

THESE DE DOCTORAT DE

NANTES UNIVERSITE

ECOLE DOCTORALE N° 605

Biologie Santé

Spécialité : « BS- Immunologie »

Par

« Amélie ROUSSELIERE »

« Caractérisation des populations lymphocytaires T CD8 spécifiques du cytomégalo virus et restreintes par HLA-E chez des patients receveurs d'une transplantation rénale ou pulmonaire »

Thèse présentée et soutenue à « Nantes », le « 21/12/2022 »

Unité de recherche :

Centre de Recherche Translationnelle en Transplantation et en Immunologie (CR2TI) – UMR 1064

INSERM, Université de Nantes

Rapporteurs avant soutenance :

Jean-François MORNEX Professeur des Universités, Praticien Hospitalier, Hôpital Louis Pradel, Université de Lyon 1
Nuala MOONEY Directrice de recherche, INSERM, CNRS U1160, Université de Paris

Composition du Jury :

Présidente : Nuala MOONEY Directrice de recherche, INSERM, CNRS U1160, Université de Paris
Examineurs: Christelle RETIERE Directrice de recherche, CRCI2NA, INSERM, CNRS, EFS, Université de Nantes
Jean-François MORNEX Professeur des Universités, Praticien Hospitalier, Hôpital Louis Pradel,
Université de Lyon 1
Directrice de thèse : Béatrice CHARREAU Chargée de recherche, CR2TI UMR 1064, INSERM à Nantes

Invitée

Céline BRESSOLLETTE Maître de conférence des Universités, Praticien Hospitalier, CR2TI UMR 1064, INSERM,
CHU de Nantes, Université de Nantes

Sommaire

Sommaire	1
Remerciements	4
Listes des abréviations	7
Table des illustrations	11
Liste des tableaux	13
Introduction	14
Chapitre 1 : Le cytomégalovirus humain (HCMV)	14
I. Le cytomégalovirus humain (HCMV) : Définitions et structure	14
1.1. Structure du HCMV	15
1.1.1. Génome	16
1.1.2. Capside	16
1.1.3. Tégument	17
1.1.4. Enveloppe	18
1.2. Tropisme cellulaire du HCMV	20
1.3. Le cycle réplicatif	21
1.4. Latence et réactivation	23
II. Épidémiologie et physiopathologie du HCMV	24
2.1. Épidémiologie	25
2.2. Physiopathologie de l'infection à HCMV	26
2.2.1. Grossesse et infection congénitale	27
2.2.2. Les patients atteints du VIH/SIDA	29
Chapitre 2 : L'infection à HCMV : un facteur de risque en transplantation	30
I. Physiopathologie de l'infection à HCMV chez les patients transplantés	30
1.1. Incidence	30
1.2. Facteurs de risque	31
1.3. Manifestations cliniques	33
1.3.1. Les effets directs	33
1.3.2. Les effets indirects	34
II. Infection à HCMV et transplantation pulmonaire	35
2.1. Risque d'infection et de maladie à HCMV chez les receveurs de greffe pulmonaire	36
2.2. HCMV et dysfonction du greffon pulmonaire	36
III. Méthodes de mise en évidence et de suivi de l'infection	38
3.1. La sérologie	38
3.2. Les tests moléculaires	39
3.3. L'antigénémie	39
3.4. L'histopathologie	40
3.5. La culture virale	40
3.6. Les tests de surveillance de l'immunité cellulaire	41
IV. Prévention et traitement du HCMV	44
4.1. Stratégies préventives : la prophylaxie antivirale universelle et le traitement préemptif	44

4.2.	Traitement du HCMV	46
4.3.	La résistance au HCMV	47
Chapitre 3 : Immunité et infection à HCMV		50
I.	Réponses humores et cellulaires contre le HCMV.....	51
1.1.	La réponse humorale anti-HCMV	51
1.2.	Les réponses effectrices anti-HCMV	52
1.2.1.	Les NK anti-HCMV	52
1.2.2.	Les T non conventionnels $\gamma\delta$	54
1.2.3.	Les LT CD4+ et LT CD8+ anti-HCMV.....	56
II.	Les mécanismes d'évasion immunitaire du HCMV	59
2.1.	La modulation de la présentation antigénique par le CMH-I.....	62
2.2.	L'échappement à la reconnaissance du « Soi manquant »	63
2.3.	La régulation négative des ligands activateurs.....	64
2.4.	Le ciblage des récepteurs Fc.....	65
Chapitre 4 : Spécificités des réponses T CD8 restreintes par HLA-E anti-HCMV		69
I.	HLA-E	69
1.1.	L'évolution, l'expression et le polymorphisme de HLA-E.....	69
1.2.	Le peptidome de HLA-E	71
1.3.	HLA-E : Le ligand de 2 types de récepteurs fonctionnellement différents	73
1.3.1.	HLA-E et les récepteurs CD94/NKG2	73
1.3.2.	HLA-E et le TCR des LT	75
II.	Les LT CD8 restreints par HLA-E anti-HCMV.....	76
Objectifs.....		80
Résultats.....		82
Partie 1 : Mise au point d'un protocole d'immunomarquage pour l'étude par cytométrie en flux spectrale des réponses immunes induites en réponse à une infection à HCMV ..82		
	Résumé	82
	Article 1	83
Partie 2 : Caractérisation phénotypique des réponses T CD8 anti-HCMV spécifiques des peptides UL40 et restreintes par les molécules HLA-E : Marqueurs distinctifs et communs aux populations T CD8 restreintes par HLA-A2, NK exprimant NKG2C et CD57 et T TCR$\gamma\delta$ 82-.....102		
	Résumé	102
	Article 2.....	104
Partie 3 : Étude des réponses lymphocytaires T CD8 dirigées contre les peptides UL40 présentés par HLA-E chez les receveurs d'une transplantation pulmonaire au cours du rejet chronique (CLAD)		
I. Introduction.....		130
II. Résumé.....		133
III. Résultats.....		135
3.1.	Les LTR développant un CLAD présentent des réponses T CD8 HLA-E/UL40 anti-HCMV moins fréquentes.....	135
3.2.	Le CLAD est associé à une altération du phénotype des LT CD8 HLA-E/UL40.....	140

3.3. Distribution des populations lymphocytaires au cours de l'infection par le HCMV et altérations associées au CLAD	147
Discussion	155
I. Apports et limites de la cytométrie en flux spectrale à notre étude	155
II. Identification des LT CD8 HLA-E/UL40 comme des TEMRA CD56+ PD1-	156
III. Les LT CD8 HLA-E/UL40 : des cellules T mémoires à la frontière entre l'immunité innée et adaptative ?	160
IV. Réponse lymphocytaire T CD8 HLA-E/UL40 et survenue du CLAD en transplantation pulmonaire.	161
Conclusion	165
Bibliographie	166

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier mes rapporteurs, le Professeur Jean-François Mornex et le Docteur Nuala Mooney, d'avoir pris le temps d'être mes rapporteurs pour évaluer mes 3 années de doctorat. Également, je remercie le Docteur Christelle Retière d'avoir examiné mon travail et le Docteur Céline Bressollette d'avoir accepté de faire partie de ce jury en tant qu'invitée.

Je remercie les membres de comité de suivi individuel, le Docteur Katia Gagne et le Docteur Pierre Tonnerre qui m'ont non seulement guidé lors de nos rencontres mais également encouragé dans la poursuite de ces différentes études.

Béatrice, merci pour ces 5 années à vos côtés, cela me paraît encore très récent l'entretien pour le stage de M1 qui s'est poursuivi en stage de M2 et en thèse. Merci pour toutes ces réunions qui duraient toujours plus longtemps que ce qui était prévu. On en a vu le bout de tous ces travaux qui se sont quand même soldés par 2 articles et un 3^e en cours de rédaction !

Nathalie, je te remercie pour tous tes conseils sur l'extraction d'ARN et nos petites discussions. J'ai passé de très bons moments avec toi d'un point de vue professionnel et personnel. Merci encore de ta motivation et d'avoir accepté que je te fasse découvrir le monde passionnant des Ficoll et le temps que cela prend.

Hermelyne, je tiens aussi à te remercier pour le soutien que tu m'as apporté pendant ton séjour avec nous et ton aide pour les Ficoll qui t'ont aussi passionné j'en suis sûre ;).

Maïlys, je sais qu'on a connu un début de stage assez compliqué mais qui s'est avéré être une bonne expérience au final. On en a vu le bout de tous ces échantillons et c'est grâce à toi. J'espère que ton changement de carrière te conviendra tu le mérites !

Laurence, je te remercie pour tout. Franchement sans toi je ne sais pas comment j'aurais survécu à tous les problèmes de machines ou autres que j'ai pu rencontrer. Cinq ans

qu'on interagit et j'ai encore l'impression d'avoir beaucoup de choses à apprendre dont ta patience inébranlable avec les cytomètres.

Aurore, Eugénie et Adrien, merci d'avoir pris le temps de répondre à toutes mes questions sur la gestion de cohorte, j'ai beaucoup appris auprès de vous dont une passion pour les licornes que je ne connaissais pas et qui me poursuit encore ;)

Je voudrais remercier l'ensemble des plateformes et biocollections sans qui ces travaux n'auraient pas eu lieu, la plateforme P²R pour les monomères HLA, l'EFS au cours de ces 5 années à récolter des prélèvements, les biocollections DIVAT et CRB (COLT) pour les échantillons de PBMC. Je remercie les patients et volontaires sains ainsi que les financements qui ont permis à ce projet de voir le jour.

Je tiens à remercier l'ensemble des membres de l'équipe 4 du CR2TI mais aussi les autres membres du laboratoire, sans votre bonne humeur cela n'aurait pas été la même chose et je vous en remercie.

Merci à tous mes collègues de l'open space: Amandine, Sümeyye, Simon, Raphaëlle, François, Erwan et Mathieu. Cette thèse n'aurait pas été la même sans vous autant d'un point de vue scientifique que personnel (pause sur la terrasse à parler de la pluie et du beau temps, et quelques verres au bar sans jamais d'abus...). Je n'oublierai jamais votre soutien au cours de ces 1 à 2 années à vos côtés. Je vous laisse un petit souvenir avec F'Ships, prenez-en soin !

Je remercie l'ensemble de mes ami(e)s ne faisant pas partie du laboratoire pour m'avoir écouté bien des fois et encouragé d'encore plus nombreuses fois. Vous avez grandement contribué à l'aboutissement de ma thèse, peut-être pas sur un plan scientifique mais d'une autre forme qui a tout autant d'importance.

Maintenant au tour de ma famille, maman et papa, merci d'avoir toujours été là pour moi. Je sais que ce n'était pas toujours simple de comprendre ce que je faisais en thèse mais malgré tout vous m'avez toujours encouragé. Papa, merci d'avoir pu venir à ma thèse et d'avoir essayé de tout comprendre jusqu'à la fin. Maman, merci d'avoir attendu les résultats

de la délibération à ton travail comme si j'avais gagné la coupe du monde. Flo et Steph, je vous remercie de vos encouragements au cours de ces presque 3 années auprès de vous.

Pour finir, Guillaume, je ne me rends toujours pas compte de comment tu as fait pour me supporter au cours de ma thèse depuis notre rencontre au laboratoire. Tu le sais déjà mais je ne te remercierais jamais assez de m'avoir remonté le moral aussi souvent, de m'avoir apporté ton soutien et tes conseils non seulement pendant la rédaction mais aussi bien avant ça ! Et merci de m'avoir écouté encore et encore raconter tous mes problèmes !

En espérant n'avoir oublié de remercier personne,

Merci à tous !

Listes des abréviations

$\alpha\beta$	Alpha beta
$\gamma\delta$	Gamma delta
Ac	Anticorps
AC viral	viral Assembly Complex, Assemblage viral cytoplasmique
ADCC	Antibody-dependent cell cytotoxicity, Cytotoxicité à médiation cellulaire dépendante des Ac
ADN	Acide Désoxyribonucléique
Ag	Antigène
ALG	Anti-lymphocyte globulin, Sérum anti-lymphocytes
APC	Allophycocyanin
Arg	Arginine
ARN	Acide Ribonucléique
ATG	Anti-thymocytes globulin/ Sérum anti-thymocytes
ATP	Adénosine-triphosphate
BB	Brilliant Blue
BPCO	Broncho-pneumopathie chronique obstructive
BCV	Brincidofovir
BLK	B-cell lymphocyte kinase
BOS	Bronchiolitis Obliterans Syndrome, Syndrome de Bronchiolite Oblitérante
BUV	Brilliant Ultraviolet
BV	Brilliant Violet
CCR7	C-C chemokine receptor type 7
CD	Cluster de différenciation
CDV	Cidofovir
CIK	Induced-Cytokine Killer Cells, Cellules tueuses induites par les cytokines
CLAD	Chronic Lung Allograft Dysfunction, Dysfonction chronique du greffon pulmonaire
CMH	Complexe majeur d'histocompatibilité
COLT	Cohort in Lung Transplantation
CPA	Cellule présentatrice d'Ag
CPD	Cell proliferation dye
CRB	Centre de Ressources Biologiques
CSH	Cellule souche hématopoïétique
CTL	Cytotoxic T-lymphocyte
CX3CR1	C-X3-C motif chemokine receptor 1
D/R	Donneur/Receveur
DC	Dendritic cell, Cellule dendritique
DE	Delayed-Early
DIVAT	Données Informatisées VALidées en Transplantation
DSA	Donor specific antibody
EBV	Epstein-Barr virus, Virus d'Epstein-Barr

ELISA	Enzyme-linked-immuno-sorbent-assay
ELISpot	Enzyme-linked immunospot
EPCR	Endothelial protein C receptor, Récepteur endothélial de la protéine C
FEV1	Forced expiratory volume in the first second, Volume expiratoire forcé durant la première seconde
FITC	Fluorescein isothiocyanate
FMO	Fluorescence minus one
FOS	Foscarnet
FSC	Forward Scatter
FVS	Fixable Viability Stain
gC	Glycocomplexe
GCV	Ganciclovir
gH, gL...	Glycoprotéine H, glycoprotéine L, ...
Glu	Glutamine
Gly	Glycine
GzmB	Granzyme B
HAART	Highly active antiretroviral therapy, Thérapie anti-rétrovirale hautement active
HCMV	Human cytomegalovirus, Cytomégalovirus humain
HCMV+/ HCMV-	Séropositif/séronégatif
HHV	Human herpesvirus, Herpès virus humain
HLA	Human leukocyte antigen, Antigène des leucocytes humains
hpi	Heure post-infection
HSV	Herpes simplex virus, Virus de l'herpès simplex
HTAP	Hypertension artérielle pulmonaire
HV	Volontaires sains, donneurs sains, Healthy volunteers
ICS	Intracellular cytokines staining/ Marquage intracellulaire des cytokines
iDC	Immature dendritic cell, Cellule dendritique immature
IE	Immediate-Early
IFN γ	Interféron γ
IgM	Immunoglobuline M
IL	Interleukine
IQR	Interquartile range, Ecart Interquartile
ITAM	Immunoreceptor tyrosine-based activation motifs, Motifs d'activation des récepteurs immunologiques contenant des tyrosines
ITIM	Immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motifs, Motifs d'inhibition des récepteurs immunologiques contenant des tyrosines
KIR	Killer-cell immunoglobulin-like receptor, Récepteur de type Ig des cellules tueuses
KLRG1	Killer cell lectin like receptor G1
KSHV	Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus, Virus de l'herpès simplex associé au sarcome de Kaposi
KTR	Kidney transplant patients, Patients transplantés rénaux

L	Late
LBA	Lavage broncho-alvéolaire
LCR	Liquide céphalo-rachidien
LIR1	Leukocyte Immunoglobuline-like receptor
LT	Lymphocyte T
LTR	Lung transplant patients, Patients transplantés pulmonaires
mAb	monoclonal Antibody
mC-BP	minor capsid protein-binding protein
MCMV	Murine cytomegalovirus, Cytomégalovirus murin
MCP	Major capsid protein
mCP	minor capsid protein
mDC	mature Dendritic Cell, Cellule dendritique mature
MHC	Major histocompatibility complex
MICA	MHC class I chain-related gene A, Chaîne A liée au CMH de classe I
MIIEP	Major IE promoter, Région promotrice précoce immédiate
MMF	Mycophénolate Mofétile
MMP-9	Matrix Metalloproteinase 9
NK	Natural Killer, cellule tueuse naturelle
nm	nanomètre
Nrp2	Neuropiline 2
OLS	Organes lymphoïdes secondaires
OMS	Organisation mondiale de la santé
ORF	Open reading frame, cadre de lecture ouvert
PAMP	Pathogen associated molecular pattern, Motif moléculaire associé aux pathogènes
PBL	Peripheral Blood Lymphocytes
PBMC	Cellules mononucléaires du sang périphérique
PC	Pentameric complex/ Complexe pentamérique
PCR	Polymerase chain reaction
PD-1	Programmed cell death protein 1
PDGFR- α	Platelet-derived growth factor receptor alpha
PE	Phycoerythrin
Phe	Phénylalanine
PLC	Peptide Loading Complex/ Complexe de chargement des peptides
POU2AF1	POU class 2 Associating Factor 1
pp65	Phosphoprotéine 65
QNAT	Test d'amplification des acides nucléiques quantitatif
RAS	Restrictive allograft syndrome/ Syndrome restrictif de l'allogreffe
RCMV	Rat cytomegalovirus/ Cytomégalovirus du rat
RE	Réticulum endoplasmique
RT	Room temperature
S	Short
SCP	Smallest capsid protein

SI	Système immunitaire
SIDA	Syndrome d'immunodéficience acquise
SIV	Simian immunodeficiency virus, Virus de l'immunodéficience du singe
SOT	Solid organ transplantation/ Transplantation d'organe solide
SPases	Enzymes signal peptidases
SPPases	Peptides SPases
SSC	Side Scatter
t-sne	T-distributed stochastic neighbor embedding
TAP1 et 2	Transporteur associé au processing de l'Ag 1 et 2
TC	Trimeric complex/ Complexe trimérique
TCL1A	T-cell leukemia/lymphoma protein 1A
TCM	Lymphocytes T centraux mémoires
TCR	T-cell receptor, Récepteur des cellules T
TEM	Lymphocytes T effecteurs mémoires
TEMRA	Lymphocytes T effecteurs mémoires réexprimant le CD45RA
tet+/tet-	tetramer+/tetramer-, tétramère+/tétramère-
Th1	T helper de type 1
Thr	Thréonine
TLR	Toll-like receptor
TNF α	Tumor necrosis factor α / Facteur de nécrose tumorale α
TRAIL	Tumor-necrosis-factor related apoptosis inducing ligand/ Ligand induisant l'apoptose lié au facteur de nécrose tumorale
TRL, IRL, TRS, IRS	Internal ou Terminal repeat short/long
UI/mL	Unité internationale/millilitre
UL	Unique Long
ULBP	UL16-Binding Protein
US	Unique Short
VGCV	Valganciclovir
VHB	Virus de l'hépatite B
VHC	Virus de l'hépatite C
VIH	Virus de l'immunodéficience humaine
VZV	Virus de la Varicelle/Zona

Table des illustrations

<i>Figure 1 : Structure du virion HCMV (Adaptée de Tomtishen III, 2012).</i>	16
<i>Figure 2 : Annotation du génome de la souche HCMV de faibles passages, Merlin (GenBank accession NC_006273) (D'après Sijmons et al., 2014).</i>	19
<i>Figure 3 : Schéma illustrant les modes d'entrée du HCMV dans la cellule soit par le TC soit par le PC (Adaptée de Gerna et al., 2019).</i>	21
<i>Figure 4 : Schéma illustrant le cycle réplicatif du HCMV (Adaptée de Tyl et al., 2022).</i>	22
<i>Figure 5 : Schéma de la régulation de la MIEP durant la latence et la réactivation (D'après Forte et al., 2020).</i>	24
<i>Figure 6 : Estimation en % de la séroprévalence moyenne du HCMV dans les différentes régions de l'OMS et dans le monde par groupe de population. (Adaptée de Zuhair et al., 2019).</i>	25
<i>Figure 7 : Transmission de la mère à l'enfant de l'infection à HCMV.</i>	28
<i>Figure 8 : Prévalence des Ac IgG anti-HCMV pour la SOT et la transplantation de CSH (D'après Griffiths & Reeves, 2021).</i>	32
<i>Figure 9 : Conséquences cliniques de l'infection à HCMV dans le contexte d'une SOT.</i>	35
<i>Figure 10 : Carte des mutations du gène UL54 (ADN polymérase du HCMV) (D'après Lurain & Chou, 2010; Kotton et al., 2018).</i>	49
<i>Figure 11 : Schéma général de la mise en place des effecteurs spécifiques de la réponse anti-HCMV (Inspirée de la thèse de N. Jouand, 2018 (https://www.theses.fr/2018NANT1002) et de Khairallah et al., 2017).</i>	51
<i>Figure 12 : Schéma de la cinétique d'apparition des différentes réponses spécifiques anti-HCMV (Adaptée de Kaminski et al., 2015).</i>	52
<i>Figure 13 : Phénotype des différentes réponses spécifiques anti-HCMV persistantes à long-terme.</i>	54
<i>Figure 14 : Exemples de structures représentatives des 3 groupes d'immunoévasines (Adaptée de Berry et al., 2020).</i>	61
<i>Figure 15 : Schéma des mécanismes d'immunoévasion mis en place par le HCMV (Adaptée de Berry et al., 2020).</i>	67
<i>Figure 16 : Structure de la molécule HLA-E (Adaptée de Grant et al., 2020).</i>	71

Figure 17 : Structure cristallographique du complexe CD94/NKG2A-HLA-E/VMAPRTLFL et du complexe TCR GF4-HLA-E/VMAPRTLIL (Adaptée de Petrie et al., 2008; Sullivan et al., 2017). 74

Figure 18 : Distribution des échantillons sanguins analysés. 137

Figure 19 : Exemple représentatif de stratégie de sélection des populations pour l'analyse des populations T CD8+ anti-HCMV. 138

Figure 20 : Détection et quantification des réponses T CD8 anti-HCMV HLA-A2/pp65 et HLA-E/UL40 chez les LTR STABLES et CLAD. 139

Figure 21 : Fréquence en cellules TEMRA et niveau d'expression de CD3, CD8 et CD45RA des LT CD8 HLA-A2/pp65 et HLA-E/UL40 chez les LTR STABLES et les LTR CLAD. 141

Figure 22 : Phénotype des cellules mémoires T CD8 HLA-A2/pp65 et HLA-E/UL40 chez les LTR STABLES et les LTR CLAD possédant au moins une réponse anti-HCMV. 143

Figure 23 : Profil d'expression qualitative des LT CD8+ anti-HCMV chez les LTR STABLES et CLAD par analyse non supervisée des données de cytométrie spectrale. 145

Figure 24 : Localisation des marqueurs étudiés dans les clusters cellulaires définis pour les LT CD8+ anti-HCMV chez les LTR STABLES et CLAD par l'analyse non supervisée des données de cytométrie en flux. 146

Figure 25 : Distribution des échantillons sanguins analysés. 148

Figure 26 : Distribution des populations lymphocytaires après une primo-infection à HCMV chez les LTR STABLES et CLAD. 150

Figure 27 : Fréquence des sous-populations NK CD16+ CD56^{dim} ou NK CD16+ CD56^{bright} exprimant ou non CD57 et/ou NKG2C avant et après une primo-infection chez les LTR STABLES et CLAD. 152

Figure 28 : Distribution des populations lymphocytaires après une primo-infection à HCMV chez les LTR STABLES possédant ou non au moins une réponse T CD8 HLA-E/UL40. 153

Liste des tableaux

<i>Tableau 1 : Classification des Herpès virus Humain (D'après Gruffat et al., 2016).</i>	15
<i>Tableau 2 : Tropisme cellulaire du HCMV pour la réplication active et pour la mise en place de la latence (D'après Sinzger et al., 2008; Schottstedt et al., 2010).</i>	20
<i>Tableau 3 : Manifestations cliniques de l'infection à HCMV (D'après Crough & Khanna, 2009).</i>	27
<i>Tableau 4 : Incidence de l'infection et de la maladie à HCMV en SOT (D'après Roman et al., 2014; Azevedo et al., 2015).</i>	31
<i>Tableau 5 : Méthodes de diagnostic/détection du cytomégalovirus en laboratoire pour les patients SOT (D'après Razonable & Hayden, 2013; Kotton et al., 2018).</i>	43
<i>Tableau 6 : Comparaison de la prophylaxie universelle versus la thérapie préemptive (D'après Kotton et al., 2018).</i>	46
<i>Tableau 7 : Répertoire peptidique de HLA-E dans des conditions physiologiques : séquence et origine des peptides issus des séquences signal des molécules HLA-I (D'après Kanevskiy et al., 2019).</i>	72
<i>Tableau 8 : Répertoire peptidique de HLA-E dans des conditions pathologiques : séquence et origine des peptides (D'après Kanevskiy et al., 2019; Voogd et al., 2022).</i>	73
<i>Tableau 9 : Démographie et caractéristiques cliniques des LTR et des échantillons de la cohorte COLT inclus dans cette étude.</i>	136

Introduction

Chapitre 1 : Le cytomégalo­virus humain (HCMV)

I. Le cytomégalo­virus humain (HCMV) : Définitions et structure

La classification de Baltimore est une classification scientifique, proposée par David Baltimore en 1975, basée sur le génome des virus, leur type d'acides nucléiques (ADN ou ARN) mais aussi leur mode d'expression de l'ARN messager. D'après cette classification, le Cytomégalo­virus Humain/ Human Cytomegalovirus (HCMV) qui est un herpesvirus, appartient au groupe I des virus à ADN double brin, ordre des Herpesvirales, famille des Herpesviridae.

Les infections par les herpesvirus sont caractérisées entre autres par leur côté ubiquitaire et leur persistance à long terme chez leur hôte. Neuf types infectent l'espèce *Homo sapiens* qu'on peut diviser en 3 sous-types : les *Alphaherpesvirinae*, les *Betaherpesvirinae*, sous-type comprenant le HCMV (5^e membre sur les 8 composant les Herpès virus humain/ Human herpesvirus (HHV), HHV5) et les *Gammaherpesvirinae*. Les 3 sous-types d'herpesvirus se distinguent par un tropisme cellulaire particulier différent en fonction d'une primo-infection ou de l'état dit de « latence » du virus (**Tableau 1**) mais possèdent un mécanisme d'entrée commun par la conservation d'un complexe trimérique (glycoprotéine H (gH)-gL et gB) et un panel divers de protéines de liaison aux récepteurs (Connolly et al., 2021).

Tableau 1 : Classification des Herpès virus Humain (D'après Gruffat et al., 2016).

Sous-famille	Nom	Synonyme	Cibles de primo-infection	Cibles de latence	Pathophysiologie
α	HHV-1	Virus Herpes simplex de type 1 (HSV-1)	Cellules mucoépithéliales	Neurones	Herpès oral et génital, comme d'autres infections Herpès simplex (gingivostomatite, kératinite, panaris cutanés, encéphalite)
	HHV-2	Virus Herpes simplex de type 2 (HSV-2)			
	HHV-3	Virus de la Varicelle-Zona (VZV)			Varicelle; Zona
β	HHV-5	Cytomégalo-virus (HCMV)	Cellules épithéliales, fibroblastes, monocytes	Cellules souches hématopoïétiques CD34+, monocytes, cellules endothéliales	- Infection congénitale (quand symptomatique) causant hépatosplénomégalie, rétinite - Syndrome mononucléosique - Hôtes immunodéprimés : Développement possible de maladies disséminées impactant les poumons, le tractus gastro-intestinal, le foie, la rétine et le système nerveux central
	HHV-6A	Roseolovirus	Lymphocytes, monocytes, macrophages, cellules épithéliales	Lymphocytes T	Roséole infantile
	HHV-6B				
	HHV-7				
γ	HHV-4	Virus d'Epstein-Barr (EBV)	Cellules épithéliales et lymphocytes B	Lymphocytes B	Mononucléose infectieuse; associée au lymphome de Burkitt; syndrome lymphoprolifératif post-transplantation; carcinome nasopharyngé; sous-type de carcinome gastrique
	HHV-8	Virus de l'herpès associé au sarcome de Kaposi (KSHV)	Lymphocytes et autres cellules		Sarcome de Kaposi; lymphome effusif primaire, sous-types de maladie de Castleman

1.1. Structure du HCMV

Le HCMV est constitué d'une enveloppe composée à la fois de membrane de la cellule-hôte infectée mais également ponctuée à sa surface de glycoprotéines virales (au moins 8 glycoprotéines virales différentes). L'enveloppe du virus entoure une couche protéique connue sous le nom de « tégument » qui entoure elle-même une capsidie icosaédrique (Schottstedt et al., 2010). Cette capsidie de 100 à 110 nm de diamètre englobe l'ADN bicaténaire linéaire du HCMV (Dolan et al., 2004). Il est estimé que l'ensemble de la particule virale mature-virion (génom-capsidie-tégument-enveloppe) a un diamètre variant de 150 à 200 nm (Schottstedt et al., 2010) (**Figure 1**).

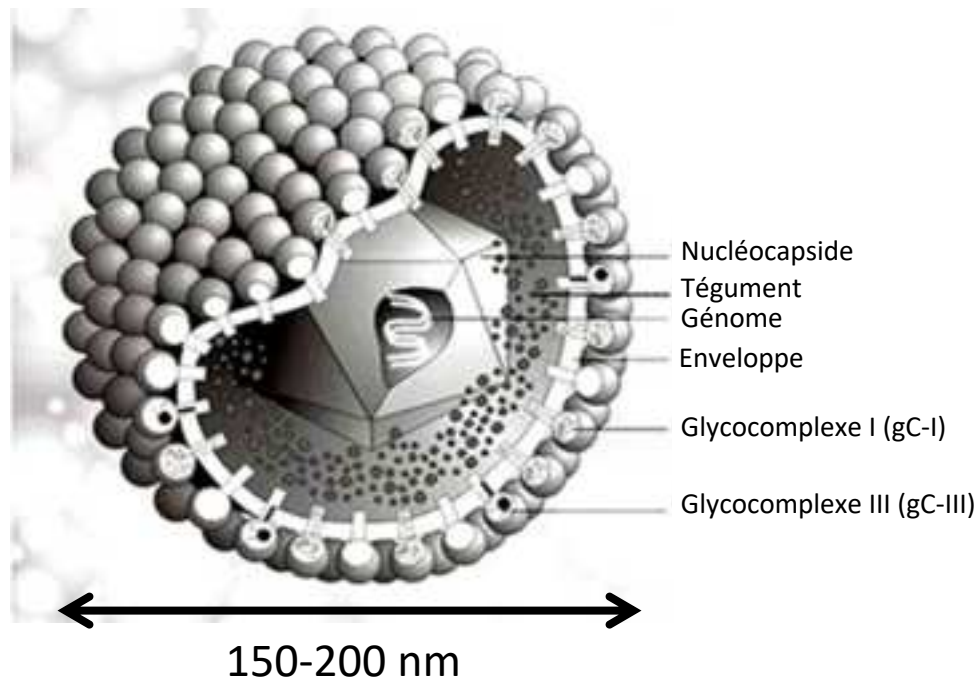


Figure 1: Structure du virion HCMV (Adaptée de Tomtishen III, 2012).

1.1.1. Génome

Le HCMV possède de loin le plus grand génome des HHV, ce génome faisant environ 236 kpb (Dolan et al., 2004). Le génome est constitué de 2 segments, L (Long) et S (Short), liés de manière covalente. Chacun de ces segments est lui-même constitué d'un segment unique U (UL et US). De part et d'autre de ces segments se situe des blocs de cadres de lecture ouverts (ORF = Open Reading Frame) inversés répétés (TRL, IRL, TRS et IRS = Internal ou Terminal Repeat Short/Long) (Davison et al., 2003). Le nombre de ces ORFs a été estimé entre 165 et 252 (Davison et al., 2003; Murphy et al., 2003). De par la complexité du génome du HCMV, une étude menée par l'équipe de Weissman en 2012, a identifié un total de 751 ORFs traduits (Stern-Ginossar et al., 2012) (**Figure 2**).

1.1.2. Capside

La taille de la capside du HCMV est similaire à celle des autres membres des HHV et est de forme icosaédrique avec une triangulation (T) = 16 (Bhella et al., 2000). La capside est une structure complexe faite de 4 protéines structurales majeures : MCP (Major Capsid Protein), mCP (minor Capsid Protein), mC-BP (minor Capsid protein-Binding Protein) et SCP (Smallest Capsid Protein). Ces protéines sont codées par UL86, UL85, UL46 et UL48A respectivement

(Davison & Bhella, 2007). Elle est constituée au total de 12 pentons, 150 hexons et 320 triplex (Chen et al., 1999; Yu et al., 2017).

1.1.3. Tégument

La matrice tégumentaire ou « tégument » interagit avec les pentons, les hexons et les triplex de la capside du virus de manière à épouser sa forme et lui donnant une forme icosaédrique (Chen et al., 1999). Environ la moitié des 71 protéines virales du virion compose le tégument (le restant composant l'enveloppe et la capside), ayant différents rôles comme la modulation/évasion du système immunitaire (SI) de l'hôte, l'assemblage et la sortie du virus, le relargage de l'ADN du virus dans la cellule hôte, ou encore l'expression de gènes (Varnum et al., 2004; Kalejta, 2008). En plus des protéines virales retrouvées dans le tégument, plus de 70 protéines cellulaires d'hôte sont présentes incluant des protéines cellulaires structurales, des enzymes et des protéines chaperonnes (Varnum et al., 2004).

La protéine la plus abondante du tégument est pp65 (UL83) (Varnum et al., 2004). Cette protéine est impliquée dans la modulation des réponses immunitaires de l'hôte par la modulation de la lyse des cellules infectées par les cellules tueuses naturelles (NK = Natural Killer) ou la modulation de la réponse interféron et de l'inflammasome (McLaughlin-Taylor et al., 1994; Gilbert et al., 1996; Odeberg et al., 2003; Arnon et al., 2005; Biolatti et al., 2018). pp150 (UL32) est considérée comme la 2^e protéine la plus abondante du tégument (Varnum et al., 2004), jouant un rôle dans la stabilité de la nucléocapside mais aussi dans l'externalisation des particules virales (AuCoin et al., 2006; Tandon & Mocarski, 2008).

La protéine pp28 (UL99) participe au cloisonnement au sein d'une enveloppe de la capside et des protéines du tégument dans le cytoplasme de la cellule-hôte (Silva et al., 2003).

Par ailleurs, UL47 fait quant à elle partie d'un complexe impliqué dans le relargage de l'ADN viral de la capside dans la cellule-hôte, l'absence de cette protéine induisant également un retard dans ce processus de relargage (Bechtel & Shenk, 2002).

Parmi ses fonctions les mieux connues, pp71 (UL82) active l'expression des gènes immédiats précoces (*IE* = Immediate Early) dans les phases précoces de la réplication (Kalejta & Albright, 2020).

1.1.4. Enveloppe

Les glycoprotéines composant l'enveloppe virale sont réparties en 3 glycocomplexes (gC): gC-I, gC-II et gC-III (Gretch et al., 1988).

Le gC-I est constitué d'homodimères de gB (UL55) et est impliqué dans l'entrée du virus plus particulièrement au moment de la fusion des membranes virales et cellulaires de l'hôte (Isaacson & Compton, 2009). Le gC-II est quant à lui constitué d'hétérodimères de gM (UL100) et gN (UL73), gM et gN jouant un rôle dans le mécanisme d'attachement aux cellules de l'hôte. (Nguyen & Kamil, 2018). Le gC-III est plus connu sous le nom de trimère ou gH/gL/gO, un autre complexe gH/gL a été décrit (Wang & Shenk, 2005), il se présente sous la forme d'un pentamère gH/gL/UL128/UL130/UL131A. Ces 2 complexes gH (UL75)/gL (UL115)/gO (UL74) et gH/gL/UL128/UL130/UL131A sont exclusifs l'un de l'autre et sont impliqués dans le tropisme cellulaire (Nguyen & Kamil, 2018).

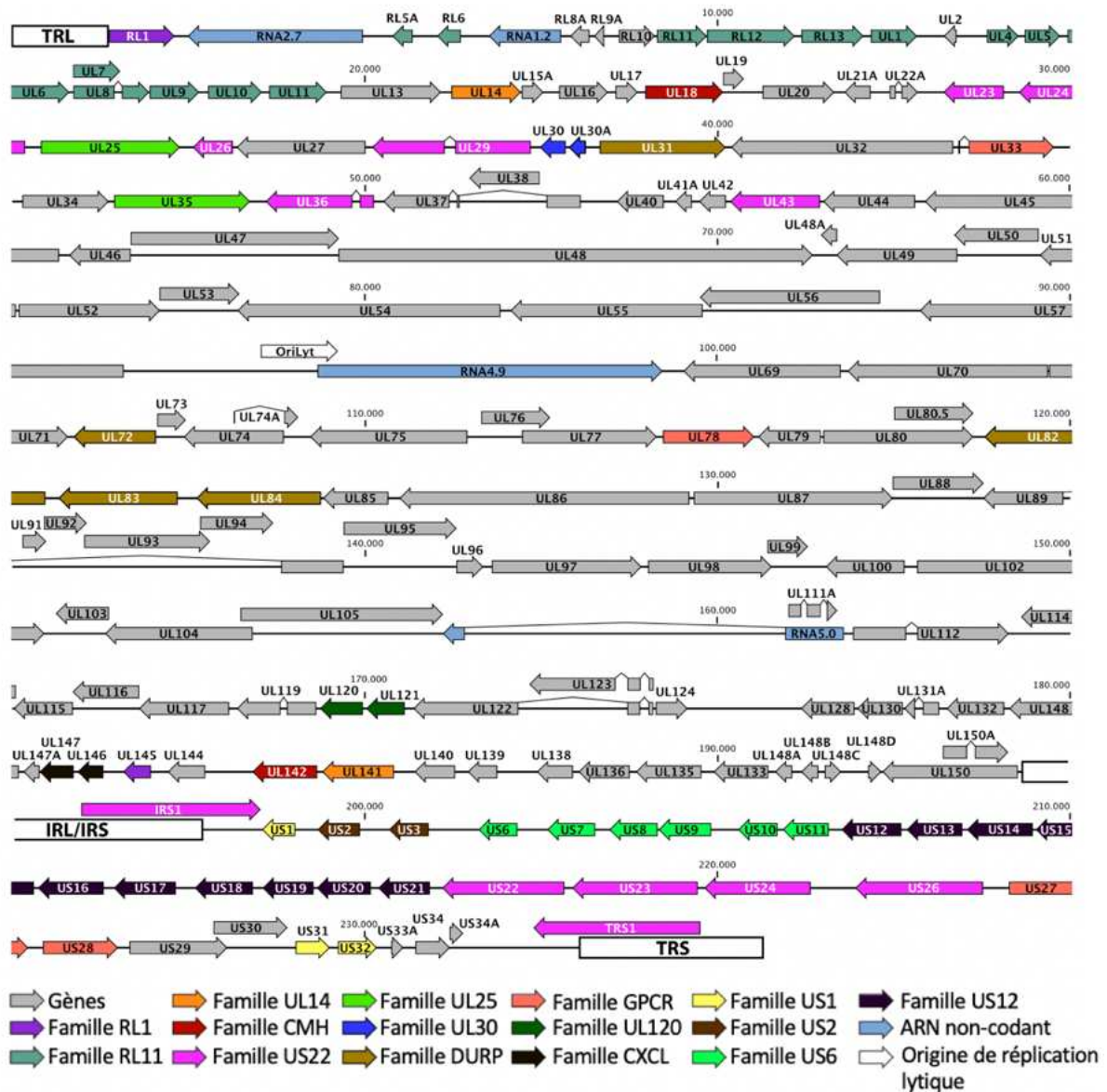


Figure 2 : Annotation du génome de la souche HCMV de faibles passages, Merlin (GenBank accession NC_006273) (D'après Sijmons et al., 2014).

Le génome viral est représenté comme une ligne unique, la position des nucléotides est donnée en simple paire de bases. Les encadrés blancs représentent les TRL, IRL/IRS et TRS. Les flèches représentent les gènes, avec des codes couleurs différents en fonction des familles de gènes ainsi que 4 ARN non-codants et l'origine de réplication.

1.2. Tropisme cellulaire du HCMV

Tableau 2 : Tropisme cellulaire du HCMV pour la réplication active et pour la mise en place de la latence (D'après Sinzger et al., 2008; Schottstedt et al., 2010).

Sites de réplication active	Site de latence
Cellules épithéliales	Cellules endothéliales
Fibroblastes	Cellules souches hématopoïétiques CD34+
Cellules endothéliales	Monocytes
Cellules de la lignée myéloïde (monocytes, macrophages, cellules dendritiques dérivées des monocytes, ...)	Cellules dendritiques immatures
Cellules musculaires lisses	
Hépatocytes	

Le HCMV a la capacité d'infecter de nombreuses cellules telles que les cellules endothéliales, les cellules épithéliales, les fibroblastes, La diversité de cellules permises au HCMV est plus restreinte quand le virus est en état de latence (Schottstedt et al., 2010; Sinzger et al., 2008) (**Tableau 2**).

Le tropisme cellulaire du HCMV se définit par 2 modèles différents d'entrée du virus dans la cellule cible impliquant soit le complexe trimérique/ trimeric complex gH/gL/gO (TC) ou le complexe pentamérique/pentameric complex gH/gL/UL128/UL130/UL131A (PC) (Wang & Shenk, 2005). Le PC est requis pour l'entrée dans les cellules endothéliales et les cellules épithéliales passant par le récepteur neuropiline 2 (Nrp2) contrairement au TC qui permet l'entrée dans tous les types cellulaires passant lui par le PDGFR- α (Platelet-derived growth factor receptor alpha) pour les fibroblastes (Gerna et al., 2019) (**Figure 3**).

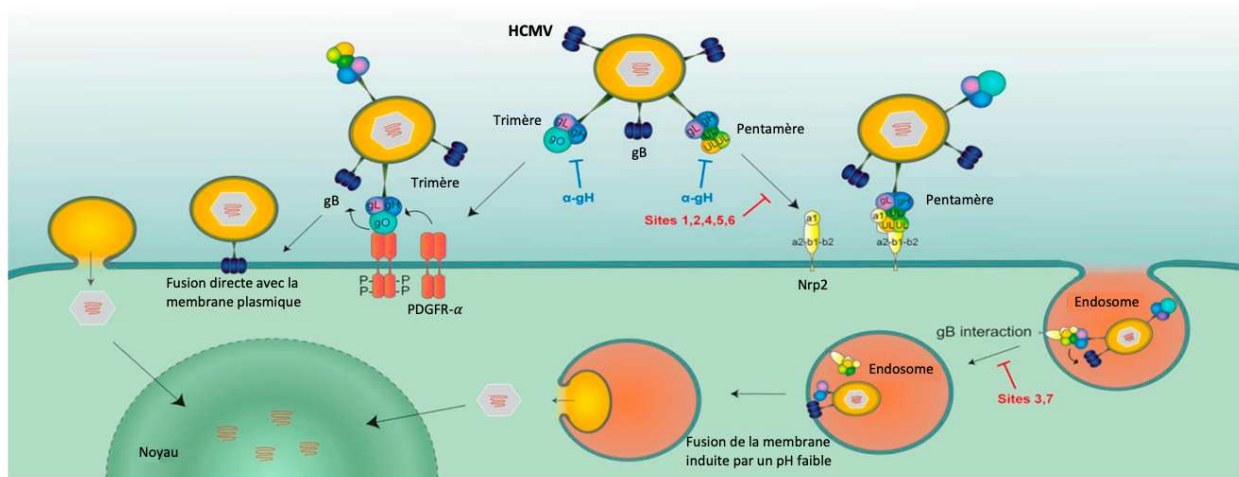


Figure 3 : Schéma illustrant les modes d'entrée du HCMV dans la cellule soit par le TC soit par le PC (Adaptée de Gerna et al., 2019).

Le TC (gH/gL/gO) interagit avec PDGFR- α via gO, puis le TC enclenche la fusion avec la membrane plasmique des fibroblastes à l'aide de gB. Le PC quant à lui se lie avec Nrp2, puis par la partie gH/gL de PC induit l'endocytose des particules virales qui seront libérées dans le cytoplasme dans les conditions de faible pH à l'aide de la capacité de fusion de gB.

1.3. Le cycle réplcatif

L'entrée du virus dans la cellule de l'hôte se faisant soit par fusion via le TC avec PDGFR- α de manière à activer l'activité de gB soit par endocytose via le PC ou TC au niveau de gH/gL se liant à Nrp2. Les particules virales sont ensuite relarguées dans le cytoplasme à partir des membranes endosomales (Gerna et al., 2019) (**Figure 3**). Suite à l'entrée du virus dans la cellule de l'hôte, les capsides des virions utilisent la machinerie du cytosquelette de l'hôte pour être transportées jusqu'au noyau (Miller & Hertel, 2009). C'est dans le noyau qu'a lieu la transcription virale, la réplication du génome et l'encapsidation des néo-particules. Une fois que le génome est entré dans le noyau de la cellule hôte, il se retrouve chromatinisé par l'ajout d'histones (Nitzsche et al., 2008; Albright & Kalejta, 2016), ces histones sont modifiées après traduction. Les gènes du HCMV sont ensuite exprimés en 3 temps distincts : les gènes précoces immédiats (*IE*), les gènes précoces retardés (*DE* = Delayed-Early) et les gènes tardifs (*L*). Les gènes *IE* sont exprimés entre 2 et 6 heures post-infection (hpi) et notamment les gènes *IE1* et *IE2*. *IE1* est une protéine virale jouant un rôle essentiel dans la réplication virale et induisant avec *IE2* l'expression des gènes *DE* entre 6 et 24 hpi (Beltran & Cristea, 2014), ces derniers permettant la réplication du génome. C'est ensuite au tour des gènes *L* d'être exprimés entre 24 et 72 hpi, produisant les protéines de la capside mais aussi les glycoprotéines. Les nouvelles particules virales sont entourées d'une capside, acquièrent une

première couche de protéines tégumentaires et sortent du noyau de la cellule par bourgeonnement de la membrane nucléaire. La 2nde couche formant le tégument est acquise ainsi que l'enveloppe grâce au complexe d'assemblage viral cytoplasmique (AC viral). L'AC viral est formé par le détournement de la machinerie sécrétoire cellulaire composée à la fois du réticulum endoplasmique (RE), de l'appareil de Golgi mais aussi de la machinerie endosomale. Les néo-virions traversent la cellule en direction de la membrane plasmique de façon à pouvoir infecter de nouvelles cellules permmissibles. L'ensemble de ce cycle réplication du HCMV dure au total 5 jours (Tyl et al., 2022) (**Figure 4**).

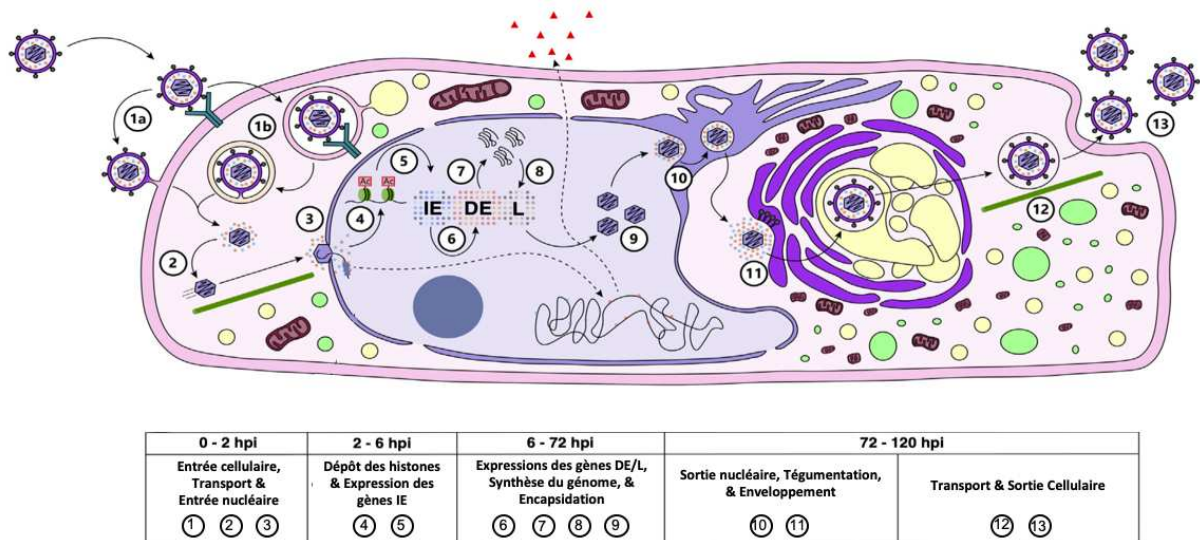


Figure 4 : Schéma illustrant le cycle réplcatif du HCMV (Adaptée de Tyl et al., 2022).

(1) Le virion se lie aux protéines transmembranaires de l'hôte pour réaliser l'entrée dans la cellule (a) par fusion directe avec la membrane plasmique via le TC (b) par endocytose via le PC. (2) Transport de la capside le long des microtubules vers le noyau. (3) La capside se fixe aux pores nucléaires et libère son génome à l'intérieur du noyau. (4) Les histones s'associent au génome de manière non dépendante de la réplication. (5) Acétylation des modifications des histones post-traductions pour remodeler les nucléosomes viraux et induire l'expression des gènes *IE*. (6) Les protéines *IE* induisent l'expression des gènes *DE*. (7) Les protéines *DE* répliquent le génome viral. (8) Induction de l'expression des gènes *L*. (9) Encapsidation du génome du HCMV. (10) Acquisition d'une première couche de protéines tégumentaires et sortie du noyau par bourgeonnement de la membrane nucléaire. (11) Acquisition de la 2nde couche du tégument et de l'enveloppe au niveau du complexe d'AC viral. (12) Transport des néo-virions vers la membrane cytoplasmique. (13) Sortie de la cellule et dissémination vers d'autres cellules.

1.4. Latence et réactivation

Du fait de son appartenance aux herpesvirus, le HCMV est doté de la capacité à s'établir en latence dans les cellules suite à la primo-infection, c'est-à-dire que le génome viral est présent sans production de particules virales infectieuses. Le panel de cellules dans laquelle la latence peut s'établir est plus restreint que pour la réplication active ; 2 types cellulaires sont majoritairement concernées : les cellules souches hématopoïétiques (CSH) CD34+ et les cellules endothéliales (Sinzger et al., 2008; Schottstedt et al., 2010) (**Tableau 2**). Le virus latent est retrouvé en faible quantité dans les cellules, avec 2 à 13 copies de son génome par cellules infectées (Slobedman & Mocarski, 1999). En latence, il a été constaté une hétérochromatisation de la région promotrice précoce immédiate/ Major IE promoter (MIEP) du génome viral qui contribuerait à la répression des gènes lytiques dont les gènes *IE* (Reeves, et al., 2005 (a) ; Reeves, et al., 2005 (b)). De plus, par l'inhibition de l'expression de gènes viraux, le virus est également capable d'échapper au SI.

Contrairement à la latence qui s'établit par des mécanismes propres à chaque type cellulaire, la réactivation, quant à elle, est provoquée par différents phénomènes. La MIEP aurait un rôle de régulateur à la fois dans la latence et dans la réactivation. En cas de réactivation, les répresseurs présents sur le génome viral au niveau de la MIEP des cellules infectées latentes sont remplacés par des activateurs (facteurs de transcription ou histones) (Forte et al., 2020). La MIEP peut être activée par plusieurs stimuli : par les lésions d'ischémie /reperfusion, le stress oxydatif, les phénomènes inflammatoires, les dommages à l'ADN (**Figure 5**). La réactivation pouvant aussi être provoquée par la différenciation des cellules de la lignée myéloïde (CSH CD34+ / monocytes) en cellules dendritiques/ dendritic cell (DC) matures (mDC) (Reeves, et al., 2005 (b)).

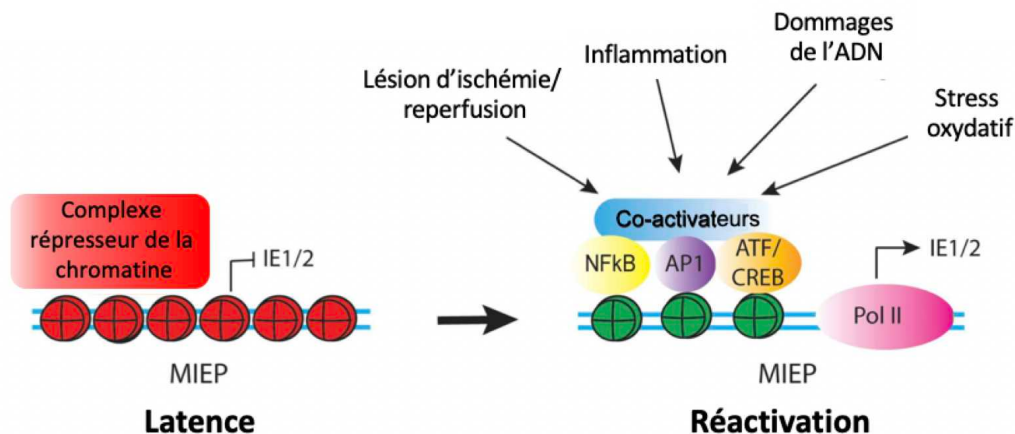


Figure 5 : Schéma de la régulation de la MIEP durant la latence et la réactivation (D'après Forte et al., 2020).

En latence, la MIEP est associée à des histones répressives et le complexe répresseur de la chromatine (en rouge). Pour la réactivation, la MIEP est modifiée de façon à remplacer les facteurs répresseurs par des facteurs activateurs, des co-activateurs, et des histones avec des modifications activatrices (en vert) et activée par divers stimuli (inflammation, stress oxydatif, ...).

II. Épidémiologie et physiopathologie du HCMV

Le HCMV est présent chez 40% à 100% des individus à travers le monde avec des disparités en fonction des pays (Bate et al., 2010; Cannon et al., 2010; Zuhair et al., 2019). Au sein des pays industrialisés, la séroprévalence est de 30 à 80% alors que dans les pays en voie de développement (une moyenne de 66% en Europe), la séroprévalence peut s'élever jusqu'à 100% (une moyenne de 90% aux Proche et Moyen-Orient) (Zuhair et al., 2019) (**Figure 6**). La forte séroprévalence est corrélée à l'ethnicité, aux conditions socio-économiques, de santé, d'éducation et d'hygiène mais aussi au niveau de revenus au sein des foyers (Bate et al., 2010; Cannon et al., 2010). Une étude menée sur 2536 individus en 2010 a estimé que 41.9% des français étaient séropositif au HCMV parmi les 15 à 49 ans (Antona et al., 2017).

Régions du monde	Population en Générale	Femmes en âge de procréer	Donneurs de sang et d'organes
<i>Europe</i>	66% (56-74%)	70% (63-76%)	69% (61-77%)
<i>Amériques</i>	75% (64-84%)	79% (69-87%)	78% (67-87%)
<i>Asie du Sud-Est</i>	86% (77-93%)	89% (82-94%)	88% (81-94%)
<i>Afrique</i>	88% (80-93%)	90% (85-94%)	90% (84-94%)
<i>Pacifique occidentale</i>	88 (81-94%)	91% (86-94%)	90% (85-94%)
<i>Proche et Moyen-Orient</i>	90 (85-94%)	92% (88-95%)	92% (87-95%)
Globale	83% (78-88%)	86% (83-89%)	86% (82-89%)

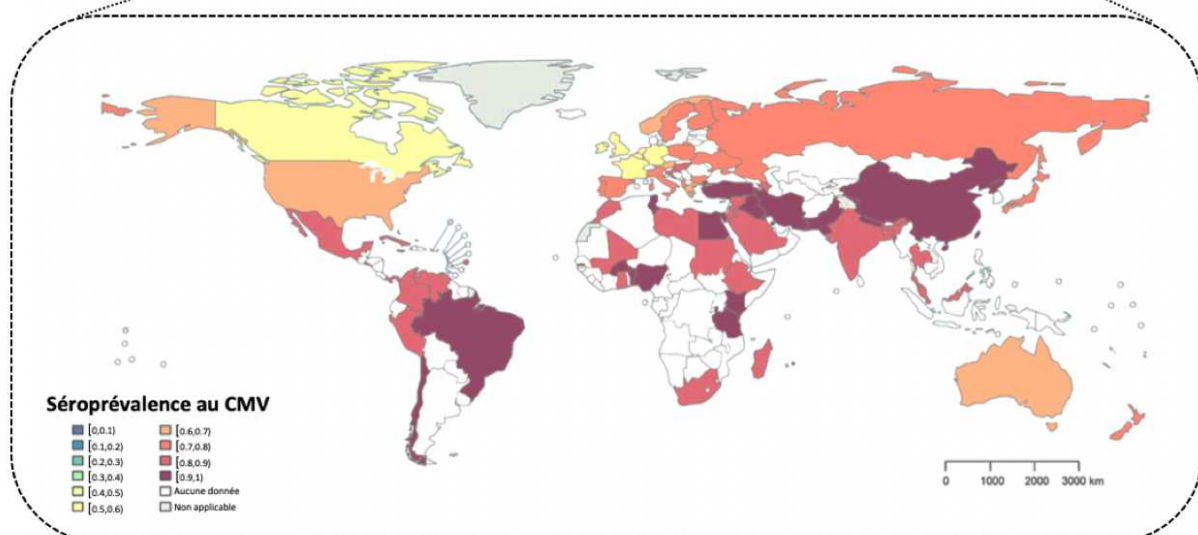


Figure 6 : Estimation en % de la séroprévalence moyenne du HCMV dans les différentes régions de l'OMS et dans le monde par groupe de population. (Adaptée de Zuhair et al., 2019).

