellulaire, qui pourrait aussi contribuer à la pathogenèse de l'infection. Nous pourrions également évaluer le comportement de différentes cibles cellulaires face aux souches cliniques, par comparaison à l'infection avec des souches de laboratoire. La faculté de dissémination virale des isolats cliniques pourrait aussi être explorée.

Un autre point qui pourrait contribuer à la modulation de la virulence virale par l'interaction avec les protéines virales est le polymorphisme génétique de l'hôte. Ainsi, selon le variant allélique MICB ou ULBP1/2 de l'hôte, l'affinité de l'interaction avec UL16 est

modulée et donc le degré d'inhibition de l'expression de ces ligands du récepteur activateur NKG2D, exprimé par les cellules NK (Muller S *et al.*, 2010). Un autre exemple est l'impossibilité d'inhiber l'expression membranaire du produit tronqué de l'allèle MICA*008 par la gpUL142 (Chalupny *et al.*, 2006). Le CMV code les glycoprotéines gp34 (RL11) et gp68 (UL119-118) qui sont des homologues aux récepteurs au fragment Fc des anticorps (FcγR). Selon l'allotype des IgG, les FcγR viraux les fixent avec plus ou moins d'affinité. Nous avons également abordé dans l'introduction le polymorphisme des TLR qui a été associé au développement d'une maladie symptomatique à CMV chez l'enfant et le patient transplanté (Kijpittayarit *et al.*, 2007 ; Kang *et al.*, 2012 ; Brown *et al.*, 2009 ; Paradowska *et al.*, 2014 ; Wujcicka *et al.*, 2015). Un autre exemple est le polymorphisme 158V/F du récepteur CD16 qui a été associé à une meilleure réponse cellulaire NK par le mécanisme de l'ADCC dans l'infection à CMV (Wu Z *et al.*, 2015). La figure 29 résume l'approche *ex vivo* de l'étude de l'infection à CMV menée au cours de ces travaux de thèse.

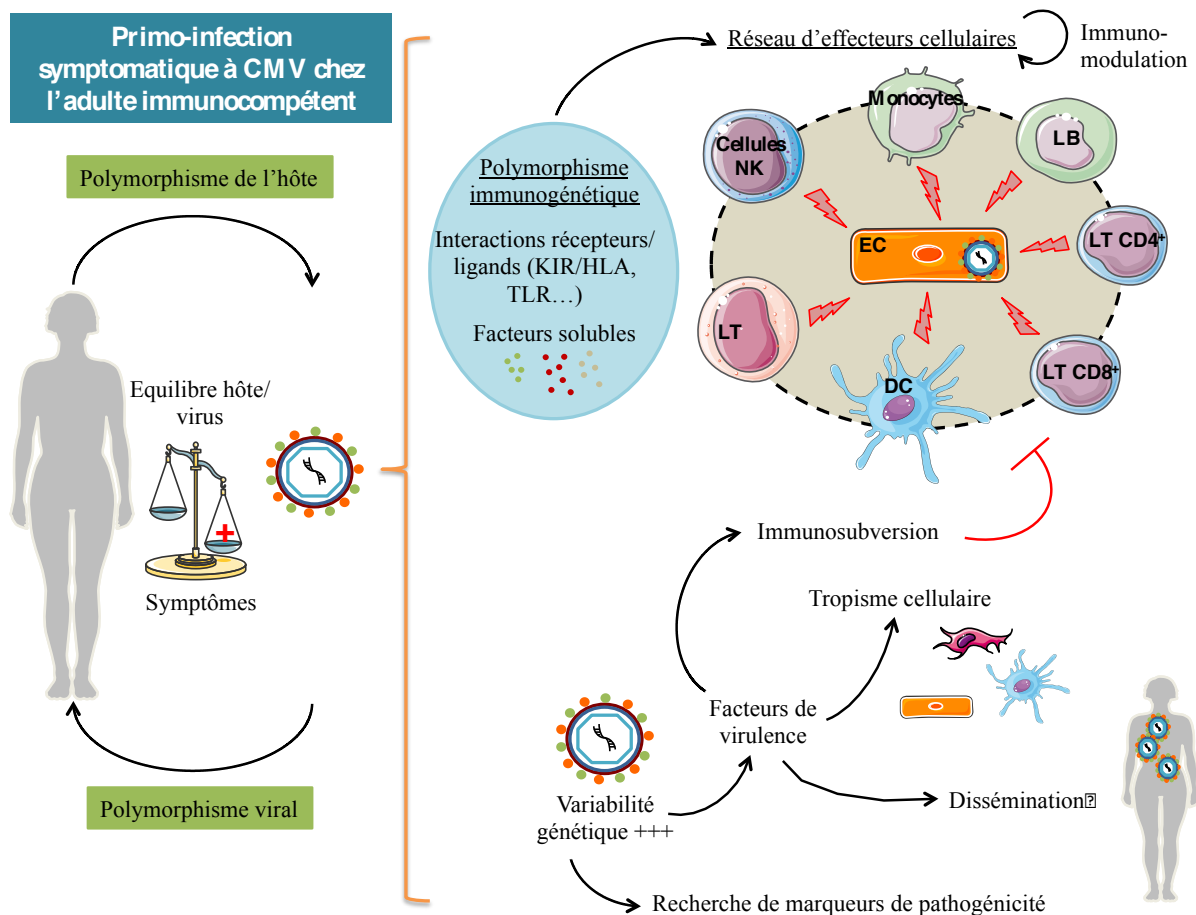


Figure 29 : La primo-infection symptomatique chez l'adulte immunocompétent. D'ordinaire bien tolérée par l'organisme, la primo-infection à CMV peut s'avérer symptomatique chez l'individu immunocompétent, témoignant ainsi d'un bouleversement de l'équilibre hôte/virus. La réponse immunitaire qui se met en place au cours de l'infection fait intervenir une multitude d'effecteurs cellulaires, qui dépendent notamment des interactions récepteurs/ligands, et solubles. Ces acteurs de l'immunité sont soumis à une variabilité immunogénétique qui peut moduler leurs fonctions effectrices mais aussi à une autorégulation pour éviter le phénomène d'auto-immunité. Les manifestations symptomatiques, observées dans ce contexte d'immunocompétence, pourraient être due à la perturbation de l'un de ces mécanismes qui pourrait contribuer à un retard dans le développement d'une réponse immunitaire efficace contre le CMV, ou qui pourrait engendrer un emballement de la réponse immunitaire mal contrôlé. De plus, le CMV est soumis à une très forte variabilité génétique, notamment au niveau de gènes de virulence impliqués dans la dissémination, le tropisme et l'immunosubversion du virus. Il est donc concevable que l'apparition de manifestations cliniques au cours de la primo-infection à CMV chez l'adulte immunocompétent puisse s'expliquer par la conjonction de polymorphismes particuliers de l'hôte et du virus.

L'approche *in vitro* de ce travail de thèse devrait contribuer à la meilleure compréhension de la mobilisation des sous-populations NK au cours de l'infection à CMV, selon le site cellulaire de l'infection. Ensuite, nous avons abordé les mécanismes qui peuvent perturber l'équilibre entre la réponse immunitaire et l'infection virale au cours de l'histoire naturelle de l'infection à CMV. Plutôt qu'un défaut de la réponse immunitaire ou une virulence accrue codée par le génome viral, il s'agirait plutôt de la conjonction du polymorphisme de l'hôte et du virus qui pourrait mener à un contrôle retardé de la dissémination et de la réplication virale, permettant ainsi le développement d'une maladie symptomatique à CMV. L'ensemble de ces travaux trouve notamment son intérêt dans un contexte d'immunosuppression ou d'infection congénitale où l'infection à CMV persiste en tant que menace pour la santé des patients. La compréhension de la mise en place de la réponse immunitaire au cours de la primo-infection chez l'individu immunocompétent, l'identification des sous-populations NK majeures dans le contrôle de l'infection à CMV ou encore le séquençage par NGS d'isolats cliniques pourraient à terme permettre le développement de marqueurs prédictifs ou de nouvelles stratégies thérapeutiques et vaccinales.

REFERENCES
BIBLIOGRAPHIQUES

Afonina, I.S., Cullen, S.P., and Martin, S.J. (2010). Cytotoxic and non-cytotoxic roles of the CTL/NK protease granzyme B. *Immunol. Rev.* 235, 105–116.

Agrawal, S., Marquet, J., Freeman, G.J., Tawab, A., Bouteiller, P.L., Roth, P., Bolton, W., Ogg, G., Boumsell, L., and Bensussan, A. (1999). Cutting edge: MHC class I triggering by a novel cell surface ligand costimulates proliferation of activated human T cells. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 162, 1223–1226.

Ahn, J.H., and Hayward, G.S. (1997). The major immediate-early proteins IE1 and IE2 of human cytomegalovirus colocalize with and disrupt PML-associated nuclear bodies at very early times in infected permissive cells. *J. Virol.* 71, 4599–4613.

Aldemir, H., Prod'homme, V., Dumaurier, M.-J., Retiere, C., Poupon, G., Cazareth, J., Bihl, F., and Braud, V.M. (2005). Cutting edge: lectin-like transcript 1 is a ligand for the CD161 receptor. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 175, 7791–7795.

Ali, A.K., Oh, J.S., Vivier, E., Busslinger, M., and Lee, S.-H. (2016). NK Cell-Specific Gata3 Ablation Identifies the Maturation Program Required for Bone Marrow Exit and Control of Proliferation. *J. Immunol.* 196, 1753–1767.

Alter, G., Teigen, N., Davis, B.T., Addo, M.M., Suscovich, T.J., Waring, M.T., Streeck, H., Johnston, M.N., Staller, K.D., Zaman, M.T., et al. (2005). Sequential deregulation of NK cell subset distribution and function starting in acute HIV-1 infection. *Blood* 106, 3366–3369.

Ameres, S., Mautner, J., Schlott, F., Neuenhahn, M., Busch, D.H., Plachter, B., and Moosmann, A. (2013). Presentation of an Immunodominant Immediate-Early CD8⁺ T Cell Epitope Resists Human Cytomegalovirus Immuno-evasion. *PLoS Pathog* 9, e1003383.

Anders, D.G., Kerry, J.A., and Pari, G.S. (2007). DNA synthesis and late viral gene expression. In *Human Herpesviruses: Biology, Therapy, and Immunoprophylaxis*, A. Arvin, G. Campadelli-Fiume, E. Mocarski, P.S. Moore, B. Roizman, R. Whitley, and K. Yamanishi, eds. (Cambridge: Cambridge University Press),.

Andersson, S., Fauriat, C., Malmberg, J.-A., Ljunggren, H.-G., and Malmberg, K.-J. (2009). KIR acquisition probabilities are independent of self-HLA class I ligands and increase with cellular KIR expression. *Blood* 114, 95–104.

Anfossi, N., André, P., Guia, S., Falk, C.S., Roetynck, S., Stewart, C.A., Bresó, V., Frassati, C., Revirón, D., Middleton, D., et al. (2006). Human NK cell education by inhibitory receptors for MHC class I. *Immunity* 25, 331–342.

Anumanthan, A., Bensussan, A., Boumsell, L., Christ, A.D., Blumberg, R.S., Voss, S.D., Patel, A.T., Robertson, M.J., Nadler, L.M., and Freeman, G.J. (1998). Cloning of BY55, a novel Ig superfamily member expressed on NK cells, CTL, and intestinal intraepithelial lymphocytes. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 161, 2780–2790.

Appay, V., Dunbar, P.R., Callan, M., Klenerman, P., Gillespie, G.M.A., Papagno, L., Ogg, G.S., King, A., Lechner, F., Spina, C.A., et al. (2002). Memory CD8⁺ T cells vary in

differentiation phenotype in different persistent virus infections. *Nat. Med.* 8, 379–385.

Aramaki, T., Ida, H., Izumi, Y., Fujikawa, K., Huang, M., Arima, K., Tamai, M., Kamachi, M., Nakamura, H., Kawakami, A., et al. (2009). A significantly impaired natural killer cell activity due to a low activity on a per-cell basis in rheumatoid arthritis. *Mod. Rheumatol. Jpn. Rheum. Assoc.* 19, 245–252.

Aramburu, J., Balboa, M.A., Ramírez, A., Silva, A., Acevedo, A., Sánchez-Madrid, F., De Landázuri, M.O., and López-Botet, M. (1990). A novel functional cell surface dimer (Kp43) expressed by natural killer cells and T cell receptor-gamma/delta+ T lymphocytes. I. Inhibition of the IL-2-dependent proliferation by anti-Kp43 monoclonal antibody. *J. Immunol. Baltim. Md* 1950 144, 3238–3247.

Arase, H., Mocarski, E.S., Campbell, A.E., Hill, A.B., and Lanier, L.L. (2002). Direct recognition of cytomegalovirus by activating and inhibitory NK cell receptors. *Science* 296, 1323–1326.

Arase, N., Arase, H., Park, S.Y., Ohno, H., Ra, C., and Saito, T. (1997). Association with FcRgamma is essential for activation signal through NKR-P1 (CD161) in natural killer (NK) cells and NK1.1+ T cells. *J. Exp. Med.* 186, 1957–1963.

Arav-Boger, R., Boger, Y.S., Foster, C.B., and Boger, Z. (2008). The use of artificial neural networks in prediction of congenital CMV outcome from sequence data. *Bioinforma. Biol. Insights* 2, 281–289.

Arnon, T.I., Achdout, H., Levi, O., Markel, G., Saleh, N., Katz, G., Gazit, R., Gonen-Gross, T., Hanna, J., Nahari, E., et al. (2005). Inhibition of the NKp30 activating receptor by pp65 of human cytomegalovirus. *Nat. Immunol.* 6, 515–523.

Artavanis-Tsakonas, K., and Riley, E.M. (2002). Innate immune response to malaria: rapid induction of IFN-gamma from human NK cells by live *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes. *J. Immunol. Baltim. Md* 1950 169, 2956–2963.

Artavanis-Tsakonas, K., Eleme, K., McQueen, K.L., Cheng, N.W., Parham, P., Davis, D.M., and Riley, E.M. (2003). Activation of a subset of human NK cells upon contact with *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes. *J. Immunol. Baltim. Md* 1950 171, 5396–5405.

Asadullah, K., Prösch, S., Audring, H., Büttnerova, I., Volk, H.D., Sterry, W., and Döcke, W.D. (1999). A high prevalence of cytomegalovirus antigenaemia in patients with moderate to severe chronic plaque psoriasis: an association with systemic tumour necrosis factor alpha overexpression. *Br. J. Dermatol.* 141, 94–102.

Ashkar, A.A., Santo, J.P.D., and Croy, B.A. (2000). Interferon γ Contributes to Initiation of Uterine Vascular Modification, Decidual Integrity, and Uterine Natural Killer Cell Maturation during Normal Murine Pregnancy. *J. Exp. Med.* 192, 259–270.

Babel, N., Brestrich, G., Gondek, L.P., Sattler, A., Wlodarski, M.W., Poliak, N., Bethke, N., Thiel, A., Hammer, M.H., Reinke, P., et al. (2009). Clonotype analysis of cytomegalovirus-

specific cytotoxic T lymphocytes. *J. Am. Soc. Nephrol. JASN* 20, 344–352.

Bacon, L., Eagle, R.A., Meyer, M., Easom, N., Young, N.T., and Trowsdale, J. (2004). Two human ULBP/RAET1 molecules with transmembrane regions are ligands for NKG2D. *J. Immunol. Baltim. Md* 1950 173, 1078–1084.

Bao, L., Sun, Q., and Lucas, K.G. (2007). Rapid generation of CMV pp65-specific T cells for immunotherapy. *J. Immunother. Hagerstown Md* 1997 30, 557–561.

Barakonyi, A., Rabot, M., Marie-Cardine, A., Aguerre-Girr, M., Polgar, B., Schiavon, V., Bensussan, A., and Le Bouteiller, P. (2004). Cutting edge: engagement of CD160 by its HLA-C physiological ligand triggers a unique cytokine profile secretion in the cytotoxic peripheral blood NK cell subset. *J. Immunol. Baltim. Md* 1950 173, 5349–5354.

Baratin, M., Roetynck, S., Lépolard, C., Falk, C., Sawadogo, S., Uematsu, S., Akira, S., Ryffel, B., Tiraby, J.-G., Alexopoulou, L., et al. (2005). Natural killer cell and macrophage cooperation in MyD88-dependent innate responses to *Plasmodium falciparum*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 102, 14747–14752.

Bareau, B., Rey, J., Hamidou, M., Donadieu, J., Morcet, J., Reman, O., Schleinitz, N., Tournilhac, O., Roussel, M., Fest, T., et al. (2010). Analysis of a French cohort of patients with large granular lymphocyte leukemia: a report on 229 cases. *Haematologica* 95, 1534–1541.

Bate, S.L., Dollard, S.C., and Cannon, M.J. (2010). Cytomegalovirus Seroprevalence in the United States: The National Health and Nutrition Examination Surveys, 1988–2004. *Clin. Infect. Dis.* 50, 1439–1447.

Bauer, S., Groh, V., Wu, J., Steinle, A., Phillips, J.H., Lanier, L.L., and Spies, T. (1999). Activation of NK cells and T cells by NKG2D, a receptor for stress-inducible MICA. *Science* 285, 727–729.

Baxter, M.K., and Gibson, W. (2001). Cytomegalovirus basic phosphoprotein (pUL32) binds to capsids in vitro through its amino one-third. *J. Virol.* 75, 6865–6873.

Becker, I., Salaiza, N., Aguirre, M., Delgado, J., Carrillo-Carrasco, N., Kobeh, L.G., Ruiz, A., Cervantes, R., Torres, A.P., Cabrera, N., et al. (2003). Leishmania lipophosphoglycan (LPG) activates NK cells through toll-like receptor-2. *Mol. Biochem. Parasitol.* 130, 65–74.

Benoit, L., Wang, X., Pabst, H.F., Dutz, J., and Tan, R. (2000). Defective NK cell activation in X-linked lymphoproliferative disease. *J. Immunol. Baltim. Md* 1950 165, 3549–3553.

Béziat, V., Duffy, D., Quoc, S.N., Le Garff-Tavernier, M., Decocq, J., Combadière, B., Debré, P., and Vieillard, V. (2011). CD56brightCD16+ NK cells: a functional intermediate stage of NK cell differentiation. *J. Immunol. Baltim. Md* 1950 186, 6753–6761.

Béziat, V., Liu, L.L., Malmberg, J.-A., Ivarsson, M.A., Sohlberg, E., Björklund, A.T., Retière, C., Sverremark-Ekström, E., Traherne, J., Ljungman, P., et al. (2013). NK cell responses to

cytomegalovirus infection lead to stable imprints in the human KIR repertoire and involve activating KIRs. *Blood* 121, 2678–2688.

Biron, C.A., Byron, K.S., and Sullivan, J.L. (1989). Severe herpesvirus infections in an adolescent without natural killer cells. *N. Engl. J. Med.* 320, 1731–1735.

Björkström, N.K., Ljunggren, H.-G., and Sandberg, J.K. (2010). CD56 negative NK cells: origin, function, and role in chronic viral disease. *Trends Immunol.* 31, 401–406.

Bloushtain, N., Qimron, U., Bar-Ilan, A., HersHKovitz, O., Gazit, R., Fima, E., Korc, M., Vlodavsky, I., Bovin, N.V., and Porgador, A. (2004). Membrane-associated heparan sulfate proteoglycans are involved in the recognition of cellular targets by NKp30 and NKp46. *J. Immunol. Baltim. Md* 1950 173, 2392–2401.

Boehme, K.W., Guerrero, M., and Compton, T. (2006). Human cytomegalovirus envelope glycoproteins B and H are necessary for TLR2 activation in permissive cells. *J. Immunol. Baltim. Md* 1950 177, 7094–7102.

Bogner, E., Radsak, K., and Stinski, M.F. (1998). The gene product of human cytomegalovirus open reading frame UL56 binds the pac motif and has specific nuclease activity. *J. Virol.* 72, 2259–2264.

Di Bona, D., Scafidi, V., Plaia, A., Colomba, C., Nuzzo, D., Occhino, C., Tuttolomondo, A., Giammanco, G., De Grazia, S., Montalto, G., et al. (2014). HLA and Killer Cell Immunoglobulin-like Receptors Influence the Natural Course of CMV Infection. *J. Infect. Dis.* 210, 1083–1089.

Bonneville, M., and Scotet, E. (2006). Human Vgamma9Vdelta2 T cells: promising new leads for immunotherapy of infections and tumors. *Curr. Opin. Immunol.* 18, 539–546.

Borges, L., Hsu, M.L., Fanger, N., Kubin, M., and Cosman, D. (1997). A family of human lymphoid and myeloid Ig-like receptors, some of which bind to MHC class I molecules. *J. Immunol. Baltim. Md* 1950 159, 5192–5196.

Bottino, C., Castriconi, R., Pende, D., Rivera, P., Nanni, M., Carnemolla, B., Cantoni, C., Grassi, J., Marcenaro, S., Reymond, N., et al. (2003). Identification of PVR (CD155) and Nectin-2 (CD112) as cell surface ligands for the human DNAM-1 (CD226) activating molecule. *J. Exp. Med.* 198, 557–567.

Le Bouteiller, P., Barakonyi, A., Giustiniani, J., Lenfant, F., Marie-Cardine, A., Aguerre-Girr, M., Rabot, M., Hilgert, I., Mami-Chouaib, F., Tabiasco, J., et al. (2002). Engagement of CD160 receptor by HLA-C is a triggering mechanism used by circulating natural killer (NK) cells to mediate cytotoxicity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 99, 16963–16968.

Bradley, A.J., Lurain, N.S., Ghazal, P., Trivedi, U., Cunningham, C., Baluchova, K., Gatherer, D., Wilkinson, G.W.G., Dargan, D.J., and Davison, A.J. (2009). High-throughput sequence analysis of variants of human cytomegalovirus strains Towne and AD169. *J. Gen. Virol.* 90, 2375–2380.

Brandt, C.S., Baratin, M., Yi, E.C., Kennedy, J., Gao, Z., Fox, B., Haldeman, B., Ostrander, C.D., Kaifu, T., Chabannon, C., et al. (2009). The B7 family member B7-H6 is a tumor cell ligand for the activating natural killer cell receptor NKp30 in humans. *J. Exp. Med.* 206, 1495–1503.

Braud, V.M., Allan, D.S., O’Callaghan, C.A., Söderström, K., D’Andrea, A., Ogg, G.S., Lazetic, S., Young, N.T., Bell, J.I., Phillips, J.H., et al. (1998). HLA-E binds to natural killer cell receptors CD94/NKG2A, B and C. *Nature* 391, 795–799.

Britt, B. (2007). Maturation and egress. In *Human Herpesviruses: Biology, Therapy, and Immunoprophylaxis*, A. Arvin, G. Campadelli-Fiume, E. Mocarski, P.S. Moore, B. Roizman, R. Whitley, and K. Yamanishi, eds. (Cambridge: Cambridge University Press),.

Britt, W. (2008). Manifestations of human cytomegalovirus infection: proposed mechanisms of acute and chronic disease. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 325, 417–470.

Britt, W.J., and Boppana, S. (2004). Human cytomegalovirus virion proteins. *Hum. Immunol.* 65, 395–402.

Brodin, P., Kärre, K., and Höglund, P. (2009). NK cell education: not an on-off switch but a tunable rheostat. *Trends Immunol.* 30, 143–149.

Bronzini, M., Luganini, A., Dell’Oste, V., De Andrea, M., Landolfo, S., and Griboaldo, G. (2012). The US16 gene of human cytomegalovirus is required for efficient viral infection of endothelial and epithelial cells. *J. Virol.* 86, 6875–6888.

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

Brown, M.G., Dokun, A.O., Heusel, J.W., Smith, H.R., Beckman, D.L., Blattenberger, E.A., Dubbelde, C.E., Stone, L.R., Scalzo, A.A., and Yokoyama, W.M. (2001). Vital involvement of a natural killer cell activation receptor in resistance to viral infection. *Science* 292, 934–937.

Brown, M.H., Boles, K., van der Merwe, P.A., Kumar, V., Mathew, P.A., and Barclay, A.N. (1998). 2B4, the natural killer and T cell immunoglobulin superfamily surface protein, is a ligand for CD48. *J. Exp. Med.* 188, 2083–2090.

Brown, R.A., Gralewski, J.H., and Razonable, R.R. (2009). The R753Q polymorphism abrogates toll-like receptor 2 signaling in response to human cytomegalovirus. *Clin. Infect. Dis. Off. Publ. Infect. Dis. Soc. Am.* 49, e96–e99.

Browne, H., Smith, G., Beck, S., and Minson, T. (1990). A complex between the MHC class I homologue encoded by human cytomegalovirus and beta 2 microglobulin. *Nature* 347, 770–772.

Brunetta, E., Hudspeth, K.L., and Mavilio, D. (2010). Pathologic natural killer cell subset

redistribution in HIV-1 infection: new insights in pathophysiology and clinical outcomes. *J. Leukoc. Biol.* 88, 1119–1130.

Bryceson, Y.T., March, M.E., Ljunggren, H.-G., and Long, E.O. (2006). Synergy among receptors on resting NK cells for the activation of natural cytotoxicity and cytokine secretion. *Blood* 107, 159–166.

Buckley, R.H. (2004). Molecular defects in human severe combined immunodeficiency and approaches to immune reconstitution. *Annu. Rev. Immunol.* 22, 625–655.

Bukowski, J.F., Woda, B.A., Habu, S., Okumura, K., and Welsh, R.M. (1983). Natural killer cell depletion enhances virus synthesis and virus-induced hepatitis in vivo. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 131, 1531–1538.

Bulmer, J.N., and Lash, G.E. (2005). Human uterine natural killer cells: a reappraisal. *Mol. Immunol.* 42, 511–521.

Bunde, T., Kirchner, A., Hoffmeister, B., Habedank, D., Hetzer, R., Cherepnev, G., Proesch, S., Reinke, P., Volk, H.-D., Lehmkuhl, H., et al. (2005). Protection from cytomegalovirus after transplantation is correlated with immediate early 1-specific CD8 T cells. *J. Exp. Med.* 201, 1031–1036.

Caillat-Zucman, S. (2006). How NKG2D ligands trigger autoimmunity? *Hum. Immunol.* 67, 204–207.

Callan, M.F., Steven, N., Krausa, P., Wilson, J.D., Moss, P.A., Gillespie, G.M., Bell, J.I., Rickinson, A.B., and McMichael, A.J. (1996). Large clonal expansions of CD8⁺ T cells in acute infectious mononucleosis. *Nat. Med.* 2, 906–911.

Cannon, M.J., Schmid, D.S., and Hyde, T.B. (2010). Review of cytomegalovirus seroprevalence and demographic characteristics associated with infection. *Rev. Med. Virol.* 20, 202–213.

Cantoni, C., Bottino, C., Vitale, M., Pessino, A., Augugliaro, R., Malaspina, A., Parolini, S., Moretta, L., Moretta, A., and Biassoni, R. (1999). NKp44, a triggering receptor involved in tumor cell lysis by activated human natural killer cells, is a novel member of the immunoglobulin superfamily. *J. Exp. Med.* 189, 787–796.

Carbone, E., Terrazzano, G., Ruggiero, G., Zanzi, D., Ottaiano, A., Manzo, C., Kärre, K., and Zappacosta, S. (1999). Recognition of autologous dendritic cells by human NK cells. *Eur. J. Immunol.* 29, 4022–4029.

Castriconi, R., Cantoni, C., Chiesa, M. Della, Vitale, M., Marcenaro, E., Conte, R., Biassoni, R., Bottino, C., Moretta, L., and Moretta, A. (2003). Transforming growth factor beta 1 inhibits expression of NKp30 and NKG2D receptors: consequences for the NK-mediated killing of dendritic cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 100, 4120–4125.

Cha, T.A., Tom, E., Kemble, G.W., Duke, G.M., Mocarski, E.S., and Spaete, R.R. (1996).

Human cytomegalovirus clinical isolates carry at least 19 genes not found in laboratory strains. *J. Virol.* **70**, 78–83.

Chaix, J., Tessmer, M.S., Hoebe, K., Fuséri, N., Ryffel, B., Dalod, M., Alexopoulou, L., Beutler, B., Brossay, L., Vivier, E., et al. (2008). Cutting edge: Priming of NK cells by IL-18. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **181**, 1627–1631.

Chalifour, A., Scarpellino, L., Back, J., Brodin, P., Devèvre, E., Gros, F., Lévy, F., Leclercq, G., Höglund, P., Beermann, F., et al. (2009). A Role for cis Interaction between the Inhibitory Ly49A receptor and MHC class I for natural killer cell education. *Immunity* **30**, 337–347.

Chalupny, N.J., Sutherland, C.L., Lawrence, W.A., Rein-Weston, A., and Cosman, D. (2003). ULBP4 is a novel ligand for human NKG2D. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **305**, 129–135.

Chan, C.J., Martinet, L., Gilfillan, S., Souza-Fonseca-Guimaraes, F., Chow, M.T., Town, L., Ritchie, D.S., Colonna, M., Andrews, D.M., and Smyth, M.J. (2014). The receptors CD96 and CD226 oppose each other in the regulation of natural killer cell functions. *Nat. Immunol.*

Chan, G., Bivins-Smith, E.R., Smith, M.S., Smith, P.M., and Yurochko, A.D. (2008). Transcriptome analysis reveals human cytomegalovirus reprograms monocyte differentiation toward an M1 macrophage. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **181**, 698–711.

Chan, H.-W., Kurago, Z.B., Stewart, C.A., Wilson, M.J., Martin, M.P., Mace, B.E., Carrington, M., Trowsdale, J., and Lutz, C.T. (2003). DNA methylation maintains allele-specific KIR gene expression in human natural killer cells. *J. Exp. Med.* **197**, 245–255.

Chapman, T.L., Heikeman, A.P., and Bjorkman, P.J. (1999a). The inhibitory receptor LIR-1 uses a common binding interaction to recognize class I MHC molecules and the viral homolog UL18. *Immunity* **11**, 603–613.

Chapman, T.L., Heikeman, A.P., and Bjorkman, P.J. (1999b). The inhibitory receptor LIR-1 uses a common binding interaction to recognize class I MHC molecules and the viral homolog UL18. *Immunity* **11**, 603–613.

Chee, M.S., Bankier, A.T., Beck, S., Bohni, R., Brown, C.M., Cerny, R., Horsnell, T., Hutchison, C.A., Kouzarides, T., and Martignetti, J.A. (1990). Analysis of the protein-coding content of the sequence of human cytomegalovirus strain AD169. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **154**, 125–169.

Chen, D.H., Jiang, H., Lee, M., Liu, F., and Zhou, Z.H. (1999). Three-dimensional visualization of tegument/capsid interactions in the intact human cytomegalovirus. *Virology* **260**, 10–16.

Chen, J., Hu, L., Wu, M., Zhong, T., Zhou, Y.-H., and Hu, Y. (2012). Kinetics of IgG antibody to cytomegalovirus (CMV) after birth and seroprevalence of anti-CMV IgG in Chinese children. *Virol. J.* **9**, 304.

Chen, Q., Amaladoss, A., Ye, W., Liu, M., Dummler, S., Kong, F., Wong, L.H., Loo, H.L., Loh, E., Tan, S.Q., et al. (2014). Human natural killer cells control *Plasmodium falciparum* infection by eliminating infected red blood cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *111*, 1479–1484.

Chewning, J.H., Gudme, C.N., Hsu, K.C., Selvakumar, A., and Dupont, B. (2007). KIR2DS1-positive NK cells mediate alloresponse against the C2 HLA-KIR ligand group in vitro. *J. Immunol. Baltim. Md* *1950* *179*, 854–868.

Chiche, L., Forel, J.-M., Thomas, G., Farnarier, C., Cognet, C., Guervilly, C., Zandotti, C., Vély, F., Roch, A., Vivier, E., et al. (2012). Interferon- γ production by natural killer cells and cytomegalovirus in critically ill patients. *Crit. Care Med.* *40*, 3162–3169.

Chiesa, M. Della, Marcenaro, E., Sivori, S., Carlomagno, S., Pesce, S., and Moretta, A. (2014). Human NK cell response to pathogens. *Semin. Immunol.* *26*, 152–160.

Chklovskaya, E., Nowbakht, P., Nissen, C., Gratwohl, A., Bargetzi, M., and Wodnar-Filipowicz, A. (2004). Reconstitution of dendritic and natural killer-cell subsets after allogeneic stem cell transplantation: effects of endogenous flt3 ligand. *Blood* *103*, 3860–3868.

Ciccone, E., Pende, D., Viale, O., Di Donato, C., Tripodi, G., Orengo, A.M., Guardiola, J., Moretta, A., and Moretta, L. (1992). Evidence of a natural killer (NK) cell repertoire for (allo) antigen recognition: definition of five distinct NK-determined allospecificities in humans. *J. Exp. Med.* *175*, 709–718.

Colonna, M., Borsellino, G., Falco, M., Ferrara, G.B., and Strominger, J.L. (1993). HLA-C is the inhibitory ligand that determines dominant resistance to lysis by NK1- and NK2-specific natural killer cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *90*, 12000–12004.

Colonna, M., Navarro, F., Bellón, T., Llano, M., García, P., Samaridis, J., Angman, L., Cella, M., and López-Botet, M. (1997). A common inhibitory receptor for major histocompatibility complex class I molecules on human lymphoid and myelomonocytic cells. *J. Exp. Med.* *186*, 1809–1818.

Compton, T., Kurt-Jones, E.A., Boehme, K.W., Belko, J., Latz, E., Golenbock, D.T., and Finberg, R.W. (2003). Human cytomegalovirus activates inflammatory cytokine responses via CD14 and Toll-like receptor 2. *J. Virol.* *77*, 4588–4596.

Constant, P., Davodeau, F., Peyrat, M.A., Poquet, Y., Puzo, G., Bonneville, M., and Fournié, J.J. (1994). Stimulation of human gamma delta T cells by nonpeptidic mycobacterial ligands. *Science* *264*, 267–270.

Cook, C.H., Trgovcich, J., Zimmerman, P.D., Zhang, Y., and Sedmak, D.D. (2006). Lipopolysaccharide, tumor necrosis factor alpha, or interleukin-1beta triggers reactivation of latent cytomegalovirus in immunocompetent mice. *J. Virol.* *80*, 9151–9158.

Cooper, M.A., Fehniger, T.A., Turner, S.C., Chen, K.S., Ghaheri, B.A., Ghayur, T., Carson, W.E., and Caligiuri, M.A. (2001). Human natural killer cells: a unique innate

immunoregulatory role for the CD56(bright) subset. *Blood* 97, 3146–3151.

Corrales-Aguilar, E., Trilling, M., Hunold, K., Fiedler, M., Le, V.T.K., Reinhard, H., Ehrhardt, K., Mercé-Maldonado, E., Aliyev, E., Zimmermann, A., et al. (2014). Human cytomegalovirus Fcγ binding proteins gp34 and gp68 antagonize Fcγ receptors I, II and III. *PLoS Pathog.* 10, e1004131.

Cosman, D., Fanger, N., Borges, L., Kubin, M., Chin, W., Peterson, L., and Hsu, M.L. (1997). A novel immunoglobulin superfamily receptor for cellular and viral MHC class I molecules. *Immunity* 7, 273–282.

Costello, R.T., Sivori, S., Marcenaro, E., Lafage-Pochitaloff, M., Mozziconacci, M.-J., Reviron, D., Gastaut, J.-A., Pende, D., Olive, D., and Moretta, A. (2002). Defective expression and function of natural killer cell-triggering receptors in patients with acute myeloid leukemia. *Blood* 99, 3661–3667.

Couzi, L., Pitard, V., Sicard, X., Garrigue, I., Hawchar, O., Merville, P., Moreau, J.-F., and Déchanet-Merville, J. (2012). Antibody-dependent anti-cytomegalovirus activity of human γδ T cells expressing CD16 (FcγRIIIa). *Blood* 119, 1418–1427.

Craig, J.M., Macauley, J.C., Weller, T.H., and Wirth, P. (1957). Isolation of intranuclear inclusion producing agents from infants with illnesses resembling cytomegalic inclusion disease. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med. Soc. Exp. Biol. Med. N. Y.* N 94, 4–12.

Crough, T., and Khanna, R. (2009). Immunobiology of human cytomegalovirus: from bench to bedside. *Clin. Microbiol. Rev.* 22, 76–98, Table of Contents.

Cunningham, C., Gatherer, D., Hilfrich, B., Baluchova, K., Dargan, D.J., Thomson, M., Griffiths, P.D., Wilkinson, G.W.G., Schulz, T.F., and Davison, A.J. (2010). Sequences of complete human cytomegalovirus genomes from infected cell cultures and clinical specimens. *J. Gen. Virol.* 91, 605–615.

Dalbeth, N., and Callan, M.F.C. (2002). A subset of natural killer cells is greatly expanded within inflamed joints. *Arthritis Rheum.* 46, 1763–1772.

David, G., Djaoud, Z., Willem, C., Legrand, N., Rettman, P., Gagne, K., Cesbron, A., and Retière, C. (2013). Large spectrum of HLA-C recognition by killer Ig-like receptor (KIR)2DL2 and KIR2DL3 and restricted C1 SPECIFICITY of KIR2DS2: dominant impact of KIR2DL2/KIR2DS2 on KIR2D NK cell repertoire formation. *J. Immunol. Baltim. Md* 1950 191, 4778–4788.

Davison, A.J. (2002). Evolution of the herpesviruses. *Vet. Microbiol.* 86, 69–88.

Davison, A.J. (2007). Comparative analysis of the genomes. In *Human Herpesviruses: Biology, Therapy, and Immunoprophylaxis*, A. Arvin, G. Campadelli-Fiume, E. Mocarski, P.S. Moore, B. Roizman, R. Whitley, and K. Yamanishi, eds. (Cambridge: Cambridge University Press),.

Davison, A.J. (2011). Evolution of sexually transmitted and sexually transmissible human herpesviruses. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1230, E37–E49.

Davison, A.J., Dolan, A., Akter, P., Addison, C., Dargan, D.J., Alcendor, D.J., McGeoch, D.J., and Hayward, G.S. (2003). The human cytomegalovirus genome revisited: comparison with the chimpanzee cytomegalovirus genome. *J. Gen. Virol.* 84, 17–28.

Davison, A.J., Trus, B.L., Cheng, N., Steven, A.C., Watson, M.S., Cunningham, C., Le Deuff, R.-M., and Renault, T. (2005). A novel class of herpesvirus with bivalve hosts. *J. Gen. Virol.* 86, 41–53.

Davison, A.J., Eberle, R., Ehlers, B., Hayward, G.S., McGeoch, D.J., Minson, A.C., Pellett, P.E., Roizman, B., Studdert, M.J., and Thiry, E. (2009). The order Herpesvirales. *Arch. Virol.* 154, 171–177.

Déchanet, J., Merville, P., Bergé, F., Bone-Mane, G., Taupin, J.L., Michel, P., Joly, P., Bonneville, M., Potaux, L., and Moreau, J.F. (1999a). Major expansion of gammadelta T lymphocytes following cytomegalovirus infection in kidney allograft recipients. *J. Infect. Dis.* 179, 1–8.

Déchanet, J., Merville, P., Lim, A., Retière, C., Pitard, V., Lafarge, X., Michelson, S., Méric, C., Hallet, M.M., Kourilsky, P., et al. (1999b). Implication of gammadelta T cells in the human immune response to cytomegalovirus. *J. Clin. Invest.* 103, 1437–1449.

DeFilippis, V.R., Alvarado, D., Sali, T., Rothenburg, S., and Früh, K. (2010). Human cytomegalovirus induces the interferon response via the DNA sensor ZBP1. *J. Virol.* 84, 585–598.

Dennehy, K.M., Klimosch, S.N., and Steinle, A. (2011). Cutting edge: Nkp80 uses an atypical hemi-ITAM to trigger NK cytotoxicity. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 186, 657–661.

Derhovanessian, E., Maier, A.B., Hähnel, K., Zelba, H., de Craen, A.J.M., Roelofs, H., Slagboom, E.P., Westendorp, R.G.J., and Pawelec, G. (2013). Lower proportion of naïve peripheral CD8⁺ T cells and an unopposed pro-inflammatory response to human Cytomegalovirus proteins in vitro are associated with longer survival in very elderly people. *Age Dordr. Neth.* 35, 1387–1399.

Diefenbach, A., and Raulet, D.H. (2002). The innate immune response to tumors and its role in the induction of T-cell immunity. *Immunol. Rev.* 188, 9–21.

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

Djaoud, Z., Riou, R., Gavlovsky, P.-J., Mehlal, S., Bressollette, C., Gérard, N., Gagne, K., Charreau, B., and Retière, C. (2016). Cytomegalovirus-Infected Primary Endothelial Cells

Trigger NKG2C⁺ Natural Killer Cells. *J. Innate Immun.* 8, 374–385.

Dolan, A., Cunningham, C., Hector, R.D., Hassan-Walker, A.F., Lee, L., Addison, C., Dargan, D.J., McGeoch, D.J., Gatherer, D., Emery, V.C., et al. (2004). Genetic content of wild-type human cytomegalovirus. *J. Gen. Virol.* 85, 1301–1312.

Dorshkind, K., Montecino-Rodriguez, E., and Signer, R.A.J. (2009). The ageing immune system: is it ever too old to become young again? *Nat. Rev. Immunol.* 9, 57–62.

Doucey, M.-A., Scarpellino, L., Zimmer, J., Guillaume, P., Luescher, I.F., Bron, C., and Held, W. (2004). Cis association of Ly49A with MHC class I restricts natural killer cell inhibition. *Nat. Immunol.* 5, 328–336.

Drew, W.L., Chou, S., Miner, R.C., Mohr, B.A., Busch, M.P., van der Horst, C.M., Asmuth, D.M., and Kalish, L.A. (2002). Cytomegalovirus glycoprotein B groups in human immunodeficiency virus-infected patients with incident retinitis. *J. Infect. Dis.* 186, 114–117.

Dring, M.M., Morrison, M.H., McSharry, B.P., Guinan, K.J., Hagan, R., Irish HCV Research Consortium, O’Farrelly, C., and Gardiner, C.M. (2011). Innate immune genes synergize to predict increased risk of chronic disease in hepatitis C virus infection. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 108, 5736–5741.

Dubois, S., Mariner, J., Waldmann, T.A., and Tagaya, Y. (2002). IL-15R α Recycles and Presents IL-15 In trans to Neighboring Cells. *Immunity* 17, 537–547.

Dunn, W., Chou, C., Li, H., Hai, R., Patterson, D., Stolc, V., Zhu, H., and Liu, F. (2003). Functional profiling of a human cytomegalovirus genome. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 100, 14223–14228.

Eagle, R.A., Traherne, J.A., Hair, J.R., Jafferji, I., and Trowsdale, J. (2009). ULBP6/RAET1L is an additional human NKG2D ligand. *Eur. J. Immunol.* 39, 3207–3216.

Elkington, R., Walker, S., Crough, T., Menzies, M., Tellam, J., Bharadwaj, M., and Khanna, R. (2003). Ex vivo profiling of CD8⁺-T-cell responses to human cytomegalovirus reveals broad and multispecific reactivities in healthy virus carriers. *J. Virol.* 77, 5226–5240.

Elliott, J.M., Wahle, J.A., and Yokoyama, W.M. (2010). MHC class I-deficient natural killer cells acquire a licensed phenotype after transfer into an MHC class I-sufficient environment. *J. Exp. Med.* 207, 2073–2079.

Enqvist, M., Ask, E.H., Forslund, E., Carlsten, M., Abrahamsen, G., Béziat, V., Andersson, S., Schaffer, M., Spurkland, A., Bryceson, Y., et al. (2015). Coordinated expression of DNAM-1 and LFA-1 in educated NK cells. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 194, 4518–4527.

Erick, T.K., and Brossay, L. (2016). Phenotype and functions of conventional and non-conventional NK cells. *Curr. Opin. Immunol.* 38, 67–74.

Esin, S., Batoni, G., Counoupas, C., Stringaro, A., Brancatisano, F.L., Colone, M., Maisetta, G., Florio, W., Arancia, G., and Campa, M. (2008). Direct binding of human NK cell natural

cytotoxicity receptor NKp44 to the surfaces of mycobacteria and other bacteria. *Infect. Immun.* 76, 1719–1727.

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

Esposito, S., Bosis, S., Semino, M., and Rigante, D. (2014). Infections and systemic lupus erythematosus. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. Off. Publ. Eur. Soc. Clin. Microbiol.* 33, 1467–1475.

Falschlehner, C., Schaefer, U., and Walczak, H. (2009). Following TRAIL's path in the immune system. *Immunology* 127, 145–154.

Fannin Rider, P.J., Dunn, W., Yang, E., and Liu, F. (2008). Human cytomegalovirus microRNAs. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 325, 21–39.

Farkas, L., Kvale, E.O., Lund-Johansen, F., and Jahnsen, F.L. (2006). Plasmacytoid dendritic cells induce a distinct cytokine pattern in virus-specific CD4⁺ memory T cells that is modulated by CpG oligodeoxynucleotides. *Scand. J. Immunol.* 64, 404–411.

Faure, M., and Long, E.O. (2002). KIR2DL4 (CD158d), an NK cell-activating receptor with inhibitory potential. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 168, 6208–6214.

Fauriat, C., Just-Landi, S., Mallet, F., Arnoulet, C., Sainty, D., Olive, D., and Costello, R.T. (2007). Deficient expression of NCR in NK cells from acute myeloid leukemia: Evolution during leukemia treatment and impact of leukemia cells in NCRdull phenotype induction. *Blood* 109, 323–330.

Fauriat, C., Long, E.O., Ljunggren, H.-G., and Bryceson, Y.T. (2010a). Regulation of human NK-cell cytokine and chemokine production by target cell recognition. *Blood* 115, 2167–2176.

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

Favier, B., Lemaoult, J., Lesport, E., and Carosella, E.D. (2010). ILT2/HLA-G interaction impairs NK-cell functions through the inhibition of the late but not the early events of the NK-cell activating synapse. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* 24, 689–699.

Feire, A.L., Koss, H., and Compton, T. (2004). Cellular integrins function as entry receptors for human cytomegalovirus via a highly conserved disintegrin-like domain. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101, 15470–15475.

Ferlazzo, G., Tsang, M.L., Moretta, L., Melioli, G., Steinman, R.M., and Münz, C. (2002). Human dendritic cells activate resting natural killer (NK) cells and are recognized via the

NKp30 receptor by activated NK cells. *J. Exp. Med.* *195*, 343–351.

Ferlazzo, G., Thomas, D., Lin, S.-L., Goodman, K., Morandi, B., Muller, W.A., Moretta, A., and Münz, C. (2004). The Abundant NK Cells in Human Secondary Lymphoid Tissues Require Activation to Express Killer Cell Ig-Like Receptors and Become Cytolytic. *J. Immunol.* *172*, 1455–1462.

Fernandez, N.C., Treiner, E., Vance, R.E., Jamieson, A.M., Lemieux, S., and Raulet, D.H. (2005). A subset of natural killer cells achieves self-tolerance without expressing inhibitory receptors specific for self-MHC molecules. *Blood* *105*, 4416–4423.

Flodström-Tullberg, M., Bryceson, Y.T., Shi, F.-D., Höglund, P., and Ljunggren, H.-G. (2009). Natural killer cells in human autoimmunity. *Curr. Opin. Immunol.* *21*, 634–640.

Fogel, L.A., Yokoyama, W.M., and French, A.R. (2013). Natural killer cells in human autoimmune disorders. *Arthritis Res. Ther.* *15*, 216.

Foley, B., Cooley, S., Verneris, M.R., Pitt, M., Curtsinger, J., Luo, X., Lopez-Vergès, S., Lanier, L.L., Weisdorf, D., and Miller, J.S. (2012a). Cytomegalovirus reactivation after allogeneic transplantation promotes a lasting increase in educated NKG2C⁺ natural killer cells with potent function. *Blood* *119*, 2665–2674.

Foley, B., Cooley, S., Verneris, M.R., Curtsinger, J., Luo, X., Waller, E.K., Anasetti, C., Weisdorf, D., and Miller, J.S. (2012b). Human cytomegalovirus (CMV)-induced memory-like NKG2C(+) NK cells are transplantable and expand in vivo in response to recipient CMV antigen. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *189*, 5082–5088.

Fons, P., Chabot, S., Cartwright, J.E., Lenfant, F., L'Faqihi, F., Giustiniani, J., Herault, J.-P., Gueguen, G., Bono, F., Savi, P., et al. (2006). Soluble HLA-G1 inhibits angiogenesis through an apoptotic pathway and by direct binding to CD160 receptor expressed by endothelial cells. *Blood* *108*, 2608–2615.

Forlenza, C.J., Boudreau, J.E., Zheng, J., Luduec, J.-B.L., Chamberlain, E., Heller, G., Cheung, N.-K.V., and Hsu, K.C. (2016). KIR3DL1 Allelic Polymorphism and HLA-B Epitopes Modulate Response to Anti-GD2 Monoclonal Antibody in Patients With Neuroblastoma. *J. Clin. Oncol.* JCO649558.

Frazier, W.R., Steiner, N., Hou, L., Dakshanamurthy, S., and Hurley, C.K. (2013). Allelic variation in KIR2DL3 generates a KIR2DL2-like receptor with increased binding to its HLA-C ligand. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *190*, 6198–6208.

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

Freud, A.G., Becknell, B., Roychowdhury, S., Mao, H.C., Ferketich, A.K., Nuovo, G.J., Hughes, T.L., Marburger, T.B., Sung, J., Baiocchi, R.A., et al. (2005). A human CD34(+) subset resides in lymph nodes and differentiates into CD56bright natural killer cells. *Immunity* *22*, 295–304.

Freud, A.G., Yokohama, A., Becknell, B., Lee, M.T., Mao, H.C., Ferketich, A.K., and Caligiuri, M.A. (2006). Evidence for discrete stages of human natural killer cell differentiation in vivo. *J. Exp. Med.* 203, 1033–1043.

Galy, A., Travis, M., Cen, D., and Chen, B. (1995). Human T, B, natural killer, and dendritic cells arise from a common bone marrow progenitor cell subset. *Immunity* 3, 459–473.

Gamadia, L.E., Remmerswaal, E.B.M., Weel, J.F., Bemelman, F., van Lier, R.A.W., and Berge, I.J.M. Ten (2003). Primary immune responses to human CMV: a critical role for IFN-gamma-producing CD4⁺ T cells in protection against CMV disease. *Blood* 101, 2686–2692.

Gasser, S., and Raulet, D.H. (2006). Activation and self-tolerance of natural killer cells. *Immunol. Rev.* 214, 130–142.

Geiselhart, A., Dietl, J., Marzusch, K., Ruck, P., Ruck, M., Horny, H.P., Kaiserling, E., and Handgretinger, R. (1995). Comparative analysis of the immunophenotypes of decidual and peripheral blood large granular lymphocytes and T cells during early human pregnancy. *Am. J. Reprod. Immunol. N. Y. N* 1989 33, 315–322.

Gibson, W. (2008). Structure and formation of the cytomegalovirus virion. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 325, 187–204.

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

Gilfillan, S., Ho, E.L., Cella, M., Yokoyama, W.M., and Colonna, M. (2002). NKG2D recruits two distinct adapters to trigger NK cell activation and costimulation. *Nat. Immunol.* 3, 1150–1155.

Gilmour, K.C., Fujii, H., Cranston, T., Davies, E.G., Kinnon, C., and Gaspar, H.B. (2001). Defective expression of the interleukin-2/interleukin-15 receptor beta subunit leads to a natural killer cell-deficient form of severe combined immunodeficiency. *Blood* 98, 877–879.

Giustiniani, J., Bensussan, A., and Marie-Cardine, A. (2009). Identification and characterization of a transmembrane isoform of CD160 (CD160-TM), a unique activating receptor selectively expressed upon human NK cell activation. *J. Immunol. Baltim. Md* 1950 182, 63–71.

Glasner, A., Ghadially, H., Gur, C., Stanitsky, N., Tsukerman, P., Enk, J., and Mandelboim, O. (2012). Recognition and prevention of tumor metastasis by the NK receptor NKp46/NCR1. *J. Immunol. Baltim. Md* 1950 188, 2509–2515.

Gonen-Gross, T., Achdout, H., Arnon, T.I., Gazit, R., Stern, N., Horejsí, V., Goldman-Wohl, D., Yagel, S., and Mandelboim, O. (2005). The CD85J/leukocyte inhibitory receptor-1 distinguishes between conformed and beta 2-microglobulin-free HLA-G molecules. *J. Immunol. Baltim. Md* 1950 175, 4866–4874.

Gorelik, E., Wilttrout, R.H., Okumura, K., Habu, S., and Herberman, R.B. (1982). Role of NK cells in the control of metastatic spread and growth of tumor cells in mice. *Int. J. Cancer* 30, 107–112.

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

Grégoire, C., Chasson, L., Luci, C., Tomasello, E., Geissmann, F., Vivier, E., and Walzer, T. (2007). The trafficking of natural killer cells. *Immunol. Rev.* 220, 169–182.

Griffiths, P.D. (2006). CMV as a cofactor enhancing progression of AIDS. *J. Clin. Virol. Off. Publ. Pan Am. Soc. Clin. Virol.* 35, 489–492.

Griffiths, P.D., Stanton, A., McCarrell, E., Smith, C., Osman, M., Harber, M., Davenport, A., Jones, G., Wheeler, D.C., O’Beirne, J., et al. (2011). Cytomegalovirus glycoprotein-B vaccine with MF59 adjuvant in transplant recipients: a phase 2 randomised placebo-controlled trial. *Lancet Lond. Engl.* 377, 1256–1263.

Grünewald, K., Desai, P., Winkler, D.C., Heymann, J.B., Belnap, D.M., Baumeister, W., and Steven, A.C. (2003). Three-dimensional structure of herpes simplex virus from cryo-electron tomography. *Science* 302, 1396–1398.

Guerra, N., Tan, Y.X., Joncker, N.T., Choy, A., Gallardo, F., Xiong, N., Knoblaugh, S., Cado, D., Greenberg, N.M., Greenberg, N.R., et al. (2008). NKG2D-deficient mice are defective in tumor surveillance in models of spontaneous malignancy. *Immunity* 28, 571–580.

Gumá, M., Angulo, A., Vilches, C., Gómez-Lozano, N., Malats, N., and López-Botet, M. (2004). Imprint of human cytomegalovirus infection on the NK cell receptor repertoire. *Blood* 104, 3664–3671.

Gumá, M., Budt, M., Sáez, A., Brckalo, T., Hengel, H., Angulo, A., and López-Botet, M. (2006). Expansion of CD94/NKG2C+ NK cells in response to human cytomegalovirus-infected fibroblasts. *Blood* 107, 3624–3631.

Gumperz, J.E., Litwin, V., Phillips, J.H., Lanier, L.L., and Parham, P. (1995). The Bw4 public epitope of HLA-B molecules confers reactivity with natural killer cell clones that express NKB1, a putative HLA receptor. *J. Exp. Med.* 181, 1133–1144.

Hahn, G., Revello, M.G., Patrone, M., Percivalle, E., Campanini, G., Sarasini, A., Wagner, M., Gallina, A., Milanesi, G., Koszinowski, U., et al. (2004). Human cytomegalovirus UL131-128 genes are indispensable for virus growth in endothelial cells and virus transfer to leukocytes. *J. Virol.* 78, 10023–10033.

Halary, F., Amara, A., Lortat-Jacob, H., Messerle, M., Delaunay, T., Houlès, C., Fieschi, F., Arenzana-Seisdedos, F., Moreau, J.F., and Déchanet-Merville, J. (2002). Human cytomegalovirus binding to DC-SIGN is required for dendritic cell infection and target cell

trans-infection. *Immunity* 17, 653–664.

Halary, F., Pitard, V., Dlubek, D., Krzysiek, R., de la Salle, H., Merville, P., Dromer, C., Emilie, D., Moreau, J.-F., and Déchanet-Merville, J. (2005). Shared reactivity of V δ 2(neg) $\gamma\delta$ T cells against cytomegalovirus-infected cells and tumor intestinal epithelial cells. *J. Exp. Med.* 201, 1567–1578.

Halfteck, G.G., Elboim, M., Gur, C., Achdout, H., Ghadially, H., and Mandelboim, O. (2009). Enhanced in vivo growth of lymphoma tumors in the absence of the NK-activating receptor NKp46/NCR1. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 182, 2221–2230.

Hanna, J., Wald, O., Goldman-Wohl, D., Prus, D., Markel, G., Gazit, R., Katz, G., Haimov-Kochman, R., Fujii, N., Yagel, S., et al. (2003). CXCL12 expression by invasive trophoblasts induces the specific migration of CD16- human natural killer cells. *Blood* 102, 1569–1577.

Heatley, S.L., Pietra, G., Lin, J., Widjaja, J.M.L., Harpur, C.M., Lester, S., Rossjohn, J., Szer, J., Schwarzer, A., Bradstock, K., et al. (2013). Polymorphism in human cytomegalovirus UL40 impacts on recognition of human leukocyte antigen-E (HLA-E) by natural killer cells. *J. Biol. Chem.* 288, 8679–8690.

Hecht, M.-L., Rosental, B., Horlacher, T., Hershkovitz, O., De Paz, J.L., Noti, C., Schauer, S., Porgador, A., and Seeberger, P.H. (2009). Natural cytotoxicity receptors NKp30, NKp44 and NKp46 bind to different heparan sulfate/heparin sequences. *J. Proteome Res.* 8, 712–720.

Hegde, N.R., Tomazin, R.A., Wisner, T.W., Dunn, C., Boname, J.M., Lewinsohn, D.M., and Johnson, D.C. (2002). Inhibition of HLA-DR Assembly, Transport, and Loading by Human Cytomegalovirus Glycoprotein US3: a Novel Mechanism for Evading Major Histocompatibility Complex Class II Antigen Presentation. *J. Virol.* 76, 10929–10941.

Herberman, R.B., Nunn, M.E., Holden, H.T., and Lavrin, D.H. (1975). Natural cytotoxic reactivity of mouse lymphoid cells against syngeneic and allogeneic tumors. II. Characterization of effector cells. *Int. J. Cancer* 16, 230–239.

Hershkovitz, O., Rosental, B., Rosenberg, L.A., Navarro-Sanchez, M.E., Jivov, S., Zilka, A., Gershoni-Yahalom, O., Brient-Litzler, E., Bedouelle, H., Ho, J.W., et al. (2009). NKp44 receptor mediates interaction of the envelope glycoproteins from the West Nile and dengue viruses with NK cells. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 183, 2610–2621.

Hiby, S.E., Apps, R., Sharkey, A.M., Farrell, L.E., Gardner, L., Mulder, A., Claas, F.H., Walker, J.J., Redman, C.W., Redman, C.C., et al. (2010). Maternal activating KIRs protect against human reproductive failure mediated by fetal HLA-C2. *J. Clin. Invest.* 120, 4102–4110.

Hirayasu, K., Ohashi, J., Kashiwase, K., Hananantachai, H., Naka, I., Ogawa, A., Takanashi, M., Satake, M., Nakajima, K., Parham, P., et al. (2012). Significant association of KIR2DL3-HLA-C1 combination with cerebral malaria and implications for co-evolution of KIR and HLA. *PLoS Pathog.* 8, e1002565.

Hofmann, A.P., Gerber, S.A., and Croy, B.A. (2014). Uterine natural killer cells pace early development of mouse decidua basalis. *Mol. Hum. Reprod.* 20, 66–76.

Höglund, P., and Brodin, P. (2010). Current perspectives of natural killer cell education by MHC class I molecules. *Nat. Rev. Immunol.* 10, 724–734.

Höglund, P., Glas, R., Ménard, C., Kåse, A., Johansson, M.H., Franksson, L., Lemmonier, F., and Kärre, K. (1998). Beta2-microglobulin-deficient NK cells show increased sensitivity to MHC class I-mediated inhibition, but self tolerance does not depend upon target cell expression of H-2Kb and Db heavy chains. *Eur. J. Immunol.* 28, 370–378.

Holzenburg, A., Dittmer, A., and Bogner, E. (2009). Assembly of monomeric human cytomegalovirus pUL104 into portal structures. *J. Gen. Virol.* 90, 2381–2385.

Horowitz, A., Strauss-Albee, D.M., Leipold, M., Kubo, J., Nemat-Gorgani, N., Dogan, O.C., Dekker, C.L., Mackey, S., Maecker, H., Swan, G.E., et al. (2013). Genetic and environmental determinants of human NK cell diversity revealed by mass cytometry. *Sci. Transl. Med.* 5, 208ra145.

Hou, S., Ge, K., Zheng, X., Wei, H., Sun, R., and Tian, Z. (2014). CD226 Involves in Immune Synapse Formation and Triggers NK Cell Activation via Its First Extracellular Domain. *J. Biol. Chem.*

Houchins, J.P., Yabe, T., McSherry, C., and Bach, F.H. (1991). DNA sequence analysis of NKG2, a family of related cDNA clones encoding type II integral membrane proteins on human natural killer cells. *J. Exp. Med.* 173, 1017–1020.

Hsu, K.C., Keever-Taylor, C.A., Wilton, A., Pinto, C., Heller, G., Arkun, K., O'Reilly, R.J., Horowitz, M.M., and Dupont, B. (2005). Improved outcome in HLA-identical sibling hematopoietic stem-cell transplantation for acute myelogenous leukemia predicted by KIR and HLA genotypes. *Blood* 105, 4878–4884.

Huang, Y.-C., Hung, S.-W., Jan, T.-R., Liao, K.-W., Cheng, C.-H., Wang, Y.-S., and Chu, R.-M. (2008). CD5-low expression lymphocytes in canine peripheral blood show characteristics of natural killer cells. *J. Leukoc. Biol.* 84, 1501–1510.

Huntington, N.D., Legrand, N., Alves, N.L., Jaron, B., Weijer, K., Plet, A., Corcuff, E., Mortier, E., Jacques, Y., Spits, H., et al. (2009). IL-15 trans-presentation promotes human NK cell development and differentiation in vivo. *J. Exp. Med.* 206, 25–34.

Huygens, A., Dauby, N., Vermijlen, D., and Marchant, A. (2014). Immunity to cytomegalovirus in early life. *Front. Immunol.* 5, 552.

Imai, K., Matsuyama, S., Miyake, S., Suga, K., and Nakachi, K. (2000). Natural cytotoxic activity of peripheral-blood lymphocytes and cancer incidence: an 11-year follow-up study of a general population. *Lancet Lond. Engl.* 356, 1795–1799.

Irmieri, A., and Gibson, W. (1983). Isolation and characterization of a noninfectious virion-

like particle released from cells infected with human strains of cytomegalovirus. *Virology* 130, 118–133.

Isaacson, M.K., Feire, A.L., and Compton, T. (2007). Epidermal growth factor receptor is not required for human cytomegalovirus entry or signaling. *J. Virol.* 81, 6241–6247.

Isaacson, M.K., Juckem, L.K., and Compton, T. (2008). Virus entry and innate immune activation. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 325, 85–100.