La carte représentant l'estimation globale de la séroprévalence du HCMV des femmes en âge de procréer.

2.1. Épidémiologie

On peut classer les modes de transmission en 2 catégories : par la voie naturelle (transmission verticale ou horizontale) et la voie iatrogène. Par la voie naturelle, la transmission se fait par les sécrétions corporelles comme la salive, les urines, les larmes, le lait maternel et les sécrétions génitales. La voie iatrogène concerne les actes médicaux comme la transfusion sanguine ou encore la transplantation d'organe solide/ solid organ transplantation

(SOT) ou de CSH (Crough & Khanna, 2009). Les modes de transmissions seront plus détaillées dans la Partie 2.2 et le Chapitre 2.

Il existe 2 pics majoritaires d'infection de l'hôte par le HCMV : le 1^{er} pic ayant lieu durant l'enfance, du nouveau-né à l'enfant de 2-3 ans, dû à la transmission dite verticale de la mère à l'enfant lors de l'accouchement ou encore par l'allaitement du nouveau-né, ou dû aux contacts répétés des enfants avec les urines et la salive d'autres enfants (Crough & Khanna, 2009). Le 2^e pic a lieu entre l'adolescence et le début de la vie adulte (16-30 ans) et cela est lié aux contacts sexuels dûs au début de la vie sexuelle active. La proportion de personnes séropositives augmente avec l'âge pour atteindre jusqu'à 70% de la population pour les pays industrialisés (Schottstedt et al., 2010).

2.2. Physiopathologie de l'infection à HCMV

Pour les individus sains dit immunocompétents, la primo-infection à HCMV est dans la majorité des cas asymptomatique. Dans une minorité des cas l'infection est symptomatique et présente différentes manifestations cliniques comme la mononucléose accompagnée de fièvre et de myalgie ou encore l'adénopathie ou l'hépatomégalie (Crough & Khanna, 2009). Cette infection peut avoir des conséquences plus graves pour les fœtus/nourrissons et les hôtes immunodéprimés tels que les patients atteints du syndrome d'immunodéficience acquise (SIDA) ou encore les patients receveurs d'une SOT ou transplantation de CSH (le cas des patients transplantés sera développé dans le Chapitre 2) (**Tableau 3**). (Razonable & Humar, 2019).

Actuellement, on distingue en clinique la virémie à HCMV, le syndrome à HCMV, et la maladie à HCMV avec invasion tissulaire ou maladie des organes cibles. L'infection à HCMV est définie actuellement par la détection de charge virale suite à la réplication active dans le sang (virémie), indépendamment de symptômes cliniques (Razonable & Humar, 2019). Le syndrome à HCMV se définit par la détection d'une virémie sanguine accompagnée d'au moins deux des critères suivants : fièvre prolongée, asthénie/sensation de malaise, leucopénie/neutropénie, ou encore thrombopénie (Ljungman et al., 2017). La maladie à HCMV avec invasion tissulaire ou maladie des organes cibles se définit, quant à elle, comme un syndrome à HCMV accompagné d'une atteinte d'organe par le virus (encéphalite, rétinite, pneumonie, hépatite, colite) (Ljungman et al., 2017). La maladie à HCMV (syndrome et

maladie à HCMV avec invasion tissulaire ou maladie des organes cibles) sera plus détaillée dans le chapitre suivant.

Tableau 3 : Manifestations cliniques de l'infection à HCMV (D'après Crough & Khanna, 2009).

Types patients	Manifestations cliniques
Individus sains	Habituellement asymptomatique; peu fréquemment mononucléose avec fièvre et myalgie, adénopathie, splénomégalie
Fœtus / nourrisson avec infection congénitale	Jaunisse; hépatosplénomégalie; pétéchies; microcéphalie; hypotonie; convulsion; léthargie; séquelles neurosensorielles
Patients atteints du VIH/ SIDA	Rétinite; entérocolite; œsophagite ou gastrite; récupération immunitaire de la vitrite- inflammation du segment postérieur; pneumonie; hépatite
Receveurs de CSH	Pneumonie; entérocolite; œsophagite ou gastrite; moins communément rétinite, encéphalite; hépatite
Receveurs de SOT	Maladie fébrile avec leucopénie et malaise; pneumonie; entérocolite; œsophagite ou gastrite; hépatite; autres maladies envahissant les tissus (néphrite, cystite, myocardite, pancréatite)

2.2.1. Grossesse et infection congénitale

L'infection congénitale à HCMV touche 0,2% à 6,1% des naissances vivantes dans le monde entier (Kabani & Ross, 2020). Une étude de 2017 réalisée sur 11 715 nouveau-nés a estimé que cette infection congénitale touchait 0,37% des naissances vivantes en France (Leruez-Ville et al., 2017). De plus, 30% des femmes en âge de procréer sont séronégatives en Europe et plus précisément 45,6% sont séronégatives en France (Antona et al., 2017; Zuhair et al., 2019) (**Figure 6**). Les femmes en âge de procréer et tout particulièrement les femmes séronégatives avant leur grossesse sont à risque d'être infectées dûs aux contacts fréquents et de longues durées avec des enfants séropositifs de moins de 3 ans (Leruez-Ville et al., 2020). Il existe différents modes de transmission du virus au fœtus : le majoritaire survient *in utero* par voie transplacentaire lors de la primo-infection ou lors d'une infection dite non-primaire (réinfection ou réactivation du virus). La transmission peut aussi se faire lors de l'accouchement soit par contact avec les sécrétions génitales infectées soit lors de l'allaitement (Leruez-Ville et al., 2020).

Dans le contexte d'une infection primaire maternelle, le taux de transmission de la mère au fœtus est de 26% au 1^{er} trimestre (≤ 14 semaines), de 28% au 2^e trimestre (> 14 semaines et ≥ 28 semaines) et de 65% au 3^e trimestre (> 28 semaines), mais c'est au 1^e

trimestre que les séquelles sont les plus graves (Leruez-Ville et al., 2020). L'infection fœtale peut-être symptomatique (10-15% des nouveau-nés infectés) ou asymptomatique (jusqu'à 90% des nouveau-nés infectés) (Fowler & Boppana, 2018). Les nouveau-nés symptomatiques vont développer, pour la moitié, une maladie des inclusions cytomégaliqes (Leruez-Ville et al., 2020) (**Tableau 3**). De plus, cette atteinte disséminée entraîne jusqu'à 30% de décès et 60% présenteront des séquelles neurosensorielles (retard mental, perte d'audition, ...) (Benoist et al., 2013). La grande majorité des nourrissons sont asymptomatiques, néanmoins, 5 à 15% développeront ces séquelles (Kabani & Ross, 2020).

Dans le contexte d'une infection non primaire, le taux de transmission de la mère à l'enfant est très faible, inférieur à 2% (Benoist et al., 2013) (**Figure 7**).

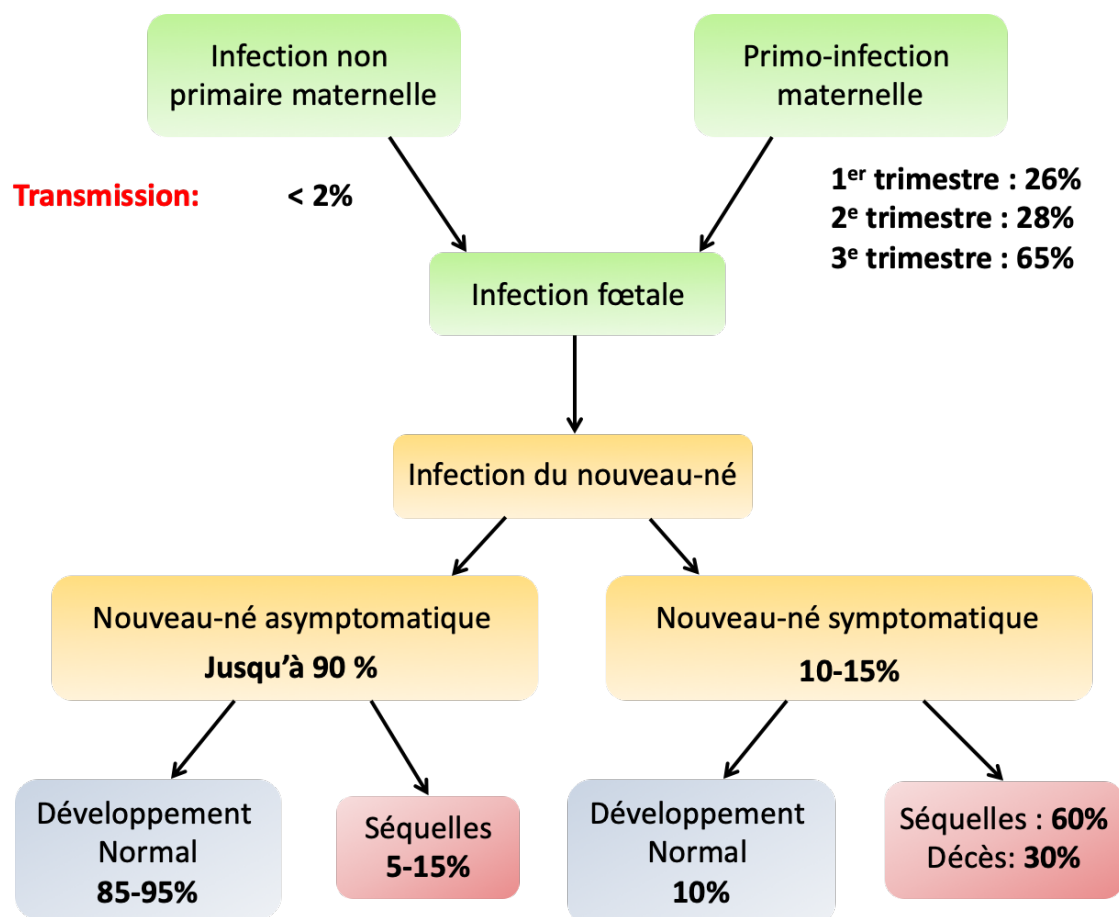


Figure 7 : Transmission de la mère à l'enfant de l'infection à HCMV.

2.2.2. Les patients atteints du VIH/SIDA

L'infection par le HCMV est considérée comme une infection opportuniste chez les patients atteints du SIDA (Griffiths, 2006). La grande majorité des adultes séropositifs pour le virus de l'immunodéficience humaine (VIH) sont également séropositifs pour le HCMV (Fulkerson et al., 2021). Toutefois, on estime qu'avant le début de la thérapie antirétrovirale hautement active/ highly active antiretroviral therapy (HAART), 40% des adultes atteints de SIDA présenteront des manifestations cliniques de la maladie à HCMV tels que la rétinite, l'entérocolite, ... (Gallant et al., 1992). (**Tableau 3**). L'infection au VIH provoque un déficit immunitaire important particulièrement dans le compartiment T CD4+, ce qui favorise la réplication du HCMV (Freeman et al., 2016).

L'infection à HCMV a également été associée à la progression de l'infection par le VIH en agissant comme un co-facteur de la pathogénicité du VIH (Griffiths, 2006). On peut citer plusieurs exemples de la manière dont le HCMV peut agir sur la pathogénicité de l'infection au VIH. L'infection par le HCMV des fibroblastes peut induire les récepteurs Fc à leur surface les rendant permmissibles à l'infection au VIH et permettant ainsi au VIH d'infecter un large panel de types cellulaires (McKeating et al., 1990). Qui plus est, le HCMV agit comme transactivateur du promoteur du VIH augmentant la transcription virale (Davis et al., 1987; Barry et al., 1990) et augmente la sénescence des cellules T (Dock & Effros, 2011).

Chapitre 2 : L'infection à HCMV : un facteur de risque en transplantation

Les patients transplantés de CSH ou SOT sont sous traitements immunosuppresseurs pouvant faciliter le développement de l'infection à HCMV. L'infection à HCMV que ce soit une infection primaire, une réactivation ou encore une maladie à HCMV apparaît dans les 3 mois post-transplantation ou après mais est considérée comme retardée en cas d'absence de traitements de prévention (Fulkerson et al., 2021). Le HCMV augmente la mortalité et la morbidité des patients transplantés et perturbe également les fonctions du greffon allant jusqu'au rejet du greffon (Ramanan & Razonable, 2013; Kaminski & Fishman, 2016).

I. Physiopathologie de l'infection à HCMV chez les patients transplantés

1.1. Incidence

Selon le type de greffe d'organe, le statut sérologique du donneur et du receveur et les stratégies de prévention utilisées, l'incidence de l'infection et de la maladie à HCMV varie (Ramanan & Razonable, 2013). Concernant la transplantation de CSH, 30% des patients ayant subi une transplantation allogénique de CSH et environ 5% ayant subi une transplantation autologue de CSH développent une maladie à HCMV (Azevedo et al., 2015). En outre, du côté de la SOT, l'incidence d'une infection à HCMV et du développement de la maladie à HCMV est différente en fonction du type d'organe. L'incidence de l'infection et de la maladie à HCMV peut être similaire comme pour la transplantation de pancréas ou de rein/pancréas (50% d'incidence pour la primo-infection et la maladie à HCMV) ou très éloignée comme en transplantation rénale (incidence de 8-32% pour la primo-infection et de 8% pour la maladie à HCMV) (Roman et al., 2014; Azevedo et al., 2015) (**Tableau 4**).

Tableau 4 : Incidence de l'infection et de la maladie à HCMV en SOT (D'après Roman et al., 2014; Azevedo et al., 2015).

Organes	Infection à HCMV	Maladie à HCMV
Rein	8%-32%	8%
Cœur	9%-35%	29%
Foie	22%-29%	29%
Poumon ou cœur/poumon	50-75%	40%
Pancréas ou rein/pancréas	50%	50%

1.2. Facteurs de risque

Basés sur l'incidence des anticorps (Ac) IgG anti-HCMV, les facteurs de risque de développement de l'infection et de la maladie à HCMV après la transplantation ont été stratifié en 4 sous-groupes majeurs : D+/R-, D+/R+, D-/R+ et D-/R-.

Concernant la SOT, le sous-groupe le plus à risque est constitué d'un donneur (D) séropositif pour le HCMV donnant son organe à un receveur (R) qui est lui séronégatif pour le HCMV, sachant que 80% des primo-infections ont lieu dans le sous-groupe D+/R- après transplantation (Atabani et al., 2012). Le risque provient du fait que le receveur est non seulement immunodéprimé et reçoit un organe infecté mais également qu'il ne possède pas de réponses anti-HCMV préétablies (Ramanan & Razonable, 2013). Le second sous-groupe le plus à risque est représenté par un donneur et un receveur qui sont tous deux séropositifs pour le HCMV (D+/R+). Le receveur fait une surinfection c'est-à-dire le virus se réactive ou le receveur subit une réinfection avec une nouvelle souche du virus provenant du donneur. La réinfection due au donneur a été démontrée lors du séquençage de 2 receveurs de transplantation rénale ayant reçu un rein du même donneur séropositif (Grundy et al., 1988). Dans le cas du 3^e sous-groupe le plus à risque, le donneur est séronégatif et le receveur est séropositif pour le HCMV (D-/R+). Dans cette situation, le receveur peut subir une réactivation du virus et possède une réponse anti-HCMV préexistante. Seulement 40% des receveurs R+ réactivent le virus en latence après la transplantation (Atabani et al., 2012). Le 4^e sous-groupe est considéré comme le moins à risque où ni le donneur ni le receveur sont séropositifs pour le HCMV (D-/R-). Les patients peuvent tout de même être infectés au cours leur vie par le

contact avec des individus séropositifs. Leur incidence de développement de la maladie à HCMV est estimée entre 1 et 2% 12 mois post-transplantation (Ramanan & Razonable, 2013). En résumé, les 4 sous-groupes peuvent être classifiés comme D+/R- >>> D+/R+ >> D-/R+ > D-R- (**Figure 8**).

Contrairement à la SOT, le sous-groupe le plus à risque pour la transplantation de CSH est le D-/R+. Ce qui souligne le fait que la transmission par le D+ est assez rare (Panagou et al., 2016) et qu'il y a une transmission possible de l'immunité cellulaire du donneur au receveur (Grob et al., 1987) faisant ainsi du sous-groupe D+/R- comme moins à risque que les D-/R+. Ainsi, lors d'une transplantation de CSH, on peut classer les sous-groupes comme ceci : D-/R+ >> D+/R- (**Figure 8**).

L'âge, le mismatch antigène des leucocytes humaines/ human leukocyte antigen (HLA) ou encore l'état d'immunosuppression de l'hôte (type de traitement, dose et durée) constituent aussi des facteurs de risque de déclenchement de la maladie à HCMV.

Un risque plus élevé de développement de la maladie à HCMV est retrouvé associé avec l'utilisation d'agents déplétants lymphocytaires tels que le sérum anti-lymphocytes/anti-lymphocyte globulin (ALG), les sérum anti-thymocytes/ anti-thymocyte globulin (ATG) et les Ac anti-CD3 (OKT3) et les anti-CD52 (alemtuzumab) (Ramanan & Razonable, 2013). Contrairement à l'inhibiteur de la rapamycine (mTOR) comme l'évérolimus dont l'utilisation est associée à une incidence plus faible d'infection ou de maladie à CMV (Brennan et al., 2011; Radtke et al., 2016).

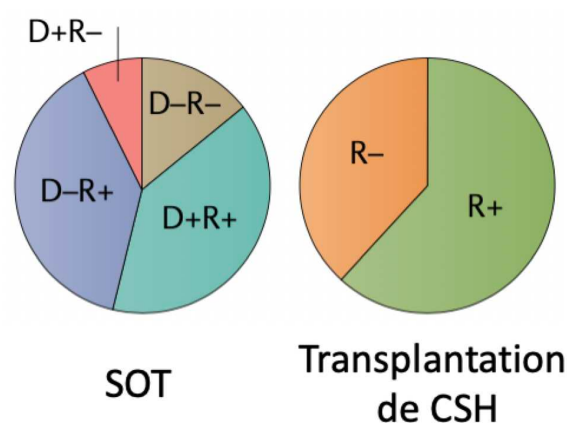


Figure 8 : Prévalence des Ac IgG anti-HCMV pour la SOT et la transplantation de CSH (D'après Griffiths & Reeves, 2021).

1.3. Manifestations cliniques

Le HCMV continue d'avoir un impact sur la survie du greffon et des patients. En plus des effets directement associés au HCMV, l'infection à HCMV est associée à des effets indirects généraux et spécifiques de l'organe transplanté.

1.3.1. Les effets directs

Les manifestations cliniques suite à la réplication, dissémination et invasion par le HCMV des organes spécifiques sont considérées comme les effets « directs » du HCMV (Ramanan & Razonable, 2013) (**Figure 9**). Plus précisément, la maladie à HCMV correspond à la présence d'une infection (charge virale détectable suite à la réplication active dans le sang = virémie) donnant lieu à des symptômes et signes cliniques chez le patient (Razonable & Humar, 2019).

La maladie à HCMV peut se distinguer en 2 types : le syndrome à HCMV et la maladie à HCMV avec invasion tissulaire ou maladie des organes cibles.

Le syndrome à HCMV se caractérise par la présence d'au moins 2 de ces symptômes (Ljungman et al., 2017) :

- Fièvre $\geq 38^{\circ}\text{C}$ pendant au moins 2 jours.
- Malaise ou fatigue
- Leucopénie ou neutropénie sur 2 mesures distinctes à au moins 24h d'intervalle
- Présence de 5% ou plus de lymphocytes atypiques
- Thrombocytopénie
- Élévation des aminotransférases hépatiques (alanine aminotransférase ou aspartate aminotransférase) à 2 fois la limite supérieure à la normale (uniquement chez les non-greffés du foie).

La maladie à HCMV avec invasion tissulaire ou maladie des organes cibles se caractérise par une atteinte spécifique des organes (pneumonie, maladie gastro-intestinale, hépatite, rétinite, encéphalite, néphrite, myocardite, pancréatite, ...) (Ljungman et al., 2017).

1.3.2. Les effets indirects

Quand les effets du HCMV ne correspondent pas à une maladie invasive des tissus ou au syndrome à HCMV, on parle d'effets indirects. Les effets indirects sont classifiables en 2 sous-groupes : les effets spécifiques à l'allogreffe ou les effets généraux (**Figure 9**).

Les effets indirects spécifiques à la transplantation comprennent la perte du greffon (Arthurs et al., 2008; Dzabic et al., 2011), la néphropathie chronique (rein) (Arthurs et al., 2008; Kliem et al., 2008; Witzke et al., 2018), la thrombose de l'artère hépatique (foie) (Madalosso et al., 1998; Gunsar, 2003; Silva et al., 2006), le syndrome de bronchiolite oblitérante/ Bronchiolitis Obliterans Syndrome (BOS; poumon) (Snyder et al., 2010; Paraskeva et al., 2011; Stern et al., 2014; Hakimi et al., 2017) ou encore la vasculopathie coronarienne (cœur) (Potena et al., 2009; Stern et al., 2014).

Le HCMV est capable de s'adapter, de moduler mais aussi d'échapper au système immunitaire. On le retrouve associé à des complications infectieuses importantes telles que les infections opportunistes : les infections bactériennes « bactériémie » (Munoz-Price et al., 2004) et les infections fongiques invasives (George et al., 1997). Le HCMV a été retrouvé également associé à un risque accru d'infections virales comme dans le cas des désordres lymphoprolifératifs post-transplantation médiée par le virus de l'Epstein-Barr/ Epstein-Barr virus (EBV) (Walker et al., 1995) mais aussi dans l'apparition d'un nouveau diabète post-transplantation, le diabète *mellitus* (Van Laecke et al., 2010; Yoo et al., 2019). De plus, un lien entre le HCMV et les risques cardiovasculaires (Smieja et al., 2003; Courivaud et al., 2013), le rejet aigu de l'allogreffe (Linares et al., 2011; Paraskeva et al., 2011) et la mortalité du receveur après transplantation (Arthurs et al., 2008; Beam et al., 2016) a pu être montré.

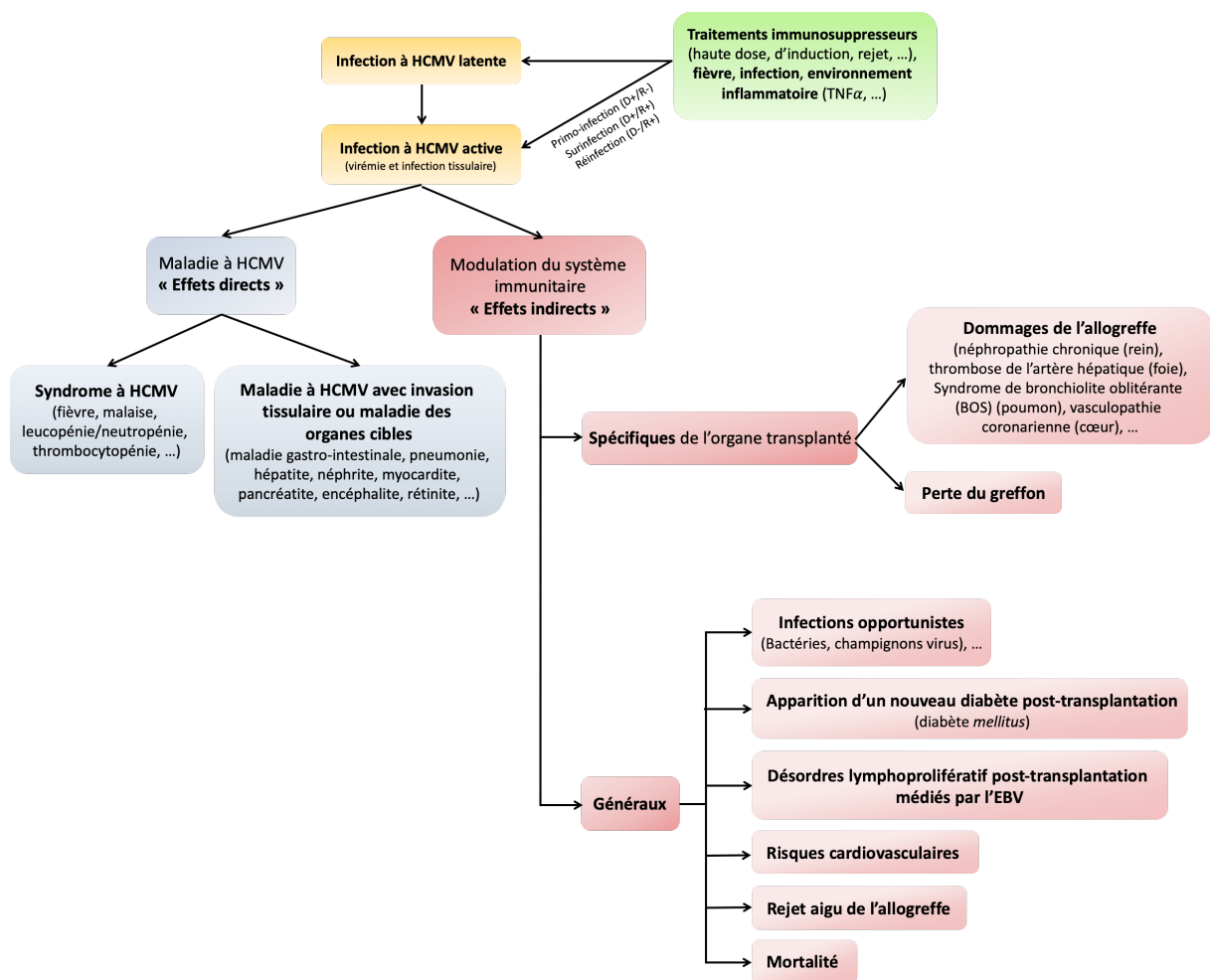


Figure 9 : Conséquences cliniques de l'infection à HCMV dans le contexte d'une SOT.

L'infection à HCMV a des effets directs et indirects sur l'hôte. Du côté des effets directs, la maladie à HCMV se distingue en syndrome à HCMV ou en maladie à HCMV envahissant les tissus (ou maladie des organes cibles). Du côté des effets indirects, ils peuvent être spécifiques du type d'organe transplanté ou généraux.

II. Infection à HCMV et transplantation pulmonaire

Le HCMV est le pathogène le plus fréquent à l'origine d'infections après une transplantation pulmonaire (Zamora, 2004; Kayawake et al., 2022). Ses effets sur la morbidité et la mortalité peuvent être divisés en effets directs, l'infection causant des lésions tissulaires et des manifestations cliniques (maladie à CMV, pneumonie), et en effets indirects entraînant une dysfonction à long terme du greffon pulmonaire. De nombreuses études suggèrent que les effets indirects du HCMV pourraient être au moins aussi importants que ses effets directs. Par l'intermédiaire de mécanismes favorisant l'alloreconnaissance, le HCMV a été associé avec le développement du rejet aigu et chronique (Duncan et al., 1992). Le HCMV augmente les coûts associés aux greffes d'organes solides de 40 à 50 % (McCarthy et al., 1993; Kim et al., 2000). Ces observations ont suscité diverses stratégies de prévention, de diagnostic précoce

et de traitement de l'infection à HCMV. Bien qu'il existe un consensus général sur le fait que les D+/R- sont les plus à risque de maladie grave et nécessitent une prophylaxie, malgré plus de deux décennies d'expériences en matière de transplantation pulmonaire et de disponibilité du ganciclovir (GCV), la prise en charge du receveur séropositif pour le HCMV reste à améliorer.

2.1. Risque d'infection et de maladie à HCMV chez les receveurs de greffe pulmonaire

Comme montré précédemment, l'incidence de l'infection et de la maladie à HCMV après une transplantation pulmonaire dans l'ère post-GCV varie de 40 à 75 % (**Tableau 4**) (Roman et al., 2014; Azevedo et al., 2015). L'immunité innée de l'hôte, le type d'organe transplanté (poumon ou cœur-poumon) avec sa charge virale, la co-infection virale et l'état d'immunosuppression affectent le risque de développer une infection à HCMV. Le groupe Papworth a montré que les receveurs cœur-poumon D+/R- pour le HCMV sont les plus à risque de développer une maladie grave, parfois mortelle (Wreghitt, 1989). L'une des raisons est l'absence chez les receveurs R- de réponses mémoires spécifiques au HCMV capables de contrôler rapidement la réplication virale. De plus, la transplantation pulmonaire implique le transfert de grandes quantités de tissu lymphatique abritant de plus grandes quantités de CMV latent que d'autres organes, augmentant théoriquement le risque et la gravité de l'infection à HCMV (Zamora, 2004). Comme expliqué précédemment, les traitements immunosuppresseurs jouent également un rôle, l'utilisation d'agents déplétant lymphocytaires est associée avec une augmentation du risque de développement de maladie à HCMV (Ramanan & Razonable, 2013) alors que l'utilisation de traitements mTOR est associée à un risque plus faible (Brennan et al., 2011; Radtke et al., 2016). Le HCMV est doté d'effets immunomodulateurs qui prédisposent les patients à des infections opportunistes notamment les infections fongiques (Munting & Manuel, 2021).

2.2. HCMV et dysfonction du greffon pulmonaire

Il existe une relation bidirectionnelle entre le HCMV et la dysfonction du greffon (Tolkoff-Rubin et al., 2001). Les cytokines, les chimiokines et les facteurs de croissance sont induits à la fois en réponse à l'infection et au cours de la réaction immunitaire impliquée dans

le rejet, entraînant l'activation de l'endothélium vasculaire et des cellules inflammatoires (Zamora, 2004). La cytokine pro-inflammatoire TNF (Facteur de nécrose tumorale/ Tumor necrosis factor α) est un acteur clé dans la réactivation du HCMV à partir de la latence (Zamora, 2004). L'activation du facteur de transcription NF κ B et de la protéine kinase C induits par le TNF conduit à l'expression des protéines IE du HCMV déclenchant ainsi le début de la réplication virale (Zamora, 2004). Le fait que la réactivation du HCMV se produise en réponse au rejet aigu n'est pas étonnant du fait que le TNF soit libéré au cours des épisodes de rejet de greffon (Zamora, 2004). De plus, une augmentation de l'immunosuppression pour traiter le rejet peut amplifier la réplication virale (Zamora, 2004). L'infection à HCMV de l'endothélium vasculaire et des cellules musculaires lisses du greffon pulmonaire joue probablement un rôle important dans la pathogenèse des lésions vasculaires observées dans le rejet aigu et chronique (Zamora, 2004). En effet, les molécules d'adhésion endothéliales telles que VCAM, ICAM, LFA-1 et VLA-4 sont régulées à la hausse par le HCMV entraînant l'augmentation du recrutement de cellules inflammatoires dans le greffon (Zamora, 2004). Le HCMV induit également des anticorps anti-cellules endothéliales, qui peuvent participer directement au développement du rejet chronique en induisant des lésions vasculaires (Zamora, 2004). La prophylaxie antivirale avec le Valganciclovir (VGCV) reste la stratégie préventive chez les patients receveurs d'une transplantation pulmonaire/ lung transplant patients (LTR) (Munting & Manuel, 2021)

Chez les receveurs d'une greffe pulmonaire, plusieurs études ont montré l'association entre le HCMV et le rejet chronique, la dysfonction chronique du greffon pulmonaire/ Chronic Lung Allograft Dysfunction (CLAD) et au BOS, le principal facteur limitant de la survie à long terme après une transplantation pulmonaire (Snyder et al., 2010; Paraskeva et al., 2011; Stern et al., 2014; Hakimi et al., 2017; Bennett et al., 2022). Alors que la pneumonie à HCMV était une complication importante dans les premières années de la transplantation pulmonaire, dorénavant son incidence est relativement faible (<10%) (Munting & Manuel, 2021).

L'étude de Bennett *et al.*, publiée en 2022, confirme l'association entre le HCMV et le rejet chronique, et trouve une association significative entre l'infection à CMV et le développement précoce d'un dysfonctionnement chronique du greffon (Bennett et al., 2022). Les courbes de survie sans CLAD ont montré que (1) les patients ayant eu au moins un épisode d'infection à CMV avaient des courbes de survie sans CLAD plus courtes ; (2) les patients qui ont eu un ou

deux épisodes d'infection à CMV ont eu des temps de survie sans CLAD similaires, mais plus courts que ceux des patients qui n'ont eu aucun épisode et plus longs que ceux des patients qui ont eu trois épisodes ou plus d'infection à CMV, qui ont montré la pire survie. Étant donné que le BOS est généralement progressif, les stratégies de prévention du BOS sont primordiales pour contrôler cette complication de la transplantation pulmonaire. La prévention et le traitement des infections à HCMV peuvent donc être des stratégies importantes pour limiter le développement du BOS.

III. Méthodes de mise en évidence et de suivi de l'infection

Parmi les nombreuses méthodes utilisées en laboratoire (culture, biopsie, sérologie, tests antigéniques ou tests moléculaires) pour détecter la présence du virus ou des protéines virales (antigènes (Ag)) ou d'acides nucléiques dans le sang (**Tableau 5**) seules certaines sont utilisées en routine pour le diagnostic.

3.1. La sérologie

En pré-greffe, la sérologie est utile de manière à stratifier les patients à risque, sachant que le sous-groupe le plus à risque en SOT reste les D+/R- (Ramanan & Razonable, 2013). A contrario, après transplantation la valeur de la sérologie est limitée voir non recommandée pour le diagnostic de la maladie et de l'infection à HCMV (Razonable & Humar, 2019). Cette méthode utilise la détection des Ac anti-HCMV Immunoglobuline M (IgM) et IgG dans le sérum. Les IgM apparaissant en premier et pouvant réapparaître suite à une infection par d'autres souches virales, ces Ac sont peu spécifiques (Azevedo et al., 2015; Kotton et al., 2018). Les IgG quant à elles apparaissent quelques semaines après l'infection et persistent à vie permettant l'étude de l'infection « latente » (Azevedo et al., 2015), ce sont ces Ac qui sont les plus utilisés dans des tests de haute sensibilité pour réaliser le screening des donneurs et receveurs après transplantation et le suivi après transplantation (Kotton et al., 2018) (**Tableau 5**).

3.2. Les tests moléculaires

Le test d'amplification par PCR (Polymerase Chain Reaction) des acides nucléiques quantitatif (ADN viral) est la méthode privilégiée pour le diagnostic de l'infection à HCMV, pour guider sur le choix des stratégies préventives et pour réaliser la surveillance de la réponse au traitement pour les patients transplantés (Ramanan & Razonable, 2013; Kotton et al., 2018). La PCR permet également de faire la différence entre une réplication virale (caractérisée par des charges virales élevées) du virus latent (caractérisé par des faibles valeurs de charges virales) (Razonable & Hayden, 2013). De plus, plus les charges virales sont élevées plus le risque de développement de la maladie à HCMV est accru (Emery et al., 2000; Humar et al., 1999). La PCR peut être réalisée sur le sang total, le plasma, le liquide céphalo-rachidien (LCR) ou encore sur le lavage broncho-alvéolaire (LBA) (Ramanan & Razonable, 2013; Kotton et al., 2018), sachant que les charges virales sont plus élevées dans le sang total que dans le plasma (Razonable et al., 2002 (a); Lisboa et al., 2011; Dioverti et al., 2017). Les valeurs de ce test sont exprimées en nombre de copies ou en UI/mL (Azevedo et al., 2015).

Néanmoins, malgré le fait que cette technique soit sensible et permet une obtention rapide des résultats (en 24h à 48h), elle manque de standardisation entre les laboratoires (réactifs de détection commerciaux, étalonnage, méthodes d'extractions des acides nucléiques utilisées, ...) (Ramanan & Razonable, 2013). Il existe également une limite dans le cas de la rétinite à HCMV ou de maladies gastro-intestinales, par exemple, où la sensibilité du test PCR pour le HCMV dans le sang s'est avérée plus faible chez les patients R+ atteints d'une maladie gastro-intestinale à HCMV (Eid et al., 2010; Durand et al., 2013) (**Tableau 5**).

3.3. L'antigénémie

La méthode de l'antigénémie correspond à un test semi-quantitatif basé sur la détection de l'Ag pp65 (codé par UL83) dans les leucocytes infectés du sang périphérique (en particulier les neutrophiles) (Ramanan & Razonable, 2013; Azevedo et al., 2015; Razonable & Humar, 2019). L'antigénémie s'effectue sur des prélèvements de sang avec un anticoagulant et les résultats sont exprimés en $\frac{\text{nombre de polynucléaires infectés}}{\text{nombre total de polynucléaires comptés}}$ (Razonable & Humar, 2019).

Cette méthode présente des avantages comme sa relative simplicité de mise en oeuvre et un délai d'obtention des résultats courts (environ 6h) (Azevedo et al., 2015). Toutefois, ce

test pourrait être remplacé par les tests moléculaires (Razonable & Hayden, 2013), entre autres du fait de ses inconvénients tels que le délai court de traitement de l'échantillon sanguin une fois prélevé (ne devant pas dépasser 6h pour la viabilité des neutrophiles), du manque de standardisation entre laboratoires et de son utilité limitée pour les patients transplantés leucopéniques (nombre de leucocytes nécessaires pour réaliser le test devant être supérieur à 200/mm³) (Ramanan & Razonable, 2013; Razonable & Hayden, 2013; Azevedo et al., 2015) (**Tableau 5**).

3.4. L'histopathologie

L'histopathologie consiste en l'analyse de biopsies de tissus, cette technique reste une référence pour le diagnostic définitif de la maladie à HCMV envahissant les tissus (Ramanan & Razonable, 2013; Azevedo et al., 2015; Razonable & Humar, 2019). L'hypertrophie cellulaire et nucléaire correspondant à des cellules cytomégaliennes et la présence d'inclusions cytomégaliennes amphophiles à basophiles correspondant à des agrégats de protéines nucléaires du HCMV produites au moment de la réplication virale, sont caractéristiques d'une infection à HCMV dans l'échantillon de tissu (Razonable & Hayden, 2013). De plus, ces observations peuvent être confirmées par immunohistochimie ou par hybridation de l'ADN *in situ* (Azevedo et al., 2015). Cependant, cette technique reste très invasive et non réalisable dans certains cas comme lorsqu'un patient atteint d'une maladie gastro-intestinale à HCMV possède des charges virales élevées de HCMV (Ramanan & Razonable, 2013). L'histopathologie est maintenant rarement utilisée. Elle reste recommandée dans le cas d'une suspicion de rejet d'allogreffe, de la suspicion d'une co-infection avec d'autres pathogènes ou encore dans le cas d'une maladie à HCMV dite compartimentée et que le test PCR reste négatif (Ramanan & Razonable, 2013; Razonable & Humar, 2019) (**Tableau 5**).

3.5. La culture virale

La culture virale est un test hautement spécifique de l'infection à HCMV mais elle s'avère peu sensible et présente un long délai d'exécution, elle est donc peu adaptée pour le diagnostic (Razonable et al., 2002 (b) ; Razonable et al., 2013; Razonable & Humar, 2019). De ce fait, cette technique est de plus en plus remplacée par les tests moléculaires et l'antigénémie (Ramanan & Razonable, 2013).

La culture virale peut être réalisée de différentes manières :

- Le test conventionnel de plaque, qui dure entre 2 et 21 jours en fonction de la charge virale des patients SOT (Razonable & Hayden, 2013).
- Culture par centrifugation en flasque (Razonable et al., 2002 (b)).

Elle peut être effectuée sur divers échantillons cliniques tels que le sang, le LBA, le LCR, la salive, les urines et les selles (Razonable & Hayden, 2013). Néanmoins, la salive, l'urine et les selles ne sont pas recommandées sauf en cas de patients séronégatifs car la sécrétion virale est courante chez les patients greffés (Razonable et al., 2013; Razonable & Humar, 2019) (**Tableau 5**).

3.6. Les tests de surveillance de l'immunité cellulaire

Les tests de surveillance de l'immunité cellulaire consistent en l'étude des réponses lymphocytaires T spécifiques du HCMV. La présence de ces réponses peut prédire les individus les plus à risque de développer la maladie à HCMV post-transplantation mais également, comme les autres tests cités précédemment, ils aident à l'orientation des stratégies préventives (Kotton et al., 2018). Le principe de la grande majorité de ces tests consiste à étudier la présence d'Interféron γ (IFN γ) après stimulation par des Ag du HCMV ou des peptides chevauchants, le sang total ou les cellules mononucléaires du sang périphérique (PBMC) (Egli et al., 2012; Sester et al., 2016). Toutefois, d'autres tests étudient l'Interleukine (IL)-2, le TNF α , le CD107a, le PD1 (Programmed cell death protein 1) ou encore le CD154 (Kotton et al., 2018). Plusieurs tests sont déjà disponibles :

- Le test de relargage de l'IFN γ comme le test QuantiFERON-CMV qui est un kit commercialisé en Europe, étudiant ce relargage sur la base d'un test Enzyme-linked-immuno-sorbent-assay (ELISA) (Kotton et al., 2018). Il est prédictif à la fois de la virémie (Cantisán et al., 2013) et de la maladie à HCMV (Kumar et al., 2009; Manuel et al., 2013). Cependant, le QuantiFERON-CMV permet de ne détecter que les lymphocytes T (LT) CD8+ stimulés au préalable avec des peptides et est de plus faible sensibilité chez les patients lymphopéniques (dû au nombre de cellules nécessaires à la réalisation du test) (Kotton et al., 2018). De plus, le « QuantiFERON » n'est accessible qu'à quelques équipes et permet surtout d'évaluer le niveau de réponses dirigées contre le HCMV.

- Le test Enzyme-linked immunospot (ELISpot) réalise la quantification à la fois des LT CD4+ et des LT CD8+ produisant de l'IFN γ suite à leur stimulation par des peptides spécifiques du HCMV ou par des Ag (provenant de lysat) (Kotton et al., 2018). Il est prédictif de la virémie et de la maladie à HCMV tout comme le QuantiFERON-CMV (Abate et al., 2010, 2012; Costa et al., 2011). Néanmoins, il ne permet pas de faire la distinction entre les LT CD4+ et les LT CD8+ (Kotton et al., 2018).
- Le marquage intracellulaire des cytokines/ Intracellular cytokines staining (ICS) étudie par exemple l'IFN γ après stimulation peptidique ou par des lysats de HCMV, les PBMC isolés ou non du sang total (Kotton et al., 2018). Cette technique rapide permet de faire une caractérisation quantitative et qualitative en plus de l'identification des LT CD8+ et des LT CD4+ (Kotton et al., 2018). Elle permet tout comme les 2 autres tests ci-dessus de prédire la virémie et la maladie à HCMV des patients (Sester et al., 2001; Sester et al., 2005; Gerna et al., 2006). Cependant, l'ICS nécessite l'utilisation d'un appareil coûteux: le cytomètre de flux.
- L'utilisation de complexes multimères (pentamère ou tétramère) complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) de classe I (CMH-I)-peptides permet de marquer les LT CD8+ spécifiques du HCMV plus précisément du peptide utilisé dans ce complexe (Kotton et al., 2018). Ce test multimère permet de prédire uniquement la virémie s'il est utilisé en combinaison avec des marqueurs phénotypiques ou fonctionnels tels que PD1 (La Rosa et al., 2008; Sund et al., 2009). Cependant, de même que pour l'ICS, la méthode nécessite l'utilisation d'un appareil coûteux (le cytomètre de flux) et aussi nécessite la connaissance du typage HLA des patients (Kotton et al., 2018) (**Tableau 5**).

Tableau 5 : Méthodes de diagnostic/détection du cytomégalovirus en laboratoire pour les patients SOT (D'après Razonable & Hayden, 2013; Kotton et al., 2018).

Méthodes	Principes	Type d'échantillon	Résultats / Utilités cliniques	Avantages	Inconvénients / Limites
Sérologie	Détection Ac IgG, IgM anti-HCMV	Sérum	IgG HCMV pour infection latente IgM HCMV pour primo-infection ou réactivation récente	Utile dans le screening / stratifications des donneurs et receveurs (D+/R+; D+/R-; D-/R+; D-/R-) et dans le suivi des patients SOT	Test non recommandé pour le diagnostic de la maladie à HCMV
Tests moléculaires	Quantification des acides nucléiques (PCR) (ADN viral) Technique de référence	Sang total, Plasma, LCR, LBA	Résultats rapportés en UI/mL ou en nombre de copies Forte charge virale indicatif de la réplication Faible charge virale indicative de la détection du virus latent	Hautement sensible, très rapide (24-48h) Permet le diagnostic de l'infection à HCMV, de guider dans le choix des stratégies de prévention et d'aider à la surveillance de la réponse aux traitements des patients SOT	Quand le test est trop sensible cela peut entraîner le risque de détection du virus latent Manque de standardisation Perte de sensibilité dans le cas d'une compartimentation du HCMV
Antigénémie	Test semi-quantitatif de détection de l'Ag pp65	Leucocytes du sang périphérique, polynucléaires neutrophiles	Calcul du nombre du $\frac{\text{nombre de polynucléaires infectés}}{\text{nombre total de polynucléaire comptés}}$	Test rapide, peu coûteux, délai d'obtention des résultats rapide (6h)	Nécessité de traiter l'échantillon en moins de 6h Utilité limitée pour les patients SOT leucopéniques Manque de standardisation Pas utilisée pour le diagnostic.
Histologie	Détection in situ de cellules infectées par le HCMV	Biopsie de tissus	Confirmation possible par immunohistochimie ou hybridation de l'ADN <i>in situ</i>	Permet le diagnostic définitif de la maladie à HCMV envahissant les tissus. Recommandée en cas de suspicion de rejet d'allogreffe ou de co-infection ou dans le cas d'une maladie à HCMV compartimentée et résultat PCR restant négatif	Technique très invasive et non réalisable dans certains cas cliniques (patients avec maladie gastro-intestinale et charges élevées de HCMV).
Culture virale	Culture sur plaque ou en tube	Sang, LBA, LCR, urine, salive, selles	Résultat allant de 48h ou entre 2-21 jours en fonction du test ou de la charge virale des patients SOT.	Hautement spécifique pour l'infection à HCMV	Faible sensibilité et long délai d'exécution Pas utilisée pour le diagnostic.
Tests de surveillance de l'immunité cellulaire anti-HCMV	Test de relargage de l'IFN γ (QuantIFERON-CMV)	Sang total, PBMC	Résultats en 30-40h, approuvé en Europe Permet la prédiction de la virémie et de la maladie à HCMV	Applicable sur de faibles volume de sang total (3 mL) Test simple à utiliser Permet la prédiction de la virémie et de la maladie à HCMV	Utile pour les réponses CD8 ⁺ Faible sensibilité chez les patients lymphopéniques Pas utilisée pour le diagnostic.
	ELISpot	PBMC	Résultats en 30-40h, possibilité de congeler les cellules	Identification des cellules CD4 ⁺ et CD8 ⁺ Pas de nécessité de connaître le typage HLA Permet la prédiction de la virémie et de la maladie à HCMV	Pas de distinction entre les réponses CD8 ⁺ et CD4 ⁺ Manque de standardisation Pas utilisé pour le diagnostic.
	Marquage des cytokines intracellulaires	Sang, PBMC	Résultats en 8h, possibilité de congeler les cellules	Applicable sur de faibles volumes de sang total (1 mL) ou un temps d'incubation court sur les PBMC Permet de faire une caractérisation quantitative et qualitative Identification des cellules CD4 ⁺ et CD8 ⁺ Pas de nécessité de connaître le typage HLA Permet la prédiction de la virémie et de la maladie à HCMV	Besoin d'un cytomètre de flux Manque de standardisation Pas utilisé pour le diagnostic.
	Marquage avec des multimères CMH-peptides	Sang, PBMC	Résultats en 1-2h	Applicable sur de faibles volumes de sang total (0,5 - 1 mL) ou PBMC Test rapide Prédicatif de la virémie uniquement en plus de marqueurs phénotypiques ou fonctionnels	Utile que pour les réponses CD8 ⁺ Besoin du HLA-peptide spécifique Besoin d'un cytomètre de flux Manque de standardisation Non prédictif de la maladie à HCMV Pas utilisé pour le diagnostic.

IV. Prévention et traitement du HCMV

4.1. Stratégies préventives : la prophylaxie antivirale universelle et le traitement préemptif

Les stratégies de prévention du HCMV sont primordiales et de nombreux progrès ont été réalisés. Ces progrès ont permis de diminuer la mortalité liée au HCMV, le risque d'infection, le développement de maladie à HCMV (maladie avec invasion des tissus) et les effets « indirects » chez les patients SOT (Ramanan & Razonable, 2013; Kotton et al., 2018; Razonable & Humar, 2019) (**Tableau 6**). Les 2 principales stratégies de prévention du HCMV sont la prophylaxie antivirale universelle et le traitement préemptif.

La prophylaxie universelle consiste en l'administration de médicaments antiviraux à tous les patients ou à un sous-ensemble de patients SOT à risque, peu de temps après la transplantation (dans les 10 jours suivant la transplantation) jusqu'à une période définie de 3 à 6 mois pouvant aller au-delà de 6 mois dans le cas d'une transplantation pulmonaire (Ramanan & Razonable, 2013; Kotton et al., 2018; Razonable & Humar, 2019). De plus, la durée de cette stratégie dépend à la fois du type de transplantation et du statut sérologique du donneur et du receveur (D+/R- ; D+/R+ ; D-/R+ ; D-/R-) (Ramanan & Razonable, 2013). La prophylaxie universelle possède de nombreux avantages tels qu'une logistique simple (facilité d'administration des médicaments antiviraux), la protection contre les infections par d'autres herpes virus (virus de l'herpès simplex/ herpes simplex virus (HSV), VZV, ...) et contre les infections opportunistes mais est aussi associée à une diminution du rejet (Ramanan & Razonable, 2013; Kotton et al., 2018). En revanche, cette stratégie de prévention possède comme principaux inconvénients, d'induire une toxicité médicamenteuse et la maladie à HCMV retardée (maladie survenant 3 à 6 mois après la fin de la prophylaxie chez les D+/R-) (Ramanan & Razonable, 2013; Kotton et al., 2018) (**Tableau 6**).

Il existe des facteurs de risque prédisposant à l'apparition de la maladie à HCMV retardée : appartenir au sous-groupe D+/R-, des niveaux élevés d'immunosuppression, des cycles plus courts de prophylaxie universelle, certains types de transplantation d'organe comme le poumon ou encore le rejet d'allogreffe (Razonable et al., 2001; Humar et al., 2010; Schoeppler et al., 2013). Dans le but d'améliorer cela, une étude menée sur 318 patients transplantés rénaux/ kidney transplant patients (KTR) D+/R- a montré qu'une prolongation du traitement passant de 100 jours à 200 jours induisait une diminution de l'incidence de la maladie à HCMV

(16.1% avec 200 jours versus 36.8% avec 100 jours de VGCV) (Humar et al., 2010). Une autre étude a réalisé, sur les LTR à haut risque, une comparaison entre 3 mois et 12 mois de traitement prophylactique au VGCV sur l'incidence de la maladie à HCMV retardée et la virémie chez ces patients. Cette étude a mis en évidence que les patients avec 12 mois de VGCV avait moins de maladie à HCMV et des taux de virémie plus faibles (Palmer, 2010).

A contrario, le traitement préemptif implique l'administration de médicaments antiviraux uniquement aux patients asymptomatiques chez lesquels des signes de réplication virale précoce ont été détectés (Ramanan & Razonable, 2013; Kotton et al., 2018; Razonable & Humar, 2019). Pour cela, une surveillance du HCMV à partir de 3 mois post-transplantation en général, est réalisée à intervalles réguliers, (généralement 1 fois/semaine), dans le sang par des tests comme la PCR ou encore l'antigénémie pp65 et pendant une période de temps prédéfinie (Ramanan & Razonable, 2013; Kotton et al., 2018; Razonable & Humar, 2019). La mise sous traitement des patients asymptomatiques dès un test positif a pour but d'empêcher la progression de la maladie à HCMV (Ramanan & Razonable, 2013; Kotton et al., 2018; Razonable & Humar, 2019). De plus, le traitement dure généralement jusqu'à la clairance du virus (plus de détection ou charge virale en dessous du seuil de positivité) (Ramanan & Razonable, 2013). Le traitement préemptif possède de nombreux avantages tels qu'une incidence faible de maladie à HCMV retardée, un coût et une toxicité faible des médicaments (Ramanan & Razonable, 2013; Kotton et al., 2018). Néanmoins, malgré le fait que cette thérapie entraîne de faibles coûts médicamenteux ce n'est pas le cas dans le suivi médical, de plus, cette stratégie peut être difficile à coordonner dans les centres et les laboratoires (organisation des visites, obtention rapide des résultats et mise en place des traitements dès un test positif) (Ramanan & Razonable, 2013; Kotton et al., 2018). La thérapie préemptive présente aussi un inconvénient majeur, elle ne protège pas contre les infections par d'autres herpes virus. Les patients sous cette thérapie doivent prendre en plus de l'acyclovir pour prévenir de ces infections (Ramanan & Razonable, 2013) (**Tableau 6**).

Plusieurs études ont comparé les 2 approches préventives et ont montré qu'elles n'étaient pas différentes significativement dans la prévention de la maladie à HCMV même chez les patients D+/R-, toutefois la survie à long-terme du greffon est plus importante avec la prophylaxie universelle (Kliem et al., 2008; Reischig et al., 2007).

Tableau 6 : Comparaison de la prophylaxie universelle versus la thérapie préemptive (D'après Kotton et al., 2018).

Effets	Prophylaxie universelle	Thérapie préemptive
Détection précoce de la charge virale (ADNémie) / infection	Rare	Fréquente
Prévention de la maladie à HCMV	Bonne efficacité	
HCMV retardé (Infection / Maladie)	Fréquente	Rare
Emergence de résistance	Peu fréquente	Peu fréquente
Prévention d'infection aux autres herpes virus	Prévient infection par HSV et VZV	Non
Protection contre les infections opportunistes	Peut prévenir	?
Prévention du rejet	Peut prévenir	?
Survie de la greffe	Amélioration de la survie	
Mortalité du patient	Diminution de la mortalité	
Logistique	Relativement facile	Plus difficile que la prophylaxie
Sécurité/Tolérance	Effets secondaires/ toxicité	Peu de toxicité
Coûts		
- Des traitements	Oui	Non
- Du suivi médical	Non	Oui

4.2. Traitement du HCMV

Les médicaments utilisés en prévention ou pour lutter contre le HCMV en première intention sont le VGCV oral et le GCV intraveineux (Paya et al., 2004; Mattes et al., 2005; Åsberg et al., 2007). Il existe 2 formes de GCV : la forme orale et la forme intraveineuse. La forme orale n'est plus commercialisée (Kotton et al., 2018) en raison de sa faible biodisponibilité orale entraînant des sous-dosages thérapeutiques de la maladie à HCMV (Ramanan & Razonable, 2013). Le VGCV est aujourd'hui le médicament le plus utilisé en prophylaxie (Kotton et al., 2018). Il est préféré au GCV en raison d'une meilleure biodisponibilité ou encore un nombre de doses journalières moins important entraînant une meilleure compliance des patients à ce traitement (Paya et al., 2004). Le VGCV et le GCV ont une efficacité similaire pour traiter l'infection ou la maladie à HCMV de grade léger ou modéré chez les patients SOT (Åsberg et al., 2007, 2016). Cependant, le GCV intraveineux est recommandé dans le cas de la maladie à HCMV sévère (Razonable et al., 2013).

Le valacyclovir est utilisé à haute dose dans la prévention en prophylaxie universelle des KTR D+/R- et D+/R+ (Lowance et al., 1999; Reischig et al., 2005, 2015). Même si le valacyclovir entraîne un coût plus faible, ce traitement implique un nombre important de pilules et des effets secondaires tels que des hallucinations et des confusions (Lowance et al.,

1999; Kacer et al., 2015). Le foscarnet (FOS) et le cidofovir (CDV) sont seulement utilisés en deuxième intention en raison du risque accru de néphrotoxicité (Avery et al., 2016).

Plusieurs traitements sont en cours de développement comme le letermovir qui est un inhibiteur de la terminase virale codée par UL56, il a été approuvé comme traitement en prophylaxie universelle mais uniquement chez les patients transplantés de CSH (Chemaly et al., 2014; Marty et al., 2017). Ou encore le maribavir qui est un inhibiteur d'UL97 du HCMV, participant à l'inhibition de la maturation et de la sortie du virus (Kotton et al., 2018). Ces 2 traitements ne protègent pas contre les infections par d'autres herpes virus contrairement au brincidofovir (BCV) (Kotton et al., 2018).

Certains centres optent pour l'administration d'Ig spécifiques du HCMV en plus de la prophylaxie antivirale chez les patients transplantés cardiaques, pulmonaires ou intestinaux (Weill et al., 2003; Bonaros et al., 2007; Rea et al., 2016).

Des vaccins contre le HCMV sont en cours de développement mais aucun n'est sur le marché. Certains vaccins emploient des virus atténués ne pouvant plus se répliquer ou des particules virales non infectieuses dans le but d'induire une réponse immunitaire proche de celle générée naturellement tel que le vaccin avec le V160 de chez Merck en essais cliniques de phase I (Wang et al., 2016). Toujours dans le but d'induire une réponse immunitaire mais cette fois-ci plus restreinte, des vaccins utilisent des approches géniques ou des protéines recombinantes tels que gB/M59 en essais cliniques de phase II (Pass et al., 2009; Griffiths et al., 2011; Nelson et al., 2018).

4.3. La résistance au HCMV

Lorsque la charge virale ne diminue pas après le délai prévu de traitement antiviral, une infection réfractaire/ résistante aux médicaments est suspectée. L'infection à HCMV réfractaire se manifeste par une charge virale qui va persister ou augmenter au moins après 2 semaines à la dose appropriée de traitement antiviral. Quant à la maladie à HCMV réfractaire, elle se caractérise par une absence d'amélioration ou une non-résolution des symptômes cliniques également après 2 semaines de traitement à la dose adéquate (Chemaly et al., 2019). Quant à l'infection à HCMV résistante aux médicaments, elle se définit habituellement par la présence de mutations de gènes viraux entraînant une modification de

la sensibilité aux médicaments antiviraux (Chemaly et al., 2019). Les facteurs de risque de cette résistance aux médicaments chez les patients SOT sont le statut sérologique D+/R-, des doses sous-thérapeutiques ou prolongées de médicaments antiviraux ou une immunosuppression très forte du patient (Lurain & Chou, 2010; Fisher et al., 2017). L'incidence de la résistance, par exemple au GCV, s'élève entre 5 et 12% des patients transplantés (Hantz et al., 2010; Young et al., 2016). Toutefois, cette incidence est plus faible chez les KTR D+/R- ayant été traités au VGCV pendant 100 à 200 jours (inférieur à 2%) (Boivin et al., 2012). Des tests phénotypiques ou génotypiques sont réalisés pour confirmer la résistance et détecter les mutations spécifiques dans les gènes *UL97* (protéine kinase phosphorylant le GCV) et *UL54* (codant pour l'ADN polymérase du HCMV) (Kotton et al., 2018; Razonable & Humar, 2019). Les tests sont réalisés sur le sang (total, plasma ou leucocytes), les fluides (urine, LCR, LBA, liquide vitré) ou une biopsie (Kotton et al., 2018; Razonable & Humar, 2019). Les mutations étant plus fréquentes sur le gène *UL97* (El Chaer et al., 2016), viennent ensuite les mutations sur le gène *UL54* dont certaines mutations, en fonction de leurs positions, peuvent conférer une résistance au GCV, au FOS et au CDV (Lurain & Chou, 2010) (**Figure 10**). Cependant, le FOS reste la première ligne pour le traitement de la résistance au GCV et le CDV en dernière ligne, malgré sa néphrotoxicité (Avery et al., 2016; El Chaer et al., 2016). Le Maribavir est actuellement en essai clinique de phase II dans le traitement de la résistance chez les patients transplantés (Papanicolaou et al., 2019). Une autre alternative pour lutter contre l'infection à HCMV en cas de résistance serait de transférer des LT spécifiques du HCMV préalablement isolés et amplifiés à partir du sang périphérique (autologue ou allogénique). Un essai clinique de phase I a montré l'efficacité de cette thérapie qui améliorerait les symptômes dont la résolution et la diminution de la réactivation du HCMV et/ou de la maladie à HCMV ainsi qu'une meilleure réponse aux médicaments antiviraux (Smith et al., 2019).

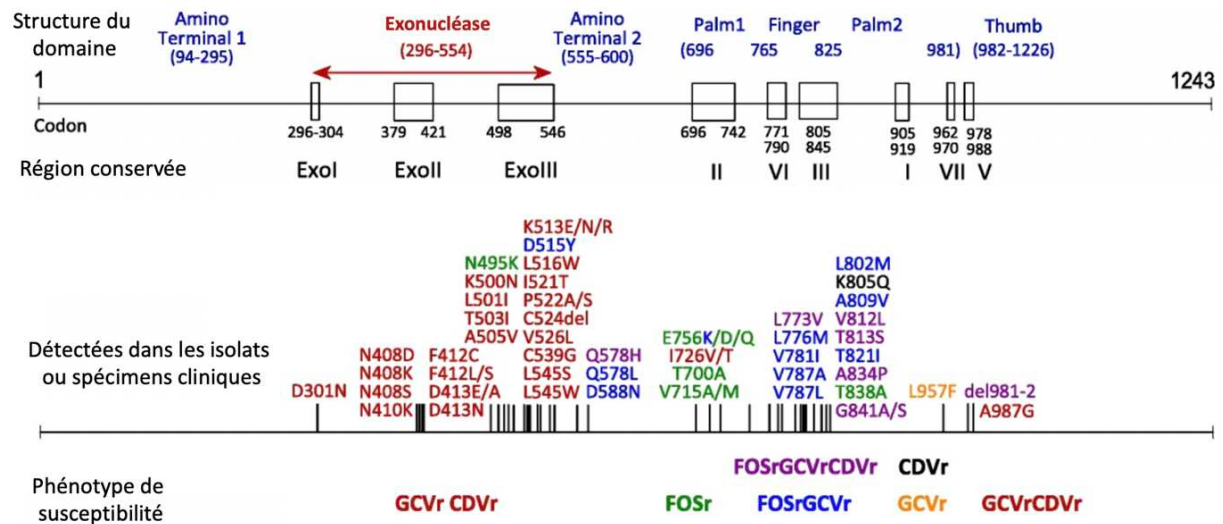


Figure 10 : Carte des mutations du gène *UL54* (ADN polymérase du HCMV) (D'après Lurain & Chou, 2010; Kotton et al., 2018).

Cette cartographie illustre les domaines structuraux et les régions conservées de la séquence en acides aminés dans la polymérase où se clusterise les mutations. Chaque couleur représente le lien entre la mutation et le médicament impliqué dans le phénotype de résistance. CDVr : Cidofovir résistant ; FOSr : Foscarnet résistant ; GCVr : Ganciclovir résistant.

Chapitre 3 : Immunité et infection à HCMV

Le HCMV étant capable de s'établir en latence et de se réactiver chez l'hôte infecté, il module ainsi le répertoire immunitaire de manière à lui échapper, laissant une empreinte durable de l'infection sur le SI des individus. De manière à comprendre l'implication des effecteurs immuns dans la lutte contre le HCMV, de nombreux modèles animaux ont été développés tels que le modèle de souris, de rats, de cobayes et de macaques rhésus. Cependant, il est estimé que moins de 50% des ORF du MCMV (CMV murin/ murine cytomegalovirus) et RCMV (CMV du rat/ rat cytomegalovirus) sont homologues à ceux du HCMV (Brocchieri et al., 2005) ce qui soulève le problème de la transposition des résultats des modèles de laboratoire à l'Homme. Chez l'Homme, les contextes pathologiques ou encore la transplantation avec le transfert adoptif de cellules lymphocytaires spécifiques du HCMV ont permis d'étudier les effecteurs immuns impliqués (NK, LT, LB, ...) dans la réponse contre le HCMV (Smith et al., 2019) (**Figure 11**).

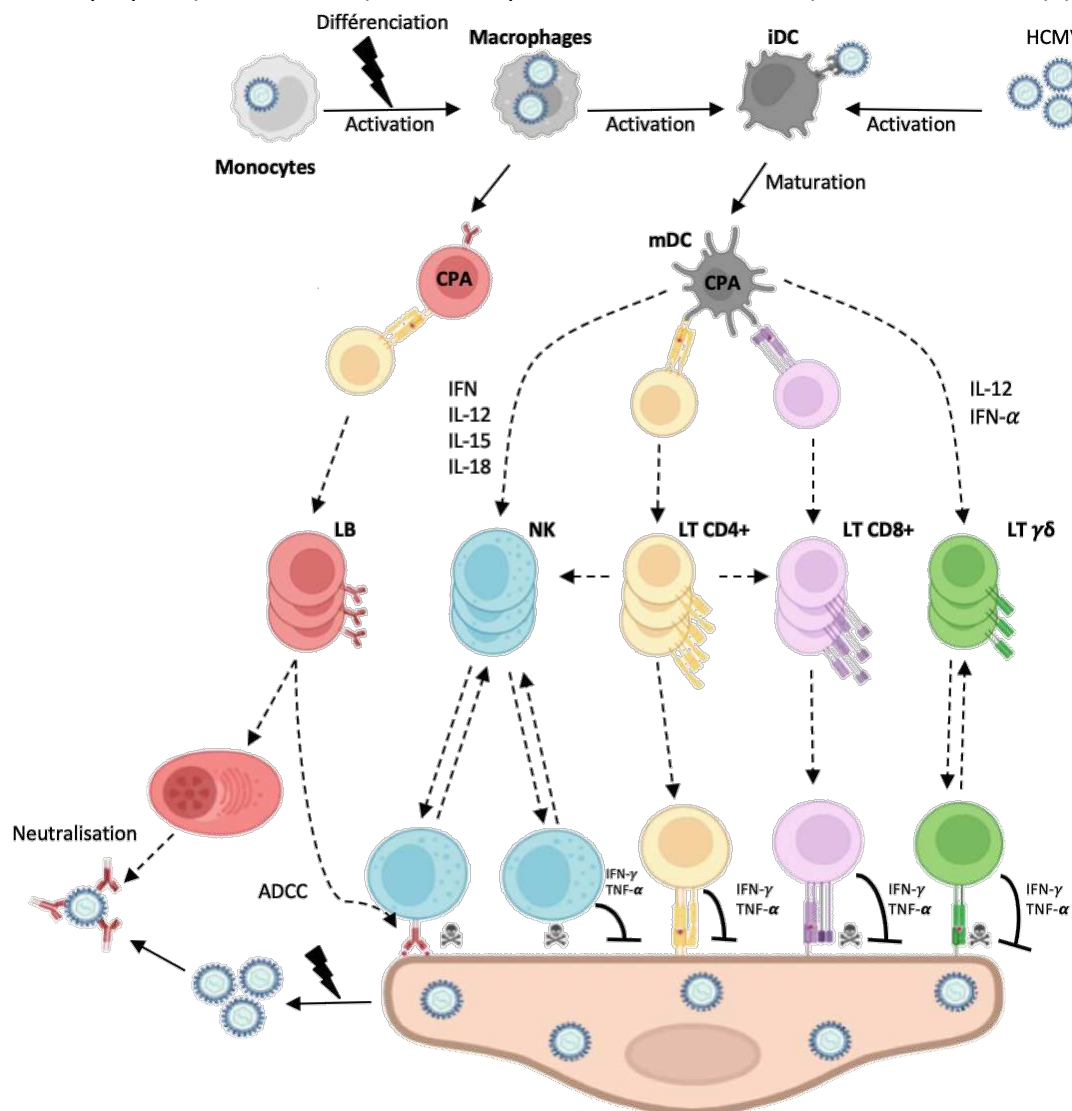


Figure 11 : Schéma général de la mise en place des effecteurs spécifiques de la réponse anti-HCMV (Inspirée de la thèse de N. Jouand, 2018 (<https://www.theses.fr/2018NANT1002>) et de Khairallah et al., 2017).

Suite à la primo-infection ou la réactivation, les macrophages et les DC activés via leur TLR (en particulier le TLR2) après la reconnaissance de PAMPs issus du HCMV, vont sécréter des cytokines pro-inflammatoires induisant l'activation des NK et LT $\gamma\delta$. Les cellules NK et les LT $\gamma\delta$ sont également stimulés par leur reconnaissance directe des cellules infectées par le virus exprimant HLA-E et/ou des ligands de stress. De plus, l'activation des iDC conduit à leur différenciation en mDC et leur migration dans les organes lymphoïdes secondaires (OLS). Quant aux LT CD8+ et aux LT CD4+ naïfs, ils sont activés lors de la présentation peptidique virale par les molécules HLA-I et HLA-II respectivement. Les LT CD4+ sont également co-activables par les Ag du HCMV présentés par les LB. Suite à l'activation de tous ces effecteurs, la phase d'expansion et de persistance à long terme des LB, NK CD94/NKG2C+, des LT TCR $\gamma\delta$ $\delta 2^-$, des LT CD4+ (TEM/TEMRA) et des LT CD8+ (TEM/TEMRA) ont lieu. Ces différents effecteurs spécifiques de la réponse anti-HCMV vont avoir différents rôles. Les LB vont se différencier en plasmocytes et sécréter des Ac anti-HCMV qui vont pouvoir soit neutraliser les particules virales en se fixant directement sur leur enveloppe virale soit augmenter la lyse des cellules infectées par les NK par l'ADCC. Les NK vont avoir également un rôle similaire à celui des autres LT cités précédemment qui est de contrôler l'infection à HCMV par leur capacité cytotoxique (via l'IFN γ et le TNF α).

ADCC : cytotoxicité à médiation cellulaire dépendante des Ac/ Antibody-dependent cell cytotoxicity ; CPA : cellule présentatrice d'Ag ; iDC : cellule dendritique immature ; mDC : cellule dendritique mature/ mature dendritic cell ; IFN γ : Interféron γ ; IL : Interleukine ; NKG2C : Natural Killer group 2 ; PAMP : Pathogen associated molecular pattern/ Motif moléculaire associé aux pathogènes ; TLR : Toll-like Receptor ; TNF α : facteur de nécrose tumorale alpha.

I. Réponses humores et cellulaires contre le HCMV

1.1. La réponse humorale anti-HCMV

La réponse humorale anti-HCMV est constituée d'Ac anti-CMV qui vont cibler et neutraliser les virions libres ou les particules virales dans le milieu extracellulaire ou étant impliquées dans le phénomène de cytotoxicité à médiation cellulaire dépendante des Ac/ antibody-dependent cell cytotoxicity (ADCC). Cette réponse a été estimée comme présente chez 48,5% des donneurs séropositifs (Xu et al., 2015). De plus, les LB peuvent reconnaître des épitopes « publics » immunodominants suggérant la formation d'un répertoire B « public » (Xu et al., 2015). La réponse des Ac neutralisants est majoritairement dirigée contre le complexe gH/gL/UL128/UL130/UL131 et il a été suggéré qu'ils neutralisent l'entrée dans les cellules épithéliales alors que les Ac gH/gL auraient un rôle plutôt dans l'inhibition de l'entrée virale (Fouts et al., 2012). A contrario les Ac dirigés contre gB auraient un rôle moindre dans la neutralisation (Fouts et al., 2012; Cui et al., 2017). En outre, les Ac anti-HCMV apparaissent entre 2 et 4 semaines après la primo-infection (Genini et al., 2011) (**Figure 12**). Cependant, le rôle du complément dans le contrôle de l'infection à HCMV est peu étudié (Carbone, 2016). Une étude menée par Sarmiento et al., a démontré l'hypocomplémentarité en C3 comme un facteur de risque d'infection à HCMV chez les patients transplantés cardiaques (Sarmiento et

al., 2014). Un autre rôle de ces Ac est d'augmenter la capacité de lyse par ADCC des NK CD94/NKG2C+ lorsqu'ils sont fixés sur les virions libres du HCMV par la voie du CD16 (Costa-Garcia et al., 2015).

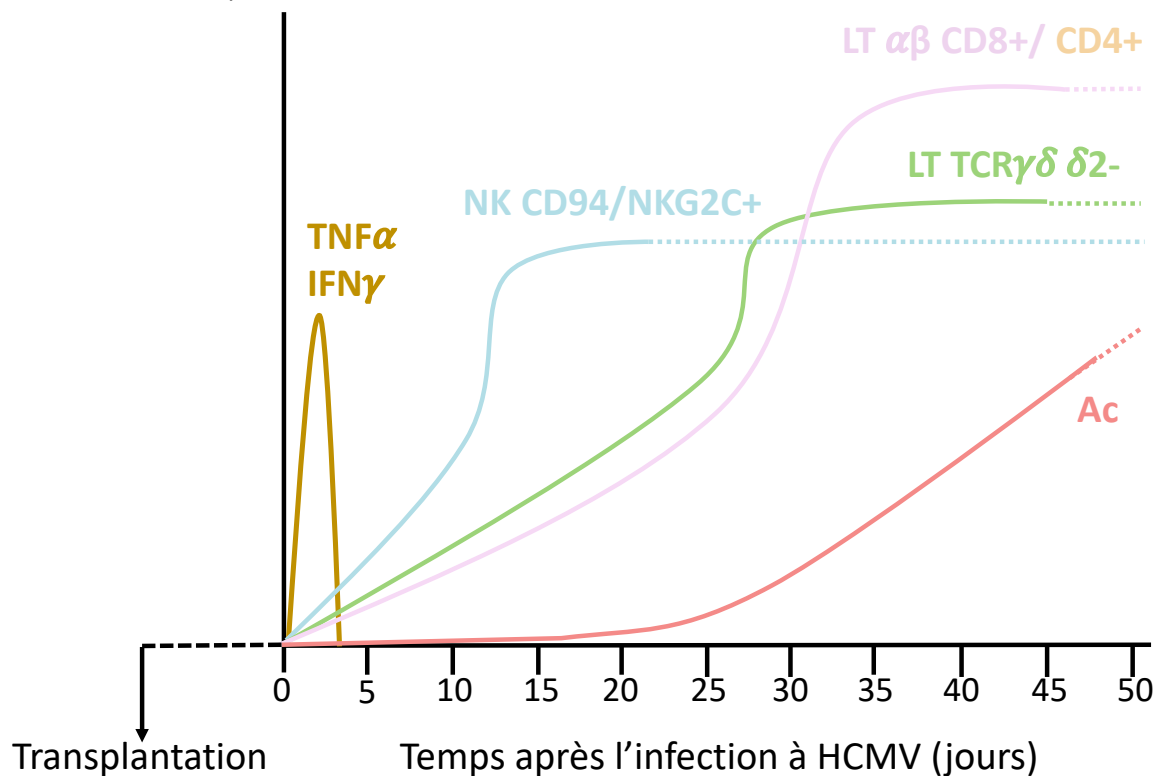


Figure 12 : Schéma de la cinétique d'apparition des différentes réponses spécifiques anti-HCMV (Adaptée de Kaminski et al., 2015).

Très tôt après la primo-infection par le HCMV, de forts taux en IFN γ et en TNF α sont détectables, suivi par la prolifération des NK CD94/NKG2C+, l'apparition des Ac anti-HCMV puis l'expansion exponentielle des populations T CD8+, T CD4+ et T TCR $\gamma\delta$ δ 2- anti-HCMV.

Ac : Anticorps ; IFN γ : Interféron γ ; NKG2C : Natural Killer group 2 ; TNF α : facteur de nécrose tumorale alpha.

1.2. Les réponses effectrices anti-HCMV

1.2.1. Les NK anti-HCMV

La réponse NK débute son activité dans les 15 jours post-infection (Kaminski et al., 2015). Sur la base de l'expression de CD56 et la non-expression de CD3, les NK du sang périphérique sont classés en 2 sous-populations : les CD56^{bright}CD16^{low} et les CD56^{dim}CD16^{high} (Smith et al., 2020). Elles sont différentes fonctionnellement, les cellules NK CD56^{bright}CD16^{low} sont des cellules productrices de cytokines et ont une forte capacité de prolifération alors que les cellules NK CD56^{dim}CD16^{high}, qui sont les plus abondantes dans le sang périphérique, sont dites cytolytiques (Smith et al., 2020). Dans un contexte normal, les cellules NK sont régulées par la balance entre des signaux inhibiteurs (récepteur de type Ig des cellules tueuses/ killer-cell

immunoglobulin-like receptor (KIR), NKG2A, ...) et activateurs (KIR, NKG2C, NKG2D, ...) (Lanier, 2008). Cependant, l'infection à HCMV façonne le répertoire des NK en induisant l'expression de NKG2C (récepteur activateur) et de CD57 par ces cellules, qui prolifèrent entre 1 et 2 semaines après la détection de la virémie sanguine à HCMV (Gumá et al., 2004; Lopez-Vergès et al., 2011; Foley et al., 2012). (**Figure 12**). Ainsi, l'infection induit l'expansion préférentielle d'une population mature de NK qui sont CD3- CD56^{dim} CD16+ CD94+ NKG2C^{high} CD57+ et qui n'expriment plus NKG2A (Lopez-Vergès et al., 2011). De plus, ces cellules qui peuvent représenter jusqu'à 70% des cellules NK totales chez les individus séropositifs pour le HCMV (HCMV+), expriment également le CD85j (ILT-2), CD158b et des KIR (Foley et al., 2012; Khairallah et al., 2017) mais sont aussi capables de produire de l'IFN γ , TNF α , Granzyme B (GzmB) et sont CD107a+ (Béziat et al., 2012; Foley et al., 2012) (**Figure 13**). Elles ont été associées au contrôle de l'infection, de la réplication et de la maladie à HCMV ainsi qu'à une protection contre le HCMV chez les patients transplantés (Foley et al., 2012; Ataya et al., 2020, 2021). Les cellules NK CD94/NKG2C+ possèdent aussi une capacité accrue de lyse par ADCC lorsque les virions du HCMV sont opsonisés par CD16 (Costa-Garcia et al., 2015). Toutefois, le HCMV peut induire l'expansion d'une population de NK CD94/NKG2C- présentant les mêmes caractéristiques que les NK CD94/NKG2C+ (production d'IFN γ , lyse par ADCC, phénotype de NK mature CD3- CD56^{dim} CD16+ CD94+ NKG2A- CD57+) (Della Chiesa et al., 2014; Liu et al., 2016).

En outre, des études ont montré que les NK partagent des caractéristiques communes avec les LT et les LB, c'est à dire des caractéristiques du système adaptatif, ainsi des cellules NK pourraient acquérir des propriétés de cellules mémoires (Sun et al., 2009; Foley et al., 2012; J. Lee et al., 2015).

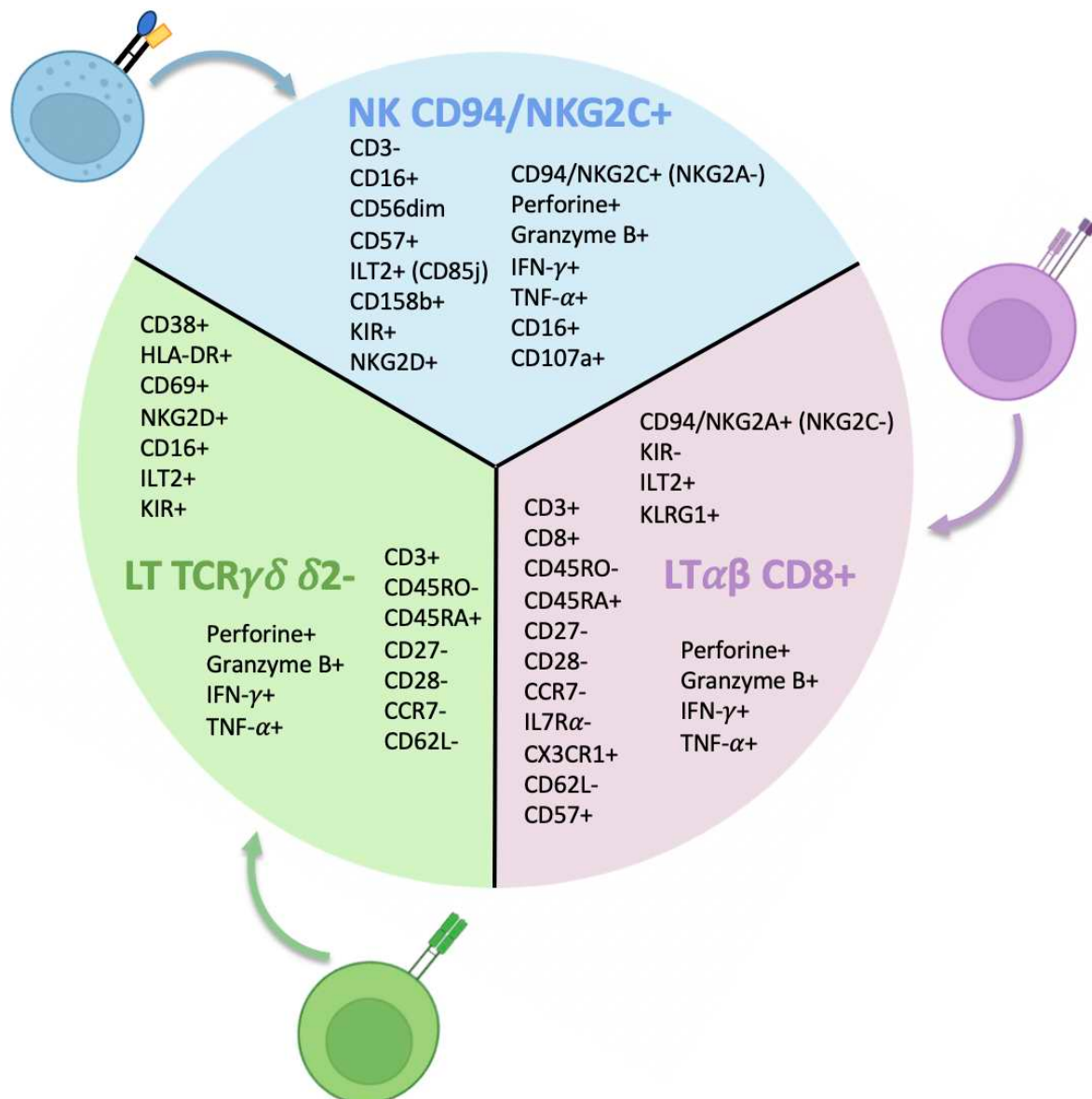


Figure 13 : Phénotype des différentes réponses spécifiques anti-HCMV persistantes à long-terme.

1.2.2. Les T non conventionnels $\gamma\delta$

Les LT gamma delta ($\gamma\delta$) sont des LT non conventionnels exprimant un récepteur des cellules T/ T-cell receptor (TCR) constitué d'une chaîne γ et d'une chaîne δ (Gaballa et al., 2021). Contrairement aux LT $\alpha\beta$ conventionnels, seule une minorité de ces LT $\gamma\delta$ expriment du CD8 et du CD4 (Gaballa et al., 2021). On peut les classer en 2 sous-populations principales en fonction de leurs expressions des chaînes γ et δ : les LT TCR $\gamma\delta$ δ 2+ et les LT TCR $\gamma\delta$ δ 2-. En outre, les LT TCR $\gamma\delta$ δ 2+ sont majoritairement représentés par les LT TCR $\gamma\delta$ γ 9 δ 2+ prédominants dans le sang périphérique au contraire des LT TCR $\gamma\delta$ δ 2- qui sont quant à eux localisés préférentiellement dans les tissus (épithéliums, ...) et composés principalement des δ 1 et de façon plus minoritaire des δ 3 et δ 5 (Gaballa et al., 2021).

C'est en 1999 que l'équipe de Déchanet a découvert une expansion massive de LT $\gamma\delta$ mais uniquement dans la sous-population de LT TCR $\gamma\delta$ $\delta 2^-$ (valable pour les sous-population $\delta 1$, $\delta 3$ et $\delta 5$) suite à une infection à HCMV chez les KTR (Déchanet et al., 1999 (a); Déchanet et al., 1999 (b)). Suite à l'expansion, cette population de LT $\gamma\delta$ reste stable dans le temps pouvant représenter en moyenne de 5 à 10% des LT totaux circulants chez les individus séropositifs pour le HCMV (Déchanet et al., 1999 (a); Déchanet et al., 1999 (b)). Cependant, cette expansion n'a pas été observée uniquement chez les KTR mais aussi chez des patients d'autres types de SOT (Puig-Pey et al., 2010; Couzi et al., 2011; Roux et al., 2013), de patients transplantés de CSH (Knight et al., 2010; Scheper et al., 2013), chez les femmes enceintes primo-infectées (Fornara et al., 2011; Roux et al., 2013), chez les enfants ayant une lymphopénie T $\alpha\beta$ et les nouveaux-nés (de Villartay, 2005; Ehl, 2005; Vermijlen et al., 2010) ainsi que chez les individus sains immunocompétents (Pitard et al., 2008; Knight et al., 2010). Toutefois, l'expansion des LT TCR $\gamma\delta$ $\delta 2^-$ est variable en fonction des individus mais a été estimée, dans l'étude de Lafarge *et al.*, en moyenne à 45 jours suite à l'infection à HCMV (Lafarge et al., 2001) (**Figure 12**).

Chez les patients séronégatifs pour le HCMV (HCMV $^-$), ces LT sont considérés comme ayant un phénotype naïf contrairement aux patients HCMV $^+$ ayant des LT TCR $\gamma\delta$ $\delta 2^-$ dans le sang périphérique avec un phénotype d'effecteur-mémoire réexprimant le CD45RA (TEMRA). Ainsi, ces cellules effectrices mémoires ont pour phénotype CD3 $^+$ CD45RA $^+$ CCR7 $^-$ CD27 $^-$ CD28 $^-$ CD45RO $^-$ CD62L $^-$ avec un profil d'activation HLA-DR $^+$ CD69 $^+$ CD38 $^+$ et une capacité cytotoxique perforine $^+$ et GzmB $^+$, ces caractéristiques phénotypiques sont proches de celles retrouvées chez les LT $\alpha\beta$ CD8 $^+$ spécifiques du HCMV (Déchanet et al., 1999 (b) ; Pitard et al., 2008; Couzi et al., 2009; Roux et al., 2013) (**Figure 13**).

Récemment il a pu être constaté qu'il y avait une différence de diversité entre les chaînes $\gamma\delta$. Les chaînes δ sont plus diversifiées mais avec des séquences moins publiques à l'opposé des chaînes γ qui sont certes moins diversifiées mais ont des séquences plus publiques (Ravens et al., 2017). Une autre comparaison de diversité peut être faite cette fois-ci entre les LT TCR $\gamma\delta$ $\delta 2^+$ et les LT TCR $\gamma\delta$ $\delta 2^-$, la diversité des LT TCR $\gamma\delta$ $\delta 2^+$ est assez modeste et stable dans le temps alors que les LT TCR $\gamma\delta$ $\delta 2^-$ ont une diversité qui évolue avec l'âge allant d'une grande diversité à un répertoire TCR plus clonal en vieillissant (Davey et al., 2017).

Seuls les ligands de quelques TCR $\gamma\delta$ $\delta 2^-$ sont actuellement connus tels que la chaîne A liée au CMH de classe I/ MHC class I chain-related gene A (MICA) (Xu et al., 2011), le récepteur

endothélial de la protéine C/ Endothelial protein C receptor (EPCR) (Willcox et al., 2012), CD1c et CD1d (Spada et al., 2000; Roy et al., 2016) et l'Annexine A2 (Marlin et al., 2017). Toutefois, contrairement aux LT $\alpha\beta$ CD8+, les LT TCR $\gamma\delta$ $\delta 2^-$ sont capables d'être activés de manière indépendante au TCR. Tout comme les NK, la majorité des LT TCR $\gamma\delta$ $\delta 2^-$ induit par le HCMV expriment le CD16+ et aussi le NKG2D contrairement aux LT $\alpha\beta$ CD8+ spécifiques du HCMV (Déchanet et al., 1999 (b); Couzi et al., 2012). *In vitro*, il a été montré que ces cellules sont capables, par leur reconnaissance et la lyse des cellules infectées (dont celles opsonisées par des IgG), d'inhiber la réplication du HCMV grâce à leur production d'IFN γ et de TNF α , de perforine et de GzmB (Déchanet et al., 1999 (b); Halary et al., 2005; Vermijlen et al., 2010; Couzi et al., 2012). De plus, il existe une corrélation entre la résolution de la virémie à HCMV chez les KTR et l'expansion de 0,06% des LT TCR $\gamma\delta$ $\delta 2^-$ par jour après l'infection à HCMV (Kaminski et al., 2016), ces cellules auraient un rôle protecteur.

1.2.3. Les LT CD4+ et LT CD8+ anti-HCMV

Les compartiments T spécifiques du HCMV sont présents à des fréquences importantes chez les individus séropositifs pour le HCMV et s'accroissent avec l'âge. Les LT CD8+ et les LT CD4+ spécifiques du HCMV représentent 10% et 9% respectivement du compartiment T mémoire (Sylwester et al., 2005). Néanmoins, ces fréquences en réponses T CD8+ et en T CD4+ spécifiques sont très variables en fonction des individus et peuvent atteindre plus de 20% de leur compartiment T mémoire respectif (Sylwester et al., 2005). Alors que les LT CD8+ anti-HCMV circulants sont majoritaires lors de la primo-infection chez les patients D+/R-, les LT CD4+ anti-HCMV sont quant à eux majoritaires après une thérapie antivirale qui les préserve chez les patients symptomatiques (Sester et al., 2002). La grande majorité des études sont basées sur les LT CD8+ anti-HCMV du sang périphérique. On les retrouve à des niveaux élevés en périphérie et à des niveaux faibles dans les ganglions lymphatiques (Remmerswaal et al., 2012) mais également dans les poumons, la rate et la moelle osseuse (Farber et al., 2014).

Les LT peuvent être classés en 4 grandes sous-populations en fonction de leur expression des isoformes de CD45 (CD45RA et CD45RO), du récepteur de chimiokine CCR7 et des récepteurs de co-stimulation CD27, CD28 (Vieira Braga et al., 2015).

Il a été constaté que le stade de différenciation des LT CD8⁺ anti-HCMV évolue avec les phases de l'infection à HCMV. En cas de primo-infection, comme par exemple chez des receveurs D⁺/R⁻, le phénotype de ces cellules correspond majoritairement à des T effecteurs-mémoires (TEM) (CD45RA⁻ CD45RO⁺ CCR7⁻ CD27⁺ CD28⁻). En revanche, avec le temps, les cellules perdent l'expression de CD27 et de CD45RO et réexpriment CD45RA, elles sont devenues des TEMRA (CD45RA⁺ CD45RO⁻ CCR7⁻ CD27⁻ CD28⁻) (Wills et al., 2002; Kuijpers et al., 2003; van Leeuwen et al., 2006). Les cellules TEMRA spécifiques du HCMV expriment également des récepteurs des cellules NK, des molécules d'adhésion des lymphocytes et des récepteurs aux cytokines. Elles sont donc des T CD3⁺ CD8⁺ TEMRA NKG2A⁺ NKG2C⁻ ILT2⁺ KIR-CD57⁺ CD62L⁻ CX3CR1⁺ IL7Rα⁻ et elles ont perdu leur capacité de prolifération mais ont conservé une capacité cytotoxique élevée (van den Berg et al., 2019). De plus, ces cellules TEMRA anti-HCMV ne présentent pas de signe d'épuisement que ce soit au niveau transcriptomique ou phénotypique (Hertoghs et al., 2010; van den Berg et al., 2019). Une étude récente a mis en avant que contrairement à ce qui avait été montré auparavant, les LT CD8⁺ TEMRA ont une durée de vie similaire à celle du pool de LT CD8⁺ mémoires, ainsi le virus ne réduit pas leur durée de vie (van den Berg et al., 2021). Ce profil phénotypique très différencié est observé pour ces cellules très tôt après la primo-infection à HCMV (Hertoghs et al., 2010) (**Figure 12**). Les cellules TEMRA anti-HCMV sont majoritaires dans le sang périphérique mais il reste une fraction plus faible de cellules composée de cellules T centrales mémoires (TCM) et TEM (Sallusto et al., 1999). Elles persistent à long-terme et participent au rôle protecteur anti-viral en permettant entre autre le renouvellement du pool de cellules TEMRA (Scheinberg et al., 2009; Peggs et al., 2011).

Tout comme les LT CD8⁺ anti-HCMV, la maturation des LT CD4⁺ évolue en fonction des phases de l'infection mais en un processus de différenciation unique. En effet, au pic de l'infection, les cellules co-expriment le CD45RA et le CD45RO et sont CD27⁺ CD28⁺ puis, avec le temps, elles deviennent CD27⁻ CD28⁻ avec également cette absence d'expression d'IL7Rα, et l'acquisition de l'expression de CD57 et de KLRG1 suggérant un phénotype de type TEMRA (Vieira Braga et al., 2015; Pachnio et al., 2016).

Les LT CD8⁺ anti-HCMV sont capables de produire de l'IFNγ et du TNFα, de reconnaître et de lyser les cellules infectées via leur TCR en sécrétant du GzmB et de la perforine (Zhou et al., 2009; van den Berg et al., 2019) (**Figure 13**).

Les LT CD4⁺ anti-HCMV produisent les cytokines classiques des Th1 (IL-2, IFN γ et TNF α) (Rentenaar et al., 2000). Elles sont aussi capables d'exprimer du GzmB et de la perforine leur permettant, tout comme pour les cellules T CD8⁺ et les cellules NK, de contrôler la dissémination du virus en lysant les cellules infectées (Pachnio et al., 2016; Jackson et al., 2017). Les cellules infectées par le HCMV peuvent induire des altérations dans la réponse des LT CD4⁺ anti-HCMV effecteurs (Mason et al., 2012). Elles ont également un rôle dans le maintien *in vivo* de la réponse T CD8⁺ anti-HCMV qui est dépendante de la présence de ces LT CD4⁺ (Walter et al., 1995). Cependant, les réponses T CD4⁺ anti-HCMV spécifiques d'Ag de latence tels que LUNA et UL138 peuvent avoir des propriétés régulatrices, cette sous-population exprime Foxp3 et produit de l'IL10 (Mason et al., 2013).

L'infection à HCMV induit une expansion progressive et continue des LT CD8⁺ et LT CD4⁺ Th1 spécifiques du HCMV, ce phénomène se nomme l'inflation mémoire (Rentenaar et al., 2000; van de Berg et al., 2010; Khairallah et al., 2017). L'inflation mémoire est déclenchée uniquement par quelques épitopes dérivés des gènes *IE* et *L* du HCMV (Khairallah et al., 2017). Les LT CD8⁺ subissant l'inflation reconnaissent notamment les épitopes pp65 et IE. Il a été montré chez des nourrissons, ayant une réponse T CD8 dirigée contre pp65 et IE1, que la réponse spécifique dirigée contre IE1 est plus importante que celle dirigée contre pp65 à 1 an (Gibson et al., 2004). La diversité du répertoire T anti-HCMV est assez restreinte ou diminuée allant progressivement vers un nombre faible de clones T de fortes avidités au cours du temps (Trautmann et al., 2005; Day et al., 2007). De plus, une étude récente a montré que le répertoire T conservait sa diversité avec l'âge, s'adaptant aux expansions clonales induites par l'infection à HCMV (Lindau et al., 2019). En revanche, le répertoire des LT CD8 spécifiques dirigés contre pp65 est oligoclonal mais reste diversifié et peut être renouvelé par la réexposition à l'Ag (Miconnet et al., 2011; Chen et al., 2017).

Des réponses anti-HCMV à TCR publics ou à TCR privés ont été décrites. L'étude menée par Wang et al., a montré qu'environ 70% du répertoire T dirigé contre HLA-A*02/pp65 (HLA-A2/pp65) est public, avec 50% des TCR à chaînes α et β publiques, chez des individus HCMV⁺ possédant les allèles HLA-A*02 (Wang et al., 2012). Un autre exemple dans le contexte de la restriction à HLA-B*35:08, cette fois-ci, avec 2 épitopes de pp65 présentés par cette molécule HLA, l'un va être reconnu par un TCR public et l'autre par un TCR privé (Wynn et al., 2008).

Les LT CD8+ et les LT CD4+ possèdent la particularité de reconnaître spécifiquement les épitopes dans un contexte de présentation par les molécules HLA de classe I (HLA-I) et HLA de classe II (HLA-II) respectivement.

Une étude menée par Sylwester a montré que le répertoire antigénique était très diversifié, sur 213 ORFs, 127 et 125 ORFs fournissent des peptides immunogènes reconnaissables spécifiquement par les LT CD8+ et les LT CD4+ respectivement (dont 26 ORFs uniquement reconnus par les LT CD8+ et 44 uniquement reconnus par les LT CD4+) (Sylwester et al., 2005). Des études de répertoire ont permis d'identifier les peptides les plus couramment reconnus (reconnus par 50% des individus HCMV+) par les LT CD8+ anti-HCMV qui sont issus des protéines virales UL48 (SCP), UL83 (pp65) et UL123 (IE1) bien que d'autres peptides aient pu être identifiés tels que ceux issus des protéines du tégment UL99 (pp28), UL44 (pp50) et UL32 (pp150), les protéines de l'enveloppe UL55 (gB) et UL75 (gH), la protéine UL40 ou encore des protéines d'évasion immunitaire US2, US3, US6, UL18 (Elkington et al., 2003; Sylwester et al., 2005; Crough & Khanna, 2009). Toutefois, pp65 et IE1 fournissent les peptides immunodominants contre lesquels les réponses T CD8+ restent majoritaires (Elkington et al., 2003; Sylwester et al., 2005; Sylwester et al., 2016). Du côté des LT CD4+, 50% des individus séropositifs ont reconnus les peptides issus des protéines virales gB, pp65, UL86 (MCP), pp28 et UL122 (IE2) (Sylwester et al., 2005). Bien qu'également ces réponses puissent reconnaître d'autres peptides issus d'IE1, de protéines du tégment, de protéines de l'enveloppe gH, des protéines d'évasion immunitaire, ou encore des protéines associées à la latence du virus (UL138 et LUNA) (Sylwester et al., 2005; Mason et al., 2013).

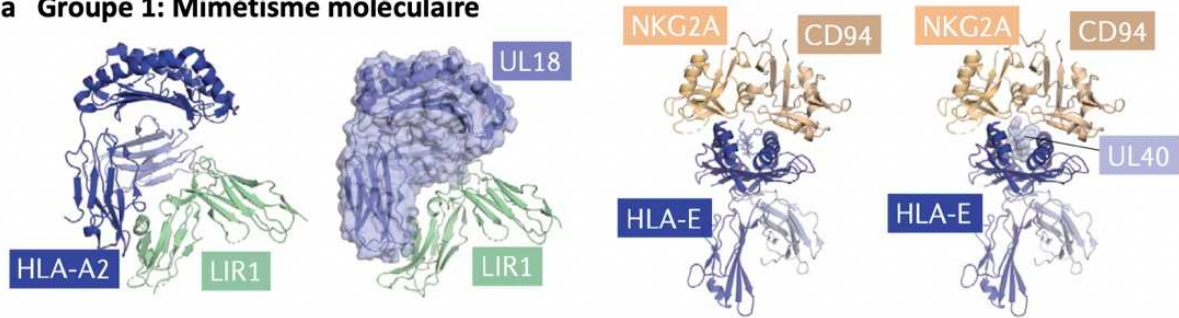
II. Les mécanismes d'évasion immunitaire du HCMV

Les réponses innées et adaptatives jouent conjointement un rôle crucial dans la protection et le contrôle efficaces de l'infection à HCMV. Il a été montré qu'un bon nombre des gènes ne sont pas impliqués dans la réplication virale et pourraient moduler le SI de l'hôte infecté (Dunn et al., 2003 (a); Llano et al., 2003; Fielding et al., 2017). Les immunoévasines qui vont moduler les récepteurs des cellules T et NK peuvent être classés en 3 groupes : le mimétisme moléculaire, les immunoévasines dites convergentes et les liaisons alternatives (Berry et al., 2020) :

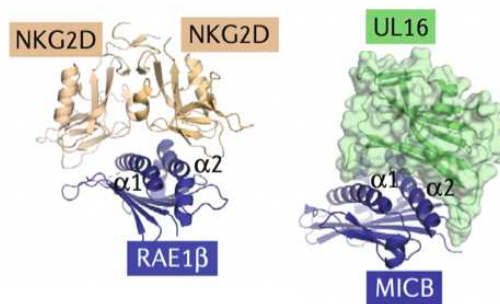
- **Groupe 1 : le mimétisme moléculaire.** Le ligand endogène et les immunoévasines sont similaires dans leur mode de repliement et d'amarrage. Ce groupe comprend UL18, une protéine codée par le HCMV qui, même avec une homologie de séquence de seulement 25% avec le CMH-I, se lie de manière extrêmement similaire à LIR1 (leukocyte immunoglobulin-like receptor 1) que le HLA-A*02 (Yang & Bjorkman, 2008). UL40 peut également être inclus dans ce groupe du fait que le peptide issu de cette protéine est très similaire au peptide signal de HLA-C qui stabilise HLA-E et permet l'interaction avec le complexe CD94/NKG2A ou NKG2C (Tomasec, 2000; Ulbrecht et al., 2000) (**Figure 14a**).
- **Groupe 2 : les immunoévasines convergentes.** Contrairement au groupe 1 où les immunoévasines sont proches de la structure du ligand endogène, les immnoévasines du groupe 2 ne le sont pas mais utilisent le même site de liaison. C'est le cas d'UL16 qui est codée par le HCMV et qui se lie avec la même affinité aux ligands de NKG2D, MICB, ULBP-1 et ULBP-2 (ULBP = UL16-Binding Protein) (Müller et al., 2010) (**Figure 14b**).
- **Groupe 3 : Les liaisons alternatives.** Les immunoévasines de ce dernier groupe ont la particularité d'avoir des replis similaires aux partenaires de liaisons endogènes mais un site de liaison différent dit alternatif. Le TCR (Rossjohn et al., 2015) et les KIR (Saunders et al., 2015) se lient au-dessus de la plateforme de liaison aux peptides du CMH-I ou encore en-dessous pour le CD8 α (Gao et al., 1997) alors que la protéine US2 va, quant à elle, se lier à un site situé à la jonction entre le sillon peptidique et le domaine $\alpha 3$ (Gewurz et al., 2001) (**Figure 14c**).

C'est dans le but d'échapper à la reconnaissance des cellules infectées par les cellules immunitaires que le virus met en place tout un arsenal de mécanismes via des immunoévasines.

a Groupe 1: Mimétisme moléculaire



b Groupe 2: Immunoévasines convergentes



c Groupe 3: Liaisons alternatives

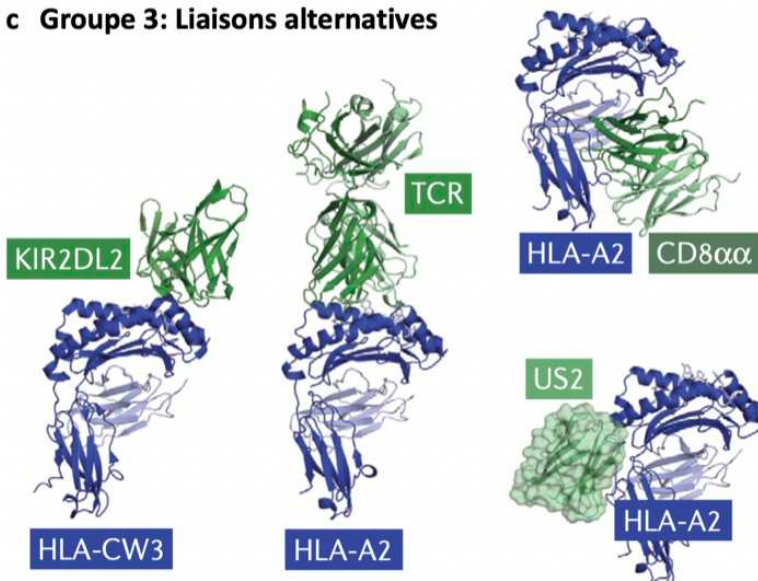


Figure 14 : Exemples de structures représentatives des 3 groupes d'immunoévasines (Adaptée de Berry et al., 2020).

Représentation des structures d'immunoévasines du HCMV avec leurs cibles moléculaires. En parallèle, les structures des récepteurs-ligands endogènes correspondants sont également représentées. Les structures sont colorées en fonction de leurs plis en bleu pour le CMH-like), en vert pour les Ig-like et en beige pour les lectines de type C-like.

2.1. La modulation de la présentation antigénique par le CMH-I

Dans les cellules infectées, le processus de dégradation des protéines virales par le protéasome permet la génération de peptides antigéniques viraux qui vont être transportés du cytosol au RE dans le but d'être chargés sur les molécules du CMH-I qui vont ensuite être acheminées jusqu'à la membrane cellulaire via la voie sécrétoire. Suite à cela, les LT CD8+ vont reconnaître via leur TCR les peptides viraux présentés par les molécules du CMH-I, et ainsi participer à la protection et à l'élimination du virus (Berry et al., 2020). Le virus va donc moduler la présentation antigénique pour empêcher cette reconnaissance des cellules infectées par les LT CD8+ (Berry et al., 2020).

Le HCMV va coder pour des immunoévasines ciblant le CMH-I dont US2, US3, US6, US10 et US11, elles sont proches structurellement mais diffèrent sur plusieurs paramètres (spécificité de cibles, mécanisme d'inhibition du CMH-I).

La translocation médiée par US2 se produit via le translocateur membranaire du RE, Sec61, (Wiertz et al., 1996 (b)) et dépend de son domaine cytoplasmique (Furman et al., 2002). En revanche la translocation médiée par US11 nécessite le domaine cytoplasmique du CMH-I et dépend, quant à elle, d'un résidu de glutamine et de glycine dans le domaine transmembranaire US11 qui provoque le recrutement des chaînes lourdes du CMH-I dans le complexe de dislocation via derlin1 (Lilley & Ploegh, 2004; Lee et al., 2005). Ces 2 protéines entraînent la dégradation efficace par le protéasome des chaînes lourdes du CMH-I (Wiertz et al., 1996 (a); Wiertz et al., 1996 (b)). Du côté, de la protéine US10, elle cible spécifiquement par son domaine intracytoplasmique unique et raccourcie, la molécule HLA-G (Park et al., 2010) (**Figure 15a**).

US3 et US6 vont interférer avec le complexe de chargement des peptides/ peptide loading complex (PLC, incluant le transporteur associé au processing de l'Ag 1 et 2 (TAP1 et TAP2), l'hétérodimère CMH-I, les chaperonnes tapasine et calréticuline et l'oxydoréductase Erp57)) (Blees et al., 2017). US3 en se liant à la tapasine va provoquer la rétention du CMH-I dans le RE et inhiber le chargement peptidique dépendant de la tapasine (Park et al., 2004). On peut ainsi retrouver des CMH-I à la surface des cellules US3+ car tous les allotypes d'HLA ne sont pas dépendants de la tapasine (Park et al., 2004). US6 va se lier à TAP1 dans le but de l'empêcher de subir ses changements conformationnels dépendant de l'ATP, ne permettant

plus la translocation des peptides du cytoplasme dans le RE ce qui va donc inhiber le chargement peptidique (Ahn et al., 1997; Lehner et al., 1997; Hewitt, 2001) (**Figure 15a**).

2.2. L'échappement à la reconnaissance du « Soi manquant »

Bien que la modulation de la présentation antigénique par la baisse du CMH-I à la surface des cellules infectées soit efficace pour contrer les réponses T anti-HCMV, cela entraîne également une baisse des molécules inhibitrices des NK qui pourrait ainsi déclencher leur activation par leur reconnaissance du « soi manquant » (Kärre et al., 1986). Dans ce but, le HCMV induit la production de ligands dit de substitution pour empêcher la reconnaissance des cellules infectées par les cellules NK.

UL18 codée par le HCMV est un homologue du CMH-I et s'associe avec le peptide et la microglobuline $\beta 2$ ($\beta 2m$) (Beck & Barrell, 1988; Browne et al., 1990; Fahnestock et al., 1995). Il est le 1^{er} ligand de substitution identifié des cellules NK. Il se lie à LIR1 avec une affinité 1000 fois supérieure à celle des ligands endogènes (Chapman et al., 1999). L'expression d'UL18 à la surface des cellules infectées permet à la fois d'atténuer le phénomène d'ADCC des NK LIR1+ mais qui permet aussi de contribuer à une meilleure destruction des NK (Prod'homme et al., 2007). De plus, UL18 a des effets contradictoires, il est dépendant de TAP et est homologue au CMH-I mais il est quand même résistant à la famille US6. Il va avoir accès aux peptides dépendants de TAP en contrecarrant l'effet de blocage de TAP médiée par US6 mais va tout de même maintenir, en association avec US6, le blocage du chargement peptidique des CMH-I en empêchant l'association du CMH-I avec TAP (Kim et al., 2008) (**Figure 15b**).

Les cellules NK sont capables de se lier au CMH-I dont HLA-E par son complexe hétérodimérique CD94/NKG2 qui peut être soit activateur (CD94/NKG2C) soit inhibiteur (CD94/NKG2A) (Braud et al., 1998 (a)). HLA-E présente des peptides issus de la séquence leader des autres molécules de CMH-I. On pourrait supposer que la baisse d'expression à la surface de CMH-I induirait l'activation des cellules NK mais le HCMV induit la production de la glycoprotéine UL40 de 221 acides aminés, produite pendant la phase E et L du cycle de réplication et codée par le gène *UL40* (Tomasec, 2000; Ulbrecht et al., 2000). La séquence signal de UL40 faisant 37 acides aminés fournit un peptide nonamérique (UL40₁₅₋₂₃) qui a une homologie de séquence très proche des peptides signaux du CMH-I endogènes (Tomasec, 2000; Ulbrecht et al., 2000). Il a été constaté, sur les cellules infectées, par le HCMV une augmentation de l'expression d'HLA-E protégeant les cellules de la lyse par interaction des NK

via leurs récepteurs CD94/NKG2A avec HLA-E et, cela malgré la présence d'US6, les peptides signaux issus d'UL40 stabilise HLA-E et cela indépendamment de TAP (Tomasec, 2000; Ulbrecht et al., 2000; Cerboni et al., 2001; Heatley et al., 2013). En outre, la séquence du peptide nonamérique est très polymorphe selon les différentes souches virales cliniques tout en conservant en grande partie les caractéristiques des peptides physiologiques stabilisant HLA-E *in vivo* (Garrigue et al., 2008; Heatley et al., 2013). De plus, même si l'affinité de l'interaction entre HLA-E/UL40 et CD94/NKG2A est en moyenne plus de 6 fois supérieure à celle avec CD94/NKG2C, la variation de la séquence du peptide affecte ces interactions (Heatley et al., 2013). Malgré cela, ces récepteurs activateurs et inhibiteurs tolèrent les polymorphismes UL40 introduisant des substitutions conservatrices aux résidus en position 1, 4, 6 (Sérine) et 8 (VMA**P**RTLIL) (Heatley et al., 2013) (**Figure 15b**). Une population de LT CD8 restreinte par HLA-E reconnaît les peptides issus de UL40 (LT CD8 HLA-E/UL40) (Romagnani et al., 2002; Sullivan et al., 2021). La description de ces cellules sera plus détaillée dans le point II du prochain chapitre.

2.3. La régulation négative des ligands activateurs

Les NK expriment à leur surface des récepteurs activateurs qui reconnaissent des molécules induites par le stress, on appelle ce phénomène le « Soi induit » car dans des conditions normales ces molécules sont absentes ou faiblement exprimées. Comme pour le mécanisme d'échappement à la reconnaissance du « Soi manquant », le HCMV induit des mécanismes pour échapper à ce « Soi induit » par le stress (Berry et al., 2020).

NKG2D est considéré comme l'un des récepteurs activateurs les plus importants de ces ligands « auto-induits », cet homodimère est exprimé sur les cellules NK et certains types de cellules T. L'infection à HCMV induit l'augmentation de la transcription des ligands de NKG2D qui sont MICA, MICB, et ULBP1 à ULBP6 (Slavuljica et al., 2011). Néanmoins, au cours des stades précoces et tardifs de l'infection, le HCMV diminue l'expression des ligands de NKG2D à l'aide de différentes immunoévasines telles que US9, US18, US20, UL142 et UL148A. Ces 5 immunoévasines peuvent avoir pour cibles différents allomorphes de MICA, elles peuvent les retenir dans le compartiment *cis*-Golgi ou encore favoriser leur dégradation dans le protéasome ou le lysosome (Chalupny et al., 2006; Ashiru et al., 2009; Fielding et al., 2014; Seidel et al., 2015; Dassa et al., 2018). Concernant les ligands MICB, ULBP1 et ULBP2, ils sont retenus dans le compartiment du RE et du *cis*-Golgi par UL16 (Dunn et al., 2003 (b)). MICB est

downrégulé également par le microARN UL112 (miR-UL112) conduisant à la baisse de liaison de NKG2D et à la diminution de la lyse par les cellules NK (Stern-Ginossar et al., 2007) (**Figure 15c**).