Ishigami, S., Natsugoe, S., Tokuda, K., Nakajo, A., Che, X., Iwashige, H., Aridome, K., Hokita, S., and Aikou, T. (2000). Prognostic value of intratumoral natural killer cells in gastric carcinoma. *Cancer* 88, 577–583.

Iversen, A.-C., Norris, P.S., Ware, C.F., and Benedict, C.A. (2005). Human NK cells inhibit cytomegalovirus replication through a noncytolytic mechanism involving lymphotoxin-dependent induction of IFN-beta. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 175, 7568–7574.

Iwasenko, J.M., Howard, J., Arbuckle, S., Graf, N., Hall, B., Craig, M.E., and Rawlinson, W.D. (2011). Human cytomegalovirus infection is detected frequently in stillbirths and is associated with fetal thrombotic vasculopathy. *J. Infect. Dis.* 203, 1526–1533.

Jabrane-Ferrat, N., and Siewiera, J. (2014). The up side of decidual natural killer cells: new developments in immunology of pregnancy. *Immunology* 141, 490–497.

Jarahian, M., Watzl, C., Fournier, P., Arnold, A., Djandji, D., Zahedi, S., Cerwenka, A., Paschen, A., Schirmmacher, V., and Momburg, F. (2009). Activation of natural killer cells by newcastle disease virus hemagglutinin-neuraminidase. *J. Virol.* 83, 8108–8121.

Jarahian, M., Fiedler, M., Cohnen, A., Djandji, D., Hämmerling, G.J., Gati, C., Cerwenka, A., Turner, P.C., Moyer, R.W., Watzl, C., et al. (2011). Modulation of NKp30- and NKp46-Mediated Natural Killer Cell Responses by Poxviral Hemagglutinin. *PLOS Pathog* 7, e1002195.

Jayasooriya, S., de Silva, T.I., Njie-jobe, J., Sanyang, C., Leese, A.M., Bell, A.I., McAulay, K.A., Yanchun, P., Long, H.M., Dong, T., et al. (2015). Early virological and immunological events in asymptomatic Epstein-Barr virus infection in African children. *PLoS Pathog.* 11, e1004746.

Johansson, S., Johansson, M., Rosmaraki, E., Vahlne, G., Mehr, R., Salmon-Divon, M., Lemonnier, F., Kärre, K., and Höglund, P. (2005). Natural killer cell education in mice with single or multiple major histocompatibility complex class I molecules. *J. Exp. Med.* 201, 1145–1155.

Johnsen, J.I., Baryawno, N., and Söderberg-Nauclér, C. (2011). Is human cytomegalovirus a target in cancer therapy? *Oncotarget* 2, 1329–1338.

Joncker, N.T., Fernandez, N.C., Treiner, E., Vivier, E., and Raulet, D.H. (2009). NK cell responsiveness is tuned commensurate with the number of inhibitory receptors for self-MHC

class I: the rheostat model. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 182, 4572–4580.

Joncker, N.T., Shifrin, N., Delebecque, F., and Raulet, D.H. (2010). Mature natural killer cells reset their responsiveness when exposed to an altered MHC environment. *J. Exp. Med.* 207, 2065–2072.

Jones, T.R., Wiertz, E.J., Sun, L., Fish, K.N., Nelson, J.A., and Ploegh, H.L. (1996). Human cytomegalovirus US3 impairs transport and maturation of major histocompatibility complex class I heavy chains. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 93, 11327–11333.

Juckem, L.K., Boehme, K.W., Feire, A.L., and Compton, T. (2008). Differential initiation of innate immune responses induced by human cytomegalovirus entry into fibroblast cells. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 180, 4965–4977.

Kaiser, B.K., Barahmand-Pour, F., Paulsene, W., Medley, S., Geraghty, D.E., and Strong, R.K. (2005). Interactions between NKG2x immunoreceptors and HLA-E ligands display overlapping affinities and thermodynamics. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 174, 2878–2884.

Kalejta, R.F. (2008). Tegument proteins of human cytomegalovirus. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* MMBR 72, 249–265, table of contents.

Kang, S.H., Abdel-Massih, R.C., Brown, R.A., Dierkhising, R.A., Kremers, W.K., and Razonable, R.R. (2012). Homozygosity for the toll-like receptor 2 R753Q single-nucleotide polymorphism is a risk factor for cytomegalovirus disease after liver transplantation. *J. Infect. Dis.* 205, 639–646.

Kärre, K., Ljunggren, H.G., Piontek, G., and Kiessling, R. (1986). Selective rejection of H-2-deficient lymphoma variants suggests alternative immune defence strategy. *Nature* 319, 675–678.

Katz, H.R. (2006). Inhibition of inflammatory responses by leukocyte Ig-like receptors. *Adv. Immunol.* 91, 251–272.

Kemble, G.W., and Mocarski, E.S. (1989). A host cell protein binds to a highly conserved sequence element (pac-2) within the cytomegalovirus a sequence. *J. Virol.* 63, 4715–4728.

Kennedy, M.K., Glaccum, M., Brown, S.N., Butz, E.A., Viney, J.L., Embers, M., Matsuki, N., Charrier, K., Sedger, L., Willis, C.R., et al. (2000). Reversible defects in natural killer and memory CD8 T cell lineages in interleukin 15-deficient mice. *J. Exp. Med.* 191, 771–780.

Kenneson, A., and Cannon, M.J. (2007). Review and meta-analysis of the epidemiology of congenital cytomegalovirus (CMV) infection. *Rev. Med. Virol.* 17, 253–276.

Khakoo, S.I., Thio, C.L., Martin, M.P., Brooks, C.R., Gao, X., Astemborski, J., Cheng, J., Goedert, J.J., Vlahov, D., Hilgartner, M., et al. (2004). HLA and NK cell inhibitory receptor genes in resolving hepatitis C virus infection. *Science* 305, 872–874.

Khan, N., Shariff, N., Cobbold, M., Bruton, R., Ainsworth, J.A., Sinclair, A.J., Nayak, L., and Moss, P.A.H. (2002). Cytomegalovirus seropositivity drives the CD8 T cell repertoire toward

greater clonality in healthy elderly individuals. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *169*, 1984–1992.

Khan, N., Bruton, R., Taylor, G.S., Cobbold, M., Jones, T.R., Rickinson, A.B., and Moss, P.A.H. (2005). Identification of cytomegalovirus-specific cytotoxic T lymphocytes in vitro is greatly enhanced by the use of recombinant virus lacking the US2 to US11 region or modified vaccinia virus Ankara expressing individual viral genes. *J. Virol.* *79*, 2869–2879.

Khan, N., Best, D., Bruton, R., Nayak, L., Rickinson, A.B., and Moss, P.A.H. (2007). T cell recognition patterns of immunodominant cytomegalovirus antigens in primary and persistent infection. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *178*, 4455–4465.

Kiessling, R., Klein, E., and Wigzell, H. (1975). “Natural” killer cells in the mouse. I. Cytotoxic cells with specificity for mouse Moloney leukemia cells. Specificity and distribution according to genotype. *Eur. J. Immunol.* *5*, 112–117.

Kijpittayarit, S., Eid, A.J., Brown, R.A., Paya, C.V., and Razonable, R.R. (2007). Relationship between Toll-like receptor 2 polymorphism and cytomegalovirus disease after liver transplantation. *Clin. Infect. Dis. Off. Publ. Infect. Dis. Soc. Am.* *44*, 1315–1320.

Kikuchi-Maki, A., Yusa, S., Catina, T.L., and Campbell, K.S. (2003). KIR2DL4 is an IL-2-regulated NK cell receptor that exhibits limited expression in humans but triggers strong IFN- γ production. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *171*, 3415–3425.

Kim, H.S., and Long, E.O. (2012). Complementary phosphorylation sites in the adaptor protein SLP-76 promote synergistic activation of natural killer cells. *Sci. Signal.* *5*, ra49.

Kim, D.-K., Kabat, J., Borrego, F., Sanni, T.B., You, C.-H., and Coligan, J.E. (2004). Human NKG2F is expressed and can associate with DAP12. *Mol. Immunol.* *41*, 53–62.

Kim, S., Poursine-Laurent, J., Truscott, S.M., Lybarger, L., Song, Y.-J., Yang, L., French, A.R., Sunwoo, J.B., Lemieux, S., Hansen, T.H., et al. (2005). Licensing of natural killer cells by host major histocompatibility complex class I molecules. *Nature* *436*, 709–713.

Kim, Y., Park, B., Cho, S., Shin, J., Cho, K., Jun, Y., and Ahn, K. (2008). Human cytomegalovirus UL18 utilizes US6 for evading the NK and T-cell responses. *PLoS Pathog.* *4*, e1000123.

Kirwan, S.E., and Burshtyn, D.N. (2005). Killer cell Ig-like receptor-dependent signaling by Ig-like transcript 2 (ILT2/CD85j/LILRB1/LIR-1). *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *175*, 5006–5015.

Kitaguchi, T., Nagoya, M., Amano, T., Suzuki, M., and Minami, M. (1996). Analysis of roles of natural killer cells in defense against *Plasmodium chabaudi* in mice. *Parasitol. Res.* *82*, 352–357.

Klenerman, P., and Oxenius, A. (2016). T cell responses to cytomegalovirus. *Nat. Rev. Immunol.*

- Klenovsek, K., Weisel, F., Schneider, A., Appelt, U., Jonjic, S., Messerle, M., Bradel-Tretheway, B., Winkler, T.H., and Mach, M. (2007). Protection from CMV infection in immunodeficient hosts by adoptive transfer of memory B cells. *Blood* *110*, 3472–3479.
- Knapp, S., Warshow, U., Hegazy, D., Brackenbury, L., Guha, I.N., Fowell, A., Little, A.-M., Alexander, G.J., Rosenberg, W.M.C., Cramp, M.E., et al. (2010). Consistent beneficial effects of killer cell immunoglobulin-like receptor 2DL3 and group 1 human leukocyte antigen-C following exposure to hepatitis C virus. *Hepatology* *51*, 1168–1175.
- Koch, J., Steinle, A., Watzl, C., and Mandelboim, O. (2013). Activating natural cytotoxicity receptors of natural killer cells in cancer and infection. *Trends Immunol.* *34*, 182–191.
- Kondo, E., Akatsuka, Y., Kuzushima, K., Tsujimura, K., Asakura, S., Tajima, K., Kagami, Y., Koder, Y., Tanimoto, M., Morishima, Y., et al. (2004). Identification of novel CTL epitopes of CMV-pp65 presented by a variety of HLA alleles. *Blood* *103*, 630–638.
- Kondo, M., Weissman, I.L., and Akashi, K. (1997). Identification of clonogenic common lymphoid progenitors in mouse bone marrow. *Cell* *91*, 661–672.
- Korbel, D.S., Newman, K.C., Almeida, C.R., Davis, D.M., and Riley, E.M. (2005). Heterogeneous human NK cell responses to *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes. *J. Immunol.* *175*, 7466–7473.
- Kroemer, A., Xiao, X., Degauque, N., Edtinger, K., Wei, H., Demirci, G., and Li, X.C. (2008). The innate NK cells, allograft rejection, and a key role for IL-15. *J. Immunol.* *180*, 7818–7826.
- Kruse, P.H., Matta, J., Ugolini, S., and Vivier, E. (2014). Natural cytotoxicity receptors and their ligands. *Immunol. Cell Biol.* *92*, 221–229.
- Kwon, H.-J., Choi, G.-E., Ryu, S., Kwon, S.J., Kim, S.C., Booth, C., Nichols, K.E., and Kim, H.S. (2016). Stepwise phosphorylation of p65 promotes NF- κ B activation and NK cell responses during target cell recognition. *Nat. Commun.* *7*, 11686.
- Lafarge, X., Merville, P., Cazin, M.C., Bergé, F., Potaux, L., Moreau, J.F., and Déchanet-Merville, J. (2001). Cytomegalovirus infection in transplant recipients resolves when circulating gammadelta T lymphocytes expand, suggesting a protective antiviral role. *J. Infect. Dis.* *184*, 533–541.
- Lamy, T., and Loughran, T.P. (2003). Clinical features of large granular lymphocyte leukemia. *Semin. Hematol.* *40*, 185–195.
- Lancini, D., Faddy, H.M., Flower, R., and Hogan, C. (2014). Cytomegalovirus disease in immunocompetent adults. *Med. J. Aust.* *201*, 578–580.
- Landais, I., Pelton, C., Streblow, D., DeFilippis, V., McWeeney, S., and Nelson, J.A. (2015). Human Cytomegalovirus miR-UL112-3p Targets TLR2 and Modulates the TLR2/IRAK1/NF κ B Signaling Pathway. *PLoS Pathog.* *11*, e1004881.

Landolfo, S., Gariglio, M., Gribaudo, G., and Lembo, D. (2003). The human cytomegalovirus. *Pharmacol. Ther.* 98, 269–297.

Lanier, L.L. (2005). NK cell recognition. *Annu. Rev. Immunol.* 23, 225–274.

Lanier, L.L. (2015). NKG2D Receptor and Its Ligands in Host Defense. *Cancer Immunol. Res.* 3, 575–582.

Lanier, L.L., Testi, R., Bindl, J., and Phillips, J.H. (1989). Identity of Leu-19 (CD56) leukocyte differentiation antigen and neural cell adhesion molecule. *J. Exp. Med.* 169, 2233–2238.

Lanier, L.L., Yu, G., and Phillips, J.H. (1991). Analysis of Fc gamma RIII (CD16) membrane expression and association with CD3 zeta and Fc epsilon RI-gamma by site-directed mutation. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 146, 1571–1576.

Lanier, L.L., Chang, C., and Phillips, J.H. (1994). Human NKR-P1A. A disulfide-linked homodimer of the C-type lectin superfamily expressed by a subset of NK and T lymphocytes. *J. Immunol.* 153, 2417–2428.

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

Laskay, T., Rölinghoff, M., and Solbach, W. (1993). Natural killer cells participate in the early defense against *Leishmania major* infection in mice. *Eur. J. Immunol.* 23, 2237–2241.

Laskay, T., Diefenbach, A., Rölinghoff, M., and Solbach, W. (1995). Early parasite containment is decisive for resistance to *Leishmania major* infection. *Eur. J. Immunol.* 25, 2220–2227.

Lawlor, G., and Moss, A.C. (2010). Cytomegalovirus in inflammatory bowel disease: pathogen or innocent bystander? *Inflamm. Bowel Dis.* 16, 1620–1627.

Lee, N., Llano, M., Carretero, M., Ishitani, A., Navarro, F., López-Botet, M., and Geraghty, D.E. (1998). HLA-E is a major ligand for the natural killer inhibitory receptor CD94/NKG2A. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 95, 5199–5204.

Lepin, E.J., Bastin, J.M., Allan, D.S., Roncador, G., Braud, V.M., Mason, D.Y., van der Merwe, P.A., McMichael, A.J., Bell, J.I., Powis, S.H., et al. (2000). Functional characterization of HLA-F and binding of HLA-F tetramers to ILT2 and ILT4 receptors. *Eur. J. Immunol.* 30, 3552–3561.

Liao, N.S., Bix, M., Zijlstra, M., Jaenisch, R., and Raulet, D. (1991). MHC class I deficiency: susceptibility to natural killer (NK) cells and impaired NK activity. *Science* 253, 199–202.

van Lier, R.A.W., Berge, I.J.M. ten, and Gamadia, L.E. (2003). Human CD8(+) T-cell differentiation in response to viruses. *Nat. Rev. Immunol.* 3, 931–939.

Litjens, N.H., de Wit, E.A., and Betjes, M.G. (2011). Differential effects of age,

cytomegalovirus-seropositivity and end-stage renal disease (ESRD) on circulating T lymphocyte subsets. *Immun. Ageing A* 8, 2.

Liu, L.L., Landskron, J., Ask, E.H., Enqvist, M., Sohlberg, E., Traherne, J.A., Hammer, Q., Goodridge, J.P., Larsson, S., Jayaraman, J., et al. (2016). Critical Role of CD2 Co-stimulation in Adaptive Natural Killer Cell Responses Revealed in NKG2C-Deficient Humans. *Cell Rep.* 15, 1088–1099.

Ljunggren, H.G., and Kärre, K. (1990). In search of the “missing self”: MHC molecules and NK cell recognition. *Immunol. Today* 11, 237–244.

Lodolce, J.P., Boone, D.L., Chai, S., Swain, R.E., Dassopoulos, T., Trettin, S., and Ma, A. (1998). IL-15 receptor maintains lymphoid homeostasis by supporting lymphocyte homing and proliferation. *Immunity* 9, 669–676.

Long, E.O., Kim, H.S., Liu, D., Peterson, M.E., and Rajagopalan, S. (2013). Controlling natural killer cell responses: integration of signals for activation and inhibition. *Annu. Rev. Immunol.* 31, 227–258.

López-Vázquez, A., Rodrigo, L., Martínez-Borra, J., Pérez, R., Rodríguez, M., Fdez-Morera, J.L., Fuentes, D., Rodríguez-Rodero, S., González, S., and López-Larrea, C. (2005). Protective effect of the HLA-Bw4I80 epitope and the killer cell immunoglobulin-like receptor 3DS1 gene against the development of hepatocellular carcinoma in patients with hepatitis C virus infection. *J. Infect. Dis.* 192, 162–165.

Lopez-Verges, S., Milush, J.M., Pandey, S., York, V.A., Arakawa-Hoyt, J., Pircher, H., Norris, P.J., Nixon, D.F., and Lanier, L.L. (2010). CD57 defines a functionally distinct population of mature NK cells in the human CD56dimCD16+ NK-cell subset. *Blood* 116, 3865–3874.

Lopez-Vergès, S., Milush, J.M., Schwartz, B.S., Pando, M.J., Jarjoura, J., York, V.A., Houchins, J.P., Miller, S., Kang, S.-M., Norris, P.J., et al. (2011). Expansion of a unique CD57⁺NKG2Chi natural killer cell subset during acute human cytomegalovirus infection. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 108, 14725–14732.

Lucas, M., Schachterle, W., Oberle, K., Aichele, P., and Diefenbach, A. (2007). Dendritic cells prime natural killer cells by trans-presenting interleukin 15. *Immunity* 26, 503–517.

Luetke-Eversloh, M., Hammer, Q., Durek, P., Nordström, K., Gasparoni, G., Pink, M., Hamann, A., Walter, J., Chang, H.-D., Dong, J., et al. (2014). Human Cytomegalovirus Drives Epigenetic Imprinting of the IFNG Locus in NKG2Chi Natural Killer Cells. *PLoS Pathog.* 10, e1004441.

Lunemann, S., Martus, G., Hölzemer, A., Chapel, A., Ziegler, M., Körner, C., Garcia Beltran, W., Carrington, M., Wedemeyer, H., and Altfeld, M. Sequence variations in HCV core-derived epitopes alter binding of KIR2DL3 to HLA-C*03:04 and modulate NK cell function. *J. Hepatol.*

Lurain, N.S., Bhorade, S.M., Pursell, K.J., Avery, R.K., Yeldandi, V.V., Isada, C.M., Robert, E.S., Kohn, D.J., Arens, M.Q., Garrity, E.R., et al. (2002). Analysis and characterization of antiviral drug-resistant cytomegalovirus isolates from solid organ transplant recipients. *J. Infect. Dis.* 186, 760–768.

Lurain, N.S., Fox, A.M., Lichy, H.M., Bhorade, S.M., Ware, C.F., Huang, D.D., Kwan, S.-P., Garrity, E.R., and Chou, S. (2006). Analysis of the human cytomegalovirus genomic region from UL146 through UL147A reveals sequence hypervariability, genotypic stability, and overlapping transcripts. *Viol. J.* 3, 4.

Macagno, A., Bernasconi, N.L., Vanzetta, F., Dander, E., Sarasini, A., Revello, M.G., Gerna, G., Sallusto, F., and Lanzavecchia, A. (2010). Isolation of Human Monoclonal Antibodies That Potently Neutralize Human Cytomegalovirus Infection by Targeting Different Epitopes on the gH/gL/UL128-131A Complex. *J. Virol.* 84, 1005–1013.

Maeda, M., Carpenito, C., Russell, R.C., Dasanji, J., Veinotte, L.L., Ohta, H., Yamamura, T., Tan, R., and Takei, F. (2005). Murine CD160, Ig-like receptor on NK cells and NKT cells, recognizes classical and nonclassical MHC class I and regulates NK cell activation. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 175, 4426–4432.

Maier, S., Tertilt, C., Chambron, N., Gerauer, K., Hüser, N., Heidecke, C.D., and Pfeffer, K. (2001). Inhibition of natural killer cells results in acceptance of cardiac allografts in CD28^{-/-} mice. *Nat. Med.* 7, 557–562.

Mandelboim, O., and Porgador, A. (2001). NKp46. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 33, 1147–1150.

Mandelboim, O., Lieberman, N., Lev, M., Paul, L., Arnon, T.I., Bushkin, Y., Davis, D.M., Strominger, J.L., Yewdell, J.W., and Porgador, A. (2001). Recognition of haemagglutinins on virus-infected cells by NKp46 activates lysis by human NK cells. *Nature* 409, 1055–1060.

Manley, T.J., Luy, L., Jones, T., Boeckh, M., Mutimer, H., and Riddell, S.R. (2004). Immune evasion proteins of human cytomegalovirus do not prevent a diverse CD8⁺ cytotoxic T-cell response in natural infection. *Blood* 104, 1075–1082.

Marcenaro, E., Ferranti, B., Falco, M., Moretta, L., and Moretta, A. (2008). Human NK cells directly recognize *Mycobacterium bovis* via TLR2 and acquire the ability to kill monocyte-derived DC. *Int. Immunol.* 20, 1155–1167.

Marchant, A., Appay, V., van der Sande, M., Dulphy, N., Liesnard, C., Kidd, M., Kaye, S., Ojuola, O., Gillespie, G.M.A., Vargas Cuero, A.L., et al. (2003). Mature CD8⁺ T lymphocyte response to viral infection during fetal life. *J. Clin. Invest.* 111, 1747–1755.

De Maria, A., Fogli, M., Costa, P., Murdaca, G., Puppo, F., Mavilio, D., Moretta, A., and Moretta, L. (2003). The impaired NK cell cytolytic function in viremic HIV-1 infection is associated with a reduced surface expression of natural cytotoxicity receptors (NKp46, NKp30 and NKp44). *Eur. J. Immunol.* 33, 2410–2418.

Marshall, E.E., and Geballe, A.P. (2009). Multifaceted evasion of the interferon response by

cytomegalovirus. *J. Interferon Cytokine Res. Off. J. Int. Soc. Interferon Cytokine Res.* 29, 609–619.

Martin, M.P., Bashirova, A., Traherne, J., Trowsdale, J., and Carrington, M. (2003). Cutting edge: expansion of the KIR locus by unequal crossing over. *J. Immunol. Baltim. Md* 1950 171, 2192–2195.

Martin, M.P., Qi, Y., Gao, X., Yamada, E., Martin, J.N., Pereyra, F., Colombo, S., Brown, E.E., Shupert, W.L., Phair, J., et al. (2007). Innate partnership of HLA-B and KIR3DL1 subtypes against HIV-1. *Nat. Genet.* 39, 733–740.

Martinet, L., Ferrari De Andrade, L., Guillerey, C., Lee, J.S., Liu, J., Souza-Fonseca-Guimaraes, F., Hutchinson, D.S., Kolesnik, T.B., Nicholson, S.E., Huntington, N.D., et al. (2015). DNAM-1 expression marks an alternative program of NK cell maturation. *Cell Rep.* 11, 85–97.

Martín-Fontecha, A., Thomsen, L.L., Brett, S., Gerard, C., Lipp, M., Lanzavecchia, A., and Sallusto, F. (2004). Induced recruitment of NK cells to lymph nodes provides IFN- γ for T(H)1 priming. *Nat. Immunol.* 5, 1260–1265.

Masson, D., Jarry, A., Baury, B., Blanchardie, P., Labois, C., Lustenberger, P., and Denis, M.G. (2001). Overexpression of the CD155 gene in human colorectal carcinoma. *Gut* 49, 236–240.

Mathew, P.A., Garni-Wagner, B.A., Land, K., Takashima, A., Stoneman, E., Bennett, M., and Kumar, V. (1993). Cloning and characterization of the 2B4 gene encoding a molecule associated with non-MHC-restricted killing mediated by activated natural killer cells and T cells. *J. Immunol. Baltim. Md* 1950 151, 5328–5337.

Matta, J., Baratin, M., Chiche, L., Forel, J.-M., Cognet, C., Thomas, G., Farnarier, C., Piperoglou, C., Papazian, L., Chaussabel, D., et al. (2013). Induction of B7-H6, a ligand for the natural killer cell-activating receptor NKp30, in inflammatory conditions. *Blood* 122, 394–404.

Maussang, D., Verzijl, D., van Walsum, M., Leurs, R., Holl, J., Pleskoff, O., Michel, D., van Dongen, G.A.M.S., and Smit, M.J. (2006). Human cytomegalovirus-encoded chemokine receptor US28 promotes tumorigenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103, 13068–13073.

Maussang, D., Langemeijer, E., Fitzsimons, C.P., Stigter-van Walsum, M., Dijkman, R., Borg, M.K., Slinger, E., Schreiber, A., Michel, D., Tensen, C.P., et al. (2009). The human cytomegalovirus-encoded chemokine receptor US28 promotes angiogenesis and tumor formation via cyclooxygenase-2. *Cancer Res.* 69, 2861–2869.

Mavilio, D., Benjamin, J., Daucher, M., Lombardo, G., Kottlil, S., Planta, M.A., Marcenaro, E., Bottino, C., Moretta, L., Moretta, A., et al. (2003). Natural killer cells in HIV-1 infection: dichotomous effects of viremia on inhibitory and activating receptors and their functional correlates. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 100, 15011–15016.

Mavilio, D., Lombardo, G., Benjamin, J., Kim, D., Follman, D., Marcenaro, E., O'Shea, M.A., Kinter, A., Kovacs, C., Moretta, A., et al. (2005). Characterization of CD56-/CD16+ natural killer (NK) cells: a highly dysfunctional NK subset expanded in HIV-infected viremic individuals. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *102*, 2886–2891.

Mavoungou, E., Held, J., Mewono, L., and Kremsner, P.G. (2007). A Duffy binding-like domain is involved in the NKp30-mediated recognition of *Plasmodium falciparum*-parasitized erythrocytes by natural killer cells. *J. Infect. Dis.* *195*, 1521–1531.

McGeoch, D.J., Dolan, A., and Ralph, A.C. (2000). Toward a comprehensive phylogeny for mammalian and avian herpesviruses. *J. Virol.* *74*, 10401–10406.

McGeoch, D.J., Rixon, F.J., and Davison, A.J. (2006). Topics in herpesvirus genomics and evolution. *Virus Res.* *117*, 90–104.

Mehraein, Y., Lennerz, C., Ehlhardt, S., Remberger, K., Ojak, A., and Zang, K.D. (2004). Latent Epstein-Barr virus (EBV) infection and cytomegalovirus (CMV) infection in synovial tissue of autoimmune chronic arthritis determined by RNA- and DNA-in situ hybridization. *Mod. Pathol. Off. J. U. S. Can. Acad. Pathol. Inc* *17*, 781–789.

Michaëlsson, J., Matos, C.T. de, Achour, A., Lanier, L.L., Kärre, K., and Söderström, K. (2002). A Signal Peptide Derived from hsp60 Binds HLA-E and Interferes with CD94/NKG2A Recognition. *J. Exp. Med.* *196*, 1403–1414.

Moesta, A.K., Norman, P.J., Yawata, M., Yawata, N., Gleimer, M., and Parham, P. (2008). Synergistic polymorphism at two positions distal to the ligand-binding site makes KIR2DL2 a stronger receptor for HLA-C than KIR2DL3. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *180*, 3969–3979.

Moffett, A., and Shreeve, N. (2015). First do no harm: uterine natural killer (NK) cells in assisted reproduction. *Hum. Reprod. Oxf. Engl.* *30*, 1519–1525.

Monsiváis-Urenda, A., Noyola-Cherpitel, D., Hernández-Salinas, A., García-Sepúlveda, C., Romo, N., Baranda, L., López-Botet, M., and González-Amaro, R. (2010). Influence of human cytomegalovirus infection on the NK cell receptor repertoire in children. *Eur. J. Immunol.* *40*, 1418–1427.

Morel, E., and Bellón, T. (2008). HLA class I molecules regulate IFN-gamma production induced in NK cells by target cells, viral products, or immature dendritic cells through the inhibitory receptor ILT2/CD85j. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *181*, 2368–2381.

Moretta, A. (2002). Natural killer cells and dendritic cells: rendezvous in abused tissues. *Nat. Rev. Immunol.* *2*, 957–964.

Moretta, L., and Moretta, A. (2004). Unravelling natural killer cell function: triggering and inhibitory human NK receptors. *EMBO J.* *23*, 255–259.

Moretta, A., Bottino, C., Pende, D., Tripodi, G., Tambussi, G., Viale, O., Orengo, A., Barbaresi, M., Merli, A., and Ciccone, E. (1990). Identification of four subsets of human

CD3-CD16⁺ natural killer (NK) cells by the expression of clonally distributed functional surface molecules: correlation between subset assignment of NK clones and ability to mediate specific alloantigen recognition. *J. Exp. Med.* 172, 1589–1598.

Moretta, A., Bottino, C., Vitale, M., Pende, D., Cantoni, C., Mingari, M.C., Biassoni, R., and Moretta, L. (2001). Activating receptors and coreceptors involved in human natural killer cell-mediated cytotoxicity. *Annu. Rev. Immunol.* 19, 197–223.

Morvan, M.G., and Lanier, L.L. (2016). NK cells and cancer: you can teach innate cells new tricks. *Nat. Rev. Cancer* 16, 7–19.

Morvan, M., David, G., Sébille, V., Perrin, A., Gagne, K., Willem, C., Kerdudou, N., Denis, L., Clémenceau, B., Folléa, G., et al. (2008). Autologous and allogeneic HLA KIR ligand environments and activating KIR control KIR NK-cell functions. *Eur. J. Immunol.* 38, 3474–3486.

Murphy, E., and Shenk, T. (2008). Human cytomegalovirus genome. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 325, 1–19.

Murphy, E., Yu, D., Grimwood, J., Schmutz, J., Dickson, M., Jarvis, M.A., Hahn, G., Nelson, J.A., Myers, R.M., and Shenk, T.E. (2003). Coding potential of laboratory and clinical strains of human cytomegalovirus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 100, 14976–14981.

Murphy, J.C., Fischle, W., Verdin, E., and Sinclair, J.H. (2002). Control of cytomegalovirus lytic gene expression by histone acetylation. *EMBO J.* 21, 1112–1120.

Nabekura, T., Kanaya, M., Shibuya, A., Fu, G., Gascoigne, N.R.J., and Lanier, L.L. (2014). Costimulatory Molecule DNAM-1 Is Essential for Optimal Differentiation of Memory Natural Killer Cells during Mouse Cytomegalovirus Infection. *Immunity* 40, 225–234.

Nakajima, H., and Colonna, M. (2000). 2B4: an NK cell activating receptor with unique specificity and signal transduction mechanism. *Hum. Immunol.* 61, 39–43.

Navarro, D. (2016). Expanding role of cytomegalovirus as a human pathogen. *J. Med. Virol.* 88, 1103–1112.

Neff, B.J., Weibel, R.E., Buynak, E.B., McLean, A.A., and Hilleman, M.R. (1979). Clinical and laboratory studies of live cytomegalovirus vaccine Ad-169. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med. Soc. Exp. Biol. Med. N. Y. N* 160, 32–37.

Nguyen, N.L., Loveland, A.N., and Gibson, W. (2008). Nuclear localization sequences in cytomegalovirus capsid assembly proteins (UL80 proteins) are required for virus production: inactivating NLS1, NLS2, or both affects replication to strikingly different extents. *J. Virol.* 82, 5381–5389.

Nigro, G., Adler, S.P., La Torre, R., Best, A.M., and Congenital Cytomegalovirus Collaborating Group (2005). Passive immunization during pregnancy for congenital cytomegalovirus infection. *N. Engl. J. Med.* 353, 1350–1362.

Nigro, G., Adler, S.P., Parruti, G., Anceschi, M.M., Coclite, E., Pezone, I., and Di Renzo, G.C. (2012). Immunoglobulin therapy of fetal cytomegalovirus infection occurring in the first half of pregnancy--a case-control study of the outcome in children. *J. Infect. Dis.* *205*, 215–227.

Nikolich-Zugich, J. (2014). Aging of the T cell compartment in mice and humans: from naive expectations to foggy memories. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *193*, 2622–2629.

Nikolova, M., Marie-Cardine, A., Boumsell, L., and Bensussan, A. (2002). BY55/CD160 acts as a co-receptor in TCR signal transduction of a human circulating cytotoxic effector T lymphocyte subset lacking CD28 expression. *Int. Immunol.* *14*, 445–451.

Nogalski, M.T., Podduturi, J.P., DeMeritt, I.B., Milford, L.E., and Yurochko, A.D. (2007). The human cytomegalovirus virion possesses an activated casein kinase II that allows for the rapid phosphorylation of the inhibitor of NF-kappaB, IkappaBalpha. *J. Virol.* *81*, 5305–5314.

Noyola, D.E., Fortuny, C., Muntasell, A., Noguera-Julian, A., Muñoz-Almagro, C., Alarcón, A., Juncosa, T., Moraru, M., Vilches, C., and López-Botet, M. (2012). Influence of congenital human cytomegalovirus infection and the NKG2C genotype on NK-cell subset distribution in children. *Eur. J. Immunol.* *42*, 3256–3266.

Occhino, M., Ghiotto, F., Soro, S., Mortarino, M., Bosi, S., Maffei, M., Bruno, S., Nardini, M., Figini, M., Tramontano, A., et al. (2008). Dissecting the structural determinants of the interaction between the human cytomegalovirus UL18 protein and the CD85j immune receptor. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *180*, 957–968.

Odeberg, J., Plachter, B., Brandén, L., and Söderberg-Nauclér, C. (2003). Human cytomegalovirus protein pp65 mediates accumulation of HLA-DR in lysosomes and destruction of the HLA-DR alpha-chain. *Blood* *101*, 4870–4877.

O’Leary, J.G., Goodarzi, M., Drayton, D.L., and von Andrian, U.H. (2006). T cell- and B cell-independent adaptive immunity mediated by natural killer cells. *Nat. Immunol.* *7*, 507–516.

Orange, J.S. (2002). Human natural killer cell deficiencies and susceptibility to infection. *Microbes Infect. Inst. Pasteur* *4*, 1545–1558.

Park, S.J., Hughes, M.A., Burdick, M., Strieter, R.M., and Mehrad, B. (2009). Early NK Cell-Derived IFN- γ Is Essential to Host Defense in Neutropenic Invasive Aspergillosis. *J. Immunol.* *182*, 4306–4312.

Pass, R.F., Zhang, C., Evans, A., Simpson, T., Andrews, W., Huang, M.-L., Corey, L., Hill, J., Davis, E., Flanagan, C., et al. (2009). Vaccine prevention of maternal cytomegalovirus infection. *N. Engl. J. Med.* *360*, 1191–1199.

Patrone, M., Secchi, M., Fiorina, L., Ierardi, M., Milanesi, G., and Gallina, A. (2005). Human cytomegalovirus UL130 protein promotes endothelial cell infection through a producer cell modification of the virion. *J. Virol.* *79*, 8361–8373.

Paulus, C., Krauss, S., and Nevels, M. (2006). A human cytomegalovirus antagonist of type I IFN-dependent signal transducer and activator of transcription signaling. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *103*, 3840–3845.

Pawelec, G. (2012). Hallmarks of human “immunosenescence”: adaptation or dysregulation? *Immun. Ageing A* *9*, 15.

Pegram, H.J., Andrews, D.M., Smyth, M.J., Darcy, P.K., and Kershaw, M.H. (2011). Activating and inhibitory receptors of natural killer cells. *Immunol. Cell Biol.* *89*, 216–224.

Pende, D., Biassoni, R., Cantoni, C., Verdiani, S., Falco, M., di Donato, C., Accame, L., Bottino, C., Moretta, A., and Moretta, L. (1996). The natural killer cell receptor specific for HLA-A allotypes: a novel member of the p58/p70 family of inhibitory receptors that is characterized by three immunoglobulin-like domains and is expressed as a 140-kD disulphide-linked dimer. *J. Exp. Med.* *184*, 505–518.

Pende, D., Parolini, S., Pessino, A., Sivori, S., Augugliaro, R., Morelli, L., Marcenaro, E., Accame, L., Malaspina, A., Biassoni, R., et al. (1999). Identification and molecular characterization of NKp30, a novel triggering receptor involved in natural cytotoxicity mediated by human natural killer cells. *J. Exp. Med.* *190*, 1505–1516.

Pende, D., Marcenaro, S., Falco, M., Martini, S., Bernardo, M.E., Montagna, D., Romeo, E., Cognet, C., Martinetti, M., Maccario, R., et al. (2009). Anti-leukemia activity of alloreactive NK cells in KIR ligand-mismatched haploidentical HSCT for pediatric patients: evaluation of the functional role of activating KIR and redefinition of inhibitory KIR specificity. *Blood* *113*, 3119–3129.

Pessino, A., Sivori, S., Bottino, C., Malaspina, A., Morelli, L., Moretta, L., Biassoni, R., and Moretta, A. (1998). Molecular cloning of NKp46: a novel member of the immunoglobulin superfamily involved in triggering of natural cytotoxicity. *J. Exp. Med.* *188*, 953–960.

Petrie, E.J., Clements, C.S., Lin, J., Sullivan, L.C., Johnson, D., Huyton, T., Heroux, A., Hoare, H.L., Beddoe, T., Reid, H.H., et al. (2008). CD94-NKG2A recognition of human leukocyte antigen (HLA)-E bound to an HLA class I leader sequence. *J. Exp. Med.* *205*, 725–735.

Petroff, M.G., Sedlmayr, P., Azzola, D., and Hunt, J.S. (2002). Decidual macrophages are potentially susceptible to inhibition by class Ia and class Ib HLA molecules. *J. Reprod. Immunol.* *56*, 3–17.

Piccioli, D., Sbrana, S., Melandri, E., and Valiante, N.M. (2002). Contact-dependent stimulation and inhibition of dendritic cells by natural killer cells. *J. Exp. Med.* *195*, 335–341.

Pietra, G., Romagnani, C., Mazzarino, P., Falco, M., Millo, E., Moretta, A., Moretta, L., and Mingari, M.C. (2003). HLA-E-restricted recognition of cytomegalovirus-derived peptides by human CD8⁺ cytolytic T lymphocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *100*, 10896–10901.

Pitard, V., Roumanes, D., Lafarge, X., Couzi, L., Garrigue, I., Lafon, M.-E., Merville, P.,

Moreau, J.-F., and Déchanet-Merville, J. (2008). Long-term expansion of effector/memory V δ 2- $\gamma\delta$ T cells is a specific blood signature of CMV infection. *Blood* 112, 1317–1324.

Plotkin, S. (2015). The history of vaccination against cytomegalovirus. *Med. Microbiol. Immunol. (Berl.)* 204, 247–254.

Plotkin, S.A., Higgins, R., Kurtz, J.B., Morris, P.J., Campbell, D.A., Shope, T.C., Spector, S.A., and Dankner, W.M. (1994). Multicenter trial of Towne strain attenuated virus vaccine in seronegative renal transplant recipients. *Transplantation* 58, 1176–1178.

Pogge von Strandmann, E., Simhadri, V.R., von Tresckow, B., Sasse, S., Reiners, K.S., Hansen, H.P., Rothe, A., Böll, B., Simhadri, V.L., Borchmann, P., et al. (2007). Human leukocyte antigen-B-associated transcript 3 is released from tumor cells and engages the NKp30 receptor on natural killer cells. *Immunity* 27, 965–974.

Polić, B., Hengel, H., Krmpotić, A., Trgovcich, J., Pavić, I., Luccaronin, P., Jonjić, S., and Koszinowski, U.H. (1998). Hierarchical and redundant lymphocyte subset control precludes cytomegalovirus replication during latent infection. *J. Exp. Med.* 188, 1047–1054.

Ponte, M., Cantoni, C., Biassoni, R., Tradori-Cappai, A., Bentivoglio, G., Vitale, C., Bertone, S., Moretta, A., Moretta, L., and Mingari, M.C. (1999). Inhibitory receptors sensing HLA-G1 molecules in pregnancy: decidua-associated natural killer cells express LIR-1 and CD94/NKG2A and acquire p49, an HLA-G1-specific receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 96, 5674–5679.

Prichard, M.N., Penfold, M.E., Duke, G.M., Spaete, R.R., and Kemble, G.W. (2001). A review of genetic differences between limited and extensively passaged human cytomegalovirus strains. *Rev. Med. Virol.* 11, 191–200.

Prod'homme, V., Retière, C., Imbert-Marcille, B.-M., Bonneville, M., and Hallet, M.-M. (2003). Modulation of HLA-A*0201-restricted T cell responses by natural polymorphism in the IE1(315-324) epitope of human cytomegalovirus. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 170, 2030–2036.

Prod'homme, V., Tomasec, P., Cunningham, C., Lemberg, M.K., Stanton, R.J., McSharry, B.P., Wang, E.C.Y., Cuff, S., Martoglio, B., Davison, A.J., et al. (2012). Human cytomegalovirus UL40 signal peptide regulates cell surface expression of the NK cell ligands HLA-E and gpUL18. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 188, 2794–2804.

Pross, H.F., and Lotzová, E. (1993). Role of natural killer cells in cancer. *Nat. Immun.* 12, 279–292.

Puchhammer-Stöckl, E., and Görzer, I. (2006). Cytomegalovirus and Epstein-Barr virus subtypes--the search for clinical significance. *J. Clin. Virol. Off. Publ. Pan Am. Soc. Clin. Virol.* 36, 239–248.

Quinnan, G.V., Kirmani, N., Rook, A.H., Manischewitz, J.F., Jackson, L., Moreschi, G., Santos, G.W., Saral, R., and Burns, W.H. (1982). Cytotoxic t cells in cytomegalovirus

infection: HLA-restricted T-lymphocyte and non-T-lymphocyte cytotoxic responses correlate with recovery from cytomegalovirus infection in bone-marrow-transplant recipients. *N. Engl. J. Med.* 307, 7–13.

Quinnan, G.V., Delery, M., Rook, A.H., Frederick, W.R., Epstein, J.S., Manischewitz, J.F., Jackson, L., Ramsey, K.M., Mittal, K., and Plotkin, S.A. (1984). Comparative virulence and immunogenicity of the Towne strain and a nonattenuated strain of cytomegalovirus. *Ann. Intern. Med.* 101, 478–483.

Rabot, M., Bensussan, A., and Le Bouteiller, P. (2006). Engagement of the CD160 activating NK cell receptor leads to its association with CD2 in circulating human NK cells. *Transpl. Immunol.* 17, 36–38.

Rabot, M., Costa, H. El, Polgar, B., Marie-Cardine, A., Aguerre-Girr, M., Barakonyi, A., Valitutti, S., Bensussan, A., and Le Bouteiller, P. (2007). CD160-activating NK cell effector functions depend on the phosphatidylinositol 3-kinase recruitment. *Int. Immunol.* 19, 401–409.

Rafailidis, P.I., Mourtzoukou, E.G., Varbobitis, I.C., and Falagas, M.E. (2008). Severe cytomegalovirus infection in apparently immunocompetent patients: a systematic review. *Virol. J.* 5, 47.

Rajagopalan, S., and Long, E.O. (1999). A human histocompatibility leukocyte antigen (HLA)-G-specific receptor expressed on all natural killer cells. *J. Exp. Med.* 189, 1093–1100.

Rasmussen, L., Geissler, A., Cowan, C., Chase, A., and Winters, M. (2002). The genes encoding the gCIII complex of human cytomegalovirus exist in highly diverse combinations in clinical isolates. *J. Virol.* 76, 10841–10848.

Raulet, D.H., and Vance, R.E. (2006). Self-tolerance of natural killer cells. *Nat. Rev. Immunol.* 6, 520–531.

Razonable, R. (2010a). Direct and indirect effects of cytomegalovirus: can we prevent them? *Enfermedades Infecc. Microbiol. Clínica* 28, 1–5.

Razonable, R.R. (2010b). Strategies for managing cytomegalovirus in transplant recipients. *Expert Opin. Pharmacother.* 11, 1983–1997.

Razonable, R.R., Rivero, A., Rodriguez, A., Wilson, J., Daniels, J., Jenkins, G., Larson, T., Hellinger, W.C., Spivey, J.R., and Paya, C.V. (2001). Allograft rejection predicts the occurrence of late-onset cytomegalovirus (CMV) disease among CMV-mismatched solid organ transplant patients receiving prophylaxis with oral ganciclovir. *J. Infect. Dis.* 184, 1461–1464.

Redman, C.W.G., and Sargent, I.L. (2010). Immunology of pre-eclampsia. *Am. J. Reprod. Immunol. N. Y. N* 1989 63, 534–543.

Reeves, M.B., Lehner, P.J., Sissons, J.G.P., and Sinclair, J.H. (2005). An in vitro model for

the regulation of human cytomegalovirus latency and reactivation in dendritic cells by chromatin remodelling. *J. Gen. Virol.* 86, 2949–2954.

Retière, C., Prod'homme, V., Imbert-Marcille, B.M., Bonneville, M., Vié, H., and Hallet, M.M. (2000). Generation of cytomegalovirus-specific human T-lymphocyte clones by using autologous B-lymphoblastoid cells with stable expression of pp65 or IE1 proteins: a tool to study the fine specificity of the antiviral response. *J. Virol.* 74, 3948–3952.

Revello, M.G., and Gerna, G. (2010). Human cytomegalovirus tropism for endothelial/epithelial cells: scientific background and clinical implications. *Rev. Med. Virol.* 20, 136–155.

Rey, J., Giustiniani, J., Mallet, F., Schiavon, V., Boumsell, L., Bensussan, A., Olive, D., and Costello, R.T. (2006). The co-expression of 2B4 (CD244) and CD160 delineates a subpopulation of human CD8⁺ T cells with a potent CD160-mediated cytolytic effector function. *Eur. J. Immunol.* 36, 2359–2366.

Riddell, S.R., Watanabe, K.S., Goodrich, J.M., Li, C.R., Agha, M.E., and Greenberg, P.D. (1992). Restoration of viral immunity in immunodeficient humans by the adoptive transfer of T cell clones. *Science* 257, 238–241.

Ripa, M., Pogliaghi, M., Chiappetta, S., Galli, L., Pensieroso, S., Cavarelli, M., Scarlatti, G., De Biasi, S., Cossarizza, A., De Battista, D., et al. (2015). Dynamics of adaptive and innate immunity in patients treated during primary human immunodeficiency virus infection: results from Maraviroc in HIV Acute Infection (MAIN) randomized clinical trial. *Clin. Microbiol. Infect. Off. Publ. Eur. Soc. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 21, 876.e1–e4.

Rist, M., Cooper, L., Elkington, R., Walker, S., Fazou, C., Tellam, J., Crough, T., and Khanna, R. (2005). Ex vivo expansion of human cytomegalovirus-specific cytotoxic T cells by recombinant polyepitope: implications for HCMV immunotherapy. *Eur. J. Immunol.* 35, 996–1007.

Ritz, J., Schmidt, R.E., Michon, J., Hercend, T., and Schlossman, S.F. (1988). Characterization of functional surface structures on human natural killer cells. *Adv. Immunol.* 42, 181–211.

Roberts, A.I., Lee, L., Schwarz, E., Groh, V., Spies, T., Ebert, E.C., and Jabri, B. (2001). NKG2D receptors induced by IL-15 costimulate CD28-negative effector CTL in the tissue microenvironment. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 167, 5527–5530.

Robertson, M.J. (2002). Role of chemokines in the biology of natural killer cells. *J. Leukoc. Biol.* 71, 173–183.

Roder, J.C., Haliotis, T., Klein, M., Korec, S., Jett, J.R., Ortaldo, J., Heberman, R.B., Katz, P., and Fauci, A.S. (1980). A new immunodeficiency disorder in humans involving NK cells. *Nature* 284, 553–555.

Rolland, M., Li, X., Sellier, Y., Martin, H., Perez-Berezo, T., Rauwel, B., Benchoua, A.,

Bessi res, B., Aziza, J., Cenac, N., et al. (2016). PPAR  Is Activated during Congenital Cytomegalovirus Infection and Inhibits Neuronogenesis from Human Neural Stem Cells. *PLOS Pathog* 12, e1005547.

R lle, A., Pollmann, J., and Cerwenka, A. (2013). Memory of infections: an emerging role for natural killer cells. *PLoS Pathog.* 9, e1003548.

R lle, A., Pollmann, J., Ewen, E.-M., Le, V.T.K., Halenius, A., Hengel, H., and Cerwenka, A. (2014). IL-12-producing monocytes and HLA-E control HCMV-driven NKG2C+ NK cell expansion. *J. Clin. Invest.*

Roman, A., Manito, N., Campistol, J.M., Cuervas-Mons, V., Almenar, L., Arias, M., Casafont, F., del Castillo, D., Crespo-Leiro, M.G., Delgado, J.F., et al. (2014). The impact of the prevention strategies on the indirect effects of CMV infection in solid organ transplant recipients. *Transplant. Rev.* 28, 84–91.

Roncagalli, R., Taylor, J.E.R., Zhang, S., Shi, X., Chen, R., Cruz-Munoz, M.-E., Yin, L., Latour, S., and Veillette, A. (2005). Negative regulation of natural killer cell function by EAT-2, a SAP-related adaptor. *Nat. Immunol.* 6, 1002–1010.

Rosen, D.B., Bettadapura, J., Alsharifi, M., Mathew, P.A., Warren, H.S., and Lanier, L.L. (2005). Cutting edge: lectin-like transcript-1 is a ligand for the inhibitory human NKR-P1A receptor. *J. Immunol. Baltim. Md* 175, 7796–7799.

Rosen, D.B., Cao, W., Avery, D.T., Tangye, S.G., Liu, Y.-J., Houchins, J.P., and Lanier, L.L. (2008). Functional consequences of interactions between human NKR-P1A and its ligand LLT1 expressed on activated dendritic cells and B cells. *J. Immunol. Baltim. Md* 180, 6508–6517.

Rosental, B., Brusilovsky, M., Hadad, U., Oz, D., Appel, M.Y., Afergan, F., Yossef, R., Rosenberg, L.A., Aharoni, A., Cerwenka, A., et al. (2011). Proliferating cell nuclear antigen is a novel inhibitory ligand for the natural cytotoxicity receptor NKp44. *J. Immunol. Baltim. Md* 187, 5693–5702.

Roux, A., Mourin, G., Larsen, M., Fastenackels, S., Urrutia, A., Gorochoff, G., Autran, B., Donner, C., Sidi, D., Sibony-Prat, J., et al. (2013). Differential Impact of Age and Cytomegalovirus Infection on the    T Cell Compartment. *J. Immunol.* 191, 1300–1306.

Rowe, W.P., Hartley, J.W., Waterman, S., Turner, H.C., and Huebner, R.J. (1956). Cytopathogenic agent resembling human salivary gland virus recovered from tissue cultures of human adenoids. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med. Soc. Exp. Biol. Med. N. Y.* 92, 418–424.

Ruggeri, L., Capanni, M., Casucci, M., Volpi, I., Tosti, A., Perruccio, K., Urbani, E., Negrin, R.S., Martelli, M.F., and Velardi, A. (1999). Role of natural killer cell alloreactivity in HLA-mismatched hematopoietic stem cell transplantation. *Blood* 94, 333–339.

Ruggeri, L., Capanni, M., Urbani, E., Perruccio, K., Shlomchik, W.D., Tosti, A., Posati, S., Rogaia, D., Frassoni, F., Aversa, F., et al. (2002). Effectiveness of donor natural killer cell

alloreactivity in mismatched hematopoietic transplants. *Science* 295, 2097–2100.

Sagedal, S., Nordal, K.P., Hartmann, A., Sund, S., Scott, H., Degré, M., Foss, A., Leivestad, T., Osnes, K., Fauchald, P., et al. (2002). The impact of cytomegalovirus infection and disease on rejection episodes in renal allograft recipients. *Am. J. Transplant. Off. J. Am. Soc. Transplant. Am. Soc. Transpl. Surg.* 2, 850–856.

Samaridis, J., and Colonna, M. (1997). Cloning of novel immunoglobulin superfamily receptors expressed on human myeloid and lymphoid cells: structural evidence for new stimulatory and inhibitory pathways. *Eur. J. Immunol.* 27, 660–665.

Di Santo, J.P. (2006). Natural killer cell developmental pathways: a question of balance. *Annu. Rev. Immunol.* 24, 257–286.

Santourlidis, S., Trompeter, H.-I., Weinhold, S., Eisermann, B., Meyer, K.L., Wernet, P., and Uhrberg, M. (2002). Crucial role of DNA methylation in determination of clonally distributed killer cell Ig-like receptor expression patterns in NK cells. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 169, 4253–4261.

Sarcinella, L., Mazzulli, T., Willey, B., and Humar, A. (2002). Cytomegalovirus glycoprotein B genotype does not correlate with outcomes in liver transplant patients. *J. Clin. Virol. Off. Publ. Pan Am. Soc. Clin. Virol.* 24, 99–105.

Sauce, D., Larsen, M., Fastenackels, S., Roux, A., Gorochoy, G., Katlama, C., Sidi, D., Sibony-Prat, J., and Appay, V. (2012). Lymphopenia-driven homeostatic regulation of naive T cells in elderly and thymectomized young adults. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 189, 5541–5548.

Savin, K.W., Cocks, B.G., Wong, F., Sawbridge, T., Cogan, N., Savage, D., and Warner, S. (2010). A neurotropic herpesvirus infecting the gastropod, abalone, shares ancestry with oyster herpesvirus and a herpesvirus associated with the amphioxus genome. *Virol. J.* 7, 308.

Sayós, J., Nguyen, K.B., Wu, C., Stepp, S.E., Howie, D., Schatzle, J.D., Kumar, V., Biron, C.A., and Terhorst, C. (2000). Potential pathways for regulation of NK and T cell responses: differential X-linked lymphoproliferative syndrome gene product SAP interactions with SLAM and 2B4. *Int. Immunol.* 12, 1749–1757.

Scalzo, A.A., Fitzgerald, N.A., Simmons, A., La Vista, A.B., and Shellam, G.R. (1990). Cmv-1, a genetic locus that controls murine cytomegalovirus replication in the spleen. *J. Exp. Med.* 171, 1469–1483.

Scalzo, A.A., Fitzgerald, N.A., Wallace, C.R., Gibbons, A.E., Smart, Y.C., Burton, R.C., and Shellam, G.R. (1992). The effect of the Cmv-1 resistance gene, which is linked to the natural killer cell gene complex, is mediated by natural killer cells. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 149, 581–589.

Schaffer, M., Malmberg, K.-J., Ringdén, O., Ljunggren, H.-G., and Remberger, M. (2004). Increased infection-related mortality in KIR-ligand-mismatched unrelated allogeneic

hematopoietic stem-cell transplantation. *Transplantation* 78, 1081–1085.

Scharton, T.M., and Scott, P. (1993). Natural killer cells are a source of interferon gamma that drives differentiation of CD4⁺ T cell subsets and induces early resistance to *Leishmania major* in mice. *J. Exp. Med.* 178, 567–577.

Scharton-Kersten, T., and Scott, P. (1995). The role of the innate immune response in Th1 cell development following *Leishmania major* infection. *J. Leukoc. Biol.* 57, 515–522.

Schellekens, J., Gagne, K., and Marsh, S.G.E. (2014). Natural killer cells and killer-cell immunoglobulin-like receptor polymorphisms: their role in hematopoietic stem cell transplantation. *Methods Mol. Biol. Clifton NJ* 1109, 139–158.

Schlums, H., Cichocki, F., Tesi, B., Theorell, J., Beziat, V., Holmes, T.D., Han, H., Chiang, S.C.C., Foley, B., Mattsson, K., et al. (2015). Cytomegalovirus infection drives adaptive epigenetic diversification of NK cells with altered signaling and effector function. *Immunity* 42, 443–456.

Schmidt, S., Zimmermann, S.-Y., Tramsen, L., Koehl, U., and Lehrnbecher, T. (2013). Natural killer cells and antifungal host response. *Clin. Vaccine Immunol. CVI* 20, 452–458.

Schmolke, S., Kern, H.F., Drescher, P., Jahn, G., and Plachter, B. (1995). The dominant phosphoprotein pp65 (UL83) of human cytomegalovirus is dispensable for growth in cell culture. *J. Virol.* 69, 5959–5968.

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

Schuhmachers, G., Ariizumi, K., Mathew, P.A., Bennett, M., Kumar, V., and Takashima, A. (1995). 2B4, a new member of the immunoglobulin gene superfamily, is expressed on murine dendritic epidermal T cells and plays a functional role in their killing of skin tumors. *J. Invest. Dermatol.* 105, 592–596.

Scott, J.L., Dunn, S.M., Jin, B., Hillam, A.J., Walton, S., Berndt, M.C., Murray, A.W., Krissansen, G.W., and Burns, G.F. (1989). Characterization of a novel membrane glycoprotein involved in platelet activation. *J. Biol. Chem.* 264, 13475–13482.

Seaman, W.E., Sleisenger, M., Eriksson, E., and Koo, G.C. (1987). Depletion of natural killer cells in mice by monoclonal antibody to NK-1.1. Reduction in host defense against malignancy without loss of cellular or humoral immunity. *J. Immunol. Baltim. Md* 1950 138, 4539–4544.

Sester, U., Gärtner, B.C., Wilkens, H., Schwaab, B., Wössner, R., Kindermann, I., Girndt, M., Meyerhans, A., Mueller-Lantzsch, N., Schäfers, H.-J., et al. (2005). Differences in CMV-specific T-cell levels and long-term susceptibility to CMV infection after kidney, heart and lung transplantation. *Am. J. Transplant. Off. J. Am. Soc. Transplant. Am. Soc. Transpl. Surg.* 5, 1483–1489.

Shellam, G.R., Allan, J.E., Papadimitriou, J.M., and Bancroft, G.J. (1981). Increased susceptibility to cytomegalovirus infection in beige mutant mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 78, 5104–5108.

Shi, F.-D., Ljunggren, H.-G., La Cava, A., and Van Kaer, L. (2011). Organ-specific features of natural killer cells. *Nat. Rev. Immunol.* 11, 658–671.

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

Shibuya, K., Lanier, L.L., Phillips, J.H., Ochs, H.D., Shimizu, K., Nakayama, E., Nakauchi, H., and Shibuya, A. (1999). Physical and functional association of LFA-1 with DNAM-1 adhesion molecule. *Immunity* 11, 615–623.

Shibuya, K., Shirakawa, J., Kameyama, T., Honda, S.-I., Tahara-Hanaoka, S., Miyamoto, A., Onodera, M., Sumida, T., Nakauchi, H., Miyoshi, H., et al. (2003). CD226 (DNAM-1) is involved in lymphocyte function-associated antigen 1 costimulatory signal for naive T cell differentiation and proliferation. *J. Exp. Med.* 198, 1829–1839.

Shimamura, M. (2013). The Contribution of Cytomegalovirus to Atherosclerotic Events after Kidney Transplantation. *J. Infect. Dis.* jit065.

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

Siewiera, J., Costa, H. El, Tabiasco, J., Berrebi, A., Cartron, G., Bouteiller, P., and Jabrane-Ferrat, N. (2013). Human Cytomegalovirus Infection Elicits New Decidual Natural Killer Cell Effector Functions. *PLoS Pathog.* 9.

Sijmons, S., Van Ranst, M., and Maes, P. (2012). Recent advances in human cytomegalovirus genomics.

Sijmons, S., Van Ranst, M., and Maes, P. (2014a). Genomic and functional characteristics of human cytomegalovirus revealed by next-generation sequencing. *Viruses* 6, 1049–1072.

Sijmons, S., Thys, K., Corthout, M., Van Damme, E., Van Loock, M., Bollen, S., Baguet, S., Aerssens, J., Van Ranst, M., and Maes, P. (2014b). A method enabling high-throughput sequencing of human cytomegalovirus complete genomes from clinical isolates. *PloS One* 9, e95501.

Sijmons, S., Thys, K., Mbong Ngwese, M., Van Damme, E., Dvorak, J., Van Loock, M., Li, G., Tachezy, R., Busson, L., Aerssens, J., et al. (2015). High-throughput analysis of human cytomegalovirus genome diversity highlights the widespread occurrence of gene-disrupting mutations and pervasive recombination. *J. Virol.*

- Simhadri, V.R., Reiners, K.S., Hansen, H.P., Topolar, D., Simhadri, V.L., Nohroudi, K., Kufer, T.A., Engert, A., and Pogge von Strandmann, E. (2008). Dendritic cells release HLA-B-associated transcript-3 positive exosomes to regulate natural killer function. *PloS One* 3, e3377.
- Sinzger, C., Digel, M., and Jahn, G. (2008). Cytomegalovirus cell tropism. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 325, 63–83.
- Sissons, J.G.P., Carmichael, A.J., McKinney, N., Sinclair, J.H., and Wills, M.R. (2002). Human cytomegalovirus and immunopathology. *Springer Semin. Immunopathol.* 24, 169–185.
- Sivori, S., Parolini, S., Falco, M., Marcenaro, E., Biassoni, R., Bottino, C., Moretta, L., and Moretta, A. (2000). 2B4 functions as a co-receptor in human NK cell activation. *Eur. J. Immunol.* 30, 787–793.
- Sivori, S., Cantoni, C., Parolini, S., Marcenaro, E., Conte, R., Moretta, L., and Moretta, A. (2003). IL-21 induces both rapid maturation of human CD34⁺ cell precursors towards NK cells and acquisition of surface killer Ig-like receptors. *Eur. J. Immunol.* 33, 3439–3447.
- Sivori, S., Falco, M., Carlomagno, S., Romeo, E., Soldani, C., Bensussan, A., Viola, A., Moretta, L., and Moretta, A. (2010). A novel KIR-associated function: evidence that CpG DNA uptake and shuttling to early endosomes is mediated by KIR3DL2. *Blood* 116, 1637–1647.
- Sivori, S., Carlomagno, S., Pesce, S., Moretta, A., Vitale, M., and Marcenaro, E. (2014). TLR/NCR/KIR: Which One to Use and When? *Front. Immunol.* 5, 105.
- Slobedman, B., and Mocarski, E.S. (1999). Quantitative analysis of latent human cytomegalovirus. *J. Virol.* 73, 4806–4812.
- Smith, I.L., Cherrington, J.M., Jiles, R.E., Fuller, M.D., Freeman, W.R., and Spector, S.A. (1997). High-level resistance of cytomegalovirus to ganciclovir is associated with alterations in both the UL97 and DNA polymerase genes. *J. Infect. Dis.* 176, 69–77.
- Smith, P.D., Shimamura, M., Musgrove, L.C., Dennis, E.A., Bimczok, D., Novak, L., Ballestar, M., Fenton, A., Dandekar, S., Britt, W.J., et al. (2014). Cytomegalovirus Enhances Macrophage TLR Expression and MyD88-Mediated Signal Transduction To Potentiate Inducible Inflammatory Responses. *J. Immunol.* 1302608.
- Smith, W., Tomasec, P., Aicheler, R., Loewendorf, A., Nemčovičová, I., Wang, E.C.Y., Stanton, R.J., Macauley, M., Norris, P., Willen, L., et al. (2013). Human cytomegalovirus glycoprotein UL141 targets the TRAIL death receptors to thwart host innate antiviral defenses. *Cell Host Microbe* 13, 324–335.
- Snydman, D.R., Werner, B.G., Heinze-Lacey, B., Berardi, V.P., Tilney, N.L., Kirkman, R.L., Milford, E.L., Cho, S.I., Bush, H.L., and Levey, A.S. (1987). Use of cytomegalovirus immune globulin to prevent cytomegalovirus disease in renal-transplant recipients. *N. Engl. J. Med.*

317, 1049–1054.

Söderberg-Nauclér, C. (2006). Does cytomegalovirus play a causative role in the development of various inflammatory diseases and cancer? *J. Intern. Med.* 259, 219–246.

Söderberg-Nauclér, C., Streblow, D.N., Fish, K.N., Allan-Yorke, J., Smith, P.P., and Nelson, J.A. (2001). Reactivation of latent human cytomegalovirus in CD14(+) monocytes is differentiation dependent. *J. Virol.* 75, 7543–7554.

Sorocanu, L., Akhavan, A., and Cobbs, C.S. (2008). Platelet-derived growth factor- α receptor activation is required for human cytomegalovirus infection. *Nature* 455, 391–395.

Spaete, R.R., and Mocarski, E.S. (1985). The alpha sequence of the cytomegalovirus genome functions as a cleavage/packaging signal for herpes simplex virus defective genomes. *J. Virol.* 54, 817–824.

Spits, H., and Di Santo, J.P. (2011). The expanding family of innate lymphoid cells: regulators and effectors of immunity and tissue remodeling. *Nat. Immunol.* 12, 21–27.

Stanton, R., Westmoreland, D., Fox, J.D., Davison, A.J., and Wilkinson, G.W.G. (2005). Stability of human cytomegalovirus genotypes in persistently infected renal transplant recipients. *J. Med. Virol.* 75, 42–46.

Staras, S.A.S., Dollard, S.C., Radford, K.W., Flanders, W.D., Pass, R.F., and Cannon, M.J. (2006). Seroprevalence of cytomegalovirus infection in the United States, 1988-1994. *Clin. Infect. Dis. Off. Publ. Infect. Dis. Soc. Am.* 43, 1143–1151.

Stegmann, K.A., Björkström, N.K., Veber, H., Ciesek, S., Riese, P., Wiegand, J., Hadem, J., Suneetha, P.V., Jaroszewicz, J., Wang, C., et al. (2010). Interferon- α -induced TRAIL on natural killer cells is associated with control of hepatitis C virus infection. *Gastroenterology* 138, 1885–1897.

Stern-Ginossar, N., Weisburd, B., Michalski, A., Le, V.T.K., Hein, M.Y., Huang, S.-X., Ma, M., Shen, B., Qian, S.-B., Hengel, H., et al. (2012). Decoding human cytomegalovirus. *Science* 338, 1088–1093.

Stinski, M.F., and Meier, J.L. (2007). Immediate–early viral gene regulation and function. In *Human Herpesviruses: Biology, Therapy, and Immunoprophylaxis*, A. Arvin, G. Campadelli-Fiume, E. Mocarski, P.S. Moore, B. Roizman, R. Whitley, and K. Yamanishi, eds. (Cambridge: Cambridge University Press),.

Streblow, D.N., Dumortier, J., Moses, A.V., Orloff, S.L., and Nelson, J.A. (2008). Mechanisms of cytomegalovirus-accelerated vascular disease: induction of paracrine factors that promote angiogenesis and wound healing. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 325, 397–415.

Strindhall, J., Skog, M., Ernerudh, J., Bengner, M., Löfgren, S., Matussek, A., Nilsson, B.O., and Wikby, A. (2012). The inverted CD4/CD8 ratio and associated parameters in 66-year-old individuals: the Swedish HEXA immune study. *AGE* 35, 985–991.

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

Sylwester, A.W., Mitchell, B.L., Edgar, J.B., Taormina, C., Pelte, C., Ruchti, F., Sleath, P.R., Grabstein, K.H., Hosken, N.A., Kern, F., et al. (2005). Broadly targeted human cytomegalovirus-specific CD4⁺ and CD8⁺ T cells dominate the memory compartments of exposed subjects. *J. Exp. Med.* 202, 673–685.

Tahara-Hanaoka, S., Shibuya, K., Onoda, Y., Zhang, H., Yamazaki, S., Miyamoto, A., Honda, S.-I., Lanier, L.L., and Shibuya, A. (2004). Functional characterization of DNAM-1 (CD226) interaction with its ligands PVR (CD155) and nectin-2 (PRR-2/CD112). *Int. Immunol.* 16, 533–538.

Talmadge, J.E., Meyers, K.M., Prieur, D.J., and Starkey, J.R. (1980). Role of natural killer cells in tumor growth and metastasis: C57BL/6 normal and beige mice. *J. Natl. Cancer Inst.* 65, 929–935.

Tandon, R., and Mocarski, E.S. (2008). Control of cytoplasmic maturation events by cytomegalovirus tegument protein pp150. *J. Virol.* 82, 9433–9444.

Tandon, R., and Mocarski, E.S. (2012). Viral and host control of cytomegalovirus maturation. *Trends Microbiol.* 20, 392–401.

Tangye, S.G., Phillips, J.H., Lanier, L.L., and Nichols, K.E. (2000). Functional requirement for SAP in 2B4-mediated activation of human natural killer cells as revealed by the X-linked lymphoproliferative syndrome. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 165, 2932–2936.

Tarek, N., Le Luduec, J.-B., Gallagher, M.M., Zheng, J., Venstrom, J.M., Chamberlain, E., Modak, S., Heller, G., Dupont, B., Cheung, N.-K.V., et al. (2012). Unlicensed NK cells target neuroblastoma following anti-GD2 antibody treatment. *J. Clin. Invest.* 122, 3260–3270.

Tarr, P.E. (1996). Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and the immune system. *Med. Oncol. Northwood Lond. Engl.* 13, 133–140.

Terhune, S.S., Schröer, J., and Shenk, T. (2004). RNAs are packaged into human cytomegalovirus virions in proportion to their intracellular concentration. *J. Virol.* 78, 10390–10398.

Tirabassi, R.S., and Ploegh, H.L. (2002). The human cytomegalovirus US8 glycoprotein binds to major histocompatibility complex class I products. *J. Virol.* 76, 6832–6835.

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

Tomazin, R., Boname, J., Hegde, N.R., Lewinsohn, D.M., Altschuler, Y., Jones, T.R., Cresswell, P., Nelson, J.A., Riddell, S.R., and Johnson, D.C. (1999). Cytomegalovirus US2

destroys two components of the MHC class II pathway, preventing recognition by CD4⁺ T cells. *Nat. Med.* 5, 1039–1043.

Tomtishen, J.P. (2012). Human cytomegalovirus tegument proteins (pp65, pp71, pp150, pp28). *Viol. J.* 9, 22.

Torok-Storb, B., Boeckh, M., Hoy, C., Leisenring, W., Myerson, D., and Gooley, T. (1997). Association of specific cytomegalovirus genotypes with death from myelosuppression after marrow transplantation. *Blood* 90, 2097–2102.

Tsujimura, K., Obata, Y., Matsudaira, Y., Nishida, K., Akatsuka, Y., Ito, Y., Demachi-Okamura, A., Kuzushima, K., and Takahashi, T. (2006). Characterization of murine CD160⁺ CD8⁺ T lymphocytes. *Immunol. Lett.* 106, 48–56.

Tu, T.C., Brown, N.K., Kim, T.-J., Wroblewska, J., Yang, X., Guo, X., Lee, S.H., Kumar, V., Lee, K.-M., and Fu, Y.-X. (2015). CD160 is essential for NK-mediated IFN- γ production. *J. Exp. Med.* 212, 415–429.

Tu, W., Chen, S., Sharp, M., Dekker, C., Manganello, A.M., Tongson, E.C., Maecker, H.T., Holmes, T.H., Wang, Z., Kemble, G., et al. (2004). Persistent and Selective Deficiency of CD4⁺ T Cell Immunity to Cytomegalovirus in Immunocompetent Young Children. *J. Immunol.* 172, 3260–3267.

Uhrberg, M., Valiante, N.M., Shum, B.P., Shilling, H.G., Lienert-Weidenbach, K., Corliss, B., Tyan, D., Lanier, L.L., and Parham, P. (1997). Human Diversity in Killer Cell Inhibitory Receptor Genes. *Immunity* 7, 753–763.

Uhrberg, M., Valiante, N.M., Young, N.T., Lanier, L.L., Phillips, J.H., and Parham, P. (2001). 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* 166, 3923–3932.

Vacca, P., Moretta, L., Moretta, A., and Mingari, M.C. (2011a). Origin, phenotype and function of human natural killer cells in pregnancy. *Trends Immunol.* 32, 517–523.

Vacca, P., Vitale, C., Montaldo, E., Conte, R., Cantoni, C., Fulcheri, E., Darretta, V., Moretta, L., and Mingari, M.C. (2011b). CD34⁺ hematopoietic precursors are present in human decidua and differentiate into natural killer cells upon interaction with stromal cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 108, 2402–2407.

del Val, M., Hengel, H., Häcker, H., Hartlaub, U., Ruppert, T., Lucin, P., and Koszinowski, U.H. (1992). Cytomegalovirus prevents antigen presentation by blocking the transport of peptide-loaded major histocompatibility complex class I molecules into the medial-Golgi compartment. *J. Exp. Med.* 176, 729–738.

Valés-Gómez, M., Reyburn, H.T., Erskine, R.A., López-Botet, M., and Strominger, J.L. (1999). Kinetics and peptide dependency of the binding of the inhibitory NK receptor CD94/NKG2-A and the activating receptor CD94/NKG2-C to HLA-E. *EMBO J.* 18, 4250–

Valés-Gómez, M., Shiroishi, M., Maenaka, K., and Reyburn, H.T. (2005). Genetic variability of the major histocompatibility complex class I homologue encoded by human cytomegalovirus leads to differential binding to the inhibitory receptor ILT2. *J. Virol.* 79, 2251–2260.

Valiante, N.M., and Trinchieri, G. (1993). Identification of a novel signal transduction surface molecule on human cytotoxic lymphocytes. *J. Exp. Med.* 178, 1397–1406.

Vankayalapati, R., Wizel, B., Weis, S.E., Safi, H., Lakey, D.L., Mandelboim, O., Samten, B., Porgador, A., and Barnes, P.F. (2002). The NKp46 receptor contributes to NK cell lysis of mononuclear phagocytes infected with an intracellular bacterium. *J. Immunol. Baltim. Md* 1950 168, 3451–3457.

Vankayalapati, R., Garg, A., Porgador, A., Griffith, D.E., Klucar, P., Safi, H., Girard, W.M., Cosman, D., Spies, T., and Barnes, P.F. (2005). Role of NK cell-activating receptors and their ligands in the lysis of mononuclear phagocytes infected with an intracellular bacterium. *J. Immunol. Baltim. Md* 1950 175, 4611–4617.

Vantourout, P., and Hayday, A. (2013). Six-of-the-best: unique contributions of $\gamma\delta$ T cells to immunology. *Nat. Rev. Immunol.* 13, 88–100.

Varnum, S.M., Streblow, D.N., Monroe, M.E., Smith, P., Auberry, K.J., Pasa-Tolic, L., Wang, D., Camp, D.G., Rodland, K., Wiley, S., et al. (2004). Identification of proteins in human cytomegalovirus (HCMV) particles: the HCMV proteome. *J. Virol.* 78, 10960–10966.

Vermijlen, D., Brouwer, M., Donner, C., Liesnard, C., Tackoen, M., Van Rysselberge, M., Twité, N., Goldman, M., Marchant, A., and Willems, F. (2010). Human cytomegalovirus elicits fetal gammadelta T cell responses in utero. *J. Exp. Med.* 207, 807–821.

Villegas, F.R., Coca, S., Villarrubia, V.G., Jiménez, R., Chillón, M.J., Jareño, J., Zuñil, M., and Callol, L. (2002). Prognostic significance of tumor infiltrating natural killer cells subset CD57 in patients with squamous cell lung cancer. *Lung Cancer Amst. Neth.* 35, 23–28.

Vitale, M., Falco, M., Castriconi, R., Parolini, S., Zambello, R., Semenzato, G., Biassoni, R., Bottino, C., Moretta, L., and Moretta, A. (2001). Identification of NKp80, a novel triggering molecule expressed by human NK cells. *Eur. J. Immunol.* 31, 233–242.

Vitale, M., Chiesa, M.D., Carlomagno, S., Romagnani, C., Thiel, A., Moretta, L., and Moretta, A. (2004). The small subset of CD56^{bright}CD16[–] natural killer cells is selectively responsible for both cell proliferation and interferon- γ production upon interaction with dendritic cells. *Eur. J. Immunol.* 34, 1715–1722.

Vitale, M., Chiesa, M., Della, Carlomagno, S., Pende, D., Aricò, M., Moretta, L., and Moretta, A. (2005). NK-dependent DC maturation is mediated by TNF α and IFN γ released upon engagement of the NKp30 triggering receptor. *Blood* 106, 566–571.

Vivier, E., Raulet, D.H., Moretta, A., Caligiuri, M.A., Zitvogel, L., Lanier, L.L., Yokoyama, W.M., and Ugolini, S. (2011). Innate or adaptive immunity? The example of natural killer cells. *Science* 331, 44–49.

Vosshenrich, C.A.J., García-Ojeda, M.E., Samson-Villéger, S.I., Pasqualetto, V., Enault, L., Richard-Le Goff, O., Corcuff, E., Guy-Grand, D., Rocha, B., Cumano, A., et al. (2006). A thymic pathway of mouse natural killer cell development characterized by expression of GATA-3 and CD127. *Nat. Immunol.* 7, 1217–1224.

Walch, M., Dotiwala, F., Mulik, S., Thiery, J., Kirchhausen, T., Clayberger, C., Krensky, A.M., Martinvalet, D., and Lieberman, J. (2014). Cytotoxic cells kill intracellular bacteria through granulysin-mediated delivery of granzymes. *Cell* 157, 1309–1323.

Walzer, T., Dalod, M., Robbins, S.H., Zitvogel, L., and Vivier, E. (2005). Natural-killer cells and dendritic cells: “l’union fait la force.” *Blood* 106, 2252–2258.

Walzer, T., Bléry, M., Chaix, J., Fuseri, N., Chasson, L., Robbins, S.H., Jaeger, S., André, P., Gauthier, L., Daniel, L., et al. (2007). Identification, activation, and selective in vivo ablation of mouse NK cells via NKp46. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 104, 3384–3389.

Wang, D., and Fu, T.-M. (2014). Progress on human cytomegalovirus vaccines for prevention of congenital infection and disease. *Curr. Opin. Virol.* 6, 13–23.

Wang, X., Huong, S.-M., Chiu, M.L., Raab-Traub, N., and Huang, E.-S. (2003). Epidermal growth factor receptor is a cellular receptor for human cytomegalovirus. *Nature* 424, 456–461.

Welte, S., Kuttruff, S., Waldhauer, I., and Steinle, A. (2006). Mutual activation of natural killer cells and monocytes mediated by NKp80-AICL interaction. *Nat. Immunol.* 7, 1334–1342.

White, E.A., and Spector, D.H. (2007). Early viral gene expression and function. In *Human Herpesviruses: Biology, Therapy, and Immunoprophylaxis*, A. Arvin, G. Campadelli-Fiume, E. Mocarski, P.S. Moore, B. Roizman, R. Whitley, and K. Yamanishi, eds. (Cambridge: Cambridge University Press),.

Wiesner, M., Zentz, C., Hammer, M.H., Cobbold, M., Kern, F., Kolb, H.-J., Hammerschmidt, W., Zeidler, R., and Moosmann, A. (2005). Selection of CMV-specific CD8⁺ and CD4⁺ T cells by mini-EBV-transformed B cell lines. *Eur. J. Immunol.* 35, 2110–2121.

Wikby, A., Ferguson, F., Forsey, R., Thompson, J., Strindhall, J., Löfgren, S., Nilsson, B.-O., Ernerudh, J., Pawelec, G., and Johansson, B. (2005). An immune risk phenotype, cognitive impairment, and survival in very late life: impact of allostatic load in Swedish octogenarian and nonagenarian humans. *J. Gerontol. A. Biol. Sci. Med. Sci.* 60, 556–565.

Wilczyński, J.R. (2006). Immunological analogy between allograft rejection, recurrent abortion and pre-eclampsia - the same basic mechanism? *Hum. Immunol.* 67, 492–511.

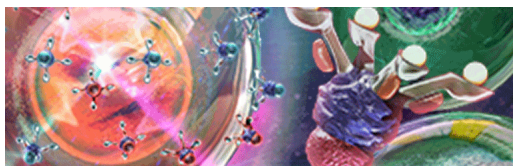
- Willcox, B.E., Thomas, L.M., and Bjorkman, P.J. (2003). Crystal structure of HLA-A2 bound to LIR-1, a host and viral major histocompatibility complex receptor. *Nat. Immunol.* *4*, 913–919.
- Wilson, J.L., Heffler, L.C., Charo, J., Scheynius, A., Bejarano, M.T., and Ljunggren, H.G. (1999). Targeting of human dendritic cells by autologous NK cells. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *163*, 6365–6370.
- Wu, J., Song, Y., Bakker, A.B., Bauer, S., Spies, T., Lanier, L.L., and Phillips, J.H. (1999). An activating immunoreceptor complex formed by NKG2D and DAP10. *Science* *285*, 730–732.
- Wujcicka, W., Paradowska, E., Studzińska, M., Gaj, Z., Wilczyński, J., Leśnikowski, Z., and Nowakowska, D. (2015). TLR9 2848 GA heterozygotic status possibly predisposes fetuses and newborns to congenital infection with human cytomegalovirus. *PloS One* *10*, e0122831.
- Xiong, S., Sharkey, A.M., Kennedy, P.R., Gardner, L., Farrell, L.E., Chazara, O., Bauer, J., Hiby, S.E., Colucci, F., and Moffett, A. (2013). Maternal uterine NK cell-activating receptor KIR2DS1 enhances placentation. *J. Clin. Invest.* *123*, 4264–4272.
- Yabuhara, A., Yang, F.C., Nakazawa, T., Iwasaki, Y., Mori, T., Koike, K., Kawai, H., and Komiyama, A. (1996). A killing defect of natural killer cells as an underlying immunologic abnormality in childhood systemic lupus erythematosus. *J. Rheumatol.* *23*, 171–177.
- Yawata, M., Yawata, N., Draghi, M., Partheniou, F., Little, A.-M., and Parham, P. (2008). MHC class I-specific inhibitory receptors and their ligands structure diverse human NK-cell repertoires toward a balance of missing self-response. *Blood* *112*, 2369–2380.
- Yokoyama, W.M., and Plougastel, B.F.M. (2003). Immune functions encoded by the natural killer gene complex. *Nat. Rev. Immunol.* *3*, 304–316.
- Yokoyama, S., Staunton, D., Fisher, R., Amiot, M., Fortin, J.J., and Thorley-Lawson, D.A. (1991). Expression of the Blast-1 activation/adhesion molecule and its identification as CD48. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *146*, 2192–2200.
- Yu, G., Xu, X., Vu, M.D., Kilpatrick, E.D., and Li, X.C. (2006). NK cells promote transplant tolerance by killing donor antigen-presenting cells. *J. Exp. Med.* *203*, 1851–1858.
- Yu, J., Freud, A.G., and Caligiuri, M.A. (2013). Location and cellular stages of natural killer cell development. *Trends Immunol.* *34*, 573–582.
- Yusa, S., Catina, T.L., and Campbell, K.S. (2002). SHP-1- and phosphotyrosine-independent inhibitory signaling by a killer cell Ig-like receptor cytoplasmic domain in human NK cells. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *168*, 5047–5057.
- Zhang, T., Scott, J.M., Hwang, I., and Kim, S. (2013). Cutting edge: antibody-dependent memory-like NK cells distinguished by FcR γ deficiency. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *190*, 1402–1406.

Zhang, Y., Wallace, D.L., de Lara, C.M., Ghattas, H., Asquith, B., Worth, A., Griffin, G.E., Taylor, G.P., Tough, D.F., Beverley, P.C.L., et al. (2007). In vivo kinetics of human natural killer cells: the effects of ageing and acute and chronic viral infection. *Immunology* 121, 258–265.

Zimmer, J., Donato, L., Hanau, D., Cazenave, J.P., Tongio, M.M., Moretta, A., and de la Salle, H. (1998). Activity and phenotype of natural killer cells in peptide transporter (TAP)-deficient patients (type I bare lymphocyte syndrome). *J. Exp. Med.* 187, 117–122.

ANNEXE

Certains articles mentionnés au cours de ce mémoire sont présentés en annexe afin de contribuer à la compréhension des travaux abordés. Le premier article publié dans *The Journal of Immunology* en 2013 décrit le modèle de co-culture, développé dans notre laboratoire, des cellules NK avec des DC dont le but était d'évaluer la mobilisation des sous-populations NK face aux DC infectées par le CMV (Djaoud *et al.*, 2013). Les deux articles suivants sont issus du laboratoire du Pr Marc Van Ranst et ont été cités à plusieurs reprises au cours de la description du projet n°3 de ce manuscrit. Ces publications abordent l'exploitation des données génomiques après séquençage par NGS de souches cliniques du CMV, à l'issue du protocole d'amplification et d'extraction de l'ADN viral (Sijmons *et al.*, 2014, 2015). Le quatrième article, auquel j'ai pu contribuer, provient de notre laboratoire et décrit le phénotype et les capacités fonctionnelles des cellules NK de sang de cordon par comparaison aux cellules NK adultes. Ce travail a fait l'objet d'une publication dans *The Journal of Leukocyte Biology* en 2016.



Flex-T™ MHC Tetramers

The most advanced technology
to find unique T cells



This information is current as
of September 5, 2016.

Amplified NKG2C⁺ NK Cells in Cytomegalovirus (CMV) Infection Preferentially Express Killer Cell Ig-like Receptor 2DL: Functional Impact in Controlling CMV-Infected Dendritic Cells

Zakia Djaoud, Gaëlle David, Céline Bressollette, Catherine Willem, Pauline Rettman, Katia Gagne, Nolwenn Legrand, Souad Mehlal, Anne Cesbron, Berthe-Marie Imbert-Marcille and Christelle Retière

J Immunol 2013; 191:2708-2716; Prepublished online 5
August 2013;

doi: 10.4049/jimmunol.1301138

<http://www.jimmunol.org/content/191/5/2708>

References This article **cites 47 articles**, 19 of which you can access for free at:
<http://www.jimmunol.org/content/191/5/2708.full#ref-list-1>

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

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

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



Amplified NKG2C⁺ NK Cells in Cytomegalovirus (CMV) Infection Preferentially Express Killer Cell Ig-like Receptor 2DL: Functional Impact in Controlling CMV-Infected Dendritic Cells

Zakia Djaoud,* Gaëlle David,* Céline Bressollette,[†] Catherine Willem,* Pauline Rettman,* Katia Gagne,*^{‡,§} Nolwenn Legrand,* Souad Mehlal,* Anne Cesbron,*^{‡,§} Berthe-Marie Imbert-Marcille,[†] and Christelle Retière*

CMV infection represents a major complication in hematopoietic stem cell transplantation, which compromises graft outcome. Downregulation of HLA class I expression is one mechanism by which CMV evades T cell-mediated immune detection, rendering infected cells vulnerable to killer cell Ig-like receptor (KIR)⁺ NK cells. In this study, we observed that the amplified NKG2C⁺ NK cell population observed specifically in CMV seropositive individuals mainly expressed KIR2DL receptors. We have shown that HLA class I expression was downregulated on CMV-infected immature dendritic cells (iDCs), which escape to HLA-A2-pp65-specific T lymphocytes but strongly trigger the degranulation of KIR2D⁺ NK cells. CMV infection conferred a vulnerability of C2C2⁺ iDCs to educated KIR2DL1⁺ and KIR2DL3⁺ NK cell subsets. Alloreactivity of KIR2DL1⁺ NK cell subsets against C1C1⁺ iDCs was maintained independently of CMV infection. Unexpectedly, CMV-infected C1C1⁺ iDCs did not activate KIR2DL3⁺ NK cell reactivity, suggesting a potential CMV evasion to KIR2DL3 NK cell recognition. Altogether, the coexpression of KIR and NKG2C on expanded NK cell subsets could be related to a functional contribution of KIR in CMV infection and should be investigated in hematopoietic stem cell transplantation, in which the beneficial impact of CMV infection has been reported on the graft-versus-leukemia effect. *The Journal of Immunology*, 2013, 191: 2708–2716.

Human CMV is a β -herpesvirus that establishes a latent infection in healthy individuals but causes a high rate of morbidity in immunocompromised patients and during fetal development. For an effective defense against CMV, both innate and adaptive immune responses are involved (1). Thanks to different inhibitory receptors, NK cells are able to detect the loss of HLA class I molecules from autologous cells, a situation that can occur when cells are perturbed by viral infection or tumor transformation (the “missing self” hypothesis) (2). Indeed, NK cells express different inhibitory receptors for self-HLA class I molecules, including CD94/NKG2A, killer cell Ig-like receptors (KIRs) and ILT2 (LILRB1). The CD94/NKG2A receptor recognizes leader peptides of most HLA-A, -B, -C, and -G molecules presented by the

HLA-E molecule (3). Nevertheless, inhibitory KIRs display a more specific recognition of different HLA class I ligands. For example, HLA-C allotypes with asparagine at position 80 (C1 ligands) are recognized by KIR2DL2/3 whereas HLA-C allotypes with lysine at position 80 (C2 ligands) are recognized by KIR2DL1 (4). Additionally, ILT2 recognizes all HLA class I molecules. Moreover, the interaction between HLA class I molecules and inhibitory receptors is essential in NK cell acquisition of self-tolerance and functional abilities (5).

Soon after infection, different viral proteins downregulate HLA class I molecule expression on infected cells, leading to escape from CMV-specific T lymphocytes, but they render these infected cells vulnerable to NK cell lysis (6). Furthermore, CMV may also escape NK surveillance by maintaining the expression of nonclassical HLA class I molecules, HLA-E and HLA-G, serving as ligands for the inhibitory receptors CD94/NKG2A and ILT2 (7). Recently it has been shown that expansion of NK cells expressing the activating NKG2C counterpart is associated with CMV infection (8–12). Furthermore, CMV has developed different strategies to prevent the expression of ligands for some activating NK cell receptors (13, 14). However, no document discusses the involvement of KIR NK cells in controlling CMV infection or the potential CMV evasion to KIR NK cells. The hypothesis of a prospective role of KIR NK cells in controlling CMV is reinforced by the knowledge gained from the murine model. In fact, Ly49 receptors, analogous to KIR receptors, are mainly engaged to control murine CMV infections (15).

In allogeneic hematopoietic stem cell transplantation (HSCT), CMV infections are considered a major complication, which may compromise graft outcome. After transplantation, lymphoid T cell reconstitution is delayed, resulting in reactivation of latent viral

*Etablissement Français du Sang–Pays de la Loire, EA4271, Immunovirologie et Polymorphisme Génétique, 44011 Nantes Cedex 01, France; [†]Université de Nantes, EA4271, 44000 Nantes, France; [‡]LabEx Transplantex; and [§]Human Leukocyte Antigen Laboratory, Etablissement Français du Sang, Nantes, 44011 Nantes Cedex 01, France

Received for publication April 29, 2013. Accepted for publication June 30, 2013.

This work was supported by the Etablissement Français du Sang–Pays de la Loire and by grants from the International Research Group on Hematopoietic Cell Transplantation, the Agence de la BioMédecine, the Etablissement Français du Sang 2010-06, and Nantes Atlantique Greffe de Moelle Osseuse. Z.D. is a Ph.D. student supported by Conventions Industrielles de Formation par la Recherche Grant 447/2011. P.R. is a Ph.D. student supported by Etablissement Français du Sang/Région des Pays de la Loire/Nantes University.

Address correspondence and reprint requests to Dr. Christelle Retière, Etablissement Français du Sang–Pays de la Loire, EA4271, Immunovirologie et Polymorphisme Génétique, 34 Boulevard Jean Monnet, 44011 Nantes Cedex 01, France. E-mail: christelle.retiere@efs.sante.fr

Abbreviations used in this article: HSCT, hematopoietic stem cell transplantation; iDC, immature dendritic cell; KIR, killer cell Ig-like receptor; SSP, sequence-specific primer.

Copyright © 2013 by The American Association of Immunologists, Inc. 0022-1767/13/\$16.00

infections such as CMV. However, NK cells that rapidly reconstitute hematopoiesis and play a crucial role in mediating the graft-versus-leukemia (GVL) effect constitute the first line of defense against viral infection. In HLA haploidentical HSCT, NK cell alloreactivity is due to the presence in the donor of NK cells expressing KIR that recognize HLA class I allotypes present in the donor but absent in the recipient (16). KIR genotypic studies have revealed the beneficial effect of activating KIR genes against CMV infection or reactivation in different graft contexts (16–18). During acute CMV infection, NKG2C⁺ NK cells expand in HSCT recipients and predominately express KIR (9). However, the contribution of NKG2C in eliminating CMV-infected cells via NK cells has not been demonstrated. It is possible that NKG2C mainly constitutes a CMV infection marker. Thus, the coexpression of NKG2C with KIR on this expanded NK cell population questions the functional KIR contribution to CMV infection control. Moreover, although a recent report suggests the beneficial impact of early CMV infection on the GVL effect in HSCT (19), whether CMV modulates KIR NK cell alloreactivity in an HSCT context has not been investigated. Thus, to address these questions, we have set up a cell culture model based on a CMV-infected immature monocyte-derived dendritic cells (iDCs) as target cells, taking into account the HLA environment, to investigate not only the functional contribution of KIR NK cell subsets in controlling CMV infection but also the impact of CMV in modulating KIR NK cell alloreactivity.

Materials and Methods

PBMCs and cell lines

PBMCs were isolated from citrate-phosphate-dextrose blood from healthy adult volunteers by gradient centrifugation on Ficoll-Hypaque (Lymphoprep; Axis-Shield, Oslo, Norway). All blood donors were recruited at the Blood Transfusion Center (Etablissement Français du Sang, Nantes, France) and informed consent was obtained from all individuals. CMV serological status was determined using the chemiluminescent immunoassay LIAISON CMV IgG II (DiaSorin). EBV-B cell lines were obtained by EBV transformation of peripheral B cells using EBV supernatant harvested from the cell line B95-8 (American Type Culture Collection). B cells were isolated from PBMCs obtained from healthy individuals. The HLA class I-deficient acute myeloid leukemia K562 cell line was used to determine the degranulation potential of NK cells. K562 cells and EBV-B lymphocytes were cultured in RPMI 1640 medium (Life Technologies, Paisley, U.K.) containing glutamine (Life Technologies) and penicillin-streptomycin (Life Technologies) and supplemented with 10% FBS (Life Technologies). *Mycoplasma* tests performed by PCR were negative for all cell lines.

HLA and KIR genotyping

Genomic DNA was extracted from PBMCs using a classical salting-out method (20). HLA-A, -B, and -Cw genes were typed via molecular techniques using PCR-sequence-specific primer (SSP) kit from GenoVision (Olerup SSP HLA-A, -B, and -Cw, BioNoBis, Montfort l'Amaury, France) under the conditions recommended by the manufacturer. KIR genes were typed via molecular techniques using PCR-SSP methods under the conditions recommended by the manufacturers, as described previously (21, 22).

Isolation of monocyte and generation of iDCs

Monocytes were separated from lymphocytes by using a high-density hyperosmotic Percoll density gradient (Sigma-Aldrich) (23) and cultured for 6 d in RPMI 1640 medium (Life Technologies) containing glutamine (Life Technologies), penicillin-streptomycin (Life Technologies), and supplemented with 10% human AB serum (Life Technologies), IL-5 (200 U/ml; CellGenix), and GM-CSF (1000 U/ml; CellGenix).

NK cell isolation and amplification

PBMCs were isolated as previously described (24, 25). Thereafter, NK cells were amplified after *in vitro* stimulation with irradiated C1⁺ and C2⁺ allogeneic PBMCs and EBV-B cells used as feeders following the

PBMC/EBV-B cell ratio at 10:1. All amplified KIR2D NK cells were NKG2C negative.

Isolation and amplification of CMV-specific T cell lymphocytes

CMV-specific T lymphocytes were sorted from HLA-A2⁺ CMV seropositive blood donors using anti-CD3-PerCP (SK7; BD Biosciences) and HLA-A*02:01-pp65 (NLVPMVATV) (tetramer-allophycocyanin, obtained after tetramerization of HLA-A2-pp65 monomer [plateforme Structure Fédérative de Recherche François Bonamy, Nantes, France] with allophycocyanin-streptavidin [AnaSpec]). Sorted cells were stimulated with irradiated feeder cells (allogeneic PBMCs and a mix of two irradiated EBV-B cell lines) and 1 µg/ml PHA-P (L-7132; Sigma-Aldrich). After 2 wk, specific stimulation using pp65 (1 mg/ml)-loaded autologous EBV-B cells (E:T ratio of 10:1) was performed. pp65-Specific lymphocyte amplification was monitored by flow cytometry using HLA-A2-pp65-PE pentamer (Proimmune, Oxford, U.K.).

CMV preparation and infection of iDCs

Stock suspensions of CMV strain VHL/E (provided by the Prof. James Waldman, Columbus, OH) were produced as previously described (26). Of note, the full genomic sequence of VHL/E is not available and thus its genetic content has not been established. Infectivity titration of the virus was performed on iDCs. After overnight coculture of iDCs alone or with VHL/E, cells were washed and resuspended in RPMI 1640, 10% FBS.

Phenotypic analysis by flow cytometry

The NK cell surface phenotype was determined by three- or four-color flow cytometry using the following mouse anti-human mAbs: anti-KIR2DL1-FITC (143211; R&D Systems), anti-KIR2DL2/2DL3/2DS2-PE (GL183; Beckman Coulter), anti-KIR2DL1/2/3/2DS1/2-FITC (1A6) (27), anti-NKp46-allophycocyanin (9E2; Becton Dickinson), anti-NKG2C-PE (134591; R&D Systems), anti-NKG2A (Z199; Beckman Coulter), anti-CD3-PerCP (SK7; BD Biosciences), anti-CD56-allophycocyanin (B159; BD Biosciences), anti-NKG2D (ID11; BD Biosciences), anti-NKp30 (Z25; Beckman Coulter), and anti-NKp44 (Z231; Beckman Coulter). iDCs were stained with the following mouse anti-human mAbs: anti-HLA-A, -B, -C (F41-IE3H1D2; EFS), anti-HLA-C (L31; MediaPharma), anti-HLA-E-PE (3D12; Miltenyi Biotec), anti-CD40-PE (5C3; BD Biosciences), anti-CD80-PE (L307.4; BD Biosciences), anti-CD83-allophycocyanin (HB15e; BD Biosciences), anti-CD86-PE (2331; BD Biosciences), anti-HLA-A, -B, -C-AF⁶⁴⁷ (F41-IE3H1D2; EFS), anti-MICA/B-PE (6D4; BD Biosciences), and isotype-matched controls (IgG1 from BD Pharmingen, IgG2a from R&D Systems). Thereafter, iDCs were washed, fixed, and permeabilized for a staining with major immediate-early IE-1 protein-specific mAb (8B1.2; Millipore), which was conjugated to FITC (Sigma-Aldrich) (28).

CD107a mobilization assay detected by flow cytometry

PBMCs and NK cells were preincubated with anti-CD107a (H4A3; BD Biosciences). NK cell degranulation was assessed after incubation for 5 h alone (negative control), with K562 cells, or with uninfected or CMV-infected allogeneic iDCs (E:T ratio of 10:1). Cell surface staining was performed using the following mouse anti-human mAbs: anti-KIR2DL1/2/3/2DS1/2-FITC (27), anti-NKG2C-PE (134591; R&D Systems), anti-NKp46-allophycocyanin (9E2; Becton Dickinson), anti-KIR2DL1-FITC (143211; R&D Systems), anti-KIR2DL2/3/2DS2-PE (GL183; Beckman Coulter, Immunotech), and NKG2A-FITC or -PE (Z199; Beckman Coulter). HLA-C, HLA-E, and KIR2D neutralization were performed using anti-HLA class I (W6/32; R&D Systems), anti-HLA-E (3D12; BioLegend), and anti-KIR2DL1/2/3/2DS2 (8C11) (27) mAbs, respectively. All flow cytometry data were collected using a FACSCalibur (BD Biosciences) and analyzed using FlowJo 7.6.1 software (Tree Star).

Statistical analyses

Comparisons of NK cell frequencies between two different series of individuals were performed using ANOVA test. A *p* value of <0.05 was considered to be statistically significant.

Results

Preferential expression of KIR2DL on amplified NKG2C⁺ NK cells in CMV seropositive individuals

Recently, some studies have shown that a variable expansion of NK cell subsets coexpressing NKG2C and KIR are associated with CMV infection (8–11). We therefore assessed the expression of KIR and NKG2C to determine what NK cell subsets are mainly

observed in CMV seropositive individuals ($n = 31$) compared with seronegative individuals ($n = 29$) (Fig. 1). By four-color flow cytometry, three different NK cell subsets were defined on the basis of NKG2C and KIR2D expression (NKG2C⁺KIR2D⁻, NKG2C⁺KIR2D⁺, and NKG2C⁻KIR2D⁺) using a KIR2DL1/L2/L3/2DS1/S2-specific mAb (1A6) (27) and NKG2C-specific mAb in CMV⁻ versus CMV⁺ individuals (Fig. 1A). In agreement with previous reports, the frequencies of NKG2C⁺ and NKG2C⁺KIR2D⁺ NK cells are significantly higher in CMV seropositive than seronegative individuals ($p = 0.004$ and $p = 0.005$, respectively) (Fig. 1B). NKG2C⁺ NK cells did not express NKG2A and preferentially expressed CD57 (data not shown), as previously described in HSCT recipients and immunocompetent CMV seropositive individuals (9). Interestingly, expansion of the NKG2C⁺KIR2D⁺ NK cell population in CMV seropositive individuals is associated to the AA KIR genotype (Fig. 1C), although the probability is not significant ($p = 0.08$), which is confirmed by preferential expression of inhibitory KIR on the NKG2C⁺ NK cell subset (Fig. 1D). Indeed, of the 12 individuals with an NKG2C⁺KIR2D⁺ NK cell frequency superior to the mean value (6.8%), 11 are KIR2DL3 genotyped and coexpressed KIR2DL3 and NKG2C⁺ whatever the HLA background (2 C2C2, 4 C1C1, and 5 C1C2 individuals) (Fig. 1D). However, only one individual (C1C2) coexpressed KIR2DL1 with KIR2DL3 and NKG2C (Fig. 1D). In B⁺ KIR genotyped individuals, activating KIR2DS2 was coexpressed on NKG2C⁺ cells in one KIR2DL3⁻KIR2DL2/S2⁺ C2C2 genotyped individual

(data not shown). KIR2DS1 expression was evaluated using the combination of KIR2DL1/2DL2/2DL3/2DS2-specific 8C11 and KIR2DL1/S1-specific EB6 mAbs in 2 KIR2DS1 genotyped individuals, and no KIR2DS1 expression was observed on expanded NKG2C⁺ NK cells. Of note, all three KIR3DS1 genotyped individuals expressed KIR3DS1 on the expanded KIR2DL3⁺NKG2C⁺ NK cell subset. KIR3DL1 was coexpressed with NKG2C⁺ and KIR2DL3⁺ in 5 of 10 individuals expressing KIR3DL1 (data not shown).

Downregulation of HLA class I molecule expression on CMV-infected iDCs

It has been previously reported that monocyte-derived DCs are susceptible to in vitro CMV infection by the endothelial cell-adapted strain VHL/E (29). Thus, after 48 h of CMV infection, iDCs were stained with an mAb specific for the CMV major immediate-early IE-1 protein (Fig. 2A). Based on the percentage of IE-1⁺ cells, 50% of values from 20 independent experiments are comprised between first quartile (Q1 = 39.5%) and the third quartile (Q3 = 56%) around a median of 48% (Fig. 2B). Interestingly, HLA ligands of NK receptors as HLA class I and especially HLA-C molecules (ligands of KIR2DL) were downregulated on CMV-infected iDCs. In the same line, the nonclassical HLA-E molecule (ligand of CD94/NKG2A or CD94/NKG2C), weakly expressed on iDCs, was downregulated on CMV-infected iDCs (Fig. 2C). As previously described, CMV infection does not induce maturation of iDCs (30).

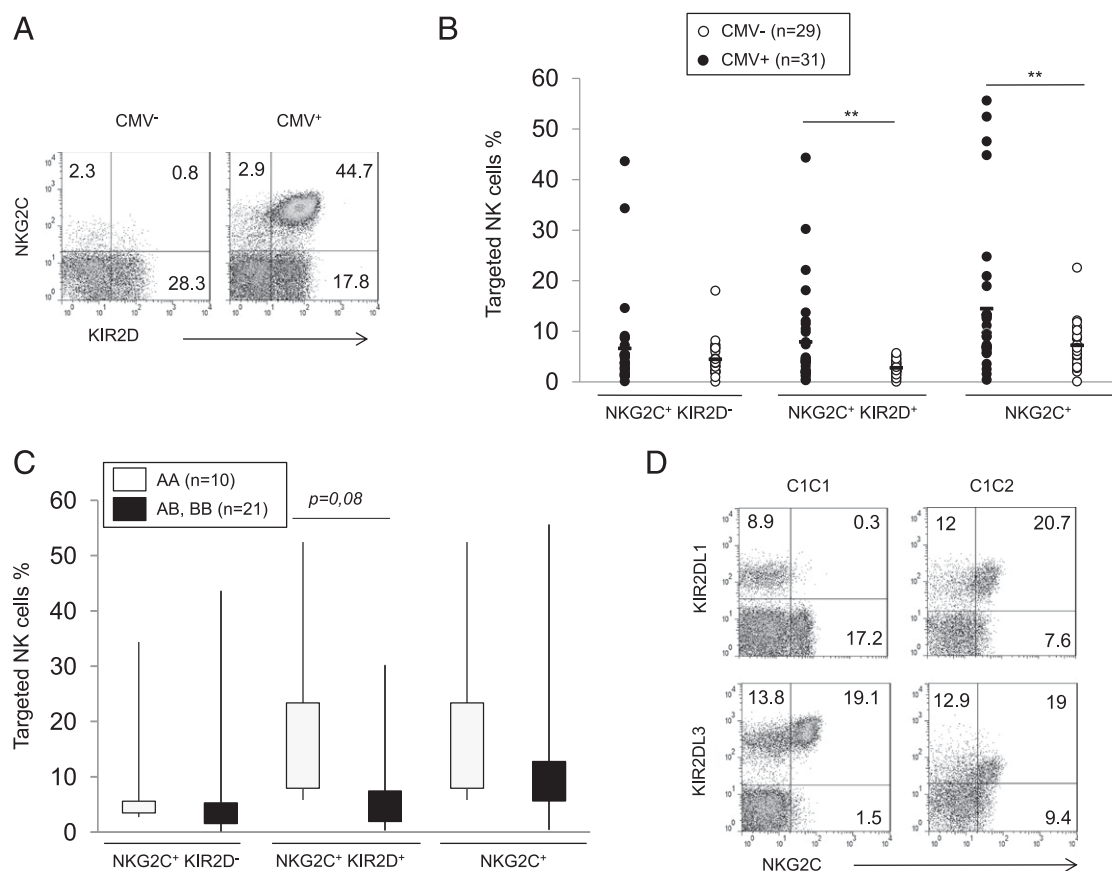


FIGURE 1. Preferential expression of KIR2DL on amplified NKG2C⁺ NK cells in human CMV seropositive individuals. **(A)** Representative density plots illustrating NK cell phenotype from CMV⁻ and CMV⁺ individuals. NK cells were stained with anti-CD56, anti-NKG2C, and anti-KIR2DL1/L2/L3/2DS1/S2 (1A6) mAbs. **(B)** Scatter plots displaying the NKG2C⁺KIR2D⁻, NKG2C⁺KIR2D⁺, and NKG2C⁻ NK cell frequencies from CMV⁻ ($n = 29$) and CMV⁺ ($n = 31$) individuals. **(C)** Summary box and whisker plot showing the frequency of NKG2C⁺KIR2D⁻, NKG2C⁺KIR2D⁺, and NKG2C⁻ NK cells from CMV⁺ AA KIR genotyped ($n = 10$) and AB and BB KIR genotyped ($n = 21$) individuals. **(D)** Representative density plots of four C1C1 and one C1C2 CMV⁺ individuals. KIR2DL3⁺NKG2C⁺ and KIR2DL1⁺NKG2C⁺ NK cells are targeted with anti-NKG2C and GL183 and with anti-NKG2C and EB6, respectively. Statistical significance (** $p < 0.01$) between both groups was determined using an ANOVA test.

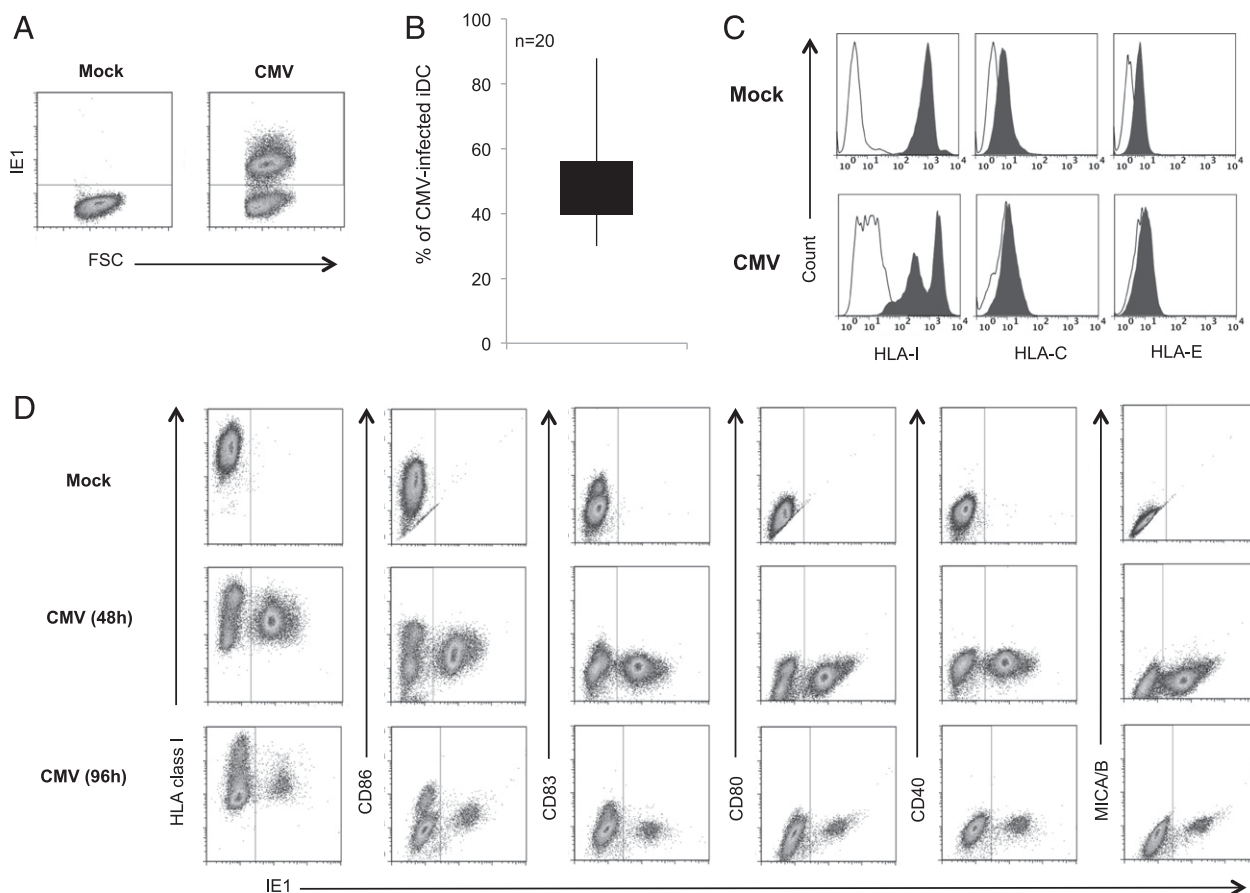


FIGURE 2. Downregulation of HLA class I molecule expression on CMV-infected iDCs. iDCs were generated from monocytes in the presence of GM-CSF and IL-4. On day 6 of the culture, they were infected with the endotheliotropic VHL/E CMV strain. Cell surface phenotype of CMV-infected iDCs was performed at 48 h postinfection by three-color flow cytometry. CMV-infected and noninfected iDCs were discriminated using FITC-conjugated IE1-specific mAb. **(A)** Representative density plots of noninfected and CMV-infected iDCs. **(B)** Summary box and whisker plot showing the frequency of IE1⁺ iDCs for 20 experiments performed. **(C)** Forty-eight hours postinfection, iDCs were surface labeled with specific mAbs for HLA class I, HLA-C, and HLA-E (open histograms represent isotype control, and filled histograms, specific staining). Results of a representative experiment of four performed are shown (50% IE1⁺ cells). **(D)** Representative density plots of flow cytometry analysis of mock-infected iDCs and CMV-infected iDC phenotype using HLA class I, CD86, CD83, CD80, CD40, and MICA/B-specific mAbs.

However, the expression of CD86 decreased on CMV-infected iDCs compared with uninfected iDCs (Fig. 2C, 2D). Moreover, the uninfected iDC subset in CMV-treated cultures present two levels of expression of HLA class I, that is, CD86 and CD83 molecules. Similar results were obtained at 96 h after infection (Fig. 2D). This could be explained by binding of viral products or soluble factors. Experiments were performed with UV-inactivated virus in the same conditions to confirm that the productive CMV infection of iDCs is necessary to modulate the biology of CMV-treated iDCs (data not shown).

CMV-infected iDCs escape to HLA-A2-pp65-specific CD8⁺ T cell recognition but activate NK cell degranulation

Consistent with previous reports indicating that several viral proteins inhibit HLA class I expression on CMV-infected cells to escape to T lymphocyte response, we further evaluate our in vitro model in assessing the CD107a mobilization of HLA-A2-pp65-specific T lymphocytes against CMV-infected iDCs versus uninfected iDCs. HLA-A2-pp65-specific T lymphocytes, targeted using HLA-A2-pp65 pentamer (Fig. 3A), reacted against pp65-loaded HLA-A2⁺ iDCs, but not against uninfected HLA-A2⁺ iDCs and CMV-infected HLA-A2⁺ iDCs (Fig. 3B). This result obtained in our cellular model is consistent with the ability of CMV to escape to T lymphocyte response by inhibiting HLA class I expression on

iDCs. We therefore investigated NK cell ability to recognize decreased expression of HLA class I molecules on CMV-infected iDCs by focusing on NKp46⁺ NK cells (Fig. 3C). Interestingly, NK cells reacted against CMV-infected iDCs almost as well as against an HLA class I-deficient K562 cell line, used as a positive control of degranulation, as illustrated for one individual (Fig. 3D) and confirmed for six individuals with a significant probability ($p = 0.01$) (Fig. 3E).

KIRs are required for a robust response against allogeneic CMV-infected iDCs

It has been reported that KIRs are required on NKG2C⁺ NK cells for a strong production of IFN- γ (9). Nevertheless, the role of KIRs in triggering NK cell degranulation is undocumented. To investigate the functional reactivity of NKG2C⁺KIR2D⁻, NKG2C⁻KIR2D⁺, and NKG2C⁺KIR2D⁺ NK cell subsets (Fig. 4A) against allogeneic CMV-infected iDCs, degranulation assays were carried out with PBMCs from CMV⁺ individuals ($n = 6$) stimulated overnight with IL-2 (Fig. 4B). As seen previously, PBMCs were incubated alone or in the presence of K562 cells, mock-infected iDCs, or CMV-infected iDCs (E:T ratio = 10:1). All of these NK cell populations reacted significantly against CMV-infected iDCs ($p = 0.02$ for NKG2C⁺KIR2D⁻ NK cells, $p = 0.0006$ for NKG2C⁻KIR2D⁺ NK cells, and $p = 3.5 \times 10^{-5}$ for NKG2C⁺KIR2D⁺ NK

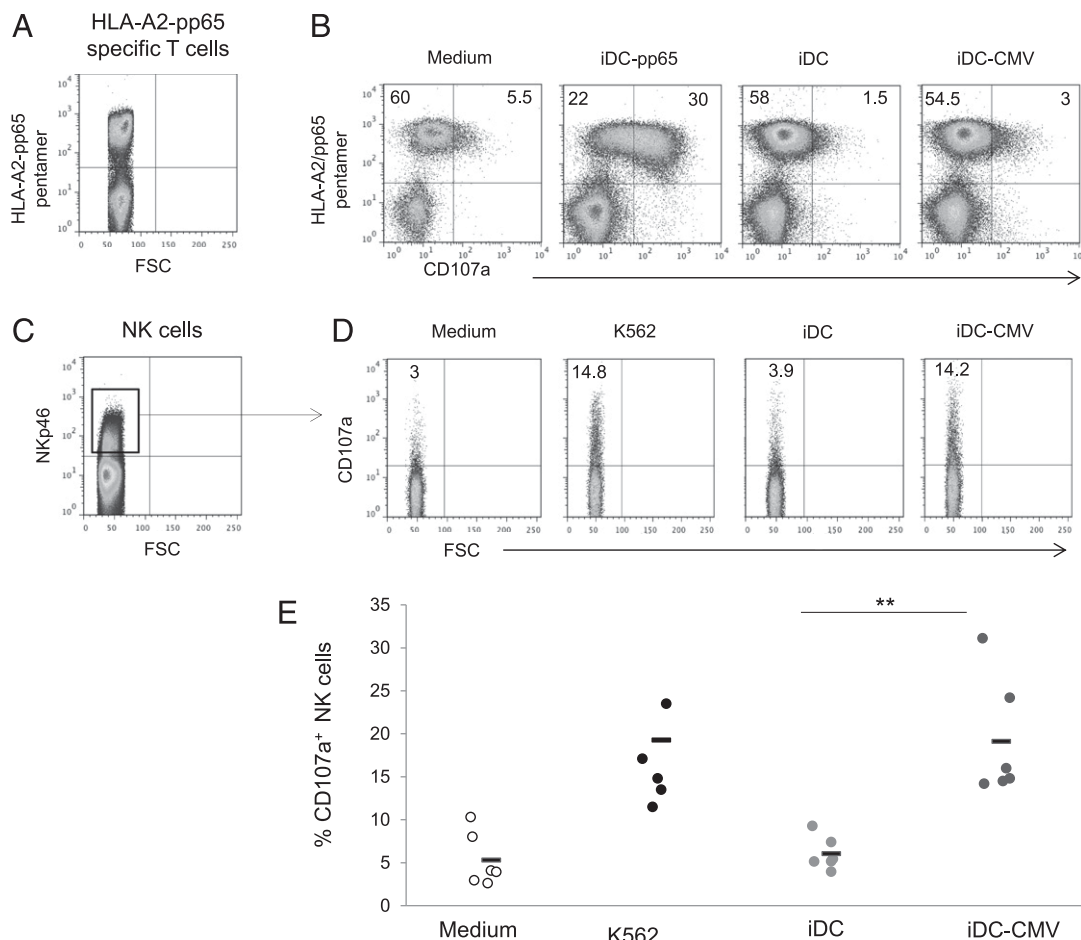


FIGURE 3. CMV-infected iDCs escape to HLA-A2-pp65-specific CD8⁺ T cell recognition but activate NK cell degranulation. **(A)** HLA-A2-pp65-specific T cells were cell sorted and amplified in vitro from CMV seropositive individuals and targeted as CD3⁺HLA-A2-pp65-pentamer⁺. **(B)** After 2 wk of stimulation, these cells were phenotyped by flow cytometry and were incubated for 5 h alone or in the presence of mock-infected, pp65-loaded, or human CMV-infected allogeneic iDC HLA-A2⁺ at an E:T ratio of 10:1. Results of CD107a mobilization obtained for a representative experiment of three performed are shown. Percentages of CD107a⁺ HLA-A2-pp65-specific T cells observed by flow cytometry are indicated on the density plots for all conditions of stimulation. **(C)** NK cells are targeted as NKp46⁺ cells. **(D)** PBMCs stimulated overnight with IL-2 were incubated for 5 h alone or in the presence of K562 cells as positive control or mock- or CMV-infected allogeneic iDCs at an E:T ratio of 10:1. Surface CD107a expression on NKp46⁺ cells was analyzed by flow cytometry. Representative density plots from six experiments are shown. The percentage of CD107a⁺ NK cells is indicated on each density plot. **(E)** Dot representation displaying the percentage of CD107a⁺ NK cells from all six experiments. Statistical significance (**p < 0.01) between both groups was determined using an ANOVA test.

cells). However, NK cells bearing KIR2D receptors (NKG2C⁺KIR2D⁺ and NKG2C⁺KIR2D⁻ NK cell subsets) reacted more robustly than did NKG2C⁺KIR2D⁻ NK cells. Indeed, when KIR2D receptors were neutralized with anti-KIR2DL1/2/3/2DS2 mAb, NKG2C⁺KIR2D⁺ NK cell degranulation against CMV-infected iDCs was decreased by half (Fig. 4C). Otherwise, because NKG2C⁺ NK cells are mostly NKG2A⁻ (Fig. 4C), we neutralized HLA-E molecules with anti-HLA-E mAb to assess the impact of NKG2C on NK cell degranulation against CMV-infected iDCs. The NKG2C⁺KIR2D⁺ NK cell degranulation was slightly decreased in this blocking condition (Fig. 4C). These results suggest a predominant impact of KIR2DL in triggering NK cell response against CMV-infected iDCs. Based on our results showing a decreased expression of HLA class I molecules on CMV-infected iDCs and the expansion of NKG2C⁺KIR2D⁺ NK cell subsets in CMV infection, we hypothesized that the absence of inhibitory KIR engagement with the cognate ligand and the activating NKG2C engagement with HLA-E on human CMV-infected iDCs might both contribute to drive the expansion process.

C1C1 but not C2C2 allogeneic iDCs activate KIR2DL1⁺ NK cell degranulation following the self-missing model

To determine the nature of KIR2DL receptors involved in the NK cell response to CMV-infected iDCs, we first focused on NK cell subsets expressing well-characterized inhibitory KIR2DL1, which recognizes HLA-C molecules of C2 group. KIR2DL1⁺ NK cells were sorted from KIR2DS1⁻ genotyped C2⁺ individuals and amplified following polyclonal stimulation. The phenotype (KIR2DL, NKG2A, NKp44, NKp30, and NKG2D) of the studied NK cell lines was stable following culture alone or coculture with iDCs or CMV-infected iDCs for 5 h. All selected and amplified NK cells did not express the inhibitory receptor ILT2 (data not shown). However, most amplified NK cells expressed the NKG2A marker (Fig. 5A). Thus, NKG2A expression on KIR2D NK cells may inhibit NK cell response and override the signal mediated by KIR2D receptors. We therefore assessed the function of KIR2DL1⁺KIR2DL2/3/S2⁻NKG2A⁻ NK cells. We showed that the degranulation of C2⁺ educated KIR2DL1⁺ NK cells, controlled with K562, is strongly induced in contact to C1C1 allogeneic iDCs (p = 0.002) but not in contact to C2C2 allogeneic iDCs (Fig. 5B). These results

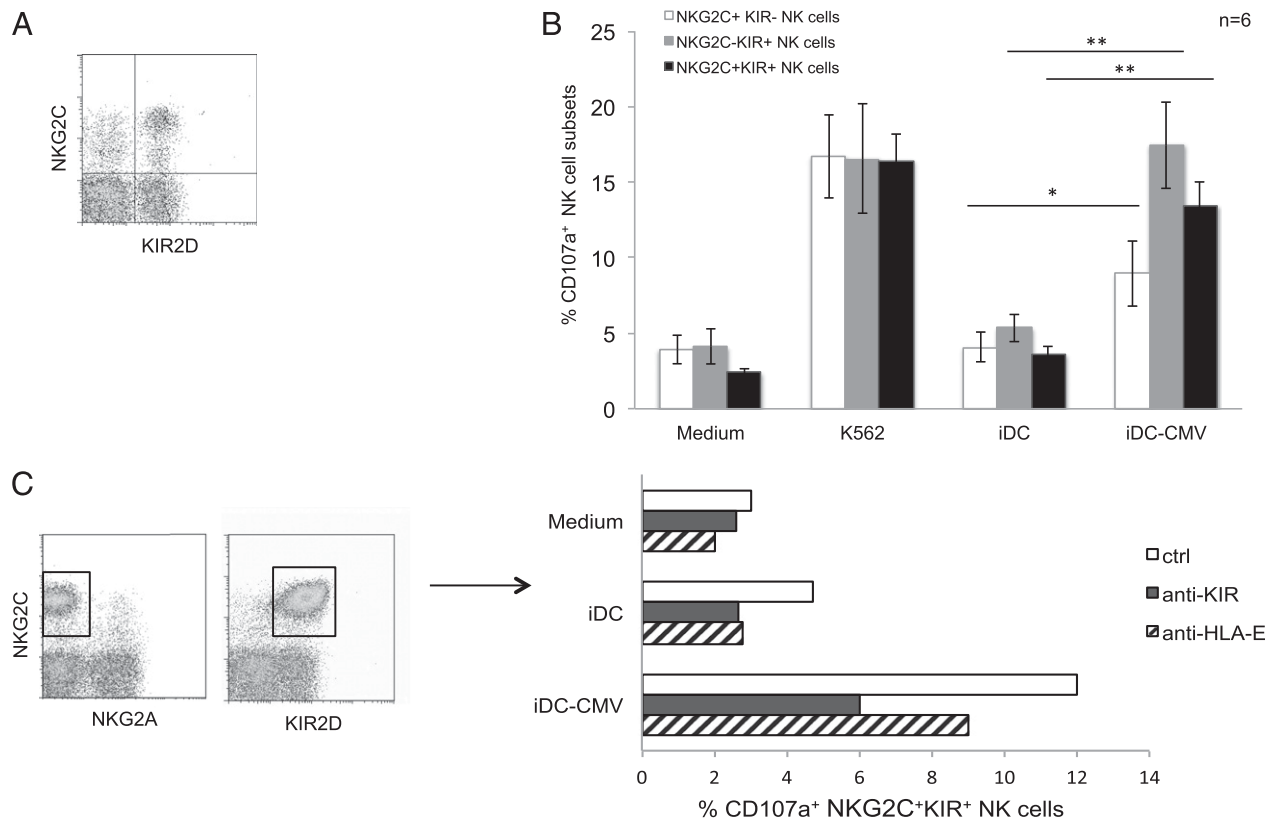


FIGURE 4. NKG2C⁺ NK cells increased in CMV seropositive individuals require KIR2D for a robust degranulation against allogeneic CMV-infected iDCs. Degranulation assays were carried out with PBMCs from CMV⁺ individuals ($n = 6$) stimulated overnight with IL-2. CD107a expression on Nkp46⁺ cells was analyzed by flow cytometry after incubation of PBMCs alone or in the presence of K562 cells or mock-infected or CMV-infected iDCs for 5 h at an E:T ratio of 10:1. (A) Representative density plot illustrating NKG2C KIR2D NK cell phenotype from CMV⁺ individual. (B) Bars indicate the mean of CD107a⁺ NK cell percentages for all NKG2C⁺KIR2D⁻, NKG2C⁻KIR2D⁺, and NKG2C⁺KIR2D⁺ NK cell subsets observed in all culture conditions: medium, K562 cells, mock-infected, or CMV-infected allogeneic iDCs $\pm$ SD. (C) Degranulation assays were performed on an NKG2C⁺KIR2D⁺NKG2A⁻ gated NK cell population. Results of CD107a mobilization obtained for a representative experiment of three performed were presented after culture alone (medium) or stimulation with iDCs or CMV-infected iDCs. Bars indicate CD107a⁺NKG2C⁺KIR2D⁺ NK cell percentage observed by flow cytometry. KIR2D receptors were blocked with 8C11 mAb and isotype control. HLA-E molecules expressed on iDCs were blocked with 3D12 mAb and isotype control. Statistical significance ($*p < 0.05$, $**p < 0.01$) between both groups was determined using an ANOVA test.

validated our in vitro model to explore the impact of CMV infection of iDCs on KIR⁺ NK cell degranulation.