Tout comme les ligands de NKG2D, l'infection à HCMV induit l'augmentation de la transcription du gène de la protéine de type nectine 5 (NECL5, aussi connu sous le nom de CD155 ou PVR) (Pignoloni et al., 2016). NECL5 et la nectine 2 (CD112) sont les ligands de la protéine accessoire DNAX1 (DNAM1 ou CD226) (Bottino et al., 2003; Tahara-Hanaoka, 2004), qui est un récepteur activateur impliqué dans la cytotoxicité des cellules NK et les cellules T (Shibuya et al., 1996). Cependant, le HCMV va inhiber l'expression de ces 2 ligands via UL141 (Prod'homme et al., 2010). Cette immunoévasine participe également à la survie des cellules infectées en empêchant leur apoptose par la rétention des récepteurs de ligands induisant l'apoptose liés au facteur de nécrose tumorale 1/ Tumor-necrosis-factor related apoptosis inducing ligand (TRAIL1) et TRAIL2 dans le RE (Nemčovičová et al., 2013; Smith et al., 2013). De plus, la nectine 2 peut être régulée par l'action simultanée d'US2 et UL141 qui vont la retenir dans le RE, favoriser sa translocation vers le cytosol et son élimination (Hsu et al., 2015) (**Figure 15c**).

Chez l'Homme, 2B4 est une protéine transmembranaire qui agit comme un récepteur activateur ou inhibiteur (Valiante & Trinchieri, 1993; Pahima et al., 2019). Concernant le ligand de 2B4, CD48, son expression est diminuée dans les cellules infectées par le HCMV, suggérant un autre mécanisme d'immunoévasion mis en place par le HCMV ciblant cette fois la voie 2B4 (Romo et al., 2011) (**Figure 15c**).

Un seul des 3 récepteurs naturels de cytotoxicité (NKp30, NKp44, et NKp46) est ciblé par les immunoévasines codées par le HCMV, le NKp30 (Berry et al., 2020). Le HCMV va agir à la fois sur le ligand et le récepteur dans le but d'altérer la fonction cytotoxique des NK. La protéine tégumentaire pp65 se lie à NKp30 entraînant la dissociation de son adaptateur de signalisation, la chaîne CD3 ζ (Arnon et al., 2005). Quant au ligand de NKp30, B7-H6, il est downrégulé par les protéines US18 et US20 (Charpak-Amikam et al., 2017) (**Figure 15c**).

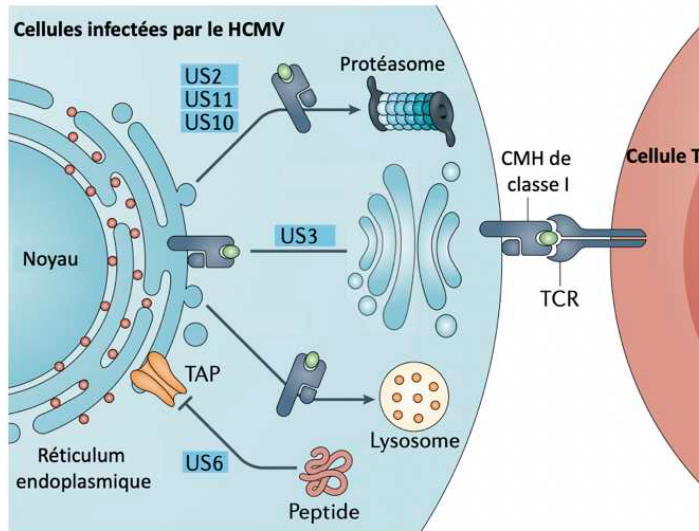
2.4. Le ciblage des récepteurs Fc

Le phénomène d'ADCC médié par les NK permet de stimuler une réponse immunitaire efficace dans l'élimination des cellules infectées via la voie du CD16. De manière à contrer l'activité antivirale des anticorps anti-HCMV, le HCMV induit la production d'immunoévasines

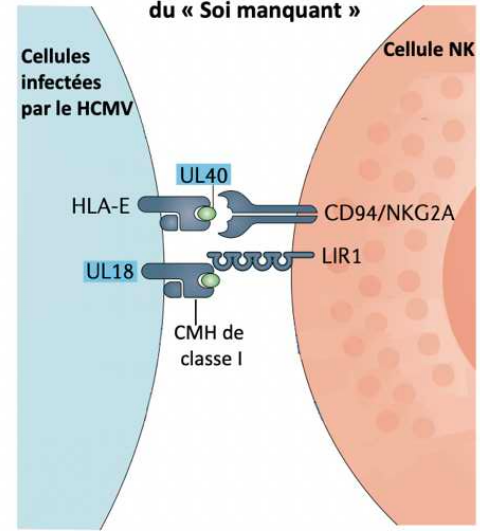
se fixant sur le Fc empêchant le déclenchement du récepteur Fcγ (FcγR) (généralement FcγRIIIa) des cellules NK et ainsi la lyse des cellules infectées (Berry et al., 2020).

La description de produits du HCMV pouvant se lier à la chaîne Fcγ des Ig des cellules infectées remonte à plus de 40 ans (Furukawa et al., 1975) et seulement 4 glycoprotéines virales présentent cette capacité. Parmi ces 4 glycoprotéines, 3 sont codées par le même groupe de gènes RL11 (gp34, gpRL13 et gp95) et la 4^e glycoprotéine provient de l'ARNm épissé chevauchant la région des gènes UL119-UL118, la gp68 (Atalay et al., 2002). Néanmoins, ces glycoprotéines virales ne sont pas capables de toutes reconnaître les mêmes IgG. Les gp34 et gp68 sont spécifiques des IgG mais ne font pas la distinction des sous-types alors que gpRL13 est spécifique des sous-types IgG1 et IgG2 (Cortese et al., 2012). De plus, le fonctionnement des FcR viraux ne donne pas lieu à la compétition directe avec les FcR de l'hôte pour la liaison aux Fcγ (Berry et al., 2020). Comme dans le cas de gp68 où la liaison de gp68 avec le Fcγ entraîne l'endocytose vers les lysosomes du complexe Ag-gp68-Fcγ, dans le but de dégrader les composants du complexe (Ndjamen et al., 2016) (**Figure 15d**).

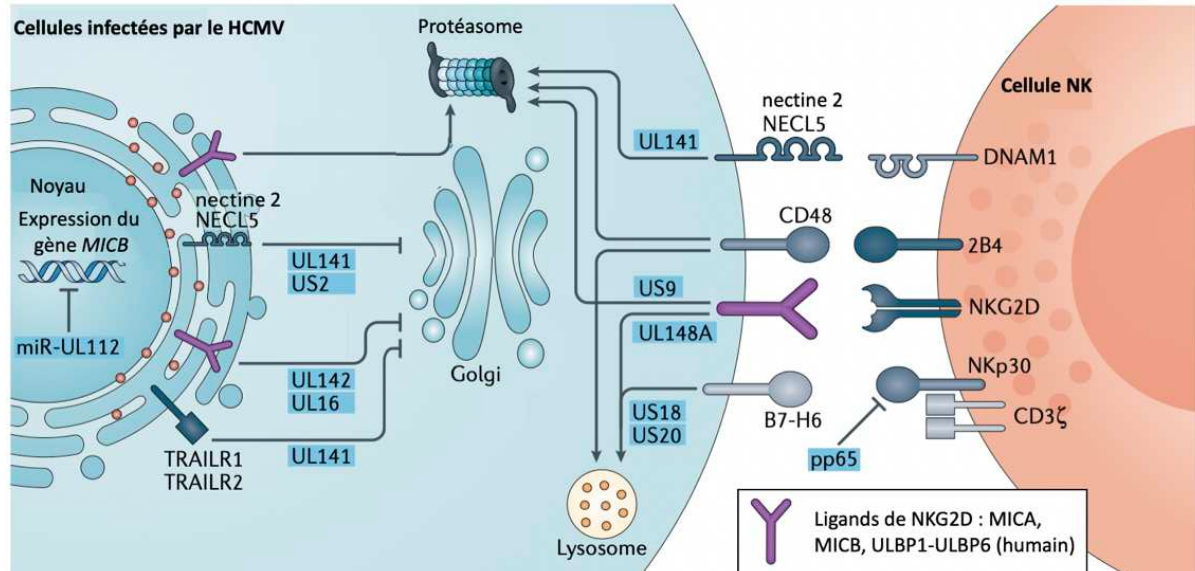
a Modulation de la présentation antigénique



b Echappement à la reconnaissance du « Soi manquant »



c Downrégulation des ligands des récepteurs activateurs des cellules NK



d Ciblage des récepteurs Fc

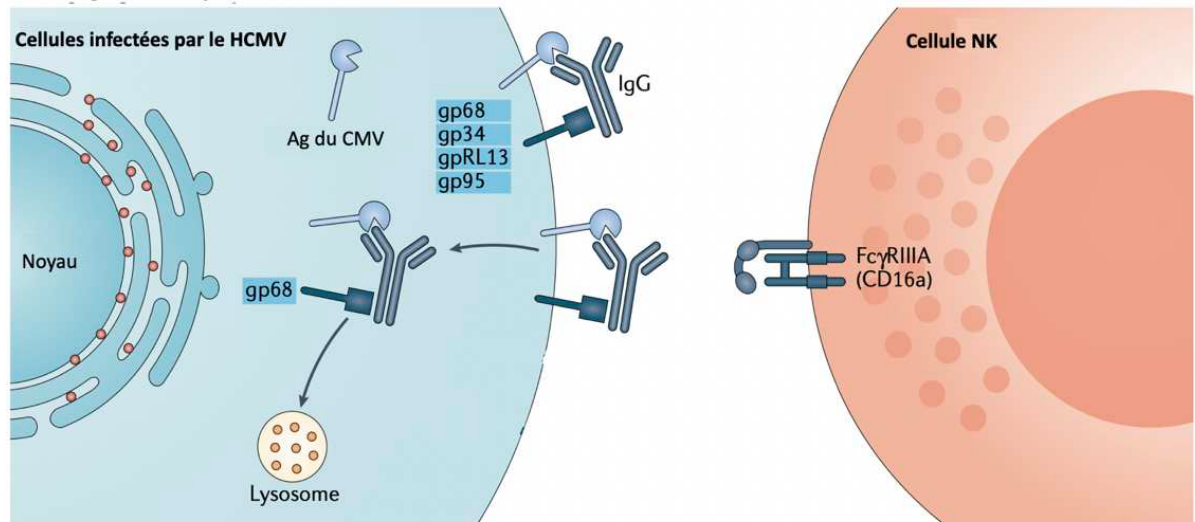


Figure 15 : Schéma des mécanismes d'immunoévasion mis en place par le HCMV (Adaptée de Berry et al., 2020).

Représentation des immunoévasines permettant (a) la modulation de la présentation antigénique par le CMH-I, (b) l'échappement à la reconnaissance du « Soi manquant », (c) la régulation à la baisse des récepteurs activateurs des cellules NK, (d) le ciblage des récepteurs Fc dans le but de les inhiber. Les protéines de l'hôte sont colorées en noir et gris (foncé et clair) et les immunoévasines codées par le HCMV sont représentées par des encadrés bleus.

Ag : Antigène ; CMH : Complexe Majeur d'Histocompatibilité ; IgG : Immunoglobuline G ; TAP : transporteur associé au processing de l'Ag ; TCR : récepteur des cellules T.

Chapitre 4 : Spécificités des réponses T CD8 restreintes par HLA-E anti-HCMV

I. HLA-E

1.1. L'évolution, l'expression et le polymorphisme de HLA-E

Les gènes codant pour les HLA se situent sur le bras court du chromosome 6, plus précisément le gène *HLA-E* est localisé entre les gènes *HLA-C* et *HLA-A* (Koller et al., 1988). Il existe au total 19 gènes de *HLA-I* connus dont 3 gènes *HLA-I* classiques (*HLA-Ia*) (*HLA-A*, *HLA-B* et *HLA-C*), 3 gènes *HLA-I* non classiques (*HLA-Ib*) (*HLA-E*, *HLA-F* et *HLA-G*) et le gène *HLA-Hfe* faisant partie de l'extension de la région des *HLA-I* (Shiina et al., 2009). L'organisation du gène *HLA-E* est similaire à celle des gènes *HLA-Ia*, il est composé de 8 exons, l'exon 1 codant pour le peptide signal, les exons 2 à 4 pour les domaines $\alpha 1$, $\alpha 2$ et $\alpha 3$ de la chaîne lourde respectivement, l'exon 5 pour le domaine transmembranaire, les exons 6 et 7 pour le domaine cytoplasmique et l'exon 8 n'est pas traduit (O'Leary et al., 2016). Le gène *HLA-E* code pour la protéine du même nom HLA-E, formée d'un complexe de 3 domaines extracellulaires similaires aux HLA-Ia, $\alpha 1$ et $\alpha 2$ formant le sillon de liaison aux peptides, et $\alpha 3$ le domaine proximal membranaire (Kanevskiy et al., 2019).

La transcription de *HLA-E* a lieu dans la plupart des cellules nucléées humaines, néanmoins l'expression de la protéine HLA-E est assez restreinte et la protéine s'associe avec la $\beta 2m$ et le peptide (Kanevskiy et al., 2019). La protéine HLA-E est physiologiquement exprimée par les cellules immunitaires de la lignée myéloïde et lymphoïde (DC, LT, LB, NK, neutrophiles, ...) mais aussi les cellules endothéliales, les cellules épithéliales, les mélanocytes et les cellules tumorales (Derré et al., 2006; Coupel et al., 2007; Perera et al., 2007; Boegel et al., 2018). Dans des conditions inflammatoires, HLA-E est régulée à la hausse sur la surface cellulaire et est aussi libérée de manière plus importante sous forme soluble grâce aux cytokines telles que IFN γ , TNF α et IL-1 β (Coupel et al., 2007).

Parmi tous les gènes CMH-I, le locus HLA-E est le mieux conservé chez les primates non-humains, il est même retrouvé chez les singes du Nouveau-Monde (Knapp et al., 1998). Dès 1988, le polymorphisme très limité de HLA-E comparé aux HLA-Ia a été mis en avant (Koller et

al., 1988). En effet, une étude récente a recensé 256 allèles *HLA-E* et 110 protéines *HLA-E* (Paech et al., 2021) alors que les *HLA-Ia* ont un polymorphisme de plus de 12 000 allèles et 8 000 protéines identifiés à ce jour (Robinson et al., 2015). Toutefois, 2 allèles *HLA-E* sont majoritairement exprimés dans la population mondiale (>99%) : *HLA-E*01:01* et *HLA-E*01:03* (Felicio et al., 2014; Paech et al., 2021; Sauter et al., 2021). L'allèle *HLA-E*01:03* semble être plus ancien puisque la Gly107 est retrouvé exclusivement chez tous les orthologues *HLA-E* chez les primates non-humains (Grimsley & Ober, 1997). Les allèles *HLA-E*01:01* et *HLA-E*01:03* sont chacun retrouvés à une fréquence de 25% et l'hétérozygotie représente 50%, indépendamment de l'ethnie suggérant une sélection naturelle équilibrée (Grimsley & Ober, 1997). Une étude récente a suggéré un profil (combinaison D/R) protecteur (*HLA-E*01:01/E*01:01*) entre le donneur et le receveur suggérant que le génotype *HLA-E* aurait un impact dans les épisodes de rejet en transplantation rénale (Miranda et al., 2020). Par ailleurs, une autre étude montre une corrélation positive entre la présence d'allèles *HLA-E*01:03* chez les donneurs de rein et les réactivations à HCMV au cours de la 1^{ère} année de transplantation (Guberina et al., 2018).

Ces 2 variants protéiques ne diffèrent que sur un seul acide aminé en position 107 localisé au niveau du domaine $\alpha 2$, où l'arginine (Arg107) dans *HLA-E*01:01* est une glycine (Gly107) dans *HLA-E*01:03* (Geraghty et al., 1992; Grimsley & Ober, 1997) (**Figure 16a**). Bien que la différence entre les 2 variants protéiques soit localisée à l'extérieur de la fente de liaison du peptide cela ne conduit pas à des changements de conformation spatiale, de structure globale ou encore au niveau de l'interaction avec la $\beta 2m$. Cependant, il existe des différences au niveau du répertoire peptidique mais aussi au niveau de la stabilité de *HLA-E*. En effet, *HLA-E*01:03* est plus exprimée à la surface cellulaire que *HLA-E*01:01* et donc serait plus stable que cette dernière (Maier et al., 2000; Strong et al., 2003; Celik et al., 2016).

Un 3^e allèle *HLA-E*01:04* a été retrouvé dans la population française, anglaise et japonaise (Grant et al., 2020). Tout comme *HLA-E*01:01*, ce variant protéique diffère de *HLA-E*01:03* d'un seul acide aminé mais en position 157 où la glycine de *HLA-E*01:03* est une arginine pour *HLA-E*01:04* ce qui rendrait l'allèle moins stable par la suppression du pont salin entre l'argine en position 157 et la glutamine en position 154 (Grant et al., 2020). Cependant, une controverse existe sur l'expression de la protéine *HLA-E*01:04* (Grimsley et al., 2002) (**Figure 16b**).

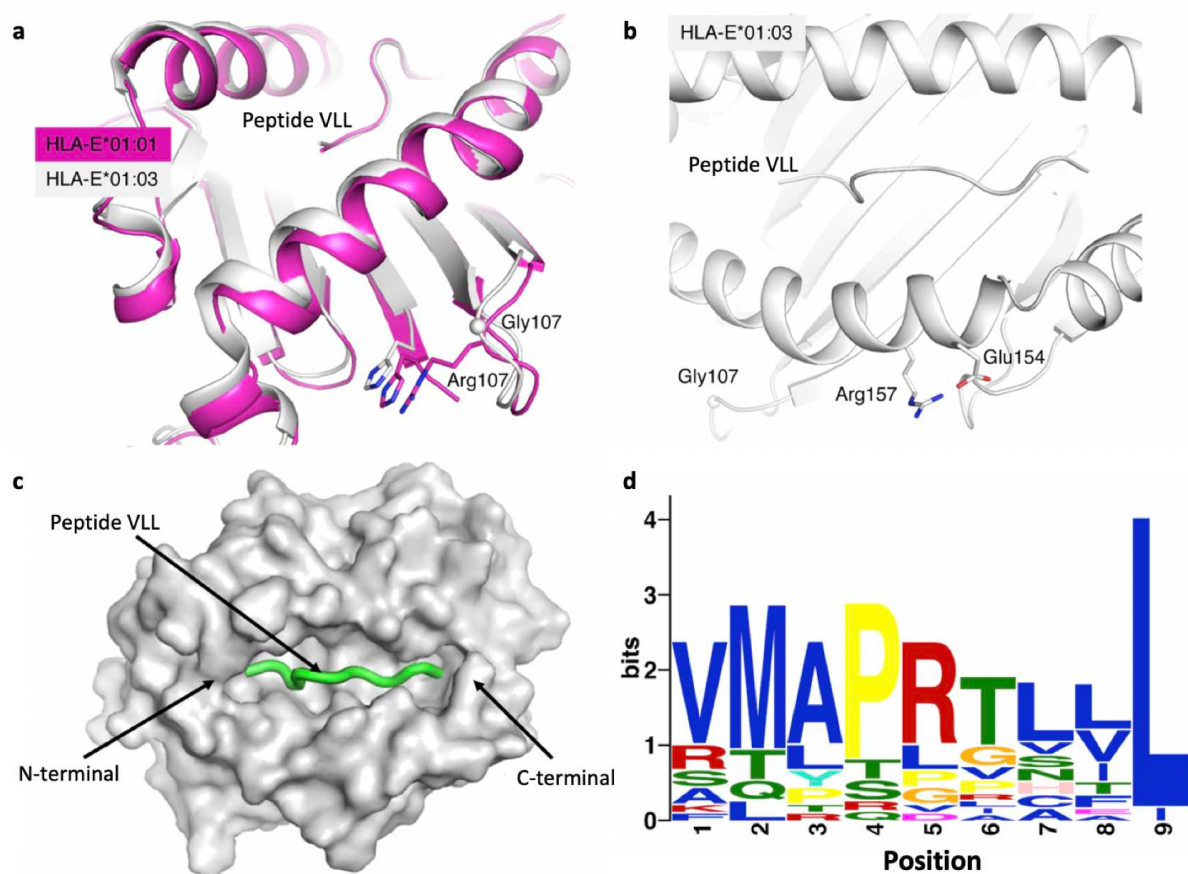


Figure 16 : Structure de la molécule HLA-E (Adaptée de Grant et al., 2020).

(a) Superposition des structures HLA-E*01:01-VLL (rose) et HLA-E*01:03-VLL (blanc/gris) montrant le polymorphisme de ces 2 molécules en position 107 sous forme de bâtonnets (Arg107) ou d'une sphère (Gly107). (b) Représentation de HLA-E*01:03 (blanc/gris) présentant le peptide VLL (boucle blanche/grise), illustrant les résidus polymorphes aux positions 157 et 107 à l'extérieur de la fente de liaison au peptide et le pont salin entre l'Arg157 et la Glu154. (c) Représentation de surface (blanche/grise) de la molécule HLA-E présentant le peptide VLL (boucle verte). (d) Motif de liaison peptidique obtenu à l'aide du motif Meme, la taille des lettres étant représentative de la conservation des résidus à cette position, plus les lettres sont grandes plus le résidu est conservé.

Arg : Arginine; Gly : Glycine ; Glu : Glutamine ; VLL : VMAPRTVLL.

1.2. Le peptidome de HLA-E

Dans des conditions dites « physiologiques », les molécules HLA-I sont exportées durant l'initiation de leur traduction vers le RE rugueux dans lequel elles vont être produites. C'est à ce moment-là que les enzymes signal peptidases (SPases) présentes dans le RE clivent la région N-terminale de la séquence signal des molécules HLA-Ia et HLA-G (Lemberg et al., 2001; Weihofen et al., 2002). De plus, dans le but de libérer des peptides optimaux nonamériques (3-11) dans le cytosol, les peptidases SPases (SPPases) vont cliver les régions hydrophobes de cette séquence (Lemberg et al., 2001; Bland et al., 2003). Puis les peptides vont être traités par le protéasome pour le transport vers le RE via TAP pour le chargement *in fine* des peptides

sur HLA-E par le PLC (Braud et al., 1998 (b)). Les protéines HLA-E stabilisées avec leurs peptides sont exportées à la membrane plasmique pour y être exprimées (Braud et al., 1998 (b)) (**Figure 16c** et **Tableau 7**).

Tableau 7 : Répertoire peptidique de HLA-E dans des conditions physiologiques : séquence et origine des peptides issus des séquences signal des molécules HLA-I (D'après Kanevskiy et al., 2019).

Peptide signal	Origine des peptides signaux des HLA-I
VMAPRTLIL	HLA-A*01, -A*03, -A*11, -A*29, -A*30, -A*31, -A*32, -A*33, -A*36 et -A*74 HLA-C*02 et -C*15
VMAPRTLVL	HLA-A*02, -A*23, -A*24, -A*25, -A*26, -A*34:02, -A*34:06, -A*43, -A*66 et -A*69
IMAPRTLVL	HLA-A*34:01
VMPRTLIL	HLA-A*80
VMAPRTLVL	HLA-B*07, -B*08, -B*14, -B*38, -B*39, -B*42, -B*48, -B*67, -B*73 et -B*81
VTAPRTLIL	HLA-B*13, -B*18, -B*27, -B*37, -B*40, -B*44, -B*47, -B*54, -B*55, -B*56, -B*59, -B*82 et -B*83
VTAPRTLVL	HLA-B*15, -B*35, -B*40, -B*41, -B*44:18, -B*45, -B*46, -B*49, -B*50, -B*51, -B*52, -B*53, -B*57, -B*58 et -B*78
VMAPRTLIL	HLA-C*01, -C*03, -C*04, -C*05, -C*06, -C*08, -C*12, -C*14, -C*16 et -C*17:02
VMAPRALIL	HLA-C*06:17, -C*07 et -C*18
VMAPRTLIL	HLA-C*08:09
VMAPQALIL	HLA-C*17:01, -C*17:03 et -C*17:05
VMAPRTLFL	HLA-G*01

La structure cristallographique de HLA-E a permis de montrer que HLA-E contient 5 résidus (3 majeurs en P2, P7, P9 et 2 mineurs en P3 et P6) d'ancrage dans le sillon de liaison au peptide contrairement au HLA-Ia qui contient en général 2 ou 3 résidus d'ancrage et d'enfouissement des acides aminés dans les poches peptidiques (P2 et P9 sur un nonamère pour HLA-A*02) (Braud et al., 1997; O'Callaghan et al., 1998) (**Figure 16d**). Ainsi, les molécules HLA-Ia sont plus flexibles permettant une présentation de peptides plus diversifiés que les molécules HLA-E (Sullivan et al., 2006).

Dans des conditions non physiologiques, le répertoire peptidique « normal » présenté par HLA-E peut être plus diversifié par des peptides issus des protéines du stress, de cancer, d'infection virale ou encore bactérienne (**Tableau 8**). En effet, indépendamment de TAP et même en absence des peptides signaux des molécules HLA-I, HLA-E peut être exprimée à la membrane grâce à cette diversité de peptides. De ce fait, la liaison du peptide à HLA-E est non seulement moins canonique mais aussi plus flexible que décrite initialement (Walters et al., 2018). Une étude menée en 2013 a pu montrer que HLA-E pouvait potentiellement lier 552

peptides de façon indépendante de TAP dont 6 peuvent se lier à HLA-A*02 (Lampen et al., 2013). Concernant les 2 protéines majoritairement exprimées et codées par HLA-E*01 :01 et HLA-E*01 :03, 36 peptides sont capables de se lier à HLA-E*01 :01 dont 27/36 avec une taille supérieure à 10 acides aminés (Kraemer et al., 2015) alors que 56 peptides sont capables de se lier à HLA-E*01 :03 allant de 9 à 17 acides aminés (Celik et al., 2016). En l'absence des molécules HLA-I, la comparaison du répertoire peptidique présenté par HLA-E*01 :03 ou par HLA-E*01 :01, n'indique aucun chevauchement des 2 répertoires peptidiques indiquant un peptidome différent pour ces 2 protéines HLA-E. (Celik et al., 2016).

Tableau 8 : Répertoire peptidique de HLA-E dans des conditions pathologiques : séquence et origine des peptides (D'après Kanevskiy et al., 2019; Voogd et al., 2022).

Peptide	Origine des peptides
QMRPVSRVL	Hsp60
ALALVRMLI	ABC de la protéine MRP7
VMAPRTL(I/V/L)L	UL40 du HCMV
YLLPRRGPRL	Core de VHC
SQAPLPCVL	BZLF1 de l'EBV
AISPRTLNA	P24 du VIH
RMAATAQVL, RMPPLGHEL, RLPKAPLL	Mtb14, P49, Mtb44 de <i>Mycobacterium tuberculosis</i>
GMQFDRGYL	GroEL de la <i>Salmonella typhimurium</i> sevarar Typhi

1.3. HLA-E : Le ligand de 2 types de récepteurs fonctionnellement différents

1.3.1. HLA-E et les récepteurs CD94/NKG2

Dès 1998, plusieurs équipes ont démontré que les peptides issus des séquences leader présentés par HLA-E pouvaient inhiber la lyse des cellules NK et que l'inhibition de la lyse passait par l'interaction de HLA-E avec CD94/NKG2A (Borrego et al., 1998; Braud et al., 1998 (a); Lee et al., 1998). NKG2A appartient à la famille des récepteurs NKG2 composée de 6 autres membres, NKG2B, NKG2C, NKG2D, NKG2E, NKG2F et NKG2H (Lanier, 1998). Qui plus est, les membres NKG2B et NKG2C de cette famille sont également capables de s'associer avec CD94, ces 2 complexes pouvant être reconnus par HLA-E (Kanevskiy et al., 2019). NKG2A et NKG2B sont 2 isoformes issues du même gène *NKG2A*, possédant au sein de leur domaine intracytoplasmique des éléments de Motifs d'inhibition des récepteurs immunologiques

contenant des tyrosines/ Immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motifs (ITIM) et transmettant des signaux inhibiteurs (Rölle et al., 2018). Ces 2 protéines diffèrent par l'absence du fragment membranaire proximal dans la partie extracellulaire de NKG2B (Kanevskiy et al., 2019). Cependant, le rôle de NKG2B demeure encore mal connu. Quant à NKG2C, ce récepteur agit comme un activateur lors de son interaction avec HLA-E induisant la lyse de la cellule cible (Braud et al., 1998 (a)). Dépourvu de motifs ITIM, il s'associe à CD94 et DAP12 qui est elle-même associée à un motif non pas ITIM mais ITAM jouant ainsi un rôle activateur (Grant et al., 2020).

La structure cristallographique du complexe CD94/NKG2A-HLA-E a permis de déterminer que CD94 se lie sur l'hélice $\alpha 1$ et NKG2A sur l'hélice $\alpha 2$ de HLA-E (Kaiser et al., 2008; Petrie et al., 2008) (**Figure 17**). Contrastant avec la conformation du système adaptatif dans la reconnaissance du peptide, l'interaction CD94/NKG2A avec HLA-E présente une conformation de « clé et serrure » (Petrie et al., 2008). L'interaction avec HLA-E/peptide est dominée par CD94 alors que NKG2A n'interagit qu'avec une petite région de l'hélice $\alpha 2$ de HLA-E et par une seule liaison hydrophobe avec le peptide (Kaiser et al., 2008; Petrie et al., 2008). CD94 domine également dans l'interaction avec le peptide en interagissant avec les résidus Arg en P5, Thréonine (Thr) en P6 et Phénylalanine (Phe) en P8, P5 et P8 étant les positions déterminantes de la reconnaissance du peptide par le complexe CD94/NKG2A (Kaiser et al., 2008; Petrie et al., 2008).

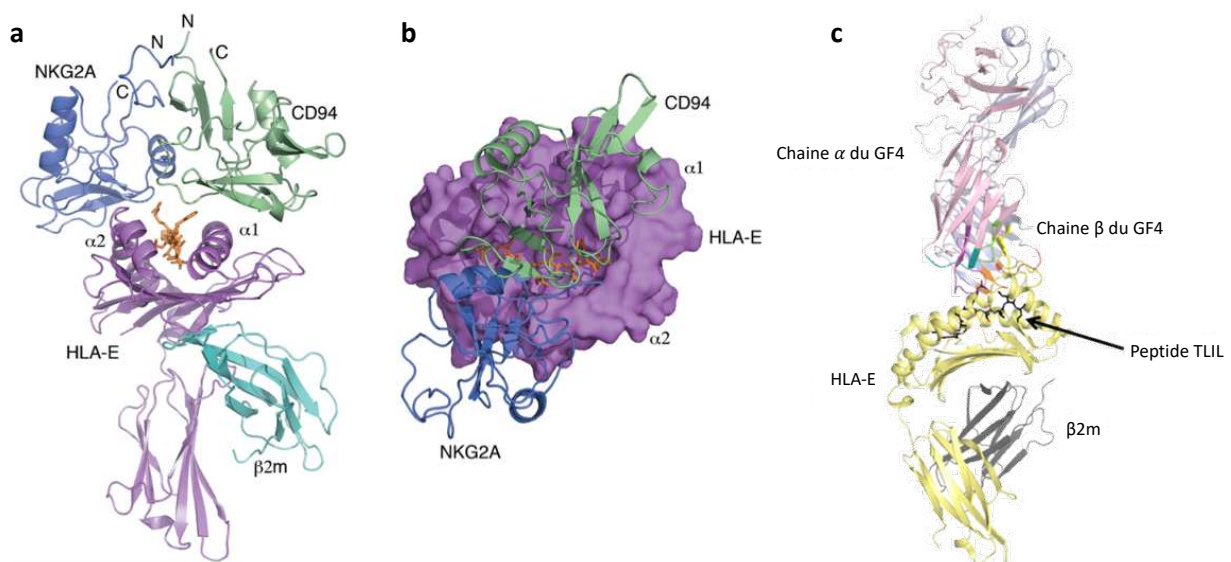


Figure 17 : Structure cristallographique du complexe CD94/NKG2A-HLA-E/VMAPRTLFL et du complexe TCR GF4-HLA-E/VMAPRTLIL (Adaptée de Petrie et al., 2008; Sullivan et al., 2017).

(a) Vue latérale et (b) vue de surface du complexe CD94/NKG2A interagissant avec HLA-E/VMAPRTLFL. CD94 et NKG2A sont représentés par des rubans bleu et vert pâle, la chaîne lourde de HLA-E par en violet, la $\beta 2m$ en cyan,

le peptide VMAPRTLFL par des bâtonnets orange. (c) Vue latérale du complexe TCR GF4 interagissant avec HLA-E/VMAPRTLIL (peptide TLIL). La structure de HLA-E est en jaune, le peptide TLIL par des batonnets noirs, la β 2m en gris, la chaîne α du TCR en rose et la chaîne β en bleu.

Les complexes CD94/NKG2A ou CD94/NKG2C sont exprimés par les cellules NK et par certaines sous-populations de cellules T (Mingari et al., 1996; Braud et al., 1998 (a) ; Lee et al., 1998). L'expression de NKG2C sur les cellules NK a été associée à l'infection par le HCMV (Gumá et al., 2004; López-Botet et al., 2014). Le HCMV favorise l'expression de HLA-E par les cellules infectées pour permettre une interaction avec le complexe CD94/NKG2A qui est un récepteur inhibiteur dans l'activité des cellules NK. Toutefois, une population de cellules NK exprimant NKG2C est capable de reconnaître les peptides issus de UL40 présentés par HLA-E, permettant ainsi la stimulation de la cytotoxicité et la production de cytokines. On appelle ces cellules des NK adaptatives (Hammer & Romagnani, 2017; Hammer et al., 2018). Les cellules peuvent entraîner deux effets opposés de par la présentation via HLA-E de peptides alternatifs, les rendre sensibles à la lyse par l'inhibition via CD94/NKG2A ou leur permettre d'échapper à la lyse via CD94/NKG2A+ dans les contextes du stress (Michaëlsson et al., 2002; Wooden et al., 2005), du VIH (Nattermann, et al., 2005 (a)), du virus de l'hépatite C (VHC) (Nattermann, et al., 2005 (b)) ou encore dans le contexte du HCMV (Tomasec, 2000; Ulbrecht et al., 2000; Heatley et al., 2013). En outre, certains variants de la protéine UL40 du HCMV pourraient contribuer au développement du CLAD (Vietzen et al., 2021). Le variant VMTPTLIL issu de UL40 est sur-représenté chez les patients développant un CLAD et conduit à une baisse de la prolifération des cellules NK CD94/NKG2A+ (Vietzen et al., 2021).

1.3.2. HLA-E et le TCR des LT

HLA-E est également le ligand du TCR exprimé sur les LT CD8+ (**Figure 17c**). Ces cellules expriment également le complexe NKG2 (A/C)-CD94 (Pump et al., 2019), ce qui implique que les LT CD8 restreints par HLA-E possèdent 2 récepteurs d'HLA-E à leur surface. Certains contextes pathologiques tels que le stress, les infections bactériennes (*Mycobacterium tuberculosis* et *Salmonella enterica*) ou les infections virales (HCMV) peuvent induire la génération de LT CD8+ cytotoxiques reconnaissant spécifiquement les molécules HLA-E présentant ces peptides alternatifs (Sharpe et al., 2019; Voogd et al., 2022). Les peptides issus de UL40 du HCMV peuvent être chargés sur HLA-E et reconnus par des LT CD8 restreints par

HLA-E/UL40 qui expriment un TCR $\alpha\beta$ et des récepteurs des cellules NK (Pietra et al., 2001; Romagnani et al., 2002).

II. Les LT CD8 restreints par HLA-E anti-HCMV

L'étude réalisée par l'équipe de Mingari et Moretta a décrit pour la première fois en 2001, qu'une fraction de LT CD8+ cytolytiques avait la particularité d'être des LT CD8+ de type mémoires et pouvant lyser des cibles des cellules NK. Elles ont donc été nommées initialement « NK-CTL ». Plus précisément, elles sont capables de lyser des cibles des cellules NK à l'exception de celles dépourvues de la $\beta 2m$ mais qui peuvent être lysées si on leur fait exprimer de la $\beta 2m$, indiquant une lyse dépendante de la présence de $\beta 2m$ à la surface des cellules cibles. Par un modèle de cellules RMA-S déficientes en TAP2 murin, ils ont pu montrer que ces cellules étaient capables de reconnaître des molécules HLA-E (Pietra et al., 2001). Ces cellules exprimaient un TCR $\alpha\beta$ $\beta 16$ ou $\beta 9$ ou $\beta 3$.

Un an plus tard, il a été montré que ces cellules expriment les récepteurs inhibiteurs des cellules NK spécifiques des HLA-I, ILT2/LIR1 et CD94 associés ou non à NKG2A. Elles sont également capables de proliférer dans des cultures mixtes de lymphocytes en réponse à des cellules allogéniques. Leurs expériences sur différents peptides chargés sur HLA-E ont suggéré que ces cellules cytolytiques pourraient reconnaître HLA-E chargé avec des peptides du Non-Soi et lyser les cellules (Romagnani et al., 2002).

Cette même équipe a précisé dans une autre étude que ces LT CD8 restreints par HLA-E pouvaient reconnaître avec une haute avidité, le peptide signal en 15-23 de la protéine UL40 de différentes souches du HCMV. De plus, la reconnaissance de ces peptides présentés par HLA-E induit la cytotoxicité, la production d'IFN γ et leur prolifération. Les cellules autologues qui sont chargées avec des peptides issus du HCMV sur HLA-E deviennent alors susceptibles à la lyse par ces LT. Toutefois, les peptides issus de UL40 étaient proches de la séquence du peptide signal de la molécule de CMH-Ia mais ces LT ne reconnaissent que les complexes HLA-E/peptides qui sont du Non-Soi. D'autres TCR $\alpha\beta$ que les TCR $\alpha\beta$ $\beta 16$, $\beta 9$ et $\beta 3$ ont pu être retrouvés exprimés par ces LT, les TCR $\alpha\beta$ $\beta 22$ et $\beta 5.1$ (Pietra et al., 2003).

C'est en 2005 que ces LT restreints par HLA-E ont été détectés et quantifiés à l'aide de complexes tétramère HLA-E/peptide (VMAPRTLIL) chez des individus sains HCMV+. Il a été montré que ces cellules étaient présentes dans une large fraction des PBMC (représentant

0,4% des PBL et 1,1% des LT CD8+ circulants). Il a également été identifié que les peptides issus du HCMV sont processés naturellement par le transporteur associé de manière indépendante au TAP2. De plus, cette population est capable non seulement de reconnaître les cellules infectées par le HCMV mais aussi de les lyser. Cette étude a bel et bien confirmé la capacité de production de perforine, Gzm (A et B) mais également qu'après une stimulation antigénique, ces cellules sont capables de produire du TNF α et de l'IFN γ mais pas d'IL2. Qui plus est, un premier phénotype de ces cellules a pu être déterminé, qui ferait d'elles des cellules effectrices mémoires (CD45RA+ CD45RO- CCR7- CD28- CD27-) (Mazzarino et al., 2005).

L'étude menée en 2006 était axée sur la description de la base structurelle de la réponse T restreinte par le CMH-Ib, HLA-E et a ainsi permis d'identifier que cette réponse était spécifique de la position 8 du peptide viral. La structure du complexe TCR-HLA-E s'est avérée être très similaire au complexe des cellules conventionnelles TCR-CMH-Ia. La fréquence de ces populations chez les donneurs sains (HV) HCMV+ était également similaire à celles restreintes par HLA-A2 et dirigées contre pp65 (représentant 0,3% des PBL) (Hoare et al., 2006).

Notre équipe a également réalisé la détection et la quantification des LT CD8 restreints par HLA-E confirmant que cette population pouvait représenter une fraction non négligeable dans le sang. Ces LT ont été estimés à 3,4% des PBL et 14% des T CD3+ CD8+ dans cette étude. En effet, la poursuite de l'étude phénotypique a permis de confirmer un phénotype de cellules effectrices-mémoires exprimant des récepteurs NK. Du fait de la capacité de ces cellules à pouvoir être réactives à la fois contre des peptides issus des séquences signal de UL40 du HCMV et des molécules HLA-Ia cela leur conférerait non seulement la capacité de contribuer au contrôle de l'infection *in vivo* mais aussi de médier directement le rejet de greffe. Cette médiation du rejet de greffe viendrait du fait qu'elles pourraient reconnaître des peptides issus des molécules HLA-Ia allogéniques du greffon. En effet, cette étude a mis en avant qu'en plus de leur capacité de reconnaissance et de lyse de cellules infectées, elles sont capables de faire de même avec les cellules endothéliales allogéniques *in vitro* mais que cette reconnaissance est strictement régulée par les récepteurs NK dont KIR2DL2 (Allard et al., 2012).

Dans ce contexte de transplantation et de rejet, l'étude de Sullivan en 2015 a réalisé la détection de la réponse T CD8 restreinte par HLA-E spécifique du HCMV dans des échantillons de PBMC issus de 15 LTR. Non seulement les fréquences de ces LT étaient variables entre les

individus mais la présence de cette réponse était également corrélée au rejet chronique de l'allogreffe, le BOS (Sullivan et al., 2015).

Cette même équipe a poursuivi l'étude des LT CD8 restreints par HLA-E anti-HCMV au niveau de sa reconnaissance de la molécule HLA-E. Les membres de cette équipe ont pu montrer que ces LT peuvent reconnaître HLA-E par un TCR TRBV14 (β 16) mais également par un TCR TRBV9. Le TCR TRBV9+ adopte un mode d'ancrage et une empreinte moléculaire différents au sommet d'HLA-E en comparaison à la structure TCR TRBV14-HLA-E en plus d'une différence de spécificité entre ces 2 TCR (Sullivan et al., 2017).

La fréquence, la spécificité et le phénotype des LT CD8 HLA-E/UL40 n'étant pas encore bien connus, notre équipe a tout d'abord réalisé une détection et une quantification de ces cellules sur une large cohorte de KTR ($n = 121$) et sur une cohorte d'HV ($n = 25$). La détection a été réalisée à partir d'un panel de différents peptides issus de UL40. Ainsi, cette réponse a pu être retrouvée chez 32% des individus séropositifs (KTR et HV) et cette population pouvait représenter jusqu'à 38% des LT CD8+ circulants. De plus, l'incidence des LT CD8 HLA-E/UL40 est affectée par le génotype *HLA-E*01:01/01:03* et la séquence du peptide du HCMV de la souche infectante. Cette étude a également permis de compléter les travaux sur le répertoire TCR β permettant d'identifier au total 16 TCR β (β 1, 2, 3, 5.1, 7.1, 8, 9, 12, 13.1, 13.2, 13.6, 14, 16, 17, 22 et 23) dont certains n'avaient pas encore été décrit pour cette réponse anti-HCMV. L'identification de nouveaux TCR β permet de dire que les LT CD8 HLA-E/UL40 n'ont pas un répertoire TCR restreint. Tout comme dans les études de Mazzarino et Allard, le phénotype de ces cellules correspond à des effecteurs-mémoires CD8+. De plus ces LT spécifiques de UL40 (AA15-23 de la séquence du peptide signal de UL40) sont réactifs contre un large panel de peptides nonamériques variant de 1 à 3 résidus ce qui inclut les peptides signaux des HLA-Ia. Par cette homologie de cette séquence, les LT CD8 HLA-E/UL40 auraient potentiellement une réactivité allogénique et/ou autologue (Jouand et al., 2018), comme suggéré dans les études précédentes.

Une étude récente en lien avec l'étude de Allard sur la régulation stricte de cette réponse, a distingué les LT CD8 HLA-E/UL40 avec une haute affinité pour HLA-E de ceux qui ont une moindre affinité pour cette molécule liée à leur expression de récepteurs des NK KIR2DL1 et KIR2DL2/L3 ou NKG2C respectivement. Les LT avec un TCR de haute affinité sont régulés par l'interaction du récepteur KIR2D avec HLA-C. Comme indiqué dans l'étude de

Allard en 2012, cela permettrait de réguler les LT CD8 HLA-E/UL40 en leur évitant l'auto-réactivité (Sullivan et al., 2021).

Dans la même année, l'étude de Sottile et al., a montré que l'expansion d'une population de LT CD8⁺ NKG2C⁺ suite à une infection à HCMV. Ces cellules T CD8⁺ NKG2C⁺ présentent une diminution de BCL11B au niveau transcriptionnel et protéique. Bcl11b est exprimé dans toutes les sous-populations de cellules T et un régulateur de la destinée des cellules T en contrôlant le programme de transcription qui prévient le développement des lymphocytes vers un phénotype de type NK. Cette même étude a également confirmé le profil phénotypique effecteur mémoire observé par les précédents travaux concernant les LT CD8 HLA-E/UL40. Ces LT CD8⁺ possèdent également une capacité cytolytique envers les cellules leucémiques et les fibroblastes infectées par le HCMV (Sottile et al., 2021).

Objectifs

Le groupe de Béatrice Charreau s'intéresse à l'expression et au polymorphisme des molécules HLA-E dans le contexte de la transplantation et du cancer. Ses travaux ont décrit l'expression des formes membranaires et solubles de HLA-E dans des conditions physiologiques, inflammatoires (Coupel et al., 2007) par l'endothélium et les cellules tumorales (Derré et al., 2006; Allard et al., 2011). De façon complémentaire, le groupe de Béatrice Charreau étudie depuis plusieurs années une population de LT CD8 restreinte par HLA-E et dirigée contre des peptides issus de la protéine UL40 (LT CD8 HLA-E/UL40) du HCMV. Les travaux de thèse de Allard ont, en particulier, permis d'identifier cette population de LT CD8+ chez un KTR HCMV+ et de montrer la capacité de ces LT à reconnaître et à lyser des cellules endothéliales exprimant HLA-E (Allard et al., 2012). Plus récemment, ces travaux ont décrit la présence et la fréquence de cette population dans une cohorte de KTR et a également montré que cette réponse lymphocytaire est présente chez plus de 30% des receveurs HCMV+. Une fois induite cette population semble persister dans le temps chez ces individus. En raison de l'homologie de séquence entre les peptides issus de la protéine virale UL40 et les peptides signaux du HLA de classe I, cette réponse dirigée contre le HCMV pourrait également reconnaître et lyser des cellules, telles que les cellules endothéliales, d'un greffon allogénique et donc être impliquée dans le rejet. Ces résultats ont été publiés en 2018 (Jouand et al., 2018). Il n'existe à l'heure actuelle pas de description approfondie du phénotype et des fonctions des LT CD8 HLA-E/UL40 dans un contexte de transplantation. Leur possible implication dans les mécanismes de rejet aigu cellulaire ou chronique n'est pas connue.

Ce **projet de thèse** avait pour objectif une meilleure caractérisation de cette population de LT CD8+ et l'étude de l'incidence de cette réponse T CD8+ spécifique du HCMV sur le rejet chronique chez les patients transplantés.

Mon projet de recherche s'articulait autour de **deux axes principaux** :

- Axe 1 : **Réponses T CD8 HLA-E/UL40 : Phénotype et fonctions**
 - **Définir le phénotype** de cette population de LT CD8 restreinte par HLA-E/UL40 chez les KTR ayant fait une primo-infection ou une réactivation à HCMV. Nous

avons comparé ce phénotype à celui observé chez des HV HCMV+ avec donc une infection en phase chronique.

- **Comparer ce phénotype** à celui de la réponse « conventionnelle » T CD8 restreinte par HLA-A2/pp65 pour définir des marqueurs communs et exclusifs à ces réponses chez les KTR et des HV HCMV+.
- **Définir et comparer les fonctions de ces deux populations T CD8+** et en particulier leur activité cytotoxique, leur capacité à proliférer et à produire des cytokines.

- **Axe 2 : Réponses T CD8 HLA-E/UL40 et Rejet chronique**

Dans le but d'explorer le rôle des LT CD8 HLA-E/UL40 induits par le HCMV dans le rejet chronique et le contrôle de l'infection, nous avons développé une étude chez des receveurs de greffe pulmonaire. Le taux de rejet chronique en transplantation pulmonaire est très important de l'ordre de 50% à 5 ans et les infections par le HCMV sont plus sévères et fréquentes.

Cet axe porte sur l'étude de la réponse T CD8 HLA-E/UL40 chez des LTR infectés par le HCMV et comprend :

- **Une étude de la fréquence et du phénotype** des LT CD8 HLA-E/UL40 post-greffe chez des receveurs HCMV+.
- **L'étude de l'impact de la réponse T CD8 HLA-E/UL40 dans le rejet chronique (CLAD)** chez des LTR.

De plus, pour traiter les questions scientifiques posées dans les axes 1 et 2, nous avons également développé une approche méthodologique visant à mettre au point une méthode d'immunomarquage et d'analyse en cytométrie spectrale pour détecter, quantifier et caractériser les populations lymphocytaires spécifiques du HCMV dont les LT CD8 HLA-E/UL40. Cette partie a fait l'objet d'un article publié en 2021 et présenté dans la partie « Résultats » de mon manuscrit.

L'ensemble des résultats obtenus sont décrits dans les 3 parties du chapitre « Résultats ».

Résultats

Partie 1 : Mise au point d'un protocole d'immunomarquage pour l'étude par cytométrie en flux spectrale des réponses immunes induites en réponse à une infection à HCMV

Résumé

Le HCMV induit la mise en place de réponses immunitaires cellulaires variées et complexes qui laissent une empreinte persistante sur le système immunitaire de l'hôte. Le but de cette étude était la mise au point d'un protocole d'immunomarquage pour l'étude par la cytométrie en flux spectrale des réponses immunes anti-HCMV pour (1) quantifier la fréquence et (2) définir le phénotype des diverses populations immunitaires induites par le HCMV comprenant les LT $\alpha\beta$ CD8+, les LT $\gamma\delta$, et les cellules NK. De manière à cartographier et caractériser les diverses réponses cellulaires après une infection à HCMV, nous avons mis au point une méthode utilisant à la fois des complexes tétramères HLA/peptide et un panel d'anticorps pour 18 marqueurs de surface (CD3, CD4, CD8, CD16, CD19, CD45RA, CD56, CD57, CD158, NKG2A, NKG2C, CCR7, TCR $\gamma\delta$, TCR $\gamma\delta$ 2, CX3CR1, KLRG1, 2B4 et PD1). Pour l'étude des T CD8 spécifiques des antigènes du HCMV, l'utilisation du complexe tétramère HLA-A2/pp65 (HLA-A2/NLVPMVATV) et de 2 complexes tétramères HLA-E/UL40 (HLA-E/VMAPRTLIL et HLA-E/VMAPRSLLL) permettent d'étudier en parallèle une réponse T CD8 dite « conventionnelle » restreinte par les molécules HLA-A2 et les réponses T CD8 dites « non conventionnelles » restreintes par HLA-E. Notre protocole a été mis au point avec des PBMC isolés à partir de HV HCMV- (n = 4) et HCMV+ (n = 4). Cette méthode permet la détermination efficace des événements faisant suite à une infection à HCMV tels que la modification du ratio CD4/CD8 vers une inflation et une différenciation des LT $\alpha\beta$ CD8+. De plus, d'autres événements peuvent être quantifiés comme la fréquence des LT CD8+ spécifiques du HCMV, l'expansion de sous-populations T $\gamma\delta$ et NK comprenant les LT TCR $\gamma\delta$ δ 2- et les NK mémoires NKG2C+ CD57+, la fréquence de ces populations restant élevée longtemps après l'infection. Les marqueurs de surface 2B4, PD1, CD45RA, CCR7, CD158, NKG2A peuvent être utilisés pour améliorer la caractérisation phénotype des diverses populations anti-HCMV. La mise au point de ce protocole et sa standardisation permettra la caractérisation et le suivi des réponses lymphocytaires T et NK après une infection à HCMV dans des cohortes de patients.

Article 1

Mapping and Characterization of HCMV-Specific Unconventional HLA-E Restricted CD8 T Cell Populations and Associated NK and T Cell Responses Using HLA/peptide Tetramers and Spectral Flow Cytometry

Amélie Rousselière, Laurence Delbos, Céline Bressolette, Mailys Berthaume and Béatrice Charreau

Int. J. Mol. Sci., **2022**, 23(1), 263 ; <https://doi.org/10.3390/ijms23010263>



Article

Mapping and Characterization of HCMV-Specific Unconventional HLA-E-Restricted CD8 T Cell Populations and Associated NK and T Cell Responses Using HLA/Peptide Tetramers and Spectral Flow Cytometry

Amélie Rousselière, Laurence Delbos, Céline Bressollette , Mailys Berthaume and Béatrice Charreau *

Citation: Rousselière, A.; Delbos, L.; Bressollette, C.; Berthaume, M.; Charreau, B. Mapping and Characterization of HCMV-Specific Unconventional HLA-E-Restricted CD8 T Cell Populations and Associated NK and T Cell Responses Using HLA/Peptide Tetramers and Spectral Flow Cytometry. *Int. J. Mol. Sci.* **2022**, *23*, 263.

<https://doi.org/10.3390/ijms23010263>

Academic Editors: Manlio Ferrarini and Patricia Price

Received: 4 November 2021

Accepted: 22 December 2021

Published: 27 December 2021

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2021 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

INSERM, Center for Research in Transplantation and Translational Immunology, Nantes Université, UMR 1064, CHU Nantes, F-44000 Nantes, France;

amelie.rousseliere@etu.univ-nantes.fr (A.R.); Laurence.Delbos@univ-nantes.fr (L.D.); celine.bressollette@chu-nantes.fr (C.B.); mailys.berthaume@etu.univ-nantes.fr (M.B.)

* Correspondence: Beatrice.Charreau@univ-nantes.fr; Tel.: +33-240-087-416

Abstract: HCMV drives complex and multiple cellular immune responses, which causes a persistent immune imprint in hosts. This study aimed to achieve both a quantitative determination of the frequency for various anti-HCMV immune cell subsets, including CD8 T, $\gamma\delta$ T, NK cells, and a qualitative analysis of their phenotype. To map the various anti-HCMV cellular responses, we used a combination of three HLA_{peptide} tetramer complexes (HLA-E_{VMAPRTLIL}, HLA-E_{VMAPRSLLL}, and HLA-A2_{NLVPMVATV}) and antibodies for 18 surface markers (CD3, CD4, CD8, CD16, CD19, CD45RA, CD56, CD57, CD158, NKG2A, NKG2C, CCR7, TCR $\gamma\delta$, TCR $\gamma\delta$ 2, CX3CR1, KLRG1, 2B4, and PD-1) in a 20-color spectral flow cytometry analysis. This immunostaining protocol was applied to PBMCs isolated from HCMV⁻ and HCMV⁺ individuals. Our workflow allows the efficient determination of events featuring HCMV infection such as CD4/CD8 ratio, CD8 inflation and differentiation, HCMV peptide-specific HLA-E_{UL40} and HLA-A2_{pp65}CD8 T cells, and expansion of $\gamma\delta$ T and NK subsets including $\delta\gamma$ T and memory-like NKG2C⁺CD57⁺ NK cells. Each subset can be further characterized by the expression of 2B4, PD-1, KLRG1, CD45RA, CCR7, CD158, and NKG2A to achieve a fine-tuned mapping of HCMV immune responses. This assay should be useful for the analysis and monitoring of T-and NK cell responses to HCMV infection or vaccines.

keywords: HLA-E; CD8 T cells; NK; $\gamma\delta$ T; HCMV; pHLA tetramers; spectral flow cytometry

Int. J. Mol. Sci. **2022**, *23*, 263. <https://doi.org/10.3390/ijms23010263>
<https://www.mdpi.com/journal/ijms>

1. Introduction

Human cytomegalovirus (HCMV; human herpesvirus 5, HHV5) is the prototype member of β -herpesvirus family and a widespread opportunistic pathogen. In healthy individuals, primary infection is subclinical and is followed by a life-long, persistent infection that is controlled by host immune system [1]. However, HCMV is a major cause of morbidity and mortality in immunocompromised individuals such as transplant recipients and patients with HIV infection. Immune response against HCMV is complex, multifactorial, and includes a set of persistent and virus-specific effector NK and CD8 $\alpha\beta$ T and $\gamma\delta$ T cell populations [2–4]. These effector cells display cytotoxic functions devoted to eliminating infected cells and preventing further HCMV reactivation [5,6]. HCMV-reactive CD8 $\alpha\beta$ T cells against viral peptides (pp65, IE1, etc.) presented by conventional MHC class I (HLA-A and HLA-B) molecules have been well characterized [7]. These conventional CD8 T cell responses are usually associated with an efficient control of infection [5]. In addition, CD8 T cell responses bearing $\alpha\beta$ TCR but recognizing non-classical MHC, and HLA-E molecules presenting peptides derived from HCMV UL40 protein have emerged as non-conventional T cell responses, also observed in HCMV seropositive (HCMV⁺) hosts including transplant recipients and healthy individuals [8–10]. In a previous study, we have detected HLA-E-restricted CD8 T targeting UL40 peptides (HLA-E_{UL40} CD8 T) in more than 30% of HCMV⁺ kidney transplant recipients. We have shown that HLA-E_{UL40} CD8 T cell responses may represent up to 30% of total blood CD8 T cells in a host post-infection [11].