CMV infection of C2C2 iDCs triggers alloreactivity of C2⁺KIR2DL1⁺ NK cells

CMV infection of C2C2⁺ iDCs activated significantly KIR2DL1⁺ NK cell degranulation ($p = 0.0003$) (Fig. 5C). This result suggests that HLA class I downregulation in CMV-infected C2C2⁺ iDCs was sufficient to trigger KIR2DL1⁺ NK cell cytotoxicity. To confirm this point, we evaluated CMV infection of C1C1⁺ iDCs on KIR2DL1⁺ NK cell degranulation. Indeed, when KIR2DL1⁺ NK cells were incubated in the presence of CMV-treated C1C1⁺ iDCs, the frequency of CD107a⁺KIR2DL1⁺ NK cells was high and similar to that observed in the presence of mock-infected C1C1⁺ iDCs (Fig. 5C). The activation of KIR2DL1⁺ NK cell degranulation with only CMV-infected C2C2⁺ iDCs but not CMV-infected C1C1⁺ iDCs supports the hypothesis that the protective KIR2DL1/C2 interaction is directly targeted. Furthermore, we investigated the function of unlicensed C1C1⁺KIR2DL1⁺ NK cells in controlling CMV infection, taking into account published works on mice indicating that “unlicensed” NK cells dominate the response to murine CMV infection (31). However, the degranulation of C1C1⁺KIR2DL1⁺ NK cells, which is low against the standard HLA class I-deficient K562 cell line, was not triggered against C1C1⁺ iDCs infected or not with CMV (data not shown). Taken together, these results

support the functional contribution of C2⁺KIR2DL1⁺ NK cells in response to CMV-infected iDCs.

KIR2DL3⁺ NK cells respond to CMV-infected allogeneic C2C2⁺ iDCs but not to CMV-infected allogeneic C1C1 iDCs

Additionally, we investigated the role of KIR2DL3⁺ NK cells in the response to CMV-infected allogeneic iDCs. KIR2DL3⁺ NK cells were sorted and in vitro amplified from KIR2DS1⁻/L2⁻/S2⁻ genotyped C1C1⁺ individuals (Fig. 5D). Fifteen days after stimulation, we foremost assessed the degranulation of KIR2DL3⁺KIR2DL1⁻/L2/S2⁻NKG2A⁻ NK cells against allogeneic iDCs. Both C1C1⁺ and C2C2⁺ iDCs inhibited KIR2DL3⁺ NK cell degranulation (Fig. 5E). Indeed, when HLA-C molecules were neutralized with anti-HLA class I mAb, C2C2⁺ iDC-mediated KIR2DL3⁺ NK cell degranulation was partially restored, showing the functional interaction of KIR2DL3 with C2 ligand (Fig. 5G). These results are in accordance with recently reported data showing that KIR2DL3 could recognize not only the expected group of HLA-C molecules belonging to the C1 group, but also those belonging to C2 group (32–34). To determine whether the decreased HLA class I expression on CMV-infected iDCs impacts the KIR2DL3⁺ NK cell function, degranulation of the KIR2DL3⁺ NK cell subset against CMV-infected iDCs has been evaluated. CMV infection of C2C2⁺ iDCs activated significantly KIR2DL3⁺ NK cell degranulation ($p = 0.01$) (Fig. 5F). This result may imply that HLA class I

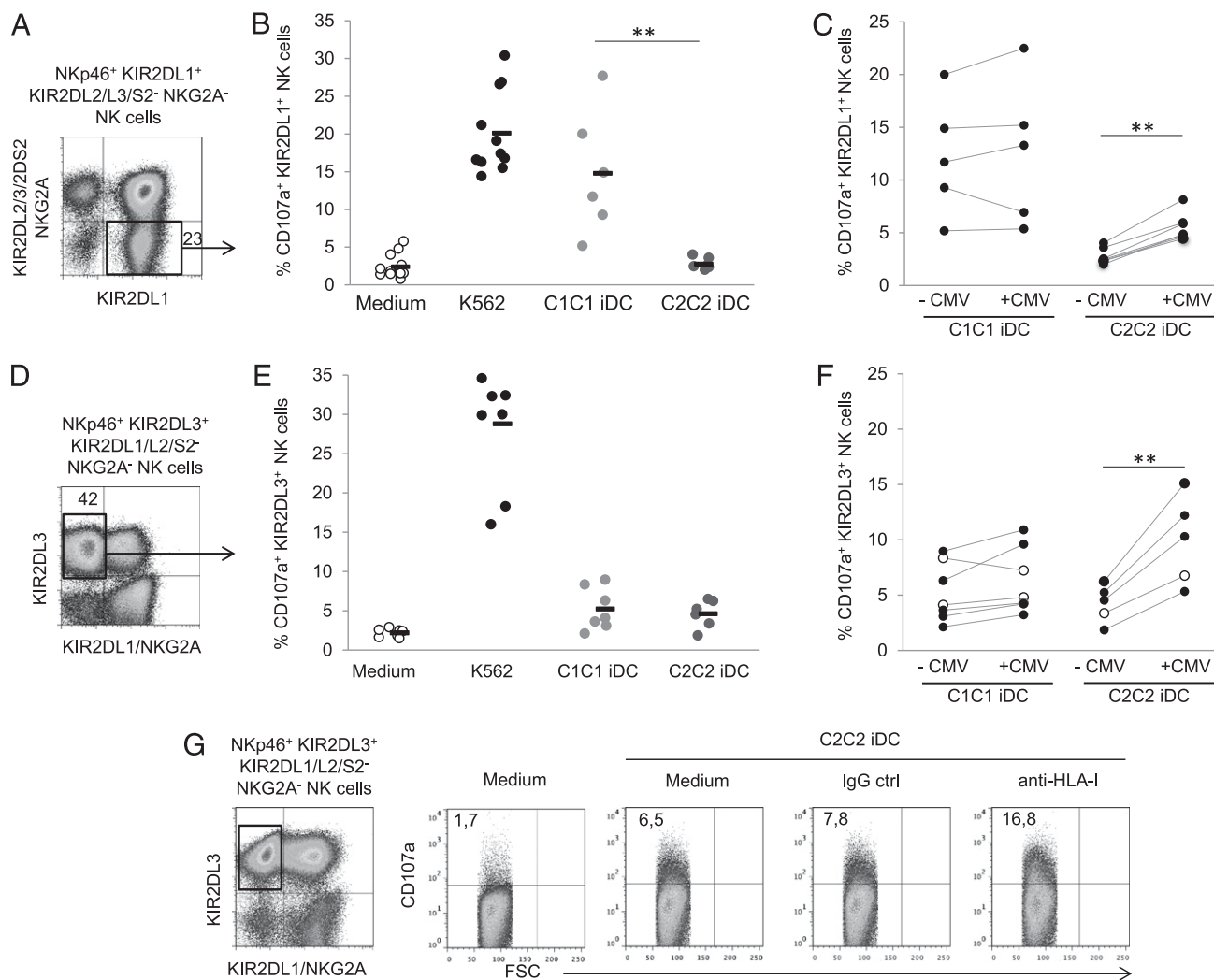


FIGURE 5. CMV-infected allogeneic C2C2⁺ iDCs activate KIR2DL1⁺ and KIR2DL3⁺ NK cell subsets. Mobilization assay has been performed on sorted and in vitro–amplified KIR2DL1⁺ NK cells from C2⁺ individuals and KIR2DL3⁺ NK cells from C1⁺ individuals. **(A)** Representative density plot illustrating the phenotype of targeted KIR2DL1⁺ NK cells in functional assay, assessed by flow cytometry using a combination of KIR2DL1-specific mAbs and a mix of KIR2DL2/3/2DS2 and NKG2A-specific mAbs. The cells were isolated from negative KIR2DS1 genotyped individuals. **(B)** Dot representation displaying the percentage of CD107a⁺KIR2DL1⁺ NK cells in all culture conditions: medium ($n = 13$), K562 cells ($n = 13$), C1C1⁺ iDCs ($n = 6$), and C2C2⁺ iDC ($n = 7$) at an E:T ratio of 10:1. **(C)** Dot representation displaying the percentage of CD107a⁺KIR2DL1⁺ NK cells in the presence of mock- or CMV-infected C1C1⁺ iDCs ($n = 6$) or C2C2⁺ iDCs ($n = 7$) at an E:T ratio of 10:1. KIR2DL1⁺ NK cells were isolated from CMV⁻ individuals. **(D)** Representative density plot illustrating the phenotype of targeted KIR2DL3⁺ NK cells in functional assay, assessed by flow cytometry using a combination of KIR2DL3-specific mAbs and a mix of KIR2DL1/S1 and NKG2A-specific mAbs. The cells were isolated from negative KIR2DL2/S2 genotyped individuals. **(E)** Dot representation displaying the percentage of CD107a⁺KIR2DL3⁺ NK cells in all culture conditions: medium ($n = 7$), K562 cells ($n = 7$), C1C1⁺ iDCs ($n = 7$), and with C2C2⁺ iDCs ($n = 6$). **(F)** Dot representation displaying the percentage of CD107a⁺KIR2DL3⁺ NK cells in the presence of mock- or CMV-infected C1C1⁺ iDCs ($n = 7$) or C2C2⁺ iDCs ($n = 5$). KIR2DL3⁺ NK cells isolated from CMV⁻ and CMV⁺ individuals are indicated by black and white circles, respectively. **(G)** Representative density plots of three experiments performed displaying the percentage of CD107a⁺KIR2DL3⁺ NK cells after coculture with C2C2⁺ iDCs. Target cells were incubated with blocking HLA class I mAb at a concentration of 10 μ g/ml for 30 min or IgG control, prior to coculture with NK cells. Statistical significance (** $p \leq 0.01$) between both groups was determined using an ANOVA test.

downregulation on CMV-infected C2C2⁺ iDCs is sufficient to trigger KIR2DL3⁺ NK cell reactivity. However, CMV infection of C1C1⁺ iDCs did not activate KIR2DL3⁺ NK cell degranulation (Fig. 5F). These findings support the functional contribution of KIR2DL3⁺ NK cells in response to CMV infection of C2C2⁺ iDCs, but they suggest a potential evasion of CMV to KIR2DL3⁺ NK cell control of C1C1⁺ target cells.

Discussion

Recent studies have reported the expansion of NKG2C⁺ NK cells expressing self-specific inhibitory KIR (8–10) in CMV infection. Our data provide evidence that inhibitory KIR2DL3 is preferentially coexpressed with NKG2C on amplified NK cells in CMV

seropositive individuals whatever the HLA-C background, and even KIR2DL3 seems to recognize the HLA-C ligand from the C1 and C2 groups with a lower affinity to C2 ligands (32). Our results are in agreement with a previous report revealing the expansion of NKG2C⁺KIR2DL2/2DS2/2DL3⁺ NK cells in a T⁺B⁺NK⁺ SCID patient with a CMV infection representing 80% of NK cells (35). In contrast to Charoudeh et al. (12) who reported a specific expansion of NK cells expressing the inhibitory receptors KIR2DL1 and KIR2DL3 in response to in vitro exposure to CMV, we observed preferential KIR2DL3 coexpression on NKG2C⁺ NK cells but seldom KIR2DL1 coexpression. Similarly, we observed mainly inhibitory KIRs coexpressed on NKG2C⁺ NK cells. Additionally, our phenotypic study showed a frequent coexpression of KIR3DL1

or KIR3DS1 on NKG2C⁺ KIR2DL3⁺ NK cells in CMV seropositive individuals, whatever the Bw4 environment. Thus, the predominant expression of KIR2DL3 suggests a driven clonal-like expansion of KIR2DL3⁺NKG2C⁺ NK cells during CMV infection that can coexpress another KIR as KIR3DL1 or KIR3DS1, as previously described for Ly49H⁺ NK cells in mice challenged with murine CMV (36). Moreover, numerous hypotheses regarding HIV-1 infection (37) and recent data (12) suggest a potential impact of KIR3DL1/S1 in controlling CMV infection. The role of KIR3DL1/S1 engagement in CMV infection should be investigated to answer this point.

We showed that NK cells bearing KIR2D receptors react more robustly than do KIR2D[−]NKG2C⁺ NK cells. Indeed, KIR2D⁺ NK cell subsets degranulated and secreted INF- γ (data not shown) more than did the KIR2D[−]NKG2C⁺ NK cell subset in response to CMV-infected iDCs. Our results are in accordance with previous results showing that KIRs are required for robust INF- γ production (9). As previously described (38), degranulation of C2⁺ educated KIR2DL1⁺ NK cells is strongly induced in contact to allogeneic C1C1⁺ iDCs but not in contact to C2C2⁺ iDCs. We demonstrated that infection of C2C2⁺ iDCs with CMV significantly enhances KIR2DL1⁺ NK cell degranulation. Thus, HLA class I downregulation observed on CMV-infected iDCs seems sufficient to activate KIR2DL1⁺ NK cells. Interestingly, KIR2DL1⁺ NK cell alloreactivity against C1C1⁺ iDCs is maintained with CMV infection. Additionally, KIR2DL1⁺ and KIR2DL3⁺ NK cell subsets reacted against CMV-infected C2C2⁺ iDCs. This point could explain recent work showing that early CMV infection is associated with a reduced risk of relapse in acute myeloid leukemia patients undergoing allogeneic HCT (19). Thus, it is possible that CMV infection activates and mobilizes the NK cell subset able to recognize “missing-self” and that expanded NKG2C⁺KIR2D⁺ NK cells constitute boosted alloreactive NK cells that are more efficient against leukemia cells.

Recent studies performed on a large cohort has revealed the expansion of activating KIR⁺ (KIR2DS2, KIR3DS1, KIR2DS4) NK cell subsets independently of NKG2C, suggesting a contribution of both activating KIR⁺ and NKG2C⁺ NK cell subsets in CMV infection (11). In a murine model, activating Ly49H recognition of the viral protein m157 drove expansion of the cells that control murine CMV infection (15). Thus, we evaluated amplified and sorted C2[−]KIR2DS1⁺ NK cell degranulation against C1C1⁺ and C2C2⁺ iDCs infected or not by CMV. In our model, we did not observe a potential activation of KIR2DS1⁺ NK cells stimulated with CMV-infected iDCs (data not shown). However, the CMV seronegative status of the studied individuals may explain the absence of the KIR2DS1⁺ NK cell response. Indeed, it is possible that “memory” status of NK cells expanded during CMV infection is necessary to involve KIR2DS1 engagement with viral ligands.

Interestingly, we show that KIR2DL3 recognizes not only C1 but also C2 ligands, as demonstrated in our cellular model using C1C1 or C2C2 iDCs. In contrast, KIR2DL1⁺ NK cells recognize only C2C2⁺ iDCs. These results are in accordance with previous works indicating that KIR2DL3 interacts with HLA-C molecules belonging to C1 and C2 groups (32). Additionally, KIR2DL3⁺ NK cell degranulation is significantly increased in contact to CMV-infected C2C2⁺ iDCs, probably due to the decreased expression of HLA class I molecules on CMV-infected C2C2⁺ iDCs. Unexpectedly, KIR2DL3⁺ NK cell degranulation is not increased in contact to CMV-infected C1C1 iDCs. This last result suggests a potential evasion of CMV to KIR2DL3⁺ NK cell control in HLA-C1 environment as observed in our model at 48 h postinfection and confirmed at 96 h postinfection (data not shown). However, we do not exclude that KIR2DL3⁺ NK cell degranulation is activated by CMV-infected target cells earlier or later during the viral cycle.

The existence of multiple CMV strategies to escape immune system control opens a range of hypotheses. Indeed, the high frequency of KIR2DL3⁺ NK cells observed in CMV infection may lead to an antiviral immune pressure mediated in vivo by these KIR2DL3⁺ NK cells. The modulation of KIR/HLA interactions by viruses has been reported for some inhibitory KIR (39–43). This suggests that viral CMV peptides may increase the affinity of C1 ligands for inhibitory KIR2DL3 and prevent the activation of specific KIR2DL3⁺ NK cells.

Different groups have recently reported a specific NK cell phenotype marked by the acquisition of CD57, NKG2C, and KIR on NK cells in different viral infections including in nonexclusive fashion CMV (44), hantavirus (45), chikungunya virus (46), and HIV-1 (47). Interestingly, all of these viruses developed evasion strategies based on HLA class I downregulation to escape T cell recognition. Although the ligand of NKG2C is still elusive in CMV infection, it is conceivable that NKG2C⁺KIR2DL⁺ NK cell expansion is mutually driven by the recognition of HLA-E by CD94/NKG2C and the absence of engagement of KIR2DL with specific HLA KIR ligands on CMV-infected cells. Additionally, the large specificity of KIR2DL3 may explain its frequent expression on NKG2C⁺ NK cells associated to CMV infection.

In conclusion, our results provide evidence that inhibitory KIR2DL3 is preferentially coexpressed with NKG2C on amplified NK cells in CMV infection. Our findings support the functional contribution of KIR2DL1⁺ and KIR2DL3⁺ NK cell subsets in controlling CMV infection in C2⁺ recipients of allogeneic HSCT, suggesting a beneficial impact of CMV on GVL effect in this clinical context. In C2[−] recipients, the beneficial KIR2DL1⁺ NK cell alloreactivity is maintained despite infection, whereas CMV seems to have developed a strategy to escape to KIR2DL3⁺ NK cell control. This study opens new perspectives of investigation to determine the molecular mechanisms involved in KIR2DL3 NK cell escape employed by CMV.

Acknowledgments

We are grateful to all the donors for participating in this study. We thank Dr. Marc Bonneville (Unité Mixte de Recherche 892, Nantes, France) for advice and Dr. Joanna Ashton (Britt House, Nantes, France) for help in editing the manuscript.

Disclosures

The authors have no financial conflicts of interest.

References

1. Biron, C. A., H. C. Su, and J. S. Orange. 1996. Function and regulation of natural killer (NK) cells during viral infections: characterization of responses in vivo. *Methods* 9: 379–393.
2. Kärre, K. 2002. NK cells, MHC class I molecules and the missing self. *Scand. J. Immunol.* 55: 221–228.
3. Braid, V. M., D. S. Allan, C. A. O’Callaghan, K. Söderström, A. D’Andrea, G. S. Ogg, S. Lazetic, N. T. Young, J. I. Bell, J. H. Phillips, et al. 1998. HLA-E binds to natural killer cell receptors CD94/NKG2A, B and C. *Nature* 391: 795–799.
4. Moretta, L., and A. Moretta. 2004. Killer immunoglobulin-like receptors. *Curr. Opin. Immunol.* 16: 626–633.
5. Anfossi, N., P. André, S. Guia, C. S. Falk, S. Roetynck, C. A. Stewart, V. Breso, C. Frassati, D. Reviron, D. Middleton, et al. 2006. Human NK cell education by inhibitory receptors for MHC class I. *Immunity* 25: 331–342.
6. Yewdell, J. W., and A. B. Hill. 2002. Viral interference with antigen presentation. *Nat. Immunol.* 3: 1019–1025.
7. Wilkinson, G. W. G., P. Tomasec, R. J. Stanton, M. Armstrong, V. Prod’homme, R. Aicheler, B. P. McSharry, C. R. Rickards, D. Cochrane, S. Llewellyn-Lacey, et al. 2008. Modulation of natural killer cells by human cytomegalovirus. *J. Clin. Virol.* 41: 206–212.
8. Gumá, M., A. Angulo, C. Vilches, N. Gómez-Lozano, N. Malats, and M. López-Botet. 2004. Imprint of human cytomegalovirus infection on the NK cell receptor repertoire. *Blood* 104: 3664–3671.
9. Foley, B., S. Cooley, M. R. Verneris, M. Pitt, J. Curtsinger, X. Luo, S. Lopez-Vergès, L. L. Lanier, D. Weisdorf, and J. S. Miller. 2012. Cytomegalovirus

- reactivation after allogeneic transplantation promotes a lasting increase in educated NKG2C⁺ natural killer cells with potent function. *Blood* 119: 2665–2674.
10. Béziat, V., O. Dalgard, T. Asselah, P. Halfon, P. Bedossa, A. Boudifa, B. Hervier, I. Theodorou, M. Martinot, P. Debré, et al. 2012. CMV drives clonal expansion of NKG2C⁺ NK cells expressing self-specific KIRs in chronic hepatitis patients. *Eur. J. Immunol.* 42: 447–457.
 11. Béziat, V., L. L. Liu, J.-A. Malmberg, M. A. Ivarsson, E. Sohlberg, A. T. Björklund, C. Retière, E. Sverremark-Ekström, J. Traherne, P. Ljungman, et al. 2013. NK cell responses to cytomegalovirus infection lead to stable imprints in the human KIR repertoire and involve activating KIRs. *Blood* 121: 2678–2688.
 12. Charoudeh, H. N., G. Terszowski, K. Czaja, A. Gonzalez, K. Schmitter, and M. Stern. 2013. Modulation of the natural killer cell KIR repertoire by cytomegalovirus infection. *Eur. J. Immunol.* 43: 480–487.
 13. Cosman, D., N. Fanger, B. Borges, M. Kubin, W. Chin, L. Peterson, and M. L. Hsu. 1997. A novel immunoglobulin superfamily receptor for cellular and viral MHC class I molecules. *Immunity* 7: 273–282.
 14. Kubin, M., L. Cassiano, J. Chalupny, W. Chin, D. Cosman, W. Fanslow, J. Müllberg, A. M. Rousseau, D. Ulrich, and R. Armitage. 2001. ULBP1, 2, 3: novel MHC class I-related molecules that bind to human cytomegalovirus glycoprotein UL16, activate NK cells. *Eur. J. Immunol.* 31: 1428–1437.
 15. Babić, M., A. Krmpotić, and S. Jonjić. 2011. All is fair in virus-host interactions: NK cells and cytomegalovirus. *Trends Mol. Med.* 17: 677–685.
 16. Stern, M., H. Elsässer, G. Hönger, J. Steiger, S. Schaub, and C. Hess. 2008. The number of activating KIR genes inversely correlates with the rate of CMV infection/reactivation in kidney transplant recipients. *Am. J. Transplant.* 8: 1312–1317.
 17. Cook, M., D. Briggs, C. Craddock, P. Mahendra, D. Milligan, C. Fegan, P. Darbyshire, S. Lawson, E. Boxall, and P. Moss. 2006. Donor KIR genotype has a major influence on the rate of cytomegalovirus reactivation following T-cell replete stem cell transplantation. *Blood* 107: 1230–1232.
 18. Chen, C., M. Busson, V. Rocha, M.-L. Appert, V. Lepage, N. Dulphy, P. Haas, G. Socié, A. Toubert, D. Charron, and P. Loiseau. 2006. Activating KIR genes are associated with CMV reactivation and survival after non-T-cell depleted HLA-identical sibling bone marrow transplantation for malignant disorders. *Bone Marrow Transplant.* 38: 437–444.
 19. Della Chiesa, M., M. Falco, M. Podestà, F. Locatelli, L. Moretta, F. Frasson, and A. Moretta. 2012. Phenotypic and functional heterogeneity of human NK cells developing after umbilical cord blood transplantation: a role for human cytomegalovirus? *Blood* 119: 399–410.
 20. Miller, S. A., D. D. Dykes, and H. F. Polesky. 1988. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res.* 16: 1215.
 21. Marsh, S. G. E., P. Parham, B. Dupont, D. E. Geraghty, J. Trowsdale, D. Middleton, C. Vilches, M. Carrington, C. Witt, L. A. Guethlein, et al. 2003. Killer-cell immunoglobulin-like receptor (KIR) nomenclature report, 2002. *Tissue Antigens* 62: 79–86.
 22. Denis, L., J. Sivula, P.-A. Gourraud, N. Kerdudou, R. Chout, C. Ricard, J.-P. Moisan, K. Gagne, J. Partanen, and J.-D. Bignon. 2005. Genetic diversity of KIR natural killer cell markers in populations from France, Guadeloupe, Finland, Senegal and Réunion. *Tissue Antigens* 66: 267–276.
 23. Repnik, U., M. Knezevic, and M. Jeras. 2003. Simple and cost-effective isolation of monocytes from buffy coats. *J. Immunol. Methods* 278: 283–292.
 24. Morvan, M., C. Willem, K. Gagne, N. Kerdudou, G. David, V. Sébille, G. Folléa, J.-D. Bignon, and C. Retière. 2009. Phenotypic and functional analyses of KIR3DL1⁺ and KIR3DS1⁺ NK cell subsets demonstrate differential regulation by Bw4 molecules and induced KIR3DS1 expression on stimulated NK cells. *J. Immunol.* 182: 6727–6735.
 25. Morvan, M., G. David, V. Sébille, A. Perrin, K. Gagne, C. Willem, N. Kerdudou, L. Denis, B. Clémenceau, G. Folléa, et al. 2008. Autologous and allogeneic HLA KIR ligand environments and activating KIR control KIR NK-cell functions. *Eur. J. Immunol.* 38: 3474–3486.
 26. Garrett, J. S., J. C. Narus, J. F. Bohnsack, D. E. Carling, K. G. Grieves, W. J. Waldman, and R. E. Shaddy. 1995. Effects of cytomegalovirus infection on growth factor production in endothelial cells and fibroblasts. *Pediatr. Res.* 38: 1003–1008.
 27. David, G., M. Morvan, K. Gagne, N. Kerdudou, C. Willem, A. Devys, M. Bonneville, G. Folléa, J.-D. Bignon, and C. Retière. 2009. Discrimination between the main activating and inhibitory killer cell immunoglobulin-like receptor positive natural killer cell subsets using newly characterized monoclonal antibodies. *Immunology* 128: 172–184.
 28. Imbert-Marcille, B. M., N. Robillard, A. S. Poirier, M. Coste-Burel, D. Cantarovich, N. Milpied, and S. Billaut. 1997. Development of a method for direct quantification of cytomegalovirus antigenemia by flow cytometry. *J. Clin. Microbiol.* 35: 2665–2669.
 29. Riegler, S., H. Hebart, H. Einsele, P. Brossart, G. Jahn, and C. Sinzger. 2000. Monocyte-derived dendritic cells are permissive to the complete replicative cycle of human cytomegalovirus. *J. Gen. Virol.* 81: 393–399.
 30. Moutafsi, M., A. M. Mehl, L. K. Borysiewicz, and Z. Tabi. 2002. Human cytomegalovirus inhibits maturation and impairs function of monocyte-derived dendritic cells. *Blood* 99: 2913–2921.
 31. Orr, M. T., W. J. Murphy, and L. L. Lanier. 2010. “Unlicensed” natural killer cells dominate the response to cytomegalovirus infection. *Nat. Immunol.* 11: 321–327.
 32. Moesta, A. K., P. J. Norman, M. Yawata, N. Yawata, M. Gleimer, and P. Parham. 1950. 2008. Synergistic polymorphism at two positions distal to the ligand-binding site makes KIR2DL2 a stronger receptor for HLA-C than KIR2DL3. *J. Immunol.* 180: 3969–3979.
 33. Pende, D., S. Marcenaro, M. Falco, S. Martini, M. E. Bernardo, D. Montagna, E. Romeo, C. Cognet, M. Martinetti, R. Maccario, et al. 2009. Anti-leukemia activity of alloreactive NK cells in KIR ligand-mismatched haploidentical HSCT for pediatric patients: evaluation of the functional role of activating KIR and redefinition of inhibitory KIR specificity. *Blood* 113: 3119–3129.
 34. Schönberg, K., M. Stribar, J. Enczmann, J. C. Fischer, and M. Uhrberg. 2011. Analyses of HLA-C-specific KIR repertoires in donors with group A and B haplotypes suggest a ligand-instructed model of NK cell receptor acquisition. *Blood* 117: 98–107.
 35. Kuijpers, T. W., P. A. Baars, C. Dantin, M. van den Burg, R. A. W. van Lier, and E. Roosnek. 2008. Human NK cells can control CMV infection in the absence of T cells. *Blood* 112: 914–915.
 36. Arase, H., E. S. Mocarski, A. E. Campbell, A. B. Hill, and L. L. Lanier. 2002. Direct recognition of cytomegalovirus by activating and inhibitory NK cell receptors. *Science* 296: 1323–1326.
 37. Carrington, M., M. P. Martin, and J. van Bergen. 2008. KIR-HLA intercourse in HIV disease. *Trends Microbiol.* 16: 620–627.
 38. Sivori, S., S. Carlomagno, M. Falco, E. Romeo, L. Moretta, and A. Moretta. 2011. Natural killer cells expressing the KIR2DS1-activating receptor efficiently kill T-cell blasts and dendritic cells: implications in haploidentical HSCT. *Blood* 117: 4284–4292.
 39. Brackenridge, S., E. J. Evans, M. Toebes, N. Goonetilleke, M. K. P. Liu, K. di Gleria, T. N. Schumacher, S. J. Davis, A. J. McMichael, and G. M. Gillespie. 2011. An early HIV mutation within an HLA-B*57-restricted T cell epitope abrogates binding to the killer inhibitory receptor 3DL1. *J. Virol.* 85: 5415–5422.
 40. Stewart-Jones, G. B. E., K. di Gleria, S. Kollnberger, A. J. McMichael, E. Y. Jones, and P. Bowens. 2005. Crystal structures and KIR3DL1 recognition of three immunodominant viral peptides complexed to HLA-B*2705. *Eur. J. Immunol.* 35: 341–351.
 41. Fadda, L., G. M. O'Connor, S. Kumar, A. Piechocka-Trocha, C. M. Gardiner, M. Carrington, D. W. McVicar, and M. Altfeld. 2011. Common HIV-1 peptide variants mediate differential binding of KIR3DL1 to HLA-Bw4 molecules. *J. Virol.* 85: 5970–5974.
 42. Hansasuta, P., T. Dong, H. Thananchai, M. Weekes, C. Willberg, H. Aldemir, S. Rowland-Jones, and V. M. Braud. 2004. Recognition of HLA-A3 and HLA-A11 by KIR3DL2 is peptide-specific. *Eur. J. Immunol.* 34: 1673–1679.
 43. Alter, G., D. Heckerman, A. Schneidewind, L. Fadda, C. M. Kadie, J. M. Carlson, C. Oniangue-Ndza, M. Martin, B. Li, S. I. Khakoo, et al. 2011. HIV-1 adaptation to NK-cell-mediated immune pressure. *Nature* 476: 96–100.
 44. Lopez-Vergès, S., J. M. Milush, B. S. Schwartz, M. J. Pando, J. Jarjoura, V. A. York, J. P. Houchins, S. Miller, S.-M. Kang, P. J. Norris, et al. 2011. Expansion of a unique CD57⁺NKG2C^{hi} natural killer cell subset during acute human cytomegalovirus infection. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 108: 14725–14732.
 45. Björkström, N. K., T. Lindgren, M. Stoltz, C. Fauriat, M. Braun, M. Evander, J. Michaëlsson, K.-J. Malmberg, J. Klingström, C. Ahlm, and H.-G. Ljunggren. 2011. Rapid expansion and long-term persistence of elevated NK cell numbers in humans infected with hantavirus. *J. Exp. Med.* 208: 13–21.
 46. Petitdemange, C., P. Becquart, N. Wauquier, V. Béziat, P. Debré, E. M. Leroy, and V. Vieillard. 2011. Unconventional repertoire profile is imprinted during acute chikungunya infection for natural killer cells polarization toward cytotoxicity. *PLoS Pathog.* 7: e1002268.
 47. Gumá, M., C. Cabrera, I. Erkizia, M. Bofill, B. Clotet, L. Ruiz, and M. López-Botet. 2006. Human cytomegalovirus infection is associated with increased proportions of NK cells that express the CD94/NKG2C receptor in aviremic HIV-1-positive patients. *J. Infect. Dis.* 194: 38–41.



A Method Enabling High-Throughput Sequencing of Human Cytomegalovirus Complete Genomes from Clinical Isolates

Steven Sijmons^{1*}, Kim Thys², Michaël Corthout¹, Ellen Van Damme², Marnix Van Lookk², Stefanie Bollen¹, Sylvie Baguet¹, Jeroen Aerssens², Marc Van Ranst¹, Piet Maes¹

1 Laboratory of Clinical Virology, Rega Institute for Medical Research, Katholieke Universiteit Leuven, Leuven, Belgium, **2** Janssen Infectious Diseases BVBA, Beerse, Belgium

Abstract

Human cytomegalovirus (HCMV) is a ubiquitous virus that can cause serious sequelae in immunocompromised patients and in the developing fetus. The coding capacity of the 235 kbp genome is still incompletely understood, and there is a pressing need to characterize genomic contents in clinical isolates. In this study, a procedure for the high-throughput generation of full genome consensus sequences from clinical HCMV isolates is presented. This method relies on low number passaging of clinical isolates on human fibroblasts, followed by digestion of cellular DNA and purification of viral DNA. After multiple displacement amplification, highly pure viral DNA is generated. These extracts are suitable for high-throughput next-generation sequencing and assembly of consensus sequences. Throughout a series of validation experiments, we showed that the workflow reproducibly generated consensus sequences representative for the virus population present in the original clinical material. Additionally, the performance of 454 GS FLX and/or Illumina Genome Analyzer datasets in consensus sequence deduction was evaluated. Based on assembly performance data, the Illumina Genome Analyzer was the platform of choice in the presented workflow. Analysis of the consensus sequences derived in this study confirmed the presence of gene-disrupting mutations in clinical HCMV isolates independent from *in vitro* passaging. These mutations were identified in genes RL5A, UL1, UL9, UL111A and UL150. In conclusion, the presented workflow provides opportunities for high-throughput characterization of complete HCMV genomes that could deliver new insights into HCMV coding capacity and genetic determinants of viral tropism and pathogenicity.

Citation: Sijmons S, Thys K, Corthout M, Van Damme E, Van Lookk M, et al. (2014) A Method Enabling High-Throughput Sequencing of Human Cytomegalovirus Complete Genomes from Clinical Isolates. PLoS ONE 9(4): e95501. doi:10.1371/journal.pone.0095501

Editor: Wenzhe Ho, Temple University School of Medicine, United States of America

Received: January 7, 2014; **Accepted:** March 26, 2014; **Published:** April 22, 2014

Copyright: © 2014 Sijmons et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Funding: SS and PM are supported by the Research Foundation Flanders (FWO – ‘Fonds voor Wetenschappelijk Onderzoek, Vlaanderen’). The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing Interests: The authors have the following interests. Kim Thys, Ellen Van Damme, Marnix Van Lookk and Jeroen Aerssens are employed by Janssen Infectious Diseases BVBA. There are no patents, products in development or marketed products to declare. This does not alter our adherence to all the PLOS ONE policies on sharing data and materials, as detailed online in the guide for authors.

* E-mail: steven.sijmons@uzleuven.be

Introduction

Human cytomegalovirus (HCMV), the prototype member of the herpesvirus subfamily *Betaherpesvirinae*, is a ubiquitous virus with seroprevalences ranging from 45 to 100% in the adult population [1]. Primary infection or reactivation usually remains asymptomatic; however, the virus can cause serious illness in newborns and immunosuppressed individuals such as transplant recipients and AIDS patients [2]. HCMV has the largest genome of all human herpesviruses, with a size of approximately 235 kbp. The genome consists of two unique fragments, the unique long (UL) and unique short (US) regions, which are both flanked by a pair of inverted repeats, termed terminal/internal repeat long (TRL/IRL) and internal/terminal repeat short (IRS/TRS). Four genomic isomers are present in equimolar concentrations through inversion of UL and US relative to each other [3].

The first complete genome sequence of HCMV, derived from the highly passaged laboratory strain AD169, was published in 1990 with 208 open reading frames (ORFs) predicted as protein-encoding [4]. Through comparison of different laboratory strains and isolates passaged more moderately on cultured human

fibroblasts, it has been well established that AD169 contains major genome rearrangements. These affect a region at the 3' end of the UL region, commonly referred to as the UL/b' region, resulting in the loss of a 15 kbp fragment which encodes 19 additional ORFs [5,6]. The HCMV genetic map was further refined by genome comparisons with chimpanzee cytomegalovirus and full genome sequencing of a handful additional clinical isolates [7–10]. The current HCMV genetic map as annotated on the HCMV reference sequence Merlin (NC_006273 [10]) contains 170 genes, some of which are only defined theoretically. In fact, recent publications defining the HCMV transcriptome have drawn a very sophisticated picture including alternative splicing and antisense transcription, which could redefine our understanding of the HCMV coding capacity [11–13]. The functionality of these products still awaits further confirmation. The determination of the complete genome sequence of additional, clinically representative isolates could assist in a better definition of the HCMV genetic map through comparative genomic approaches.

During the last years, next-generation sequencing (NGS) has immensely impacted the genomics field [14]. Although several complete HCMV genomes have been determined using the

traditional cloning and Sanger sequencing approaches, it is still highly laborious and not suitable for high-throughput applications [4,9,10,15]. NGS technology obviates the need for cloning procedures by the generation of enormous amounts of short sequence reads starting from minimal input material. The benefits of NGS for HCMV genomics were first demonstrated through the elucidation of variants present in laboratory preparations of the AD169 and Towne strains [16]. In an attempt to evaluate the effectiveness of NGS with clinical HCMV isolates, Cunningham *et al.* compared a more traditional PCR-based amplification and Sanger sequencing approach with a NGS approach using the Illumina Genome Analyzer (IGA; Illumina, Inc., San Diego, USA) [17]. In addition, the 454 GS FLX (Roche Applied Science, Penzberg, Germany) platform was successfully used to determine the first complete genome sequence of an Asian HCMV isolate [18]. Cunningham *et al.* showed that sequencing of complete HCMV genomes directly from clinical material is achievable, but given the small fraction of viral DNA, not practically amenable to high-throughput. In order to achieve a high-throughput application with NGS technology, a protocol to amplify and isolate highly pure viral DNA is desirable.

Currently, 33 complete HCMV sequences are available in the NCBI GenBank (v196.0), including 17 derived from unpassaged or moderately passaged material (up to 10 cell culture passages). Additional sequences of clinical isolates are necessary to better apprehend the genetic diversity and coding capacity of HCMV strains. Since sequencing complete genomes of clinically representative HCMV isolates in high-throughput awaits new amplification protocols, we have developed a dedicated amplification, sequencing and analysis workflow for HCMV genome characterization. The workflow maximizes sequencing capacity through the generation of highly pure HCMV DNA (>90% viral DNA). The efficiency of using 454 GS FLX and/or IGA for HCMV full genome sequencing was compared. Using a series of validation experiments, we show that consensus sequences derived by the workflow are representative for the strain present in the original clinical isolate. The presented workflow enables high-throughput analysis of HCMV full genome sequences and could serve as an important tool in elucidating the genetic diversity of this complex herpesvirus.

Materials and Methods

Patient Samples, Viruses and Cell Culture

Seven PCR-confirmed HCMV-positive urine samples were included in the study (primers listed in Table S1). Sample BE/9/2010 was taken from a child with a primary infection presenting with fever. Samples BE/10/2010 i1 and BE/10/2010 i2 were collected on the same day from a congenitally infected infant that was asymptomatic at birth. Sample BE/11/2010 was obtained from a child with a primary infection with liver dysfunction. Sample BE/21/2010 was taken from a pulmonary transplant recipient who had received a transplant and seroconverted in 2007. Finally, samples BE/27/2010 i1 and BE/27/2010 i2 were collected from a patient receiving a renal transplant in 2008 and seroconverting in 2009.

Typically, 1 mL of urine was centrifuged for 10 min at 300×g and the supernatant was subsequently filtered through a 0.45 µm filter (Minisart NY25, Sartorius AG, Göttingen, Germany). A confluent monolayer of human embryonic skin-muscle fibroblast cells (E1SM [19]) in a 25 cm² flask containing 10 mL of DMEM (Life Technologies, Carlsbad, USA) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS, Life Technologies) was inoculated with 0.5 mL of the filtrate and incubated at 37°C in a humidified 5%

CO₂ environment. Infected cells were passaged every two weeks by diluting cells 1:2 into a 75 cm² flask after trypsinization (0.05% Trypsin-EDTA, Life Technologies).

Strain Merlin was obtained from ATCC (ATCC-VR-1590, Lot Nr. 58730771, passage 4). A confluent monolayer of E1SM cells in a 75 cm² flask containing 10 mL of DMEM was inoculated with 0.5 mL of the virus stock and the cells were incubated at 37°C and 5% CO₂. After 1 h, the medium was removed and the cells were washed with 1X PBS (Life Technologies) before adding DMEM with 10% FBS.

Viral DNA Purification and Multiple Displacement Amplification

Since clinical isolates do not produce large amounts of cell-free virus, a procedure was needed to purify intracellular, viral DNA from large backgrounds of cellular DNA. We therefore adapted a protocol described by Sinzger *et al.* [20]. Briefly, cells from three 75 cm² flasks were trypsinized and pooled. After lysis in a Tris buffer containing sucrose and Triton X-100, cellular DNA was digested using micrococcal nuclease (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA). Subsequently, DNA was extracted using the QIAamp DNA Blood Mini Kit. Extracted DNA was amplified by multiple displacement amplification using the REPLI-g Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany). For each sample, three independent REPLI-g reactions were pooled. A mixture of 150 µL of REPLI-g products, 300 µL of pure ethanol and 15 µL of 3 M sodium acetate was incubated at −80°C for 2 h. The samples were centrifuged for 30 min at 20,000×g (4°C), the supernatant was removed and the pellets were washed with 70% ethanol. Afterwards, the samples were centrifuged again for 30 min at 20,000×g (4°C) and the supernatant was removed. The pellets were air dried and resuspended in 50 µL of QIAamp Elution Buffer (Qiagen).

For the purification of an unpassaged isolate, 200 mL of sample BE/21/2010 was centrifuged for 10 min at 300×g and the supernatant was centrifuged for 2 h at 100,000×g (4°C) in a type 35 rotor (Beckman Coulter Inc., Brea, USA). The pellet was resuspended in 200 µL of 1X PBS and DNA was extracted using the QIAamp DNA Blood Mini Kit (Qiagen). Extracted DNA was amplified through whole genome amplification as described above.

Quantitation of Viral and Cellular DNA

Viral and cellular DNA contents were evaluated using a quantitative PCR assay (qPCR). HCMV DNA was quantitated through amplification of a fragment of the conserved major capsid protein-encoding gene UL86. For human DNA, a region of the β-globin household gene was amplified. Primers and probes were obtained from Eurogentec (Liège, Belgium); the sequences are listed in Table S1. The qPCR was carried out using TaqMan Universal PCR Master Mix (Life Technologies) on an Applied Biosystems 7500 Fast Real-Time PCR system (Life Technologies), following the manufacturer's protocols. Both standards and samples were quantitated in duplicate, viral and cellular DNA was quantitated in separate wells.

For absolute quantitation, standard series were produced by serial dilution of HCMV UL86 and human β-globin standards. The standards were prepared through PCR amplification of the qPCR targets and products were gel purified using the QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen). After spectrophotometrical quantitation with a BioPhotometer (Eppendorf, Hamburg, Germany), DNA concentrations were converted to copy number/µL using the formula described by Fronhoffs *et al.* [21]. Viral and cellular

DNA copy numbers were converted to absolute weight (μg of DNA) for mutual comparison.

Next-generation Sequencing

For 454 GS FLX sequencing, total DNA was fragmented to an average length of 400 bp using a Covaris E210 system (Covaris). DNA fragments were end-repaired, 3'-adenylated, ligated to adapters (GS FLX Titanium Rapid Library MID Adaptors kit, Roche) and size-selected (>350 bp) using the SPRIworks Fragment Library System II (Beckman Coulter Genomics). The quality of the library was evaluated using a high-sensitivity DNA chip on a model 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies). Libraries were quantitated with the TBS-380 Mini-Fluorometer (Promega) and subsequently pooled at equimolar concentrations. Prior to sequencing, clonal amplification was performed during an emulsion based PCR (GS FLX Titanium emPCR Kit, Roche). Sequencing was performed using the GS FLX Titanium Sequencing Kit (Roche). Following sequencing, processing of the raw sequence data was performed with the Roche Sequencing System Software package.

For Illumina Genome Analyzer (IGA) sequencing, total DNA was fragmented to an average length of 200 bp using a Covaris E210 system (Covaris). The ends of the fragmented DNA were repaired, adenylated and Illumina compatible adaptors (Index PE Adaptor Oligo Mix, Illumina) were ligated using the SPRIworks Fragment Library System I (Beckman Coulter Genomics). Fragments were indexed using the Multiplexing Sample Preparation Oligonucleotide Kit (Illumina) and the library was enriched during 12 PCR cycles. Enriched fragments were visualized on a Bioanalyzer (Agilent Technologies) for quality control and quantitation. Finally, samples were pooled at equimolar ratios and put on the Illumina cluster station for cluster generation using the TruSeq PE Cluster Kit v2 (Illumina). One hundred and nine cycles of multiplexed paired-end sequencing were performed using the TruSeq SBS Kit v5 (Illumina). Following sequencing on the GAIIx, processing of the raw sequence data was performed with the Illumina analysis software (Casava 1.7.0).

Assembly of Consensus Sequences and Finishing with Sanger Sequencing

IGA and 454 GS FLX datasets were first subjected to a quality control step using *QUASR* v6.08 (<http://sourceforge.net/projects/quasr/>). Low-quality bases were trimmed from the 3' end of reads until the median quality of the reads was higher than 20. Reads smaller than 20 bp were removed. A *de novo* assembly was constructed for 454 GS FLX reads using *MIRA* v3.4.1.1 [22,23] with assembly settings on 'accurate' and for IGA reads with *Velvet* v1.2.07 [24]. The hash value, expected coverage and coverage cutoff parameters needed for Velvet assemblies were first estimated using VelvetOptimiser (Perl script, <http://bioinformatics.net.au/software/velvetoptimiser.shtml>) and then manually adjusted to produce longer contigs (Table S2). The resulting contigs were assembled using *Phrap* v1.090518 [25] and *Phrap* contigs longer than 1,000 bp were included in a NCBI nucleotide *BLAST* search to find a suitable HCMV reference sequence. Next, all *Phrap* contigs were aligned to the selected reference sequence using *NUCmer* included in the *MUMmer 3* package [26]. For this alignment, reference sequences were trimmed of its terminal repeats, except for the 50 bp region adjacent to UL and US regions, as described [17]. This alignment was used to build a hybrid reference combining *Phrap* contigs and pieces of the original reference sequence in regions where no contigs had mapped. Finally, a reference assembly was constructed using the 454 GS FLX and IGA reads with *MIRA* and a consensus sequence of the

strain was generated. This assembly was outputted in ACE format and visualized using *Tablet* v1.12.12.05 [27,28]. The complete consensus sequence was manually inspected and any misassembly corrected.

Gaps remaining in the consensus sequences after assembly of NGS data were resolved through PCR amplification and Sanger sequencing. PCR reactions were carried out with HotStarTaq DNA Polymerase (Qiagen) using standard manufacturer's protocols. Primer sequences and annealing temperatures are presented in Table S3. Products were cleaned up before sequencing with ExoSAP-IT (Affymetrix, Santa Clara, USA). Sequencing reactions were performed in both directions using the BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Life Technologies) and sequencing products were analyzed in an ABI PRISM 3100 Genetic Analyzer. Chromatograms were interpreted and contigs were joined with the complete genome consensus using *Lasergene SeqMan* v7.0.0 (DNASTAR, Madison, USA).

Using the final complete genome consensus sequence, a reference assembly was constructed using the *CLC Genomics Workbench* v5.5.1 (CLC bio, Aarhus, Denmark) and the regions corresponding to gaps in the original reference mapping were revised. The final consensus sequences were submitted to NCBI GenBank (accession no. KC519319–KC519323). Sequence alignments were constructed using *MAFFT* v6.903 [29] and visualized with *MEGA5* [30]. Comparisons with other HCMV strains included NCBI GenBank entries GU179001, BK00039, FJ527563, AC146999, AY315197, AC146851, FJ616285, GU937742, AC146905, AC146907, AC146904, AC146906, EF999921, GQ221974, GQ466044, GU179291, GQ221973, GQ396663, GQ396662, GQ221975, GU179288, GU179290, GU179289, HQ380895, JN379814, JN379815 and JN379816.

To assess the content of the original sample preparations, a *de novo* assembly was built with the *CLC Genomics Workbench* using only 454 GS FLX and IGA reads that were not mapped onto the final HCMV reference sequence. The resulting contigs were analyzed with the *blastn* command of the *BLAST+* application [31] using the complete nucleotide (nt) database. Output of contig database searches was interpreted with *MEGAN4* [32].

Evaluation of Sequencing Technologies and Assembly Software

To evaluate the performance of assemblies using only 454 GS FLX, IGA or both read sets, *de novo* assemblies were constructed and the resulting contigs were aligned with *NUCmer* against the final genome sequence of the appropriate strain to evaluate genome coverage. The freeware software suites (*MIRA*, *Velvet* and *Phrap*) that were used to build the initial consensus sequences were compared to a commercial alternative (*CLC Genomics Workbench*). Statistical analyses were performed with *SPSS Statistics* v21 (IBM, Armonk, USA). Overall differences of $n50$ contig length and number of gaps left in the assembly were tested using the Friedman Test and individual groups were compared using the Wilcoxon Signed Ranks Test with Bonferroni correction.

Results and Discussion

Development of a Sample Preparation Protocol Generating Highly Pure HCMV DNA

For the development of a method to characterize HCMV genomes in high-throughput, a procedure was needed to amplify the viral material in clinical samples. To maximize sequencing capacity, extract purity had to be optimized. PCR-based amplification approaches that use a set of conserved primers covering the complete HCMV genome have been applied [17,33].

However, the labor-intensity of these methods compromises a high-throughput perspective. Therefore, we have amplified viral material through passing isolates on E₁SM cells, a human fibroblast cell line (Figure 1). The number of passages on fibroblasts in this amplification was limited to avoid potential genetic adaptation of HCMV to growth on fibroblasts [34]. This implied that virus production would be low and predominantly cell-associated. Amplification by passing HCMV clinical isolates on fibroblasts had already been used as a preparative step for NGS analysis, but usually DNA was isolated through a whole cell extraction [17,18]. The extracted viral DNA is usually heavily contaminated with cellular DNA, which impacts on the efficiency of the sequencing process. We chose to implement a technique to specifically purify cell-associated viral DNA [20]. This method is based on lysis of the cellular membranes and nuclease-based cleavage of cellular DNA, followed by extraction of viral DNA from nucleocapsids. Isolates were harvested at passage 2 or 4, when the first foci of cytopathogenic effect became visible. To assess viral yield and purity, we developed a quantitative PCR to evaluate the amounts of viral and cellular DNA present in the isolates. After virus isolation and DNA extraction, viral DNA yield and especially purity were considered unsatisfactory for NGS, since most samples (11/14) contained less than 500 ng of HCMV DNA and the majority of the DNA detected was of cellular origin (Figure 2, pre-MDA). To further amplify viral DNA, samples were subjected to multiple displacement amplification (MDA). MDA makes use of the high processivity, strand displacement and proofreading capacity of the Φ 29 DNA polymerase to amplify DNA using random primers. This method can amplify nanograms of DNA to micrograms and generates long contiguous strands with very low mutation rates (10^{-6}). Amplification biases have been reported, but tend to be more problematic when starting from very low amounts of input material such as in single-cell sequencing [35]. MDA affected both yield and purity of viral DNA, with amounts of viral DNA mostly above 5 μ g (11/14) and purities largely higher than 90% (11/14) (Figure 2, post-MDA). Only for the unpassaged isolate of strain BE/21/2010, viral DNA yield remained low with 600 ng of HCMV DNA, but with an estimated purity of 85%. The relative increase in viral DNA contents after MDA could possibly be attributed to the differential quality of viral and cellular DNA after nuclease treatment. While viral DNA was protected from nuclease activity by the viral capsid, cellular DNA was presumably heavily degraded. Although cellular DNA is still detected by the qPCR assay, which only amplifies a 167 bp fragment, we hypothesize that it is amplified much less efficiently by MDA than the intact viral DNA [36]. Because of the observed increase in viral DNA yield and purity, genomic contents of extracts could be characterized more efficiently, supporting high-throughput applications.

Sequencing and Assembly of HCMV Genomes Using 454 GS FLX and/or IGA Data

Purified HCMV DNA was analyzed using both 454 GS FLX and IGA to compare the performance of both systems in generating consensus sequences of complete genomes. Although several complete genome sequences of HCMV strains are available on NCBI GenBank, substantial regions of the genome are highly variable, which makes a mapping assembly unsuitable for analysis of distinct HCMV strains. Mapping assemblies left large areas of the genome uncovered. A large fraction of the unmapped reads, however, were found to be genuine HCMV reads with *BLAST* (data not shown). Therefore, a *de novo* assembly approach was chosen, followed by scaffolding of *de novo* contigs on HCMV reference sequences (Figure 1). A similar assembly

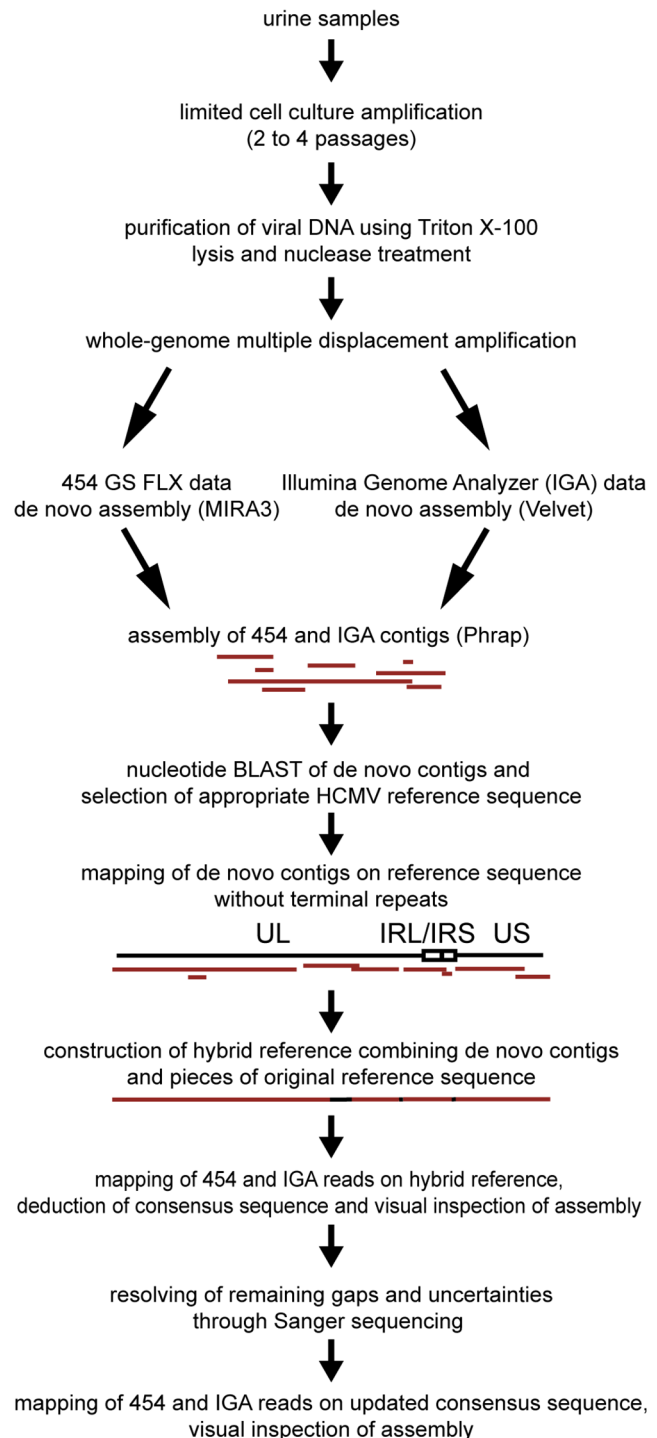


Figure 1. Schematic overview of the amplification, sequencing and analysis workflow. UL and US denote unique and unique short regions of the genome; IRL and IRS denote internal repeats. doi:10.1371/journal.pone.0095501.g001

approach using different software suites was already successfully implemented for HCMV [17]. Briefly, *de novo* contigs were mapped on HCMV reference genomes and a hybrid reference sequence was constructed combining contigs and pieces of the original reference sequence in regions with no contig coverage. Subsequently, the consensus sequence was derived from a

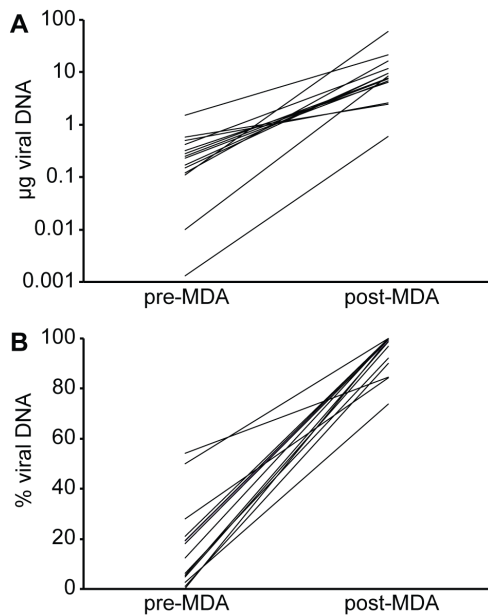


Figure 2. Multiple Displacement Amplification (MDA) selectively amplifies viral but not cellular DNA. Amounts of viral and cellular DNA were estimated using qPCR before and after amplification of the DNA extraction products using MDA (pre- and post-MDA). In [A], the increase in absolute amounts of viral DNA (μg) is visualized, [B] represents the relative increase of viral to cellular DNA (% viral DNA). doi:10.1371/journal.pone.0095501.g002

mapping assembly of all sequencing reads against this hybrid reference.

The final consensus sequences were used to construct a reference assembly using 454 GS FLX and IGA datasets. The percentage of reads mapped to the HCMV consensus sequence was generally in accordance with the sample purity predicted by the qPCR assay (Table 1). Since qPCR assays only quantified cellular DNA as a possible contaminant, this measure could overestimate sample purity, but there was only a small difference between qPCR and read mapping purity estimates for most samples (9/14 < 5%, 11/14 < 10%). Only strains BE/21/2010 UP and BE/27/2010-1 showed a large discrepancy (>20%) between the purity estimates, with the actual amount of reads that mapped to the HCMV consensus much lower than expected by qPCR. This discrepancy could be explained by the fact that qPCR assays only detect one segment of viral and cellular DNA, while the sequencing data reflect total DNA levels. To identify additional contaminating DNA present in the isolates, *de novo* assemblies were performed using 454 GS FLX and IGA reads that did not map to the HCMV consensus sequence. These contigs were analyzed using *BLAST* (Table S4). For strain BE/27/2010-1, only the presence of human DNA could account for the discrepancy between qPCR and read mapping results. The unmapped reads of BE/21/2010 UP largely consisted of human DNA and some bacterial and papillomaviral sequences. With only 12% of NGS reads being HCMV-specific for BE/21/2010 UP, we essentially encountered the same limitations as Cunningham and colleagues [17] for sequencing of unamplified clinical material and confirm that this is currently not amenable to high-throughput applications, even after MDA. This result indicates that an amplification and/or enrichment procedure for viral DNA is crucial to efficiently utilize NGS high-throughput capacities, which is provided through our cell culture extraction and MDA workflow. For three other samples, a small number of HCMV sequences

were detected that did not map to the consensus sequence during the reference assembly (Table S4). Nevertheless, these contigs, mostly smaller than 1,000 bp, could be aligned to the consensus using the *NUCmer* algorithm with similarities close or equal to 100% (data not shown).

Since both immunocompetent and immunocompromised patients can be co-infected by and shed multiple HCMV strains, the derived consensus sequences do not necessarily represent a single, contiguous genome but a collection of the most abundant variants at each position in the genome [33,37,38]. However, inspection of our assemblies always showed the predominance of a single variant throughout the entire genome, without any clear evidence of multiple infections, suggesting that these particular consensus sequences do represent contiguous strain sequences (data not shown).

To compare the utility of 454 GS FLX and IGA datasets in the characterization of HCMV genomes, *de novo* assemblies were constructed using only 454 GS FLX or IGA data and a combination of both. A commercial package, the *CLC Genomics Workbench*, was compared to *MIRA* and *Velvet*, which are freely available. *MIRA* was used for assembly of 454 GS FLX data, while IGA data were assembled with *Velvet*. *Velvet* uses a de Bruijn graph strategy which is better suited for large datasets than the overlap-layout-consensus strategy that *MIRA* utilizes [39]. Both datasets were combined through a *Phrap* assembly of combined contigs. The performance of *de novo* assemblies was compared by mapping the resulting contigs on the appropriate consensus sequence that was derived earlier. A complete overview of results for each dataset is presented in Table S2. Here, we present the range of n50 contig lengths (Figure 3a) and number of gaps left when contigs were mapped to the consensus sequence (Figure 3b). The n50 contig length states that 50% of the entire assembly is comprised in contigs equal to or larger than this length. These data clearly illustrate that IGA datasets produce assemblies that are comparable to those using both datasets combined. Both n50 contig length and number of gaps do not significantly differ between both cases (Wilcoxon Signed Ranks Test; n50 contig length: $p = 0.123$; gaps: $p = 0.055$). The n50 contig length is drastically lowered by using only 454 GS FLX data, which consequently increases the number of gaps left after the initial assembly (Wilcoxon Signed Ranks Test; n50 contig length: $p < 0.001$; gaps: $p < 0.001$). Our results show that IGA datasets outperform 454 GS FLX datasets. IGA sequencing has a higher throughput and lower cost per base and therefore achieves much higher coverages than 454 GS FLX sequencing in this study (Table 1). The benefits of this higher coverage clearly outweigh the longer length of 454 GS FLX reads for *de novo* HCMV genome assembly. In fact, the combined use of 454 GS FLX and IGA datasets does not significantly alter *de novo* contig length. Taking into account the higher error rates of 454 GS FLX sequencing in homopolymeric stretches [40], IGA would be the preferred platform of both for high-throughput sequencing of HCMV isolates.

Based on n50 contig lengths, commercially and freely available software packages delivered no significantly different assemblies (Wilcoxon Signed Ranks Test; $p = 0.933$). There was, however, a small but significant difference in the number of gaps left in the assembly, with the freeware assemblies containing less gaps (Wilcoxon Signed Ranks Test; $p = 0.031$). When IGA data were involved, the assemblies produced by the *CLC Genomics Workbench* showed a smaller range in n50 contig lengths than *Velvet* assemblies. Assembly of IGA data using the *CLC Genomics Workbench* is in fact more user-friendly than *Velvet* assemblies that have to be optimized manually by adjusting several parameters. This optimization step makes these assemblies less reproducible.

Table 1. Mapping of 454 GS FLX and IGA reads to strain consensus sequences.

Strain	GenBank accession	Isolate and/or passage number	# reads mapped	# reads unmapped	% reads mapped	qPCR sample purity	Average read depth (454 GS FLX + IGA)
Merlin	NC_006273		5,855,670	76,782	99	100	1306 (23+1283)
BE/9/2010	KC519319	p2	7,166,157	351,662	95	100	1611 (43+1568)
		p5	8,934,863	226,933	98	100	1978 (19+1959)
		p7	8,445,946	607,953	93	99	1879 (28+1851)
		p11	6,781,195	1,542,530	81	74	1507 (22+1485)
BE/10/2010	KC519320	i1 p2	10,359,782	63,203	99	100	2262 (22+2240)
		i2 p2	5,963,342	50,527	99	100	1314 (27+1287)
BE/11/2010	KC519321	p2	8,855,022	325,142	96	99	1971 (30+1941)
		p5	9,205,907	470,107	95	100	2046 (26+2020)
		p9	5,751,100	682,788	89	92	1275 (13+1262)
BE/21/2010	KC519322	up	5,429,700	39,097,554	12	85	1077 (0+1077)
		p4	6,008,424	209,938	97	84	1390 (64+1326)
BE/27/2010	KC519323	i1 p4	1,190,000	2,150,782	36	90	273 (14+259)
		i2 p4	1,256,717	89,568	93	97	328 (44+284)

i = isolate number.

p = passage number.

up = unpassaged.

doi:10.1371/journal.pone.0095501.t001

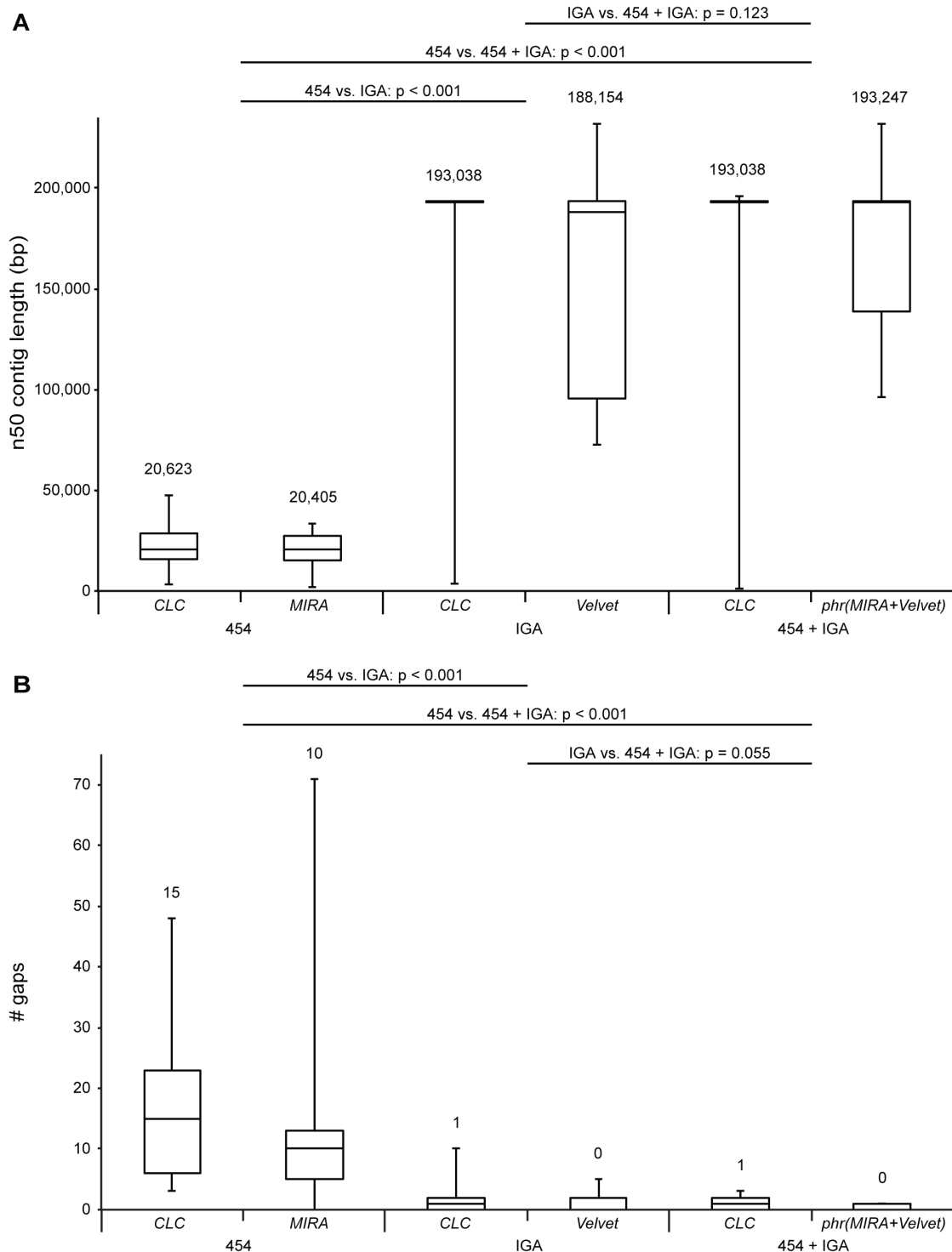


Figure 3. Assembly performance using 454 GS FLX, IGA or both and freeware or commercial software suites. Boxplots representing [A] the range of n50 contig lengths and [B] number of gaps in contig coverage of consensus sequences after *de novo* assembly of respectively 454 GS FLX, IGA or combined datasets. The central line in the box represents the median, top and bottom represent the 75 and 25 percentile and error bars represent minimum and maximum values. Median values are stated above each boxplot. Datasets (454 GS FLX and/or IGA) and software suites (CLC *Genomics Workbench*, MIRA, Velvet or Phrap combining MIRA and Velvet assemblies) are indicated below the plots. Since normality was violated, overall differences for n50 contig length and number of gaps were tested with the non-parametric Friedman test ($n = 13$; n50 contig length: $\chi^2(5) = 42.506$, $p < 0.001$; gaps: $\chi^2(5) = 37.275$, $p < 0.001$). Comparisons between assemblies based on different datasets were made using the Wilcoxon Signed Ranks Test with Bonferroni correction; p-values are reported in the figure. Because of the Bonferroni correction, differences are only significant when $p < 0.017$.

doi:10.1371/journal.pone.0095501.g003

Recently, novel freeware *de novo* assembly algorithms have been released that show improved performance and could be better alternatives to the commercial assembly options than *Velvet* [41–44].

Consensus Sequences are Representative for the HCMV Population Present in the Original Clinical Isolate

Four different approaches were combined to validate the consensus sequences that were generated using our preparation, sequencing and assembly pipeline. (1) Reference strain Merlin was resequenced and (2) consensus sequences of independent isolates of the same patient (BE/10/2010 and BE/27/2010) were compared. (3) Strain BE/21/2010 was sequenced both directly from clinical material and after cell culture passage to evaluate how the consensus sequence was altered during cell culture adaptation. (4) Finally, strains BE/9/2010 and BE/11/2010 were sampled at different culture passages (2–11 passages) to characterize potential changes in the consensus sequence during further adaptation to cell culture.

(1) To validate our workflow, the HCMV reference strain Merlin was grown for one additional passage and harvested using the aforementioned protocol. The consensus sequence was generated using a *de novo* approach and the original reference sequence was only used to guide assembly of *de novo* contigs. The generated consensus sequence was aligned to the original reference [10]. Only two SNPs were detected between both sequences. The first SNP was situated in gene UL32, encoding the major tegument protein pp150, resulting in a silent CTC to CTG substitution at amino acid position 1,038. When the read alignment of the assembly was inspected, this mutation was observed in 65% of reads, with the other 35% still displaying the wild-type G. Another SNP, a G to C substitution, was initially noted in the IRL at nucleotide position 195,063. However, when variants that were segregated between IRL and TRL copies were added up, it was noted that only 24% of reads contained this substitution. Interestingly, these two substitutions were also noted when Merlin was cloned into a BAC and resequenced by Stanton and colleagues [45]. They reported the substitution in UL32 to be a single nucleotide polymorphism in the original Merlin population. The fact that these SNPs were also found using our workflow confirms that these were present in the original viral population.

(2) To assess the reproducibility of our consensus-generating pipeline, we independently passaged twice two samples taken from the same patient on the same day (BE/10/2010 i1 and BE/10/2010 i2) and subsequently purified, sequenced and assembled the genomes. After analysis, nearly identical consensus sequences were obtained with only a minor length difference in three homopolymer regions (Table S5). Likewise, strains BE/27/2010 i1 and BE/27/2010 i2 were derived from sequential isolates of the same patient, derived with an interval of 49 days. Both samples were independently passaged four times in E₁SM cells and processed in our workflow after which consensus sequences were compared. Sequences only differed in the length of one homopolymer region (Table S5). All apprehensive homopolymer regions were situated in non-coding regions. These findings show that the generated consensus sequences are reproducible and furthermore indicate that the consensus sequence of strain BE/27/2010 remained stable during 49 days of intrahost viral replication.

(3) Strain BE/21/2010 was isolated and sequenced directly from HCMV-positive urine and simultaneously passaged four times in E₁SM cells to characterize potential changes in the consensus sequence during initial adaptation to cell culture. A substitution was detected in gene UL30 (A13G) in 45% of reads derived from the passaged isolate. Differences between both

consensus sequences were only situated in the length of four homopolymer regions and one trinucleotide repeat (Table 2). These regions also display variable lengths in different HCMV strains. Furthermore, a closer inspection of the assembly in these regions revealed some repeat length heterogeneity in NGS reads. This could both reflect technological constraints in the prediction of homopolymer lengths and inpatient variability in repeat lengths. Given the fact that these repeats are mostly situated in non-coding sequences and these regions are inherently of variable length in different isolates, it seems perfectly conceivable that inpatient heterogeneity exists. In fact, the length difference in the trinucleotide repeat cannot be explained by homopolymer error and thus probably reflects inpatient heterogeneity.

(4) To characterize potential changes during further adaptation of HCMV to fibroblast replication, strains BE/9/2010 and BE/11/2010 were sampled and sequenced at different culture passages. Strain BE/9/2010 was sequenced after passage 2, 5, 7 and 11. Consensus sequences were derived independently. Consensus sequences for passages 2, 5 and 7 were identical, whereas passage 11 contained one substitution in gene UL44 (A128V), which encodes the DNA polymerase processivity subunit [46]. Analysis of the read alignments indicate that this mutation had arisen somewhere between passage 2 and 5 and was gradually becoming the dominant type at this position. At passage 2, all reads displayed the wild-type while at passage 5 the mutation was present in 3% of the reads. At passage 7 and 11, this fraction had risen to 33% and 77% respectively. This variability of UL44 has been shown before by Dargan *et al.*, albeit at different positions and at much higher passage numbers [34]. Subsequently, strain BE/11/2010 was sequenced after passage 2, 5 and 9. All derived consensus sequences were identical. To summarize, both strain's sequences analyzed with the presented workflow were perfectly matching (up to passage 11), indicating that potential mutations during this period would not have a considerable impact on the overall consensus sequence.

It has been shown that gene RL13 and one of the genes of the UL128 locus (UL128, UL130 and UL131A; together UL128L) consistently mutate during passaging because of their inhibitory effect on HCMV replication in fibroblasts [34,45]. Interestingly, none of the five strains that were sequenced in our study showed obvious gene-disrupting mutations in UL128L or RL13. This would indicate that the strains had not yet undergone these hallmark mutations that accompany the initial adaptation to growth in human fibroblasts and could therefore be considered genetically unaltered by cell culture. It cannot be excluded however, that some of these strains do contain mutations in UL128L or RL13. Mutations could be present at different positions in different members of the viral population, which would result in a wild-type consensus sequence, as was the case for RL13 in Merlin [45].

Taken together, these validation experiments indicate that the presented workflow had only a minimal impact on consensus sequences of the clinical isolates under study. Most of the differences detected between independent replicates could most likely be attributed to heterogeneity of repeat lengths in the original clinical isolates. The stability of sequences throughout these procedures shows that they are characteristic for the original strains present in clinical isolates.

Genome Sequences Confirm Presence of Gene-disrupting Mutations in Clinical HCMV Isolates

Adaptation of HCMV strains to cell culture is accompanied by changes in the HCMV genome, including gene-disrupting mutations [6,34]. More recently, evidence indicated that HCMV

Table 2. Comparison of strain BE/21/2010 consensus sequences, derived directly from the clinical material (BE/21/2010 up) and after four cell culture passages (BE/21/2010 p4).

Nucleotide position	Genome region	BE/21/2010 up	BE/21/2010 p4	Length range in other HCMV strains
6,055–63	non-coding, UL	9–10 C's	9–10 C's	7–12
96,658–81	ncRNA4.9	23–24 T's	23–24 T's	7–24
99,184–207	UL69	5–8 CGG's	8 CGG's	2–8
231,849–60	non-coding, US	9–13 G's	10–13 G's	8–15
232,207–20	non-coding, US	11–15 G's	11–15 G's	9–15

doi:10.1371/journal.pone.0095501.t002

mutants could be present in unpassaged clinical isolates as well [17,34]. Strain JP was sequenced without *in vitro* amplification and was mutated in genes RL5A and UL111A [17]. We analyzed strain BE/21/2010 directly from clinical material and identified disruptive mutations in RL5A, UL9 and UL150. Furthermore, we examined ORFs currently annotated on the HCMV reference strain Merlin for the presence of gene-disrupting mutations in the other four strains under study and found that genes RL5A, UL1, UL9 and UL111A could contain disruptive mutations (Table 3). Mutations in RL5A, UL1, UL9 and UL111A have been identified in earlier publications [17,18,34]. The transgenic strain CINCYP+ Towne (NCBI GenBank acc. no. GU980198) has a frameshift-inducing deletion in UL150, but this strain was passaged several times in human fibroblasts. To our knowledge this is the first report about a gene-disrupting mutation in UL150 present in an uncultured viral isolate. To rule out the possibility that mutations in strains BE/10/2010, BE/11/2010 and BE/27/2010 were acquired during passaging, viral genes of interest were PCR amplified and sequenced from the original clinical material (Table S6). All verified gene sequences from the clinical material corresponded to the sequences generated with NGS from the passaged material. Furthermore, identical mutations were present in distinct strains (Table 3). The fact that these mutations are conserved between independent and even geographically unrelated isolates provides a further indication of their widespread occurrence in clinical HCMV isolates.

HCMV gene family RL11 stands out in particular with several members (RL5A, RL6, UL1 and UL9) being suggested here and/or elsewhere to be mutated *in vivo* [17,34,47]. Most of these genes are hypervariable and their gene products are poorly characterized. UL1 encodes an envelope glycoprotein that was suggested to

be a cell-type specific tropism factor [48], but for RL5A, RL6 and UL9 no functionality data are available. The same holds for gene UL150. Most interestingly, gene UL111A is mutated in strain BE/27/2010, the previously sequenced strains JP and PH and four isolates from renal transplant recipients [17,49]. Strains BE/27/2010 and JP have deletions of 220 bp and 38 bp, which interfere with splicing of the second and first exon respectively. Strain PH has a substitution in the splice-acceptor site for the second exon. In the renal transplant recipients, three isolates (NCBI GenBank acc. no. EF488364-6) share a 5 bp deletion in the first exon, while a fourth isolate (EF535834) has a nonsense mutation in the first exon. UL111A encodes a viral interleukin-10 homolog, which has been shown to be involved in immune regulation, both during lytic and latent replication [50]. The observed existence of UL111A mutants in natural settings may have clinical significance, although more research is warranted to characterize the occurrence of mutations in different patient groups, both immunocompetent and immunocompromised. Interestingly, UL111A mutants have only been described in transplant recipients (BE/27/2010, PH and renal transplant isolates) or AIDS patients (JP), suggesting that the presence of these UL111A mutants could be associated with a defective immune system.

Our data indicate that the HCMV coding capacity is not fixed but can vary between different isolates. Additional full genome sequences from diverse patient groups and geographical areas are needed to characterize in further detail what ORFs can be mutated in clinical isolates, at what frequencies and in what patient groups.

Table 3. Gene-disrupting mutations in clinical HCMV strains.

Strain	RL5A	UL1	UL9	UL111A	UL150
BE/9/2010	wt	wt	wt	wt	wt
BE/10/2010	wt	wt	point mutation [°]	wt	wt
BE/11/2010	11 bp deletion ^{°'}	several point mutations*	wt	wt	wt
BE/21/2010	17 bp deletion ^{°'}	wt	point mutation	wt	2 bp deletion
BE/27/2010	11 bp deletion ^{°'}	several point mutations ^{°*}	point mutation [°]	220 bp deletion [°]	wt
Other published full genome strains	JP, HAN13 ^{°'}	JHC	AF1	JP, PH	CINCYP+Towne

wt = wild-type.

JP (GQ221975), HAN13 (GQ221973), JHC (HQ380895), AF1 (GU179291), PH (AC146904), CINCYP+Towne (GU980198).

[°]Mutations verified by PCR amplification (Table S6) and Sanger sequencing of the viral gene in the original clinical material.^{°'}Identical mutations in unrelated strains.

doi:10.1371/journal.pone.0095501.t003

Conclusion

The introduction of a new generation of sequencing technologies with high-throughput capacities has immensely impacted the field of genomics. Previous publications have provided a snapshot of the possible applications in the field of HCMV genomics and transcriptomics [12,13,16–18,33,38]. We believe that the amplification, sequencing and analysis workflow that we present in this study can help to maximize the efficiency of sequencing HCMV strains in high-throughput. Given the large genetic background of HCMV, it could be interesting to routinely elucidate the complete sequence of strains that are used in mutational studies. This should no longer be considered as extremely laborious or costly. Additionally, the analysis of clinical HCMV isolates could assist in the refinement of the HCMV genetic map. It will provide a better knowledge of viral mutants and in which patient populations they are circulating. Finally, it could prove to be of value in the ongoing quest for genetic determinants of viral pathogenicity that has eluded scientists for more than a decade [37,51,52].

Supporting Information

Table S1 Primers and probes for HCMV UL86 and human β -globin qPCR. (DOCX)

Table S2 Performance of HCMV *de novo* genome assembly with 454 GS FLX and/or IGA datasets and different assembly software suites. (XLSX)

Table S3 Primers and annealing temperatures for PCRs finishing the full genome sequences of strains BE/9/2010, BE/11/2010 and BE/21/2010. (DOCX)

Table S4 *De novo* assembly of 454 GS FLX and IGA reads not mapping to the HCMV consensus sequence. (DOCX)

Table S5 Consensus sequences of strains BE/10/2010 i1 – BE/10/2010 i2 and strains BE/27/2010 i1 – BE/27/2010 i2, derived from the same patient, only differed in homopolymer lengths. (DOCX)

Table S6 Primers and annealing temperatures for PCRs amplifying mutated HCMV genes. (DOCX)

Acknowledgments

We would like to thank all colleagues of the Laboratory of Clinical Virology for helpful comments and insightful discussions. We are also indebted to the lab technicians of the molecular diagnostics unit (CEMOL) at the University Hospitals Leuven for cell culture inoculation of patient samples.

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: SS MVL JA MVR PM. Performed the experiments: SS KT MC S. Bollen S. Baguet. Analyzed the data: SS KT MC S. Bollen S. Baguet PM. Contributed reagents/materials/analysis tools: KT EV D MVL JA MVR PM. Wrote the paper: SS KT EV D MVL JA MVR PM.

References

- Cannon MJ, Schmid DS, Hyde TB (2010) Review of cytomegalovirus seroprevalence and demographic characteristics associated with infection. *Rev Med Virol* 20: 202–213.
- Britt W (2008) Manifestations of human cytomegalovirus infection: proposed mechanisms of acute and chronic disease. *Curr Top Microbiol Immunol* 325: 417–470.
- Murphy E, Shenk T (2008) Human cytomegalovirus genome. *Curr Top Microbiol Immunol* 325: 1–19.
- Chee MS, Bankier AT, Beck S, Bohni R, Brown CM, et al. (1990) Analysis of the protein-coding content of the sequence of human cytomegalovirus strain AD169. *Curr Top Microbiol Immunol* 154: 125–169.
- Cha TA, Tom E, Kemble GW, Duke GM, Mocarski ES, et al. (1996) Human cytomegalovirus clinical isolates carry at least 19 genes not found in laboratory strains. *J Virol* 70: 78–83.
- Prichard MN, Penfold ME, Duke GM, Spaete RR, Kemble GW (2001) A review of genetic differences between limited and extensively passaged human cytomegalovirus strains. *Rev Med Virol* 11: 191–200.
- Davison AJ, Dolan A, Akter P, Addison C, Dargan DJ, et al. (2003) The human cytomegalovirus genome revisited: comparison with the chimpanzee cytomegalovirus genome. *J Gen Virol* 84: 17–28.
- Murphy E, Rigoutsos I, Shibuya T, Shenk TE (2003) Reevaluation of human cytomegalovirus coding potential. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100: 13585–13590.
- Murphy E, Yu D, Grimwood J, Schmutz J, Dickson M, et al. (2003) Coding potential of laboratory and clinical strains of human cytomegalovirus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100: 14976–14981.
- Dolan A, Cunningham C, Hector RD, Hassan-Walker AF, Lee L, et al. (2004) Genetic content of wild-type human cytomegalovirus. *J Gen Virol* 85: 1301–1312.
- Zhang G, Raghavan B, Kotur M, Cheatham J, Sedmak D, et al. (2007) Antisense transcription in the human cytomegalovirus transcriptome. *J Virol* 81: 11267–11281.
- Gatherer D, Seirafian S, Cunningham C, Holton M, Dargan DJ, et al. (2011) High-resolution human cytomegalovirus transcriptome. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108: 19755–19760.
- Stern-Ginossar N, Weisburd B, Michalski A, Le VT, Hein MY, et al. (2012) Decoding human cytomegalovirus. *Science* 338: 1088–1093.
- Mardis ER (2008) Next-generation DNA sequencing methods. *Annu Rev Genom Hum G* 9: 387–402.
- Bankier AT, Beck S, Bohni R, Brown CM, Cerny R, et al. (1991) The DNA sequence of the human cytomegalovirus genome. *DNA Seq* 2: 1–12.
- Bradley AJ, Lurain NS, Ghazal P, Trivedi U, Cunningham C, et al. (2009) High-throughput sequence analysis of variants of human cytomegalovirus strains Towne and AD169. *J Gen Virol* 90: 2375–2380.
- Cunningham C, Gatherer D, Hilfrich B, Baluchova K, Dargan DJ, et al. (2010) Sequences of complete human cytomegalovirus genomes from infected cell cultures and clinical specimens. *J Gen Virol* 91: 605–615.
- Jung GS, Kim YY, Kim JL, Ji GY, Jeon JS, et al. (2011) Full genome sequencing and analysis of human cytomegalovirus strain JHC isolated from a Korean patient. *Virus Res* 156: 113–120.
- Billiau A, Edy VG, Heremans H, Vandamme J, Desmyter J, et al. (1977) Human Interferon - Mass-Production in a Newly Established Cell Line, Mg-63. *Antimicrob Agents Ch* 12: 11–15.
- Sinzger C, Knapp J, Schmidt K, Kahl M, Jahn G (1999) A simple and rapid method for preparation of viral DNA from cell associated cytomegalovirus. *J Virol Methods* 81: 115–122.
- Fronhoffs S, Totzke G, Stier S, Wernert N, Rothe M, et al. (2002) A method for the rapid construction of cRNA standard curves in quantitative real-time reverse transcription polymerase chain reaction. *Mol Cell Probes* 16: 99–110.
- Chevreux B, Pfisterer T, Drescher B, Driesel AJ, Muller WE, et al. (2004) Using the miraEST assembler for reliable and automated mRNA transcript assembly and SNP detection in sequenced ESTs. *Genome Res* 14: 1147–1159.
- Chevreux B, Wetter T, Suhai S (1999) Genome sequence assembly using trace signals and additional sequence information. *Computer science and biology: proceedings of the German conference on bioinformatics (GCB)* 99: 45–56.
- Zerbino DR, Birney E (2008) Velvet: algorithms for de novo short read assembly using de Bruijn graphs. *Genome Res* 18: 821–829.
- Machado M, Magalhaes WC, Sene A, Araujo B, Faria-Campos AC, et al. (2011) Phred-Phrap package to analyses tools: a pipeline to facilitate population genetics re-sequencing studies. *Investig Genet* 2: 3.
- Kurtz S, Phillippy A, Delcher AL, Smoot M, Shumway M, et al. (2004) Versatile and open software for comparing large genomes. *Genome Biol* 5: R12.
- Milne I, Bayer M, Cardle L, Shaw P, Stephen G, et al. (2010) Tablet—next generation sequence assembly visualization. *Bioinformatics* 26: 401–402.
- Milne I, Stephen G, Bayer M, Cock PJ, Pritchard L, et al. (2012) Using Tablet for visual exploration of second-generation sequencing data. *Brief Bioinform.*
- Katoh K, Toh H (2010) Parallelization of the MAFFT multiple sequence alignment program. *Bioinformatics* 26: 1899–1900.
- Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, et al. (2011) MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Mol Biol Evol* 28: 2731–2739.
- Camacho C, Coulouris G, Avagyan V, Ma N, Papadopoulos J, et al. (2009) BLAST+: architecture and applications. *BMC Bioinformatics* 10: 421.

32. Huson DH, Mitra S, Ruscheweyh HJ, Weber N, Schuster SC (2011) Integrative analysis of environmental sequences using MEGAN4. *Genome Res* 21: 1552–1560.
33. Renzette N, Bhattacharjee B, Jensen JD, Gibson L, Kowalik TF (2011) Extensive genome-wide variability of human cytomegalovirus in congenitally infected infants. *PLoS Pathog* 7: e1001344.
34. Dargan DJ, Douglas E, Cunningham C, Jamieson F, Stanton RJ, et al. (2010) Sequential mutations associated with adaptation of human cytomegalovirus to growth in cell culture. *J Gen Virol* 91: 1535–1546.
35. Lasken RS (2009) Genomic DNA amplification by the multiple displacement amplification (MDA) method. *Biochem Soc Trans* 37: 450–453.
36. Direito SOL, Zaura E, Little M, Ehrenfreund P, R  ling WFM (2014) Systematic evaluation of bias in microbial community profiles induced by whole genome amplification. *Environ Microbiol* 16(3): 643–657.
37. Puchhammer-Stockl E, Gorzer I (2011) Human cytomegalovirus: an enormous variety of strains and their possible clinical significance in the human host. *Future Virol* 6: 259–271.
38. Gorzer I, Guelly C, Trajanoski S, Puchhammer-Stockl E (2010) Deep sequencing reveals highly complex dynamics of human cytomegalovirus genotypes in transplant patients over time. *J Virol* 84: 7195–7203.
39. Li Z, Chen Y, Mu D, Yuan J, Shi Y, et al. (2012) Comparison of the two major classes of assembly algorithms: overlap-layout-consensus and de-bruijn-graph. *Brief Funct Genomics* 11: 25–37.
40. Archer J, Baillie G, Watson SJ, Kellam P, Rambaut A, et al. (2012) Analysis of high-depth sequence data for studying viral diversity: a comparison of next generation sequencing platforms using Segminator II. *BMC Bioinformatics* 13: 47.
41. Peng Y, Leung HC, Yiu SM, Chin FY (2012) IDBA-UD: a de novo assembler for single-cell and metagenomic sequencing data with highly uneven depth. *Bioinformatics* 28: 1420–1428.
42. Bankevich A, Nurk S, Antipov D, Gurevich AA, Dvorkin M, et al. (2012) SPAdes: a new genome assembly algorithm and its applications to single-cell sequencing. *J Comput Biol* 19: 455–477.
43. Magoc T, Pabinger S, Canzar S, Liu X, Su Q, et al. (2013) GAGE-B: an evaluation of genome assemblers for bacterial organisms. *Bioinformatics* 29: 1718–1725.
44. Nurk S, Bankevich A, Antipov D, Gurevich AA, Korobeynikov A, et al. (2013) Assembling single-cell genomes and mini-metagenomes from chimeric MDA products. *J Comput Biol* 20: 714–737.
45. Stanton RJ, Baluchova K, Dargan DJ, Cunningham C, Sheehy O, et al. (2010) Reconstruction of the complete human cytomegalovirus genome in a BAC reveals RL13 to be a potent inhibitor of replication. *J Clin Invest* 120: 3191–3208.
46. Weiland KL, Oien NL, Homa F, Wathen MW (1994) Functional analysis of human cytomegalovirus polymerase accessory protein. *Virus Res* 34: 191–206.
47. Sekulin K, Gorzer I, Heiss-Czedik D, Puchhammer-Stockl E (2007) Analysis of the variability of CMV strains in the RL11D domain of the RL11 multigene family. *Virus Genes* 35: 577–583.
48. Shikhagaie M, Merce-Maldonado E, Isern E, Muntasell A, Alba MM, et al. (2012) The human cytomegalovirus-specific UL1 gene encodes a late-phase glycoprotein incorporated in the virion envelope. *J Virol* 86: 4091–4101.
49. Garrigue I, Corte MF, Magnin N, Couzi L, Capdepon S, et al. (2007) Variability of UL18, UL40, UL111a and US3 immunomodulatory genes among human cytomegalovirus clinical isolates from renal transplant recipients. *J Clin Virol* 40: 120–128.
50. Slobodman B, Barry PA, Spencer JV, Avdic S, Abendroth A (2009) Virus-encoded homologs of cellular interleukin-10 and their control of host immune function. *J Virol* 83: 9618–9629.
51. Pignatelli S, Dal Monte P, Rossini G, Landini MP (2004) Genetic polymorphisms among human cytomegalovirus (HCMV) wild-type strains. *Rev Med Virol* 14: 383–410.
52. Puchhammer-Stockl E, Gorzer I (2006) Cytomegalovirus and Epstein-Barr virus subtypes—the search for clinical significance. *J Clin Virol* 36: 239–248.

High-Throughput Analysis of Human Cytomegalovirus Genome Diversity Highlights the Widespread Occurrence of Gene-Disrupting Mutations and Pervasive Recombination

Steven Sijmons,^a Kim Thys,^b Mirabeau Mbong Ngwese,^a Ellen Van Damme,^b Jan Dvorak,^c Marnix Van Look,^b Guangdi Li,^d Ruth Tachezy,^c Laurent Busson,^e Jeroen Aerssens,^b Marc Van Ranst,^a Piet Maes^a

KU Leuven, Laboratory of Clinical Virology, Department of Microbiology and Immunology, Leuven, Belgium^a; Janssen Infectious Diseases BVBA, Beerse, Belgium^b; Department of Experimental Virology, Institute of Hematology and Blood Transfusion, Prague, Czech Republic^c; Metabolic Syndrome Research Center, the Second Xiangya Hospital, Central South University, Changsha, Hunan, China^d; Department of Microbiology, Iris-Lab, Brussels, Belgium^e

ABSTRACT

Human cytomegalovirus is a widespread pathogen of major medical importance. It causes significant morbidity and mortality in immunocompromised individuals, and congenital infections can result in severe disabilities or stillbirth. Development of a vaccine is prioritized, but no candidate is close to release. Although correlations of viral genetic variability with pathogenicity are suspected, knowledge about the strain diversity of the 235-kb genome is still limited. In this study, 96 full-length human cytomegalovirus genomes from clinical isolates were characterized, quadrupling the amount of information available for full-genome analysis. These data provide the first high-resolution map of human cytomegalovirus interhost diversity and evolution. We show that cytomegalovirus is significantly more divergent than all other human herpesviruses and highlight hot spots of diversity in the genome. Importantly, 75% of strains are not genetically intact but contain disruptive mutations in a diverse set of 26 genes, including the immunomodulatory genes UL40 and UL11A. These mutants are independent of culture passage artifacts and circulate in natural populations. Pervasive recombination, which is linked to the widespread occurrence of multiple infections, was found throughout the genome. The recombination density was significantly higher than those of other human herpesviruses and correlated with strain diversity. While the overall effects of strong purifying selection on virus evolution are apparent, evidence of diversifying selection was found in several genes encoding proteins that interact with the host immune system, including UL18, UL40, UL142, and UL147. These residues may present phylogenetic signatures of past and ongoing virus-host interactions.

IMPORTANCE

Human cytomegalovirus has the largest genome of all viruses that infect humans. Currently, there is a great interest in establishing associations between genetic variants and strain pathogenicity of this herpesvirus. Since the number of publicly available full-genome sequences is limited, knowledge about strain diversity is highly fragmented and biased toward a small set of loci. Combined with our previous work, we have now contributed 101 complete genome sequences. We have used these data to conduct the first high-resolution analysis of interhost genome diversity, providing an unbiased and comprehensive overview of cytomegalovirus variability. These data are of major value to the development of novel antivirals and a vaccine and to identify potential targets for genotype-phenotype experiments. Furthermore, these data have enabled a thorough study of the evolutionary processes that have shaped cytomegalovirus diversity.

Human cytomegalovirus (HCMV), the prototype member of the herpesvirus subfamily *Betaherpesvirinae*, is a widespread and important pathogen. Seroprevalence in the adult population ranges from 45% to 100% (1). After primary infection, HCMV establishes a lifelong, latent infection in myeloid progenitor cells (2). This virus causes mild to no symptoms in immunocompetent individuals but is responsible for considerable morbidity and mortality in immunocompromised individuals such as AIDS patients and transplant recipients (3). Furthermore, infection of the developing fetus can lead to sensorineural hearing loss, neurodevelopmental delay, or stillbirth, making HCMV a notorious congenital pathogen in both developed and developing countries (4). In the United States alone, total health care costs related to HCMV exceed \$4.4 billion annually. Consequently, HCMV has been included among high-priority targets in vaccine prioritization reports by the U.S. Institute of Medicine (5). Several vaccine candidates are currently in early development, but licensure is not forthcoming (6).

With a length of 235 kb, HCMV has the longest genome of any

known virus infecting humans (7). It is composed of a linear double-stranded DNA (dsDNA) helix and is structured in the characteristic herpesvirus class E architecture, combining two unique

Received 3 March 2015 Accepted 8 May 2015

Accepted manuscript posted online 13 May 2015

Citation Sijmons S, Thys K, Mbong Ngwese M, Van Damme E, Dvorak J, Van Look M, Li G, Tachezy R, Busson L, Aerssens J, Van Ranst M, Maes P. 2015. High-throughput analysis of human cytomegalovirus genome diversity highlights the widespread occurrence of gene-disrupting mutations and pervasive recombination. *J Virol* 89:7673–7695. doi:10.1128/JVI.00578-15.

Editor: L. Hutt-Fletcher

Address correspondence to Steven Sijmons, steven.sijmons@rega.kuleuven.be, or Piet Maes, piet.maes@rega.kuleuven.be.

Supplemental material for this article may be found at <http://dx.doi.org/10.1128/JVI.00578-15>.

Copyright © 2015, American Society for Microbiology. All Rights Reserved. doi:10.1128/JVI.00578-15

regions (unique long [UL] and unique short [US]) that are both flanked by a pair of inverted repeats (terminal repeat long/internal repeat long [TRL/IRL] and internal repeat short/terminal repeat short [IRS/TRS]). UL and US regions can be inserted in both directions between repeats, giving rise to four genome isomers (8). Genetic and antigenic heterogeneity of HCMV isolates was reported early on in cytomegalovirus (CMV) research by neutralization, hybridization, and restriction fragment length polymorphism assays (9–11). This was further confirmed by full-genome analyses of a few clinical isolates (7, 12). PCR sequencing of several hypervariable loci indicated that these loci exist as separate clusters of polymorphisms or genotypes (reviewed in references 13–15). These findings have spiked the interest of clinical virologists in identifying potential correlations between genetic variants and the pathogenic potential of different isolates. Several studies have found some evidence to correlate specific genotypes with disease outcome, investigating polymorphisms in the UL55 (glycoprotein B) (16–19), UL73 (glycoprotein N) (20–22), UL75 (glycoprotein H) (23), UL144 (tumor necrosis factor alpha [TNF- α]-like receptor) (24–26), and UL146 and UL147 (viral CXCL chemokines) (27, 28) genes. Others, however, found no evidence of these relationships (29–32). Overall, these studies have focused on one or, at best, a few genes at a time, ignoring the influence of other variable regions in the genome. Furthermore, variations in more conserved genes could also have a major impact on strain phenotype, as shown for the UL18 gene, encoding a major histocompatibility complex class I (MHC-I) homolog (33, 34). In the near future, more comprehensive approaches that characterize complete viral genomes will become feasible and, if applied to sufficiently large and well-defined patient cohorts, should provide clearer insights into viral determinants of infection outcome.

The introduction of next-generation sequencing (NGS) nearly a decade ago has drastically altered the genomics field and has already shown its promise in the characterization of both inter- and intrahost HCMV diversity (reviewed in reference 35). Despite these recent developments, the number of publicly available complete genomic sequences from clinically representative, low-passage-number HCMV strains is still limited. Considering the established diversity in several genes, there is a clear need to characterize more complete genomic sequences from clinical isolates. In this study, we provide the first high-resolution map of HCMV diversity and evolution through the characterization of 96 additional isolates, quadrupling the amount of publicly available full-genome sequence information. From these data, a wide extent of gene-disrupting mutations in clinical isolates becomes apparent, independent of passage artifacts. Furthermore, we corroborate the important role of recombination in HCMV evolution and identify signatures of selective pressure acting on individual protein residues. This study provides an important compendium of data concerning strain diversity that will be of outstanding value for future research efforts into understanding viral pathogenesis and developing antivirals and vaccines against this important pathogen.

MATERIALS AND METHODS

Patient samples, virus culture, and DNA purification. Both the KU Leuven and University Hospitals Leuven Ethical Committees approved the study protocol (protocol number S55970). A total of 100 samples were collected from different HCMV patients. An overview of all samples included in this study is given in Table S1 in the supplemental material. Samples were collected at the University Hospitals Leuven ($n = 81$) and

Saint-Pierre University Hospital ($n = 13$) in Belgium and at the Institute of Hematology and Blood Transfusion in the Czech Republic ($n = 6$). Virus culture, DNA purification, and amplification were executed as described previously (36). Briefly, samples were inoculated onto E₁SM fibroblasts and cultured for the number of passages listed in Table S1 in the supplemental material. When isolated foci of cytopathic effects became apparent, viral DNA was isolated by Triton X-100-mediated lysis and micrococcal nuclease digestion of cellular DNA. After DNA extraction, viral DNA was amplified by multiple-displacement amplification.

Sequencing and assembly of genome sequences. Library preparation for 454 and Illumina sequencing was performed as described previously (36). Libraries were sequenced on the 454 GS FLX (Roche) and GAIIX and HiSeq2000 (Illumina) platforms (see Table S1 in the supplemental material). Full-genome consensus sequences were derived by using an approach that has been discussed extensively, with some modifications (36). This approach consisted of *de novo* assembly, scaffolding of contigs on HCMV reference sequences, and construction of a hybrid reference combining contig and background reference sequences. Finally, the genome consensus sequence of the strain under study was derived by mapping of sequence reads onto this hybrid reference. The whole assembly procedure was performed by using CLC Genomics Workbench v6.0.2 (Qiagen). Sequence reads were quality trimmed by using a base-calling error probability cutoff of 0.05 and a maximum of 2 ambiguities in each read. After *de novo* assembly with standard settings, a reference sequence was selected based on BLAST analyses of all contigs of >1 kb. Subsequently, all *de novo* contigs (or the 2,000 longest contigs when there were $>2,000$ contigs) were assembled with the selected reference sequence (“assemble sequences to reference” with standard settings), and the hybrid reference was derived by using the “extract consensus sequence” option, whereby areas without coverage in the assembly were filled from the reference sequence. Sequence reads were then mapped to the hybrid reference with standard settings and the “create stand-alone read mappings” option. The process of consensus extraction and sequence read mapping was repeated until the number of reads mapping to the consensus stopped increasing. The final assembly was visualized with Tablet v1.12.12.05, manually inspected, and corrected if necessary (37). At this point, most genomes still had a problematic assembly quality in the internal repeat area. Assemblies were then cut at these regions, and the separate contigs were extended and eventually joined by iterative mapping of sequence reads. Remaining uncertainties were resolved via PCR amplification and Sanger sequencing, as described previously (36). Data concerning the number of sequence reads mapping to the final genome consensus and average read depth are summarized in Table S1 in the supplemental material.

Sequence alignment and genome annotation. A DNA sequence alignment of all 101 in-house-derived and 27 additional full-genome sequences was constructed with MAFFT v7.158b, option FFT-NS-i (maximum of 1,000 cycles) (38). Previously reported strains that were used in this study are listed in Table S1 in the supplemental material. Full-genome sequences of strains AD169, Towne, and Davis were omitted from all analyses since they are derived from highly passaged laboratory strains with obscure passage histories. It has been well established that these strains are genetically severely altered by these procedures (39–41). Alignment inspection and editing were done with MEGA6 (42). NCBI GenBank annotations of reference strain Merlin were identified in the alignment, and individual open reading frame (ORF) alignments were excised and realigned at the codon level by using the RevTrans v2.0 server with MAFFT v6.240 (43). As a service to the HCMV research community, we have shared fasta files containing all 170 gene alignments used for all gene-specific analyses. Strains containing gene-disrupting mutations were omitted on a gene-by-gene basis. The alignments can be downloaded at http://www.regatools.be/hcmv_gene_alignments.tar.gz. Genome annotations for NCBI GenBank entries were transferred from a genetically intact reference strain (BE/9/2010) by using RATT, with a word size of 30, a cluster size of 400, a maximum extend cluster of 500, and an identity cutoff of 40 (44). ORFs refractory to transfer because of sequence variability

ity or disruptive mutations were manually annotated by referral to the ORF-specific alignments.

Recent studies of HCMV transcription and translation at the full-genome level have hinted at the expression of a much more complicated pattern of RNAs and proteins than the 170 gene products that are currently annotated in the NCBI reference sequence for Merlin (45–47). These findings await further experimentation to firmly establish the expression of these additional products and their conservation in different strains. In our diversity analyses, we have therefore not yet included these putative genes, which often (partially) overlap previously annotated genes.

Analysis of ORF-disrupting mutations. Disruption of ORFs in specific strains was evaluated in the ORF-specific alignments. All mutations that disrupted ORF integrity compared to the majority of strains were noted (see Table S2 in the supplemental material). These mutations include indels that cause a frameshift leading to a completely altered protein sequence and/or premature termination; deletions including the original start codon or splice sites; and substitutions eliminating start codons, introducing stop codons, or affecting splice sites. Mutations that were shown previously to be artifacts of culture passage were omitted. Furthermore, if original clinical specimens were available, genes containing disruptive mutations were characterized by PCR and Sanger sequencing as described previously (36) (primer sequences and annealing temperatures are listed in Table S3 in the supplemental material).

Detection and analysis of tandem repeats. Tandem repeats (TRs) were identified in the reference strain Merlin genome sequence, using a method similar to the one described previously for herpes simplex virus 1 (HSV-1) (48). To avoid duplicate detection of identical TRs in TRL/TRS and IRL/IRS regions, the Merlin sequence was trimmed of its terminal repeat sequences. Perfect repeats with a period size (length of one repeat unit) of 1 to 6 were identified with MicroSatellite identification tool v1.0 (MISA) (<http://pgsc.ipk-gatersleben.de/misa/>). Homopolymers (period size of 1) were reported when they were longer than 5 copies (>5 nucleotides [nt]), TRs with a period size of 2 to 6 were reported when the total repeat length was >9 nt (5 copies with a period size of 2, 4 copies with a period size of 3, 3 copies with a period size of 4, and 2 copies with period sizes of 5 and 6). Compound repeats identified by MISA were divided into their individual constituent repeats. When these repeats were overlapping, the longest repeat was retained. Longer and nonperfect repeats were identified by using Tandem Repeat Finder v4.07b (TRF) with alignment weights 2, 5, and 5 for matches, mismatches, and indels, respectively, a minimum score of 40, and a maximum period size of 500 (49). If TRF repeats contained overlap, only the highest-scoring repeat was retained. MISA and TRF TR sets were then combined, retaining the longest TR in case of overlap. Subsequently, conservation of TRs identified in Merlin was assessed by referral to the multiple alignment of 124 complete HCMV genome sequences (see Table S1 in the supplemental material). TRs that showed overlap with the Merlin TRs and fulfilled the MISA or TRF criteria described above were identified as orthologous repeats. TRs that did not have orthologous repeats in >50% of strains were omitted from further analyses. For all TRs, period size, copy number, position in the genome (coding RNA/noncoding RNA [ncRNA]/intron/intergenic and UL/US/IRL/IRS), and repeat type (homopolymer, period of 1 nt; microsatellite, period of 2 to 9 nt; minisatellite, period of >9 nt) were recorded. TRs were reported to be conserved if >50% of strains had identical sequences and copy numbers.

Phylogenetic analyses. To maximize the amount of genetic information included in our analyses, strains Toledo, TB40/E, 6397, and HAN2 were omitted from the full-genome alignment, along with the previously excluded strains AD169, Towne, and Davis (see Table S1 in the supplemental material). These strains all contain large genome deletions and/or rearrangements that interfere with a proper alignment. Since sites containing gaps in one or more strains are omitted from several diversity calculations, this would lead to the loss of important sequence information. Genome-wide diversity estimates are thus based on a set of 124

full-genome sequences, 101 of which were sequenced in our laboratory (see Table S1 in the supplemental material). For analyses at the gene level, the complete set of 128 low-passage-number strains was used, although strains mutated in a specific gene were omitted on a gene-by-gene basis (see Table S2 in the supplemental material).

Genome-wide diversity statistics were calculated by using DnaSP v5.10 and MEGA6 (42, 50). Nucleotide diversity (π), the number of polymorphic sites, and the average number of nucleotide differences were calculated by using the DNA polymorphism option of DnaSP, excluding gapped sites. A sliding window of π along the genome alignment was constructed with a window size of 500 nt and a step size of 100 nt. To compare HCMV diversity to those of the other human herpesviruses, the overall mean distance (Jukes-Cantor model) and transition/transversion ratio were calculated for genome alignments of available strain sequences of all human herpesviruses by using the overall mean distance option of MEGA6, with pairwise deletion of gapped sites.

Phylogenetic network analyses were performed with SplitsTree v4.13.1 (51). Neighbor-net split networks were constructed by using uncorrected p -distances and excluding gap sites. Network construction using the Jukes-Cantor model instead of p -distances yielded similar network topologies. Recombination was further studied with the BootScan function of SimPlot v3.5.1, using a window size of 2,000 nt, a step size of 500 nt, gap stripping, empirical transition/transversion ratio, neighbor-joining tree construction with the Kimura two-parameter model, and 100 bootstrap replicates (52). Recombination estimates for HCMV, HSV-1, varicella-zoster virus (VZV), and Epstein-Barr virus (EBV) were compared by analyzing an equal set of 9 full-genome sequences (the total number of strains available for EBV). Strains of HCMV, HSV-1, and VZV were chosen to best cover total diversity based on a split network of all strains (see Fig. 6A and 7). Recombination breakpoints were analyzed by using Recombination Detection Program (RDP) v3.44 (53). This program combines several recombination detection algorithms. Detection of breakpoints with RDP, GENECONV, Chimera, MaxChi, and 3Seq were combined with secondary detection with BootScan and SiScan (only for testing of breakpoints identified by previously used methods). Analyses were run with the linear-sequences option, checking of alignment consistency, and automatic masking of identical sequences. Breakpoints were reported if they were detected by at least two independent methods and the Bonferroni-corrected P value was <0.05. Duplicate breakpoints were counted only once; uncertain breakpoints were omitted. Gene-level recombination was analyzed by using three separate approaches. First, evidence for recombination inside a gene was assessed with the Phi-test included in the SplitsTree package (54). This is a simple and robust test that determines whether recombination signals are detected in the alignment. Next, the genetic algorithm for recombination detection (GARD) reported whether recombination was present and identified presumable recombination breakpoints (55). GARD was run via the Datamonkey Web server of the HyPhy package (56, 57). Finally, recombination breakpoints were further identified by using RDP3 as described above. RDP3-detected breakpoints were used for calculations of breakpoint density, reporting the number of breakpoints per kilobase for each gene.

To assess the overall selection type acting on a gene, estimates of the ratio of nonsynonymous substitutions per nonsynonymous site (dN) to synonymous substitutions per synonymous site (dS) were made with MEGA6, using the Nei-Gojobori method (Jukes-Cantor) with 1,000 bootstrap replicates, treating gaps by pairwise deletion. Individual sites under positive or negative selection were further assessed by using the Datamonkey Web server of the HyPhy package. After inference of a nucleotide substitution model, recombination was detected by using GARD. Further analyses were based on either neighbor-joining trees of the complete gene when no recombination was detected or GARD-inferred trees of the separate recombination fragments. Subsequently, evidence of positive and negative selection at the codon level was assessed by using the SLAC, FEL, FUBAR, and MEME algorithms (58–60). The RCSB Protein Data Bank (PDB) was queried for structural data for HCMV proteins with

residues under positive selection. Such a structure was available only for pUL18 (PDB accession number 3D2U). Positively selected residues were visualized on the structure with UCSF Chimera v1.9 (61).

Statistical analyses. All statistical analyses were performed by using RStudio v0.98.1073. Comparisons of gene diversity (dN), recombination density (breakpoints per kilobase), and selection density (percentage of codons under positive or negative selection) over different gene families, conservation groups, and functions were performed with Kruskal-Wallis one-way analysis of variance (KWt), and pairwise comparisons were performed with pairwise Wilcoxon rank sum tests (WRSts) with Holm correction for multiple testing. Nonparametric tests were chosen since there was a large difference in the sizes of the groups.

Nucleotide sequence accession numbers. All full-genome consensus sequences derived from this study were submitted to the NCBI GenBank database under accession numbers KP745633 to KP745728.

RESULTS AND DISCUSSION

High-throughput sequencing of complete genomes from clinical HCMV isolates. To efficiently characterize the genetic diversity of a large set of complete genomic sequences derived from clinical HCMV isolates, we recently described a method that combines limited virus culturing and virion DNA purification with multiple-displacement amplification and NGS (36). We showed that this procedure was able to generate highly pure viral DNA suitable for NGS analysis and validated that strain consensus sequences were representative of the original virus populations in the clinical isolates. Here, we implemented this method to characterize complete genomes in a group of 100 clinical HCMV isolates (see Table S1 in the supplemental material). These isolates were collected from Belgian ($n = 94$) and Czech ($n = 6$) individuals infected with HCMV, including healthy adults, immunosuppressed patients, and congenitally infected infants.

DNA sequence reads were generated by using a combination of the 454 GS FLX and Illumina NGS platforms. In Table S1 in the supplemental material, some basic genome assembly statistics are listed. We successfully derived a full-genome consensus sequence for 96/100 strains, with the average read depth ranging from 35 to 3,315 (median, 2,031) and the proportion of reads mapping to the consensus ranging from 1% to 98% (median, 89%). While eight isolates were successfully sequenced at read percentages of $<10\%$, sample purity was $>50\%$ in the majority of isolates (77/96). For three strains, we could not determine the full-genome consensus because coverage was too low or unevenly distributed, leaving too many sequence gaps for finishing through Sanger sequencing. For one strain, coverage was adequate, but the isolate clearly consisted of multiple genome variants, and a single, meaningful consensus sequence could not be obtained, nor was it possible to segregate the constituting variants, since NGS data provide no connection between variants at different variable loci. The predominance of a single genome variant along the entire genome for all other strains suggests that these sequences constitute a contiguous genome.

As reported previously, genome assembly consisted of *de novo* assembly, scaffolding on a reference sequence, and subsequent iterative mapping of NGS reads on the genome scaffold (36, 62). Terminal repeats were omitted from the scaffold since these repeats are identical to the internal repeats. This approach was mostly successful, but assembly of the internal repeat regions (IRL/IRS) generally required additional consideration, since *de novo* contigs tended to break at these regions. Because of the high sequence variability of the internal repeat regions (Fig. 1), reference-assisted iterative mapping usually did not solve this issue.

Therefore, contigs were split, sequence reads were assembled on both contigs separately, and contigs were enlarged by the 50% read overhangs at contig ends. This process was reiterated until contigs could be joined. The transition between unique and repeat regions needed to be determined manually to correctly add the terminal repeat sequences at both genome ends. Transitions can be recognized from NGS read assemblies through the concomitant mapping of transition-crossing reads from different genome isomers with inverted UL and US directions. While the position of the US-IRS junction is stable, presumably because it is located inside the TRS1/IRS1 reading frame, the UL-IRL junction is located in a noncoding region and is positioned differently in separate strains. Strain BE/5/2010 had an unusual layout for the IRL/IRS region, with the IRL repeat starting after the IRS repeat and being completely encompassed by it.

HCMV displays the highest level of genetic diversity of all human herpesviruses. The overall genetic diversity of the HCMV genome was assessed by aligning our 96 genomes with 28 previously reported sequences (see Table S1 in the supplemental material). This alignment contains 255,248 sites: 223,991 sites are without gaps, and 31,528 of these nongapped sites (14%) are polymorphic. The interstrain nucleotide diversity, π , was estimated to be 0.021, and the average number of nucleotide differences between two genomes is 4,734. This number is higher than the recent estimate of π of 0.015 for murine cytomegalovirus (MCMV), based on 11 complete genomes (63). There is a clear discrepancy with the values for intrastrain nucleotide diversity that were reported for congenitally infected infants ($\pi = 0.18$ to 0.25) (64). Care should be taken in directly comparing these estimates, as interstrain diversity is estimated from measuring polymorphisms in separate consensus sequences, while intrastrain diversity is derived from characterizing polymorphisms of a single virus population. However, the large discrepancy suggests that many of the variants that were identified in these intrahost populations are deleterious and are not passed on. This notion is supported by the apparent stability of genotype sequences in patients (30, 65–69).

To put these data in perspective toward the other human herpesviruses, we estimated the overall mean distance and transition/transversion ratio for alignments of all available complete genomic sequences of all nine human herpesviruses (Table 1). Apart from HCMV, only for HSV-1, VZV, and EBV were the numbers of complete genomic sequences adequate for a meaningful estimation of overall diversity. With >0.02 substitutions/site, versus <0.01 substitutions/site, HCMV stands out as being significantly more diverse than these alpha- and gammaherpesviruses ($P = 0.012$ for comparisons with HSV-1, VZV, and EBV only, or $P = 2.5 \times 10^{-6}$ for comparisons with all human herpesviruses [determined by one-sample t test]). This is not an artifact of the higher number of sequences available for HCMV, since analysis of the overall mean distance in five random, separate subsets gave highly similar results (0.025 to 0.028 substitutions/site). In fact, considering the larger geographical diversity of HSV-1 and VZV strains included in this analysis, the current estimate for HCMV could even be too low (see “HCMV evolution has been shaped by pervasive recombination,” below). There is also a great discrepancy in the estimated transition/transversion ratios between different herpesvirus species. HCMV has a relatively high ratio of 2.53. This is probably a consequence of strong purifying selection removing transversions, which result in more nonsynonymous

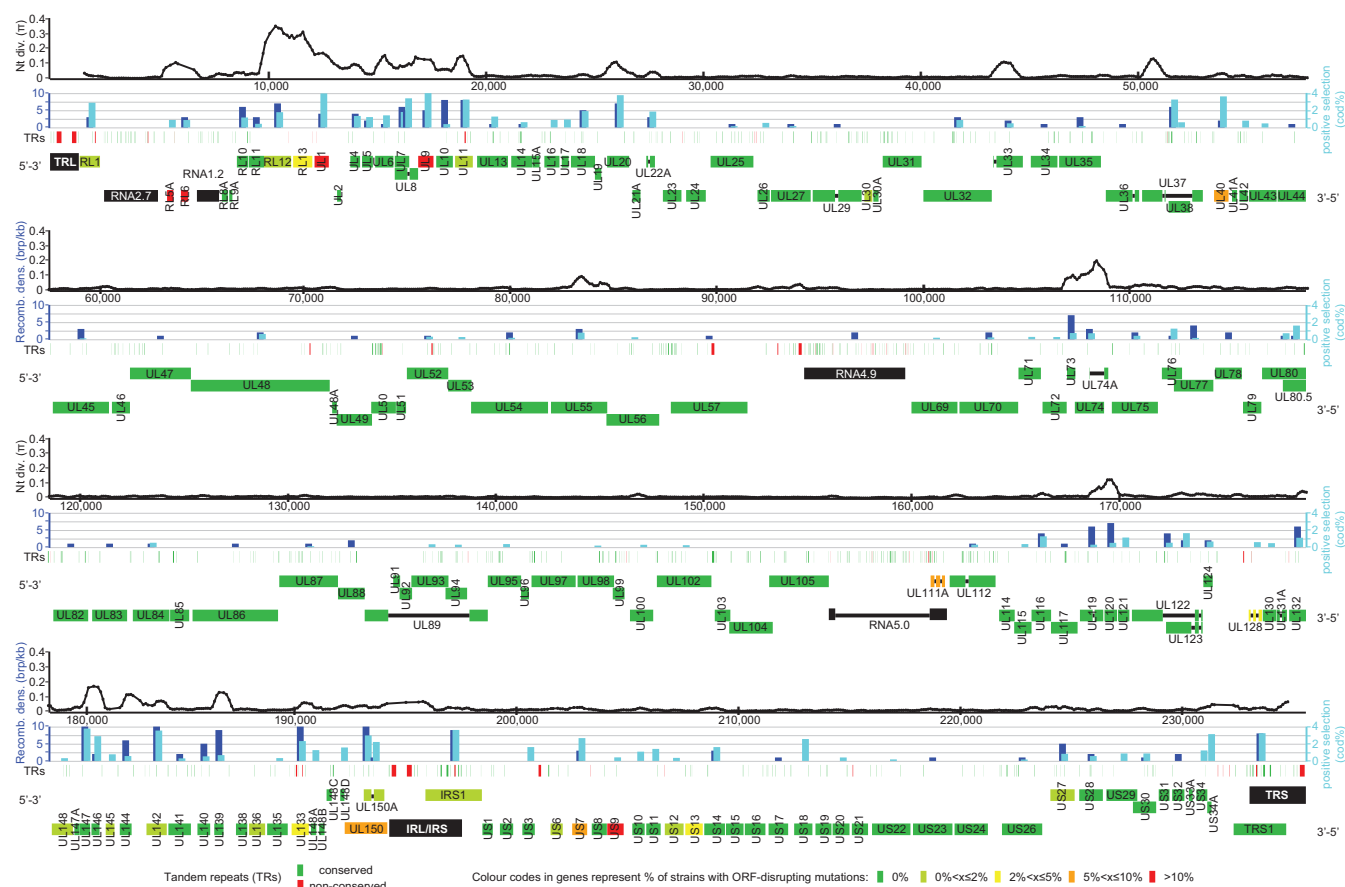


FIG 1 Diversity and evolution of the HCMV genome. Shown is an overview of genetic diversity and evolutionary pressure along the HCMV genome. The genome is divided into four panels. Each panel consists of four separate tracks. In the top track, nucleotide diversity is calculated in a sliding window of 500 nt with a step size of 100 nt. As only ungapped residues are included in each window, the distance between two data points may vary in areas with many indels. In the second track, the extents of recombination and positive selection are assessed for each gene. Displayed above the center of the appropriate gene (bottom track), dark and light blue bars represent recombination breakpoint density and the percentage of codons under positive selection, respectively. For optimal resolution, values were cut off at 10 breakpoints (brp)/kb and 4% codons under positive selection. Green and red bars in the third track indicate the genome positions of conserved and variable tandem repeats. The bottom track annotates genes and other genome elements in four layers. The first two layers show genes carried on the forward strand, and the last two layers show genes carried on the reverse strand. Spliced exons are connected with thin black lines. Genomic inverted repeats (TRL, IRL/IRS, and TRS) and long noncoding RNAs are represented in black; genes are colored on a scale from green to red, indicating the frequency of ORF-disrupting mutations in separate clinical isolates.

mutations (see “Positively selected residues provide a genetic fingerprint of the evolutionary arms race between virus and host,” below) (70).

In Fig. 1 (top), π is represented in a sliding window along the HCMV genome. This clearly delineates several diversity hot spots, isolated by long stretches of conserved sequence. To further analyze the heterogeneity of divergence, ratios of nonsynonymous substitutions per nonsynonymous site (dN) were calculated for all 170 genes as a measure of the divergence of the encoded proteins (see Table S4 in the supplemental material). A list of the most divergent genes is provided in Table 2. All 30 genes that have a dN value of >0.025 are listed, along with their gene family, conservation over herpesvirus subfamilies, their confirmed/proposed function(s) (71), and studies that have previously characterized and classified the diversity of these genes. Only 1 of these 30 genes is conserved in all mammalian herpesviruses (UL73, encoding glycoprotein N), while 3 others are conserved within the subfamily *Betaherpesvirinae*. For 4 of these 30 genes, no previous studies have analyzed diversity in clinical isolates. For 9 others (including 5 of

the 6 most variable genes), analyses were limited to partial genomic sequences of <10 clinical isolates (7). This demonstrates the added value of a high-throughput, comprehensive analysis of divergent genome regions. Reciprocally, genes such as UL55 and UL75, encoding glycoproteins B and H, respectively, have been sequenced extensively because of their known functional roles, but they are not in this broad group of the most divergent genes. On the other end of the diversity spectrum, the 25 most conserved genes (dN of <0.002) are listed in Table 3. The majority of these genes (19/25) are conserved in all mammalian herpesviruses (14/25), in betaherpesviruses (3/25), or in beta- and gammaherpesviruses (2/25) (7).