In contrast to conventional HLA class I-restricted anti-HCMV CD8T cells, the frequency, the peptide-specificity, and the function of HLA-E_{UL40} CD8 T cell responses remain

mostly unknown [12]. Although the first pieces of knowledge have been reported on the phenotype and functions of HLA-E_{UL40} CD8 T cells, a broader characterization of their phenotype in comparison with other, conventional anti-HCMV HLA-I-restricted CD8 T such as HLA-A*02pp65 and HLA-A*02IE1 cells remains to be established. Concerning their functions, previous studies reported that HLA-E_{UL40} CD8 T cells can be activated in vitro and display cytotoxic activity against cellular targets, such as endothelial cells, expressing HLA-E molecules loaded with UL40 peptides [11–13]. The specific implication of anti-HCMV HLA-E_{UL40} CD8 T cells to the immune control of HCMV infection is still unknown. It can be speculated that, similar to other HCMV-specific CD8 T cells, HLA-E-restricted cytotoxic T cells (CTL) patrol to detect and eliminate infected cells. Another non-exclusive function for HLA-E-restricted CTL could be to ensure the regulation of other anti-HCMV cellular responses such as NK or $\gamma\delta$ T or CD4T cells. Importantly, due to a full sequence homology between the UL40 peptides frequently provided by HCMV strains and some HLA class I peptides, both presented by HLA-E, it has been established that anti-HCMV HLA-E_{UL40} CD8 T cell responses may cross-react with allogeneic HLA in the setting of solid organ transplantation [11]. Whether this cross-recognition of donor HLA-E_{HLA-I} on allograft could mediate transplant injury and rejection remains to be determined. Nevertheless, the biological relevance of this persistent CD8 T cell subset in the course of HCMV infection and recovery is still unknown.

Detection and analysis of HCMV antigen-specific CD8 T cells require the use of HLA monomers loaded with viral peptides. The interaction between the peptide-HLA (pHLA) complex and a cognate TCR is short lived and of low affinity. By way of multimerization of four peptide-HLA molecules on a streptavidin scaffold, tetramers increase the avidity of the pHLA:TCR interaction by engaging several of the TCRs expressed on a specific T cell, thereby stabilizing the interaction [14]. This allows for direct and specific staining of the T cells. pHLA tetramers provide a simple, fast, and efficient approach for monitoring and handling specific T cells in patients. Peptide-HLA tetramers can be used to identify specific T cells without further in vitro manipulation, and they allow for a simultaneous evaluation of the differentiation state through co-staining for various cell surface markers for differentiation, activation, and exhaustion [15–17]. Spectral flow cytometry measures the complete emission spectrum to identify fluorochromes. Consequently, in contrast to conventional flow cytometry, spectral flow cytometry is able to differentiate fluorochromes with significant overlap in the emission spectra, enabling the use of spectrally similar fluorochrome pairs in a single assay and thus increasing the number of protein markers that can be analyzed concomitantly [18,19]. The present study presents the set up and validation of a method based on the use of a set of HLA-A_{peptide} and HLA-E_{peptide} complexes in combination with antibodies for 20 cell markers for the concomitant detection, quantification, and immunophenotyping of non-conventional anti-HCMV HLA-E_{UL40} CD8 T cells, conventional HLA-A*02:01_{pp65} and other immune responses including NK and $\gamma\delta$ T cell subsets regulated upon HCMV infection.

2. Results

2.1. Quantitative Assessment of CD8 $\alpha\beta$ T Cells in Response to HCMV Infection: CD8 Inflation and Frequencies of Anti-HCMV Peptide-Specific CD8 T Cells

Here, to define our ability to map the various anti-HCMV cellular responses postinfection, we used a combination of three pHLA tetramer complexes (HLA-E_{VMAPRTLIL}, HLA-E_{VMAPRSLLL}, HLA-A2_{NLVPMVATV}) and antibodies for 18 surface markers (CD3, CD4,

CD8, CD16, CD19, CD45RA, CD56, CD57, CD158, NKG2A, NKG2C, CCR7, TCR $\gamma\delta$, TCR $\gamma\delta$ 2, CX3CR1, KLRG1, 2B4, and PD-1) in a 20-color multiparameter flow cytometry analysis. For validation, our immunostaining protocol was applied to PBMCs isolated from HCMV- ($n = 4$) and HCMV+ ($n = 4$) individuals and cytometry data were analyzed post-acquisition as follows.

2.1.1. Lymphocyte Gating

As an initial gating strategy to discriminate anti-HCMV NK and T cell populations (Figure 1), both forward and side scatter (FSC-Area (A) vs. FSC- Height (H) and SSC-H vs. SSC-A) dot plots were used to exclude doublets and to target singlets only (Figure 1A). Next, FSC vs. SSC gating was used to identify lymphocytes based on size and granularity. It is often suggested that forward scatter indicates cell size, whereas side scatter relates to the complexity or granularity of the cell. This gating strategy is also used to exclude debris, as they tend to have lower forward scatter levels. They are found at the bottom left corner of the FSC vs. SSC density plot. Next, live cells were selected using Fixable Viability Stain 440UV as a viability marker. This dye reacts with and covalently binds to cell-surface and intracellular amines. Permeable plasma cell membranes, such as those present in necrotic cells, allow for the intracellular diffusion of the dye and covalent binding to higher overall concentrations of amines than in non-permeable live cells. Using the expression for CD3 and $\gamma\delta$ TCR allows us to determine three lymphocyte subsets: CD3⁻ $\gamma\delta$ TCR⁻ cells including mostly B lymphocytes and NK cells, CD3⁺ $\gamma\delta$ TCR⁻ cells including mostly $\alpha\beta$ TCR T cells, and finally, CD3⁺ $\gamma\delta$ TCR⁺ cells, which include $\gamma\delta$ T cells (Figure 1A). Thus CD3/ $\gamma\delta$ TCR costaining provides the distribution of these three subsets among PBMC samples issued from HCMV⁺ patients and controls and may be indicative of $\gamma\delta$ TCR inflation post-infection.

2.1.2. CD4/CD8 Ratio.

CD4 and CD8 expression was then examined in the CD3⁺ $\gamma\delta$ TCR⁻ lymphocyte population to define the percentage of CD4⁺ T cells, CD8⁺ T cells as well as double positive and negative CD3⁺ T cells (Figure 1B). As illustrated in Figure 1C, our data show that HCMV individuals display a higher percentage of CD4 compared to CD8 (mean values: 66.6% vs. 33.4% for CD4 and CD8 T cells, respectively, from HCMV- individuals ($n = 4$), $p < 0.05$). In contrast, HCMV⁺ individuals, even at a distance from primary infection, display no significant difference in the percentages of CD4 versus CD8 T cells (mean values: 48.9% vs. 51.1% for CD4 and CD8 T cells, respectively, from four HCMV⁺ individuals), indicative of an HCMV-induced CD8 T cell inflation. Indeed, expansion of the CD8 T cell pool occurs early post-infection and is a hallmark of HCMV and HIV infections [20–22].

2.1.3. HCMV Peptide-Specific CD8 T Cell Responses

Three pHLA tetramer complexes were used in conjunction with anti-CD8 antibodies for the immunostaining of conventional and unconventional HCMV peptide-specific CD8 T cell responses. Conventional CD8 T cells were detected using HLA-A*0201(A2)/_{pp65} (NLVPMVATV) tetramer complexes, while unconventional HLA-E restricted CD8 T cells were detected using two HLA-E tetramer complexes containing two different UL40 signal peptides (HLA-E/_{VMAPRTLIL} and HLA-E/_{VMAPRSLLL}). Examples of detection using HLA-A2_{pp65} and HLA-E_{UL40} tetramers and CD8 costaining are shown in Figure 1D,E and reveal similar frequency (from 2 to 6% of total CD8 T cells) for both HCMV antigen-specific, HLA-A2_{pp65} and HLA-E_{UL40}, CD8 T cells, consistent with our previous studies [11]

Thus, CD8/HLA class I/peptide tetramer costaining allows the detection and quantification of HCMV-specific conventional but also unconventional, HLA-E-restricted CD8 T cell populations using spectral flow cytometry.

2.2. Immunophenotyping of CD8 T Cell Responses

2.2.1. CD8 T Cell Differentiation

HCMV peptide-specific CD8 T cells stained with pMHC class I tetramers can be further characterized by immunophenotyping using antibodies for CD45RA, CCR7, CX3CR1, PD-1, CD56, CD57, CD158, NKG2A, NKG2C, KLRG1, and 2B4. Firstly, costaining for CD45RA and CCR7 allows us to segregate CD8 T cells according to their differentiation state: CD45RA⁺CCR7⁺ CD8 T cells are defined as naive T cells (TN), CD45RA⁻CCR7⁻ as central memory T cells (TCM), CD45RA⁻CCR7⁺ as effector memory T cells (TEM), and CD45RA⁺CCR7⁻ as terminally differentiated T cells re-expressing CD45RA (TEMRA) (Figure 2A) [23]. Consequently, CD45RA/CCR7 costaining enables a comparative analysis of CD8 T cell differentiation for HCMV peptide-specific CD8 T cells stained with pHLA class I tetramers, such as conventional vs. unconventional (HLA-E-restricted) CD8 T and a comparison between HCMV peptide-specific CD8 T cells and total (tetramer negative) CD8 T cell pool (Figure 2A). As illustrated in Figure 2A lower panel, and consistent with previous studies [22,23], a majority of CD8 T cells (around 70%) in HCMV⁺ individuals are TEMRA cells expressing CD45RA but not CCR7. Considering HCMV-specific responses, only a part of HLA-A2_{pp65} and almost all anti-HCMV HLA-E_{UL40} CD8 T cells stained with HLA-E_{UL40} tetramers that persist in HCMV⁺ individuals post-infection displays a CD45RA⁺CCR7⁻ phenotype and thus belong to TEMRA cells (Figure 2A). Figure 2B provides a quantification of the CD8 differentiation stages in HCMV⁺ versus HCMV⁻ individuals, indicating a trend toward less TN and more TEMRA in HCMV⁺ individuals, which may reflect the impact of HCMV-specific CD8 populations, as previously reported [22,24].

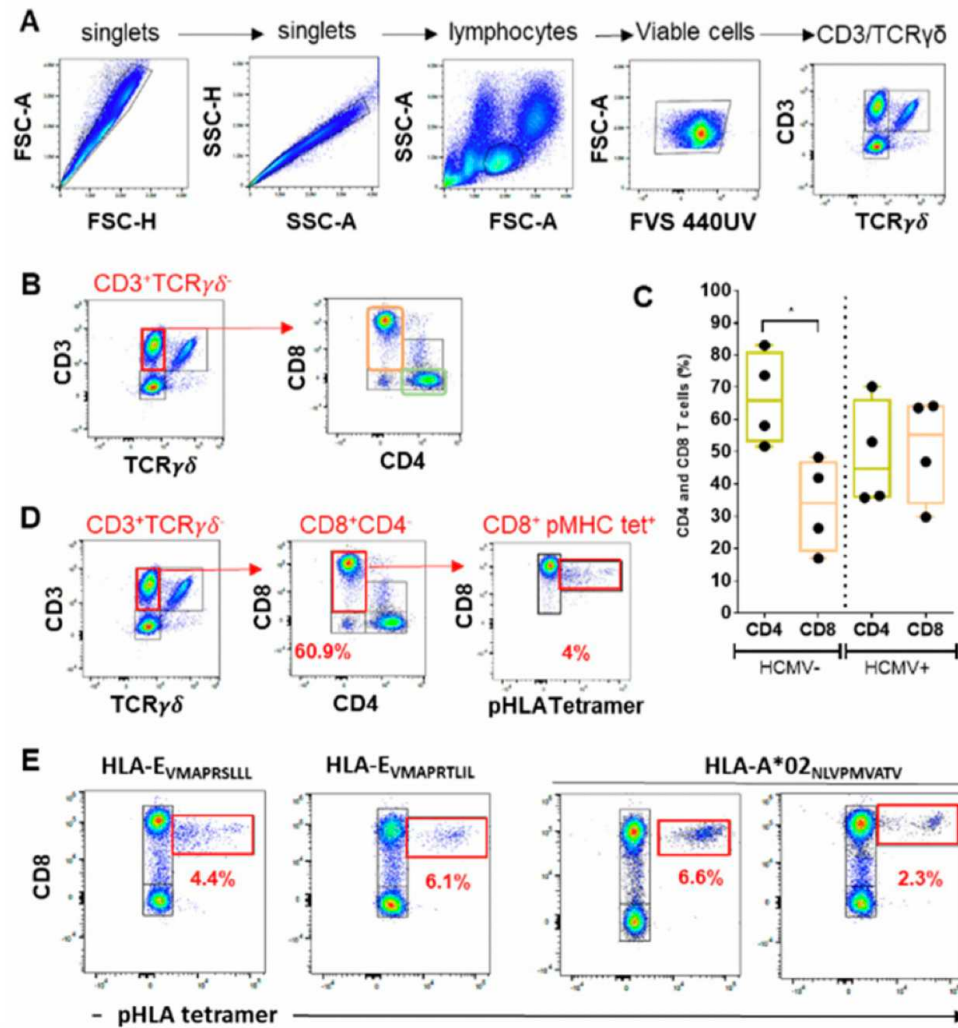


Figure 1. (A) A representative nested gating strategy illustrating lymphocyte population subgated by the expression of CD3 and $\gamma\delta$ TCR. Cells were gated first on FSC-A vs. FSC-H plots and then on SSC-H vs. SSC-A plots to eliminate doublets. Lymphocytes were gated on an SSC-A vs. FSC-A dot plot. Viable lymphocytes were selected using fixable viability stain (FVS) 440UV staining. Lymphocytes were subgated using CD3 and $\gamma\delta$ TCR staining. (B,C) Analysis of CD4 and CD8 lymphocyte subsets. A representative density plot showing CD4 and CD8 staining among the CD3⁺ $\gamma\delta$ TCR⁺ lymphocytes. (C) A graphical and statistical analysis of CD4 and CD8 lymphocyte subsets from independent HCMV⁻ ($n = 4$) and HCMV⁺ ($n = 4$) individuals. (D,E) Detection and quantification of peptide-specific conventional and non-conventional CD8 T cell populations using HLA class I /peptide tetramers (pHLA). Representative detection of anti-HCMV peptide-specific, conventional (HLA-A2_{pp65}, peptide NLVPMVATV) and two unconventional (HLA-E_{UL40}, peptides VMAPRSLLL and VMAPRTLIL), CD8 T cells from three HCMV⁺ hosts is shown. The percentages of tetramer positive cells (tet⁺) among total CD8 T cells are indicated. FSC-H: Forward scatter height. FSC-A: Forward scatter area. SSC: Side scatter. TCR: T cell receptor. p value: * for $p < 0.05$.

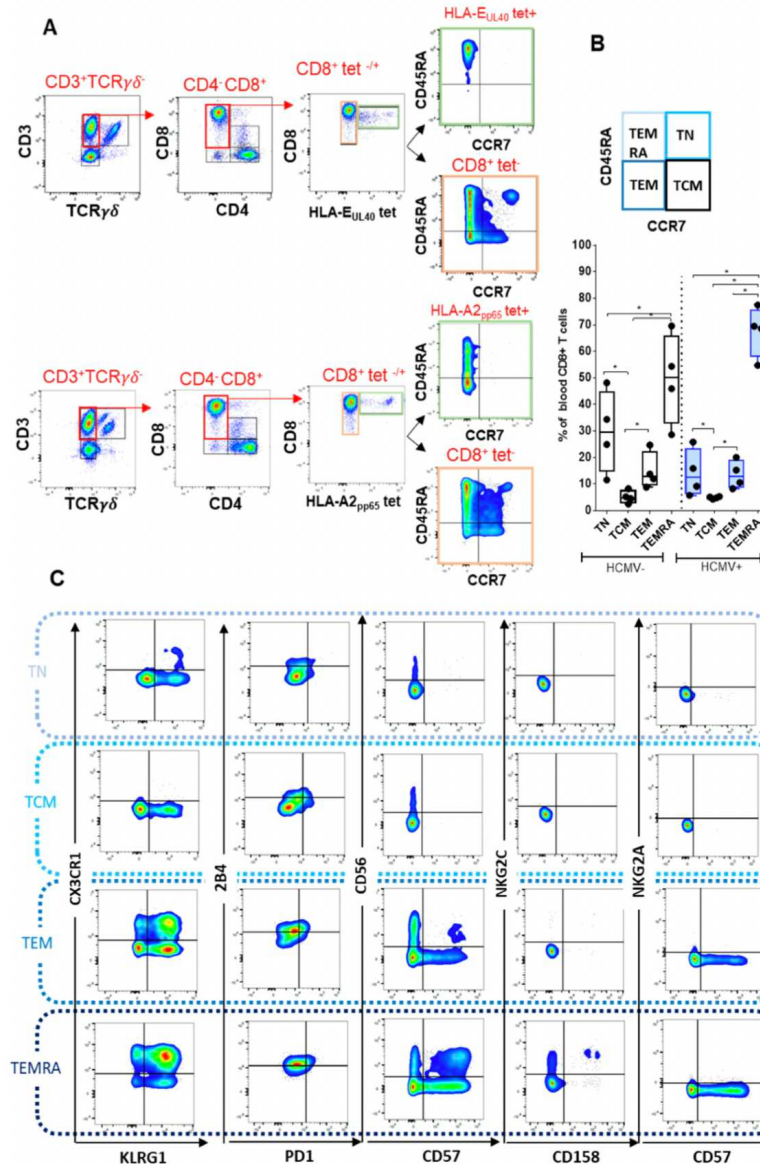


Figure 2. Analysis of CD8 T cell differentiation. (A) Representative density plots showing the sequential gating of CD8 T cells negatively (tet⁻) and positively (tet⁺) stained by pMHC class I tetramer (HLA-E_{UL40} VMAPRTSLLL, upper panel or HLA-A2_{pp65}, lower panel) after a selection according to CD4 and CD8 costaining among the CD3⁺ TCRγδ⁻ lymphocytes. The expression pattern for CD45RA/CCR7 of each population (tet⁻ and tet⁺) is shown. (B) A schematic representation of CD8 differentiation stages including CD8 naive T cells (TN), central memory T cells (TCM), effector memory T cells (TEM), and terminally differentiated T cells (TEMRA) according to CD45RA and CCR7 expression is indicated (upper panel). A graphical and statistical analysis of differentiation for total CD8 T cell pool from independent HCMV⁻ ($n = 4$) and HCMV⁺ ($n = 4$) individuals. Data are expressed as box plot with median and interquartile values. (C) Immunophenotyping of CD8 T cells for receptors for T cell activation and inhibition (2B4, PD-1, CD158, NKG2A, NKG2C, KLRG1), migration (CX3CR1) and cytotoxic capacity (CD56, CD57). The coexpression of receptors are shown for the 4 differentiation states (TN, TCM, TEM, TEMRA) analyzed for total CD8 T cells and representative of a single HCMV⁺ individual. p value: * for $p < 0.05$.

2.2.2. Immunophenotyping of Naive, Central Memory, Effector Memory, and Terminally Differentiated CD8⁺ T Cell Subsets

Concomitant costaining with a panel of antibodies was performed to investigate, in a single assay, receptors for T cell activation and inhibition (2B4, PD-1, CD158, NKG2A, NKG2C, and KLRG1), migration (CX3CR1), and cytotoxic and proliferation capacity (CD56, CD57). This antibody panel was used to better characterize and to compare the various T cell subsets

according to their differentiation state, as illustrated in Figure 2C. CD8 T cell differentiation from TN to TEMRA is associated with gain and loss of expression for several receptors, as previously reported [23]. Upon differentiation, CD8 T cells acquire both CX3CR1 and the inhibiting receptor KLRG1, which are not expressed on TN but appear on TEM and are coexpressed (80% of cells) on TEMRA. Similarly, the expression of the activating receptor 2B4 progress along differentiation with majority of TEMRA (55%) being 2B4⁺. NKG2C and CD158 are expressed or even coexpressed on TEMRA only. Concerning cytotoxic activity, the expression of CD56 is null for CD8 TN and TCM, appears maximal for TEM (18.2%), and then decreases for TEMRA (5.2%), while CD57 appears on TEM (13.7%) and further increases for TEMRA (27.8%). TEM and TEMRA, coexpressing both CD56 and CD57, represent 2.4% and 12.0%, respectively. Only a small portion of CD8 TEMRA express the activating receptor NKG2C (4.84%, and among them, 1.39% coexpress CD158). These data indicate that our workflow is robust enough to provide an accurate phenotype comparison across the four differentiation stages of CD8 T cells, thus enabling us to characterize HCMV-specific CD8 T cell subsets.

2.3. Deciphering $\gamma\delta$ T and V δ 2- $\gamma\delta$ T Cells upon HCMV Infection

The $\gamma\delta$ T cells are an integral part of the immune response against HCMV [6,25]. Using our protocol, the use of anti- $\gamma\delta$ TCR antibodies allows the positive selection of lymphocytes expressing both CD3 and an $\gamma\delta$ TCR, thus excluding conventional CD3⁺ T lymphocytes that bear conventional $\alpha\beta$ TCR (Figure 3A). This gating step provides a quantification for total $\gamma\delta$ T cells in blood samples from HCMV⁻ and HCMV⁺ hosts (Figure 3A,B). Consistent with previous studies [6], $\gamma\delta$ T cells comprise around $10 \pm 7\%$ of total CD3⁺ cells in both HCMV⁻ and HCMV⁺ individuals (Figure 3B). In a subsequent step, subgating of CD3⁺ $\gamma\delta$ T according to the expression of δ 2TCR chain and CD8 provided a mean to focus on CD3⁺ γ V δ 2⁻ $\gamma\delta$ T cells. In humans, $\gamma\delta$ T cells are divided in two subsets, the V γ 9⁺V δ 2⁺T cells that are found predominantly in the blood and all the other $\gamma\delta$ T cells (collectively called V δ 2- $\gamma\delta$ T cells, and mainly composed of V δ 1⁺ and V δ 3⁺ T cells) that are primarily located in tissues, particularly in epithelia [6]. HCMV infection leads to a strong increase (in proportion and number) in $\gamma\delta$ T cell subsets in the blood circulation, which persisted long term [26]. HCMV induces the expansion of V δ 2- $\gamma\delta$ T cells in the blood, which correlates with the resolution of infection providing evidence for an antiviral function of these subset of $\gamma\delta$ T cells [27,28]. Our data illustrate the predominance of V δ 2- $\gamma\delta$ T cells over V δ 2⁺ $\gamma\delta$ T cells in HCMV⁺ hosts with a frequency that ranges between 38% and 97% (mean value: 65.6%) of total CD3⁺ $\gamma\delta$ T cells but with large individual variations (Figure 3C). HCMV induced $\gamma\delta$ T cells mostly express an effector/memory TEMRA phenotype (Figure 3A) with similarities to the one described for HCMV-specific CD8⁺ $\alpha\beta$ T cells [23]. Subgating on CD45RA/CCR7 indicated divergent differentiation status for V δ 2- $\gamma\delta$ T cells vs. V δ 2⁺ $\gamma\delta$ T cells with almost all V δ 2- $\gamma\delta$ T being TEMRA (CD45RA⁺CCR7⁻), whereas V δ 2⁺ $\gamma\delta$ T cells include mostly less-differentiated T cells in HCMV⁺ individuals. To further characterize HCMV-induced $\gamma\delta$ T cells, the phenotype of both subsets was investigated for the immune receptors used for phenotyping CD8 $\alpha\beta$ T cells. Comparison of expression pattern further highlights phenotype differences between V δ 2⁻ and V δ 2⁺ $\gamma\delta$ T cells and suggests that coexpression for CX3CR1 and KLRG1 and CD56/CD16 expression featured V δ 2⁻ $\gamma\delta$ T cells (Figure 3A).

2.4. Analysis of HCMV-Induced NK Cell Subsets

In healthy human adults, NK cells comprise 5–15% of circulating lymphocytes; together with T cells and B cells, they are one of the three major lymphoid lineages [29].

Within lymphocytes, NK cells are phenotypically defined as CD56⁺ cells that do not express T (CD3) or B (CD19) cell lineage markers. In our protocol, sequential gating on CD3-TCR $\gamma\delta$ - cells followed by the exclusion of CD19⁺ cells allowed us to define CD3⁻CD19⁻CD56^{+/-} as NK cells (Figure 4A,B). Accordingly, the total percentages of NK cells among peripheral lymphocytes were calculated in samples from HCMV⁻ and HCMV⁺ individuals and are shown in (Figure 4C). The expression of CD56 in combination with CD16, the low affinity Fc γ receptor IIIa, further allows to distinguish different NK cell subsets [30,31]. By examining CD56 and CD16 costaining, we were able to identify NK cells at different stages of differentiation, including the immature CD56⁻/CD16⁻, the early differentiated CD56^{bright}CD16^{+/-}, the mature CD56^{dim/bright}CD16⁺, and the terminally differentiated CD56⁻CD16⁺ NK cell subsets [32,33]. When comparing the frequency of each subset in HCMV⁻ and HCMV⁺ individuals, we found that CD56^{dim}CD16⁺ represent the vast majority of NK cells in both groups (Figure 4D). HCMV infection triggers the specific expansion of mature CD56^{dim}CD16⁺ NK, expressing the CD94/NKG2C activating receptor and coexpressing the CD57 with a high cytotoxic activity. Thus, subgating using CD57 and NKG2C markers was performed for all the samples to calculate the percentages of mature CD56^{dim}CD16⁺ CD57⁺ NKG2C⁺ in HCMV⁻ and HCMV⁺ hosts, as shown in Figure 4E.

Our data indicated that, although no statistically significant difference was achieved due to individual variability, the frequency of mature, memory-like CD56^{dim}CD16⁺ CD57⁺ NKG2C⁺ appears higher in HCMV⁺ compared to HCMV⁻ hosts.

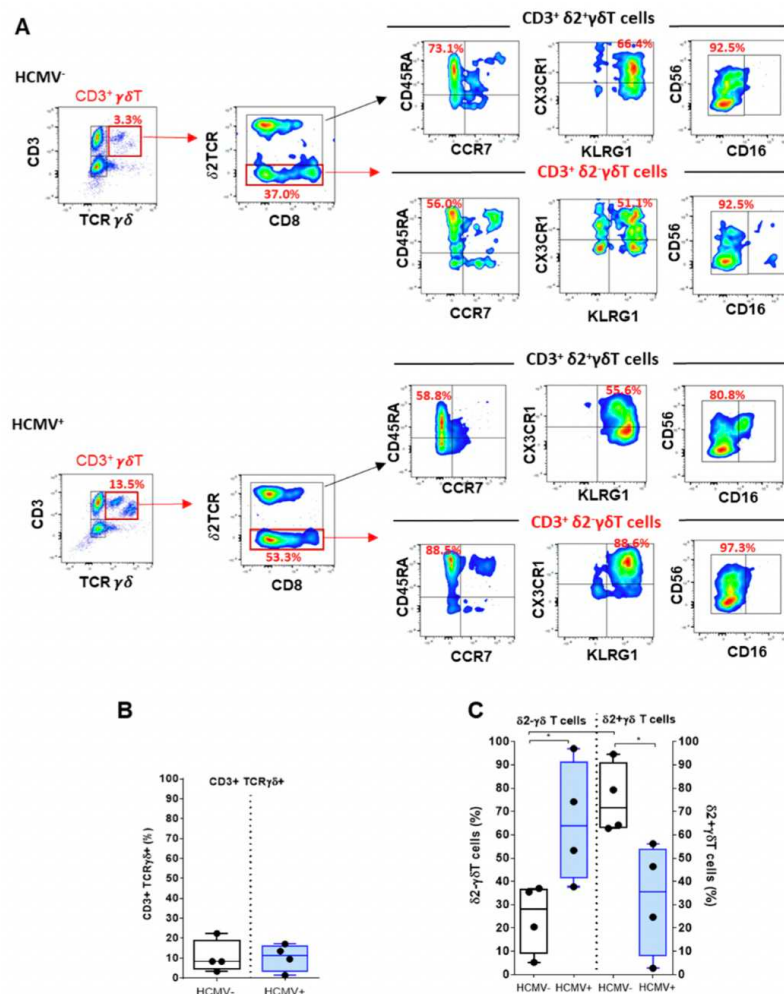


Figure 3. Analysis of $\gamma\delta$ T and V δ 2 $\gamma\delta$ T cells. (A) Representative density plots from a single HCMV⁻ (upper panel) and HCMV⁺ (lower panel) individuals showing the sequential selection of CD3⁺ $\gamma\delta$ T cells using CD3 and $\gamma\delta$ TCR costaining and of V δ 2 $\gamma\delta$ T and V δ 2⁺ $\gamma\delta$ T subsets using V δ 2 $\gamma\delta$ T and CD8 costaining used to quantify the $\gamma\delta$ T cell subsets. Immunophenotyping of $\gamma\delta$ T cell subsets showing costaining for CD45RA/CCR7, CX3CR1/KLRG1 and CD56/CD16. The coexpression of immune receptors for V δ 2 $\gamma\delta$ T vs. V δ 2⁺ $\gamma\delta$ T cell populations are shown. For comparison, cell frequency (%) is indicated for some costainings. (B,C) Box plots with median and interquartile values were used to represent the percentages of (B) CD3⁺ $\gamma\delta$ T among lymphocytes and (C) V δ 2⁺ $\gamma\delta$ T vs. V δ 2 $\gamma\delta$ T cells obtained from independent HCMV⁻ ($n = 4$) and HCMV⁺ ($n = 4$) individuals. p value: * for $p < 0.05$.

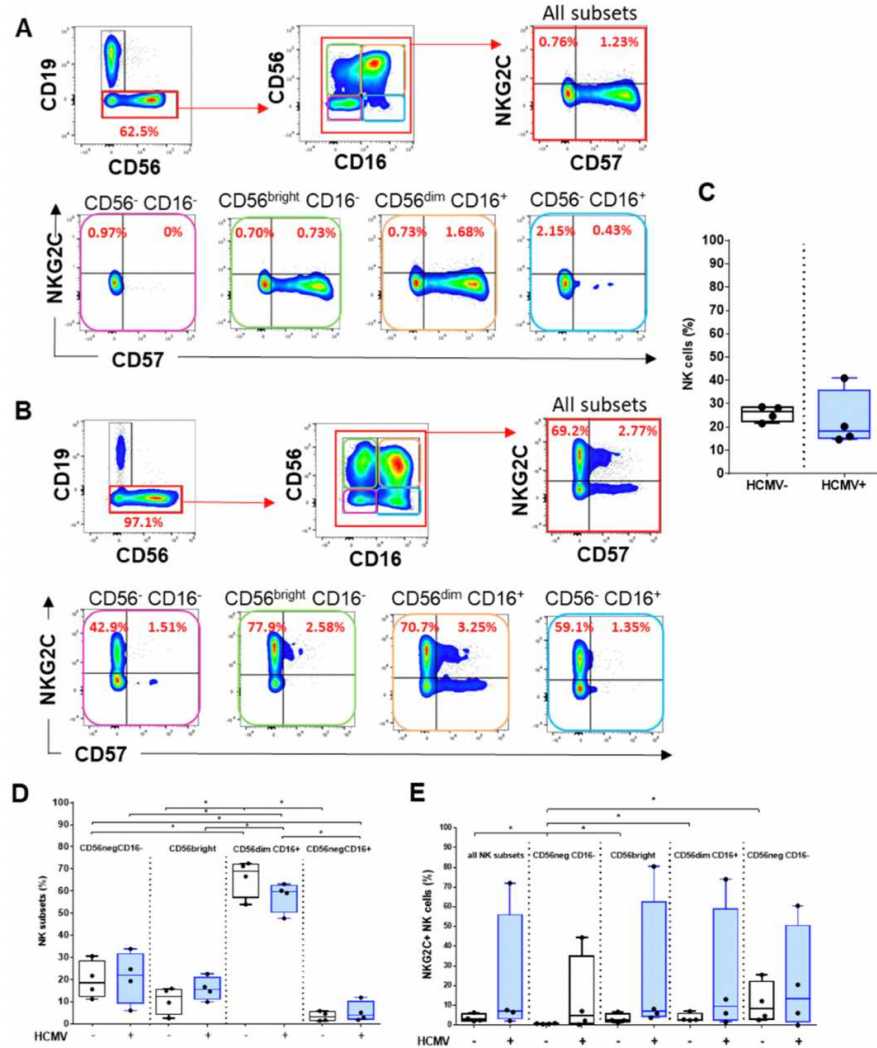


Figure 4. Analysis of HCMV-induced NK cell subsets. (A,B) Representative density plots showing the sequential selection (upper panel, left to right) CD3⁺ $\gamma\delta$ T cells, CD19⁺ cells using CD19/CD56 costaining, and CD56/CD16 costaining, enabling the determination of 4 major NK cell subsets. Co-expression for CD57/NKG2C is shown for all NK (upper panel) and for each NK subset (lower panel). The data shown are from one representative HCMV⁻ HV (A) and HCMV⁺ kidney transplant recipient (B). For comparison, cell frequency (%) is indicated for some costainings. Quantitative analyses are represented as box plots comparing the percentages of total NK cells (C), the percentages of NK subsets (D), and the percentages of NKG2C⁺ NK cells (E) for HCMV⁻ ($n = 4$) and HCMV⁺ ($n = 4$) individuals. p value: * for $p < 0.05$.

3. Discussion

Flow cytometry provides a high-throughput and cost-effective method of immunophenotyping and immunomonitoring of patients (currently, more than 40 fluorophores are available) on many cells with high-throughput (approx. 10,000 events/s). In contrast to flow cytometry, which uses fluorescent molecules, mass cytometry uses heavy metal tags and time-of-flight mass spectrometry readouts to measure antibody binding to cells [34]. This method allows a much larger number of simultaneous markers than conventional flow cytometry. Mass cytometry, on the other hand, acquires cells at a much lower rate (approx. 300–400 events/s) but with more markers per cell (over 50). Spectral cytometry improves conventional flow cytometry by increasing the number and combination of fluorophores, thereby providing increased flexibility of panel design, as well as incorporating autofluorescence measurement and extraction [19]. By the use of fluorophore-conjugated antibodies, staining, and analysis protocols already established for conventional cytometry, spectral cytometry provides a readily accessible technique [35].

Here, we report on the development of a staining protocol and a staining strategy combining HLA class I/HCMV peptides tetramer complexes and a panel of 18 antibodies to study HCMV-specific immune cell responses. HLA/peptide tetramer staining offers the possibility to detect and quantitate peptide-specific anti-HCMV CD8 T cell populations [16]. The tetramers that we used include HLA-A2_{pp65} tetramers and HLA-E_{UL40} tetramers to decipher HLA-E-restricted CD8 T cells induced in the response to HCMV infection. It is important to emphasize that HLA-E_{UL40} tetramers bind to both NK and T cells. HLA-E is a ligand for the heterodimeric CD94/NKG2A/C receptors [36], which are expressed at high level on NK cells and are also expressed at lower level on CD8 T cells [36,37]. To allow a TCR-specific binding and to avoid the binding of HLA-E_{UL40} tetramers to CD94/NKG2A and CD94/NKG2C receptors, we performed a CD94 blockade using blocking antibodies as a preliminary step of immunostaining as we previously reported [11,13]. A major result from this study was the efficient detection of both HLA-A2_{pp65} and HLA-E_{UL40} CD8 T cells stained with the tetramers in our experimental conditions using spectral cytometry. In the present study, we found that the frequency of pp65 and UL40 epitope-specific T cells among CD8 T cells was in the range of the frequency that we previously reported with conventional flow cytometry [11]. This result indicates that the binding of pHLA tetramer remains stable during the processes of immunostaining and data acquisition and is strong enough to allow cell detection by spectral flow cytometry. Therefore, pHLA-E tetramers against UL40 HCMV epitopes combined with cell surface markers allow us to study these HCMV-specific CD8 T cell responses in more detail in a large cohort of patients. Previous studies established the emergence of HLA-E-restricted CD8 T cell subsets in autoimmune [38] and infectious diseases [12,39]. Functionally, in some studies, HLA-E-restricted CD8 T cells have been shown to display cytotoxic activities [8,11,39] toward autologous, allogeneic, or infected cells expressing HLA-E such as endothelial cells [40] but also regulatory functions [38], as reported in mice [41]. The role of HLA-E-restricted CD8 T cells in the outcome on HCMV infection is still unknown. Previous analysis of phenotype identified HCMV-specific HLA-E CD8 T as terminally differentiated TEMRA cells expressing CD56 [8,11]. Commonly, there is no known specific surface receptor that leads to HLA-E_{UL40} CD8 T cell identification within PBMCs that may help to analyze or sort these T cells without using HLA-E tetramers. The phenotypic and molecular characteristics of these CD8⁺ T cells therefore require further study. To investigate further the role that HLA-E_{UL40} CD8 T cells may play in the control of HCMV infection, we

sought to set up an integrated analysis of the multiple cellular responses induced by the infection. Our panel of antibodies enables the concomitant determination in a single sample of the frequency for a set of anti-HCMV responses such as conventional and unconventional peptide-specific CD8 T cells, total $\gamma\delta$ T and $\delta 2\text{-}\gamma$ T cells, immature and mature NK, and memory-like NK cells expressing NKG2C and/or CD57 [6,42]. Each subset can be further characterized for the expression of several markers including 2B4, PD-1, KLRG1, CD45RA, CCR7, CD158, and NKG2A to achieve a fine-tuned analysis of HCMV immune responses. Future applications for this assay include a better knowledge of HCMV infection through the comprehensive analysis of NK and T cell responses to HCMV infection or vaccines and a tool for the stratification of transplanted patients according to risk factors related to HCMV infection [43,44].

4. Materials and Methods

4.1. Samples and Reagents

Blood samples collected from seronegative (HCMV⁻) and seropositive (HCMV⁺) anonymous healthy volunteers (HV) were obtained from the Etablissement Français du Sang (EFS des Pays de La Loire, Nantes, France) with donors' specific and written informed consent for research use. PBMCs were isolated by Ficoll density gradient (Eurobio, Les Ulis, France) and kept frozen until used. Banked biological samples (PBMCs) from HCMV⁺ kidney transplant recipients were issued from the DIVAT biocollection (CNIL agreement n°891735, French Health Minister Project n°02G55). PBMCs from patients who underwent kidney transplantation in the Institute for Transplantation Urology Nephrology (ITUN, CHU de Nantes, France) were prospectively isolated from blood samples, frozen, and stored at the Centre de Ressources Biologiques (CRB, CHU de Nantes, France). PBMCs were thawed before use in RPMI-1640 medium (Gibco, Amarillo, TX, USA) supplemented with 10% human serum (Gibco), 2 mM L-glutamine (Gibco), 100 U/mL penicillin (Gibco), and 0.1 mg/mL streptomycin (Gibco). To set up the present protocol, we used blood samples that we previously tested for the absence or the presence of HCMV peptide-specific CD8 T cells using a set of pHLA tetramers and conventional flow cytometry. Four PBMC samples containing different HCMV peptide-specific CD8 T cells were then selected for the study. These 4 samples were issued from 2 HCMV⁺ healthy donors and from 2 HCMV⁺ kidney transplant recipients. The two groups included 2F/2M and 1F/3M for HCMV⁻ and HCMV⁺ individuals, respectively. The mean values of ages are 47.5 ± 14.7 and 55 ± 14.7 years for HCMV⁻ and HCMV⁺, respectively, and thus are not significantly different.

4.2. HLA-E_{UL40} and HLA-A*02:01_{pp65} Tetramer Complexes

Peptides from HCMV UL40 protein (AA₁₅₋₂₃: VMAPRTLIL and VMAPRSLLL) and the UL83 (pp65) protein (AA₄₉₅₋₅₀₃: NLVPMVATV) were synthesized (purity > 95%) and purchased from Genecust (Boynes, France). The HLA_{peptide} monomers HLA-E*01:01_{UL40} and HLA-A*02:01_{pp65} were produced by the recombinant protein core facilities (P2R, SFR Bonamy, Université de Nantes, France) as we previously reported [11]. HLA_{peptide} monomers were biotinylated, purified, and tetramerized using APC-streptavidin (BD Biosciences, Le Pont de Claix, France).

4.3. Spectral Flow Cytometry: Immunostaining, Acquisition and Post-Acquisition Data Analysis

The 20-marker panel was optimized for use on a Cytex Aurora (Cytex Biosciences, Fremont, CA, USA) spectral flow cytometry platform with a 5-laser configuration (laser excitation wavelengths: 355 nm, 405 nm, 488 nm, 561 nm, and 640 nm). Before use, titration experiments were carried out to determine the antibody concentration providing highest staining index. For immunophenotyping, cells (1.10^6 PBMCs/well in 96-well plates) were costained using a multistep protocol. PBMCs were washed twice in RPMI and cells and filtered through a 100 μ m filter (ThermoFisher, Waltham, MA USA) before immunostaining. PBMCs were then incubated with a viability marker, Fixable Viability Stain 440UV (BD Bioscience) and diluted in PBS (100 μ L) for 15 min at 4 °C. PBMCs were washed twice in PBS and centrifugated at 2500 rpm for 2 min at 4 °C. Next, cells were incubated with anti-NKG2A (Biotechne, Noyal-Châtillon-sur-Seiche, France) and anti-NKG2C (BD Bioscience) mAbs for 15 min at 4 °C, diluted in PBS (30 μ L) before being incubated in PBS (30 μ L) for 25 min at 4 °C with blocking anti-CD94 mAb (BD Bioscience) to avoid the binding of HLA-E_{UL40} tetramer to CD94/NKG2A/C receptors. After a washing step, PBMCs were incubated with APC-labeled -HLA_{peptide} tetramers (50 μ g/mL in 30 μ L PBS) for 20 min at RT. After washing, PBMCs were incubated successively for 10 min at 4 °C with 5 cocktails of antibodies diluted in PBS (30 μ L): cocktail 1 containing Fc-block™ reagent (BD Bioscience) and anti-CCR7, cocktail 2 containing anti-TCR $\gamma\delta$ and anti-TCR $\gamma\delta$ 2, cocktail 3 containing anti-CX3CR1 mAbs alone, cocktail 4 containing anti-CD158, -KLRG1, -2B4, -PD-1 mAbs, and cocktail 5 containing anti-CD4, -CD57, -CD3, -CD45RA, -CD8, -CD56 and -CD16 mAbs. After a washing step, PBMCs were finally incubated with anti-CD19 mAbs for 15 min at 4 °C. All antibodies are listed in Table 1. PBMCs were washed twice and were resuspended in PBS before fluorescence analysis. For our study, a mean value of 40,000 events (viable lymphocytes)/samples were acquired for analysis. The fluorescence intensities were measured with a five-laser Cytex Aurora™ spectral flow cytometer (Cytex Biosciences) using SpectroFlo™ software version 2.2.0 (Cytex Biosciences). Using online fluorescence spectra viewers, we were able to identify 20 fluorophores with distinct signatures that could be used in the panel. The selected fluorophores included BUV395, UV440, BUV496, BUV563, BUV737, BUV805, BV421, VioBlue, BV510, BV570, BV605, BV785, FITC, PerCPeFluor710, PE, AlexaFluor594, PE -Cy7, SparkNir685, APC Fire750, and APC (Table 1). The spectral profile of unstained cells was collected and treated as an independent parameter, which allows the autofluorescence signature to be extracted using the unmixing algorithm. The full emission spectrum of each single-stained sample was performed using compensation beads (OneComp eBeads™, Thermo Fisher) or PBMCs and was used to determine the contribution of each fluorophore in a mixed sample using spectral deconvolution (unmixing) algorithms before experiments. The fluorophore spectral signatures obtained at the cytometer were compared to the gold standard full-spectrum signatures shown in the Aurora fluorochrome guide (<https://cytekbio.com/blogs/resources/5l-full-spectrum-cytometry-overview-poster>, accessed on 1 November 2021) to ensure fluorophore identity and quality. Post-acquisition, unmixing FCS files were conventionally compensated before the data analysis. The frequency of major immune cell populations was determined using FlowJo™ Software v10 (BD Biosciences) based on manual gating strategies as reported in the results section.

Table 1. Antibody panel and HLApeptide tetramers used for anti-HCMV immune profiling using spectral flow cytometry. Antigen, fluorophore, clone, and dilution are indicated.

λ Excitation (nm)	Fluorophore	λ Emission (nm)	Cytometer Detector	Antigen	Antibody Clone	Dilution	Source
355	BUV395	395	UV2	CD45RA	5H9	1/80 ^e	BD Bioscience
	Fixable Viability Dye UV440	436	UV6	Viability	/	1/2000 ^e	BD Bioscience
	BUV496	496	UV7	CD16	3G8	1/160 ^e	BD Bioscience
	BUV563	564	UV9	NKG2C	134591	1/20 ^e	BD Bioscience
	BUV737	735	UV14	CD56	NCAM16.2	1/20 ^e	BD Bioscience
	BUV805	803	UV16	CD8	SK1	1/80 ^e	BD Bioscience
405	BV421	421	V1	CCR7	G043H7	1/20 ^e	Biolegend
	VioBlue	452	V3	KLRG1	REA261	1/50 ^e	Mytenyi
	BV510	510	V7	CD3	OKT3	1/20 ^e	Biolegend
	BV570	570	V8	CD4	RPA-T4	1/80 ^e	Biolegend
	BV605	603	V10	2B4	C1.7	1/80 ^e	Biolegend
	BV785	785	V15	PD-1	EH12.2H7	1/10 ^e	Biolegend
488	FITC	520	B2	CD57	HNK-1	1/160 ^e	Biolegend
	PerCPeFluor710	710	B10	TCRgd	B1.1	1/20 ^e	Thermo Fisher
561	PE	576	YG1	CD158	HP-MA4	1/40 ^e	Biolegend
	AlexaFluor594	617	YG3	NKG2A	131411	1/20 ^e	Bio-Techne
	PE-Cy7	781	YG9	CX3CR1	2A9-1	1/20 ^e	Biolegend
640	SparkNir685	685	R3	CD19	HIB19	1/80 ^e	Biolegend
	APC Fire750	787	R7	TCRgd2	B6	1/160 ^e	Biolegend
	APC	660	R1	Streptavidin HLA _{peptide}	/	1/11 ^e	BD Bioscience
/	/	/	/	CD94	HP-3D9	30 μ g/mL	BD Bioscience
/	/	/	/	Fc block	Fc1.3216	1/100 ^e	BD Bioscience

4.4. Statistical Analysis

Comparisons between groups were represented as box plots showing median, 25th, and 75th percentile values using GraphPad Prism 8.0 software (GraphPad Software Inc., Sand Diego, CA, USA). Comparisons among groups were performed using non-parametric Wilcoxon-Mann-Whitney tests when suitable. Statistical differences were determined by GraphPad Prism 8.0. A two-sided p value < 0.05 was considered to be statistically significant. p value: * for p < 0.05.

Author Contributions: Conceptualization, B.C., A.R. and L.D.; methodology, A.R. and L.D.; formal analysis, B.C. and A.R.; investigation, A.R., L.D., and M.B.; resources, C.B. and A.R.; writing—original draft preparation, B.C.; supervision, B.C.; funding acquisition, B.C. and C.B. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research was funded by the Association Grégory Lemarchal and Vaincre la Mucoviscidose (France), grant number RF20190502487, and by l'Institut de Recherche en Santé Respiratoire des Pays de la Loire (France), grant number LSC 10280.

Institutional Review Board Statement: Banked biological samples (PBMCs) were issued from the DIVAT biocollection (CNIL agreement n°891735, French Health Minister Project n°02G55). This retrospective study was performed according to the guidelines of the local and national

ethics committees (CCPRB, CHU de Nantes, France). Blood samples collected from anonymous healthy volunteers ($n = 25$) were obtained from the Etablissement Français du Sang (EFS Pays de la Loire, Nantes) with donors' specific and written informed consent for research use.

Informed Consent Statement: Informed consent was obtained from all subjects involved in the study.

Data Availability Statement: Publicly available datasets were analyzed in this study.

Acknowledgments: The authors thank Karine Bernardeau and Klara Echasserieu from the Recombinant Protein Facility (P²R, Structure Fédérative de Recherche “Francois Bonamy”, Nantes) for the production of pHLA-E- and pHLA-A*02-tetramers. The authors also thank the Etablissement Français du Sang (EFS, Pays de la Loire, Nantes, France) and the Centre de Ressources Biologiques (CRB, CHU de Nantes, France) for blood sample collection and harvesting. The graphical abstract was drawn using biorender.com.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest. The funders had no role in the design of the study; in the collection, analyses, or interpretation of data; in the writing of the manuscript, or in the decision to publish the results.

References

1. Boeckh, M.; Geballe, A.P. Cytomegalovirus: Pathogen, paradigm, and puzzle. *J. Clin. Investig.* **2011**, *121*, 1673–1680. [[CrossRef](#)]
2. 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. Broadly targeted human cytomegalovirus-specific CD4⁺ and CD8⁺ T cells dominate the memory compartments of exposed subjects. *J. Exp. Med.* **2005**, *202*, 673–685. [[CrossRef](#)]
3. Kaminski, H.; Garrigue, I.; Couzi, L.; Taton, B.; Bachelet, T.; Moreau, J.F.; Dechanet-Merville, J.; Thiebaut, R.; Merville, P. Surveillance of gammadelta T Cells Predicts Cytomegalovirus Infection Resolution in Kidney Transplants. *J. Am. Soc. Nephrol.* **2016**, *27*, 637–645. [[CrossRef](#)]
4. Forte, E.; Zhang, Z.; Thorp, E.B.; Hummel, M. Cytomegalovirus Latency and Reactivation: An Intricate Interplay With the Host Immune Response. *Front. Cell Infect. Microbiol.* **2020**, *10*, 130. [[CrossRef](#)]
5. Klenerman, P.; Oxenius, A. T cell responses to cytomegalovirus. *Nat. Rev. Immunol.* **2016**, *16*, 367–377. [[CrossRef](#)]
6. Khairallah, C.; Dechanet-Merville, J.; Capone, M. gammadelta T Cell-Mediated Immunity to Cytomegalovirus Infection. *Front. Immunol.* **2017**, *8*, 105. [[CrossRef](#)]
7. Sylwester, A.; Nambiar, K.Z.; Caserta, S.; Klenerman, P.; Picker, L.J.; Kern, F. A new perspective of the structural complexity of HCMV-specific T-cell responses. *Mech. Ageing Dev.* **2016**, *158*, 14–22. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
8. Romagnani, C.; Pietra, G.; Falco, M.; Millo, E.; Mazzarino, P.; Biassoni, R.; Moretta, A.; Moretta, L.; Mingari, M.C. Identification of HLA-E-specific alloreactive T lymphocytes: A cell subset that undergoes preferential expansion in mixed lymphocyte culture and displays a

broad cytolytic activity against allogeneic cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2002**, *99*, 11328–11333. [[CrossRef](#)]

9. Pietra, G.; Romagnani, C.; Mazzarino, P.; Falco, M.; Millo, E.; Moretta, A.; Moretta, L.; Mingari, M.C. HLA-E-restricted recognition of cytomegalovirus-derived peptides by human CD8⁺ cytolytic T lymphocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2003**, *100*, 10896–10901. [[CrossRef](#)]

10. Sullivan, L.C.; Westall, G.P.; Widjaja, J.M.; Mifsud, N.A.; Nguyen, T.H.; Meehan, A.C.; Kotsimbos, T.C.; Brooks, A.G. The Presence of HLA-E-Restricted, CMV-Specific CD8⁺ T Cells in the Blood of Lung Transplant Recipients Correlates with Chronic Allograft Rejection. *PLoS ONE* **2015**, *10*, e0135972. [[CrossRef](#)]

11. Jouand, N.; Bressollette-Bodin, C.; Gerard, N.; Giral, M.; Guerif, P.; Rodallec, A.; Oger, R.; Parrot, T.; Allard, M.;

Cesbron-Gautier, A.; et al. HCMV triggers frequent and persistent UL40-specific unconventional HLA-E-restricted CD8 T-cell responses with potential autologous and allogeneic peptide recognition. *PLoS Pathog.* **2018**, *14*, e1007041. [[CrossRef](#)]

12. Pietra, G.; Romagnani, C.; Falco, M.; Vitale, M.; Castriconi, R.; Pende, D.; Millo, E.; Anfossi, S.; Biassoni, R.; Moretta, L.; et al. The analysis of the natural killer-like activity of human cytolytic T lymphocytes revealed HLA-E as a novel target for TCR alpha/beta-mediated recognition. *Eur. J. Immunol.* **2001**, *31*, 3687–3693. [[CrossRef](#)]

13. Allard, M.; Tonnerre, P.; Nedellec, S.; Oger, R.; Morice, A.; Guilloux, Y.; Houssaint, E.; Charreau, B.; Gervois, N. HLA-E-restricted cross-recognition of allogeneic endothelial cells by CMV-associated CD8 T cells: A potential risk factor following transplantation. *PLoS ONE* **2012**, *7*, e50951. [[CrossRef](#)]

14. Altman, J.D.; Moss, P.A.; Goulder, P.J.; Barouch, D.H.; McHeyzer-Williams, M.G.; Bell, J.I.; McMichael, A.J.; Davis, M.M. Phenotypic analysis of antigen-specific T lymphocytes. *Science* **1996**, *274*, 94–96. [[CrossRef](#)]

15. Hadrup, S.R.; Bakker, A.H.; Shu, C.J.; Andersen, R.S.; van Veluw, J.; Hombrink, P.; Castermans, E.; Straten, P.T.; Blank, C.; Haanen, J.B.; et al. Parallel detection of antigen-specific T-cell responses by multidimensional encoding of MHC multimers. *Nat. Methods* **2009**, *6*, 520–526. [[CrossRef](#)]

16. Newell, E.W.; Klein, L.O.; Yu, W.; Davis, M.M. Simultaneous detection of many T-cell specificities using combinatorial tetramer staining. *Nat. Methods* **2009**, *6*, 497–499. [[CrossRef](#)]

17. Newell, E.W.; Sigal, N.; Nair, N.; Kidd, B.A.; Greenberg, H.B.; Davis, M.M. Combinatorial tetramer staining and mass cytometry analysis facilitate T-cell epitope mapping and characterization. *Nat. Biotechnol.* **2013**, *31*, 623–629. [[CrossRef](#)]

18. Perfetto, S.P.; Chattopadhyay, P.K.; Roederer, M. Seventeen-colour flow cytometry: Unravelling the immune system. *Nat. Rev. Immunol.* **2004**, *4*, 648–655. [[CrossRef](#)]

19. Nolan, J.P.; Condello, D. Spectral flow cytometry. *Curr. Protoc. Cytom.* **2013**, *1*, 1–27. [[CrossRef](#)]

20. Karrer, U.; Sierro, S.; Wagner, M.; Oxenius, A.; Hengel, H.; Koszinowski, U.H.; Phillips, R.E.; Klenerman, P. Memory inflation: Continuous accumulation of antiviral CD8⁺ T cells over time. *J. Immunol.* **2003**, *170*, 2022–2029. [[CrossRef](#)]

21. Meyer-Olson, D.; Simons, B.C.; Conrad, J.A.; Smith, R.M.; Barnett, L.; Lorey, S.L.; Duncan, C.B.; Ramalingam, R.; Kalams, S.A. Clonal expansion and TCR-independent differentiation shape the HIV-specific CD8⁺ effector-memory T-cell repertoire in vivo. *Blood* **2010**, *116*, 396–405. [[CrossRef](#)]
22. O'Hara, G.A.; Welten, S.P.; Klenerman, P.; Arens, R. Memory T cell inflation: Understanding cause and effect. *Trends Immunol.* **2012**, *33*, 84–90. [[CrossRef](#)]
23. Van den Berg, S.P.H.; Pardieck, I.N.; Lanfermeijer, J.; Sauce, D.; Klenerman, P.; van Baarle, D.; Arens, R. The hallmarks of CMV-specific CD8 T-cell differentiation. *Med. Microbiol. Immunol.* **2019**, *208*, 365–573. [[CrossRef](#)]
24. Derhovanessian, E.; Maier, A.B.; Hahnel, K.; Beck, R.; de Craen, A.J.M.; Slagboom, E.P.; Westendorp, R.G.J.; Pawelec, G. Infection with cytomegalovirus but not herpes simplex virus induces the accumulation of late-differentiated CD4⁺ and CD8⁺ T-cells in humans. *J. Gen. Virol.* **2011**, *92*, 2746–2756. [[CrossRef](#)]
25. Dechanet, J.; Merville, P.; Berge, F.; Bone-Mane, G.; Taupin, J.L.; Michel, P.; Joly, P.; Bonneville, M.; Potaux, L.; Moreau, J.-F.; et al. Major expansion of gammadelta T lymphocytes following cytomegalovirus infection in kidney allograft recipients. *J. Infect. Dis.* **1999**, *179*, 1–8. [[CrossRef](#)]
26. Stankovic, S.; Davey, M.S.; Shaw, E.M.; von Borstel, A.; Cristiano, Y.; Levvey, B.J.; Rossjohn, J.; Westall, G.P.; Snell, G.I.; Brooks, A.G.; et al. Cytomegalovirus replication is associated with enrichment of distinct gammadelta T cell subsets following lung transplantation: A novel therapeutic approach? *J. Heart Lung Transpl.* **2020**, *39*, 1300–1312. [[CrossRef](#)]
27. Alejef, A.; Pachnio, A.; Halawi, M.; Christmas, S.E.; Moss, P.A.; Khan, N. Cytomegalovirus drives Vdelta2neg gammadelta T cell inflation in many healthy virus carriers with increasing age. *Clin. Exp. Immunol.* **2014**, *176*, 418–428. [[CrossRef](#)]
28. Couzi, L.; Pitard, V.; Moreau, J.F.; Merville, P.; Dechanet-Merville, J. Direct and Indirect Effects of Cytomegalovirus-Induced gammadelta T Cells after Kidney Transplantation. *Front. Immunol.* **2015**, *6*, 3. [[CrossRef](#)]
29. Della Chiesa, M.; Marcenaro, E.; Sivori, S.; Carlomagno, S.; Pesce, S.; Moretta, A. Human NK cell response to pathogens. *Semin. Immunol.* **2014**, *26*, 152–160. [[CrossRef](#)]
30. Cichicki, F.; Schlums, H.; Theorell, J.; Tesi, B.; Miller, J.S.; Ljunggren, H.G.; Bryceson, Y.T. Diversification and Functional Specialization of Human NK Cell Subsets. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **2016**, *395*, 63–94.
31. Freud, A.G.; Mundy-Bosse, B.L.; Yu, J.; Caligiuri, M.A. The Broad Spectrum of Human Natural Killer Cell Diversity. *Immunity* **2017**, *47*, 820–833. [[CrossRef](#)]
32. Roberto, A.; Di Vito, C.; Zaghi, E.; Mazza, E.M.C.; Capucetti, A.; Calvi, M.; Tentorio, P.; Zanon, V.; Sarina, B.; Mariotti, J.; et al. The early expansion of anergic NKG2A(pos)/CD56(dim)/CD16(neg) natural killer represents a therapeutic target in haploidentical hematopoietic stem cell transplantation. *Haematologica* **2018**, *103*, 1390–1402. [[CrossRef](#)]
33. Di Vito, C.; Mikulak, J.; Mavilio, D. On the Way to Become a Natural Killer Cell. *Front. Immunol.* **2019**, *10*, 1812. [[CrossRef](#)]

34. Ferrer-Font, L.; Mayer, J.U.; Old, S.; Hermans, I.F.; Irish, J.; Price, K.M. High-Dimensional Data Analysis Algorithms Yield Comparable Results for Mass Cytometry and Spectral Flow Cytometry Data. *Cytom. A* **2020**, *97*, 824–831. [[CrossRef](#)]
35. Ferrer-Font, L.; Pellefigues, C.; Mayer, J.U.; Small, S.J.; Jaimes, M.C.; Price, K.M. Panel Design and Optimization for HighDimensional Immunophenotyping Assays Using Spectral Flow Cytometry. *Curr. Protoc. Cytom.* **2020**, *92*, e70. [[CrossRef](#)]
36. Braud, V.M.; Allan, D.S.; O'Callaghan, C.A.; Soderstrom, K.; D'Andrea, A.; Ogg, G.S.; Lazetic, S.; Young, N.T.; Bell, J.I.; Phillips, J.H.; et al. HLA-E binds to natural killer cell receptors CD94/NKG2A, B and C. *Nature* **1998**, *391*, 795–799. [[CrossRef](#)]
37. Arlettaz, L.; Villard, J.; de Rham, C.; Degermann, S.; Chapuis, B.; Huard, B.; Roosnek, E. Activating CD94:NKG2C and inhibitory CD94:NKG2A receptors are expressed by distinct subsets of committed CD8+ TCR alphabeta lymphocytes. *Eur. J. Immunol.* **2004**, *34*, 3456–3464. [[CrossRef](#)]
38. Jiang, H.; Canfield, S.M.; Gallagher, M.P.; Jiang, H.H.; Jiang, Y.; Zheng, Z.; Chess, L. HLA-E-restricted regulatory CD8(+) T cells are involved in development and control of human autoimmune type 1 diabetes. *J. Clin. Investig.* **2010**, *120*, 3641–3650. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
39. La Manna, M.P.; Orlando, V.; Prezzemolo, T.; Di Carlo, P.; Cascio, A.; Delogu, G.; Poli, G.; Sullivan, L.C.; Brooks, A.G.; Dieli, F.; et al. HLA-E-restricted CD8(+) T Lymphocytes Efficiently Control Mycobacterium tuberculosis and HIV-1 Coinfection. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **2020**, *62*, 430–439. [[CrossRef](#)]
40. Coupel, S.; Moreau, A.; Hamidou, M.; Horejsi, V.; Souillou, J.P.; Charreau, B. Expression and release of soluble HLA-E is an immunoregulatory feature of endothelial cell activation. *Blood* **2007**, *109*, 2806–2814. [[CrossRef](#)]
41. Holderried, T.A.; Lang, P.A.; Kim, H.J.; Cantor, H. Genetic disruption of CD8+ Treg activity enhances the immune response to viral infection. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2013**, *110*, 21089–21094. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
42. Lopez-Verges, S.; Milush, J.M.; Schwartz, B.S.; Pando, M.J.; Jarjoura, J.; York, V.A.; Houchins, J.P.; Miller, S.; Kang, S.-M.; Norris, P.J.; et al. Expansion of a unique CD57(+)NKG2Chi natural killer cell subset during acute human cytomegalovirus infection. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2011**, *108*, 14725–14732. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
43. Gratama, J.W.; Boeckh, M.; Nakamura, R.; Cornelissen, J.J.; Brooimans, R.A.; Zaia, J.A.; Forman, S.J.; Gaal, K.; Bray, K.R.; Gasior, G.H.; et al. Immune monitoring with iTag MHC Tetramers for prediction of recurrent or persistent cytomegalovirus infection or disease in allogeneic hematopoietic stem cell transplant recipients: A prospective multicenter study. *Blood* **2010**, *116*, 1655–1662. [[CrossRef](#)]
44. Jarque, M.; Crespo, E.; Melilli, E.; Gutierrez, A.; Moreso, F.; Guirado, L.; Revuelta, I.; Montero, N.; Torras, J.; Reira, L.; et al. Cellular Immunity to Predict the Risk of Cytomegalovirus Infection in Kidney Transplantation: A Prospective, Interventional, Multicenter Clinical Trial. *Clin. Infect. Dis.* **2020**, *71*, 2375–2385. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

Partie 2 : Caractérisation phénotypique des réponses T CD8 anti-HCMV spécifiques des peptides UL40 et restreintes par les molécules HLA-E : Marqueurs distinctifs et communs aux populations T CD8 restreintes par HLA-A2, NK exprimant NKG2C et CD57 et T TCR $\gamma\delta$ δ 2-

Résumé

Le HCMV engendre le développement de réponses immunitaires cellulaires innées et adaptatives dont incluant des LT $\alpha\beta$ CD8+ qui sont associés au contrôle de l'infection (Pipelung et al., 2011). Ces réponses comprennent les réponses dites « conventionnelles » car restreintes par les molécules HLA-Ia, telles que HLA-A2 présentant les peptides issus de pp65 du HCMV (LT CD8 HLA-A2/pp65). En outre, le HCMV induit également le développement de réponses T CD8+ dites « non conventionnelles » (HLA-Ib) car restreintes par les molécules non classiques HLA-E et présentant des peptides issus de la protéine UL40 du HCMV (LT CD8 HLA-E/UL40).

Cette étude avait pour objectifs la quantification et la caractérisation phénotypique des LT CD8 HLA-E/UL40 en comparaison aux LT CD8 HLA-A2/pp65 durant la phase aiguë (infection primaire ou secondaire) chez des KTR et la phase chronique de l'infection chez des HV HCMV+.

Nous avons étudié l'émergence et la persistance des réponses T CD8+ spécifiques du HCMV dans des PBMC récoltés, isolés d'échantillons sanguins prélevés avant et après l'infection de KTR post-transplantation, des PBMC issus de KTR ayant subi une réactivation à HCMV post-transplantation et issus de HV HCMV+. Les PBMC ont été étudiés à différents temps de manière à comparer les fréquences durant le priming des cellules T à celui de la restimulation/réactivation et durant la phase de latence de l'infection. De manière à analyser ces échantillons nous avons utilisé des complexes tétramères HLA/peptide (HLA-A2/pp65 et HLA-E/UL40). Nous avons observé que la fréquence des hôtes avec une réponse T CD8 HLA-E/UL40 après une primo-infection (24%) et durant la latence chez les HV HCMV+ (26%) est similaire et qu'elle est comparable à celle détectée dans les 2 groupes pour la réponse T CD8 HLA-A2/pp65 (29%). La fréquence de ces 2 types de cellules T CD8+ anti-HCMV varie selon les individus de 0,1% à plus de 30% de la totalité des T CD8+ circulants. Dans notre étude, la fréquence des T CD8 HLA-E/UL40 après une primo-infection est plus élevée que celle des T CD8 HLA-A2/pp65 suggérant une présentation plus précoce des peptides UL40 par les

molécules HLA-E. Cette observation est soutenue par la mise en évidence d'une expression plus rapide des ARNm *UL40* que celle des ARNm *UL83* (pp65) dans des cellules infectées *in vitro*.

Nous avons également comparé le phénotype de ces 2 réponses T CD8+ anti-HCMV. Nous montrons que les 2 réponses anti-HCMV partagent un phénotype spécifique de LT CD8+ effecteurs mémoires (TEMRA CD45RA+/CCR7-) mais se distinguent notamment par leurs niveaux d'expression de CD3, CD8 et CD45RA. Nous avons aussi constaté que le phénotype de ces populations évolue au cours des phases de l'infection chez les KTR et les HV HCMV+. Tim-3, Lag-3 et 4-1BB sont caractéristiques du priming des cellules T après la primo-infection, alors que Tigit et KLRG1 sont caractéristiques de la restimulation et des réponses T CD8+ spécifiques anti-HCMV à longue durée de vie. Ces particularités sont partagées par les LT CD8 HLA-E/UL40 et les LT CD8 HLA-A2/pp65. Toutefois, nous montrons que CD57, CD56, CD62L et PD1 sont des marqueurs discriminant les réponses T CD8 HLA-E/UL40 des réponses T CD8 HLA-A2/pp65.

Nous avons également caractérisé la capacité de ces populations de LT CD8 HLA-E/UL40 à proliférer et à produire des cytokines et des molécules effectrices de l'activité cytotoxique. Cette étude a été réalisée avec des PBMC issus des HV HCMV+ qui possèdent soit une réponse T CD8 HLA-A2/pp65 (n = 4) ou une réponse T CD8 HLA-E/UL40 (n = 5). Les LT CD8 HLA-E/UL40 ont montré un taux de prolifération plus important que les LT CD8 HLA-A2/pp65 en cohérence avec l'expression de CD57 par ces cellules. Après stimulation, les 2 types de LT CD8+ spécifiques du HCMV expriment le CD107a et produisent du GzmB, de l'IFN γ et du TNF α de manière similaire, indiquant des capacités cytotoxiques. En revanche, l'IL-2 est produite de manière plus importante par les LT CD8 HLA-A2/pp65 que les LT CD8 HLA-E/UL40.

Pour finir, nous avons comparé le phénotype des LT CD8 HLA-E/UL40 CD56+ PD1- à celui des autres réponses participant au contrôle de l'infection et de longue durée de vie. Ces réponses anti-HCMV incluent les LT $\alpha\beta$, les LT CD8 HLA-A2/pp65, les sous-populations de NK exprimant CD57 et/ou NKG2C, les LT TCR $\gamma\delta$ δ 2- au sein des PBMCs d'un même individu (n = 3). Nous montrons que les LT CD8 HLA-E/UL40 ont un profil phénotypique à la frontière entre les LT $\alpha\beta$ CD8+, les cellules NK mémoires NKG2C+ CD57+ et les LT TCR $\gamma\delta$ δ 2-. Cette étude a donc permis d'apporter une caractérisation plus complète du phénotype des LT CD8 reconnaissant les peptides viraux UL40 présentés par les molécules HLA-E et d'identifier un ensemble de marqueurs phénotypiques spécifiques à cette sous-population de LT CD8+ mémoires.

Article 2

Distinctive phenotype for HLA-E- versus HLA-A2-restricted memory CD8 α β T cell in the course of HCMV infection discloses features shared with NKG2C+ CD57+ NK and δ 2- γ δ T cell subsets

Amélie Rousselière, Nathalie Gérard, Laurence Delbos, Pierrick Guérif, Magali Giral, Céline Bressollette and Béatrice Charreau

Front. Immunol., **2022**, <https://doi.org/10.3389/fim>



OPEN ACCESS

EDITED BY

Linda F. Van Dyk,
University of Colorado Denver,
United States

REVIEWED BY

Nicolas Cuburu,
National Cancer Institute (NIH),
United States
Paul Goepfert,
University of Alabama at Birmingham,
United States

*CORRESPONDENCE

Béatrice Charreau
Beatrice.Charreau@univ-nantes.fr

SPECIALTY SECTION

This article was submitted to
Viral Immunology,
a section of the journal
Frontiers in Immunology

RECEIVED 07 October 2022

ACCEPTED 10 November 2022

PUBLISHED 01 December 2022

CITATION

Rousselière A, Gérard N, Delbos L,
Guérif P, Giral M, Bressollette-Bodin C
and Charreau B (2022) Distinctive
phenotype for HLA-E- versus HLA-A2-
restricted memory CD8 $\alpha\beta$ T cells in
the course of HCMV infection
discloses features shared with
NKG2C⁺CD57⁺NK and $\delta\gamma$ T
cell subsets.
Front. Immunol. 13:1063690.
doi: 10.3389/fimmu.2022.1063690

COPYRIGHT

© 2022 Rousselière, Gérard, Delbos,
Guérif, Giral, Bressollette-Bodin and
Charreau. This is an open-access article
distributed under the terms of the
[Creative Commons Attribution License](#)
(CC BY). The use, distribution or
reproduction in other forums is
permitted, provided the original
author(s) and the copyright owner(s)
are credited and that the original
publication in this journal is cited, in
accordance with accepted academic
practice. No use, distribution or
reproduction is permitted which does
not comply with these terms.

Distinctive phenotype for HLA-E- versus HLA-A2-restricted memory CD8 $\alpha\beta$ T cells in the course of HCMV infection discloses features shared with NKG2C⁺CD57⁺NK and $\delta\gamma$ T cell subsets

Amélie Rousselière¹, Nathalie Gérard¹, Laurence Delbos¹,
Pierrick Guérif², Magali Giral^{1,2}, Céline Bressollette-Bodin^{1,3}
and Béatrice Charreau^{1,2*}

¹Nantes Université, CHU Nantes, Inserm, Centre de Recherche Translationnelle en Transplantation et Immunologie, UMR 1064, Nantes, France, ²CHU Nantes, Nantes Université, Institut de Transplantation Urologie Néphrologie (ITUN), Nantes, France, ³CHU Nantes, Nantes Université, Laboratoire de Virologie, Nantes, France

The human cytomegalovirus (HCMV) triggers both innate and adaptive immune responses, including protective CD8⁺ $\alpha\beta$ T cells (CD8T) that contributes to the control of the infection. In addition to CD8T restricted by classical HLA class Ia molecules, HCMV also triggers CD8T recognizing peptides from the HCMV UL40 leader peptide and restricted by HLA-E molecules (HLA-E_{UL40} CD8T). This study investigated the frequency, phenotype and functions of HLA-E_{UL40} CD8T in comparison to the immunodominant HLA-A2_{pp65} CD8T upon acute (primary or secondary infection) or chronic infection in kidney transplant recipients (KTR) and in seropositive (HCMV⁺) healthy volunteer (HV) hosts. The frequency of hosts with detected HLA-E_{UL40} CD8T was similar after a primary infection (24%) and during viral latency in HCMV⁺ HV (26%) and equal to the frequency of HLA-A2_{pp65} CD8T cells in both conditions (29%). Both CD8T subsets vary from 0.1% to >30% of total circulating CD8T according to the host. Both HLA-E_{UL40} and HLA-A2_{pp65} CD8T display a phenotype specific of CD8⁺ TEMRA (CD45RA⁺/CCR7⁻) but HLA-E_{UL40} CD8T express distinctive level for CD3, CD8 and CD45RA. Tim3, Lag-3, 4-1BB, and to a lesser extend 2B4 are hallmarks for T cell priming post-primary infection while KLRG1 and Tigit are markers for restimulated and long lived HCMV-specific CD8T responses. These cell markers are equally expressed on HLA-E_{UL40} and HLA-A2_{pp65} CD8T. In contrast, CD56 and PD-1 are cell markers discriminating memory HLA-E- from HLA-A2-restricted CD8T. Long lived HLA-E_{UL40} display higher proliferation rate compared to HLA-A2_{pp65} CD8T consistent with elevated CD57 expression. Finally, a comparative immunoprofiling indicated that HLA-

E_{UL40} CD8T, divergent from HLA-A2_{pp65} CD8T, share the expression of CD56, CD57, NKG2C, CD158 and the lack of PD-1 with NKG2C⁺CD57⁺ NK and $\delta 2^-$ $\gamma\delta$ T cells induced in response to HCMV and thus defines a common immunopattern for these subsets.

KEYWORDS

HCMV, HLA-E, CD8 T cells, CD56, PD-1, NK, $\gamma\delta$ T

Introduction

Human cytomegalovirus (HCMV) is a ubiquitous virus found in > 50% of the world's population (1), commonly characterized by latency and lifelong persistence after primary infection in the immunocompetent hosts (2). By using a large spectrum of immune escape strategies, HCMV can survive in the host despite robust innate and adaptive immune responses and cause chronic infection (3). Although more often asymptomatic in immunocompetent hosts, HCMV infection can cause life threatening infections in individuals with a suppressed immune system or immunodeficiency disorders. HCMV remains a challenging obstacle in transplant recipients due to immunosuppressive regimen (2). HCMV trigger innate and adaptive immune responses.

CD8⁺ T cells play an essential role in the host immune response to HCMV and other viruses by recognizing and eliminating infected cells (4–6). Recognition is mediated by the $\alpha\beta$ T cell receptor (TCR), which binds viral peptides presented by major histocompatibility complex (MHC) class I molecules on infected cells (7). After infection, antigen-specific CD8⁺ $\alpha\beta$ T (CD8T) cells undergo clonal expansion and acquire effector functions to eliminate infected cells (6). The effectiveness of the T cell response to a given virus relies on highly diverse $\alpha\beta$ TCR repertoires able to recognize multiple viral epitopes and assure protection from viral escape (8). T-cell responses against HCMV naturally focus not only on one, but multiple antigens. A total of 151 HCMV open reading frames (ORFs) out of the 213 HCMV ORFs, were found to be immunogenic for CD4⁺ and/or CD8T cells (9). The CD8T cell response to HCMV has been studied extensively (2, 4, 8). The tegument protein pp65 (UL83) accounts for 70%–90% of the CD8⁺ T cell response to HCMV (9–11). The dominant epitope in human leukocyte antigen (HLA)-A2⁺ individuals corresponds to AA 495–503 of pp65 (NLVPMVATV) (12). In addition to conventional anti-HCMV CD8T cell responses defined by peptide presentation by classical HLA class I molecules exemplified by HLA-A*02:01pp65 (referred to as

HLA-A2_{pp65}), unconventional CD8T cells responses that recognize signal peptides from HCMV UL40 leader peptides presented by HLA-E molecules (13, 14) (referred to as HLA-E_{UL40}) have been also reported (15–19). However, studies have not been rigorously performed comparing the phenotype, protective abilities and functional activities of HLA-E_{UL40} versus conventional HLA-A2_{pp65} memory CD8T cells during the various phases of HCMV chronic infections.

We have previously shown that HLA-E_{UL40} CD8⁺T responses are frequently induced in response to HCMV infection in kidney transplant recipients (KTR) as well as in healthy subjects which may represent a large fraction of the CD8T cells compartment post-infection that persist for life (19). The phenotype and functions of HLA-E_{UL40} CD8T cells still remain poorly described (20). The present study provides a refined phenotype characterization of HLA-E_{UL40} CD8T in comparison to HLA-A2_{pp65} CD8T cells responses during the acute and chronic phases of HCMV infection in KTR and healthy HCMV seropositive (HCMV⁺) subjects (healthy volunteers, HV). Our findings indicate that memory HLA-E_{UL40} CD8T cells responses occurs rapidly post-infection and may precede the development of HLA-A2_{pp65} CD8T cells responses reflecting the rapid and earlier expression of UL40 compared to pp65 in HCMV infected cells. Here we show that circulating HLA-E_{UL40} CD8T and HLA-A2_{pp65} CD8T cells are effector memory CD8T re-expressing CD45RA (TEMRA) which share common phenotype traits evolving according infection phase (primary infection, reactivation and chronic infection). We also found qualitative and quantitative changes between the two responses and we identified a set of markers that distinguish HLA-E_{UL40} from HLA-A2_{pp65} CD8T cells responses which may be indicative of specific functions, regulations and cell targets. A comparative immunophenotyping further indicates that divergent from HLA-A2_{pp65} CD8T, HLA-E_{UL40} CD8T share with NKG2C⁺CD57⁺ NK and $\delta 2^-$ $\gamma\delta$ T cells the expression of CD56, CD57, NKG2C, CD158 and the lack of PD-1 which thus define a common immunopattern for these subsets induced in response to HCMV.

Materials and methods

Study approval and ethics

Banked biological samples (peripheral blood mononuclear cells, PBMC) were issued from the DIVAT biocollection (CNIL agreement n°891735, French Health Minister Project n°02G55) and stored at the Centre de Ressources Biologiques (CRB, CHU Nantes, France). This retrospective study was performed according to the guidelines of the local and national ethics committees (CCPRB, CHU Nantes, France). Blood samples collected from anonymous healthy volunteers (HV, n=35) were obtained from the Etablissement Français de Sang (EFS Pays de la Loire, Nantes, France) and collected with donor's specific and written informed consent for research use.

Patients and samples

A total of 21 patients who underwent kidney transplantation in our institute (Institute for Transplantation Urology Nephrology, ITUN, CHU Nantes, France) between 2009 and 2017 were retrospectively enrolled in our study. The cohort includes HCMV seronegative (HCMV⁻) transplant recipients (R⁻) at the time of transplantation with a primary HCMV infection post-transplantation (n=17) and seropositive (HCMV⁺) transplant recipients (R⁺, n=4) with a HCMV reactivation post-transplantation. Characteristics of the patients are provided in [Table 1](#). No statistical differences were found between HV and KTR patients related to age or gender ratio.

PBMC issued from KTR were prospectively isolated and stored in liquid nitrogen at the Centre de Ressources Biologiques (CRB, CHU Nantes, France). PBMC from HCMV⁺ HV were isolated by Ficoll density gradient (Eurobio, Les Ulis, France) and kept frozen until use. PBMC were thawed before use in RPMI-1640 medium (Gibco, Amarillo, Tx, USA) supplemented with 10% human serum (pool of male AB plasma, Sigma Aldrich, St-Louis, MI, USA), 2 mM L-glutamine (Gibco) and 100 U/mL penicillin (Gibco), 0.1 mg/mL streptomycin (Gibco). For KTR, blood samples were analysed before and after primary infection or reactivation. A single blood sample collected after a primary or a secondary infection was analyzed for all KTR and, for few recipients, 2-to-4 samples collected post-infection or reactivation were analyzed. A total of 20 blood samples from 17 KTR harvested after a HCMV primary infection and 12 samples from 4 HCMV⁺ recipients harvested post-reactivation were investigated for the detection of HCMV-specific CD8T cells and for phenotype analyses. A single sample harvested post-infection was analyzed for 35 HCMV⁺ HV. Samples from HCMV⁺ HV all correspond to chronic infection (viral latency). Patients, samples and individual time points toward

HCMV infection/reactivation and transplantation are depicted in the [Supplemental Figure S1](#). Samples from individual patients were all immunostained and acquired during the same experiment. For each time point, HLA-E_{UL40} and HLA-A2_{pp65} CD8T cells were concomitantly immunostained, quantified and phenotyped as described below.

HCMV monitoring and UL40 sequencing

The groups were defined according to the HCMV serology of the transplant recipients (HCMV⁻ or HCMV⁺) the day of transplantation and for HCMV⁺ hosts by the status of infection (primary, latent, reactivation): Symptomatic primary HCMV infection was defined as a mononucleosis-like syndrome with fever, malaise, lymphocytosis ($>4.0 \times 10^9$ lymphocytes/ml), and/or the presence of activated lymphocytes, combined with serology compatible with HCMV primary infection (positive HCMV IgM and/or IgG with low avidity). HCMV active infection (AI) was defined by having at least two consecutive PCR with a viral load (VL) $> 3 \log_{10}$, expressed as number of viral DNA copies ($\log_{10}$ cop) per 10^6 cells.

For HCMV monitoring, blood samples were collected for patient's follow up or during the acute phase of HCMV infection. HCMV serology was performed using the LIAISON[®] CMV IgG; 149 LIAISON[®] CMV IgM and LIAISON[®] CMV IgG Avidity tests (DiaSorin, Saluggia, Italia). Additional evidence of active HCMV replication was examined using HCMV-specific quantitative PCR on DNA extracted from whole blood, as we previously reported ([21](#)). The combination of positive HCMV IgM and/or IgG and positive PCR was used for confirmation of primary HCMV infection.

For UL40 sequencing, DNA from blood samples (1mL) was used as a template for the amplification HCMV UL40 DNA in a two-runs PCR as described ([19](#), [22](#)) using the following pairs of primers for a first long PCR: forward 5'-TCCTCCCTGGTACCCGATAACAG-3' and reverse 5'-CGGGCCAGGACTTTATAATGGCC-3'; and then for a second nested PCR: forward 5'-GGTAAGGGCACTCGTGAGGATGTGC-3' and reverse 5'-TCCGAACGCTCGTGAGCAACAGTCG-3'. PCR products were purified using ExoSAP-IT[®] USB (Affymetrix, Thermo Fisher Scientific). Bidirectional sequence was performed using the fluorescent BigDye terminator method (Big Dye version 1.1 Cycle Sequencing Kit, Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific) and sequence reactions were run on Applied Biosystems ABI Prism 3130 XL. Nucleotide and amino acid sequences were analysed using Seqscape software (version 2.5, Applied Biosystems). UL40 sequences were determined using of the UL40 sequences from HHV5 (Merlin strain), as references (NCBI Reference Sequence: NC_006273.2). The results of UL40 sequencing are reported in the supplemental [Table S1](#).

TABLE 1 Characteristics of the HCMV⁺ hosts.

	HCMV+			
	Primary-infection (n = 17)	Reinfection/Reactivation (n = 4)	Latent infection (n = 35)	p-value
Transplant HCMV serologic status (M12 post-transplantation)				
D+/R-	16/17	0	NA	
D-/R-	1/17	0	NA	
D+/R+	0	2/4	NA	
D-/R+	0	2/4	NA	
Transplant DONORS				
Age	49.4	58.75	NA	0.4222 ¹
[years; median (Q1-Q3)]	(44-63)	(57-63)		
Gender	12/5	2/2	NA	0.5743 ³
[Male/Female; (% of Male)]	(70.6%)	(50%)		
Donor status [Deceased/Living (% of deceased donors)]	16/1	4/0	NA	>0.9999 ³
	(94.1%)	(100%)		
Transplant RECIPIENTS		HEALTHY VOLUNTEERS		
Age	48.4	60.3	51.2	0.3100 ²
[years; median (Q1-Q3)]	(40.1-60.4)	(51-61.4)	(37-64)	
Gender	12/5	4/0	19/16	0.1436 ⁴
[Male/Female; (% of Male)]	(70.6%)	(100%)	(54.3%)	
Transplant	16/1	4/0	NA	>0,9999 ³
[Kidney/Pancreas-Kidney; (% of Kidney only)]	(94.1%)	(100%)		
Cold ischemia	978.3	1078.8	NA	0.6353 ¹
[minutes; median (Q1-Q3)]	(643-1274)	(868-974)		
Serum creatinine at M12	79.1	162.8	NA	0.0640 ¹
[μmol/L; median (Q1-Q3)]	(6.8-139)	(144-166)		
Proteinuria at M12	0.26	0.17	NA	0.5375 ¹
[g/24h; median (Q1-Q3)]	(0.10-0.34)	(0.12-0.25)		
HLA-A*02 recipients [n; (%)]	11 (64.7%)	4 (100%)	ND	0,2807 ³
Donor Specific Antibodies (DSA) [n; (%)]	1 (5.9%)	2 (50%)	NA	0.0727 ³
Post-Tx HCMV infection [n; (%)]	17 (100%)	/	NA	
HCMV infection time post-Tx	7.7	2.9	NA	0.0160 ¹
[months; median (Q1-Q3)]	(3-11)	(1-2.5)		
Post-Tx HCMV reactivation	4	4	NA	0.0117 ³
[n; (% of HCMV+ recipients)]	(23.5%)	(100%)		
HCMV anti-viral prophylaxis [n;(%)]				
None	1(5.9%)	0	NA	0.0995 ⁴
Ganciclovir™	0	1(25%)	NA	0.0995 ⁴
Rovalcyte™	16(94.1%)	3(75%)	NA	0.0995 ⁴

NA, not applicable; ¹Mann-Whitney U test, ²one-way ANOVA, ³Fisher's exact test, ⁴ KHi2 test.

Production of HLA-E_{UL40} and HLA-A2_{pp65} tetramer complexes

Peptides from 4 HCMV UL40 protein variants (AA₁₅₋₂₃: VMAPRTLIL, VMAPRTLLI, VMAPRSLLI and VMAPRTLVI) and the UL83 (pp65) protein (AA₄₉₅₋₅₀₃: NLVPMVATV) were synthesized (purity>95%) and purchased from Genecust (Boynes, France). The HLA_{peptide} monomers HLA-E*01:01_{UL40} and HLA-A*02:01_{pp65} were produced by the recombinant protein core facilities (P2R, SFR Bonamy, Nantes Université, France) as we previously reported (19). HLA_{peptide} monomers were biotinylated,

purified and tetramerized using APC- streptavidin (BD Biosciences, Le Pont de Claix, France) as we described previously (19).

Immunostaining and multipanel flow cytometry

Ex vivo detection and quantification of HLA-E_{UL40} and HLA-A2_{pp65} CD8T cells

To detect anti-HCMV CD8T cells responses, PBMC (3x10⁵ per condition) were pre-incubated with a blocking anti-CD94

mAb (clone HP-3D9, PE, 5 µg/mL, BD Biosciences) for 25 min at 4°C to inhibit the binding of HLA-E-tetramers to CD94/NKG2A/C receptors. PBMC were then incubated with one of the different APC-labelled HLA-E_{peptide}- or pHLA-A*02_{pp65}-tetramers (10 µg/mL, 1 h, 4°C), before incubation (30 min, 4°C) with the following mAbs: anti-CD3 (clone SK7/Leu4, APC-H7, BD Biosciences), anti-CD8α (clone SK1, BV510, BD Biosciences) and anti-γδTCR (clone B1, BV421, BD Biosciences). In the present work, investigations of KTR's samples were performed using either the exact UL40 peptide identified by the virus sequencing or using a peptide with the closest sequence (Table S1). For the analysis of HV, since the infecting strains were unknown, 3 of the most common UL40 peptides (VMAPRTLIL, VMAPRTLLL, VMAPRSLLL) were used for detection assays. A FMO condition (Fluorescence Minus One; all labelled-markers except one) without tetramer was performed for each sample as a negative control. Data acquisition was performed using BD LSR Fortessa™ X-20 and BD CANTO II™ and analyses were performed using BD DIVA™ Software v8.0 (BD Biosciences). Compensations were made by using anti-mouse κ chain Ab-coated beads (anti-mouse Ig, κ chain/negative control compensation particles set, BD Biosciences) incubated with corresponding mAb at the same concentration during 15 min at RT. Gating analysis strategy is depicted in (Supplemental Figure S2) and was identical for all samples. Briefly, lymphocytes were gated on the basis of their morphology in FSC-A/SSC-A, and doublets of cells were excluded using FSC-A/FSC-H and SSC-A/SSC-H dot plots. Frequency of tetramers⁺ CD8T cells subpopulations was determined after gating on the CD3⁺ TCR γδ⁻ cells.

Phenotype analysis of HCMV-specific CD8T cells

Phenotype was investigated for all the HCMV-specific CD8T responses identified in KTR and for all KTR included in the study. For HCMV+ HV, phenotype analysis was performed for 11 out of the 15 HV that display at least one HCMV-specific CD8T response, 4 HV with HCMV-specific CD8T response accounting for <0.5% were not included (Table S2). For phenotype analyses, immunostaining protocol included sequentially (1) an initial step of CD94 using blocking mAb, (2) an incubation step with HLA_{peptide} tetramers and (3) finally an incubation with anti-CD3, anti-γδTCR and anti-CD8α reported above as a preliminary steps. Next, PBMC were incubated in parallel with sets of mAbs for multipanel analyses as depicted in Supplemental Figure S2. Antibody included: BB700-anti-CD45RA (clone 5H9, BD Optibuild™, BD Biosciences), BV786-anti-CD45RO (clone UCHL1, BD Horizon™, BD Biosciences), PE-Cy7 anti-CCR7 (CD197, clone 3D12, BD Pharmingen™, BD Biosciences) BB515-anti-CD27 (clone M-T271, BD Horizon™), PE-anti-CD28 (clone CD28.2, BD Pharmingen™) and PE-anti-CD57 (clone NK1), BB700-anti-CD56 (clone B159), BB700-anti-HLA-DR (clone

46-6), BB515-anti-CD38 (clone HIT2), PE-anti-2B4 (CD244, clone 2-69), BV786-anti-4-1BB (CD137, clone 4B4-1), BB700-anti-PD-1 (CD279, clone EH12.1), PE-Cy7-anti-TIGIT (clone A15153G), BB515-anti-Tim-3 (CD366, clone 7D3), BB515-or FITC- anti-Lag-3 (CD223, clone T47-530), PE-Cy7-anti-KLRG1 (clone 2f1/KLRG1), BV786-anti-CX3CR1 (clone 2A9-1) and PE-anti-CD62L (clone DREG-56) all from BD Biosciences.

Phenotype analysis of CD56 expressing immune subsets

A 15-color mixed mAbs/pMHC tetramers panel was optimized for use on a Cytex Aurora (Cytex Biosciences, Fremont, CA, USA) spectral flow cytometry platform with a 5-laser configuration (laser excitation wavelengths: 355nm, 405 nm, 488 nm, 561 nm, et 640 nm) as we previously described (23). Briefly, PBMC (1.10⁶/well) were costained using a multistep protocol. PBMC were incubated first with a viability marker (Fixable Viability Stain 440UV, BD Bioscience). Next, cells were incubated in successive steps with (1) BUV563-anti-NKG2C (clone 134591, BD Bioscience), (2) blocking anti-CD94 mAb (BD Bioscience), and (3) APC-labeled -HLA_{peptide} tetramers (HLA-E_{UL40} or HLA-A2_{pp65}), Spark-NIR685-anti-CD19 (Clone HIB19, Biolegend), PerCepFluor710-anti-TCRγδ (clone B1.1, Thermo Fisher, Courtaboeuf, France) and APC-Fire750 anti-TCRγδ2 (clone B6, Biolegend), PE-anti-CD158 (clone HP-MA4, Biolegend, San Diego, CA, USA), BV785-anti-PD-1 (clone EH12.2H7, Biolegend), BV570-anti-CD4 (clone RPA-T4, Biolegend), FITC-anti-CD57 (clone HNK-1, Biolegend), BV510-anti-CD3 (clone OKT3, Biolegend), BUV395-anti-CD45RA (clone 5H9, BD Bioscience) BV805-anti-CD8 (clone SK1, BD Bioscience), BUV737-anti-CD56 (clone NCAM16.2, BD Bioscience) and BUV496-anti-CD16 (clone 3G8, BD Biosciences) mAbs. Cells were incubated with anti-NKG2C mAb before CD94 blockage to avoid interference due to CD94 blocking. The fluorescence intensities were then analyzed using SpectroFlo™ software version 2.2.0 (Cytex Biosciences). The frequency of major immune cell populations was determined using FlowJo™ Software v10 (BD Biosciences) based on manual gating strategies as we reported (23) and as shown in the Supplemental Figure S3. Identification of HLA-E_{UL40} CD8T cells based on selected phenotype markers or with tetramers was made using a gating strategy reported in Supplemental Figure S3.

Cell proliferation assays, cytotoxic capacity and cytokine production

Experiments were performed using PBMC from anonymous HCMV⁺ HV which possess either HLA-A2_{pp65} (n=4) or HLA-E_{UL40} (n=5) CD8T cells responses. For proliferation assays, PBMC were loaded with eF450-Cell proliferation dye (CPD, Invitrogen™, Carlsbad, CA, USA) and cultured for 4 days on 24-well culture plates either uncoated or coated with anti-CD3 (OKT3) and anti-CD8 mAbs (OKT8) in PBS (10µg/mL). At D4, PBMC were harvested and sequentially incubated first with CD94 blocking mAb, then with APC-labelled HLA-A2_{pp65} or

HLA-E_{UL40} tetramers as above and finally immunostained with a cocktail of mAbs containing BV510-anti-CD3, PerCP eFluor710-anti- $\gamma\delta$ TCR, BUV805-anti-CD8 mAbs and Live-dead blue[®] (Invitrogen[™]) to exclude dead cells. PBMC were washed twice in PBS before fluorescence analysis. The fluorescence intensities were measured with a 5-laser Cytex Aurora[™] spectral flow cytometer (Cytex Biosciences) using SpectroFlo[™] software version 2.2.0 (Cytex Biosciences). Cell division was quantified using Flowjo[®] after gating on live CD3+ $\gamma\delta$ TCR- CD8+ tetramer positive (tet⁺) or negative (tet⁻) T cell populations as depicted on **Supplemental Figure S2**.

For the analysis of cytokine production and effectors of cytotoxicity, PBMC were incubated for 4h in the presence of phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) and ionomycin (Cell Stimulation Cocktail, eBioscience[™]) purchased from Sigma-Aldrich (St-Louis, MI, USA) with (for intracellular staining of cytokines and granzyme B) or without (for CD107a staining) brefeldin A and monensin in the presence or absence of HLApeptide tetramers. After treatment, PBMC were harvested and sequentially incubated first with CD94 blocking mAb, then with APC-labelled HLA-A2_{pp65} or HLA-E_{UL40} tetramers as above before immunostaining with cocktails of mAbs containing BV510-anti-CD3, PerCP 710-anti- $\gamma\delta$ TCR, BUV805-anti-CD8, Live-dead blue[®] (Invitrogen) and either BV605-anti-IL-2 (clone 5344.111, BD Biosciences), PerCPCy7-anti-GzmB (clone QA18A28, Biolegend), for panel 1, or PerCPCy7- anti-TNF (clone MAb11, Biolegend), BV605-IFN γ (clone B27, BD Biosciences) and PE-CD107a (clone H4A3, BD Biosciences), for panel 2. CD107a-specific mAb was added to the cells during the stimulation step. The expression of CD107a and GzmB were analyzed in parallel experiments but not on the same cells (no CD107a/GzmB costaining was performed). PBMC were washed twice in PBS before fluorescence analysis as reported above for proliferation and gating strategy was reported above and shown in **Supplemental Figure S2**.

Cell culture, *in vitro* HCMV infection and mRNA analyses

We generated gene expression data from MRC-5 and primary human endothelial cells (EC) isolated from 5 individuals as we described (24); both cell types are commonly used in HCMV infection models. MRC-5 lung fibroblasts were purchased from the ATCC (CCL-171, Manassas, VA, USA) and grown in RPMI (Gibco) supplemented with 5% fetal calf serum (FCS, Gibco). Human primary vascular ECs were isolated by collagenase digestion as we previously reported (24) and used between passages 2 and 5. ECs were cultured in Endothelial Cell Basal Medium (ECBM) supplemented with 5% FCS, 0.004 mL/mL ECGS/Heparin, 0.1 ng/mL hEGF, 1 ng/mL hbFGF, 1 μ g/mL hydrocortisone, 50 μ g/mL gentamicin and 50 ng/mL amphotericin B (C-22010, PromoCell, Heidelberg, Germany).

For HCMV production, an inoculate of HCMV isolate (VHL/E strain, kindly provided by Dr. Franck Halary, CR2TI INSERM UMR1064, Nantes, France) was used to produce a virus stock. For titration, a protocol adapted from (25) was used. For infection, cell monolayers at 50%-80% of confluence were infected with a HCMV (0.2 pfu/cell) for 4h in ECBM supplemented with 2% FCS to allow for virus adsorption. After incubation, culture medium was removed to eliminate free virus and cells are grown for the indicated period of time. Mock-infected cell samples were collected at each time, as mock RNAs can fluctuate over the HCMV infection time course. RNAs were isolated using TRIzol reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), analyzed by Caliper LabChip GX Analyzer (Perkin Elmer Inc., Wellesley, MA, USA) for quantity and quality, and treated with DNase (Ambion, Austin, TX, USA) before reverse transcription (RT). Quantitative RT-PCRs (qRT-PCRs) were performed using the ABI PRISM 7700 sequence detection application program (PE Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). For cellular mRNA quantification, means of C_t triplicates were normalized by the concomitant quantification of ribosomal protein lateral stalk subunit P0 (RPLP0, gene ID: 6175). Relative expression was calculated according to the 2^{- $\Delta\Delta$ C_t} method, as previously described (26) and expressed as Fold-change ratios (HCMV/mock) after normalization to RPLP0. Cellular mRNAs were quantified by qRT-PCR with the following primers and probes purchased from Applied Biosystems: HLA-E (Hs03045171_m1), CD56 (Hs00941830_m1), CD112 (Hs01071562_m1), CD155 (Hs00197846_m1), RPLP0 (Hs99999902_m1). Quantification of viral mRNAs in infected cells was achieved by qRT-PCR using SybrGreen[®] technology with the following primers purchased from Eurofins Genomics (Ebersberg, Germany): UL11 (HHV5UL11for: 5'GCTGTTTCAGGTACATTACC3' and HHV5UL11rev: 5'GGACCGTATGACCAACGAAC3' and UL40 (HHV5UL40for: 5'AAGGCGTAGTGATGATCGT TGGG3' and HHV5UL40rev: 5'CCCGCCACGTTCCGGTC TGG3'), UL83 (HHV5UL83for: 5'AAGGCGGCCGCGT GTCATAACC3' and HHV5UL83rev3: 5'GACGAAGAAC TCGTAACCACCG3') after validation as shown in the **Supplemental Figure S4**.

Statistical analyses

Data are expressed as means $\pm$ SD, or as medians $\pm$ interquartile range between Q1 and Q3, or percentages. Appropriate statistical analyses were performed using GraphPad Prism[™] Software (GraphPad, San Diego, CA, USA) or R and the web application FaDa (<https://github.com/danger-r/FaDAapp>) when indicated. For comparisons of groups Fisher exact test, chi-square test, Mann-Whitney U-test, ANOVA, or 2-sided paired *t* test were used as appropriate. A p-value <0.05 was considered to represent a statistically significant difference.

Results

Generation and maintenance of long-lived HLA-E-restricted versus HLA-A2-restricted CD8T cell responses to HCMV

To investigate the emergence and persistence of HCMV-specific CD8T cells we used PBMC samples collected from KTR before and after a primary infection post-transplantation. PBMC from 4 HCMV⁺ KTR who experienced an episode of HCMV reactivation, and with anti-HCMV CD8T cell responses previously detected, were also included as well as samples from HCMV⁺ HV to compare the frequency of CD8T cells responses after T cell priming, restimulation or during infection latency. Time points at sample collection before and after primary infection or reactivation are reported in [Supplemental Figure S1](#). PBMC were analyzed by flow cytometry using HLA-A2_{pp65}, HLA-E_{UL40} tetramers and a panel of mAbs to detect and quantify antigen-specific CD8T cells using a dedicated gating strategy shown in [Fig.S2](#). This allowed us to establish the frequency of hosts with the HLA-E_{UL40} and HLA-A2_{pp65} CD8 T and the frequency of these HCMV-specific CD8T cells populations among circulating CD8 T cells in the hosts. The panel of CD8T responses and the UL40 peptides recognized by the HLA-E_{UL40} CD8T cells in the patients and HV is reported in [Table S2](#). No HCMV-specific CD8T cells were detected using our assays in samples collected before a primary infection. This findings confirm our previous study (19) indicating that HLA-E_{UL40} as well as HLA-A2_{pp65} CD8T cells appear in response to HCMV infection. First, the [Figure 1](#) shows that the percentage of individuals with HLA-E_{UL40} CD8T cells was similar for KTR with a primary infection and for HCMV⁺ HV with a chronic infection (24% and 26% of the total population, respectively). An equal frequency was also found for the detection of HLA-A2_{pp65} CD8T cells in both groups (29% of both KTR after a primary infection and of HCMV⁺ HV; [Figure 1A](#)). Next, the percentages of the respective HCMV-specific CD8T cell subsets among total blood CD8T cells was calculated to define the frequency of the responses ([Figure 1B](#)). The frequency for both types of anti-HCMV CD8T cells varies from 0.1% to >30% of total circulating CD8T cells according to hosts. These frequencies were similar in the different groups for HLA-E_{UL40} CD8T cells (mean values 1.1%, 2.5% and 4.1%, ns). In contrast, the frequency of HLA-A2_{pp65} CD8T cells was found significantly higher after reactivation (mean value: 1.4%) or at long term post-infection in HV (2.5%) than early after primo-infection (mean value: 0.3%) ([Figure 1B](#)) suggesting that development of HLA-E_{UL40} CD8T cells may occur earlier than those of HLA-A2_{pp65} CD8T cells. To investigate this discrepancy endothelial cells and fibroblasts were infected *in vitro* and viral mRNAs for UL40 and UL83 (pp65) were quantified by qRT-PCR ([Figures 1C–E](#)). Time courses analyses post-infection revealed that UL40 viral

mRNA transcription occurs earlier and is quantitatively higher (around 100-fold) than UL83 mRNA supporting the idea that the emergence of HLA-E_{UL40} CD8T cells recognizing UL40 peptides may precede the apparition of HLA-A2_{pp65} CD8T cells after infection.

HLA-E_{UL40} CD8 TEMRA display distinctive low CD8 and high CD45RA expression compared to HLA-A2_{pp65} CD8 TEMRA

The phenotype of the various tetramer⁺ CD8T responses was compared by multipanel flow cytometry using the workflow and gating strategies depicted in [Supplemental Figure S3](#). Firstly, the differentiation stage of anti-HCMV CD8T cells was investigated. After a primary HCMV infection or a reactivation, the homeostasis of overall circulating CD8T cells subsets changes toward a decrease in naive CD8T cells counterbalanced by an increase in effector CCR7[−] memory T cells re-expressing CD45RA (TEMRA) cells ([Figure 2A](#)). Consistent with a rise in TEMRA cells in blood, we found that the vast majority of both HLA-E_{UL40} and HLA-A2_{pp65} CD8T cells populations display a phenotype specific of TEMRA after a primary infection, a reactivation and also during the chronic phase (at viral latency) of infection in HCMV⁺ healthy hosts. Compared to the pool of tetramer[−] TEMRA CD8T cells in the various conditions, UL40- and pp65-specific memory T cells display significant changes in the expression of CD3, CD8 and CD45RA ([Figures 2B–E](#)). HLA-A2_{pp65} CD8 T cells express low CD3 and high CD8 while HLA-E_{UL40} CD8T display lower CD3 and CD8 post-reactivation and a higher CD45RA expression which persist long term post-infection as exemplified in HV.

Considering the time course of infection, the expression of CD27 and CD28 was progressively lost after HCMV infection to reach a stable CD27[−]/CD28[−], CCR7[−], CD45RA⁺, CD8⁺ TEMRA phenotype during chronic infection such as in HV hosts with a latent HCMV infection ([Supplemental Figure S5](#)). After primoinfection there is a significant decrease in the coexpression of HLA-DR and CD38 for total and HCMV-specific CD8T cells and may reflect recent activation ([Supplemental Figure S5](#)). No specific changes were found during reactivation or latency.

Common phenotype traits between HLA-E_{UL40} and HLA-A2_{pp65} CD8T cells and evolution according to the phase of HCMV infection

Immunophenotyping was implemented to further characterize HLA-E_{UL40} CD8T cells responses and to compare

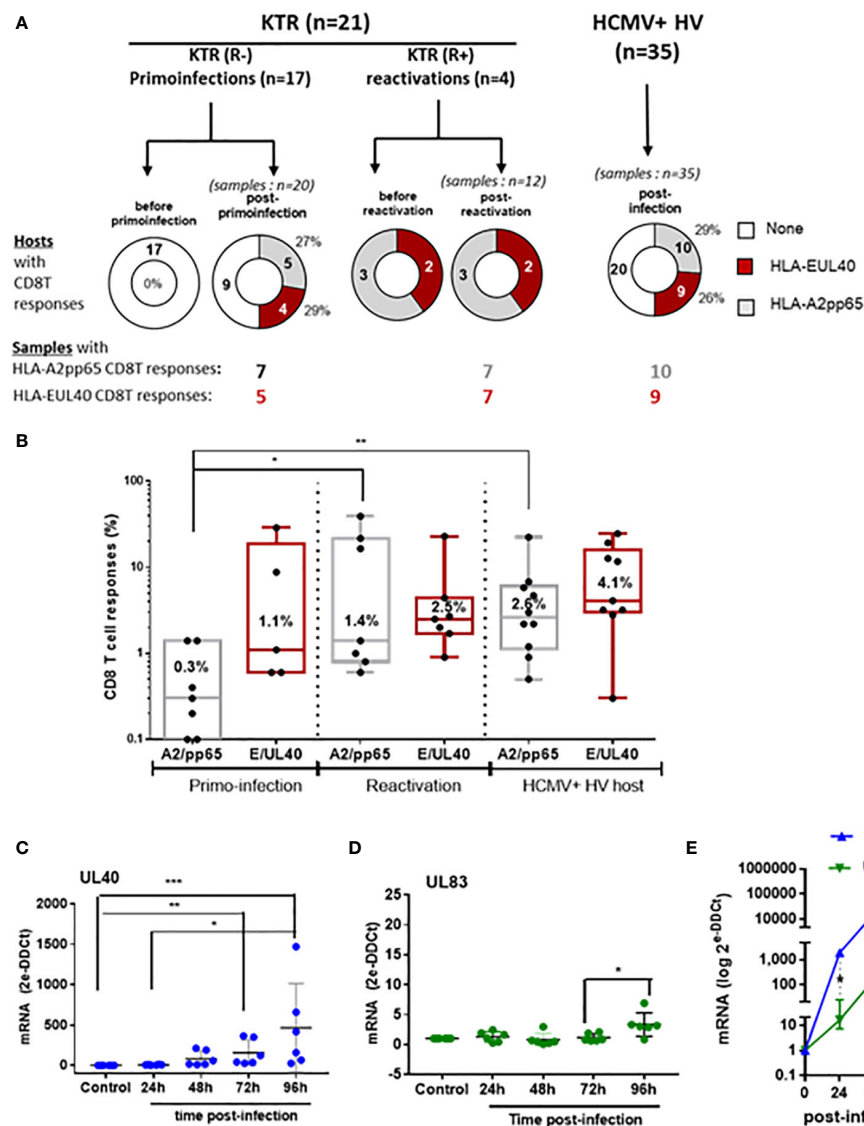


FIGURE 1

Detection and quantification of HCMV-specific CD8T cell responses in KTR and HV and time course analysis of viral UL40 and UL83 (pp65) post-infection. (A) Donut charts showing the number of hosts with HCMV-specific CD8T cell responses (HLA-E_{UL40}, HLA-A2_{pp65}, none) including KTR before and after a primary infection (R⁻), virus reactivation (R⁺) and in HCMV+ healthy controls (HV). The number of samples containing the different HCMV-specific CD8T responses in the groups are indicated. (B) Box plots with median and interquartile values of the percentages of HCMV-specific CD8T cell responses (HLA-E_{UL40}, HLA-A2_{pp65}) detected in blood among total CD8T cells in samples from KTR after a HCMV primary infection (7 A2pp65 responses and 5 EUL40 responses), a reactivation (7 A2pp65 responses and 7 EUL40 responses), and in HCMV+ HV (10 A2pp65 responses and 9 EUL40 responses). Each point corresponds to an individual CD8T cell response. (C–E) Quantitative RT-PCR analysis of viral mRNA levels for UL40 and UL83/pp65 in HCMV-infected primary endothelial cells (n=5) (C, D). Each point corresponds to an independent endothelial cell culture. (E) Quantitative RT-PCR analysis of viral mRNA levels for UL40 and UL83/pp65 in HCMV-infected MRC5 cells. Controls are uninfected cells. Results are medians from 5 independent endothelial cell cultures (C, D) or means ± SD from triplicate experiments for MRC5 cells (E) and are expressed as 2^{-ΔΔCt} values normalized to the RPLP0 housekeeping gene. Statistical analysis was performed by Mann-Whitney U-test. P values: * for p < 0.05, ** for p < 0.01 and *** for p < 0.001.

them with conventional HLA-A2_{pp65} CD8T cells responses. Here we show that the phenotype of the two HCMV-specific CD8T populations evolves with the infection phase in KTR and HV hosts. Upon a primary infection, priming of HCMV-specific

CD8T cells corresponds with a transient expression for Tim-3, Lag-3 and 4-1BB at the surface of tet+ CD8T cells (Figures 3A–C). The costimulatory molecule 4-1BB was expressed by a small subset of blood CD8 T cells (<10%) before and after

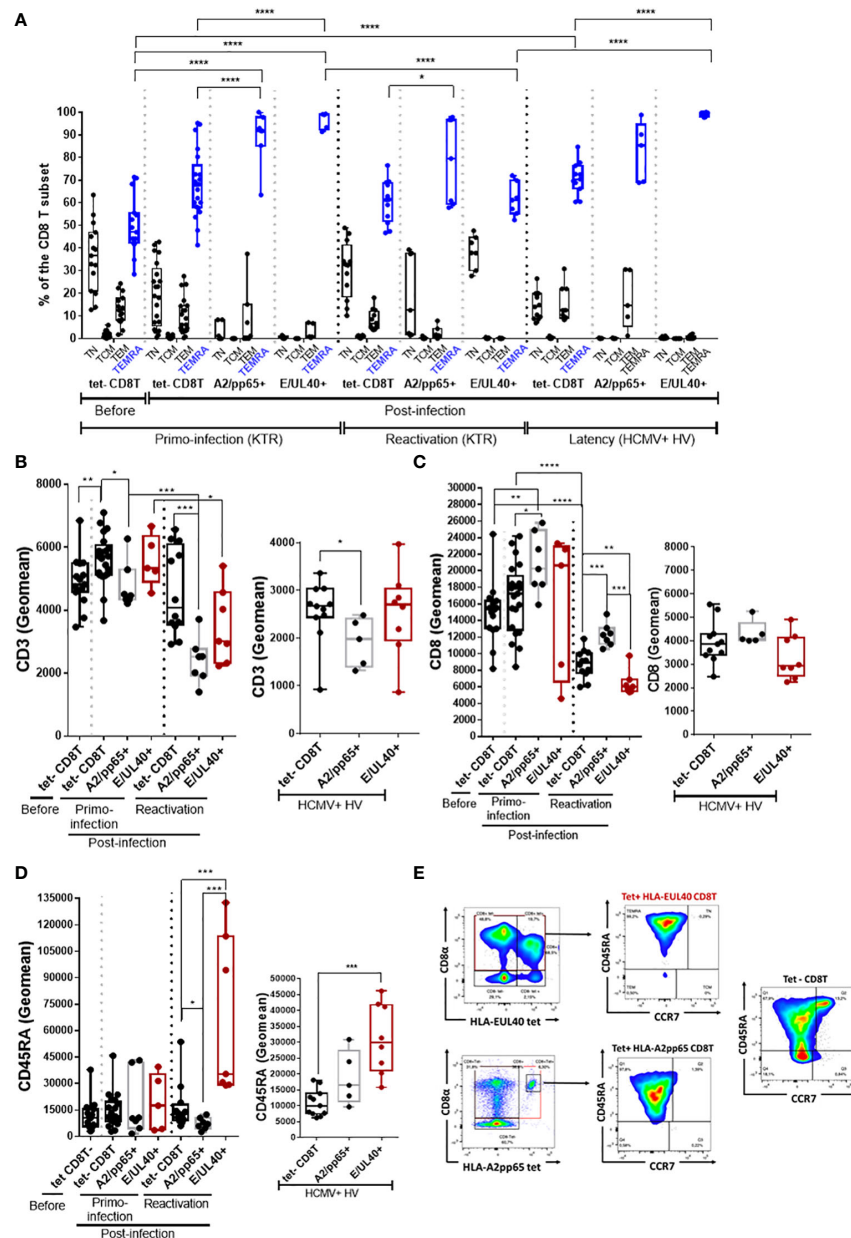


FIGURE 2

HLA-E_{UL40} memory CD8T cells are TEMRA cells with distinctive levels for CD3, CD8 and CD45RA compared to HLA-A2_{pp65} CD8T cells. After immunostaining and fluorescence acquisition CD8T cell populations were defined using a dedicated gating strategy as reported in the Materials and methods section and in Fig S3 in order to identify tetramer⁺ CD8T cells (tet-CD8T), HLA-E_{UL40} (E/UL40+) and HLA-A2_{pp65} (A2/pp65+) CD8 T cells. (A–D) Box plots representations of analyses performed on HLA-E_{UL40} CD8T cells from KTR with a primary infection (n=5), a reactivation (n=7), from HV at latency (n=9) and on HLA-A2_{pp65} CD8T cells from KTR with a primary infection (n=7), a reactivation (n=7), from HV at latency (n=10) and the respective tet- CD8T cells. Each point corresponds to a single CD8T response (A) Differentiation stage determined using CD45RA and CCR7 costaining to define naive T, central memory T cells (TCM), effector memory T cells (TEM) and terminally differentiated effector memory T cells reexpressing CD45RA (TEMRA). Data are expressed as percents of total CD8⁺ αβT cells in the respective subsets. Statistical analysis was performed by two-way Anova test. Comparative expression levels for CD3 (B), CD8 (C) and CD45RA (D) in KTR before and post-infection (primary or reactivation) and HCMV⁺ HV (latency). Data are expressed as specific fluorescence intensities (geomeans). (E) Representative flow histograms illustrating CD8α and CD45RA expression at the surface of tetramer⁺ CD8T cells (tet-CD8T), HLA-E_{UL40} (E/UL40+) and HLA-A2_{pp65} (A2/pp65+) CD8T cells. (B–D) Statistical analysis was performed by Mann-Whitney U-test. p values: *for p < 0.05, **for p < 0.01, ***for p < 0.001 and ****for p < 0.0001.

primoinfection. The expression of 4-1BB was more disparate among hosts for HLA-E_{UL40} and HLA-A2_{pp65} CD8T cells after a primary infection but drop drastically upon HCMV reactivation. Tim-3 and Lag-3 were also not further expressed upon HCMV reactivation nor during latency in HCMV⁺ HV hosts for Tim-3. HCMV-specific CD8T priming and reactivation upon HCMV reactivation also associate with the expression of 2B4 while 2B4 was found to be expressed only by a minority of the tetramer⁺ CD8T populations in HV during latency (Figure 3D). Tigit was consistently expressed by HCMV-specific CD8T cells post-primoinfection, reactivation and during infection latency. After reactivation and long lived HLA-E_{UL40} and HLA-A2_{pp65} CD8T cells expressed consistently KLRG1, Tigit (Figures 3E, F). Thus Tim3, Lag-3, 4-1BB and 2B4 are hallmarks for T cell priming post-primary infection, and restimulation for 2B4, while KLRG1

and Tigit are markers for restimulated and long lived HCMV-specific CD8T cells responses. These cell markers were equally expressed on HLA-E_{UL40} and HLA-A2_{pp65} CD8T cells.