Relationships of gene diversity with gene family, gene conservation across herpesviruses, and encoded function(s) were further explored and are visualized for gene families in Fig. 2 (top). Clear and significant differences in gene diversity between separate gene families and gene conservation groups were found ($P = 4.8 \times 10^{-6}$ and $P = 2.0 \times 10^{-8}$ [determined by KWT]) (Fig. 2). Because of the small number of genes in several gene families, pairwise compar-

TABLE 1 Genetic diversity of human herpesviruses

Subfamily	Species ^a	No. of strains ^b	Overall mean distance (substitutions/site)	Standard error ^c	Transition/transversion ratio
<i>Alphaherpesvirinae</i>	HHV-1 (HSV-1)	26	0.0076	0.000079	1.63
	HHV-2 (HSV-2)	2	0.0041	0.000083	1.29
	HHV-3 (VZV)	46	0.0014	0.000040	2.01
<i>Betaherpesvirinae</i>	HHV-5 (HCMV)	124	0.0266	0.000100	2.53
	HHV-6A	2	0.0135	0.000380	1.88
	HHV-6B	2	0.0070	0.000138	1.81
	HHV-7	2	0.0013	0.000084	2.80
<i>Gammapherpesvirinae</i>	HHV-4 (EBV)	9	0.0087	0.000086	1.36
	HHV-8 (KSHV)	3	0.0021	0.000066	1.05

^a The official taxonomic names (human herpesvirus 1 [HHV-1] to HHV-8) are given, followed by common names in parentheses, if available. HSV-1, herpes simplex virus 1; VZV, varicella-zoster virus; HCMV, human cytomegalovirus; EBV, Epstein-Barr virus; KSHV, Kaposi sarcoma-associated herpesvirus.
^b GenBank accession numbers for strains used in genome alignments are listed in Table S1 in the supplemental material; data for the HSV-1 alignment were reported previously (48).
^c Standard errors were calculated from 500 bootstrap replicates.

isons were significant only for the RL11 family versus the US6 ($P = 0.037$ by WRSt), US12 ($P = 0.0047$ by WRSt), and US22 ($P = 0.0044$ by WRSt) gene families. The RL11 gene family indeed truly stands out for the high number of variable genes. While variability in RL11 genes was described previously, analyses of the most variable members, RL5A, RL6, RL12, and RL13, were limited to a comparison of seven strains (Table 2). Especially for the RL13 gene, it would be of interest to study the functional behavior of different variants, as this gene has been implicated as a growth temperance factor (72) and in immunomodulation (73). Considering the latter function of RL13, we found that the endocytic YxxL motif essential for internalization of IgGs was 100% conserved among clinical isolates. Cytomegalovirus-specific genes were significantly more diverse than genes conserved in all mammalian herpesviruses ($P = 8.4 \times 10^{-8}$ by WRSt), betaherpesvirus genes ($P = 0.0024$ by WRSt), and genes conserved between beta- and gammaherpesviruses ($P = 0.0025$ [determined by WRSt]). The UL73 (encoding glycoprotein N) and UL74 (encoding glycoprotein O) genes are outliers within core and betaherpesvirus genes, respectively. Variability in these genes has been widely studied (Table 2). Similarly, we found statistically significant differences in the genetic diversity of genes classified according to the function of the encoded product ($P = 9.8 \times 10^{-6}$ by KWt) (based on the functional classification reported in reference 71). Pairwise comparisons were significant only for immunomodulation genes versus genes encoding assembly ($P = 0.0017$ by WRSt), gene regulation ($P = 0.0031$ by WRSt), and replication ($P = 0.011$ by WRSt) functions. Generally, diverse genes are involved in interactions with the host (immunomodulation, entry, spread, cell tropism, and virion proteins, which include surface glycoproteins), while conserved genes perform core viral functions such as replication, assembly, modulation of the host cell cycle and proteins, gene regulation, cellular trafficking, nucleotide repair, virion stability, latency, and viral growth.

Tandem repeats in the HCMV genome. Another important source of sequence variation is the heterogeneity in the copy numbers of adjacently repeated elements or tandem repeats (TRs), caused by recombination or strand slippage replication. Variation in TRs is associated with phenotypic variability, regulation of gene expression, and genetic evolvability in both prokaryotes and eu-

karyotes (74–76). Furthermore, several studies have found evidence that TR variations may impact strain functionality and pathogenicity in viruses (77–82). The presence of TRs in HCMV was described previously, and TR polymorphisms could be used as epidemiological markers to distinguish clinical isolates (83–85). A comparative analysis of TRs in several members of the family *Herpesviridae*, based on a single genome sequence for each species, found the highest TR content in the alphaherpesvirus pseudorabies virus (18% of total nucleotides), followed by HSV-1 (9%), EBV (7%), KSHV (4.5%), and VZV and HCMV (3%) (86). To assess the total set of repeats in HCMV genomes, we identified all homopolymers (repeats with a period size of 1 nt), microsatellites (period size of 2 to 9 nt), and minisatellites (period size of >9 nt) in the genome of reference strain Merlin and subsequently searched for orthologous TRs in 123 other HCMV genome sequences. The total set of identified repeats is reported in Table S5 in the supplemental material. In total, 779 TRs were found in the genome of strain Merlin, 23 of which are duplicated or triplicated in TRL and/or TRS inverted repeats. For 683/779 TRs (88%), an orthologous repeat could be found in the majority of the other HCMV strains. These 683 TRs constitute 3.9% of the total nucleotides and are annotated in the HCMV genome in Fig. 1. Only 51 of these orthologous repeat sets (7%) were classified as variable (<50% conservation of repeat sequence and copy number) (Fig. 1). While 81% of the total nucleotides are within protein-coding regions, only 65% of TR nucleotides are found inside genes (Fig. 3A). Reciprocally, there is a clear overrepresentation of TRs in noncoding regions, including the 4 long noncoding RNAs, introns, and intergenic regions. Likewise, the internal repeat regions (IRL-IRS) that make up only 1% of the trimmed Merlin genome contain 8% of TR nucleotides (Fig. 3B). Overall, the level of TR conservation is higher in coding than in noncoding regions ($P = 9.9 \times 10^{-9}$ by Fisher’s exact test [FET]) (Fig. 3C). When different repeat types were analyzed separately, this held true for homopolymers ($P = 1.3 \times 10^{-6}$ by FET) and minisatellites ($P = 0.017$ by FET) but not for microsatellites ($P = 0.56$ by FET). Recently, TRs of HSV-1 were analyzed based on a collection of 26 complete genomes by using a similar approach (48). The authors of that study found 584 orthologous TRs in this data set, corresponding to 4.3 TRs/kb (5.4% of nucleotides), which is higher than the 2.9 TRs/kb

TABLE 2 Most divergent HCMV genes

Gene	<i>dN</i> ^a	Gene family ^b	Gene conservation ^c	Function(s) ^d	Reference ^e
RL6	0.555	RL11	No	Latency ^e	7
RL5A	0.516	RL11	No	Unknown	7
RL12	0.467	RL11	No	Virion protein, ^e immunomodulation ^e	7
UL146	0.448	CXCL	No	Immunomodulation	67
RL13	0.297	RL11	No	Cell tropism, ^e virion protein, immunomodulation, ^e replication	7
UL9	0.235	RL11	No	Viral growth	7
UL1	0.156	RL11	No	Virion protein, cell tropism, ^e assembly ^e	98
UL139	0.144	NA	No	Immunomodulation ^e	137
UL74	0.110	NA	Beta	Viral spread, assembly, entry, immunomodulation, virion protein	138
UL11	0.106	RL11	No	Immunomodulation	139
UL73	0.103	NA	Core	Entry, virion protein, latency ^e	140
UL6	0.086	RL11	No	Unknown	98
UL144	0.082	NA	No	Immunomodulation, latency	141
UL120	0.075	UL120	No	Unknown	7
UL20	0.068	NA	No	Immunomodulation ^e	NA
UL8	0.064	RL11	No	Unknown	7
UL4	0.060	RL11	No	Virion protein, latency ^e	142
UL7	0.056	RL11	No	Immunomodulation	98
UL142	0.047	MHC	No	Immunomodulation	7
UL147	0.046	CXCL	No	Immunomodulation ^e	67
UL37	0.041	NA	Beta	Latency, ^e replication, apoptosis, gene regulation, immunomodulation, viral growth	143
UL22A	0.039	NA	No	Immunomodulation, ^e virion protein	NA
UL148D	0.036	NA	No	Unknown	144
UL10	0.034	RL11	No	Viral growth	98
UL2	0.033	NA	No	Unknown	7
UL150	0.033	NA	No	Latency ^e	145
UL25	0.032	UL25	No	Virion protein	NA
UL133	0.028	NA	No	Assembly, ^e latency ^e	7
US34A	0.028	NA	No	Unknown	NA
UL33	0.027	GPCR	Beta	Immunomodulation, virion protein, host modulation	146

^a *dN*, nonsynonymous substitutions per nonsynonymous site.^b NA, not assigned to a gene family.^c Gene conservation over different herpesvirus subfamilies. Core, conserved in all mammalian herpesviruses; Beta, conserved in all members of the subfamily *Betaherpesvirinae*; No, not conserved in all members of the subfamily *Betaherpesvirinae*.^d Functions of the encoded gene products were reported previously (71).^e Proposed function, which needs further validation.^f Studies characterizing diversity in clinical isolates for each gene. NA indicates that there have been no previous reports analyzing sequence diversity for this gene.

(3.9% of nucleotides) that we found for HCMV. HSV-1 also has more variable TRs than does HCMV (17% versus 7%). HSV-1 shows a similar overrepresentation of TRs in noncoding regions and in the genomic inverted repeats. Likewise, most variable TRs are located in noncoding regions in both viruses. While HSV-1 has a higher proportion of genes containing TRs (92%, versus 79% for HCMV), this is caused mostly by the large number of homopolymers in HSV-1 genomes (3.4 TRs/kb, versus 1.2 TRs/kb for HCMV). When only the proportion of genes containing micro- and minisatellites is calculated (thus excluding homopolymers), 68% of HCMV genes still contain TRs, while this proportion is decreased to 39% for HSV-1.

TR polymorphisms in noncoding regions might have a profound impact on gene regulation and expression by altering binding sites for regulatory proteins, chromatin structure, transcript stability and transcription, splicing, or translation efficiency (87–90). However, we can only speculate about their effects based on sequence data alone. Overall, selection seems to have constrained

the presence of unstable TR elements inside coding regions, illustrated by the discrepancy of TR frequencies between coding and noncoding regions (Fig. 3A) and the higher level of conservation of TRs in coding regions (Fig. 3C). Therefore, it is conceivable that some TR variations in coding regions might have specific functions or provide the virus with greater adaptability because of their intrinsic instability (so-called “evolutionary tuning knobs” [91]). Mutation rates in TRs can be up to 100,000 times higher than those in other parts of the genome. Therefore, we assessed the potential impact of TR variation in coding regions on the encoded proteins (see Table S5 in the supplemental material). Nine out of the 13 variable TRs inside protein-coding regions constitute variability in the longer and nonperfect TRs, as determined by TRF analysis. Diversity in these minisatellites comprises mostly variations in repeat sequence and period length, caused by nucleotide divergence in these areas. The UL50 and UL111A genes contain variable trinucleotide microsatellites, causing amino acid stretches of various lengths (Table 4). Homopolymer length variation is pres-

TABLE 3 Most conserved HCMV genes

Gene	dN ^a	Gene family ^b	Gene conservation ^c	Function(s) ^d
UL46	0.000	NA	Core	Virion protein
UL85	0.000	NA	Core	Assembly
UL103	0.000	NA	Core	Virion protein, assembly
US18	0.000	US12	No	Unknown
UL26	0.001	US22	No	Virion protein, gene regulation, virion stability
UL29	0.001	US22	Beta	Virion protein, ^e gene regulation, apoptosis, cell tropism
UL31	0.001	DURP	Beta	Gene regulation
UL35	0.001	UL25	Beta	Gene regulation, ^e replication, nucleotide repair, assembly, virion protein
UL41A	0.001	NA	No	Virion protein
UL44	0.001	NA	Core	Host modulation, replication, latency ^e
UL50	0.001	NA	Core	Virion protein, ^e latency, ^e assembly
UL57	0.001	NA	Core	Replication
UL79	0.001	NA	Betagamma	Gene regulation, latency ^e
UL86	0.001	NA	Core	Assembly
UL88	0.001	NA	Betagamma	Virion protein, assembly ^e
UL89	0.001	NA	Core	Viral growth, assembly
UL96	0.001	NA	Core	Virion protein, assembly
UL98	0.001	NA	Core	Nucleotide repair, latency ^e
UL102	0.001	NA	Core	Replication
UL104	0.001	NA	Core	Assembly
UL105	0.001	NA	Core	Replication, latency ^e
UL114	0.001	NA	Core	Nucleotide repair, replication, latency ^e
US13	0.001	US12	No	Unknown
US24	0.001	US22	No	Virion protein, gene regulation
US31	0.001	US1	No	Unknown

^a dN, nonsynonymous substitutions per nonsynonymous site.
^b NA, not assigned to a gene family.
^c Gene conservation over different herpesvirus subfamilies. Core, conserved in all mammalian herpesviruses; Beta, conserved in all members of the subfamily *Betaherpesvirinae*; Betagamma, conserved in all members of the subfamilies *Betaherpesvirinae* and *Gammaherpesvirinae*; No, not conserved in all members of the subfamily *Betaherpesvirinae*.
^d Functions of the encoded gene products were reported previously (71).
^e Proposed function, which needs further validation.

ent in the RL12 and UL1 genes, but it does not cause frameshifts and results only in amino acid divergence. In fact, none of these 13 variable TRs in protein-coding regions cause frameshifts that disrupt ORF integrity. Because TRs cataloged as conserved (>50% of strains with conserved repeat sequence and copy number) could also contain variation in a minority of strains, we analyzed an additional set of 53 protein-encoding TRs with variations in period length or copy number below the 50% threshold (see Table S5 in the supplemental material). These TRs comprised 26 homopolymers, 5 microsatellites, and 22 minisatellites. While most of these TR variations either were conserved or led to amino acid variations and indels without a clear repetitive character at the protein level, seven TRs caused the occurrence of repetitive single-amino-acid stretches of various lengths (Table 4). These stretches contain mostly small and hydrophilic amino acids, suggesting selective constraints toward these residues in coding TRs (92). It is assumed that TRs inside coding regions form flexible, unstructured, and hydrophilic loops (75). These amino acid loops might be involved in protein-protein interactions that could be altered by changes in loop length. For example, the variable proline stretch in UL50 might have functional consequences for the efficiency of nuclear egress of HCMV capsids. Together with pUL53, pUL50 forms the nuclear egress complex (NEC). A random screen for dominant negative mutants of M50 (the MCMV homolog of UL50) identified this proline-rich motif to be essential for nuclear egress, and this finding was confirmed for HCMV UL50 (93). The

authors of that study suggested that this motif likely controlled a binding site for a NEC interaction partner. The latter could be HCMV pUL97, a protein kinase that was recently found to phosphorylate S216, a site neighboring the proline stretch. This phosphorylation modulates NEC localization and nuclear egress (94, 95). It might be of interest to assess the effect of the large length heterogeneity (4 to 12 residues) in the proline motif on nuclear egress efficiency. Finally, homopolymer length variation in the UL111A and UL133 genes caused frameshifts that resulted in premature ORF termination in strains BE/16/2010 and BE/17/2010 (UL111A) and in strain BE/2/2012 (UL133) (see Tables S2 and S5 in the supplemental material).

Wild-type HCMV strains contain ORF-disrupting mutations in a wide range of nonessential genes. The accumulation of gene-disrupting mutations in cell culture-passaged HCMV strains is a well-described phenomenon (35, 96). As first suggested for isolates of koi herpesvirus, some disrupting mutations might also occur *in vivo* (97). Recently, a few studies have indicated that some HCMV mutants may indeed be present in clinical isolates prior to culture passage (36, 62, 98). In particular, strains JP (62) and BE/21/2010 (36) were sequenced directly from clinical material and displayed disruptive mutations in the RL5A and UL111A genes and in the RL5A, UL9, and UL150 genes, respectively. Furthermore, we showed that RL5A, UL1, UL9, and UL111A mutants identified in three additional strains after limited passaging were also present in the original clinical isolate (36). With our current

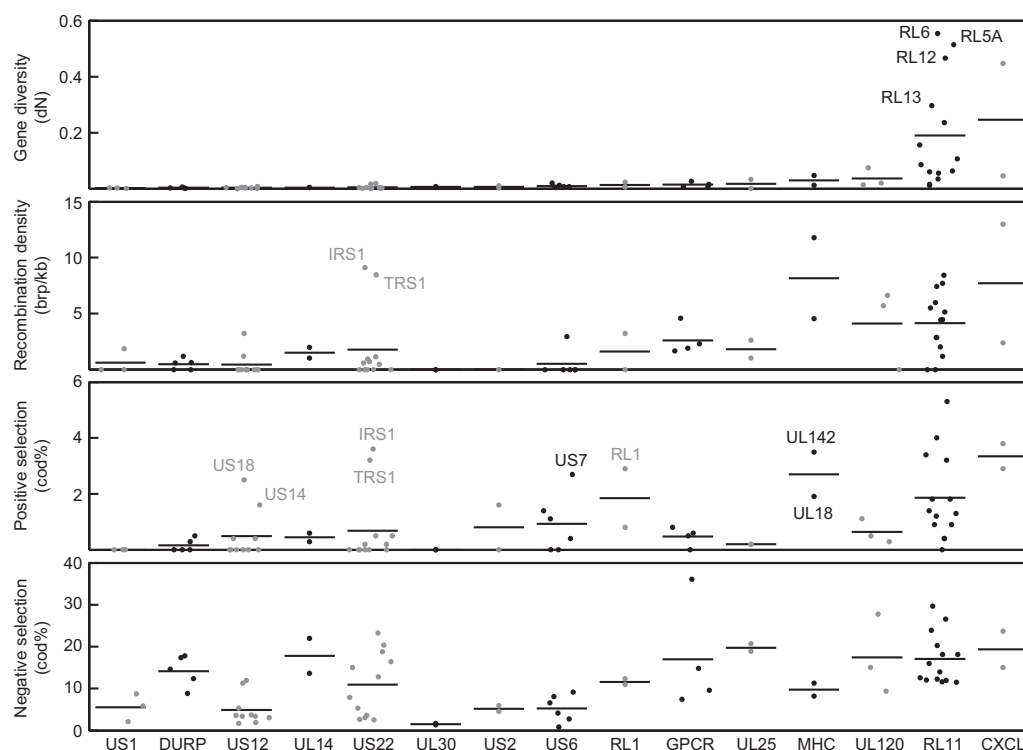


FIG 2 Variability, recombination, and selection in HCMV gene families. Gene diversity (dN), recombination breakpoint density, and the percentages of codons under positive and negative selection are indicated for HCMV genes within gene families; each dot represents a gene. Only genes belonging to specific gene families are represented. Group averages are designated with horizontal lines.

data set providing full-genome information for 96 clinical isolates, supplemented with 32 previously reported sequences, we have an ideal opportunity to further assess the occurrence of ORF-disrupting mutations in clinical HCMV isolates and provide a more detailed estimate of the mutation frequency in different genes.

An overview of all genes that contain ORF-disrupting mutations in one or more isolates is presented in Table 5, and more detailed information is provided in Table S2 in the supplemental material. In total, 26 of 170 genes (15%) have a disrupted ORF in at least one clinical isolate. Unsurprisingly, none of these genes are essential for growth on fibroblast cells, although UL30 was found to be growth augmenting (99, 100). Looking at the distribution of mutants over different clinical isolates (Fig. 4), only 28 of 124 isolates (23%) have the complete set of 170 intact genes, with the other isolates having 1 (33%), 2 (27%), 3 (13%), or 4 (3%) mutated genes. With these data, we show that only 1 out of 4 clinical isolates is genetically intact and that gene-disrupting mutations are extremely common in a defined set of nonessential genes. We cannot rule out the possibility that even more genes are mutated in our isolates, as discussed in Text S1 in the supplemental material. Some mutations affect only a small proportion of the ORF (e.g., in the US9 and US27 genes) (Table 5). These cases could be better described as variants than as mutants if the encoded gene products are not affected by these N- or C-terminal deletions, but functional experiments are needed to evaluate this.

As our strains were minimally passaged in fibroblast cell culture, some mutations might be artifacts of culture adaptation. Therefore, the presence of mutations in the original clinical material was assessed by direct PCR sequencing of these samples, if

available. All mutations that were confirmed with this procedure are shown in Table 5 and in Table S2 in the supplemental material. Importantly, all but one of the mutations that were characterized in the original clinical material could be confirmed to be unrelated to culture amplification. Mutations in the RL1, RL5A, RL6, UL1, UL9, UL30, UL40, UL111A, UL142, UL150, US7, US9, and US27 genes are thus indeed present in clinical isolates. Moreover, the occurrence of identical mutations in unrelated and geographically distinct isolates confirms their circulation in natural populations. The only mutation identified as an artifact of culture passage was a substitution in the first splice donor site of the UL128 gene in strain BE/11/2011; the specific case of mutations in the RL13 and UL128 genes is discussed in further detail in Text S1 in the supplemental material.

Mutated genes are highlighted on the genome map in Fig. 1 with a color code depicting mutation frequency. The RL11 gene family stands out, with 7 out of 14 members containing disruptive mutations (or 6 if RL13 is omitted). Furthermore, 4 out of 5 genes that are mutated in >10% of isolates are part of this family. RL11 genes share homology with the CR1 domain of the adenovirus E3 genes through their RL11 domain (101). The encoded proteins have similarities to the IgD family, and because of their hypervariability (see “HCMV displays the highest level of genetic diversity of all human herpesviruses,” above), it is believed they could have a function in modulating variable host proteins. Immunomodulatory capacities have recently been proposed for UL7 (102), UL11 (103), and RL12 and RL13 (73). While RL13 mutants are probably culture artifacts and RL12 and UL11 mutants are rare and unconfirmed in clinical material, mutations in RL5A, RL6, UL1, and

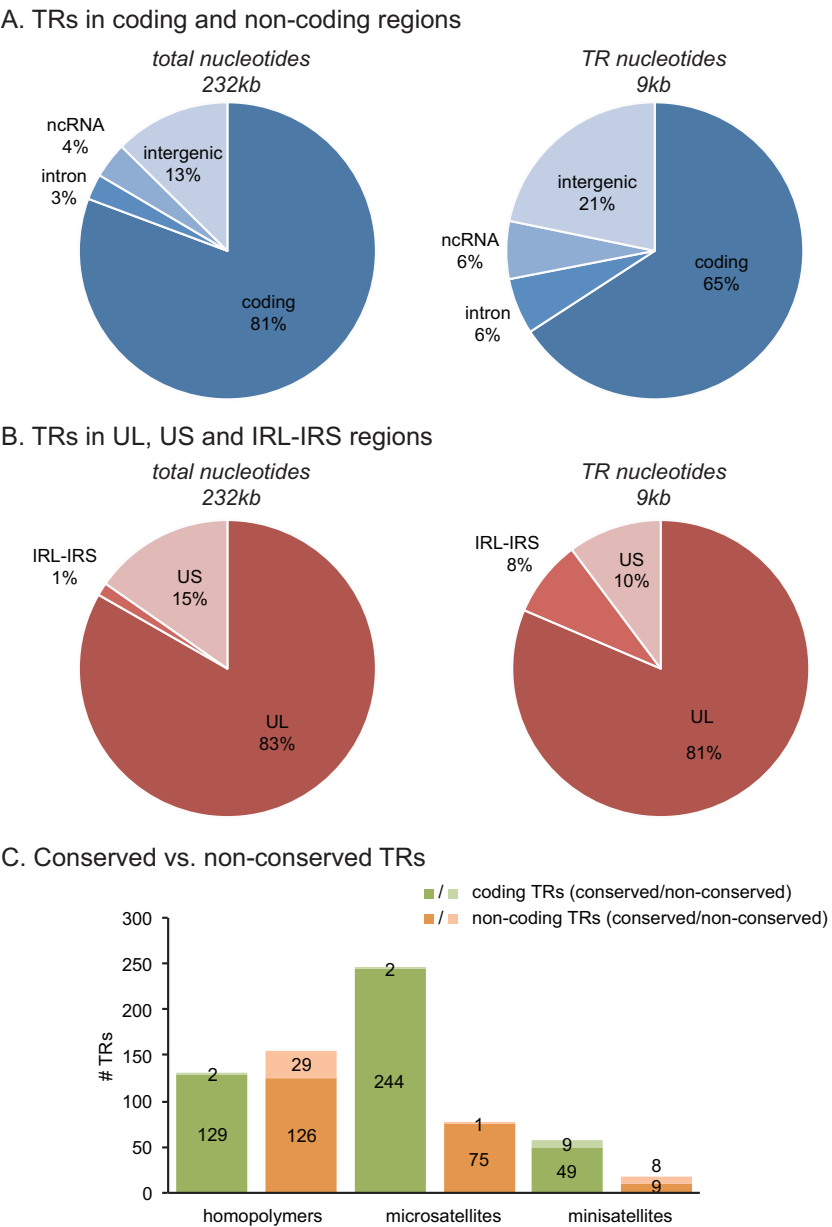


FIG 3 Tandem repeats (TRs) in the HCMV genome. TRs in reference strain Merlin were identified, and orthologous repeats were searched for in a data set of 124 complete HCMV genomes. Only TRs with orthologs in >50% of strains were included in the analysis. (A) TR nucleotide content (9,008 nt) in coding and noncoding (intergenic, intron, and ncRNA) regions compared to the distribution of total nucleotides (231,784 nt) over these regions. (B) Similar to panel A, where TR and total nucleotide distributions over unique long (UL), unique short (US), and internal repeat long and short (IRL-IRS) genome regions are compared. Percentages in panels A and B do not add up to 100% because of rounding errors. (C) Conservation of TRs between coding and noncoding TRs and between different TR types (homopolymers, microsatellites, and minisatellites). TRs were reported to be conserved if >50% of strains had identical repeat sequences and copy numbers.

UL9 are much more common and definitely circulate in the host. Functional data for these genes are limited, with UL1 being implicated as a tropism factor (104) and UL9 being implicated in growth temperance (100). While our analysis shows that almost 35% of strains have a mutation in UL9, a previous study that characterized UL9 sequences in unpassaged and moderately and highly passaged isolates from a diverse geographical background found only 2 mutations in 41 strains (5%) (GenBank accession numbers [DQ847465](#) to [DQ847505](#)). It is unclear whether this discrepancy is due to geographical differences in UL9 mutations, the

types of patients involved, or the body compartment that was sampled.

Several genes in the RL1 family (2/2), the US6 family (3/6), and the US12 family (2/10) are also affected. For the RL1 family genes RL1 and UL145, functional knowledge is lacking, and in both cases, only one strain contains a mutation. Members of the US6 family have established or tentative immunomodulatory functions, interfering with the major histocompatibility complex class I (MHC-I) antigen-processing pathway (71, 105). The role of US6 in inhibition of antigen peptide transport to MHC-I molecules has

TABLE 4 Tandem repeats encoding variable repetitive elements at the protein level

nt positions ^a	Gene	Period size (nt)	Copy no. (range)	Repetitive element in protein (copy no. [range])
27690–27696	UL22A	1	6–9	Glycine stretch (1–3)
73888–73902	UL50	3	3–11	Proline stretch (4–12)
99616–99627	UL69	3	3–9	Proline stretch (4–12)
118052–118063	UL80/UL80.5	3	2–6	Serine stretch (4–7)
150242–150253	UL102	3	2–5	Serine stretch (3–4)
161081–161092	UL111A	3	1–8	Threonine stretch (1–8)
162890–162901	UL112	3	3–5	Glycine stretch (3–5)
162925–162951	UL112	12–15	1.9–2.3	Glycine stretch (7–9)
178548–178559	UL132	3	2–8	Glutamate stretch (2–8)

^a Positions in the genome of reference strain Merlin.

been well described (106). Studies on US7 and US9 function are much scarcer (107–109), but immunomodulatory functions have been predicted (71). The natural occurrence of mutants in US6, US7, and US9 may suggest some functional redundancy, as the

US2, US3, US10, and US11 genes all target MHC-I antigen presentation (110). The US12 gene family encodes 10 seven-transmembrane proteins, with some members recently being associated with immunomodulation (111, 112) and cell tropism for

TABLE 5 Genes containing ORF-disrupting mutations in HCMV strains

Gene	% of strains mutated ^a	Mutation type(s) ^b (no. of strains)	Median unaffected fraction of mutated ORFs (min–max)
UL9	34.6 (<i>n</i> = 127)	Sub in cod59 (5), ^c 23-nt del (4), ^c sub in cod6 (3), ^c 5-nt del (3), ^c sub in cod59 (2), 71-nt del (1), ^c sub in cod23 (1), sub in cod26 (1), ^c sub in cod40 (1), ^c sub in cod49 (1), sub in cod53 (1), ^c sub in cod59 (1), sub in cod63 (1), sub in cod71 (1), ^c sub in cod79 (1), sub in cod163 (1), 1-nt ins (1), 1-nt ins (1), ^c 1-nt ins (1), 178-nt del (1), 90-nt del (1), 51-nt del (1), 44-nt del (1), 40-nt del (1), 40-nt del (1), 29-nt del (1), 29-nt del (1), ^c 19-nt del (1), 19-nt del (1), 4-nt del (1), 2-nt del (1), ^c 1-nt del (1)	27 (2–95)
RL5A	20.3	11-nt del (14), ^c 2-nt del (4), ^c 17-nt del (3), ^c sub in cod12 (2), ^c sub in cod35 (1), ^c 44-nt del (1), 1-nt del (1)	51 (6–58)
RL6	15.6	316-nt del (14), ^c 17-nt del (2), sub in cod57 (1), ^c 5-nt del (1), 2-nt del (1), 2-nt del (1)	0 (0–66)
US9	15.0 (<i>n</i> = 127)	35-nt del (18), ^c sub in cod227 (1) ^c	94 (91–94)
UL1	10.2	Sub in cod99 (6), ^c sub in cod86 (2), sub in cod147 (2), sub in cod42 (1), sub in cod45 (1), ^c 4-nt del (1)	44 (8–68)
UL111A	9.4	Sub in cod36 (3), ^c 38-nt del (3), ^c sub in cod129 (2), sub in cod56 (1), 2-nt ins (1), 1-nt ins (1), 219-nt del (1) ^c	32 (9–72)
UL150	6.3	Sub in cod1 (1), 2-nt deletion (7) ^c	1 (1–95)
UL40	5.5	Sub in cod1 (7) ^c	93 (93–93)
US7	5.5 (<i>n</i> = 127)	Sub in cod161 (1), sub in cod179 (1), 1-nt ins (1), ^c 112-nt del (1), 76-nt del (1), ^c 67-nt del (1), 47-nt del (1) ^c	71 (3–93)
RL13	3.9	Sub in cod150 (1), 2-nt ins (1), 279-nt del (1), 2-nt del (1), 1-nt del (1)	50 (23–80)
UL128	2.4 (<i>n</i> = 126)	Sub in splice donor site (1), 1-nt ins (1), 14-nt del (1)	32 (19–41)
UL133	2.3	Sub in cod247 (1), 1-nt ins (1), 37-nt del (1)	78 (61–97)
US13	2.3	24-nt del (3)	97 (97–97)
RL12	1.6	5-nt del (1), 2-nt del (1)	36 (27–45)
UL136	1.6	Sub in cod210 (1), sub in cod227 (1)	91 (87–94)
US27	1.6	18-nt del (1), 43-nt del (1) ^c	97 (97–97)
RL1	0.8	84-nt del (1) ^c	87 (87–87)
UL11	0.8	1-nt del (1)	39 (39–39)
UL30	0.8	1-nt ins (1) ^c	73 (73–73)
UL148	0.8	Sub in cod104 (1)	33 (33–33)
UL145	0.8	349-nt del (1)	54 (54–54)
UL142	0.8	77-nt del (1) ^c	73 (73–73)
UL150A	0.8	Sub in cod264 (1)	97 (97–97)
IRS1	0.8 (<i>n</i> = 126)	Sub in cod836 (1)	99 (99–99)
US6	0.8 (<i>n</i> = 127)	Sub in cod35 (1)	19 (19–19)
US12	0.8	2-nt ins (1)	44 (44–44)

^a *n* = 128, unless stated otherwise (mutations that are certain to be artifacts of culture passage are omitted).^b del, deletion; ins, insertion; sub, substitution; cod, codon (codon refers to the actual codon position in the specific strain that contains the mutation).^c Mutations that were verified to be present in original clinical material (or strains sequenced directly from clinical material).

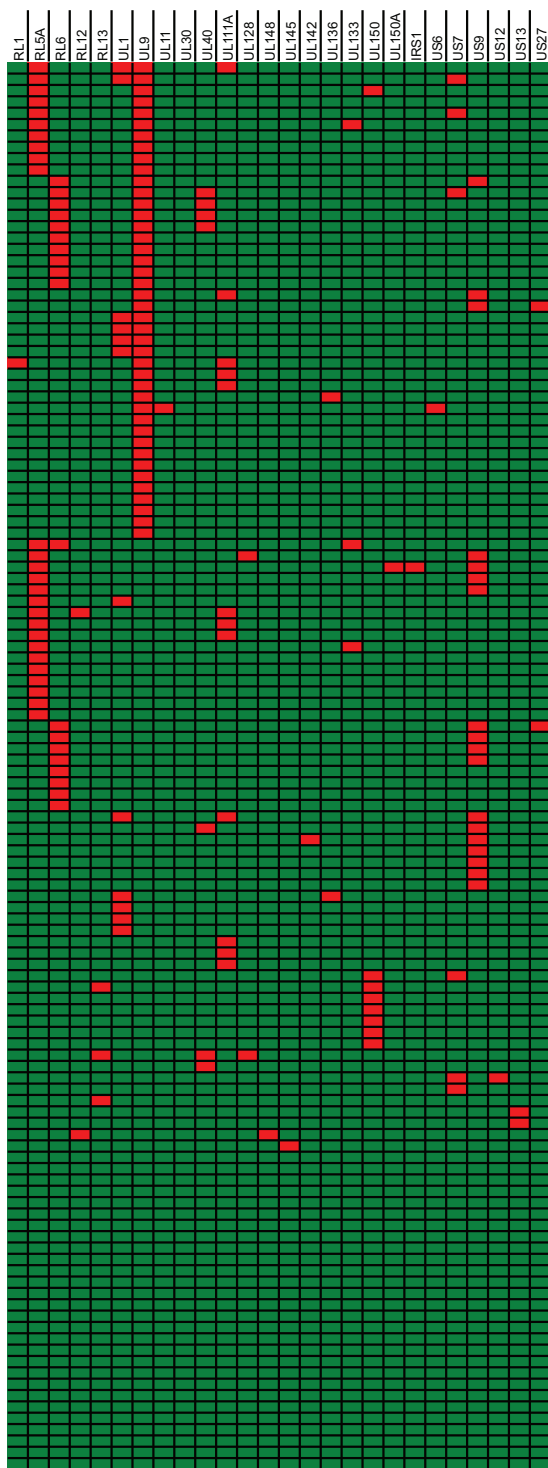


FIG 4 Distribution of ORF-disrupting mutations. Shown is a graphical representation of the distribution of ORF-disrupting mutations over 124 clinical isolates. Rows represent different isolates, and columns represent all 26 genes containing disruptive mutations. Disrupted genes are represented in red, and intact genes are represented in green.

epithelial and endothelial cells (113). Functions of the US12 and US13 genes have not yet been revealed. These different HCMV gene families exist as clusters of adjacent (apart from the RL1 family) and (distantly) related genes that probably originated

from duplication of an ancestral gene (114). As recent experiments with poxviruses have shown, these so-called genomic accordions can rapidly expand under strong selective pressure and provide dsDNA viruses with low mutation rates an alternative mode to evolve more quickly under specific circumstances (115, 116). Subsequently, adaptive mutations in these new copies can accumulate at a much higher rate than in one isolated gene. Finally, when the selective environment changes, genes that did not acquire beneficial functions can be removed, and the accordion contracts. Especially for the RL11 and US6 gene families, where mutant genes were confirmed to be present in clinical isolates, this accordion contraction could be currently ongoing.

Several additional, isolated genes are mutated in the original clinical material. The fact that almost 10% of strains are affected in the viral interleukin-10 (IL-10)-encoding UL111A gene is striking. UL111A encodes separate transcripts during productive (cmvIL-10) and latent (LAcvmIL-10) infection, and both gene products are affected in all 12 mutant isolates (Fig. 5). cmvIL-10 binds and signals through the human IL-10 receptor and mimics its immunomodulatory properties. It has been shown to inhibit the production of proinflammatory cytokines and MHC-I and -II expression in monocytes and to stimulate monocyte differentiation to a phagocytic phenotype and B cell proliferation and differentiation. It is believed that these concerted cmvIL-10 actions have an important impact on the immune system's capacity to control HCMV replication (117). In this regard, cmvIL-10 has been shown to impair cytotrophoblast remodeling of the uterine vasculature, thereby possibly enhancing congenital disease (118). The latency-associated LAcvmIL-10 product cannot signal through human IL-10 receptors in the same fashion but was recently shown to upregulate the expression of cellular IL-10 and CCL8 (119). Another mutated gene with potential implications for the immunomodulatory capacities of isolates is UL40. The UL40 signal peptide is necessary for the cell surface expression of HCMV pUL18 and HLA-E molecules, both of which are natural killer (NK) cell ligands that can inhibit NK cell activation in the absence of normal MHC-I antigen presentation (120). In 5.5% of isolates, UL40 has a substitution in its original start codon, presumably leading to translation initiation from an alternative start codon located 15 nt downstream and truncating the signal peptide (see Table S2 in the supplemental material). Whereas this mutation was previously found only in strain 3157, we identified six more instances of signal peptide truncation in our isolates. By using UL40 from strain 3157 in comparison to wild-type UL40, it was recently demonstrated that this mutation did not affect UL40 translation or pUL18 surface expression but did inhibit the surface expression of HLA-E and thereby sensitized infected cells to NK cell lysis (120). For both the UL111A and UL40 genes, unrelated strains display identical deletions or substitutions, suggesting wide circulation of mutants in the population (Fig. 5; see also Table S2 in the supplemental material). Studying the impact of UL111A and UL40 mutants on the immune-evasive potential of strains and their implications for strain pathogenicity might be worthwhile, as initial findings for UL40 illustrate (120). The remaining genes containing disruptive mutations are discussed further in Text S1 in the supplemental material; mutants of these genes in clinical material were rare and/or unconfirmed.

HCMV evolution has been shaped by pervasive recombination. An important role for recombination in HCMV evolution has long been suggested. Given the common occurrence of mul-

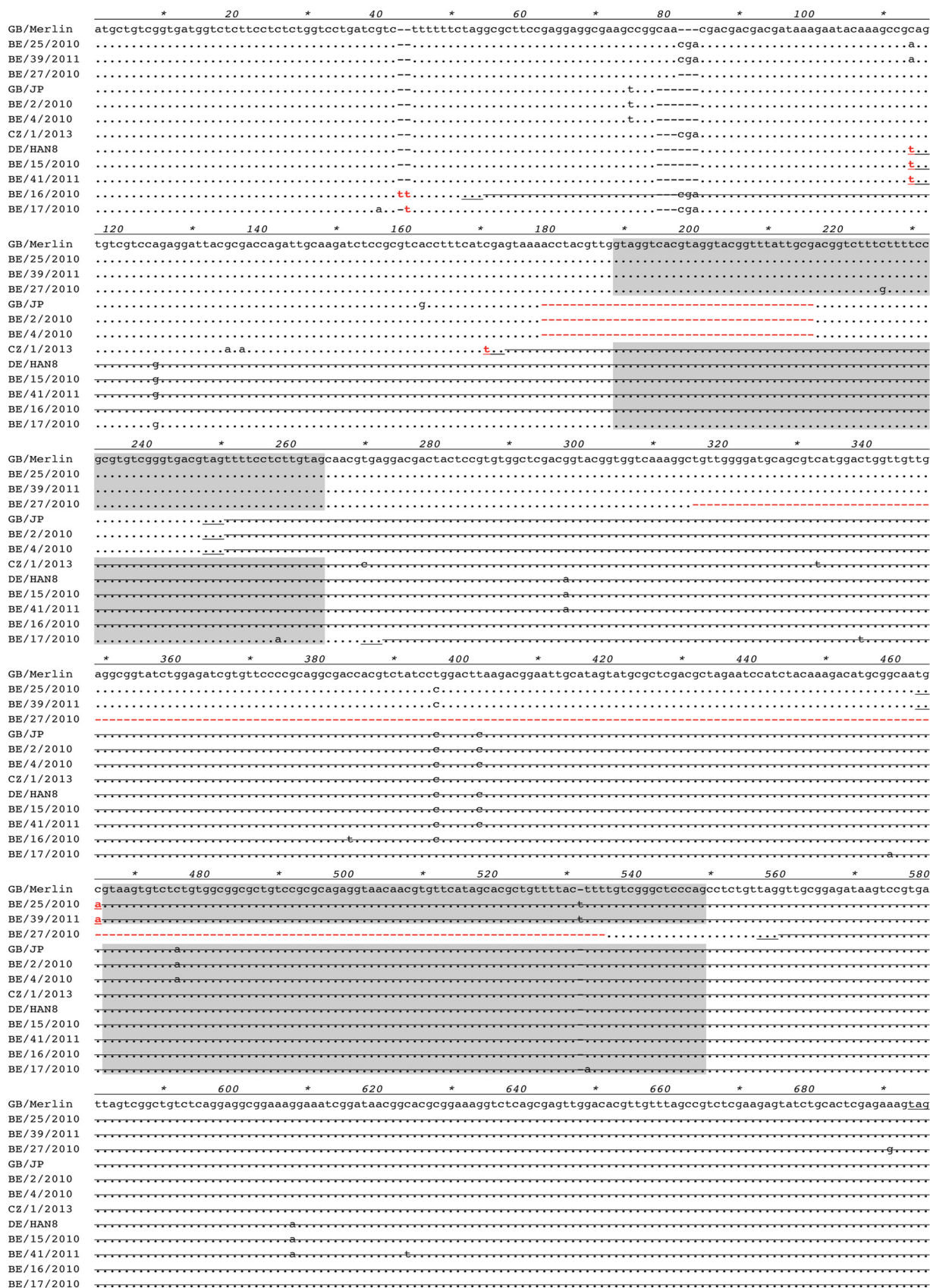
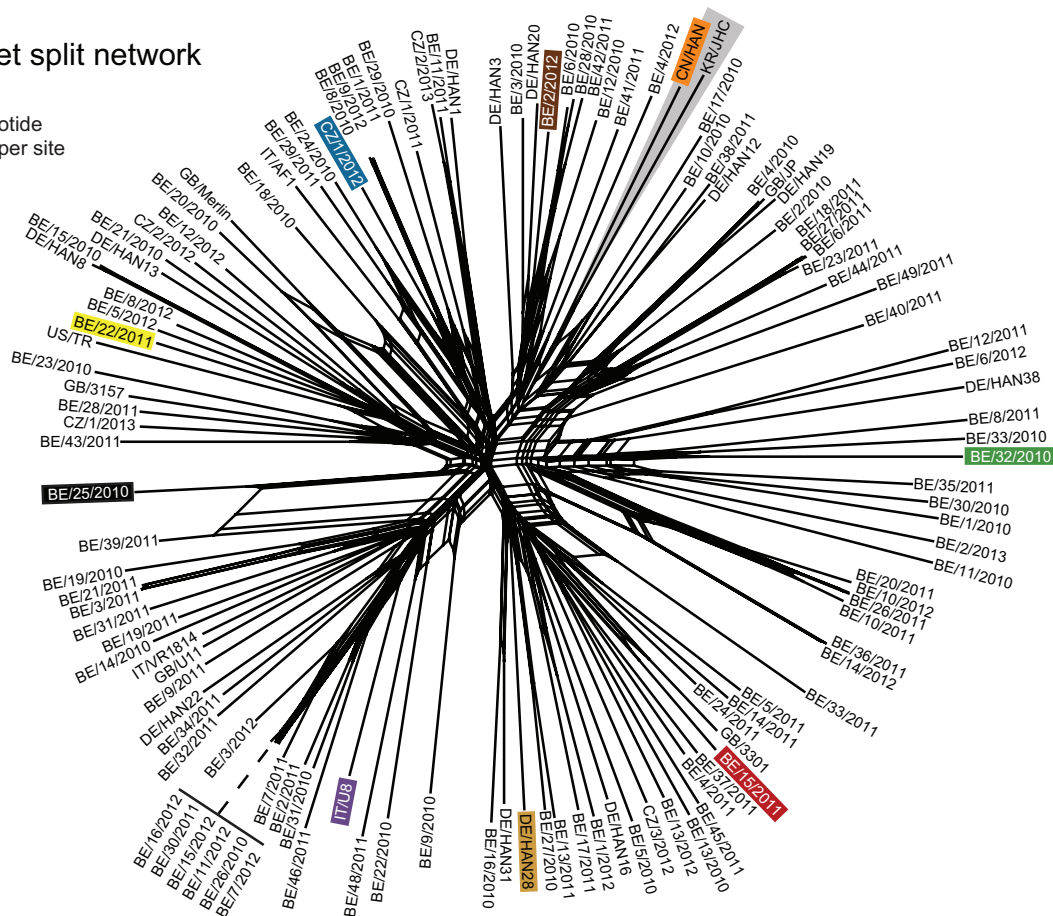


FIG 5 ORF-disrupting mutations in the UL111A gene. Shown is a nucleotide alignment of wild-type UL111A (strain Merlin) and all 12 mutants. Countries of isolation are listed for all strains with the international two-letter code (GB, Great Britain; BE, Belgium; CZ, Czech Republic; DE, Germany). Mutations (deletions, insertions, and substitutions) are highlighted in red, and the predicted stop codons are underlined, with untranslated sequences after stop codons being crossed out. Introns have a gray background, unless they are aberrantly translated because of the deletion of splice donor sites. LACmVIL-10 transcripts are similar, but the second intron is not spliced, with translation proceeding into it.

A. Neighbor-net split network

0.001 nucleotide
differences per sitePhi-test:
 $p=0.0$ 

B. BootScan analysis

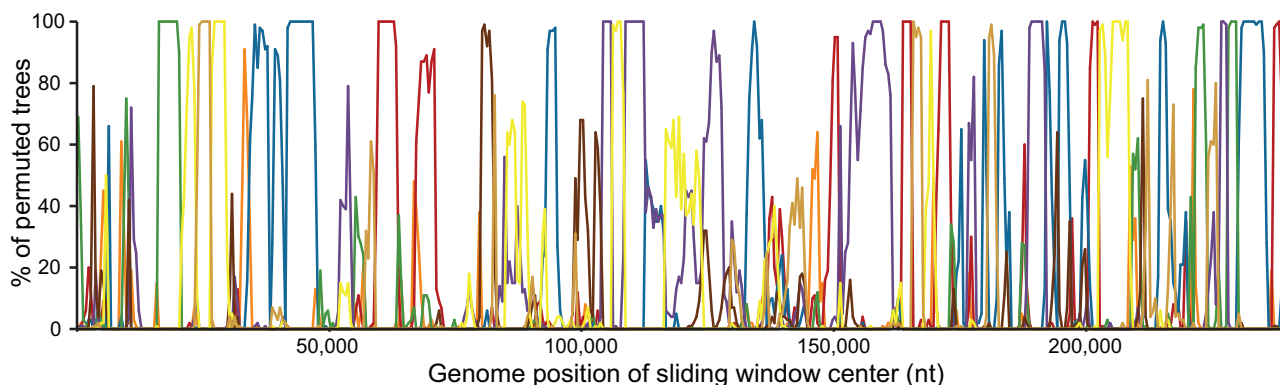


FIG 6 Widespread recombination between HCMV strains. Recombination between separate HCMV strains was analyzed. (A) Neighbor-net split network of 124 full-genome sequences showing numerous reticulate connections that are indicative of recombination. The Phi-test for recombination gave strong statistical evidence for recombination. Countries of isolation of different strains are represented with the international two-letter country codes at the beginning of strain names (CN, China; KR, South Korea; IT, Italy; US, United States; other codes are defined in the legend to Fig. 5). Asian strains JHC and HAN are highlighted with a gray background. (B) BootScan analysis of 9 strains highlighted in the split network. Strain BE/25/2010 (highlighted in black) was used as a reference strain.

multiple infections in a single host, the potential for recombination is obvious (reviewed in reference 15). Recombination has been identified in individual gene sequences and by the small amount of gene linkage observed (98, 121–124). However, overall recombination on a full-genome scale has not yet been quantified.

Since standard phylogenetic trees cannot account for recombination and are incorrect if recombined sequences are included,

we have analyzed phylogenetic relationships by constructing a split-decomposition network (Fig. 6A) (51). The large numbers of reticulate connections that are apparent at the root of the network indicate conflicting evolutionary signals such as those caused by recombination. By using the Phi-test for recombination, it was confirmed that recombination between isolates was detected ($P = 0.0$) (54). To further visualize recombination events, nine strains

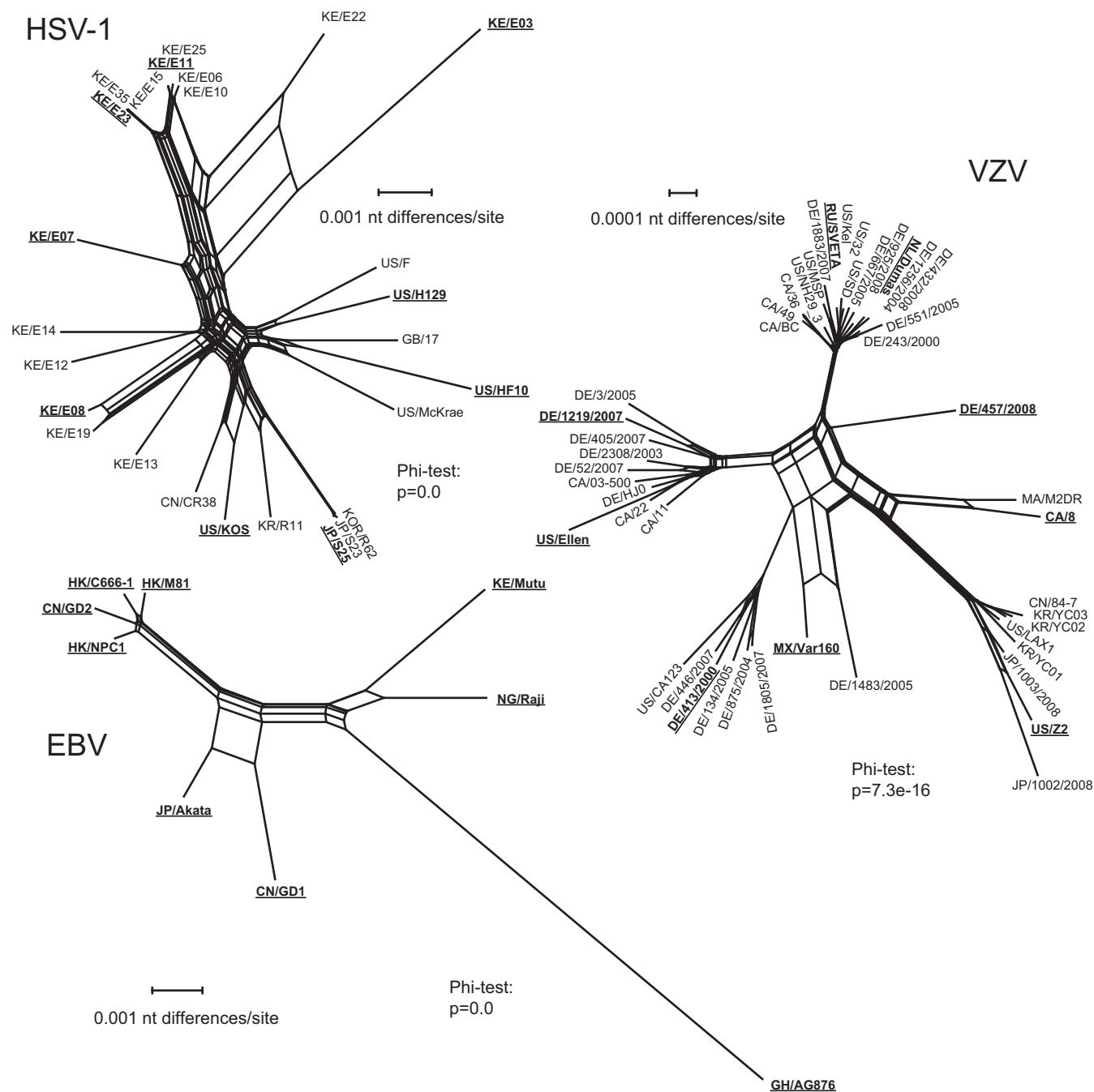


FIG 7 Diversity and recombination in HSV-1, VZV, and EBV. Using the full-genome sequences listed in Table S1 in the supplemental material, neighbor-net split networks were constructed for HSV-1, VZV, and EBV strains. In all three cases, statistically significant evidence for recombination was detected. Countries of isolation of different strains are represented with the international two-letter country codes at the beginning of strain names (KE, Kenya; JP, Japan; HK, Hong Kong; NG, Nigeria; GH, Ghana; CA, Canada; RU, Russia; NL, the Netherlands; MA, Morocco; MX, Mexico; other codes are defined in the legends to Fig. 5 and Fig. 6). In all three networks, distinct clusters are recognizable. Strains chosen for recombination analysis with RDP3 are underlined.

were selected from the network, and a BootScan analysis was performed based on a sequence alignment of these strains only (Fig. 6B). The constant shifting of phylogenetic relationships along the genome provides further evidence of numerous recombination events.

When split networks were constructed for HSV-1, VZV, and EBV, similar evidence for recombination was detected (P values are shown in Fig. 7). Previous studies have reported distinct geo-

graphic clusters for HSV-1, VZV, and EBV strains (48, 125–127). Split networks for these viruses indeed show distinct clusters (Fig. 7), while such clusters do not become apparent from our HCMV split network. However, apart from two Asian strains, all isolates were collected from European and North American patients. Interestingly, Asian strains JHC (128) and HAN are neighbors in the split network (highlighted in gray in Fig. 6A), but they do not

TABLE 6 Comparative analysis of recombination in human herpesviruses

Subfamily	Species ^a	No. of recombination events	No. of breakpoints	Recombination density (no. of breakpoints/kb)
<i>Alphaherpesvirinae</i>	HHV-1 (HSV-1)	60	78	0.57
	HHV-3 (VZV)	13	13	0.10
<i>Betaherpesvirinae</i>	HHV-5 (HCMV)	314	392	1.33
<i>Gammapherpesvirinae</i>	HHV-4 (EBV)	61	69	0.40

^a The official taxonomic name is given, followed by common names (Table 1). For each virus, an alignment of nine strains was analyzed (Fig. 6 and 7).

cluster separately from European/North American strains. Additional full-genome sequences from Asian and African strains will be necessary to investigate the potential existence of separate geographic clusters of HCMV.

The amount of recombination was quantified by detecting individual recombination breakpoints with RDP3 (53). To allow comparison of recombination densities in HCMV, HSV-1, VZV, and EBV genomes, we selected a group of nine full-genome sequences for each virus species, i.e., the total number of genomes that was available for EBV. Strains were selected to properly reflect total diversity (Fig. 6A and 7). Of these four human herpesviruses, HCMV clearly has the highest recombination density (Table 6). There is a statistically significant, positive correlation between overall nucleotide diversity (Table 1) and recombination density (Table 6) for these four viruses ($P = 0.017$ and $\rho = 0.98$ by Pearson's product-moment correlation). In comparisons of clusterings of isolates in the split networks (Fig. 6A and 7), there is a tentative inverse relation between the existence of distinct clusters and the recombination breakpoint density. VZV has the lowest recombination density, and the divergence of clusters is very clear, with few recombinants between clusters. HSV-1 and EBV have intermediate recombination densities: distinct clusters are still recognizable, but their delineation is less pronounced because of the presence of intermediate recombinants. Finally, HCMV has a markedly higher recombination density, resulting in a star-like phylogeny with no apparent clustering. Hypothesizing that these clusters or "genome types" have evolved during human radiation across the planet, we may now see a fading of geographical genome types because of increased global travel and mixing of populations and viruses. This hypothesis is supported by findings that the geographic separation of VZV clades might be slowly fading because of recent immigration (129). Given their different recombination densities, distinct herpesviruses would currently be at different stages of this process. In comparisons of recombination in HSV-1 and VZV, it has been proposed that inherent disparities in biological characteristics might be at the root of recombination potential (130). Higher recombination rates in HSV-1 were attributed to more frequent reactivation, longer episodes of asymptomatic shedding, and subsequent increased occurrence of multiple infections. In the same fashion, its superior immunomodulatory capabilities and broad cell tropism might explain the even higher capacity for recombination in HCMV.

While it is clear that recombination at the genome level permits the exchange of alleles at separate loci, we also wanted to evaluate the contribution of recombination to the generation of variation at the level of individual genes. Evidence for recombination in codon-aligned gene sequences was assessed by three different methods. The Phi-test for recombination simply determines

whether there is statistically significant evidence for recombination, while GARD and RDP3 identify specific recombination breakpoints. An overview of results for all genes is presented in Table S6 in the supplemental material. Recombination was confirmed in 93 out of 170 genes (55%) by at least 2 out of 3 methods. The densities of breakpoints varied enormously between different genes, as illustrated in Fig. 1. Gene-specific recombination densities were grouped in different gene families, gene conservation groups, and gene functions, as described above for diversity (see second panel in Fig. 2 for gene families). There was a statistically significant difference between recombination densities in different gene families ($P = 0.0031$ by KWt) but not in different conservation categories ($P = 0.13$ by KWt). For the former, none of the pairwise comparisons were significant. Overall, gene families with higher levels of diversity display higher recombination densities, although there are clearly some exceptions in conserved genes, such as IRS1 and TRS1 of the US22 family (Fig. 2). When divided over different gene functions, there was still a statistically significant difference between recombination densities ($P = 0.023$ by KWt; no significant pairwise comparisons). The discrepancy between overall KWt results and the results of pairwise comparisons for recombination over different gene families and functions is caused by the rigorous correction for multiple testing in the latter. The numbers of genes assigned to gene families and functions vary widely, reducing the power of the tests. In summary, our data demonstrate the potential for recombination to generate diversity both at the level of the individual gene as well as over the complete genome. The high recombination rate in HCMV compared to that in other human herpesviruses could be one of the most important reasons for its higher level of strain diversity. Reciprocally, the increased diversity could also result in a higher sensitivity for detection of recombination events that are undetectable in more conserved herpesviruses.

Positively selected residues provide a genetic fingerprint of the evolutionary arms race between virus and host. While intermolecular recombination is a very strong mechanism to increase nucleotide diversity, its ability to do so relies on preexisting variation through mutations caused by polymerase infidelity. Obviously, the accumulation of these mutations is dependent on the selective pressure that acts upon them. The persistent nature of HCMV and its constant interplay with host immune components highlight the potential selective pressure that might act on gene variants. To characterize the overall selective pressure acting on viral genes, we calculated the ratio of nonsynonymous substitutions per nonsynonymous site (dN) to synonymous substitutions per synonymous site (dS) for each gene alignment (Fig. 8; see also Table S4 in the supplemental material). Most HCMV genes seem to be under strong evolutionary constraints, as 96% of genes have

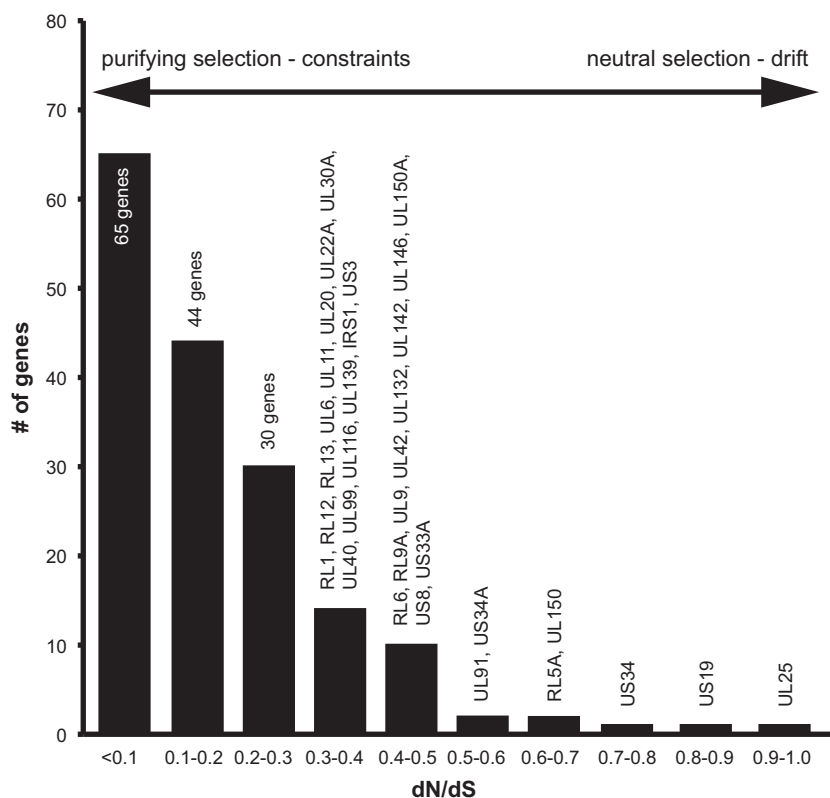


FIG 8 The majority of HCMV genes are under strong purifying selection. The selection mode acting on genes is represented by calculation of dN/dS ratios. A ratio close to zero indicates strong negative/purifying selection, and a ratio close to 1 indicates neutral selection or genetic drift. A ratio significantly higher than 1 indicates positive/diversifying selection. Genes are binned in groups with similar dN/dS ratios in steps of 0.1.

a dN/dS ratio of <0.5 and 64% of genes have a ratio of <0.2 . Recent studies of HSV-1 and MCMV also found a predominance of negative selection, but the proportion of genes with a dN/dS ratio of <0.1 is much higher for HCMV (38%, versus 7% for HSV-1 and 13% for MCMV) (48, 63). A few genes have dN/dS ratios closer to 1, indicating neutral selection or genetic drift. Most of these genes are poorly characterized, but the tegument protein ppUL25 was found to be a major target of anti-CMV antibodies (131). This strong negative/purifying selection is an indication of the excellent adaptation of HCMV to its human host, with most mutations having negative fitness effects and being quickly removed.