CD56 and PD-1 are cell markers discriminating HLA-E- from HLA-A2-restricted HCMV-specific CD8T cells

Significant differences were found by comparing the phenotype of HLA-E_{UL40} and HLA-A2_{pp65} CD8T cells. HLA-E_{UL40} CD8T cells progressively acquire the expression of CD56 post-infection with up to 97% of HLA-E_{UL40} CD8T cells expressing CD56 during latency (Figure 4A). CD56 is selectively expressed on HLA-E_{UL40} CD8T cells detected after

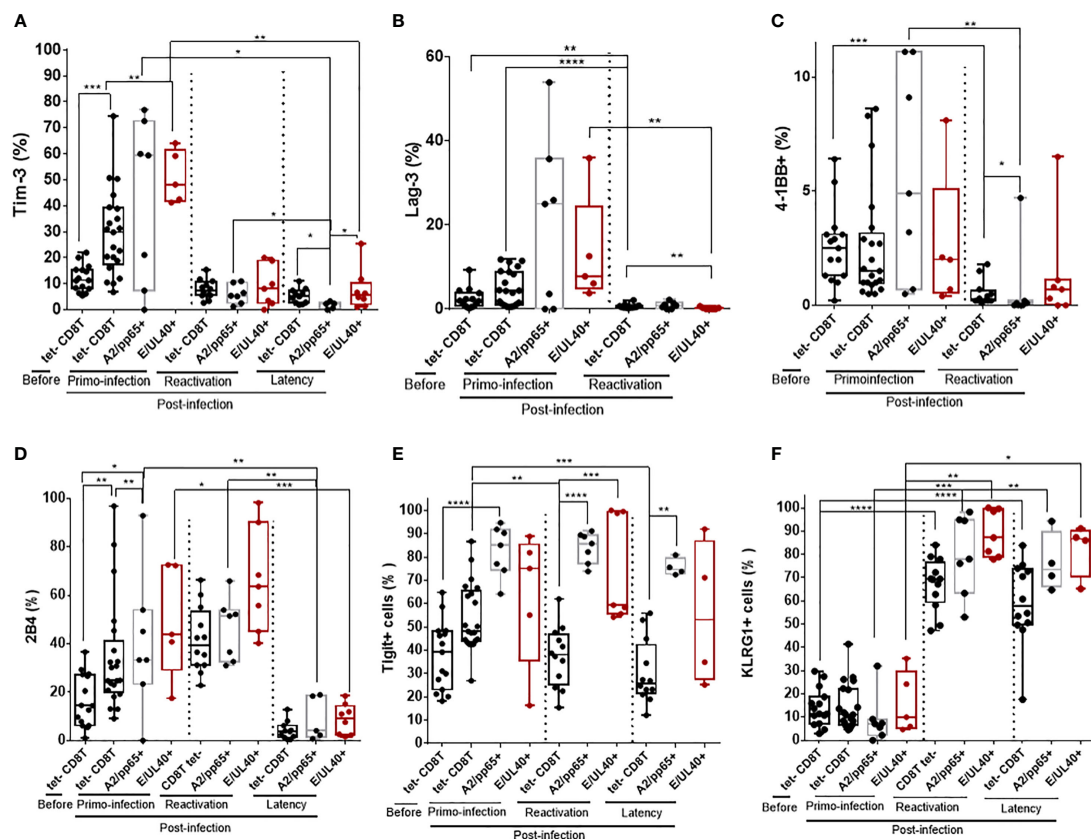


FIGURE 3

Immunophenotype of HLA-E_{UL40} and HLA-A2_{pp65} memory CD8 T cells after a primary HCMV infection, a reactivation in KTR and during chronic infection in HCMV⁺ HV. After immunostaining and fluorescence acquisition, CD8T cell populations were defined using a dedicated gating strategy as reported in the Materials and methods section and in Figure S3 in order to identify pMHC tetramer- CD8T cells (tet-CD8T), HLA-E_{UL40} (E/UL40+) and HLA-A2_{pp65} (A2/pp65+) CD8T cells. Box plots with median and interquartile values showing the specific expression for Tim-3 (A), Lag-3 (B), 4-1BB (C), 2B4 (D), Tigit (E) and KLRG1 (F). Results are expressed as percentages of positive cells in the different CD8 T cell subsets. (A–F) Box plots with median and interquartile values for analyses performed on HLA-E_{UL40} CD8T cells from KTR with a primary infection (n=5), a reactivation (n=7), from HV with chronic infection/latency (HV; n=9) and on HLA-A2_{pp65} CD8T cells from KTR with a primary infection (n=7), a reactivation (n=7), from HV with chronic infection/latency (n=10) and the respective tet⁺ CD8T cells. Each point corresponds to an individual CD8T response. Statistical analysis was performed by Mann-Whitney U-test. P values: *for p < 0.05, **for p < 0.01, ***for p < 0.001 and ****for p < 0.0001.

a primary infection. CD56 expression was found maximal post-reactivation and remains a feature HLA-E_{UL40} CD8T cells responses at latency, far away from infection. In contrast to HLA-E_{UL40}, HLA-A2_{pp65} CD8T cells do not express CD56. Another marker discriminating HLA-E_{UL40} from HLA-A2_{pp65} CD8T cells is the inhibitory receptor PD-1. Post-infection, during acute phase as well as at latency, a majority of HLA-A2_{pp65} CD8 TEMRA express PD-1 (Figure 4B). In contrast, PD-1 was only expressed by a minority of HLA-E_{UL40} CD8 T (around 10%) after primary infection but was no longer expressed after reactivation and at latency. Differences in the expression for CD57 (Figure 4C) and CD62L (Figure 4D) were also found between the two CD8T cell responses. CD57 was found to be expressed on total (tetramer⁺) and by the two antigen-specific CD8T cells subsets after a primary infection and after HCMV reactivation. At latency, during the chronic phase of HCMV infection, CD57 is significantly higher on HLA-E_{UL40} CD8T compared to HLA-A2_{pp65} CD8T cells and total (tetramer⁺) CD8 T cells. Similarly at latency, CD62L was significantly higher on HLA-E_{UL40} CD8T cells compared to HLA-A2_{pp65} CD8T cells. Overall, HLA-E_{UL40} CD8 T cells are CD56⁺ CD57⁺ PD-1⁻ CD8⁺ TEMRA cells whereas HLA-A2_{pp65} CD8T cells are CD56⁻ CD57⁺ PD-1⁺ CD8⁺ TEMRA cells. In this study we used HCMV-infected cells to analyze whether the ligands of the receptors found expressed on HCMV-specific CD8T cells are expressed and either up- or down-regulated on infected cells. Our findings indicated that mirroring the phenotype traits of anti-HCMV CD8T cells, infected cells overexpress HLA-E (TCR ligand), CD56 (CD56 ligand) and the Tigit low affinity ligand CD112 but not CD155, the high affinity ligand for Tigit (Figure 4E) and thus may interact with/be target of HLA-E-restricted CD8T cells. Moreover, infected cells also express UL11, a potential ligand for CD45RA (Figure 4F).

CD56⁺ PD-1⁻ HLA-E_{UL40} CD8T cells display rapid proliferation and effector functions

CD56 and CD57 are markers for cytotoxicity and proliferation, respectively (27) (28). Most of the pp65-specific and UL40-specific CD8T cells detected and analyzed in our study are TEMRA cells and do not express CD28 (Sup Fig S5). Consequently, in the set up experiments of our functional assays we tested the possibility to stimulate these CD8T cells *via* CD3 and CD8. Moreover, as shown in the Figure 3, pp65-specific and UL40-specific CD8T cells display distinctive levels of CD3 and CD8 expression. Thus our assay was designed to also investigate whether this difference of expression could affect their proliferation. Proliferation assays and cell division analyses indicated a faster proliferation for HLA-E_{UL40} CD8T cells compared to HLA-A2_{pp65} CD8T cells (Figure 5A). Moreover, proliferation for HLA-E_{UL40} CD8T cells was faster than the

proliferation of total (tet⁺) CD8T cells (Figure 5B) while in contrary HLA-A2_{pp65} CD8T cells proliferation was slower than global CD8T cells (Figure 5C). Both HLA-E_{UL40} and HLA-A2_{pp65} CD8T subsets express Granzyme B and, after stimulation, CD107a indicating cytotoxic capacities. After stimulation HLA-E_{UL40} and HLA-A2_{pp65} CD8T cells similarly produce TNF and IFN γ while IL-2 production was higher for HLA-A2_{pp65} than for HLA-E_{UL40} CD8T cells (Figure 5D).

CD56⁺ PD-1⁻ HLA-E_{UL40} CD8T cells display phenotype features shared with CD57⁺ NKG2C⁺ NK and $\delta 2$ - $\gamma\delta$ T cells

To further investigate the properties of CD56⁺ PD-1⁻ HLA-E_{UL40} CD8T cells we thought to achieve an analysis comparing the phenotype of HLA-E_{UL40} CD8T cells with other long lived immune subsets participating to the control of HCMV after infection. These subsets include total CD8 $\alpha\beta$ T cells and the well described HLA-A2_{pp65} CD8T, total NK cells and subsets expressing CD57 and/or NKG2C, total $\gamma\delta$ T and $\delta 2$ - $\gamma\delta$ T, $\delta 2$ ⁺ $\gamma\delta$ T subsets from the same HCMV⁺ hosts. Immunophenotyping was performed by spectral flow cytometry and data are shown in the Figure 6A, B. This analysis indicates that while CD3 expression is a feature of both CD8⁺ $\alpha\beta$ T and $\gamma\delta$ T cells, CD8 and CD45RA are also expressed by $\gamma\delta$ T in particular $\delta 2$ - $\gamma\delta$ T cells and by CD57⁺ NK subsets (Figure 6A). High and equal expression of CD45RA were found on HLA-E_{UL40} CD8T and NK cells. Among CD8T cells CD57 is selectively expressed by HLA-E_{UL40} and HLA-A2_{pp65} CD8T. In addition to these anti-HCMV CD8T subsets CD57 is restricted to CD57⁺ NK cells. Interestingly, concerning the relative levels of expression, CD57 levels on HLA-E_{UL40} and HLA-E_{pp65} CD8T is significantly higher than the one on NK cells (Figure 6B). NKG2C was also only observed on HLA-E_{UL40} CD8T and on NKG2C⁺ NK cells. In contrast to CD57, CD56 was found common to HLA-E_{UL40} CD8T, $\gamma\delta$ T in particular $\delta 2$ - $\gamma\delta$ T cells and by CD57⁺ NK subsets (Figure 6A) and expressed at similar level in these immune subsets (Figure 6B). Similarly CD158 is another common feature of HLA-E_{UL40} CD8T, $\gamma\delta$ T in particular $\delta 2$ - $\gamma\delta$ T cells and by CD57⁺ NK subsets. Finally, low or even no expression of PD-1 is a key feature shared by HLA-E_{UL40} CD8T, $\delta 2$ - $\gamma\delta$ T cells and all NK cells. Therefore, CD8^{low}, CD45RA^{high} CD56⁺, CD57^{high} CD158⁺, PD-1⁻ immune profile defines a set of HLA-E-restricted $\alpha\beta$ CD8T, $\gamma\delta$ T (mostly $\delta 2$ - $\gamma\delta$ T) and CD57⁺ NK cells induced by HCMV infection. Finally, using either a set of these markers (CD3, CD8, CD45RA, CCR7, CD56, CD57, PD-1 and CD158) or HLA-E_{UL40} tetramers, for cell gating in parallel cytometry experiments, indicates that the phenotype CD3⁺ $\gamma\delta$ TCR⁻ CD8⁺ CD45RA⁺ CCR7⁻ CD56⁺ CD57⁺ PD-1⁻ and CD158⁺ identifies a subset of CD8T cells present HCMV⁺ hosts independently of the detection of HLA-E_{UL40} tet⁺ CD8T (Figure 6C). Nevertheless, this CD8T subset is

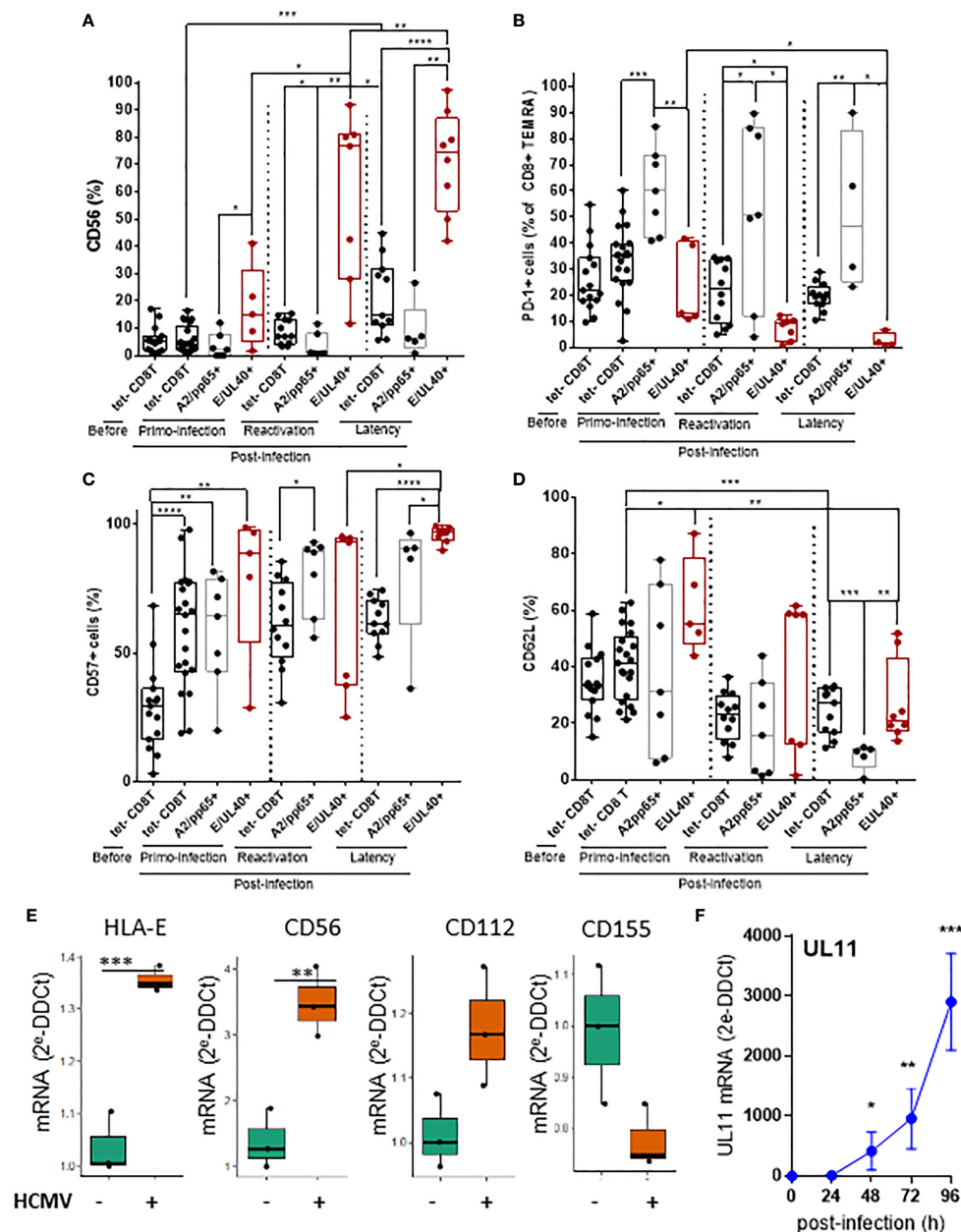


FIGURE 4

T cell markers discriminating HLA-E- from HLA-A2-restricted HCMV-specific CD8T cells and expression of related ligands on HCMV infected cells. After immunostaining and fluorescence acquisition, CD8T cell populations were defined using a dedicated gating strategy as reported in the FigS3 in order to identify pMHC tetramer⁺ CD8T cells (tet-CD8T), HLA-E_{UL40} (E/UL40⁺) and HLA-A2_{pp65} (A2/pp65⁺) CD8T cells. (A–D) Box plots with median and interquartile values for analyses performed on HLA-E_{UL40} CD8T cells from KTR with a primary infection (n=5), a reactivation (n=7), HV (n=9) and on HLA-A2_{pp65} CD8T cells from KTR with a primary infection (n=7), a reactivation (n=7), HV (n=10) and the respective tet⁺ CD8T cells. Specific expression for CD56 (A), PD-1 (B), CD57 (C), and CD62L (D) are shown. Results are expressed as percents of positive cells in the different CD8T cell subsets. Each point corresponds to an individual CD8T response. Statistical analysis was performed by Mann-Whitney U-test. (E, F) Quantitative variations in mRNA levels for cellular (E) HLA-E, CD56, CD112, CD155 and viral (F) UL11 in primary human endothelial cell cultures after HCMV infection. Results from qRT-PCR are means ± SD obtained from 5 independent endothelial cell cultures and are expressed as 2^{-ΔΔCt} values normalized to the RPLP0 housekeeping gene. R and the web application FaDa (<https://github.com/danger-r/FaDAapp>) were used for (E). Statistical analysis was performed by Mann-Whitney U-test. P values: * for p < 0.05, ** for p < 0.01, *** for p < 0.005 and **** for p < 0.001.

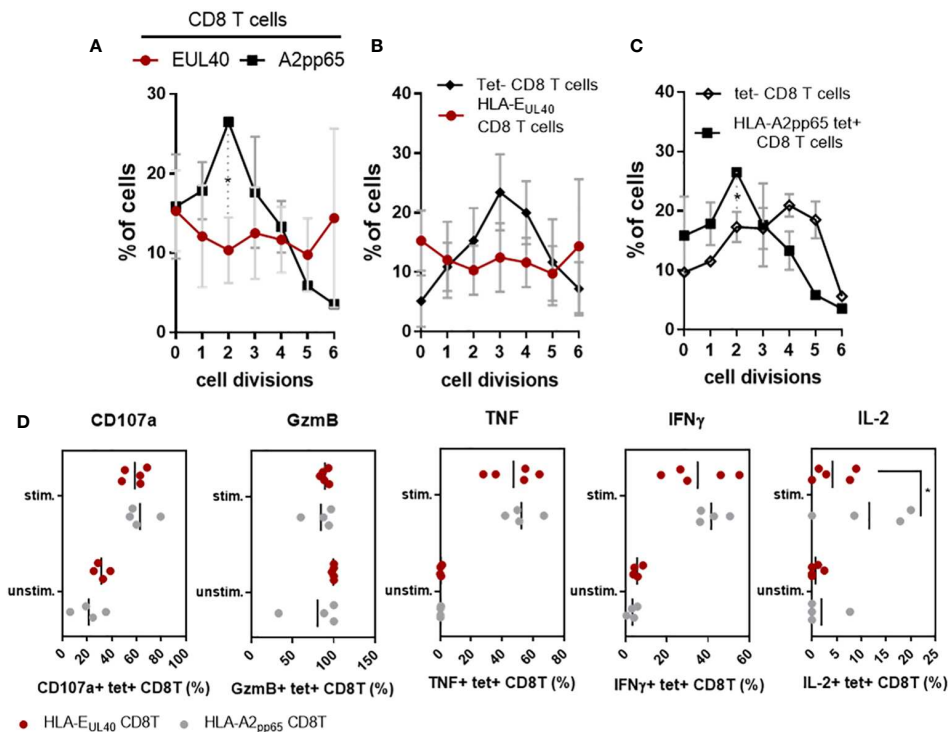


FIGURE 5

Proliferation and effector capacities for HLA-E_{UL40} versus HLA-A2_{pp65} CD8T cells. PBMC from HCMV⁺ HV possessing either HLA-A2_{pp65} (n=4) or HLA-E_{UL40} (n=5) CD8T⁺ cell responses were used. (A–C) For proliferation assays, PBMC were loaded with Cell Proliferation Dye and cultured for 4 days on culture plates either uncoated or coated with anti-CD3 and anti-CD8 mAbs before immunostaining. The number of cell division was quantified using Flowjo[®] after gating on live CD3⁺ γ TCR⁺ CD8⁺ tetramer positive (tet⁺) HLA-E_{UL40} or HLA-A2_{pp65} and tetramer negative (tet⁻) T cell populations. Analyses comparing cell division for HLA-E_{UL40} and HLA-A2_{pp65} CD8T cell populations (A), HLA-E_{UL40} and tet⁻ CD8T cell populations (B) and HLA-A2_{pp65} and tet⁻ CD8T cell populations (C) are shown. Data are expressed as percentages of cells in the cycles. (D) Level of membrane CD107a, granzyme B (GzmB) expression and intracellular TNF, IFN γ and IL-2 expressed by HLA-E_{UL40} and HLA-A2_{pp65} CD8T cell populations before (unstim.) and after (stim.) a 4h-stimulation assay in the presence of PMA/ionomycin. Each point represents an independent CD8T⁺ cell response. Data are expressed as percents of positive cells among tet⁺ CD8T⁺ cells. Statistical analysis was performed by Mann-Whitney U-test. P values: *for p < 0.05.

significantly enlarged in HCMV⁺ hosts with HLA-E_{UL40} CD8T detected with tetramers suggesting that this phenotype may includes HLA-E_{UL40} CD8T and allow their detection.

Discussion

After viral infection, memory CD8T cells can provide efficient protection to re-infection due to their increased cytotoxic potential, cytokine secretion, and ability to respond to reinfection faster than naïve CD8T cells (4–6). Consistent with our previous findings (19), the present study investigating kidney transplanted patients with a primary HCMV infection post-transplantation shows that HLA-E-restricted CD8T cells, a subset of anti-HCMV CD8T cells, are frequently induced post-infection. We found that HLA-E-restricted CD8T are almost as frequent as the « immunodominant » conventional HLA-A2-

restricted pp65-specific CD8T responses early after a primary infection as well as decades post-infection, during viral latency. Both UL40- and pp65-specific CD8T cells responses were detected for 25-30% of KTRs. A frequency similar to the one observed in HCMV⁺ chronically infected healthy individuals. These findings confirm the ability of KTR to develop robust conventional (HLA-Ia-restricted) and unconventional (HLA-E-restricted) HCMV-specific CD8 $\alpha\beta$ T cell responses owing immunosuppressive regimens. This also establish HLA-E-restricted CD8T cells as a major trigger of HCMV immunity. HLA-E-restricted UL40-specific CD8T cell responses appear early after HCMV primary infection and represent a stable pool of HCMV-specific CD8T cells representing 1-to-4% (median values), according to hosts, of total circulating CD8T cells that maintain for life. Early after primary infection the frequency of circulating HLA-E_{UL40} CD8T was found significantly higher than the frequency of HLA-A2_{pp65} T cells

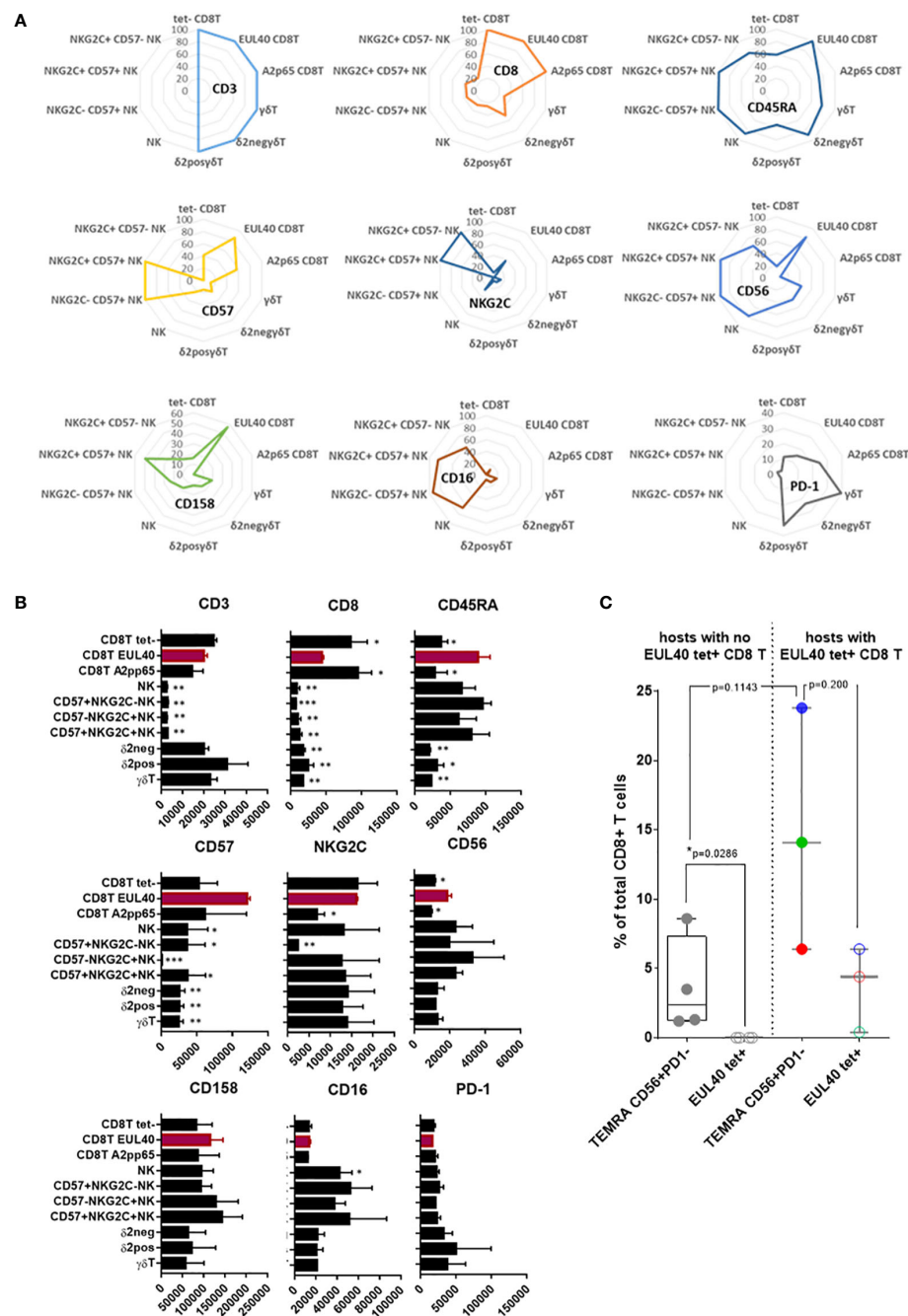


FIGURE 6

Phenotypic proximity of HLA-E_{UL40} CD8 αβT cells with NKG2C⁺CD57⁺ NK and δ2⁺γδT cells. Immunophenotypes comparing HLA-E_{UL40} CD8T cells to tetramer negative (tet-) and HLA-A2_{pp65} CD8 αβT, γδT and NK subsets based on their respective expression of CD3, CD8, CD45RA, CD56, CD57, PD-1, CD16, CD158 and NKG2C. Data were obtained from 4 individuals. **(A)** Radar plots showing the mean of percentages of expressing cells in the different cell subsets for each cell marker. **(B)** Histograms show the means ± SD of fluorescence intensity for expressing cells in the different cell subsets for each cell marker. P values for comparison between HLA-E_{UL40} CD8T and the other immune subsets: **(C)** Detection of CD8T cells using, in parallel experiments, a set of markers (CD3, CD8, CD45RA, CCR7, CD56, CD57, PD-1 and CD158) or HLA-E_{UL40} tetramers (EUL40 tet+) for cell gating on the same PBMC from HCMV⁺ individuals with (n=3) and without (n=4) HLA-E_{UL40} tet+ CD8T cells. Results are shown as box plots with medians and interquartiles values. Statistical analysis was performed by Mann-Whitney U-test. P values: *for p < 0.05, **for p < 0.01, ***for p < 0.005.

while these frequencies reach a similar rate after a secondary infection and in HCMV⁺ HVs (Figure 1B). This discrepancy may suggest that HLA-E_{UL40} T cells appear earlier post-infection than HLA-A2_{pp65} T cell response. This could be explained by the fact that HCMV downregulates HLA class Ia expression but preserves HLA-E level by providing exogenous viral UL40 signal peptide to ensure the surface expression of HLA-E (13, 14, 29, 30). This phenomenon which may contribute to virus escape by promoting cellular inhibition through CD94/NKG2A triggering may also promote the rapid emergence of HLA-E-restricted CD8T cells while, in contrast, reduced expression for HLA-A2 by virus may delay pp65 antigen presentation and subsequent T cell priming. Our data further indicate that differential time course and steady state levels for viral mRNAs encoding UL40 and UL83 (pp65) in HCMV-infected cells may be additive factors which may also account for a delayed emergence of pp65-specific responses compared to UL40-specific responses. Future studies are needed to explore these hypotheses.

The principal objective of the present work was to decipher the phenotype of HLA-E_{UL40} in comparison to the HLA-A2_{pp65} CD8T cells. To this aim, we set up an experimental protocol for immunostaining using HLA-E_{UL40} and HLA-A2_{pp65} tetramers and antibodies to cell surface molecules for multipanel flow cytometry analysis. Our results show that both UL40-specific and pp65-specific responses belong to TEMRA cells after a primary infection and display a stable CD27⁺/CD28⁺, CCR7⁺, CD45RA⁺, CD8⁺ TEMRA phenotype which persist lifelong in HCMV⁺ healthy hosts. However, in comparison to HLA-A2_{pp65} T cells, HLA-E_{UL40} T cells display distinctive levels of CD3 (CD3^{high}), CD8 (CD8^{low}) and CD45RA (CD45RA^{high}) which may suggest specific activation capacity, affinity or/and regulation for HLA-E-restricted CD8T cells. CD45RA has been shown to be a receptor for the viral protein UL11 (31) and thus it could be speculated that elevated CD45RA may contribute to cellular contact with HLA-E-expressing cells *via* the binding to UL11 expressed on infected cells. Mechanistically, extracellular domain of the HCMV glycoprotein pUL11 has been shown to interact with CD45 in trans and to impair T cell signalling and functions (31) and promote IL-10 secretion (32). Here we found a rapid increase in the UL11 transcript level in HCMV-infected cells (Figure 4F) consistent with a potential role for the CD45/UL11 axis in the modulation of HLA-E_{UL40} CD8T cell activation and functions.

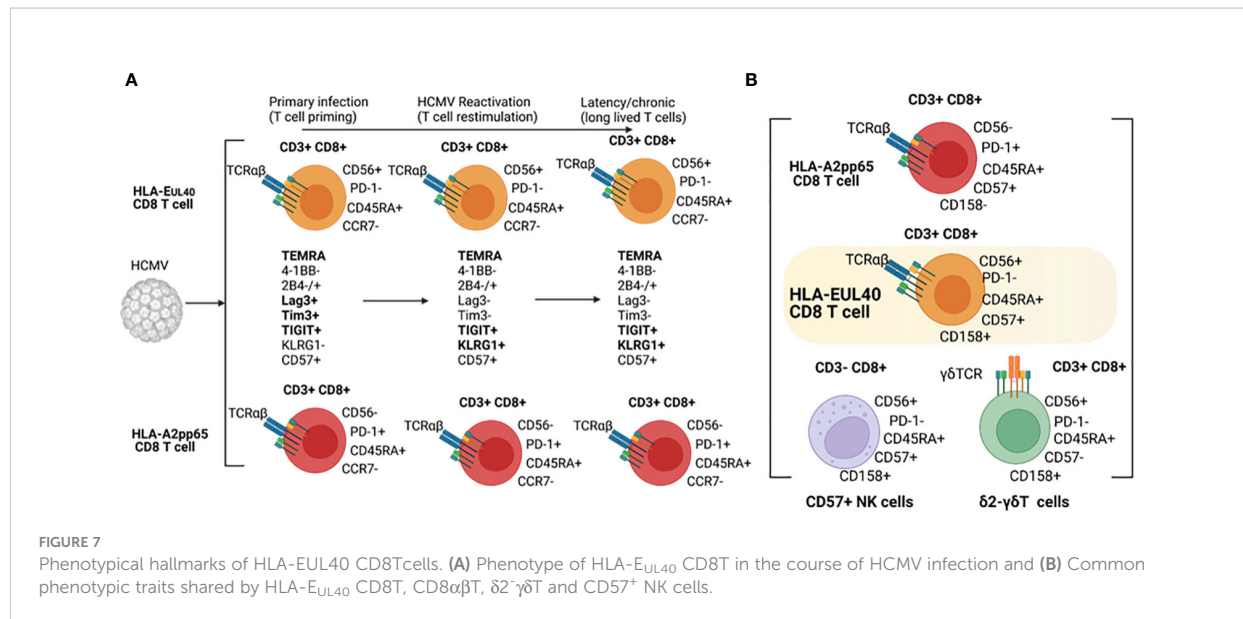
We found that CD3 and CD8 expression levels are other distinctive hallmarks for HLA-E_{UL40} CD8T cells. It is generally thought that the ability of CD8 coreceptor to enhance T cell responses is due to two main effects: first, binding of CD8 to MHC class I molecules helps to stabilize TCR-pMHC interactions and second, the recruitment of the Src kinase Lck to the TCR is more efficient upon CD8 binding to MHC molecules which enhance the initiation of TCR signaling (33). Consistent with our findings, it has been previously shown that T cell subsets are heterogeneous in terms of CD3 surface expression (34, 35). Among $\alpha\beta$ T cells differences have been

established between CD4 and CD8T cells and for naive compared to memory T and regulatory T cells (34, 35). Moreover, $\gamma\delta$ T cells do express similar or even higher levels of CD3 than $\alpha\beta$ T cells (36) as observed in the present study (Figure 6B). Elevated level of CD3 on HLA-E_{UL40} CD8T cells should theoretically influence their capacity to respond to antigen since higher levels of membrane CD3 reached higher levels of activation (35).

Our results indicate that HLA-E_{UL40} and HLA-A2_{pp65} CD8 memory T cells share common phenotypic evolution post-infection with the coexpression of the regulatory receptors 2B4, Lag-3, Tim3 and 4-1BB as an early signature for the primary infection followed by the loss of Lag-3 and Tim3 and the gain of KLRG1 as a signature of T cell restimulation and long lived T cells during virus reactivation and chronic infection/latency, respectively. Immunophenotyping also revealed divergence between HLA-E_{UL40} and HLA-A2_{pp65} T cells as summarized in the Figure 7. A limitation to this study is that the comparison is limited to A2pp65 CD8T cells which represent a fraction of the repertoire of CD8T cells specific of HCMV and therefore does not capture the breadth of the conventional memory CD8T cells phenotypes against other HCMV antigens presented by HLA Ia molecules. Another limitation is the low number of patients especially in the reactivation group (n=4) thereby limiting the comparison between HCMV status at the time of kidney transplantation.

Distinctive membrane expression for CD56, CD57, CD62L and PD-1 are specific features of HLA-E_{UL40} T cells. HLA-E_{UL40} T cells express higher level of CD57 than do HLA-A2_{pp65} T cells. CD57 is a terminally sulphated carbohydrate determinant (glycoepitope) found on various surface glycoproteins, proteoglycans and glycolipids initially detected on subsets of NK cells. CD57 has been almost considered as a marker of replicative senescent T cells but CD57 also associates with a higher cytotoxic capacity, greater responsiveness to signaling, decreased responsiveness to cytokines (37) and failure to proliferate (38). HCMV drives expansion of NKG2C⁺ NK cells which preferentially acquire CD57 (39) (40). In contrast to HLA-A2_{pp65} T cells, HLA-E_{UL40} T cells express no PD-1. PD-1 was found to restrict virus-specific CD8T cells responses during chronic infection by restraining proliferation during the effector phase (41). Previous studies have demonstrated that loss of PD-1 signals *in vitro* leads to increased phosphorylation of signaling molecules downstream of the TCR and costimulatory receptors (42). A feature of HLA-E_{UL40} CD8T cells is the lack of PD-1 expression. Considering the two cardinal features of exhausted CD8T cells which are the loss of effector capabilities and the sustained high expression of multiple inhibitory receptors including PD-1 (43) it could be argued that anti-HCMV HLA-E_{UL40} CD8T cells are not exhausted T cells.

Immunophenotyping of T and NK immune subsets allowed us to compare HLA-E_{UL40} CD8T cells to others CD8 $\alpha\beta$ T, $\gamma\delta$ T



and NK subsets based on their respective expression of CD3, CD8, CD45RA, CD56, CD57, PD-1, CD16, CD158 and NKG2C. This study indicates that HLA-E_{UL40} CD8T cells share with NK cells a high level of CD45RA and CD56, the expression of CD57 (CD57⁺ NK cells) and NKG2C (NKG2C⁺ NK cells) for CD57⁺ and NKG2C⁺ NK subsets both induced by HCMV infection (39, 40). Consistent with a recent study (44), NKG2C expression is a feature that HLA-E_{UL40} CD8T share with NK cells. Since NKG2C binding to HLA-E_{UL40} mediates a strong activation of NK cells (45, 46), it can be speculated that NKG2C expression confer superior activity of the HLA-E_{UL40} CD8T compared to NK cells. Functional assays using cells expressing HLA-E pulsed with the UL40 peptides to detect potential synergistic or additive effect mediated by the engagement of TCR alone or together with NKG2C would be helpful to address this point. Interestingly, γδT cells, in particular δ2-γδT, also express CD45RA, CD56, CD158 and CD8. Thus, these data further support the idea that HLA-E_{UL40} CD8T cells stay at the frontier between adaptive, memory NK, unconventional (γδT) and conventional (αβT) T cell responses and concur together with CD57⁺/NKG2C⁺ NK and δ2-γδT to the effector cell arsenal mobilized to cure infection (Figure 7). Functionally, expression of CD56 that define proximity for HLA-E_{UL40} CD8T cells with NK and γδT cells includes HLA-E_{UL40} CD8T cells in cytokine-induced killer cells (CIK). Indeed, CD56 expression is a key feature of CIK defined as an heterogeneous population of immune effector cells that feature a mixed T- and NK cell-like phenotype in their terminally-differentiated CD3⁺CD56⁺ subset (47, 48). They can be expanded *ex vivo* by culture of PBMC with anti-CD3 antibody and IL-2 [9]. CIK cells can recognize cancer cells which escape immune surveillance with low or even no MHC restriction, and CIK cells are currently evaluated in several

randomized controlled trials as adjuvant cells for immunotherapies in cancer (48). Due to the low polymorphism of *HLA-E* gene and the relatively limited set of peptides presented by HLA-E molecules, HLA-E_{UL40} CD8T cells could also constitute a subset of cytotoxic memory T cells with low or even no HLA-restriction but with a high potential for adoptive cell therapy.

Data availability statement

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

Ethics statement

The studies involving human participants were reviewed and approved by CCPRB, CHU de Nantes, France. The patients/participants provided their written informed consent to participate in this study.

Author contributions

Conceptualization, AR, NG, LD, BC. Methodology, AR, NG, LD, BC. Formal analysis, AR, NG, BC. Investigation, AR, NG, PG, BC, resources, MG, PG, CB-B, BC. Writing—original draft preparation, BC, AR. Supervision, BC. Funding acquisition, BC and CB-B. All authors contributed to the article and approved the submitted version.

Funding

This research was funded by the “Association Grégory Lemarchal » and the « Association Vaincre la Mucoviscidose » (France), grant number RF20190502487 by l’Institut de Recherche en Santé Respiratoire des Pays de la Loire (France), grant number LSC 10280 and by the RHU project Kidney Transplantation Diagnostics Innovation (KTD Innov) funded by the ANR grant number 17-RHUS-0010. A.R. was recipient of a PhD grant from the Nantes Université (France).

Acknowledgments

The authors thank the Recombinant Protein Facility (P²R, Structure Fédérative de Recherche “Francois Bonamy”, Nantes) for the production of pHLA-E_{UL40}- and pHLA-A*02_{pp65}-monomers. The authors also thank the Etablissement Français du Sang (EFS, Pays de la Loire, Nantes, France) and the Centre de Ressources Biologiques (CRB, CHU Nantes, France) for blood sample collection and harvesting. Figure 7 has been created using BioRender.com.

References

- Adland E, Klennerman P, Goulder P, Matthews PC. Ongoing burden of disease and mortality from HIV/CMV coinfection in Africa in the antiretroviral therapy era. *Front Microbiol* (2015) 6:1016. doi: 10.3389/fmicb.2015.01016
- Griffiths P, Baraniak I, Reeves M. The pathogenesis of human cytomegalovirus. *J Pathol* (2015) 235(2):288–97. doi: 10.1002/path.4437
- Forte E, Zhang Z, Thorp EB, Hummel M. Cytomegalovirus latency and reactivation: An intricate interplay with the host immune response. *Front Cell Infect Microbiol* (2020) 10:130. doi: 10.3389/fcimb.2020.00130
- Zhang N, Bevan MJ. CD8(+) T cells: foot soldiers of the immune system. *Immunity* (2011) 35(2):161–8. doi: 10.1016/j.immuni.2011.07.010
- Klennerman P, Oxenius A. T Cell responses to cytomegalovirus. *Nat Rev Immunol* (2016) 16(6):367–77. doi: 10.1038/nri.2016.38
- van den Berg SPH, Pardieck IN, Lanfermeijer J, Sauce D, Klennerman P, van Baarle D, et al. The hallmarks of CMV-specific CD8 T-cell differentiation. *Med Microbiol Immunol* (2019) 208(3–4):365–73. doi: 10.1007/s00430-019-00608-7
- Gabanti E, Bruno F, Fornara C, Bernuzzi S, Lillieri D, Gerna G. Polyfunctional analysis of human cytomegalovirus (HCMV)-specific CD4(+) and CD8 (+) memory T-cells in HCMV-seropositive healthy subjects following different stimuli. *J Clin Immunol* (2014) 34(8):999–1008. doi: 10.1007/s10875-014-0093-5
- Couzi L, Pitard V, Netzer S, Garrigue I, Lafon ME, Moreau JF, et al. Common features of gammadelta T cells and CD8(+) alphabeta T cells responding to human cytomegalovirus infection in kidney transplant recipients. *J Infect Dis* (2009) 200(9):1415–24. doi: 10.1086/644509
- Sylwester AW, Mitchell BL, Edgar JB, Taormina C, Pelte C, Ruchti F, et al. Broadly targeted human cytomegalovirus-specific CD4+ and CD8+ T cells dominate the memory compartments of exposed subjects. *J Exp Med* (2005) 202(5):673–85. doi: 10.1084/jem.20050882
- Wills MR, Carmichael AJ, Mynard K, Jin X, Weekes MP, Plachter B, et al. The human cytotoxic T-lymphocyte (CTL) response to cytomegalovirus is dominated by structural protein pp65: frequency, specificity, and T-cell receptor usage of pp65-specific CTL. *J Virol* (1996) 70(11):7569–79. doi: 10.1128/JVI.70.11.7569-7579.1996
- Sylwester A, Nambiar KZ, Caserta S, Klennerman P, Picker LJ, Kern F. A new perspective of the structural complexity of HCMV-specific T-cell responses. *Mech Ageing Dev* (2016) 158:14–22. doi: 10.1016/j.mad.2016.03.002

Conflict of interest

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

Publisher’s note

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

Supplementary material

The Supplementary Material for this article can be found online at: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2022.1063690/full#supplementary-material>

- Weekes MP, Wills MR, Mynard K, Carmichael AJ, Sissons JG. The memory cytotoxic T-lymphocyte (CTL) response to human cytomegalovirus infection contains individual peptide-specific CTL clones that have undergone extensive expansion in vivo. *J Virol* (1999) 73(3):2099–108. doi: 10.1128/JVI.73.3.2099-2108.1999
- Braud VM, Allan DS, O’Callaghan CA, Soderstrom K, D’Andrea A, Ogg GS, et al. HLA-E binds to natural killer cell receptors CD94/NKG2A, b and c. *Nature* (1998) 391(6669):795–9. doi: 10.1038/35869
- Hoare HL, Sullivan LC, Pietra G, Clements CS, Lee EJ, Ely LK, et al. Structural basis for a major histocompatibility complex class Ib-restricted T cell response. *Nat Immunol* (2006) 7(3):256–64. doi: 10.1038/ni1312
- Romagnani C, Pietra G, Falco M, Millo E, Mazzarino P, Biassoni R, et al. Identification of HLA-E-specific alloreactive T lymphocytes: a cell subset that undergoes preferential expansion in mixed lymphocyte culture and displays a broad cytolytic activity against allogeneic cells. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* (2002) 99(17):11328–33. doi: 10.1073/pnas.172369799
- Pietra G, Romagnani C, Mazzarino P, Falco M, Millo E, Moretta A, et al. HLA-E-restricted recognition of cytomegalovirus-derived peptides by human CD8 + cytolytic T lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* (2003) 100(19):10896–901. doi: 10.1073/pnas.1834449100
- Pietra G, Romagnani C, Manzini C, Moretta L, Mingari MC. The emerging role of HLA-E-restricted CD8+ T lymphocytes in the adaptive immune response to pathogens and tumors. *J Biomed Biotechnol* (2010) 2010:907092. doi: 10.1155/2010/907092
- Sullivan LC, Westall GP, Widjaja JM, Mifsud NA, Nguyen TH, Meehan AC, et al. The presence of HLA-E-Restricted, CMV-specific CD8+ T cells in the blood of lung transplant recipients correlates with chronic allograft rejection. *PLoS One* (2015) 10(8):e0135972. doi: 10.1371/journal.pone.0135972
- Jouand N, Bressollette-Bodin C, Gerard N, Giral M, Guerif P, Rodallec A, et al. HCMV triggers frequent and persistent UL40-specific unconventional HLA-E-restricted CD8 T-cell responses with potential autologous and allogeneic peptide recognition. *PLoS Pathog* (2018) 14(4):e1007041. doi: 10.1371/journal.ppat.1007041
- Pietra G, Romagnani C, Falco M, Vitale M, Castriconi R, Pende D, et al. The analysis of the natural killer-like activity of human cytolytic T lymphocytes revealed HLA-E as a novel target for TCR alpha/beta-mediated recognition. *Eur*

- J Immunol* (2001) 31(12):3687–93. doi: 10.1002/1521-4141(200112)31:12<3687::AID-IMMU3687>3.0.CO;2-C
21. Bressollette-Bodin C, Coste-Burel M, Besse B, Andre-Garnier E, Ferre V, Imbert-Marcille BM. Cellular normalization of viral DNA loads on whole blood improves the clinical management of cytomegalovirus or Epstein Barr virus infections in the setting of pre-emptive therapy. *J Med Virol* (2009) 81(1):90–8. doi: 10.1002/jmv.21334
22. Garrigue I, Doussau A, Asselineau J, Bricout H, Couzi L, Rio C, et al. Prediction of cytomegalovirus (CMV) plasma load from evaluation of CMV whole-blood load in samples from renal transplant recipients. *J Clin Microbiol* (2008) 46(2):493–8. doi: 10.1128/JCM.01499-07
23. Rousselière A, Delbos L, Bressollette C, Berthaume M, Charreau B. Mapping and characterization of HCMV-specific unconventional HLA-E-Restricted CD8 T cell populations and associated NK and T cell responses using HLA/Peptide tetramers and spectral flow cytometry. *Int J Mol Sci* (2021) 23(1):263. doi: 10.3390/ijms23010263
24. Coupel S, Moreau A, Hamidou M, Horejsi V, Souillou JP, Charreau B. Expression and release of soluble HLA-E is an immunoregulatory feature of endothelial cell activation. *Blood* (2007) 109(7):2806–14. doi: 10.1182/blood-2006-06-030213
25. Baer A, Kehn-Hall K. Viral concentration determination through plaque assays: using traditional and novel overlay systems. *J Vis Exp* (2014) 93:e52065. doi: 10.3791/52065
26. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{(-delta delta C(T))} method. *Methods* (2001) 25(4):402–8. doi: 10.1006/meth.2001.1262
27. Van Acker HH, Capsomidis A, Smits EL, Van Tendeloo VF. CD56 in the immune system: More than a marker for cytotoxicity? *Front Immunol* (2017) 8:892. doi: 10.3389/fimmu.2017.00892
28. Weekes MP, Wills MR, Mynard K, Hicks R, Sissons JG, Carmichael AJ. Large Clonal expansions of human virus-specific memory cytotoxic T lymphocytes within the CD57+ CD28- CD8+ T-cell population. *Immunology* (1999) 98(3):443–9. doi: 10.1046/j.1365-2567.1999.00901.x
29. Ulbrecht M, Hofmeister V, Yuksekdog G, Ellwart JW, Hengel H, Momburg F, et al. HCMV glycoprotein US6 mediated inhibition of TAP does not affect HLA-E dependent protection of K-562 cells from NK cell lysis. *Hum Immunol* (2003) 64(2):231–7. doi: 10.1016/s0198-8859(02)00788-7
30. Petrie EJ, Clements CS, Lin J, Sullivan LC, Johnson D, Huyton T, et al. CD94-NKG2A recognition of human leukocyte antigen (HLA)-E bound to an HLA class I leader sequence. *J Exp Med* (2008) 205(3):725–35. doi: 10.1084/jem.20072525
31. Gabaev I, Steinbrück L, Pokoyski C, Pich A, Stanton RJ, Schwinzer R, et al. The human cytomegalovirus UL11 protein interacts with the receptor tyrosine phosphatase CD45, resulting in functional paralysis of T cells. *PLoS Pathog* (2011) 7(12):e1002432. doi: 10.1371/journal.ppat.1002432
32. Zischke J, Mamareli P, Pokoyski C, Gabaev I, Buyny S, Jacobs R, et al. The human cytomegalovirus glycoprotein pUL11 acts via CD45 to induce T cell IL-10 secretion. *PLoS Pathog* (2017) 13(6):e1006454. doi: 10.1371/journal.ppat.1006454
33. Holler PD, Kranz DM. Quantitative analysis of the contribution of TCR/peptide-MHC affinity and CD8 to T cell activation. *Immunity* (2003) 18(2):255–64. doi: 10.1016/s1074-7613(03)00019-0
34. Valle A, Barbagiovanni G, Jofra T, Stabilini A, Perol L, Baeyens A, et al. Heterogeneous CD3 expression levels in differing T cell subsets correlate with the *in vivo* anti-CD3-mediated T cell modulation. *J Immunol* (2015) 194(5):2117–27. doi: 10.4049/jimmunol.1401551
35. El Hentati FZ, Gruy F, Iobagiu C, Lambert C. Variability of CD3 membrane expression and T cell activation capacity. *Cytometry B Clin Cytom* (2010) 78(2):105–14. doi: 10.1002/cyto.b.20496
36. Nicolas L, Monneret G, Debard AL, Blesius A, Gutowski MC, Salles G, et al. Human gammadelta T cells express a higher TCR/CD3 complex density than alphabeta T cells. *Clin Immunol* (2001) 98(3):358–63. doi: 10.1006/clim.2000.4978
37. Lopez-Verges S, Milush JM, Pandey S, York VA, Arakawa-Hoyt J, Pircher H, et al. CD57 defines a functionally distinct population of mature NK cells in the human CD56dimCD16+ NK-cell subset. *Blood* (2010) 116(19):3865–74. doi: 10.1182/blood-2010-04-282301
38. Brenchley JM, Karandikar NJ, Betts MR, Ambrozak DR, Hill BJ, Crotty LE, et al. Expression of CD57 defines replicative senescence and antigen-induced apoptotic death of CD8+ T cells. *Blood* (2003) 101(7):2711–20. doi: 10.1182/blood-2002-07-2103
39. Lopez-Verges 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 U.S.A.* (2011) 108(36):14725–32. doi: 10.1073/pnas.1110900108
40. Foley B, Cooley S, Verneris MR, Pitt M, Curtsinger J, Luo X, et al. Cytomegalovirus reactivation after allogeneic transplantation promotes a lasting increase in educated NKG2C+ natural killer cells with potent function. *Blood* (2012) 119(11):2665–74. doi: 10.1182/blood-2011-10-386995
41. Odorizzi PM, Pauken KE, Paley MA, Sharpe A, Wherry EJ. Genetic absence of PD-1 promotes accumulation of terminally differentiated exhausted CD8+ T cells. *J Exp Med* (2015) 212(7):1125–37. doi: 10.1084/jem.20142237
42. Yokosuka T, Takamatsu M, Kobayashi-Imanishi W, Hashimoto-Tane A, Azuma M, Saito T. Programmed cell death 1 forms negative costimulatory microclusters that directly inhibit T cell receptor signaling by recruiting phosphatase SHP2. *J Exp Med* (2012) 209(6):1201–17. doi: 10.1084/jem.20112741
43. Wherry EJ. T Cell exhaustion. *Nat Immunol* (2011) 12(6):492–9. doi: 10.1038/ni.2035
44. Sottile R, Panjwani MK, Lau CM, Daniyan AF, Tanaka K, Barker JN, et al. Human cytomegalovirus expands a CD8(+) T cell population with loss of BCL11B expression and gain of NK cell identity. *Sci Immunol* (2021) 6(63):eabe6968. doi: 10.1126/sciimmunol.abe6968
45. Rolle A, Meyer M, Calderazzo S, Jager D, Momburg F. Distinct HLA-E peptide complexes modify antibody-driven effector functions of adaptive NK cells. *Cell Rep* (2018) 24(8):1967–1976 e4. doi: 10.1016/j.celrep.2018.07.069
46. Hammer Q, Ruckert T, Borst EM, et al. Peptide-specific recognition of human cytomegalovirus strains controls adaptive natural killer cells. *Nat Immunol* (2018) 19(5):453–63. doi: 10.1038/s41590-018-0082-6
47. Linn YC, Niam M, Chu S, et al. The anti-tumour activity of allogeneic cytokine-induced killer cells in patients who relapse after allogeneic transplant for haematological malignancies. *Bone Marrow Transplant* (2012) 47(7):957–66. doi: 10.1038/bmt.2011.202
48. Schmeel FC, Schmeel LC, Gast SM, Schmidt-Wolf IG. Adoptive immunotherapy strategies with cytokine-induced killer (CIK) cells in the treatment of hematological malignancies. *Int J Mol Sci* (2014) 15(8):14632–48. doi: 10.3390/ijms150814632

Supplemental data

Figure S1

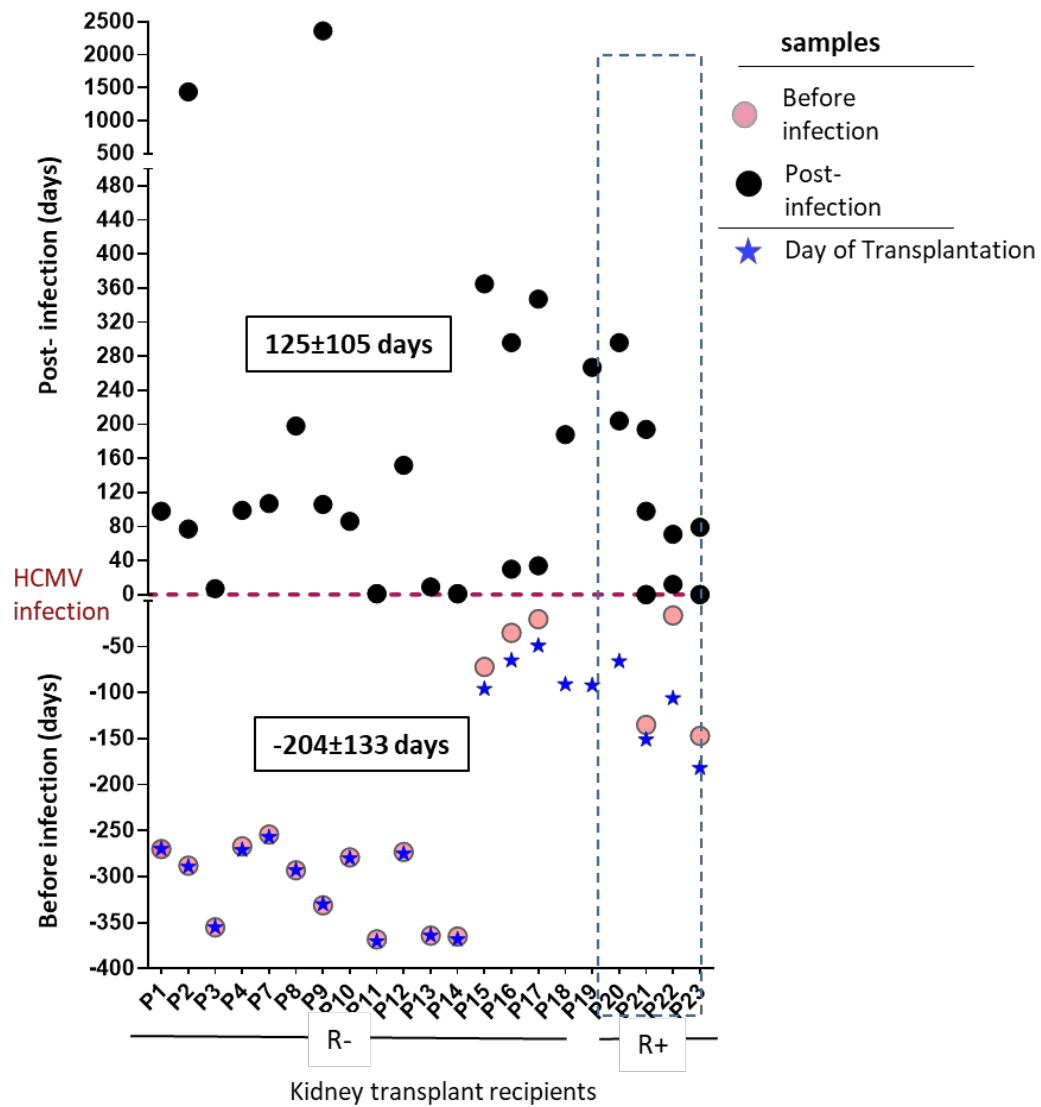
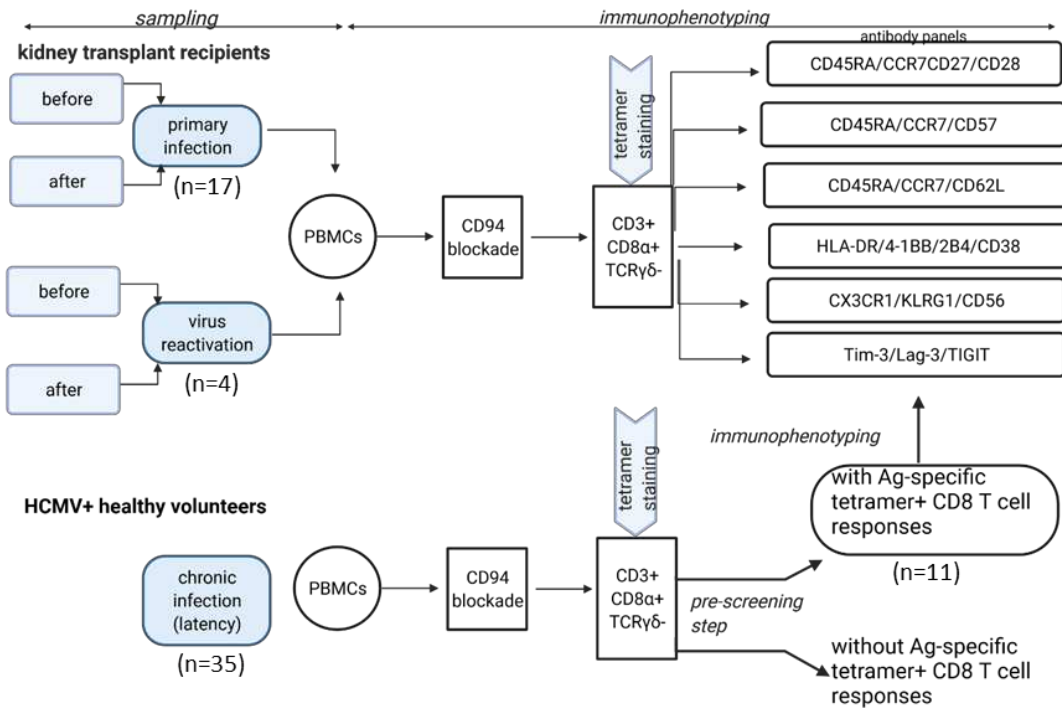


Figure S1. Time line of the blood samples harvested from kidney transplant recipients (n=21) before and after a primary infection (R-) or virus reactivation (R+) post-transplantation included in the study. The day of transplantation (star), the day of infection (DO, dashed red line) and the mean $\pm$ SD values of sampling time related to the day of infection (in frame) are indicated for all patients.