Notwithstanding the strong purifying selection acting on most HCMV genes, individual residues might be experiencing a different selective regimen. To identify positive/diversifying and negative/purifying selection at the codon level, we made use of four separate algorithms (SLAC, FEL, MEME, and FUBAR) included in the HyPhy package for phylogenetic hypothesis testing (56) (see Table S7 in the supplemental material). Since these methods have different sensitivities and specificities, we retained only sites that were independently confirmed by at least two out of four methods. Of 68,287 codons analyzed, 431 (0.6%) showed evidence of positive selection (in 105 genes), and 7,731 (11.3%) showed evidence of negative selection (in 169 genes), again demonstrating the predominance of negative selection acting on HCMV genes. However, there were clear discrepancies in the distribution of positively selected residues, as shown in Fig. 1. There was a statistically significant difference between gene families ($P = 0.0054$ by KWt)

and gene conservation groups ($P = 0.00055$ by KWt); genes with higher levels of variability generally display higher percentages of positively selected codons (statistically significant only for cytomegalovirus-specific versus core genes [$P = 0.0033$ by WRSt]). Clearly, there are multiple exceptions, most notably the MHC family (UL18 and UL142) and the RL1 (RL1 family), US7 (US6 family), IRS1 and TRS1 (US22 family), and US14 and US18 (US12 family) genes, which are subjected to higher levels of positive selection than would be expected from their diversity (Fig. 2, third panel). Their products function in the evasion of both adaptive immune responses (UL18, UL142, and US18) and innate antiviral mechanisms (IRS1 and TRS1), or their functions are not yet characterized. Hence, it could be suggested that these functionally uncharacterized genes might also interact with host antiviral mechanisms. Also, for negative selection, there was a significant difference between gene families ($P = 0.00023$ by KWt) and gene conservation groups ($P = 0.015$ by KWt), but this was unrelated to gene diversity (Fig. 2, bottom). No statistically significant differences in selection between gene functions were observed ($P = 0.16$ for positive selection; $P = 0.32$ for negative selection [determined by KWt]).

Of the genes experiencing the highest percentages of positive selection, there is a clear predominance of genes modulating host immune and antiviral pathways (Fig. 1; see also Table S7 in the supplemental material). The UL147 gene encodes an α -chemokine (132), UL142 interferes with NK cell activation (133), IRS1 inhibits the protein kinase R antiviral pathway (134), and UL20 is poorly characterized but has also been implicated in immune eva-

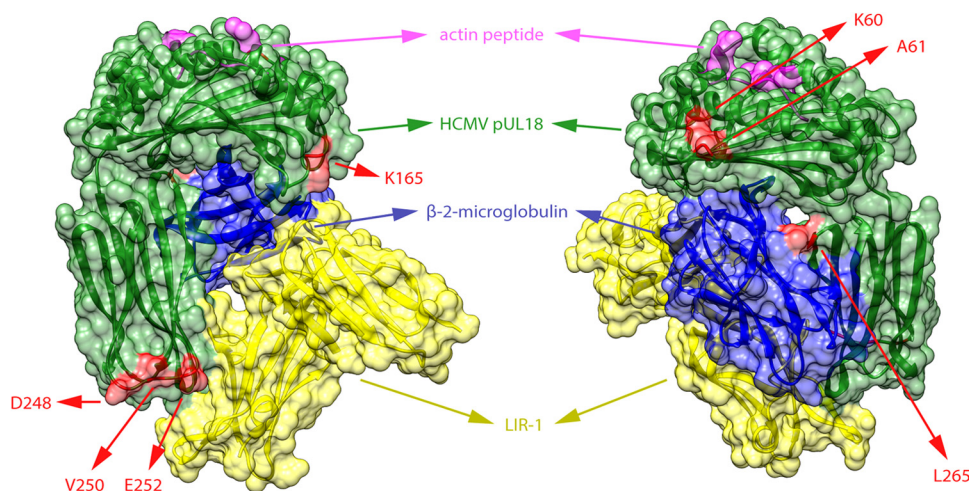


FIG 9 Residues under diversifying selection in pUL18. Codons under positive/diversifying selection in the UL18 gene were determined with the SLAC, FEL, MEME, and FUBAR algorithms of the HyPhy package. Sites that showed significant evidence of positive selection by at least two of four methods are represented in red on the protein structure of pUL18 (green). The structure shows a complex of pUL18 (a viral MHC-I homolog), human β -2-microglobulin (blue) (a MHC-I light chain), and an actin peptide (pink) bound to the inhibitory immunoglobulin receptor LIR-1 (yellow) (136). The three-dimensional structure is visualized from two opposite angles. All selected residues are located at the surface of pUL18.

sion (135). The role of the UL40 signal peptide in inhibiting NK cells is discussed above (see “Wild-type HCMV strains contain ORF-disrupting mutations in a wide range of nonessential genes”). Interestingly, 6 out of 8 residues under positive selection in pUL40 are located within this signal peptide, and more specifically, 4 out of 8 are located within the nonamer peptide that is processed to bind the viral MHC-I mimic pUL18 and HLA-E. For pUL18, a crystal structure of its interaction with human β -2-microglobulin (MHC-I light chain), an actin peptide, and the inhibitory LIR-1 receptor was reported (136). We have visualized pUL18 residues under positive selection on the pUL18 structure (Fig. 9). All positively selected residues are located on the surface of pUL18, with L265 interacting with β -2-microglobulin and D248, V250, and E252 being situated adjacent to LIR-1 binding sites. Although the overall evolutionary mode of HCMV is strongly shaped by constraints and purifying selection, these examples illustrate that specific protein residues can experience diversifying selective pressure through their interactions with the host.

Concluding remarks. In this study, we have applied our previously described workflow (36) to the characterization of HCMV genomes of 96 distinct clinical isolates from Belgian and Czech patients. Based on a comparative analysis of 124 full-genome sequences, HCMV interstrain nucleotide diversity, π , was estimated to be 0.021, significantly higher than the diversity in other human herpesviruses. Nevertheless, overall levels of purifying selection were very high, reflecting the remarkable adaptation of HCMV to its human host. Given the proofreading capacity of the HCMV DNA polymerase, additional strategies are necessary to generate diversity apart from replication error. Because of the wide range of immune-evasive functions, multiple infections are common, permitting the virus to recombine extensively. Furthermore, gene duplications can effectively enlarge mutational space. Finally, interactions with host components generate positive selective pressure at specific loci, which may help the virus avoid immune recognition.

We have demonstrated the widespread occurrence of gene-disrupting mutations in wild-type HCMV strains, unrelated to culture

passage. While some of these mutants might be evidence of ongoing contraction of gene family duplications, others could have implications for the immunomodulatory and, ultimately, the pathogenic potential of the isolates involved. In particular, a closer look at mutants of the UL40 and UL111A genes is warranted. We are currently retrieving clinical data regarding our patient population to explore associations of gene variants and mutants with disease outcome.

Our data set is completely derived from European patients. Currently, only two complete genome sequences from patients outside Europe and North America are publicly available. The availability of more complete genomes, especially from African and Asian patients, will reveal whether there are geographical discrepancies in gene diversity and mutational patterns. Additionally, the majority of our isolates (74/96) were derived from urine samples. Our preliminary results show identical mutations in different body compartments for several genes (including nasopharyngeal isolates, blood, amniotic fluid, and bronchoalveolar lavage fluid), but we cannot exclude the possibility that specific mutations can influence the tissue tropism of the viral strain. In the future, it will be interesting to see whether there are differences in the occurrence of disruptive mutations depending on the body compartment that is sampled.

To our knowledge, this study is the most comprehensive analysis of genetic variability and evolution in HCMV to date, providing both conceptual insights into diversity generation and a large source of sequence information of outstanding value for functional experiments with this important human pathogen.

ACKNOWLEDGMENTS

Steven Sijmons and Piet Maes were supported by the Research Foundation Flanders (FWO [Fonds voor Wetenschappelijk Onderzoek, Vlaanderen]).

The FWO was not involved in experimental design; in the collection, analysis, and interpretation of data; in the writing of the manuscript; and in the decision to submit the manuscript for publication.

We thank all colleagues of the Laboratory of Clinical Virology for

helpful comments and insightful discussions. We are also indebted to the laboratory technicians of the molecular diagnostics unit (CEMOL) at University Hospitals Leuven and Marc De Foor (Iris-Lab, Brussels, Belgium) for cell culture inoculation of patient samples and to Carl Van Hove (Janssen R&D) for preparing sequencing libraries and conducting sequencing experiments. Finally, we acknowledge the efforts and contributions of authors of previously reported sequences included in our analyses.

REFERENCES

- Cannon MJ, Schmid DS, Hyde TB. 2010. Review of cytomegalovirus seroprevalence and demographic characteristics associated with infection. *Rev Med Virol* 20:202–213. <http://dx.doi.org/10.1002/rmv.655>.
- Sinclair J, Reeves M. 2014. The intimate relationship between human cytomegalovirus and the dendritic cell lineage. *Front Microbiol* 5:389. <http://dx.doi.org/10.3389/fmicb.2014.00389>.
- Boeckh M, Geballe AP. 2011. Cytomegalovirus: pathogen, paradigm, and puzzle. *J Clin Invest* 121:1673–1680. <http://dx.doi.org/10.1172/JCI45449>.
- Manicklal S, Emery VC, Lazzarotto T, Boppana SB, Gupta RK. 2013. The “silent” global burden of congenital cytomegalovirus. *Clin Microbiol Rev* 26:86–102. <http://dx.doi.org/10.1128/CMR.00062-12>.
- Arvin AM, Fast P, Myers M, Plotkin S, Rabinovich R, National Vaccine Advisory Committee. 2004. Vaccine development to prevent cytomegalovirus disease: report from the National Vaccine Advisory Committee. *Clin Infect Dis* 39:233–239. <http://dx.doi.org/10.1086/421999>.
- Krause PR, Bialek SR, Boppana SB, Griffiths PD, Laughlin CA, Ljungman P, Mocarski ES, Pass RF, Read JS, Schleiss MR, Plotkin SA. 2013. Priorities for CMV vaccine development. *Vaccine* 32:4–10. <http://dx.doi.org/10.1016/j.vaccine.2013.09.042>.
- Dolan A, Cunningham C, Hector RD, Hassan-Walker AF, Lee L, Addison C, Dargan DJ, McGeoch DJ, Gatherer D, Emery VC, Griffiths PD, Sinzger C, McSharry BP, Wilkinson GW, Davison AJ. 2004. Genetic content of wild-type human cytomegalovirus. *J Gen Virol* 85:1301–1312. <http://dx.doi.org/10.1099/vir.0.79888-0>.
- Murphy E, Shenk T. 2008. Human cytomegalovirus genome. *Curr Top Microbiol Immunol* 325:1–19. http://dx.doi.org/10.1007/978-3-540-77349-8_1.
- Waner JL, Weller TH. 1978. Analysis of antigenic diversity among human cytomegaloviruses by kinetic neutralization tests with high-titered rabbit antisera. *Infect Immun* 21:151–157.
- Drew WL, Sweet ES, Miner RC, Mocarski ES. 1984. Multiple infections by cytomegalovirus in patients with acquired immunodeficiency syndrome: documentation by Southern blot hybridization. *J Infect Dis* 150:952–953. <http://dx.doi.org/10.1093/infdis/150.6.952>.
- Kilpatrick BA, Huang ES, Pagano JS. 1976. Analysis of cytomegalovirus genomes with restriction endonucleases *Hin* D III and *Eco*R-I. *J Virol* 18:1095–1105.
- Murphy E, Yu D, Grimwood J, Schmutz J, Dickson M, Jarvis MA, Hahn G, Nelson JA, Myers RM, Shenk TE. 2003. Coding potential of laboratory and clinical strains of human cytomegalovirus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:14976–14981. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.2136652100>.
- Pignatelli S, Dal Monte P, Rossini G, Landini MP. 2004. Genetic polymorphisms among human cytomegalovirus (HCMV) wild-type strains. *Rev Med Virol* 14:383–410. <http://dx.doi.org/10.1002/rmv.438>.
- Puchhammer-Stockl E, Gorzer I. 2006. Cytomegalovirus and Epstein-Barr virus subtypes—the search for clinical significance. *J Clin Virol* 36:239–248. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jcv.2006.03.004>.
- Puchhammer-Stockl E, Gorzer I. 2011. Human cytomegalovirus: an enormous variety of strains and their possible clinical significance in the human host. *Future Virol* 6:259–271. <http://dx.doi.org/10.2217/fvl.10.87>.
- Shepp DH, Match ME, Ashraf AB, Lipson SM, Millan C, Pergolizzi R. 1996. Cytomegalovirus glycoprotein B groups associated with retinitis in AIDS. *J Infect Dis* 174:184–187. <http://dx.doi.org/10.1093/infdis/174.1.184>.
- Torok-Storb B, Boeckh M, Hoy C, Leisenring W, Myerson D, Gooley T. 1997. Association of specific cytomegalovirus genotypes with death from myelosuppression after marrow transplantation. *Blood* 90:2097–2102.
- Correia-Silva JF, Resende RG, Arao TC, Abreu MH, Teixeira MM, Bittencourt H, Silva TA, Gomez RS. 2011. HCMV gB genotype and its association with cytokine levels in hematopoietic stem cell transplantation. *Oral Dis* 17:530–537. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1601-0825.2011.01801.x>.
- Emery VC, Manuel O, Asberg A, Pang X, Kumar D, Hartmann A, Preiksaitis JK, Pescovitz MD, Rollag H, Jardine AG, Gahlemann CG, Humar A. 2012. Differential decay kinetics of human cytomegalovirus glycoprotein B genotypes following antiviral chemotherapy. *J Clin Virol* 54:56–60. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jcv.2012.01.015>.
- Rossini G, Pignatelli S, Dal Monte P, Camozzi D, Lazzarotto T, Gabrielli L, Gatto MR, Landini MP. 2005. Monitoring for human cytomegalovirus infection in solid organ transplant recipients through antigenemia and glycoprotein N (gN) variants: evidence of correlation and potential prognostic value of gN genotypes. *Microbes Infect* 7:890–896. <http://dx.doi.org/10.1016/j.micinf.2005.01.016>.
- Pignatelli S, Lazzarotto T, Gatto MR, Dal Monte P, Landini MP, Faldella G, Lanari M. 2010. Cytomegalovirus gN genotypes distribution among congenitally infected newborns and their relationship with symptoms at birth and sequelae. *Clin Infect Dis* 51:33–41. <http://dx.doi.org/10.1086/653423>.
- Paradowska E, Jablonska A, Studzinska M, Suski P, Kasztelewicz B, Zawilinska B, Wisniewska-Ligier M, Dzierzanowska-Fangrat K, Wozniakowska-Gesicka T, Czech-Kowalska J, Lipka B, Kornacka M, Pawlik D, Tomasik T, Kosz-Vnenchak M, Lesnikowski ZJ. 2013. Distribution of cytomegalovirus gN variants and associated clinical sequelae in infants. *J Clin Virol* 58:271–275. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jcv.2013.05.024>.
- Paradowska E, Jablonska A, Studzinska M, Kasztelewicz B, Zawilinska B, Wisniewska-Ligier M, Dzierzanowska-Fangrat K, Wozniakowska-Gesicka T, Kosz-Vnenchak M, Lesnikowski ZJ. 2014. Cytomegalovirus glycoprotein H genotype distribution and the relationship with hearing loss in children. *J Med Virol* 86:1421–1427. <http://dx.doi.org/10.1002/jmv.23906>.
- Arav-Boger R, Willoughby RE, Pass RF, Zong JC, Jang WJ, Alcendor D, Hayward GS. 2002. Polymorphisms of the cytomegalovirus (CMV)-encoded tumor necrosis factor- α and beta-chemokine receptors in congenital CMV disease. *J Infect Dis* 186:1057–1064. <http://dx.doi.org/10.1086/344238>.
- Arav-Boger R, Battaglia CA, Lazzarotto T, Gabrielli L, Zong JC, Hayward GS, Diener-West M, Landini MP. 2006. Cytomegalovirus (CMV)-encoded UL144 (truncated tumor necrosis factor receptor) and outcome of congenital CMV infection. *J Infect Dis* 194:464–473. <http://dx.doi.org/10.1086/505427>.
- Waters A, Hassan J, De Gascon C, Kissoon G, Knowles S, Molloy E, Connell J, Hall WW. 2010. Human cytomegalovirus UL144 is associated with viremia and infant development sequelae in congenital infection. *J Clin Microbiol* 48:3956–3962. <http://dx.doi.org/10.1128/JCM.01133-10>.
- Paradowska E, Jablonska A, Plociennikowska A, Studzinska M, Suski P, Wisniewska-Ligier M, Dzierzanowska-Fangrat K, Kasztelewicz B, Wozniakowska-Gesicka T, Lesnikowski ZJ. 2014. Cytomegalovirus α -chemokine genotypes are associated with clinical manifestations in children with congenital or postnatal infections. *Virology* 462–463:207–217. <http://dx.doi.org/10.1016/j.virol.2014.06.020>.
- Arav-Boger R, Boger YS, Foster CB, Boger Z. 2008. The use of artificial neural networks in prediction of congenital CMV outcome from sequence data. *Bioinform Biol Insights* 2:281–289.
- He R, Ruan Q, Qi Y, Ma YP, Huang YJ, Sun ZR, Ji YH. 2006. Sequence variability of human cytomegalovirus UL146 and UL147 genes in low-passage clinical isolates. *Intervirology* 49:215–223. <http://dx.doi.org/10.1159/000091468>.
- Heo J, Petheram S, Demmler G, Murph JR, Adler SP, Bale J, Sparer TE. 2008. Polymorphisms within human cytomegalovirus chemokine (UL146/UL147) and cytokine receptor genes (UL144) are not predictive of sequelae in congenitally infected children. *Virology* 378:86–96. <http://dx.doi.org/10.1016/j.virol.2008.05.002>.
- Pati SK, Pinninti S, Novak Z, Chowdhury N, Patro RK, Fowler K, Ross S, Boppana S, NIDCD CHIMES Study Investigators. 2013. Genotypic diversity and mixed infection in newborn disease and hearing loss in congenital cytomegalovirus infection. *Pediatr Infect Dis J* 32:1050–1054. <http://dx.doi.org/10.1097/INF.0b013e31829bb0b9>.
- Nijman J, Mandemaker FS, Verboon-Macielek MA, Aitken SC, van

- Loon AM, de Vries LS, Schuurman R. 2014. Genotype distribution, viral load and clinical characteristics of infants with postnatal or congenital cytomegalovirus infection. *PLoS One* 9:e108018. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0108018>.
33. Vales-Gomez M, Shiroishi M, Maenaka K, Reyburn HT. 2005. Genetic variability of the major histocompatibility complex class I homologue encoded by human cytomegalovirus leads to differential binding to the inhibitory receptor ILT2. *J Virol* 79:2251–2260. <http://dx.doi.org/10.1128/JVI.79.4.2251-2260.2005>.
34. Cerboni C, Achour A, Warnmark A, Mousavi-Jazi M, Sandalova T, Hsu ML, Cosman D, Karre K, Carbone E. 2006. Spontaneous mutations in the human CMV HLA class I homologue UL18 affect its binding to the inhibitory receptor LIR-1/ILT2/CD85j. *Eur J Immunol* 36:732–741. <http://dx.doi.org/10.1002/eji.200425220>.
35. Sijmons S, Van Ranst M, Maes P. 2014. Genomic and functional characteristics of human cytomegalovirus revealed by next-generation sequencing. *Viruses* 6:1049–1072. <http://dx.doi.org/10.3390/v6031049>.
36. Sijmons S, Thys K, Corthout M, Van Damme E, Van Look M, Bollen S, Baguet S, Aerssens J, Van Ranst M, Maes P. 2014. A method enabling high-throughput sequencing of human cytomegalovirus complete genomes from clinical isolates. *PLoS One* 9:e95501. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0095501>.
37. Milne I, Stephen G, Bayer M, Cock PJ, Pritchard L, Cardle L, Shaw PD, Marshall D. 2013. Using Tablet for visual exploration of second-generation sequencing data. *Brief Bioinform* 14:193–202. <http://dx.doi.org/10.1093/bib/bbs012>.
38. Katoh K, Standley DM. 2013. MAFFT multiple sequence alignment software version 7: improvements in performance and usability. *Mol Biol Evol* 30:772–780. <http://dx.doi.org/10.1093/molbev/mst010>.
39. Cha TA, Tom E, Kemble GW, Duke GM, Mocarski ES, Spaete RR. 1996. Human cytomegalovirus clinical isolates carry at least 19 genes not found in laboratory strains. *J Virol* 70:78–83.
40. Prichard MN, Penfold ME, Duke GM, Spaete RR, Kemble GW. 2001. A review of genetic differences between limited and extensively passaged human cytomegalovirus strains. *Rev Med Virol* 11:191–200. <http://dx.doi.org/10.1002/rmv.315>.
41. Bradley AJ, Lurain NS, Ghazal P, Trivedi U, Cunningham C, Baluchova K, Gatherer D, Wilkinson GW, Dargan DJ, Davison AJ. 2009. High-throughput sequence analysis of variants of human cytomegalovirus strains Towne and AD169. *J Gen Virol* 90:2375–2380. <http://dx.doi.org/10.1099/vir.0.013250-0>.
42. Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipowski A, Kumar S. 2013. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. *Mol Biol Evol* 30:2725–2729. <http://dx.doi.org/10.1093/molbev/mst197>.
43. Wernersson R, Pedersen AG. 2003. RevTrans: multiple alignment of coding DNA from aligned amino acid sequences. *Nucleic Acids Res* 31:3537–3539. <http://dx.doi.org/10.1093/nar/gkg609>.
44. Otto TD, Dillon GP, Degraeve WS, Berriman M. 2011. RATT: Rapid Annotation Transfer Tool. *Nucleic Acids Res* 39:e57. <http://dx.doi.org/10.1093/nar/gkq1268>.
45. Zhang G, Raghavan B, Kotur M, Cheatham J, Sedmak D, Cook C, Waldman J, Trgovcich J. 2007. Antisense transcription in the human cytomegalovirus transcriptome. *J Virol* 81:11267–11281. <http://dx.doi.org/10.1128/JVI.00007-07>.
46. Gatherer D, Seirafian S, Cunningham C, Holton M, Dargan DJ, Baluchova K, Hector RD, Galbraith J, Herzyk P, Wilkinson GW, Davison AJ. 2011. High-resolution human cytomegalovirus transcriptome. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108:19755–19760. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.1115861108>.
47. Stern-Ginossar N, Weisburd B, Michalski A, Le VT, Hein MY, Huang SX, Ma M, Shen B, Qian SB, Hengel H, Mann M, Ingolia NT, Weissman JS. 2012. Decoding human cytomegalovirus. *Science* 338:1088–1093. <http://dx.doi.org/10.1126/science.1227919>.
48. Szpara ML, Gatherer D, Ochoa A, Greenbaum B, Dolan A, Bowden RJ, Enquist LW, Legendre M, Davison AJ. 2014. Evolution and diversity in human herpes simplex virus genomes. *J Virol* 88:1209–1227. <http://dx.doi.org/10.1128/JVI.01987-13>.
49. Benson G. 1999. Tandem Repeats Finder: a program to analyze DNA sequences. *Nucleic Acids Res* 27:573–580. <http://dx.doi.org/10.1093/nar/27.2.573>.
50. Librado P, Rozas J. 2009. DnaSP v5: a software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics* 25:1451–1452. <http://dx.doi.org/10.1093/bioinformatics/btp187>.
51. Huson DH, Bryant D. 2006. Application of phylogenetic networks in evolutionary studies. *Mol Biol Evol* 23:254–267. <http://dx.doi.org/10.1093/molbev/msj030>.
52. Lole KS, Bollinger RC, Paranjape RS, Gadkari D, Kulkarni SS, Novak NG, Ingersoll R, Sheppard HW, Ray SC. 1999. Full-length human immunodeficiency virus type 1 genomes from subtype C-infected seroconverters in India, with evidence of intersubtype recombination. *J Virol* 73:152–160.
53. Martin DP, Lemey P, Lott M, Moulton V, Posada D, Lefevre P. 2010. RDP3: a flexible and fast computer program for analyzing recombination. *Bioinformatics* 26:2462–2463. <http://dx.doi.org/10.1093/bioinformatics/btq467>.
54. Bruen TC, Philippe H, Bryant D. 2006. A simple and robust statistical test for detecting the presence of recombination. *Genetics* 172:2665–2681. <http://dx.doi.org/10.1534/genetics.105.048975>.
55. Kosakovsky Pond SL, Posada D, Gravenor MB, Woelk CH, Frost SDW. 2006. Automated phylogenetic detection of recombination using a genetic algorithm. *Mol Biol Evol* 23:1891–1901. <http://dx.doi.org/10.1093/molbev/msl051>.
56. Pond SL, Frost SD, Muse SV. 2005. HyPhy: hypothesis testing using phylogenies. *Bioinformatics* 21:676–679. <http://dx.doi.org/10.1093/bioinformatics/bti079>.
57. Delpont W, Poon AF, Frost SD, Kosakovsky Pond SL. 2010. Datamonkey 2010: a suite of phylogenetic analysis tools for evolutionary biology. *Bioinformatics* 26:2455–2457. <http://dx.doi.org/10.1093/bioinformatics/btq429>.
58. Kosakovsky Pond SL, Frost SD. 2005. Not so different after all: a comparison of methods for detecting amino acid sites under selection. *Mol Biol Evol* 22:1208–1222. <http://dx.doi.org/10.1093/molbev/msi105>.
59. Murrell B, Moola S, Mabona A, Weighill T, Sheward D, Kosakovsky Pond SL, Scheffler K. 2013. FUBAR: a fast, unconstrained Bayesian approximation for inferring selection. *Mol Biol Evol* 30:1196–1205. <http://dx.doi.org/10.1093/molbev/mst030>.
60. Murrell B, Wertheim JO, Moola S, Weighill T, Scheffler K, Kosakovsky Pond SL. 2012. Detecting individual sites subject to episodic diversifying selection. *PLoS Genet* 8:e1002764. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pgen.1002764>.
61. Pettersen EF, Goddard TD, Huang CC, Couch GS, Greenblatt DM, Meng EC, Ferrin TE. 2004. UCSF Chimera—a visualization system for exploratory research and analysis. *J Comput Chem* 25:1605–1612. <http://dx.doi.org/10.1002/jcc.20084>.
62. Cunningham C, Gatherer D, Hilfrich B, Baluchova K, Dargan DJ, Thomson M, Griffiths PD, Wilkinson GW, Schulz TF, Davison AJ. 2010. Sequences of complete human cytomegalovirus genomes from infected cell cultures and clinical specimens. *J Gen Virol* 91:605–615. <http://dx.doi.org/10.1099/vir.0.015891-0>.
63. Smith LM, McWhorter AR, Shellam GR, Redwood AJ. 2013. The genome of murine cytomegalovirus is shaped by purifying selection and extensive recombination. *Virology* 435:258–268. <http://dx.doi.org/10.1016/j.virol.2012.08.041>.
64. Renzette N, Bhattacharjee B, Jensen JD, Gibson L, Kowalik TF. 2011. Extensive genome-wide variability of human cytomegalovirus in congenitally infected infants. *PLoS Pathog* 7:e1001344. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.ppat.1001344>.
65. Stanton R, Westmoreland D, Fox JD, Davison AJ, Wilkinson GW. 2005. Stability of human cytomegalovirus genotypes in persistently infected renal transplant recipients. *J Med Virol* 75:42–46. <http://dx.doi.org/10.1002/jmv.20235>.
66. Bradley AJ, Kovacs IJ, Gatherer D, Dargan DJ, Alkharsah KR, Chan PK, Carman WF, Dedicoat M, Emery VC, Geddes CC, Gerna G, Ben-Ismael B, Kaye S, McGregor A, Moss PA, Pusztai R, Rawlinson WD, Scott GM, Wilkinson GW, Schulz TF, Davison AJ. 2008. Genotypic analysis of two hypervariable human cytomegalovirus genes. *J Med Virol* 80:1615–1623. <http://dx.doi.org/10.1002/jmv.21241>.
67. Lurain NS, Fox AM, Lichy HM, Bhorade SM, Ware CF, Huang DD, Kwan SP, Garrity ER, Chou S. 2006. Analysis of the human cytomegalovirus genomic region from UL146 through UL147A reveals sequence hypervariability, genotypic stability, and overlapping transcripts. *Virol J* 3:4. <http://dx.doi.org/10.1186/1743-422X-3-4>.
68. Gorzer I, Guelly C, Trajanoski S, Puchhammer-Stockl E. 2010. Deep sequencing reveals highly complex dynamics of human cytomegalovirus genotypes in transplant patients over time. *J Virol* 84:7195–7203. <http://dx.doi.org/10.1128/JVI.00475-10>.

69. Murthy S, Hayward GS, Wheelan S, Forman MS, Ahn JH, Pass RF, Arav-Boger R. 2011. Detection of a single identical cytomegalovirus (CMV) strain in recently seroconverted young women. *PLoS One* 6:e15949. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0015949>.
70. Zhang J. 2000. Rates of conservative and radical nonsynonymous nucleotide substitutions in mammalian nuclear genes. *J Mol Evol* 50:56–68. <http://link.springer.com/article/10.1007%2Fs002399910007>.
71. Van Damme E, Van Loock M. 2014. Functional annotation of human cytomegalovirus gene products: an update. *Front Microbiol* 5:218. <http://dx.doi.org/10.3389/fmicb.2014.00218>.
72. Stanton RJ, Baluchova K, Dargan DJ, Cunningham C, Sheehy O, Seirafian S, McSharry BP, Neale ML, Davies JA, Tomasec P, Davison AJ, Wilkinson GW. 2010. Reconstruction of the complete human cytomegalovirus genome in a BAC reveals RL13 to be a potent inhibitor of replication. *J Clin Invest* 120:3191–3208. <http://dx.doi.org/10.1172/JCI42955>.
73. Cortese M, Calo S, D'Aurizio R, Lilja A, Pacchiani N, Merola M. 2012. Recombinant human cytomegalovirus (HCMV) RL13 binds human immunoglobulin G Fc. *PLoS One* 7:e50166. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0050166>.
74. Hannan AJ. 2012. Tandem repeat polymorphisms: mediators of genetic plasticity, modulators of biological diversity and dynamic sources of disease susceptibility. *Adv Exp Med Biol* 769:1–9. http://dx.doi.org/10.1007/978-1-4614-5434-2_1.
75. Gemayel R, Vences MD, Legendre M, Verstrepen KJ. 2010. Variable tandem repeats accelerate evolution of coding and regulatory sequences. *Annu Rev Genet* 44:445–477. <http://dx.doi.org/10.1146/annurev-genet-072610-155046>.
76. Brouwer JR, Willemsen R, Oostra BA. 2009. Microsatellite repeat instability and neurological disease. *Bioessays* 31:71–83. <http://dx.doi.org/10.1002/bies.080122>.
77. Duke GM, Osorio JE, Palmenberg AC. 1990. Attenuation of Mengo virus through genetic engineering of the 5' noncoding poly(C) tract. *Nature* 343:474–476. <http://dx.doi.org/10.1038/343474a0>.
78. Hahn H, Palmenberg AC. 1995. Encephalomyocarditis viruses with short poly(C) tracts are more virulent than their mengovirus counterparts. *J Virol* 69:2697–2699.
79. Perdue ML, Garcia M, Senne D, Fraire M. 1997. Virulence-associated sequence duplication at the hemagglutinin cleavage site of avian influenza viruses. *Virus Res* 49:173–186. [http://dx.doi.org/10.1016/S0168-1702\(97\)01468-8](http://dx.doi.org/10.1016/S0168-1702(97)01468-8).
80. Bates PA, DeLuca NA. 1998. The polyserine tract of herpes simplex virus ICP4 is required for normal viral gene expression and growth in murine trigeminal ganglia. *J Virol* 72:7115–7124.
81. Pfister LA, Letvin NL, Koralnik IJ. 2001. JC virus regulatory region tandem repeats in plasma and central nervous system isolates correlate with poor clinical outcome in patients with progressive multifocal leukoencephalopathy. *J Virol* 75:5672–5676. <http://dx.doi.org/10.1128/JVI.75.12.5672-5676.2001>.
82. Kaufer BB, Jarosinski KW, Osterrieder N. 2011. Herpesvirus telomeric repeats facilitate genomic integration into host telomeres and mobilization of viral DNA during reactivation. *J Exp Med* 208:605–615. <http://dx.doi.org/10.1084/jem.20101402>.
83. Davis CL, Field D, Metzgar D, Saiz R, Morin PA, Smith IL, Spector SA, Wills C. 1999. Numerous length polymorphisms at short tandem repeats in human cytomegalovirus. *J Virol* 73:6265–6270.
84. Walker A, Petheram SJ, Ballard L, Murph JR, Demmler GJ, Bale JF, Jr. 2001. Characterization of human cytomegalovirus strains by analysis of short tandem repeat polymorphisms. *J Clin Microbiol* 39:2219–2226. <http://dx.doi.org/10.1128/JCM.39.6.2219-2226.2001>.
85. Picone O, Ville Y, Costa JM, Rouzioux C, Leruez-Ville M. 2005. Human cytomegalovirus (HCMV) short tandem repeats analysis in congenital infection. *J Clin Virol* 32:254–256. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jcv.2004.10.012>.
86. Szpara ML, Tafuri YR, Parsons L, Shamim SR, Verstrepen KJ, Legendre M, Enquist LW. 2011. A wide extent of inter-strain diversity in virulent and vaccine strains of alphaherpesviruses. *PLoS Pathog* 7:e1002282. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.ppat.1002282>.
87. Vences MD, Legendre M, Caldara M, Hagihara M, Verstrepen KJ. 2009. Unstable tandem repeats in promoters confer transcriptional evolvability. *Science* 324:1213–1216. <http://dx.doi.org/10.1126/science.1170097>.
88. Martin P, Makepeace K, Hill SA, Hood DW, Moxon ER. 2005. Microsatellite instability regulates transcription factor binding and gene expression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102:3800–3804. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.0406805102>.
89. Kawakami K, Salonga D, Park JM, Danenberg KD, Uetake H, Brabender J, Omura K, Watanabe G, Danenberg PV. 2001. Different lengths of a polymorphic repeat sequence in the thymidylate synthase gene affect translational efficiency but not its gene expression. *Clin Cancer Res* 7:4096–4101.
90. Tiscornia G, Mahadevan MS. 2000. Myotonic dystrophy: the role of the CUG triplet repeats in splicing of a novel DMPK exon and altered cytoplasmic DMPK mRNA isoform ratios. *Mol Cell* 5:959–967. [http://dx.doi.org/10.1016/S1097-2765\(00\)80261-0](http://dx.doi.org/10.1016/S1097-2765(00)80261-0).
91. King DG, Soller M, Kashi Y. 1997. Evolutionary tuning knobs. *Endeavour* 21:36–40. [http://dx.doi.org/10.1016/S0160-9327\(97\)01005-3](http://dx.doi.org/10.1016/S0160-9327(97)01005-3).
92. Faux NG, Bottomley SP, Lesk AM, Irving JA, Morrison JR, de la Banda MG, Whisstock JC. 2005. Functional insights from the distribution and role of homopeptide repeat-containing proteins. *Genome Res* 15:537–551. <http://dx.doi.org/10.1101/gr.3096505>.
93. Rupp B, Ruzsics Z, Buser C, Adler B, Walther P, Koszinowski UH. 2007. Random screening for dominant-negative mutants of the cytomegalovirus nuclear egress protein M50. *J Virol* 81:5508–5517. <http://dx.doi.org/10.1128/JVI.02796-06>.
94. Sharma M, Kamil JP, Coughlin M, Reim NI, Coen DM. 2014. Human cytomegalovirus UL50 and UL53 recruit viral protein kinase UL97, not protein kinase C, for disruption of nuclear lamina and nuclear egress in infected cells. *J Virol* 88:249–262. <http://dx.doi.org/10.1128/JVI.02358-13>.
95. Sharma M, Bender BJ, Kamil JP, Lye MF, Pesola JM, Reim NI, Hogle JM, Coen DM. 2015. Human cytomegalovirus UL97 phosphorylates the viral nuclear egress complex. *J Virol* 89:523–534. <http://dx.doi.org/10.1128/JVI.02426-14>.
96. Dargan DJ, Douglas E, Cunningham C, Jamieson F, Stanton RJ, Baluchova K, McSharry BP, Tomasec P, Emery VC, Percivalle E, Sarasini A, Gerna G, Wilkinson GW, Davison AJ. 2010. Sequential mutations associated with adaptation of human cytomegalovirus to growth in cell culture. *J Gen Virol* 91:1535–1546. <http://dx.doi.org/10.1099/vir.0.018994-0>.
97. Aoki T, Hirono I, Kurokawa K, Fukuda H, Nahary R, Eldar A, Davison AJ, Waltzek TB, Bercovier H, Hedrick RP. 2007. Genome sequences of three koi herpesvirus isolates representing the expanding distribution of an emerging disease threatening koi and common carp worldwide. *J Virol* 81:5058–5065. <http://dx.doi.org/10.1128/JVI.00146-07>.
98. Sekulin K, Gorzer I, Heiss-Czedik D, Puchhammer-Stockl E. 2007. Analysis of the variability of CMV strains in the RL11D domain of the RL11 multigene family. *Virus Genes* 35:577–583. <http://dx.doi.org/10.1007/s11262-007-0158-0>.
99. Yu D, Silva MC, Shenk T. 2003. Functional map of human cytomegalovirus AD169 defined by global mutational analysis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:12396–12401. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.1635160100>.
100. Dunn W, Chou C, Li H, Hai R, Patterson D, Stolz V, Zhu H, Liu F. 2003. Functional profiling of a human cytomegalovirus genome. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:14223–14228. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.2334032100>.
101. Davison AJ, Akter P, Cunningham C, Dolan A, Addison C, Dargan DJ, Hassan-Walker AF, Emery VC, Griffiths PD, Wilkinson GW. 2003. Homology between the human cytomegalovirus RL11 gene family and human adenovirus E3 genes. *J Gen Virol* 84:657–663. <http://dx.doi.org/10.1099/vir.0.18856-0>.
102. Engel P, Perez-Carmona N, Alba MM, Robertson K, Ghazal P, Angulo A. 2011. Human cytomegalovirus UL7, a homologue of the SLAM-family receptor CD229, impairs cytokine production. *Immunol Cell Biol* 89:753–766. <http://dx.doi.org/10.1038/icb.2011.55>.
103. Gabaev I, Steinbrück L, Pokoyski C, Pich A, Stanton RJ, Schwinzer R, Schulz TF, Jacobs R, Messerle M, Kay-Fedorov PC. 2011. The human cytomegalovirus UL11 protein interacts with the receptor tyrosine phosphatase CD45, resulting in functional paralysis of T cells. *PLoS Pathog* 7:e1002432. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.ppat.1002432>.
104. Shikhagaie M, Merce-Maldonado E, Isern E, Muntasell A, Alba MM, Lopez-Botet M, Hengel H, Angulo A. 2012. The human cytomegalovirus-specific UL1 gene encodes a late-phase glycoprotein incorporated in the virion envelope. *J Virol* 86:4091–4101. <http://dx.doi.org/10.1128/JVI.06291-11>.
105. Powers C, DeFilippis V, Malouli D, Fruh K. 2008. Cytomegalovirus

- immune evasion. *Curr Top Microbiol Immunol* 325:333–359. http://dx.doi.org/10.1007/978-3-540-77349-8_19.
106. Dugan GE, Hewitt EW. 2008. Structural and functional dissection of the human cytomegalovirus immune evasion protein US6. *J Virol* 82:3271–3282. <http://dx.doi.org/10.1128/JVI.01705-07>.
 107. Maidji E, Tugizov S, Abenes G, Jones T, Pereira L. 1998. A novel human cytomegalovirus glycoprotein, gpUS9, which promotes cell-to-cell spread in polarized epithelial cells, colocalizes with the cytoskeletal proteins E-cadherin and F-actin. *J Virol* 72:5717–5727.
 108. Huber MT, Tomazin R, Wisner T, Boname J, Johnson DC. 2002. Human cytomegalovirus US7, US8, US9, and US10 are cytoplasmic glycoproteins, not found at cell surfaces, and US9 does not mediate cell-to-cell spread. *J Virol* 76:5748–5758. <http://dx.doi.org/10.1128/JVI.76.11.5748-5758.2002>.
 109. Mandic L, Miller MS, Coulter C, Munshaw B, Hertel L. 2009. Human cytomegalovirus US9 protein contains an N-terminal signal sequence and a C-terminal mitochondrial localization domain, and does not alter cellular sensitivity to apoptosis. *J Gen Virol* 90:1172–1182. <http://dx.doi.org/10.1099/vir.0.008466-0>.
 110. Noriega V, Redmann V, Gardner T, Tortorella D. 2012. Diverse immune evasion strategies by human cytomegalovirus. *Immunol Res* 54: 140–151. <http://dx.doi.org/10.1007/s12026-012-8304-8>.
 111. Fielding CA, Aicheler R, Stanton RJ, Wang EC, Han S, Seirafian S, Davies J, McSharry BP, Weekes MP, Antrobus PR, Prod'homme V, Blanchet FP, Sugrue D, Cuff S, Roberts D, Davison AJ, Lehner PJ, Wilkinson GW, Tomasec P. 2014. Two novel human cytomegalovirus NK cell evasion functions target MICA for lysosomal degradation. *PLoS Pathog* 10:e1004058. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.ppat.1004058>.
 112. Gurczynski SJ, Das S, Pellett PE. 2014. Deletion of the human cytomegalovirus US17 gene increases the ratio of genomes per infectious unit and alters regulation of immune and endoplasmic reticulum stress response genes at early and late times after infection. *J Virol* 88:2168–2182. <http://dx.doi.org/10.1128/JVI.02704-13>.
 113. Bronzini M, Luginani A, Dell'Oste V, De Andrea M, Landolfo S, Gribaudo G. 2012. The US16 gene of human cytomegalovirus is required for efficient viral infection of endothelial and epithelial cells. *J Virol* 86: 6875–6888. <http://dx.doi.org/10.1128/JVI.06310-11>.
 114. Davison AJ. 2011. Evolution of sexually transmitted and sexually transmissible human herpesviruses. *Ann N Y Acad Sci* 1230:E37–E49. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1749-6632.2011.06358.x>.
 115. Elde NC, Child SJ, Eickbush MT, Kitzman JO, Rogers KS, Shendure J, Geballe AP, Malik HS. 2012. Poxviruses deploy genomic accordions to adapt rapidly against host antiviral defenses. *Cell* 150:831–841. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2012.05.049>.
 116. Brennan G, Kitzman JO, Rothenburg S, Shendure J, Geballe AP. 2014. Adaptive gene amplification as an intermediate step in the expansion of virus host range. *PLoS Pathog* 10:e1004002. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.ppat.1004002>.
 117. McSharry BP, Avdic S, Slobodman B. 2012. Human cytomegalovirus encoded homologs of cytokines, chemokines and their receptors: roles in immunomodulation. *Viruses* 4:2448–2470. <http://dx.doi.org/10.3390/v4112448>.
 118. Yamamoto-Tabata T, McDonagh S, Chang HT, Fisher S, Pereira L. 2004. Human cytomegalovirus interleukin-10 downregulates metalloproteinase activity and impairs endothelial cell migration and placental cytotrophoblast invasiveness in vitro. *J Virol* 78:2831–2840. <http://dx.doi.org/10.1128/JVI.78.6.2831-2840.2004>.
 119. Poole E, Avdic S, Hodgkinson J, Jackson S, Wills M, Slobodman B, Sinclair J. 2014. Latency-associated viral interleukin-10 (IL-10) encoded by human cytomegalovirus modulates cellular IL-10 and CCL8 secretion during latent infection through changes in the cellular microRNA hsa-miR-92a. *J Virol* 88:13947–13955. <http://dx.doi.org/10.1128/JVI.02424-14>.
 120. Prod'homme V, Tomasec P, Cunningham C, Lemberg MK, Stanton RJ, McSharry BP, Wang EC, Cuff S, Martoglio B, Davison AJ, Braud VM, Wilkinson GW. 2012. Human cytomegalovirus UL40 signal peptide regulates cell surface expression of the NK cell ligands HLA-E and gpUL18. *J Immunol* 188:2794–2804. <http://dx.doi.org/10.4049/jimmunol.1102068>.
 121. Chou SW. 1989. Reactivation and recombination of multiple cytomegalovirus strains from individual organ donors. *J Infect Dis* 160:11–15. <http://dx.doi.org/10.1093/infdis/160.1.11>.
 122. Haberland M, Meyer-König U, Hufert FT. 1999. Variation within the glycoprotein B gene of human cytomegalovirus is due to homologous recombination. *J Gen Virol* 80(Part 6):1495–1500.
 123. Rasmussen L, Geissler A, Winters M. 2003. Inter- and intragenic variations complicate the molecular epidemiology of human cytomegalovirus. *J Infect Dis* 187:809–819. <http://dx.doi.org/10.1086/367900>.
 124. Faure-Della Corte M, Samot J, Garrigue I, Magnin N, Reigadas S, Couzi L, Dromer C, Velly JF, Dechanet-Merville J, Fleury HJ, Lafon ME. 2010. Variability and recombination of clinical human cytomegalovirus strains from transplantation recipients. *J Clin Virol* 47:161–169. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jcv.2009.11.023>.
 125. Kolb AW, Ane C, Brandt CR. 2013. Using HSV-1 genome phylogenetics to track past human migrations. *PLoS One* 8:e76267. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0076267>.
 126. Quinlivan M, Hawrami K, Barrett-Muir W, Aaby P, Arvin A, Chow VT, John TJ, Matondo P, Peiris M, Poulsen A, Siqueira M, Takahashi M, Talukder Y, Yamanishi K, Leedham-Green M, Scott FT, Thomas SL, Breuer J. 2002. The molecular epidemiology of varicella-zoster virus: evidence for geographic segregation. *J Infect Dis* 186:888–894. <http://dx.doi.org/10.1086/344228>.
 127. Santpere G, Darre F, Blanco S, Alcamí A, Villoslada P, Mar Alba M, Navarro A. 2014. Genome-wide analysis of wild-type Epstein-Barr virus genomes derived from healthy individuals of the 1,000 Genomes Project. *Genome Biol Evol* 6:846–860. <http://dx.doi.org/10.1093/gbe/evu054>.
 128. Jung GS, Kim YY, Kim JI, Ji GY, Jeon JS, Yoon HW, Lee GC, Ahn JH, Lee KM, Lee CH. 2011. Full genome sequencing and analysis of human cytomegalovirus strain JHC isolated from a Korean patient. *Virus Res* 156:113–120. <http://dx.doi.org/10.1016/j.virusres.2011.01.005>.
 129. Sauerbrei A, Wutzler P. 2007. Different genotype pattern of varicella-zoster virus obtained from patients with varicella and zoster in Germany. *J Med Virol* 79:1025–1031. <http://dx.doi.org/10.1002/jmv.20879>.
 130. Norberg P, Tyler S, Severini A, Whitley R, Liljeqvist JA, Bergstrom T. 2011. A genome-wide comparative evolutionary analysis of herpes simplex virus type 1 and varicella zoster virus. *PLoS One* 6:e22527. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0022527>.
 131. Lazzarotto T, Varani S, Gabrielli L, Pignatelli S, Landini MP. 2001. The tegument protein ppUL25 of human cytomegalovirus (CMV) is a major target antigen for the anti-CMV antibody response. *J Gen Virol* 82:335–338.
 132. Penfold ME, Dairaghi DJ, Duke GM, Saederup N, Mocarski ES, Kemble GW, Schall TJ. 1999. Cytomegalovirus encodes a potent alpha chemokine. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:9839–9844. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.96.17.9839>.
 133. Ashiru O, Bennett NJ, Boyle LH, Thomas M, Trowsdale J, Wills MR. 2009. NKG2D ligand MICA is retained in the cis-Golgi apparatus by human cytomegalovirus protein UL142. *J Virol* 83:12345–12354. <http://dx.doi.org/10.1128/JVI.01175-09>.
 134. Hakki M, Marshall EE, De Niro KL, Geballe AP. 2006. Binding and nuclear relocalization of protein kinase R by human cytomegalovirus TRS1. *J Virol* 80:11817–11826. <http://dx.doi.org/10.1128/JVI.00957-06>.
 135. Jelcic I, Reichel J, Schlude C, Treutler E, Sinzger C, Steinle A. 2011. The polymorphic HCMV glycoprotein UL20 is targeted for lysosomal degradation by multiple cytoplasmic dileucine motifs. *Traffic* 12:1444–1456. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1600-0854.2011.01236.x>.
 136. Yang Z, Bjorkman PJ. 2008. Structure of UL18, a peptide-binding viral MHC mimic, bound to a host inhibitory receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105:10095–10100. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.0804551105>.
 137. Qi Y, Mao ZQ, Ruan Q, He R, Ma YP, Sun ZR, Ji YH, Huang Y. 2006. Human cytomegalovirus (HCMV) UL139 open reading frame: sequence variants are clustered into three major genotypes. *J Med Virol* 78:517–522. <http://dx.doi.org/10.1002/jmv.20571>.
 138. Rasmussen L, Geissler A, Cowan C, Chase A, Winters M. 2002. The genes encoding the gCIII complex of human cytomegalovirus exist in highly diverse combinations in clinical isolates. *J Virol* 76:10841–10848. <http://dx.doi.org/10.1128/JVI.76.21.10841-10848.2002>.
 139. Hitomi S, Kozuka-Hata H, Chen Z, Sugano S, Yamaguchi N, Watanabe S. 1997. Human cytomegalovirus open reading frame UL11 encodes a highly polymorphic protein expressed on the infected cell surface. *Arch Virol* 142:1407–1427. <http://dx.doi.org/10.1007/s007050050169>.
 140. Pignatelli S, Dal Monte P, Rossini G, Chou S, Gojobori T, Hanada K, Guo JJ, Rawlinson W, Britt W, Mach M, Landini MP. 2003. Human cytomegalovirus glycoprotein N (gpUL73-gN) genomic variants: identification of a novel subgroup, geographical distribution and evidence of positive selective pressure. *J Gen Virol* 84:647–655. <http://dx.doi.org/10.1099/vir.0.18704-0>.
 141. Luran NS, Kapell KS, Huang DD, Short JA, Paintsil J, Winkfield E, Benedict CA, Ware CF, Bremer JW. 1999. Human cytomegalovirus

- UL144 open reading frame: sequence hypervariability in low-passage clinical isolates. *J Virol* 73:10040–10050.
142. Bar M, Shannon-Lowe C, Geballe AP. 2001. Differentiation of human cytomegalovirus genotypes in immunocompromised patients on the basis of UL4 gene polymorphisms. *J Infect Dis* 183:218–225. <http://dx.doi.org/10.1086/317939>.
 143. Hayajneh WA, Contopoulos-Ioannidis DG, Lesperance MM, Venegas AM, Colberg-Poley AM. 2001. The carboxyl terminus of the human cytomegalovirus UL37 immediate-early glycoprotein is conserved in primary strains and is important for transactivation. *J Gen Virol* 82:1569–1579.
 144. Ji YH, Rong Sun Z, Ruan Q, Guo JJ, He R, Qi Y, Ma YP, Mao ZQ, Huang YJ. 2006. Polymorphisms of human cytomegalovirus UL148A, UL148B, UL148C, UL148D genes in clinical strains. *J Clin Virol* 37:252–257. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jcv.2006.09.007>.
 145. Ji YH, Sun ZR, Ruan Q, He R, Qi Y, Ma YP, Huang YJ. 2006. High variability of human cytomegalovirus UL150 open reading frame in low-passaged clinical isolates. *Chin Med Sci J* 21:69–74.
 146. Deckers M, Hofmann J, Kreuzer KA, Reinhard H, Edubio A, Hengel H, Voigt S, Ehlers B. 2009. High genotypic diversity and a novel variant of human cytomegalovirus revealed by combined UL33/UL55 genotyping with broad-range PCR. *Virology* 6:210. <http://dx.doi.org/10.1186/1743-422X-6-210>.

New insights on the natural killer cell repertoire from a thorough analysis of cord blood cells

Pauline Rettman,* Catherine Willem,* Gaëlle David,* Raphaëlle Riou,* Nolwenn Legrand,* Julie Esbelin,[†] Anne Cesbron,^{‡,§} David Senitzer,[¶] Katia Gagne,^{*‡,§} and Christelle Retière*

*Immunovirologie et Polymorphisme Génétique and [†]Laboratoire d'Histocompatibilité et d'Immunogénétique, Etablissement Français du Sang, Université de Nantes, Nantes, France; [‡]Hôpital Mère-Enfant, Centre Hospitalier Universitaire Hotel Dieu, Nantes, France; [§]LabEx Transplantex, Université de Strasbourg, France; and [¶]Division of Hematology and Bone Marrow Transplantation, City of Hope, National Medical Center, Duarte, California, USA

RECEIVED JANUARY 22, 2016; REVISED MARCH 4, 2016; ACCEPTED MARCH 10, 2016. DOI: 10.1189/jlb.1HI0116-036R

ABSTRACT

Although CB NK cells are characterized as immature lymphocytes, their impressive expansion and efficient graft-versus-leukemia response have been highlighted early after UCBT. To better evaluate their potential as source of effective NK cells, we revisited the study of NK cell repertoire from a large cohort of CB samples. Our study showed that the CB NK cell repertoire appears to be constructed early, depending on KIR gene content, but not on the autologous HLA environment. NKG2A was expressed on a large proportion of CB NK cells that inversely correlated with KIR⁺ NK cell frequency. Self-HLA class I molecule-educated CB KIR⁺ NK cells present a lower spontaneous lysis than do their adult counterparts, which is probably related to the low expression of activating NK receptors. We describe for the first time a proliferative and cytotoxic NKG2C⁺ NK cell subset representing more than 10% of CB NK cells. NKG2A strongly inhibited CB NK cell degranulation, and its coexpression on NKG2C⁺ NK cells may contribute to limiting their activation. Overall, the CB NK cell repertoire is constructed early and harbors numerous functional abilities shared by adult NK cells. In addition, their naïve viral status and fast expansion confer numerous advantages in immunotherapy on CB NK cells.

J. Leukoc. Biol. 100: 000–000; 2016.

Introduction

NK cells are the first line of defense against viral infection and tumors, primarily because of their ability to discriminate self from nonself. These innate lymphocytes express different receptors

specific to HLA class I molecules, present on almost all cells, leading to self-recognition. In viral and tumoral processes, HLA class I processing and cell surface expression are frequently targeted to escape adaptive cellular immunity. This new phenotype marked by the absence or reduced expression of HLA class I molecules triggers NK cell cytotoxicity. The absence of inhibitory receptor engagement with cognate HLA ligands leads to NK cell activation because of “missing-self” recognition [1, 2]. NK cell effector functions are orchestrated by a finely tuned and broad range of inhibitory and activating receptors. HLA-specific NK receptors include the KIR, heterodimer CD94/C-type lectin receptors (CD94/NKG2A, CD94/NKG2C) and ILT2. Inhibitory signals are insufficient to trigger NK cell cytotoxicity and require additional activating signals transmitted by different activating receptors as such NKG2D, DNAM-1, 2B4, and NCRs for whom the ligands are less well documented.

KIR receptors recognize specific allotypic determinants shared by different HLA-class I molecules, referred to as KIR ligands. Group C1 and C2 HLA-Cw allotypes are recognized by KIR2DL2/2DL3 and KIR2DL1, respectively, although KIR2DL2 and -3 present a larger spectrum of HLA-C recognition than KIR2DL1 [3, 4], and HLA-A and -B allotypes with a Bw4 motif are targeted by KIR3DL1. Activating KIR specificities are less described, except KIR2DS1 and KIR2DS2 which recognize C2 and C1 ligands, respectively [4–6]. CD94/NKG2C and CD94/NKG2A recognize HLA-E molecules and are respectively activating and inhibitory receptors. ILT2 is an inhibitory receptor that can bind to HLA class I molecules and nonclassical HLA-G and -E molecules [7]. The homodimer NKG2D binding with MIC-A, MIC-B, and ULBP ligands activates NK cell effector functions. NKp30 and NKp44 recognize surface proteins of the B7-H6 family [8] and proliferating cell nuclear Ag [9], respectively, and most NCR ligands are expressed on tumor cells. These receptors also recognize viral hemagglutinin. Finally, CD112 and nectin-like CD155 are identified ligands of DNAM-1 [10], also

Abbreviations: CB = cord blood, DNAM-1 = DNAX accessory molecule-1, GvL = graft versus leukemia, HSCT = hematopoietic stem cell transplantation, ILT2 = immunoglobulin-like transcript 2, KIR = killer cell Ig-like receptor, MFI = mean fluorescence intensity, MICA = MHC class I polypeptide-related sequence A, NCR = natural cytotoxicity receptor, NKG2D = natural killer group 2D, UCBT = umbilical cord blood transplantation, ULBP = UL16 binding protein

The online version of this paper, found at www.jleukbio.org, includes supplemental information.

1. Correspondence: Etablissement Français du Sang-Pays de la Loire, EA4271 “Immunovirologie et Polymorphisme Génétique”, 34 boulevard Jean Monnet, 44011 Nantes cedex 01, France. Email: christelle.retiere@efs.sante.fr

frequently expressed on virally infected and tumor cells. Overall, NK cells express a broad range of activating and inhibitory receptors regulating anti-viral and -leukemic NK cell activities.

Because of their ability to recognize missing self, NK cells are alloreactive in an HLA class I-mismatched context. The role of KIR⁺ NK cell alloreactivity has been reported, in particular after HLA haploidentical HSCT. Moreover, NK cells are the first population to reconstitute the hematopoietic system after HSCT. In HLA class I-mismatched donor/recipient pairs, alloreactive KIR⁺ NK cells can exert a beneficial graft-versus-leukemia effect [11]. When fully HLA-matched related or unrelated donors are unavailable, double umbilical CB transplantation (dUCBT) is an efficient alternative [12, 13]. We have recently highlighted the importance of KIR genes in assessing early chimerism status after dUCBT [14]. It has been shown that CB NK cells mature rapidly after UCBT and harbor strong cytotoxic activity against blast cells [15]. Recent deep investigations have brought new insights into the shaping of the NK cell repertoire after persistent viral infection and aging [16–19]. Despite a thorough analysis of the adult NK cell repertoire, few studies have been devoted to CB NK cell biology [19, 20]. In this study, we performed an in-depth monitoring of CB NK cell repertoire from CB samples ($n = 73$) compared with healthy adult individuals ($n = 158$) to reevaluate its structural formation and functionality in light of new insights in the NK cell field.

MATERIALS AND METHODS

Cells: PBMCs, CB samples, and cell lines

PBMCs and CB cells were isolated from healthy adult volunteers and from umbilical CB samples, respectively. All blood donors were recruited at the Blood Transfusion Center (EFS, Nantes, France), and umbilical CB samples were obtained at the Nantes CHU maternity unit. Informed consent was obtained from all healthy individuals and mothers. HLA class I-deficient 721.221 lymphoblastoid EBV-B cells, referred to as 221 cells, were used as positive controls to assess NK cell degranulation and IFN- γ secretion. HLA-B*15:13 (Bw4), B*39:01 (Bw6), C*03:04 (C1), C*02:02 (C2) and HLA-E transfected 221 cells (kindly provided by Dr. V. Braud, Centre National de la Recherche Scientifique/UNSA UMR 7275, Valbonne, France) were used to evaluate degranulation and IFN- γ secretion of NK cells.

KIR and HLA genotyping

Genomic DNA from healthy adult donors and CB were provided by the HLA laboratory (Dr. A. Cesbron, EFS Nantes, France). All DNAs were typed for KIR2DL1, 2DL2, 2DL3, 2DL4, 2DL5A/B, 3DL1, 3DL2, 3DL3, 2DS1, 2DS2, 2DS3, 2DS4/1D, 2DS5, and 3DS1, with a KIR multiplex PCR-SSP method [21]. High-resolution typing for HLA-A, -B, and -C loci was carried out on all healthy adult donor and CB samples by a Sequence Based Typing kit (Abbott Molecular, Abbott Park, IL, USA). KIR genotypes were determined based on the presence or absence of activating KIR, KIR AA genotype presenting only KIR2DS4 as activating KIR, and KIR B⁺ genotype presenting several activating KIR. KIR ligand C1, C2, Bw4, and Bw6 were defined based on allelic HLA class I typing.

Phenotypic analysis by flow cytometry

The NK cell-surface phenotype from freshly isolated CB cells and adult PBMCs was determined by 4-color flow cytometry with the following mouse anti-human mAbs: anti-KIR2DL1-FITC (143211; R&D Systems, Minneapolis, MN, USA); anti-KIR2DL1/2DS1-PE (EB6), anti-KIR2DL2/2DL3/2DS2-PE (GL183), anti-KIR2DS4 (FES172), anti-KIR3DL1/3DS1 (Z27), and anti-KIR3DL1-FITC (DX9) (Beckman Coulter Immunotech, Marseille, France); anti-CD3-PerCP (SK7) and anti-CD56-allophycocyanin (B159; BD Biosciences,

Le Pont de Claix, France); and anti-NKp30-PE (Z25; Beckman Coulter). anti-NKp44-PE (Z231; Beckman Coulter), anti-NKG2D-PE (ID11; BD Biosciences), anti-NKG2C-PE (R&D System), anti-NKG2A-PE (Z199; Beckman Coulter), anti-ILT2-FITC (CD85j; BD Biosciences), anti-DNAM-1-FITC (CD226; BD Biosciences), anti-2B4-FITC (CD244; BD Biosciences), anti-CD161-FITC (BD Biosciences), anti-CD16-FITC (BD Biosciences), anti-CD57-FITC (BD Biosciences), anti-KIR2DL1/2/3/2DS1/2-FITC (1A6), anti-KIR2DL1/2/3/2DS2-FITC (8C11), anti-KIR2DL2/2DL3/2DS2-FITC (4A8) and anti-KIR2DL3/2DS2-FITC (1F12) generated and characterized in our laboratory [22]. All flow cytometry data were collected on a FACSCalibur system (BD Biosciences), and analyzed with Flowjo 7.6.1 software (TreeStar, Ashland, OR, USA).

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

Adult and CB NK cells with an AA KIR genotype were tested for their cytolytic potential with a CD107a mobilization assay after stimulation with 221-, 221-C1-, 221-C2-, 221-Bw4-, and 221-Bw6-transfected cell lines. Thawed PBMCs prestained with CD107a (H4A3, BD Biosciences) were cultured with different target cells (221, 221-C1, 221-C2, 221-Bw4, and 221-Bw6) for 5 h at an E:T ratio of 1:1 with brefeldin A (Sigma-Aldrich) at 10 μ g/ml for the last 4 h. The cells were surface stained with anti-KIR2DL1/2DS1-PE (EB6; Beckman Coulter), anti-KIR2DL2/2DL3/2DS2-APC (GL183; Beckman Coulter), and CD3-PerCP (9E2; BD Biosciences).

For the IFN- γ secretion assay, after 5 h culture with target cells, adult and CB cells were surface stained with anti-KIR2DL1/2DS1-FITC (EB6; Miltenyi Biotec, Paris, France), anti-KIR2DL2/2DL3/2DS2-APC (GL183; Beckman Coulter) and anti-CD3-PerCP (9E2; BD Biosciences), at an E:T ratio of 1:1, and fixed with PFA 4%. Cells were then permeabilized in a PBS 0.1% saponin solution, and IFN- γ intracellular expression was measured using anti-IFN- γ (BD Biosciences) after 1 h incubation at room temperature. Adult and CB NKG2C⁺ and NKG2A⁺ NK cells were targeted in a CD107a mobilization assay against 221 and 221-HLA-E target cells, at an E:T ratio of 1:1 or 50:1, as described using CD107a-PerCP, CD3-PerCP (9E2, BD Biosciences), NKG2A-FITC (Beckman Coulter), and NKG2C-PE (R&D Systems). All flow cytometry data were collected on a FACSCalibur system (BD Biosciences) and analyzed with Flowjo 7.6.1 software (TreeStar).

In vitro amplification of CB NK cells

Thawed CB cells were cultured with 221 or 221-HLA-E cells at an E:T ratio of 10:1 for 2 wk at 37°C in an *in vitro* model, as previously described [5].

Statistical analyses

Data were analyzed by Prism, v6.0 (GraphPad, San Diego, CA, USA), and statistically significant differences were determined by Student's *t* test or ANOVA. $P < 0.05$ indicated be statistically significant results.

RESULTS

Impact of KIR genotype but not HLA class I autologous environment on CB KIR NK cell repertoire

In the current study, 73 CB and 158 healthy adult samples were included in an in-depth phenotypic NK cell analysis. We focused on inhibitory (KIR2DL1, KIR2DL2/3, and KIR3DL1) and activating KIR (KIR2DS1, KIR2DS2) for which KIR ligands are well characterized and known to contribute to the functional education of NK cells. Thus, we observed that the frequency of the KIR2D⁺ (KIR2DL1, 2DL2/3, 2DS1, and 2DS2) NK cells was lower in CB in comparison to their adult counterparts (mean, 33.1 vs. 39.5, $P = 0.0004$) (Fig. 1A) in agreement with prior results [19, 23]. Next, we dissected KIR2D CB NK cell subsets, focusing on KIR2DL2/3/2DS2⁺ and KIR2DL1/S1⁺ NK cells and different

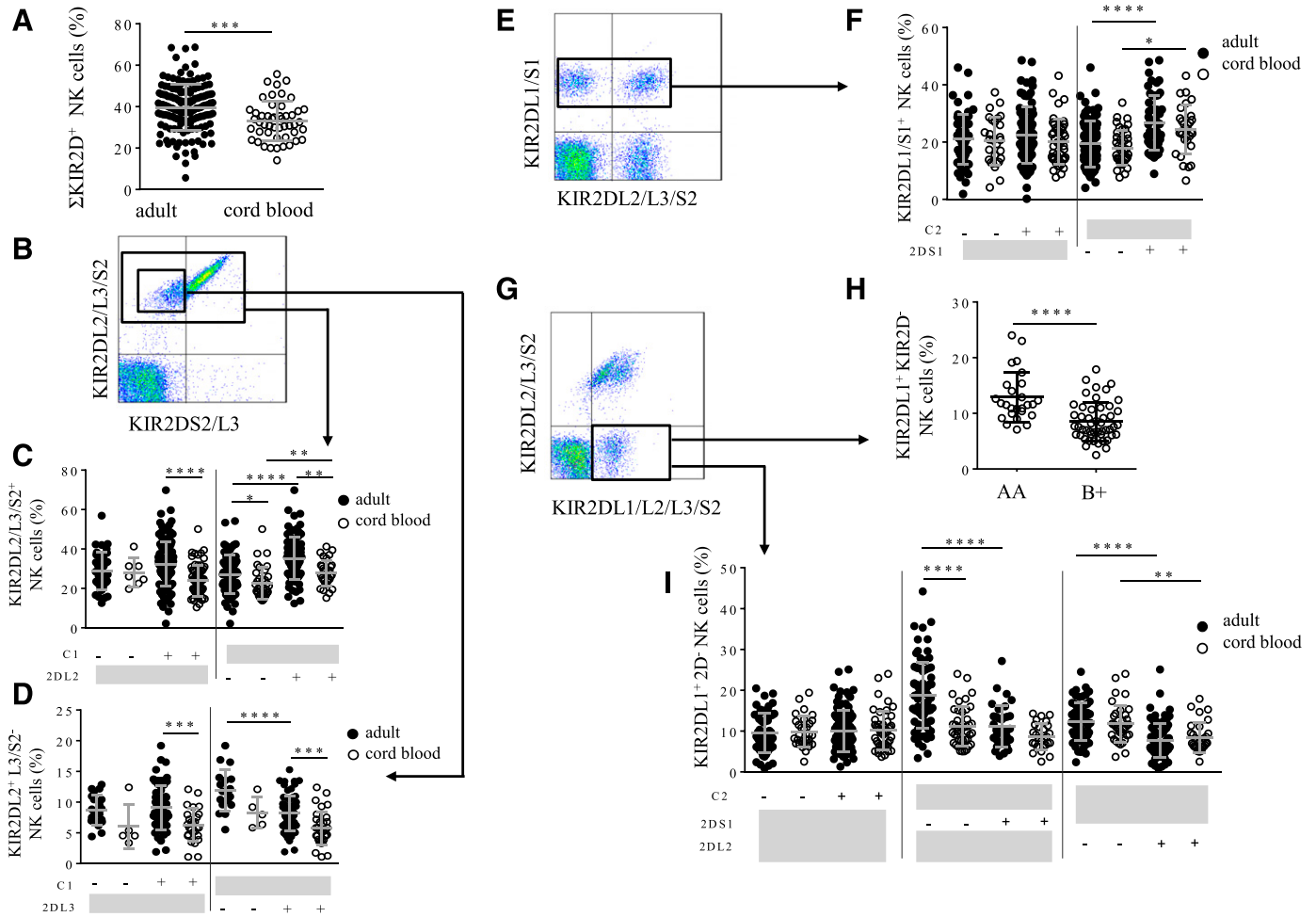


Figure 1. Impact of KIR genotype but not HLA class I autologous environment on CB KIR NK cell repertoire. (A) Overall KIR2D⁺ (KIR2DL1, 2DL2/3, 2DS1, and 2DS2) NK cell frequency in adult ($n = 148$) and CB ($n = 49$) samples. Anti-KIR2DL1/S1 (EB6) and anti-KIR2DL2/L3/S2 (4A8) Abs were used to evaluate KIR2D⁺ frequency as the sum of EB6⁺4A8⁻, EB6⁺4A8⁺, and EB6⁻4A8⁺ populations. (B) KIR2DL2/L3/S2⁺ and KIR2DL2⁺KIR2DL3/S2⁻ NK cell-gating strategy for a representative CB sample. (C) KIR2DL2/L3/S2⁺ (GL183⁺) NK cells frequencies in adult and CB cells according to the absence (-) of HLA-C ligand (C1⁻) (adult, $n = 36$; CB, $n = 7$) and the presence (+) of HLA-C ligand (C1⁺) (adult, $n = 121$; CB, $n = 66$) or the absence (-) of KIR2DL2 gene (adult, $n = 71$; CB, $n = 35$) and the presence (+) of KIR2DL2 gene (adult, $n = 86$; CB, $n = 33$). (D) KIR2DL2⁺KIR2DL3/S2⁻ NK (1F12⁻GL183⁺) cell frequencies in adult and CB cells, according to the absence (-) of HLA-C1 ligand (adult, $n = 20$; CB, $n = 5$) and the presence (+) of HLA-C1 ligand (adult, $n = 61$; CB, $n = 27$) or the absence (-) of KIR2DL3 gene (adult, $n = 18$; CB, $n = 5$) and the presence (+) of KIR2DL3 gene (adult, $n = 62$; CB, $n = 32$). (E) KIR2DL1/S1⁺ NK cell-gating strategy using anti-KIR2DL1/S1 (EB6) and -KIR2DL2/L3/S2 (4A8) Abs for a representative CB sample. (F) KIR2DL1/S1⁺ NK cell frequency compared in adult and CB cells according to the absence (-) of HLA-C2 ligand (adult, $n = 57$; CB, $n = 28$) and the presence (+) of HLA-C2 ligand (adult, $n = 89$; CB, $n = 45$) or the absence (-) of KIR2DS1 gene (adult, $n = 88$, CB, $n = 40$) and the presence (+) of KIR2DS1 gene (adult, $n = 54$, CB, $n = 29$). (G) KIR2DL1⁺KIR2DL2/L3/S2⁻ NK cells-gating strategy with anti-KIR2DL2/L3/S2 (GL183) and -KIR2DL1/L2/L3/S2 (8C11) Abs for a representative CB sample. (H) KIR2DL1⁺KIR2DL2/L3/S2⁻ NK cell frequency in CB samples with AA KIR genotype ($n = 26$) and B⁺ KIR genotype ($n = 49$). (I) KIR2DL1⁺KIR2DL2/L3/S2⁻ NK cell frequency compared in adult and CB cells, according to the absence (-) of HLA-C2 ligand (adult, $n = 55$, CB, $n = 30$) and the presence (+) of HLA-C2 ligand (adult, $n = 93$; CB, $n = 45$), or the absence (-) of KIR2DS1 gene (adult, $n = 35$; CB, $n = 28$) and the presence (+) of KIR2DS1 gene (adult, $n = 79$; CB, $n = 42$) or the absence (-) of KIR2DL2 gene (adult, $n = 81$; CB, $n = 32$) and the presence (+) of KIR2DL2 gene (adult, $n = 66$; CB, $n = 37$). * $P < 0.05$, ** $P < 0.001$, *** $P < 0.0005$, **** $P < 0.0001$, between 2 groups, unpaired t test; between >2 groups, 1-way ANOVA.

single-positive KIR NK cell populations, such as KIR2DL1⁺ and KIR2DL2⁺ NK cells. The frequency of KIR2DL2/L3/S2⁺ CB NK cells (Fig. 1B) was significantly lower in comparison to adult NK cells in HLA-C1⁺ individuals (mean, 24.05 vs. 32.35; $P < 0.0001$) (Fig. 1C), but KIR2DL2/L3/S2⁺ CB NK cell frequency was not influenced by the HLA-C environment. However, the presence of KIR2DL2 gene increased KIR2DL2/L3/S2⁺ NK cell frequencies

in both adult ($P < 0.0001$) and CB ($P = 0.0042$) samples (Fig. 1C). To refine our investigation, we analyzed the KIR2DL2⁺ KIR2DL3/2DS2⁻ NK cells with a combination of specific Abs (Fig. 1B). We observed a significantly lower frequency of single-positive KIR2DL2⁺ NK cells in CB compared with adult cells in C1⁺ individuals (mean, 6.3 vs. 9.1; $P = 0.0004$), and a trend toward a decrease in C1⁻ individuals was probably caused by the small

number of C1[−] CB samples (Fig. 1D). In accordance KIR2DL2 and KIR2DL3 segregation as alleles [24], the presence of the KIR2DL3 gene significantly decreased the frequency of KIR2DL2⁺ NK cells in adults (mean, 11.9 vs. 8.2; $P < 0.0001$).

We next targeted KIR2DL1/S1⁺ NK cells with specific mAbs (Fig. 1E). We observed similar frequencies of KIR2DL1⁺/S1⁺ NK cells in CB and adult samples, in both C2⁺ and C2[−] environments (Fig. 1F). The presence of the KIR2DS1 gene significantly increased the frequency of KIR2DL1/S1⁺ CB NK cells (mean, 17.9 vs. 24.3; $P = 0.0102$) as observed in adults (mean = 19.5 vs. 26.7; $P < 0.0001$) (Fig. 1F). Single-positive KIR2DL1⁺ NK cell frequencies (Fig. 1G) were significantly higher in CB with an AA KIR genotype compared with CB with an AB/BB KIR genotype (called B⁺) (mean, 12.9 vs. 8.5; $P < 0.0001$) (Fig. 1H) and similar in regard to the C2 environment (Fig. 1I). The presence of both KIR2DS1 and KIR2DL2 genes significantly decreased single-positive KIR2DL1⁺ NK cell frequencies in adults (mean, 18.8 vs. 11.2; $P < 0.0001$ and mean, 12.4 vs. 7.7, $P < 0.0001$, respectively). In contrast, only the KIR2DL2 gene significantly decreased single-positive KIR2DL1⁺ NK cell frequencies in CB samples (mean, 11.7 vs. 8.4; $P = 0.0079$) (Fig. 1I). In parallel to the KIR2D NK cell subset, we investigated NK cells expressing the Bw4-specific KIR3DL1 (Supplemental Fig. 1). KIR3DL1 receptors present an extensive allelic polymorphism that directly influences NK cell phenotype and function [25–27]. We highlighted that nearly 50% of KIR3DL1⁺ NK cells express KIR2D receptors in early life (Supplemental Fig. 1). These data suggest a consecutive expression of KIR2D (KIR2DL1/L2/L3, KIR2DS1/S2) on KIR3DL1⁺ CB NK cells, as we have reported for the adult NK cell repertoire [28]. The presence of KIR2DL2 and KIR2DS1 genes limits KIR2DL1 acquisition on NK cells at an early stage of NK cell differentiation, to a greater extent than the HLA-C environment. There is no influence of HLA class I ligand on KIR⁺ CB NK cell frequency. Overall, although there is a lower frequency of KIR⁺ NK cells in CB, the NK repertoire profile is similar to the adult NK repertoire and appears to be constructed early.

Extended phenotype of CB NK cells

To complete the CB phenotypic analysis, we further investigated other NK receptor expression including the CD94/NGK2A and CD94/NGK2C heterodimers NCR and CD57 on CB NK cells. In accordance with previous studies [19, 23], CB NK cells express more NGK2A than adult counterparts, as illustrated in Fig. 2A for representative individuals, and presented for all studied samples in Fig. 2B (mean, 74.9 vs. 54.9; $P < 0.0001$). The CB NK cell phenotype was significantly marked by a preferential representation of NGK2A⁺ KIR[−] NK cell subsets in higher frequencies than in adult counterparts (mean, 54.3 vs. 44.1; $P < 0.0001$) and a lower frequency of NK cells expressing KIR without NGK2A (mean, 9.3 vs. 23; $P < 0.0001$). As shown for adult NK cells ($r = -0.4845$; $P = 0.0057$), there is a negative correlation between NGK2A⁺ and KIR⁺ CB NK cells ($r = -0.5243$; $P = 0.0006$) (Fig. 2C). Similarly, we highlighted a negative correlation between KIR[−]NGK2A[−] NK cells and NGK2A⁺KIR[−] NK cells, in CB cells ($r = -0.5830$; $P = 0.0001$) that was also observed in adults ($r = -0.8252$; $P < 0.0001$), as has been reported [29].

Although NGK2C was commonly associated with CMV infection [16, 30–32], we evaluated NGK2C expression on CB- and

CMV-negative adult NK cells by using a combination of NGK2C- and KIR (KIR2DL1/2/3/2DS1/2)-specific mAbs (Fig. 2D). There was a much higher frequency of overall NGK2C⁺ and NGK2C⁺KIR[−] NK cell subsets in CB compared to adults (mean, 13.7 vs. 6.8; $P < 0.0001$ and mean, 8.7 vs. 4.2; $P < 0.0001$, respectively) and a trend toward a higher, although not significant, frequency of NGK2C⁺KIR⁺ NK cells (Fig. 2E). We did not observe NGK2C expression on CB CD3⁺ T cells (data not shown). In the absence of CMV serology, the homogenous NGK2C expression for all studied CB samples disproves a possible link with a maternofetal CMV infection. Moreover, CB NK cells expressed a weak expression level of NGK2C (Fig. 2F), in contrast to CMV⁺ individuals for whom NGK2C is highly expressed on NK cells [31]. We observed no correlation between NGK2A and NGK2C expression on CB NK cells in contrast to adult CMV⁺ NK cells ($r = 0.5848$; $P = 0.0007$) (Fig. 2F). CB NK cells present a double-positive NGK2A⁺NGK2C⁺ population that is not observed in adults, as illustrated in representative density plots. There was no correlation between NGK2C and KIR expression on CB NK cells (data not shown).

We also evaluated NKp30 expression using anti-NKp30 and anti-KIR (KIR2DL1/2/3/2DS1/2)-specific mAbs (Fig. 2G). CB NK cells presented a higher NKp30 MFI compared with their adult counterparts (mean = 31.2 vs. 19.1; $P = 0.0001$) (Fig. 2H). We confirmed a low expression of NKp44 but a very high expression of CD94, NGK2D, and NKp46 on CB NK cells (data not shown) [19]. As expected, we also confirmed the sharply lower frequency of CD57 expression, a late-stage marker of differentiation on CB compared to adult NK cells (mean, 3.4 vs. 41.8; $P < 0.0001$; Fig. 2I), highlighting their early stage of CB NK cell differentiation according to previous studies [33]. Overall, NGK2A is expressed on a large proportion of CB NK cells, which is inversely correlated to KIR⁺ NK cell frequency, and we highlight the questionable expression of NGK2C on CB NK cells.

CB NK cells are functionally competent but exhibit weaker degranulation compared to their adult counterparts

In accordance with the phenotype of CB NK cells, we investigated their functional potential by comparing CB and PBMC degranulation (CD107a) and IFN- γ responses against the standard HLA class I-negative target cell line, 721.221 (221). CB NK cells degranulated in response to 221 cell stimulation ($P = 0.0004$), but they presented a significantly lower response than did the adult NK cells ($P = 0.0461$) (Fig. 3A). Moreover, the IFN- γ response was comparable between CB and adult NK cells (Fig. 3B). Previous studies of NK cell education by self-HLA class I molecules suggested that the NK cell pool of a given individual would be more educated, in that the number of KIR ligands has been shown to be important [2]. We observed a positive correlation between NK cell degranulation (CD107a⁺ CD3[−] NK cells) and the overall KIR⁺ NK cell frequency in adults ($r = 0.5153$; $P = 0.0084$) but not in CB (Fig. 3C). The functional education of KIR⁺ CB NK cells by self-HLA class I molecules has been previously highlighted [20]. Our analysis on 10 CB samples with an AA KIR genotype confirmed these observations (data not shown). Moreover, we observed a strong inhibition of KIR⁺ NK cell degranulation and IFN- γ production against cognate KIR ligand⁺ target cells (data not shown).

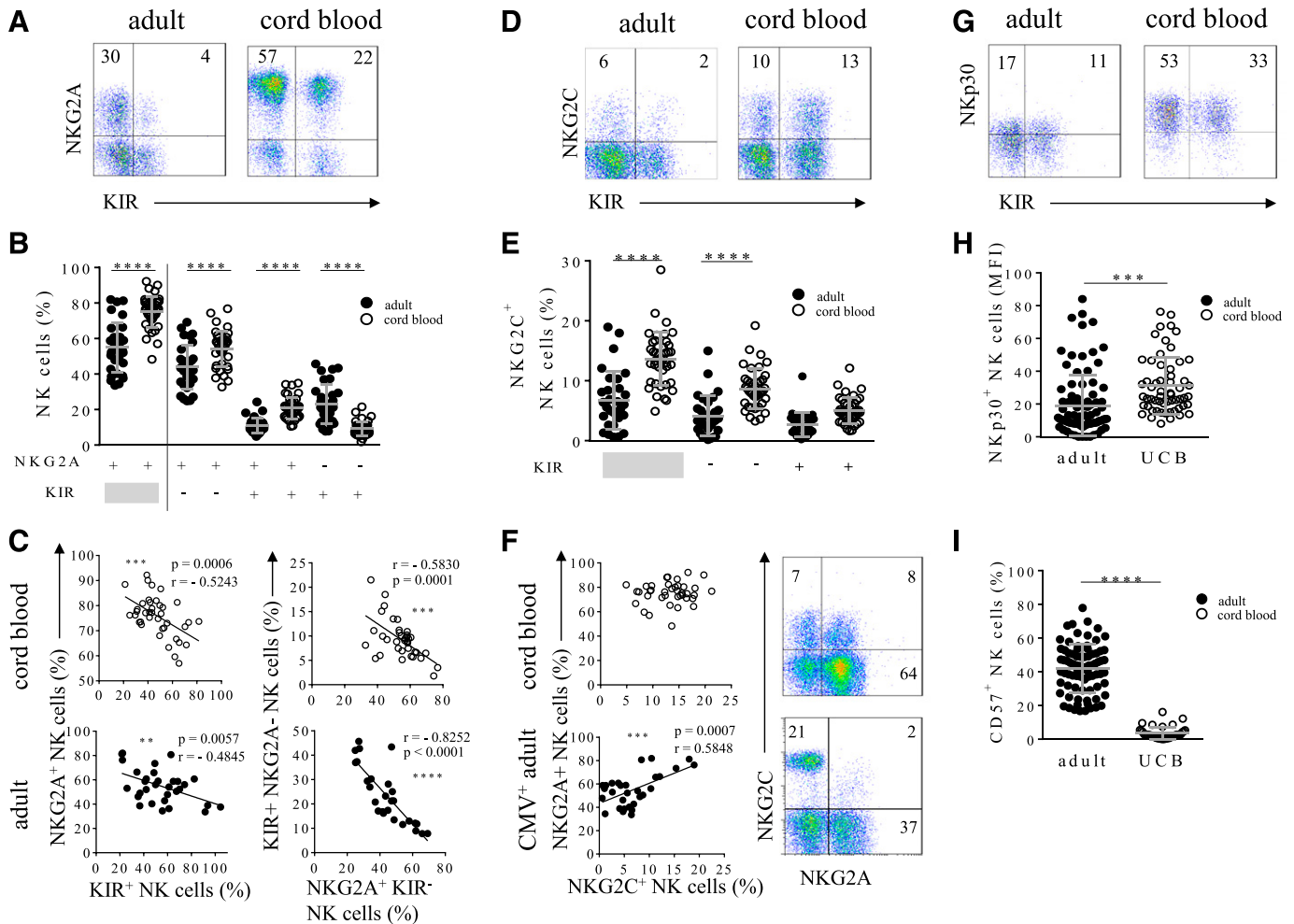


Figure 2. Extended phenotype of CB NK cells. (A) NKG2A⁺ NK cell expression for a representative adult and CB sample with anti-NGK2A and anti-KIR2D (1A6) Abs. (B) NK cells frequency according to the presence (+) or absence (–) of NKG2A and KIR receptors in adult ($n = 31$) and CB ($n = 41$) samples. (C) The correlation between the frequency of NKG2A⁺ NK cells and KIR⁺ NK cells (left) in CB ($n = 39$) and adults ($n = 31$) and between the frequency of KIR⁺NKG2A[–] NK cells and NKG2A⁺KIR[–] NK cells (right) in CB ($n = 38$) and adults ($n = 27$) samples. (D) Density plot illustrating NKG2C⁺ NK cells expression for a representative adult and a representative CB sample, with anti-NGK2C and -KIR2D (1A6) Abs. (E) NKG2C⁺ NK cell frequencies in adult and CB cells according to the absence (–) or presence (+) of KIR receptors in adult ($n = 30$) and CB ($n = 41$) samples. (F) Left: correlation between the frequencies of NKG2A⁺ NK cells and NKG2C⁺ NK cells in CB ($n = 39$) and CMV⁺ adult ($n = 30$) samples. Right: CB NKG2C and NKG2A expression with anti-NGK2A and anti-NGK2C Abs. (G) NKp30⁺ NK cell expression for a representative adult and CB sample with anti-NKp30 and anti-KIR2D (1A6) Abs. (H) NKp30⁺ NK cell MFI in adult ($n = 90$) and CB ($n = 58$) samples. (I) CD57⁺ NK cell frequencies in adult ($n = 79$) and CB ($n = 39$) samples. * $P < 0.05$, ** $P < 0.001$, *** $P < 0.0005$, **** $P < 0.0001$, between 2 groups, unpaired t test; >2 groups, 1-way ANOVA.

It is now well known that functional education of NK cells is mediated, not only by the interactions between HLA class I molecules and inhibitory receptors such as KIR, but also by activating NK cell receptor engagement. In an attempt to investigate the link between the phenotypic profile and function, we compared the expression of the activating NK receptors DNAM-1, 2B4, CD16, and CD161 of a CB sample presenting a weak degranulation (UCB 2gray) or a stronger degranulation (UCB 1) in comparison with their adult counterparts (Fig. 3D). CB NK cells presenting a weak degranulation (UCB 2) expressed lower levels of DNAM-1, 2B4, CD16, and CD161 compared to the CB that presented a stronger degranulation (UCB 1). We also observed a positive correlation between CD161 expression and the degranulation of CB NK cells ($r = 0.6154$; $P = 0.0043$) and a trend

toward a positive correlation between DNAM-1, NB4, and CD16 expression and CB NK cell degranulation; however, this result was not statistically significant because of our limited cohort (data not shown). Overall, our results suggest that the acquisition of activating NK receptors contributes to the increase of the functional potential of CB NK cells at early stages of differentiation.

Full responsiveness of NKG2C⁺ CB NK cells

Given the expression of NKG2C highlighted by the phenotypic analyses, we investigated the functionality of NKG2C⁺ CB NK cells and further evaluated their proliferation and degranulation potential. Thawed CB cells cocultured for 2 wk with 221 cell lines transfected (or not) to express HLA-E, a known ligand of CD94/NKG2C, were assessed for NKG2C⁺ NK cell frequency (Fig. 4A).

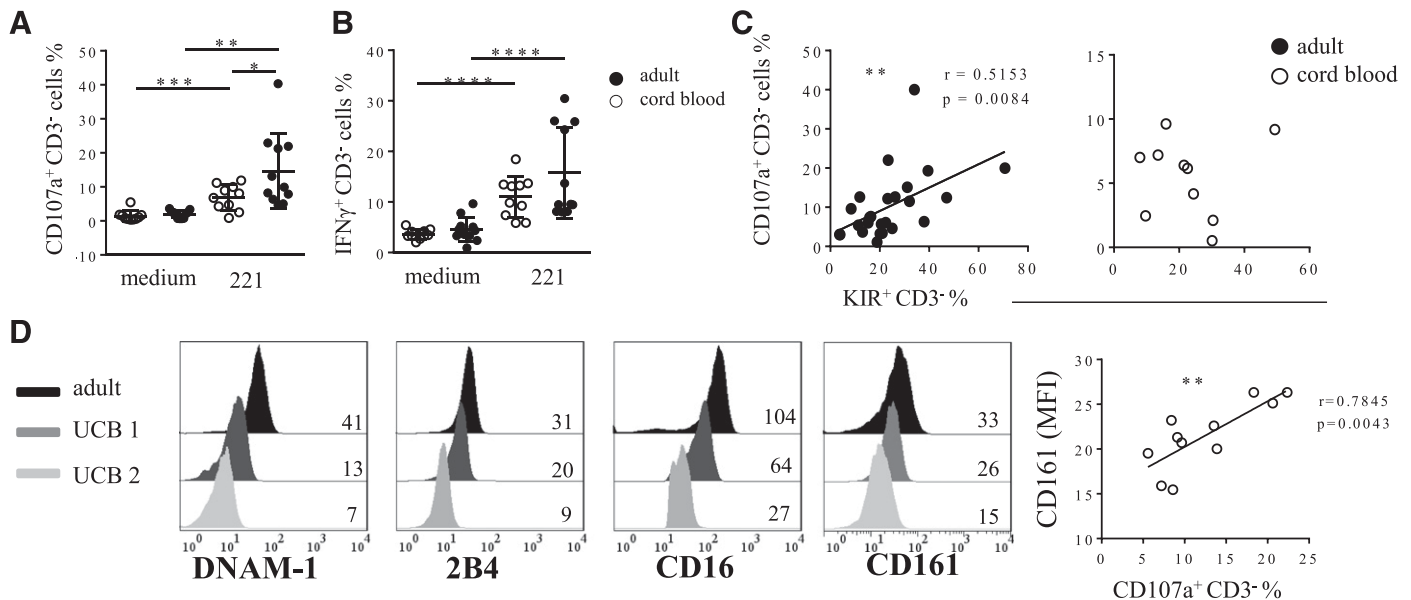


Figure 3. CB NK cells are functionally competent, but exhibit weaker degranulation than their adult counterparts. (A) The degranulation of adult ($n = 11$) and CB ($n = 10$) CD3⁻ cells in medium and 221 conditions. (B) Scatter plots representing the IFN-γ production of adult ($n = 11$) and CB ($n = 10$) CD3⁻ cells in medium and 221 conditions. Mean $\pm$ sd. (C) Dot plots representing the correlation between the frequency of CD107a⁺CD3⁻ cells and KIR⁺CD3⁻ cells in adult ($n = 25$; $r = 0.5153$) and CB ($n = 10$) samples. $P = 0.0084$. (D) Histograms illustrating the expression of DNAM-1, 2B4, CD16, and CD161 receptors for a representative adult (black), 1 CB presenting a strong degranulation (dark gray), and 1 CB presenting a weak degranulation (light gray). Correlation between CB CD161 MFI and CD107a⁺CD3⁻ frequency (right) ($n = 11$; $r = 0.6154$). $P = 0.0043$. * $P < 0.05$, ** $P < 0.001$, *** $P < 0.0005$, **** $P < 0.0001$, between >2 groups, 1-way ANOVA.

In this *in vitro* model of expansion [5], the absolute number of NK cells was strongly increased independent of the nature of the target cells (221 or 221-HLA-E; data not shown). As illustrated in a representative CB sample, NKG2C⁺ NK cells mostly expanded after 14 d of stimulation with a 221-HLA-E-transfected cell line (12% at d 0; 36% at d 14) compared with the nontransfected 221 cell line (12% at d 0; 27% at d 14). The sharp increase in NKG2C⁺ NK cell frequency from d 0 to 14 after 221 stimulation ($P = 0.0093$) and from d 0 to 14 after 221-HLA-E stimulation ($P = 0.002$) and from 221 and 221-E stimulation at d 14 ($P = 0.0074$) was confirmed in 5 independent experiments (Fig. 4B). We then evaluated the *ex vivo* degranulation profile of thawed NKG2C⁺NKG2A⁻ CB NK cells in parallel to NKG2A⁺NKG2C⁻ CB NK cells against 221 and 221-HLA-E targets (Fig. 4C, 4D). At an E:T ratio of 1:1 (Fig. 4C), the degranulation of CB and adult NKG2C⁺NKG2A⁻ NK cells was not enhanced by HLA-E expression on 221 target cells (Fig. 4C). Moreover, we observed a sharply higher degranulation of CB NKG2A⁺NKG2C⁻ against 221 cell targets (mean CB, 31.12, mean adult, 10.31; $P < 0.0001$) compared to their adult counterparts, which was strongly inhibited by 221-HLA-E (mean 221, 31.1; mean 221 HLA-E, 14; $P < 0.0001$).

At an E:T ratio of 50:1 (Fig. 4D), NKG2C⁺NKG2A⁻ NK cells weakly degranulated after 221 target cell stimulation but showed a strong degranulation against 221-HLA-E target cells for both CB and adult NK cells ($P < 0.0001$ and $P = 0.0116$, respectively) (Fig. 4D). For both NK cell populations, even though the response profile was similar; the degranulation of CB NK cells was higher than those observed for adult NK cells. We observed a distinctly weaker degranulation of NKG2A⁺NKG2C⁻ CB NK cells against 221 targets and an absence of inhibition with 221-HLA-E at

that E:T ratio, as observed for their adult counterparts (Fig. 4D). 221-HLA-E inhibited the degranulation of NK cells coexpressing NKG2A and NKG2C, likely to NKG2A⁺ NK cells, showing that NK cell inhibition via NKG2A overrode NK cell activation via NKG2C (Supplemental Fig. 2). Altogether, these results highlight a strong inhibition of NKG2A⁺ CB NK cells and the full responsiveness of NKG2C⁺ CB NK cells in the presence of HLA-E on target cells.

We next studied the phenotype of the CB NKG2C⁺ NK cell subset, focusing on ILT2, DNAM-1, CD161, 2B4, and CD16 expression in comparison to CMV-seropositive adults with NKG2C⁺ NK cell amplification (Fig. 4E). CB NKG2C⁺ NK cells expressed DNAM-1, CD161, 2B4, and CD16 with a lower MFI, as observed in their adult counterparts, as illustrated for a representative experiment. However, we did not observe coexpression of ILT2 with NKG2C on CB NK cells, as observed on their adult NK cell counterparts, shown by the absence of ILT2 expression on CB NK cells, as previously reported on all CB NK cells [19]. CB NKG2C⁺ NK cells coexpressed inhibitory NKG2A receptors in contrast to their adult counterparts (Fig. 2F). Thus, it is possible that the strong inhibition mediated by NKG2A limits the triggering of NK cells by NKG2C. These functional results underline a potential role for NKG2A on CB NK cells to limit the reactivity at early stages of their development.

DISCUSSION

Different groups have investigated the formation of the KIR⁺ NK cell repertoire; however, the impact of cognate HLA class I ligands on the NK cell repertoire is still debated. Some studies have supported either a model with sequential and random acquisition of KIR receptors in the absence of selection and

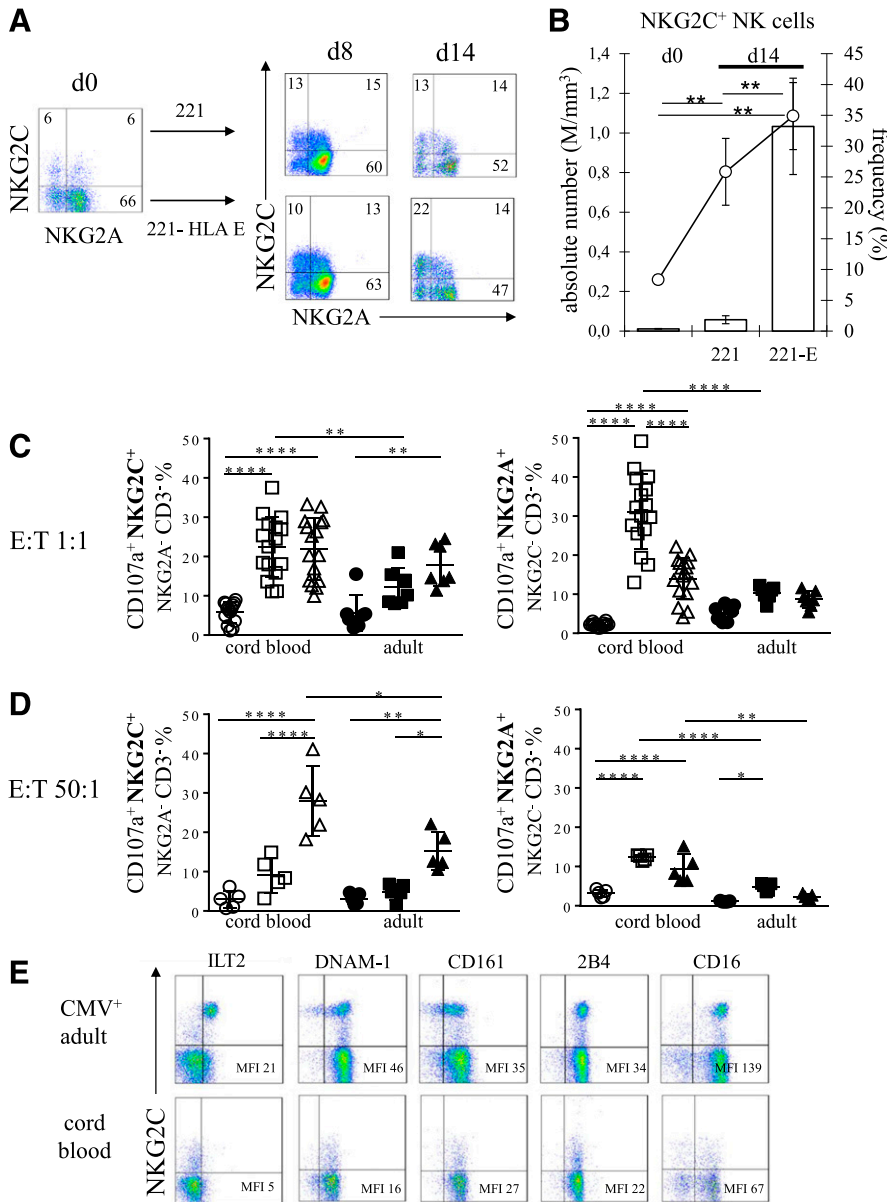


Figure 4. Full responsiveness of NKG2C⁺ CB NK cells. (A) CB CD3⁺NKG2C⁺ and NKG2A⁺ cell expression with specific anti-NKG2C and -NKG2A mAbs at d 0 and after d 8 or 14 of coculture with 221 or transfected 221-HLA-E cell lines for a representative CB sample. (B) Absolute number of CB NKG2C⁺ NK cells (M/mm³) (bars) and frequency (circles) at d 0 and after coculture at E:C 10:1 with 221 or 221-HLA-E cell lines in 5 independent experiments Mean $\pm$ sd. ** P < 0.001, between groups, paired t test. (C) Plots representing CD107a⁺NKG2C⁺NKG2A⁻CD3⁻ cell frequency (left) and CD107a⁺NKG2A⁺NKG2C⁻CD3⁻ cell frequency (right) in CB (n = 16) and adult (n = 7) samples at E:T 1:1 in different culture conditions: medium only (circles), 221 (squares), and 221-HLA-E (triangles). (D) Plots representing CD107a⁺NKG2C⁺NKG2A⁻CD3⁻ cell frequency (left) and CD107a⁺NKG2A⁺NKG2C⁻CD3⁻ cell frequency (right) in CB (n = 5) and adult (n = 5) at E:T 50:1 in the culture conditions in (C). (E) Density plot illustrating adult CMV⁺ and CB NKG2C coexpression with ILT2, DNAM-1, CD161, 2B4, and CD16 receptors, with combinations of specific mAbs. * P < 0.05, ** P < 0.001, *** P < 0.0005, **** P < 0.0001, between >2 groups, 1-way ANOVA.

independently of HLA class I molecules [34] or a model of sequential acquisition of KIR receptors influenced by the HLA class I environment [20, 35]. Although NK cells from adult individuals have been well studied, CB NK cells are less well characterized and their immature status is still debated.

As previously shown from a large cohort of healthy adults [4], we performed a deep investigation of the phenotype and functions of CB NK cells from a large cohort of CB samples to reevaluate CB NK repertoire structural formation and functionality in light of new insights in the NK cell field. We confirmed that KIR⁺ CB NK cell repertoire formation is independent of the autologous HLA class I environment, as previously reported [23]. The dominant effect of the KIR genotype on the percentage of adult KIR⁺ NK cells has been shown on other groups [36, 37]. Interestingly, we showed for the first time that the CB NK cell repertoire is influenced by KIR gene content. In particular,

the KIR2DL1⁺ NK cell frequency was markedly impacted by the presence of both KIR2DL2 and KIR2DS1 genes. We showed the consecutive expression of KIR2D receptors on KIR3DL1⁺ CB NK cells with a lower KIR3DL1⁺ NK cell frequency associated with all known combinations of KIR3DL1/S1 alleles and irrespective of the autologous Bw4 environment. Although a lower frequency of KIR⁺ NK cells was observed in CB compared to their adult counterparts, the CB NK repertoire profile was similar to the adult repertoire and appeared to be structured early. NKG2A was expressed on a wide frequency of CB NK cells and was inversely correlated to KIR⁺ NK cell frequency. The adult NK cell repertoire was shaped toward increased clonal frequencies of KIR for self-HLA class I molecules, associated with a decreased frequency of NKG2A⁺ NK cells. NKG2A is a strong educating inhibitory receptor in adults [29]. Whereas 50% of liver NK cells are NKG2A⁺, up to 90% are NKG2A⁺ in fetal tissues, and these are

educated by NKG2A, but not by KIR [38]. The effect of the HLA class I environment on NK repertoire formation seems to be only observable on educated KIR⁺ NK cells, particularly after viral infection that leads to specific and long-lasting expansion of NK cell clones. Taking this into account, the construction of the CB NK repertoire appears to be completed at this stage. We hypothesize that individual infection history will next shape the NK cell repertoire in an HLA-dependent way, given that educated KIR⁺ NK cells are preferentially expanded. Virus infections differentially affect the NK cell repertoire, as we observed an NKG2C⁺ NK cell expansion [16, 32] or the induction of adaptive NK cell subsets [18] after CMV infection, and CD56^{dim}NKG2A⁺KIR⁺ NK cell expansion after B-EBV infection [17]. On a wider perspective, NK cell repertoire will evolve over the life span in relation to environmental factors such as viruses [32, 39], toxic agents (*e.g.*, smoke [40, 41] or pollution), and aging [19, 42, 43], privileging the expansion of educated NK cell clones.

We showed that CB KIR⁺ NK cell frequency and degranulation do not correlate in contrast to that in adults. This observation may be related to the low expression of activating NK receptors that appear to contribute to increase the functional potential of CB NK cells [44]. We highlighted a low expression of CD16 on CB NK cells that corroborates the poor antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity of CB NK cells previously reported [15].

Recent studies have described an NKG2C⁺ NK cell expansion in CMV seropositive individuals [16, 31, 32, 45] and other viral infections, such as Chikungunya virus [46] and HCV [30], but always with a coinfection with CMV. In contrast, this NKG2C⁺ NK cell expansion was not associated with EBV infection, another herpes virus [47]. However, CMV naïve adult individuals express very low NKG2C levels on NK cells. In this study, we investigated for the first time NKG2C expression on a large cohort of CB samples highlighting its questionable expression on CB NK cells. Surprisingly, we showed that CB NKG2C⁺ NKG2A⁺ NK cells could significantly expand *in vitro* after 14 d of stimulation with HLA-E⁺ 221 cells and present a strong degranulation activity against 221-HLA-E target cells in comparison to 221 target cells at a high E:T ratio. Even though UCB NK cells presented a lower degranulation potential than their adult counterparts, we showed that both NKG2C⁺ and NKG2A⁺ CB NK cell subsets present a higher effector potential than their adult counterparts. It is possible that the subsequent immune history as a CMV infection modulates the phenotype of these NKG2A⁺ and NKG2C⁺ NK cell subsets and their effector potential. Moreover, the coexpression of NKG2A on a main part of CB NKG2C⁺ NK cells may restrict CB NKG2C⁺ NK cell activation. Indeed, HLA-E expression on 221 target cells efficiently inhibited NKG2A⁺ and NKG2A⁺NKG2C⁺ CB NK cell degranulation. In contrast to adult NKG2C⁺ NK cells expanded in CMV⁺ individuals, CB NKG2C⁺ NK cells did not express ILT2. It has been reported that CB NK cells can rapidly become fully mature after dUCBT, with a structured and functional repertoire, thus expressing all receptors observed in their adult counterparts, including DNAM-1 and ILT2 [15]. It has been shown that CB NKG2C⁺ NK cell expansion can also be promoted after CMV reactivation [48]. Thus, there is a clinical potential for CB NKG2C⁺ NK cells to control CMV reactivation. CB NK cells are fully functional, and their NK repertoire has not yet been shaped by their immunologic background. These cells can efficiently

expand *in vitro* [49, 50] and their efficacy against acute myeloid leukemia blasts has been highlighted [15]. Overall, CB NK cells present numerous possibilities for use in immunotherapy.

AUTHORSHIP

P.R. designed and performed the experiments, analyzed data, and wrote the manuscript. C.W., G.D., and R.R. participated in phenotypic and functional NK cell experiments. N.L. contributed to KIR genotyping. J.E. provided CB samples and corresponding clinical data. A.C. performed HLA genotyping. D.S. provided materials for the KIR multiplex. K.G. supervised KIR and HLA genetic analysis and reviewed the manuscript. C.R. developed and supervised the project, designed the research, interpreted data, and wrote the manuscript.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was financially supported by the EFS Pays de la Loire and by grants from International Research Group on Unrelated Hematopoietic Stem Cell Transplantation (IRGHET), Agence de la BioMédecine, LabEx Transplantex, Association Leucémie Espoir Atlantique Famille (LEAF) and Nantes Atlantique Greffe Moelle Osseuse (NAGMO). P.R. is a PhD student supported by EFS/Région des Pays de la Loire/Nantes University, and R.R. is a PhD student supported by Région des Pays de la Loire [Alliance for Research on Infectious Diseases Nantes/Angers (ARMINA) project]. The authors thank all the blood donors for participating in the study and Adrien Chess (Britt House, Swiss) for his help in editing the manuscript.

DISCLOSURES

The authors declare no conflicts of interest.

REFERENCES

1. Kärre, K., Ljunggren, H. G., Piontek, G., Kiessling, R. (1986) Selective rejection of H-2-deficient lymphoma variants suggests alternative immune defence strategy. *Nature* **319**, 675–678.
2. Anfossi, N., André, P., Guia, S., Falk, C. S., Roetynck, S., Stewart, C. A., Bresó, V., Frassati, C., Revirón, D., Middleton, D., Romagné, F., Ugolini, S., Vivier, E. (2006) Human NK cell education by inhibitory receptors for MHC class I. *Immunity* **25**, 331–342.
3. Moesta, A. K., Norman, P. J., Yawata, M., Yawata, N., Gleimer, M., Parham, P. (2008) Synergistic polymorphism at two positions distal to the ligand-binding site makes KIR2DL2 a stronger receptor for HLA-C than KIR2DL3. *J. Immunol.* **180**, 3969–3979.
4. David, G., Djaoud, Z., Willem, C., Legrand, N., Rettman, P., Gagne, K., Cesbron, A., Retière, C. (2013) Large spectrum of HLA-C recognition by killer Ig-like receptor (KIR)2DL2 and KIR2DL3 and restricted C1 SPECIFICITY of KIR2DS2: dominant impact of KIR2DL2/KIR2DS2 on KIR2D NK cell repertoire formation. *J. Immunol.* **191**, 4778–4788.
5. Morvan, M., David, G., Sébille, V., Perrin, A., Gagne, K., Willem, C., Kerdudou, N., Denis, L., Clémenceau, B., Folléa, G., Bignon, J.-D., Retière, C. (2008) Autologous and allogeneic HLA KIR ligand environments and activating KIR control KIR NK-cell functions. *Eur. J. Immunol.* **38**, 3474–3486.
6. Cheuning, J. H., Gudme, C. N., Hsu, K. C., Selvakumar, A., Dupont, B. (2007) KIR2DS1-positive NK cells mediate alloresponse against the C2 HLA-KIR ligand group *in vitro*. *J. Immunol.* **179**, 854–868.
7. Navarro, F., Llano, M., Bellón, T., Colonna, M., Geraghty, D. E., López-Botet, M. (1999) The ILT2(LIR1) and CD94/NKG2A NK cell receptors respectively recognize HLA-G1 and HLA-E molecules co-expressed on target cells. *Eur. J. Immunol.* **29**, 277–283.
8. Brandt, C. S., Baratin, M., Yi, E. C., Kennedy, J., Gao, Z., Fox, B., Haldeman, B., Ostrander, C. D., Kaifu, T., Chabannon, C., Moretta, A., West, R., Xu, W., Vivier, E., Levin, S. D. (2009) The B7 family member B7-H6 is a tumor cell ligand for the activating natural killer cell receptor Nkp30 in humans. *J. Exp. Med.* **206**, 1495–1503.

9. Rosental, B., Brusilovsky, M., Hadad, U., Oz, D., Appel, M. Y., Afergan, F., Yossef, R., Rosenberg, L. A., Aharoni, A., Cerwenka, A., Campbell, K. S., Braiman, A., Porgador, A. (2011) Proliferating cell nuclear antigen is a novel inhibitory ligand for the natural cytotoxicity receptor Nkp44. *J. Immunol.* **187**, 5693–5702.
10. Pende, D., Spaggiari, G. M., Marcenaro, S., Martini, S., Rivera, P., Capobianco, A., Falco, M., Lanino, E., Pierri, I., Zambello, R., Bacigalupo, A., Mingari, M. C., Moretta, A., Moretta, L. (2005) Analysis of the receptor-ligand interactions in the natural killer-mediated lysis of freshly isolated myeloid or lymphoblastic leukemias: evidence for the involvement of the Poliovirus receptor (CD155) and Nectin-2 (CD112). *Blood* **105**, 2066–2073.
11. Ruggeri, L., Capanni, M., Urbani, E., Perruccio, K., Shlomchik, W. D., Tosti, A., Posati, S., Rogaia, D., Frasson, F., Aversa, F., Martelli, M. F., Velardi, A. (2002) Effectiveness of donor natural killer cell alloreactivity in mismatched hematopoietic transplants. *Science* **295**, 2097–2100.
12. EBMT Paediatric Acute Leukemia Working Parties; Eurocord. (2008) Indications and results of cord blood transplant in children with leukemia. *Bone Marrow Transplant.* **41**(Suppl 2), S80–S82.
13. Ballen, K. K., Gluckman, E., Broxmeyer, H. E. (2013) Umbilical cord blood transplantation: the first 25 years and beyond. *Blood* **122**, 491–498.
14. Rettman, P., Legrand, N., Willem, C., Lodé, L., Chevallier, P., Cesbron, A., Senitzer, D., Retière, C., Gagne, K. (2015) Use of killer cell immunoglobulin-like receptor genes as early markers of hematopoietic chimerism after double-umbilical cord blood transplantation. *Haematologica* **100**, e475–e479.
15. Beziat, V., Nguyen, S., Lapusan, S., Hervier, B., Dhedin, N., Bories, D., Uzunov, M., Boudifa, A., Trebeden-Negre, H., Norol, F., Marjanovic, Z., Marie, J.-P., Vernant, J.-P., Debre, P., Rio, B., Vieillard, V. (2009) Fully functional NK cells after unrelated cord blood transplantation. *Leukemia* **23**, 721–728.
16. Gumá, M., Angulo, A., Vilches, C., Gómez-Lozano, N., Malats, N., López-Botet, M. (2004) Imprint of human cytomegalovirus infection on the NK cell receptor repertoire. *Blood* **104**, 3664–3671.
17. Azzi, T., Lünemann, A., Murer, A., Ueda, S., Béziat, V., Malmberg, K.-J., Staubli, G., Gysin, C., Berger, C., Münz, C., Chijioke, O., Nadal, D. (2014) Role for early differentiated natural killer cells in infectious mononucleosis. *Blood* **124**, 2533–2543.
18. Schlums, H., Cichocki, F., Tesi, B., Theorell, J., Beziat, V., Holmes, T. D., Han, H., Chiang, S. C. C., Foley, B., Mattsson, K., Larsson, S., Schaffer, M., Malmberg, K.-J., Ljunggren, H.-G., Miller, J. S., Bryceson, Y. T. (2015) Cytomegalovirus infection drives adaptive epigenetic diversification of NK cells with altered signaling and effector function. *Immunity* **42**, 443–456.
19. Le Garff-Tavernier, M., Béziat, V., Decocq, J., Siguret, V., Gandjbakhch, F., Pautas, E., Debré, P., Merle-Beral, H., Vieillard, V. (2010) Human NK cells display major phenotypic and functional changes over the life span. *Aging Cell* **9**, 527–535.
20. Schönberg, K., Sribar, M., Enczmann, J., Fischer, J. C., Uhrberg, M. (2011) Analyses of HLA-C-specific KIR repertoires in donors with group A and B haplotypes suggest a ligand-instructed model of NK cell receptor acquisition. *Blood* **117**, 98–107.
21. Sun, J. Y., Gaidulis, L., Miller, M. M., Goto, R. M., Rodriguez, R., Forman, S. J., Senitzer, D. (2004) Development of a multiplex PCR-SSP method for Killer-cell immunoglobulin-like receptor genotyping. *Tissue Antigens* **64**, 462–468.
22. David, G., Morvan, M., Gagne, K., Kerdudou, N., Willem, C., Devys, A., Bonneville, M., Folléa, G., Bignon, J.-D., Retière, C. (2009) Discrimination between the main activating and inhibitory killer cell immunoglobulin-like receptor positive natural killer cell subsets using newly characterized monoclonal antibodies. *Immunology* **128**, 172–184.
23. Schönberg, K., Fischer, J. C., Kögler, G., Uhrberg, M. (2011) Neonatal NK-cell repertoires are functionally, but not structurally, biased toward recognition of self HLA class I. *Blood* **117**, 5152–5156.
24. Middleton, D., Meenagh, A., Gourraud, P. A. (2007) KIR haplotype content at the allele level in 77 Northern Irish families. *Immunogenetics* **59**, 145–158.
25. Trundley, A., Frebel, H., Jones, D., Chang, C., Trowsdale, J. (2007) Allelic expression patterns of KIR3DS1 and 3DL1 using the Z27 and DX9 antibodies. *Eur. J. Immunol.* **37**, 780–787.
26. O'Connor, G. M., Guinan, K. J., Cunningham, R. T., Middleton, D., Parham, P., Gardiner, C. M. (2007) Functional polymorphism of the KIR3DL1/S1 receptor on human NK cells. *J. Immunol.* **178**, 235–241.
27. Gardiner, C. M., Guethlein, L. A., Shilling, H. G., Pando, M., Carr, W. H., Rajalingam, R., Vilches, C., Parham, P. (2001) Different NK cell surface phenotypes defined by the DX9 antibody are due to KIR3DL1 gene polymorphism. *J. Immunol.* **166**, 2992–3001.
28. Gagne, K., Willem, C., Legrand, N., Djaoud, Z., David, G., Rettman, P., Bressollette-Bodin, C., Senitzer, D., Esbelin, J., Cesbron-Gautier, A., Schneider, T., Retière, C. (2013) Both the nature of KIR3DL1 alleles and the KIR3DL1/S1 allele combination affect the KIR3DL1 NK-cell repertoire in the French population. *Eur. J. Immunol.* **43**, 1085–1098.
29. Yawata, M., Yawata, N., Draghi, M., Partheniou, F., Little, A.-M., Parham, P. (2008) MHC class I-specific inhibitory receptors and their ligands structure diverse human NK-cell repertoires toward a balance of missing self-response. *Blood* **112**, 2369–2380.
30. Béziat, V., Dalgard, O., Asselah, T., Halfon, P., Bedossa, P., Boudifa, A., Hervier, B., Theodorou, I., Martinot, M., Debré, P., Björkström, N. K., Malmberg, K.-J., Marcellin, P., Vieillard, V. (2012) CMV drives clonal expansion of NKG2C+ NK cells expressing self-specific KIRs in chronic hepatitis patients. *Eur. J. Immunol.* **42**, 447–457.
31. Lopez-Vergès, S., Milush, J. M., Schwartz, B. S., Pando, M. J., Jarjoura, J., York, V. A., Houchins, J. P., Miller, S., Kang, S.-M., Norris, P. J., Nixon, D. F., Lanier, L. L. (2011) Expansion of a unique CD57⁺NKG2Chi natural killer cell subset during acute human cytomegalovirus infection. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **108**, 14725–14732.
32. Béziat, V., Liu, L. L., Malmberg, J.-A., Ivarsson, M. A., Sohlberg, E., Björklund, A. T., Retière, C., Sverremark-Ekström, E., Traherne, J., Ljungman, P., Schaffer, M., Price, D. A., Trowsdale, J., Michaëlsson, J., Ljunggren, H.-G., Malmberg, K.-J. (2013) NK cell responses to cytomegalovirus infection lead to stable imprints in the human KIR repertoire and involve activating KIRs. *Blood* **121**, 2678–2688.
33. Dalle, J.-H., Menezes, J., Wagner, E., Blagdon, M., Champagne, J., Champagne, M. A., Duval, M. (2005) Characterization of cord blood natural killer cells: implications for transplantation and neonatal infections. *Pediatr. Res.* **57**, 649–655.
34. Andersson, S., Fauriat, C., Malmberg, J.-A., Ljunggren, H.-G., Malmberg, K.-J. (2009) KIR acquisition probabilities are independent of self-HLA class I ligands and increase with cellular KIR expression. *Blood* **114**, 95–104.
35. Yu, J., Heller, G., Cheung, J., Kim, S., Yokoyama, W. M., Hsu, K. C. (2007) Hierarchy of the human natural killer cell response is determined by class and quantity of inhibitory receptors for self-HLA-B and HLA-C ligands. *J. Immunol.* **179**, 5977–5989.
36. Li, H., Pascal, V., Martin, M. P., Carrington, M., Anderson, S. K. (2008) Genetic control of variegated KIR gene expression: polymorphisms of the bi-directional KIR3DL1 promoter are associated with distinct frequencies of gene expression. *PLoS Genet.* **4**, e1000254.
37. Dunphy, S. E., Guinan, K. J., Chhorra, C. N., Jayaraman, J., Traherne, J. A., Trowsdale, J., Pende, D., Middleton, D., Gardiner, C. M. (2015) 2DL1, 2DL2 and 2DL3 all contribute to KIR phenotype variability on human NK cells. *Genes Immun.* **16**, 301–310.
38. Sharkey, A. M., Xiong, S., Kennedy, P. R., Gardner, L., Farrell, L. E., Chazara, O., Ivarsson, M. A., Hiby, S. E., Colucci, F., Moffett, A. (2015) Tissue-specific education of decidual NK cells. *J. Immunol.* **195**, 3026–3032.
39. Charoudeh, H. N., Terszowski, G., Czaja, K., Gonzalez, A., Schmitter, K., Stern, M. (2013) Modulation of the natural killer cell KIR repertoire by cytomegalovirus infection. *Eur. J. Immunol.* **43**, 480–487.
40. Lu, L.-M., Zavitz, C. C. J., Chen, B., Kianpour, S., Wan, Y., Stämpfli, M. R. (2007) Cigarette smoke impairs NK cell-dependent tumor immune surveillance. *J. Immunol.* **178**, 936–943.
41. Mian, M. F., Lauzon, N. M., Stämpfli, M. R., Mossman, K. L., Ashkar, A. A. (2008) Impairment of human NK cell cytotoxic activity and cytokine release by cigarette smoke. *J. Leukoc. Biol.* **83**, 774–784.
42. Lutz, C. T., Moore, M. B., Bradley, S., Shelton, B. J., Lutgendorf, S. K. (2005) Reciprocal age related change in natural killer cell receptors for MHC class I. *Mech. Ageing Dev.* **126**, 722–731.
43. Solana, R., Campos, C., Pera, A., Tarazona, R. (2014) Shaping of NK cell subsets by aging. *Curr. Opin. Immunol.* **29**, 56–61.
44. Enqvist, M., Ask, E. H., Forslund, E., Carlsten, M., Abrahamson, G., Béziat, V., Andersson, S., Schaffer, M., Spurkland, A., Bryceson, Y., Önfelt, B., Malmberg, K.-J. (2015) Coordinated expression of DNAM-1 and LFA-1 in educated NK cells. *J. Immunol.* **194**, 4518–4527.
45. Malmberg, K.-J., Béziat, V., Ljunggren, H.-G. (2012) Spotlight on NKG2C and the human NK-cell response to CMV infection. *Eur. J. Immunol.* **42**, 3141–3145.
46. Petitdémange, C., Becquart, P., Wauquier, N., Béziat, V., Debré, P., Leroy, E. M., Vieillard, V. (2011) Unconventional repertoire profile is imprinted during acute chikungunya infection for natural killer cells polarization toward cytotoxicity. *PLoS Pathog.* **7**, e1002268.
47. Hendricks, D. W., Balfour, H. H., Jr., Dunmire, S. K., Schmeling, D. O., Hogquist, K. A., Lanier, L. L. (2014) Cutting edge: NKG2C(hi)CD57+ NK cells respond specifically to acute infection with cytomegalovirus and not Epstein-Barr virus. *J. Immunol.* **192**, 4492–4496.
48. Della Chiesa, M., Falco, M., Bertina, A., Muccio, L., Alicata, C., Frasson, F., Locatelli, F., Moretta, L., Moretta, A. (2014) Human cytomegalovirus infection promotes rapid maturation of NK cells expressing activating killer Ig-like receptor in patients transplanted with NKG2C⁺ / – umbilical cord blood. *J. Immunol.* **192**, 1471–1479.
49. Spanholtz, J., Tordoir, M., Eissens, D., Preijers, F., van der Meer, A., Joosten, I., Schaap, N., de Witte, T. M., Dolstra, H. (2010) High log-scale expansion of functional human natural killer cells from umbilical cord blood CD34⁺ positive cells for adoptive cancer immunotherapy. *PLoS One* **5**, e9221.
50. Tanaka, J., Sugita, J., Shiratori, S., Shigematsu, A., Imamura, M. (2012) Dasatinib enhances the expansion of CD56⁺CD3⁺ NK cells from cord blood. *Blood* **119**, 6175–6176.

KEY WORDS:
NK cells · KIR · NKG2C · differentiation

Thèse de Doctorat

Raphaëlle RIOU

Contribution à l'étude du rôle des cellules Natural Killer dans le contrôle de l'infection à cytomégalovirus

Contribution to the study of Natural Killer cell involvement during the course of cytomegalovirus infection

Résumé

Les cellules NK, membres de l'immunité innée, sont impliquées dans le contrôle des infections virales et notamment l'infection à cytomégalovirus (CMV). Généralement bien tolérée chez l'individu immunocompétent, l'infection à CMV demeure associée à une forte morbidité chez les individus dont le système immunitaire est compromis (patients transplantés, coinfectés par le VIH) ou immature (fœtus et nouveau nés). Lors de l'infection par le CMV, une relation étroite s'établit entre le système immunitaire et le virus. Celle-ci génère en effet une forte mobilisation, associée à un profond remodelage, de différents compartiments immuns. Au cours de ce travail de thèse, nous nous sommes intéressées à l'équilibre qui s'instaure entre le virus et le système immunitaire. Dans une première approche menée *in vitro*, nous avons exploré le rôle de différentes sous-populations NK dont les cellules NK NKG2C⁺, caractéristiques de l'infection à CMV, en réponse à des cellules endothéliales, isolées à partir de donneurs de rein, infectées par le CMV. Ensuite, une cohorte rare d'adultes immunocompétents souffrant d'une primo-infection symptomatique à CMV nous a permis d'étudier la course naturelle de l'infection à CMV. Cette approche *ex vivo* a constitué d'une part en l'analyse du polymorphisme de la réponse de l'hôte au virus, par l'étude phénotypique et transcriptomique non seulement de la réponse NK mais aussi d'autres effecteurs lymphocytaires. D'autre part, nous avons exploré l'impact du polymorphisme génétique viral, par le séquençage par NGS d'isolats cliniques du CMV, sur le pouvoir pathogène du virus. L'ensemble de ces travaux devrait contribuer à la meilleure compréhension du rôle des cellules NK dans le contrôle de l'infection à CMV.

Mots clés

Cytomégalovirus, système immunitaire, cellules NK, NGS

Abstract

NK cells are innate lymphocyte effectors involved in the control of viral infections and particularly cytomegalovirus (CMV) infection. Usually well tolerated in immunocompetent individuals, CMV infection remains life threatening in immunosuppressed patients, as transplant recipients or HIV-infected patients, or for fetuses in case of congenital infection. Upon primary infection, CMV establishes a close relationship with the immune system. CMV infection is known to drive an important immune response and to deeply imprint several immune compartments. In this present work, we focused on the host-virus balance that takes place upon infection. Through a first *in vitro* approach, we investigated the role of different NK cell subpopulations, including NKG2C⁺ NK cells which represent one of the hallmarks of CMV infection, in response to CMV-infected endothelial cells isolated from kidney donors. Then, an *ex vivo* approach was conducted in a cohort of immunocompetent adults diagnosed with symptomatic primary CMV infection. On one hand, our aim was to explore the host immune response polymorphism, through phenotypic and transcriptomic analyses of lymphocyte responses. On the other hand, we investigated the viral genome polymorphism, through NGS sequencing of clinical CMV isolates, which could modulate the viral pathogenicity. Taken together, these findings should contribute to the better understanding of the role of NK cells during the course of CMV infection.

Key Words

Cytomegalovirus, immune system, NK cells, NGS