Figure S2

A



B

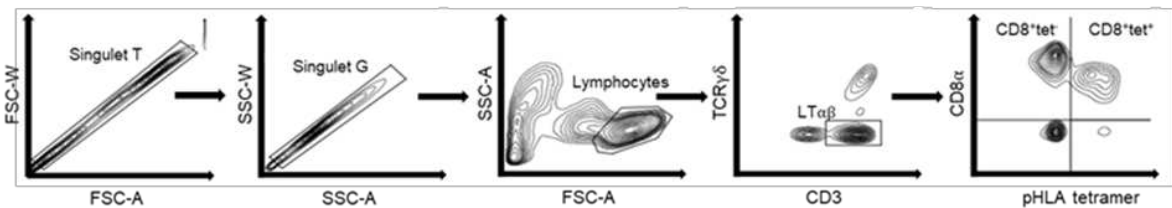


Figure S2. (A) Workflow and cytometry panels used for quantitative expression profiling of surface antigens on CD8T cell subsets from KTR and HV. **(B) A representative gating strategy** illustrating lymphocyte population subgated by the expression of CD3, γδTCR, CD8α and pHLA tetramer (tet). Cells were gated first on FSC-A vs FSC-H plots and then on SSC-H vs SSC-A plots to eliminate doublets. Lymphocytes were gated on an SSC-A vs. FSC-A dot plot. Lymphocytes were subgated using CD3 and γδTCR staining and then CD3⁺ γδTCR⁺ T cells were subgated using CD8α and pHLA tetramers. FSC-H: Forward scatter height. FSC-A: Forward scatter area. SSC: Side scatter. TCR : T cell receptor.

Figure S3

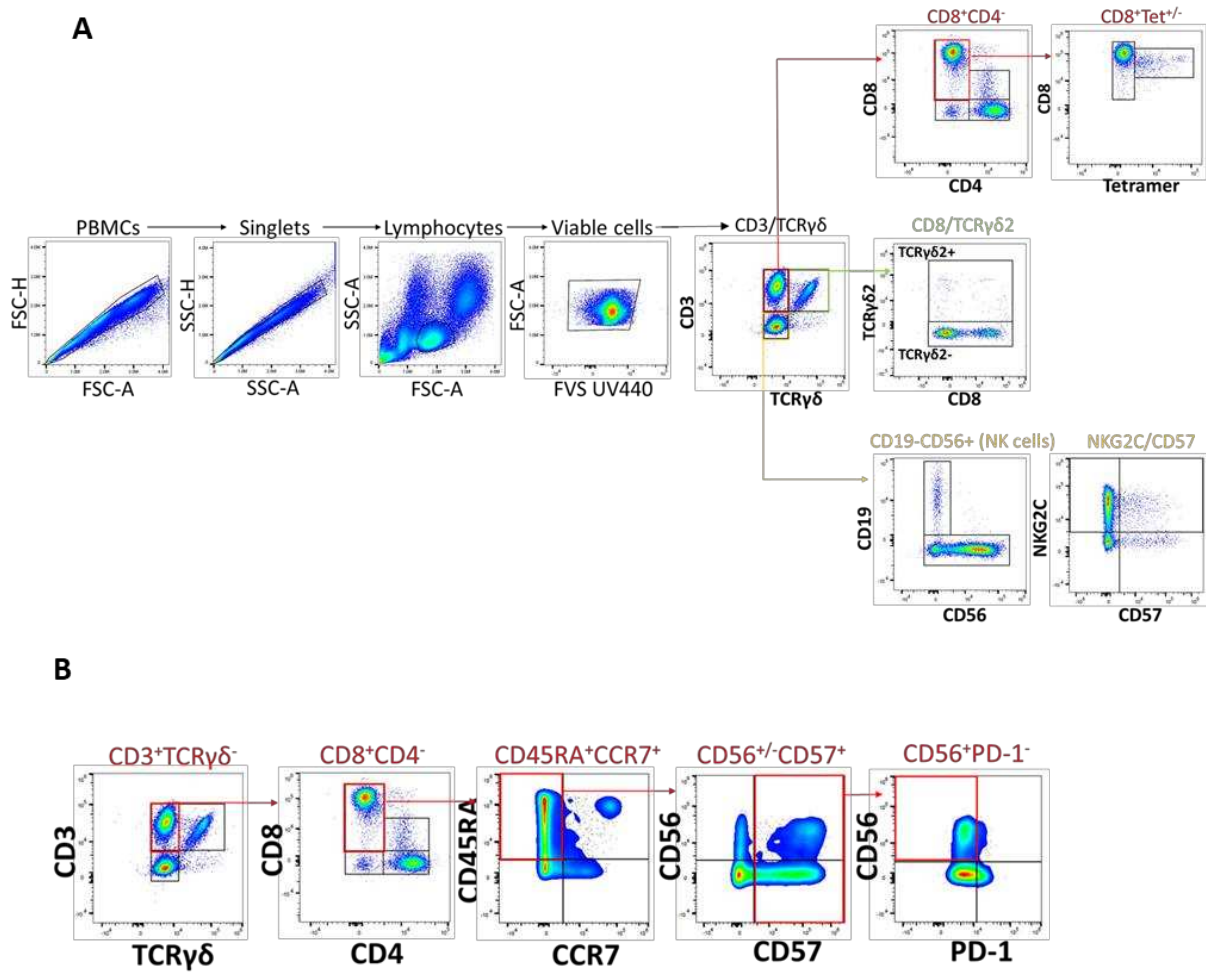


Figure S3. Representative gating strategies illustrating lymphocyte population gated by the expression of CD3, $\gamma\delta$ TCR and subsequent subgating (**A**) to identify the CD8 $\alpha\beta$ T populations (tet⁻ and tet⁺), $\gamma\delta$ T and NK cell subsets and (**B**) to identify the CD56⁺ CD57⁺ PD-1⁻ TEMRA CD8 $\alpha\beta$ T populations.

Figure S4

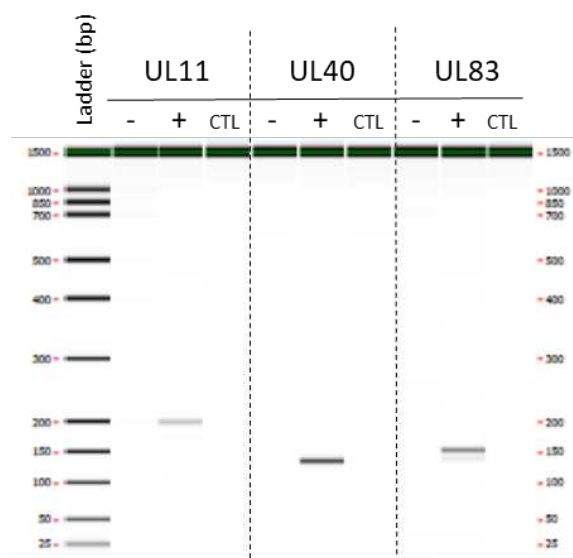


Figure S4. Representative RT-PCR amplicons obtained with UL11, UL40 and UL83 primer pairs using mRNA from MRC5 cells before (-) and after (+) HCMV infection. CTL indicates control PCR performed with no cDNA. Base pairs (bp).

Figure S5

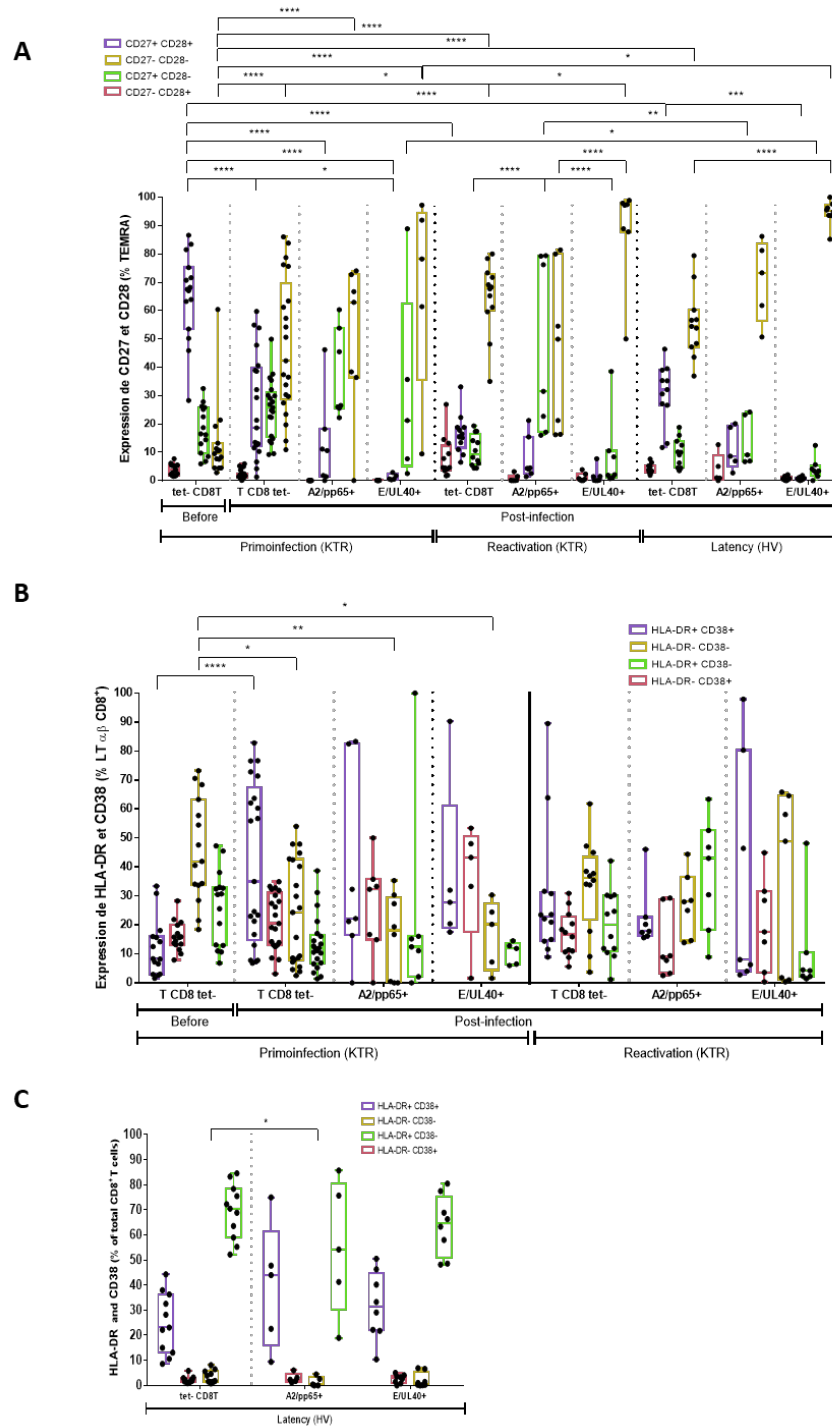


Figure S5. Coexpression of CD27/CD28 (**A**) and HLA-DR/CD38 (**B,C**) on the pHLA tetramer negative (tet-) and positive (A2/pp65+ and E/UL40+) CD8T subsets from KTRs and HCMV+ HV. Statistical analysis was performed by two-way ANOVA test. P values: * for $p < 0.05$, ** for $p < 0.01$, *** for $p < 0.001$ and **** for $p < 0.0001$.

Table S1. Viral UL40 sequences identified in kidney transplant recipients and peptides loaded into HLA-E monomers for the detection of HLA-E_{UL40} CD8T cells.

	KTR	Viral UL40 (AA15-23) Sequences	Peptide used For detection
HCMV primo infection	P1	ND	VMAPRTLIL
	P2	VMGPRTLIL	VMAPRTLIL
	P3	VMAPRTLIL	VMAPRTLIL
	P4	VMAPRTLIL	VMAPRTLIL
	P7	LMAPRTLIL	VMAPRTLIL
	P8	VMAPRSLLL	VMAPRSLLL
	P9	ND	VMAPRTLIL
	P10	VMTPTRTLIL	VMAPRTLIL
	P11	VVAPRTLIL	VMAPRTLIL
	P12	VIAPRTLIL	VMAPRTLIL
	P13	VMASRTLFL	VMAPRTLIL
	P14	ND	VMAPRTLIL
	P15	VMA(-----)L	VMAPRTLIL
	P16	ND	VMAPRTLIL
	P17	VMAPRTLIL	VMAPRTLIL
	P18	VMAPRTLIL	VMAPRTLIL
	P19	VMAPRTLAL	VMAPRTLVL
HCMV reactivation	P20	ND	VMAPRTLIL
	P21	VMAPRTL(I/L)L	VMAPRTLIL
	P22	VMAPRSLLL	VMAPRSLLL
	P23	VMAPRTL(LL/VL)L	VMAPRTLIL

ND : not determined.

Table S2. Hosts, samples and peptide-specific CD8T cell responses detected and analyzed.

	Hosts	Samples post- infection (n)	HLA-A2 /pp65	HLA-E /UL40
KTR primary infection	P8	1	0	VMAPRSLLL
	P9	2	pp65	0
	P11	1	pp65	0
	P14	1	0	VMAPRTLIL
	P16	2	pp65	0
	P17	2	pp65	VMAPRSLLL
	P18	1	pp65	ND
	P19	1	0	VMAPRTLVL
KTR reactivation	P20	2	pp65	ND
	P21	3	ND	VMAPRTLIL
	P22	4	pp65	VMAPRSLLL
	P23	3	pp65	ND
HCMV+ HV	HV4	1	pp65	VMAPRTLIL
	HV5	1	pp65	0
	HV6	1	0	VMAPRTLIL
	HV9	1	pp65	VMAPRTLIL
	HV14	1	pp65	VMAPRTLIL
	HV15	1	pp65	0
	HV18	1	pp65	0
	HV19	1	0	VMAPRTLIL
	HV20	1	0	VMAPRTLIL
	HV21	1	0	VMAPRTLIL
	HV24	1	pp65	0
	HV25	1	pp65	VMAPRTLIL
	HV27	1	0	VMAPRTLIL
	HV30	1	pp65	0
	HV35	1	pp65	0

ND: not determined ; CD8T cell responses indicated in bold were further investigated for phenotype analyses.

Partie 3 : Étude des réponses lymphocytaires T CD8 dirigées contre les peptides UL40 présentés par HLA-E chez les receveurs d'une transplantation pulmonaire au cours du rejet chronique (CLAD)

I. Introduction

La transplantation pulmonaire reste à ce jour le seul traitement pour les patients souffrant d'une insuffisance respiratoire terminale. L'amélioration de la survie à long terme des greffons pulmonaires et des patients ainsi que la diminution du rejet ont été permis par l'amélioration de la prise en charge des traitements immunosuppresseurs et thérapeutiques. Cependant, le CLAD continue à diminuer le taux de survie des patients avec une incidence de 50% à 5 ans (Meyer et al., 2014; Royer et al., 2016). Le CLAD a été défini comme une baisse persistante du volume expiratoire forcé durant la première seconde/ forced expiratory volume in the first second (FEV₁), n'étant pas la cause d'un autre élément que le rejet chronique du greffon (Verleden et al., 2014). Les 2 phénotypes majoritaires du CLAD sont le BOS et le syndrome restrictif de l'allogreffe/ restrictive allograft syndrome (RAS) (Verleden et al., 2015; Royer et al., 2016). Le pronostic est plus mauvais pour le RAS que pour le BOS (Sato et al., 2011; Del Fante et al., 2015; Verleden et al., 2016). Le RAS est généralement caractérisé par une diminution persistante $\geq 20\%$ de la FEV₁, concomitante avec une baisse $\geq 10\%$ de la capacité totale du poumon comparée à la norme de base et l'apparition permanente d'opacité dans les imageries de la poitrine (Verleden et al., 2019). Quant au BOS, il est défini comme une obstruction persistante du flux d'air (diminution jusqu'à 20% de la FEV₁) sans défaut de ventilation restrictif mais aussi par des études d'imagerie ne montrant soit aucune particularité soit aucun piégeage d'air visible (Meyer et al., 2014). Qui plus est, le poumon représente l'organe avec le plus de risques de rejet du fait sa grande susceptibilité aux infections et aux lésions mais également du fait de son exposition permanente à l'environnement. Ainsi, de nombreux facteurs de risques ont été associés au développement du CLAD dont l'infection à HCMV (Sato et al., 2011; Meyer et al., 2014). Le HCMV est présent chez 40 à 100% des individus à travers le monde et sa séroprévalence s'élève entre 30 à 80% dans les pays industrialisés (Bate et al., 2010; Cannon et al., 2010; Zuhair et al., 2019). De plus, l'incidence de l'infection est en effet plus importante dans le poumon pouvant aller jusqu'à 75% (Roman et al., 2014; Azevedo et al., 2015).

L'objectif principal de Cohort in Lung Transplantation (COLT) est la découverte de facteurs précoces capables de prédire le CLAD (<https://lungo2.fr/projet-colt/>). La méthode est la constitution d'une cohorte dont les patients sont vus avant la greffe, puis régulièrement sur une durée de 10 ans. A chaque visite jusqu'aux 5 ans de suivi du patient des prélèvements sanguins sont recueillis. L'objectif initial portait sur le recrutement de 500 transplantés pulmonaires. Cet objectif a pu être dépassé et COLT compte à ce jour 1585 patients transplantés et plus de 140 000 échantillons collectés et conservés au CRB du CHU de Nantes. Ce projet, coordonné par le CHU de Nantes, a rallié les 11 centres de transplantation pulmonaire adulte français. La première inclusion dans COLT a eu lieu le 2 septembre 2009. Courant 2012, l'intégration de l'hôpital Erasme (Bruxelles, Belgique) en tant que 12ème centre a permis d'ouvrir la cohorte au niveau international. En 2012, la cohorte COLT s'est également associée à la Cohorte suisse STCS.

Les études menées sur la cohorte COLT ont pu mettre en évidence 4 biomarqueurs sanguins prédictifs du CLAD. Ces biomarqueurs correspondent à 3 gènes impliqués dans la régulation du SI, prédictifs 6 mois avant le diagnostic du BOS, le gène POU Class 2 Associating Factor 1 (*POU2AF1*), le gène T-cell leukemia/lymphoma protein 1A (*TCL1A*) et le gène B-cell lymphocyte kinase (*BLK*) (Danger et al., 2018). Le dernier biomarqueur prédictif correspond à Matrix Metalloproteinase 9 (MMP-9) dont le dosage est prédictif 12 mois avant le diagnostic du BOS (Pain et al., 2017).

Nous avons utilisé des échantillons sanguins issus de la cohorte COLT pour étudier l'impact des réponses dirigées contre le HCMV, et en particulier les réponses T CD8 restreintes par HLA-E et dirigées contre les peptides leader de UL40 (T CD8 HLA-E/UL40), sur la survenue du CLAD chez les receveurs d'une transplantation pulmonaire. Des travaux menés par l'équipe de Sullivan à Melbourne sur 15 LTR, ont montrés que la présence des LT CD8 HLA-E/UL40 était associée à la survenue du CLAD chez ces patients infectés par le HCMV (Sullivan et al., 2015). Ces résultats obtenus sur un petit nombre de patients suggèrent que les réponses T CD8 HLA-E/UL40 pourraient constituer un facteur de risque pour la survie des greffons et des patients.

Pour mieux comprendre le rôle de cette sous-population de LT CD8+, nous avons donc entrepris une étude pour chercher à réaliser la détection, la quantification et l'analyse du phénotype des réponses T CD8 HLA-E/UL40 induites par l'infection chez des LTR qui vont développer un CLAD (CLAD) ou maintenir un greffon stable (STABLE). Nous avons comparé la fréquence et le phénotype des réponses T CD8 dirigées contre HLA-E/UL40 à la fréquence et

au phénotype des réponses T CD8 dirigées contre HLA-A2/pp65 considérées comme un archétype de réponse T CD8+ effectrice impliquée dans le contrôle de l'infection HCMV. Dans une seconde étape, nous avons étudié la distribution des différentes populations lymphocytaires (LB, LT $\alpha\beta$ CD4+, LT $\alpha\beta$ CD8+, LT $\gamma\delta$ et les NK) au sein des PBMC après l'infection à HCMV dans les groupes de patients CLAD et STABLES afin à la fois de rechercher une signature du CLAD avec l'infection et de mieux caractériser les réponses T CD8 HLA-E/UL40.

Les résultats de cette étude sont présentés ci-dessous et feront l'objet d'un article actuellement en préparation :

Article 3 (en préparation)

Impaired HCMV immunity associates with the occurrence of chronic lung allograft dysfunction

Amélie Rousselière¹, Laurence Delbos¹, Aurore Foureau², Martine Reynaud Gaubert³, Antoine Roux⁴, Xavier Demant⁵, Jérôme Lepavec⁶, Romain Kessler⁷, Jean François Mornex⁸, Jonathan Messika⁹, Loïc Falque¹⁰, Aurélie Le Borgne¹¹, Véronique Boussaud¹², Adrien Tissot^{1,13}, Céline Bressollette-Bodin^{1,14}, and Béatrice Charreau*¹

1 Nantes Université, CR2TI INSERM UMR1064, CHU de Nantes, Nantes, France

2 CHU Nantes COLT

3 Service de pneumologie et transplantation pulmonaire, CHU Nord, Marseille, France

4 Service de pneumologie, hôpital Foch, Suresnes, France

5 Service de pneumologie, CHU, Bordeaux, France

6 Hôpital Marie Lannelongue, service de chirurgie thoracique, vasculaire et transplantation cardiopulmonaire, Le Plessis Robinson, France

7 Groupe de transplantation pulmonaire des Hôpitaux universitaires, Strasbourg, France

8 Université de Lyon, INRAE, IVPC; hospices Civils, Lyon, France

9 Service de pneumologie et transplantation pulmonaire, hôpital Bichat, Paris, France

10 Clinique universitaire pneumologie, Pôle Thorax et Vaisseaux, CHU, Grenoble, France

11 CHU de Toulouse, Toulouse, France

12 HEGP, Paris

13 Service de pneumologie, CHU, Nantes, France

14 Laboratoire de virologie, CHU Nantes, Nantes, France

Les figures de cette étude ont été mises en forme pour la publication et sont donc présentées en anglais dans ce manuscrit.

II. Résumé

L'infection à HCMV est fréquente et souvent sévère chez les LTR, elle constitue un facteur de risque associé au rejet chronique du greffon (CLAD).

Cette étude rétrospective détecte, quantifie et phénotype les réponses T CD8 anti-HCMV conventionnelles (HLA-A2/pp65) et non conventionnelles (HLA-E/UL40) induites par l'infection chez des LTR qui vont développer un CLAD (CLAD) ou maintenir un greffon stable (STABLE) de la cohorte COLT et étudie l'homéostasie des réponses immunes (LB, LT $\alpha\beta$ CD4+, LT $\alpha\beta$ CD8+, LT $\gamma\delta$ et les NK) post-infection associées au CLAD.

La détection et la quantification des réponses T CD8+ anti-HCMV à 18 mois post-transplantation montrent que les LTR qui vont développer un CLAD (CLAD, n = 31) possèdent moins fréquemment (21,7%) des réponses T CD8 HLA-E/UL40 que les LTR avec un greffon fonctionnel (STABLE, n = 32, 55%). A contrario, la fréquence des réponses T CD8 HLA-A2/pp65 est identique dans les 2 groupes de LTR (45% chez les STABLES et 47,8% chez les CLAD). Les populations T CD8 HLA-E/UL40 et HLA-A2/pp65 varient selon les LTR et elles représentent 0,1% à 18,1% des LT CD8+ circulants totaux dans les 2 groupes de LTR avec des valeurs de médianes légèrement plus faibles chez les LTR CLAD. L'analyse du phénotype des populations T CD8 HLA-E/UL40 et HLA-A2/pp65 révèle un profil d'expression CD8+ CD45RA+ CCR7- (TEMRA) CD57+ CD56+ PD1- pour les réponses T CD8 HLA-E/UL40 et CD8+ CD45RA+ CCR7- (TEMRA) CD57+ CD56- PD1+ pour les réponses T CD8 HLA-A2/pp65. En outre, nous montrons qu'il y a une altération du profil d'expression pour les réponses T CD8 HLA-E/UL40 chez les LTR CLAD, qui présentent une diminution d'expression de CD56 et l'acquisition de PD1. Ainsi, ces résultats indiquent que la survenue du CLAD chez les LTR HCMV+ est associée à une altération à la fois quantitative et qualitative du profil d'expression des réponses T CD8 HLA-E/UL40.

Nous avons étudié la distribution des différentes populations lymphocytaires (LB, LT $\alpha\beta$ CD4+, LT $\alpha\beta$ CD8+, LT $\gamma\delta$ et les NK) au cours de l'infection à HCMV par analyse longitudinale à l'aide de la cytométrie en flux à déconvolution de flux (aussi connue sous le nom de cytométrie en flux spectrale) multiparamétriques dans des PBMC issus de LTR STABLES (n = 13) et CLAD (n = 5) après une primo-infection à HCMV. Sur l'ensemble des LTR, l'infection par le HCMV se traduit par une diminution des LB et une augmentation des LT CD8+, des cellules NK CD57+ NKG2C+ et des LT TCR $\gamma\delta$ δ 2-. La comparaison des groupes de LTR STABLES et CLAD

post-infection, montre des fréquences en NK totaux et en LT TCR $\gamma\delta$ $\delta 2^+$ significativement plus basses chez les LTR CLAD par rapport aux LTR STABLES. Chez les LTR STABLES, la présence d'une réponse T CD8 HLA-E/UL40 est associée à une expansion des LT $\alpha\beta$ CD8 $^+$ et à une tendance à plus de LT TCR $\gamma\delta$ $\delta 2^-$ suggérant un rôle protecteur de cette population T CD8 $^+$ spécifique du HCMV.

En conclusion, nous montrons que l'infection à HCMV post-transplantation induit des profils de réponses immunitaires différents durant les 12 mois suivant l'infection à HCMV chez les LTR qui vont développer un CLAD qui pourrait suggérer un lien entre l'immunité anti-HCMV et la survenue du CLAD. Toutefois, les mécanismes cellulaires impliqués et la valeur prédictive d'un profil immunitaire dédié pour un suivi diagnostique des LTR restent à déterminer.

III. Résultats

3.1. Les LTR développant un CLAD présentent des réponses T CD8 HLA-E/UL40 anti-HCMV moins fréquentes

Un total de 63 patients infectés par le HCMV qui ont subi une transplantation pulmonaire entre 2010 et 2012 et issus de la cohorte COLT ont été inclus dans cette étude. Ces patients ont été répartis en 2 groupes en fonction du développement ou non d'un CLAD dans une période de 3 à 5 ans post-transplantation. Dans ce manuscrit, les LTR qui n'ont pas développé de CLAD et gardent donc un greffon fonctionnel seront nommés « STABLE » et les LTR qui vont développer un CLAD seront nommés « CLAD ». Nous avons étudié des PBMC prélevés à la visite 5 ou 6 post-transplantation, correspondant respectivement à 18 et 24 mois post-transplantation. Cette partie du projet porte sur 31 LTR CLAD et 32 LTR STABLES. Le **Tableau 9** montre les caractéristiques des patients et des échantillons que nous avons étudié. La répartition des échantillons aux V5 et V6 est similaire pour les LTR STABLES et CLAD, la moyenne des échantillons étant de 593 jours après la transplantation (**Figure 18a**). Dans le groupe de patients CLAD, les échantillons ont été analysés en moyenne 404 jours (environ 13 mois) avant le diagnostic de CLAD (**Figure 18b**).

Il convient de noter que si la plupart des échantillons des LTR CLAD sont situés avant le diagnostic du CLAD pour une minorité de patients (n = 8) les échantillons étudiés ont été prélevés après le diagnostic du CLAD.

Tableau 9 : Démographie et caractéristiques cliniques des LTR et des échantillons de la cohorte COLT inclus dans cette étude.

	Groupe 1		Groupe 2		p-value groupe 1	p-value groupe 2
	STABLE	CLAD	STABLE	CLAD		
Nombre de patients, n	32	31	13	5		
Age du donneur (médiane, année) [intervalle min-max]	48 (12-70)	41 (11-68)	39 (14-62)	42 (27-53)	0.2859 ¹	0.9414 ²
Sexe du donneur, n (%)					0.6088 ³	0.2682 ³
Homme	18 (56)	20 (65)	10 (77)	2 (40)		
Femme	14 (44)	11 (35)	3 (23)	3 (60)		
Age du receveur (médiane, année) [intervalle min-max]	50 (19-65)	55 (15-64)	28 (18-61)	34 (21-51)	0.0887 ²	0.7560 ²
Sexe du receveur, n (%)					0.4500 ³	>0.9999 ³
Homme	12 (38)	15 (48)	7 (54)	2 (40)		
Femme	20 (63)	16 (52)	6 (46)	3 (60)		
Pathologie conduisant à la transplantation, n (%)					0.3475 ⁴	0.3714 ⁴
BPCO/Emphysème	10 (31)	15 (48)	3 (23)	2 (40)		
BPCO/Emphysème/Dilations des bronches	0 (0)	1 (3)	0 (0)	0 (0)		
Mucoviscidose	9 (28)	3 (10)	7 (54)	2 (40)		
HTAP primitive	3 (9)	4 (13)	0 (0)	1 (20)		
Pneumopathie interstitielle diffuse	6 (19)	6 (19)	0 (0)	0 (0)		
Mucoviscidose/Dilatation des bronches	1 (3)	0 (0)	2 (15)	0 (0)		
Pneumopathie interstitielle diffuse / Dilatation des bronches	1 (3)	0 (0)	0 (0)	0 (0)		
Lymphangioléiomyomatose	1 (3)	0 (0)	0 (0)	0 (0)		
Sarcoidose	1 (3)	0 (0)	0 (0)	0 (0)		
Pneumopathie interstitielle diffuse / Troubles respiratoires associés à une maladie du tissu conjonctif	0 (0)	1 (3)	0 (0)	0 (0)		
Dilatation des bronches	0 (0)	1 (3)	1 (8)	0 (0)		
Type de transplantation, n (%)					0.1152 ⁴	>0.9999 ³
Cœur-Poumon	1 (3)	1 (3)	0 (0)	0 (0)		
Bi-pulmonaire	26 (81)	18 (58)	12 (92)	5 (100)		
Mono-pulmonaire	5 (16)	12 (39)	1 (8)	0 (0)		
Médiane de temps d'ischémie (min) [intervalle min-max]	252 (1-514)	277 (134-420)	240 (3-335)	320 (205-460)	0.2241 ²	0.2791 ²
Traitement induction, n (%)					0.6892 ⁴	0.2977 ⁴
Polyclonaux	14 (44)	14 (45)	3 (23)	3 (60)		
Anti-IL2	8 (25)	6 (19)	3 (23)	1 (20)		
Polyclonaux/anti-IL2	1 (3)	0 (0)	0 (0)	0 (0)		
Aucun traitement d'induction	9 (28)	11 (35)	7 (54)	1 (20)		
Thérapie immunosuppressive, n (%)					0.0545 ⁴	0.0818 ⁴
Tacrolimus/ Corticoïdes / MMF	17 (53)	6 (19)	7 (54)	0 (0)		
Ciclosporine / Corticoïdes / MMF	4 (13)	11 (35)	3 (23)	2 (40)		
Ciclosporine / Corticoïdes	6 (19)	10 (32)	3 (23)	1 (20)		
Tacrolimus / Corticoïdes	1 (3)	1 (3)	0 (0)	1 (20)		
Corticoïdes / Mycophénolate	1 (3)	2 (6)	0 (0)	0 (0)		
Tacrolimus	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (20)		
Non renseigné	3 (9)	1 (3)	0 (0)	0 (0)		
Mismatch						
HLA-A n ≥1/2	25 (78)	19 (61)	9 (75)	4 (80)		
HLA-B n ≥1/2	27 (84)	26 (84)	10 (100)	5 (100)		
HLA-DR n ≥1/2	24 (77)	20 (67)	9 (75)	4 (80)		
HLA-DQ n ≥1/2	23 (79)	16 (53)	8 (80)	3 (60)		
Rejet aigu cellulaire, n (%)						
Grade A1	2 (6)	4 (13)	3 (23)	0 (0)		
Grade A2	2 (6)	0 (0)	1 (20)	1 (20)		
CLAD, n (%)						
BOS, n (%)	/	17 (55)	/	5 (100)		
RAS et mixte, n (%)	/	4 (13)	/	0 (0)		
Médiane d'apparition du CLAD, mois post-transplantation [intervalle min-max]	/	30 (12-69)	/	31 (24-49)		
Azithromycine, n (%)	3 (9)	/	7 (54)	/		
Statut infection à HCMV avant la transplantation						
D+/R+	18 (56)	21 (68)	0 (0)	0 (0)		
D-/R+	14 (44)	10 (32)	0 (0)	0 (0)		
D+/R-	0 (0)	0 (0)	12 (92)	4 (80)		
D-/R-	0 (0)	0 (0)	1 (8)	1 (20)		
Nombre total d'échantillons, n	32	31	41	16		
Avant infection à HCMV, n	0	0	13	4		
Temps avant l'infection à HCMV, moyenne (jour) [écart-type]	0	0	186 ± 75	166 ± 141		0.4945 ²
Temps avant l'infection à HCMV, médiane (jour) [min-max]	/	/	182 (103-345)	133 (42-358)		0.4945 ²
Post-infection à HCMV, n	32	31	28	12		
Temps post-infection à HCMV, moyenne (jour) [écart-type]	/	/	292 ± 204	416 ± 190		0.0477 ²
Temps avant l'infection à HCMV, médiane (jour) [intervalle min-max]	/	/	273.5 (0-746)	407.5 (42-625)		0.0477 ²
Médiane post-transplantation, jour [intervalle min-max]	561 (506-757)	552 (459-779)	546 (0 - 1161)	536 (0 - 1271)	0.8995 ²	0.9965 ²
Médiane d'apparition du CLAD, jour [intervalle min-max]	/	-257 (-1576 - 398)	/	-691 (-1520 - 395)		

Les grades de rejet aigu cellulaire sont basés sur la révision en 2007 de « 1996 ISHLT Working Formulation for the Standardization of Nomenclature in the Diagnosis of Lung Rejection”.

Grade A1 : sévérité minimale ; Grade A2 : sévérité légère.

BPCO : Bronchopneumopathie chronique obstructive ; HLA : Human Leukocyte Antigen ; HTAP : Hypertension artérielle pulmonaire ; MMF : Mycophénolate Mofétil.

¹ correspond au Test T (la normalité de la distribution a été vérifiée par le test de Shapiro-Wilk) ; ² correspond au test de Mann-Whitney ; ³ correspond au test exact de Fisher ; ⁴ correspond au test de χ^2 .

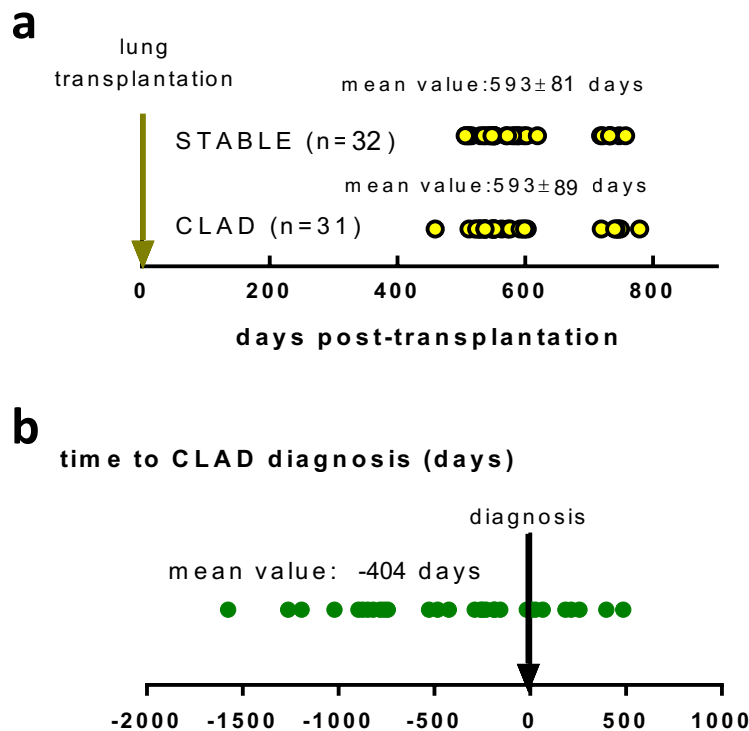


Figure 18 : Distribution des échantillons sanguins analysés.

Distribution des échantillons issus de PBMC par rapport à (a) la date de transplantation pour les 63 LTR et (b) la date du diagnostic du CLAD pour les 31 LTR CLAD.

Pour caractériser les LT CD8 HLA-E/UL40, nous avons réalisé la détection et la quantification de ces réponses chez les LTR STABLES et CLAD. En outre, nous avons réalisé en parallèle des réponses T CD8 HLA-E/UL40, la détection et la quantification des LT HLA-A2 dirigés contre les peptides issus de pp65 afin de pouvoir comparer ces deux types de réponses T CD8+. La détection et la quantification de ces 2 types de réponses T CD8+ anti-HCMV ont été réalisées avec des PBMC issus des 63 LTR de cette étude en utilisant la méthode d'immunomarquage décrite dans notre article présenté dans la Partie 1 du chapitre « Résultats » (Rousselière et al., 2021). Pour détecter et quantifier ces réponses T CD8+ spécifiques du HCMV, nous avons utilisé un protocole d'immunomarquage employant 3 complexes tétramères HLA-peptide (HLA-E/VMAPRTLIL, HLA-E/VMAPRTLLL et HLA-A2/NLVPMVATV) et des anticorps pour 11 marqueurs de surface cellulaire (CD3, CD8, CD45RA,

CCR7, CD56, CD57, TCR $\gamma\delta$, CX3CR1, KLRG1, 2B4, PD1). Nous avons ensuite défini et appliqué une stratégie de sélection des populations présentée dans la **Figure 19** pour l'analyse des données de cytométrie en flux.

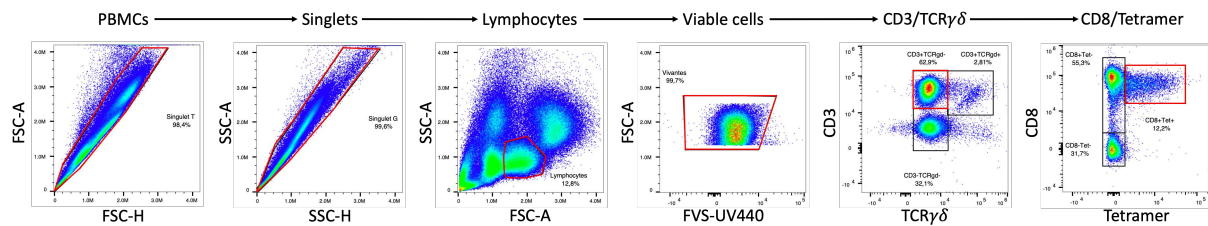


Figure 19 : Exemple représentatif de stratégie de sélection des populations pour l'analyse des populations T CD8+ anti-HCMV.

Les cellules sont sélectionnées successivement sur les valeurs de FSC-A vs FSC-H, puis sur les valeurs de SSC-H vs SSC-A. Ces 2 plots permettent d'éliminer les doublets. Les lymphocytes sont sélectionnés ensuite grâce au plot SSC-A vs FSC-A et grâce au marqueur de viabilité (Fixable Viability Stain (FVS)-UV440), seules les cellules vivantes sont conservées. Une sous sélection des lymphocytes vivants est réalisée au moyen des marqueurs CD3/TCR $\gamma\delta$ pour la sélection des LT CD3+ TCR $\gamma\delta$ -. Enfin, les cellules T CD8+ spécifiques du HCMV sont identifiées par le comarquage CD8/Tetramer HLA-peptide.

Dans la **Figure 20a**, les différents types de réponses détectées dans les échantillons des deux groupes, exprimés en pourcentages de la population étudiée, sont indiqués. Nous montrons que globalement les réponses anti-HCMV (T CD8 HLA-A2/pp65 et HLA-E/UL40 confondues) sont plus fréquentes dans le groupe STABLE (70% des patients) que dans le groupe CLAD (56,5%). Concernant les réponses T CD8 HLA-E/UL40 : 55% des patients STABLES possèdent une réponse contre au moins un peptide UL40 et 40% contre au moins deux peptides. Ces pourcentages sont plus faibles dans le groupe CLAD avec 26,5% des patients STABLES possédant une réponse contre au moins un peptide UL40 et 17,4% contre au moins deux peptides. Les réponses T CD8 HLA-E/UL40 sont donc environ deux fois plus rares dans le groupe CLAD comparé au groupe STABLE. Ces différences ne sont pas observées pour les réponses T CD8 HLA-A2/pp65 avec 45-47.8% des patients présentant une réponse dans les deux groupes. Enfin alors que la présence des deux types de réponses T CD8 HLA-A2/pp65 et HLA-E/UL40 est détectée chez 30% des patients STABLES seuls 17,4% des patients CLAD possèdent une double réponse T CD8 HLA-A2/pp65 et HLA-E/UL40. On peut donc dire en synthèse que dans les 18 mois post-greffe une primo-infection HCMV induit des réponses T CD8+ moins fréquentes caractérisées par un défaut de réponse T CD8 HLA-E/UL40 chez les patients qui vont développer un CLAD. La nature des peptides UL40 (VMAPRTLIL et/ou VMAPRTLIL) reconnus parmi les réponses T CD8 HLA-E/UL40 est illustrée dans la **Figure 20b**

qui semble indiquer que ce sont les réponses anti-VMAPRTLLL qui sont moins fréquentes chez les LTR CLAD.

Concernant la fréquence des LT CD8 HLA-E/UL40 et HLA-A2/pp65, elle varie selon les individus de 0.1% à 18.1% des LT CD8+ circulants totaux dans les 2 groupes de LTR. Les valeurs de médiane de ces populations sont légèrement plus faibles chez les LTR CLAD par rapport aux LTR STABLES (différence non significative) (**Figure 20c**).

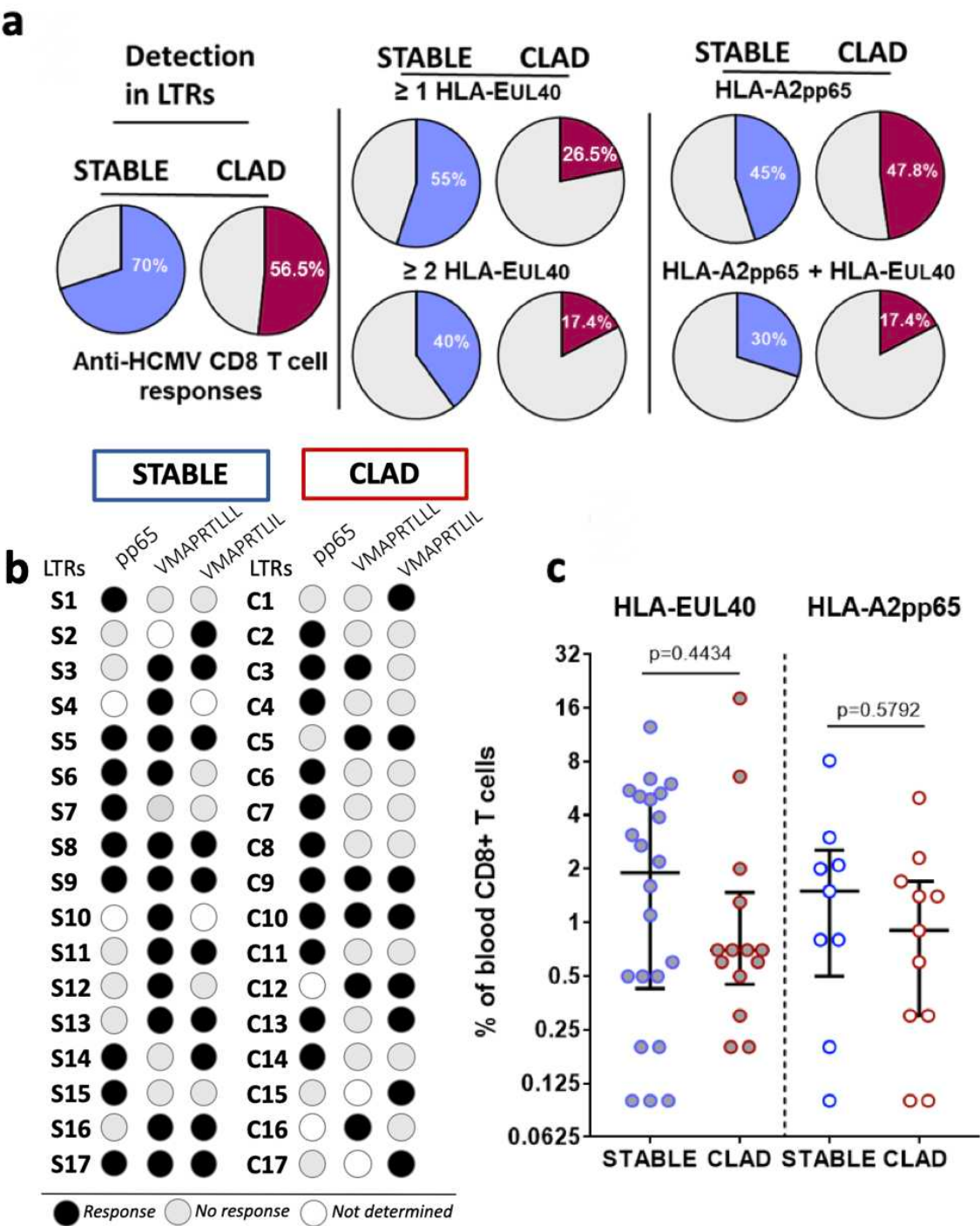


Figure 20 : Détection et quantification des réponses T CD8 anti-HCMV HLA-A2/pp65 et HLA-E/UL40 chez les LTR STABLES et CLAD.

(a) Fréquence des LTR dans les groupes STABLE (n = 32) et CLAD (n = 31) ayant développés une réponse T CD8+ anti-HCMV (panel de gauche), une réponse T CD8 HLA-E/UL40 contre au moins un peptide ou plusieurs (panel central), une réponse T CD8 HLA-A2/pp65 (panel du haut à droite) ou les 2 réponses (T CD8 HLA-E/UL40 et T CD8 HLA-A2/pp65) (panel du bas à droite). (b) Nature des réponses détectées par les complexes tétramères HLA/peptide (HLA-A2/pp65, HLA-E/VMAPRTLIL et HLA-E/VMAPRTLLL) par cytométrie en flux spectrale chez les 17 LTR STABLES et les 17 LTR CLAD possédant au moins une réponse T CD8+ anti-HCMV. (c) Fréquences des populations T CD8 HLA-E/UL40 et HLA-A2/pp65 des 17 patients STABLES et des 17 patients CLAD possédant au moins une réponse T CD8+ anti-HCMV. Les résultats sont exprimés en pourcentages de T CD8+ spécifiques des peptides du HCMV parmi les LT CD8+ circulants totaux et les valeurs de la médiane et l'écart interquartile/ Interquartile range (IQR) sont également indiquées. Les valeurs de p-value ont été déterminées à l'aide du test de Mann-Whitney.

3.2. Le CLAD est associé à une altération du phénotype des LT CD8 HLA-E/UL40

Dans le but de mieux caractériser les réponses T CD8+ post-infection associées au CLAD, nous avons réalisé un immunomarquage des PBMC issus de LTR STABLES et CLAD par cytométrie en flux à déconvolution de flux (aussi connue sous le nom de cytométrie en flux spectrale) à l'aide des complexes tétramères HLA-E/UL40 (VMAPRTLIL et VMAPRTLLL) et de 11 anticorps de marqueurs de surface cellulaire. L'analyse a été réalisée au moyen du logiciel FlowJo™ après une sélection manuelle des populations lymphocytaires reconnues par les tétramères HLA/peptide comme indiqué dans la **Figure 19**. Le phénotype de ces cellules a été comparé à celui des LT CD8 HLA-A2/pp65. Nous avons tout d'abord étudié le stade de différenciation des T CD8+ anti-HCMV par l'expression de CD45RA et CCR7. Nous montrons que la quasi-totalité (>90%) des LT CD8 HLA-E/UL40 sont des TEMRA (CD45RA+ CCR7-) dans les 2 groupes de LTR. Seule une partie des LT CD8 HLA-A2/pp65 sont des TEMRA (les valeurs de médiane sont de 50% des T CD8+ tet+ pour les patients STABLES et plus de 60% pour les patients CLAD) (**Figure 21a**). L'analyse des niveaux d'expression de CD3, CD8 et CD45RA ne montre pas de différence de niveau d'expression du CD3 par les 2 populations spécifiques. Le niveau d'expression du CD8 est quant à lui différent, les LT CD8 HLA-E/UL40 expriment moins le CD8 que les LT CD8 HLA-A2/pp65 que ce soit chez les LTR STABLES ou CLAD (**Figure 21b et c**). A l'inverse le CD45RA est plus exprimé par la réponse T CD8 HLA-E/UL40 que par la réponse T CD8 HLA-A2/pp65 mais uniquement chez les LTR STABLES (**Figure 21d**). Ainsi, chez les LTR HCMV+ les LT CD8 HLA-E/UL40 et les LT CD8 HLA-A2/pp65 sont majoritairement des cellules TEMRA avec des niveaux d'expression CD8 et CD45RA différents. Ces résultats confirment donc les spécificités phénotypiques LT CD8 HLA-E/UL40 rapportées dans la Partie 2 du chapitre « Résultats » et étendent donc ces observations aux receveurs de greffe pulmonaire.

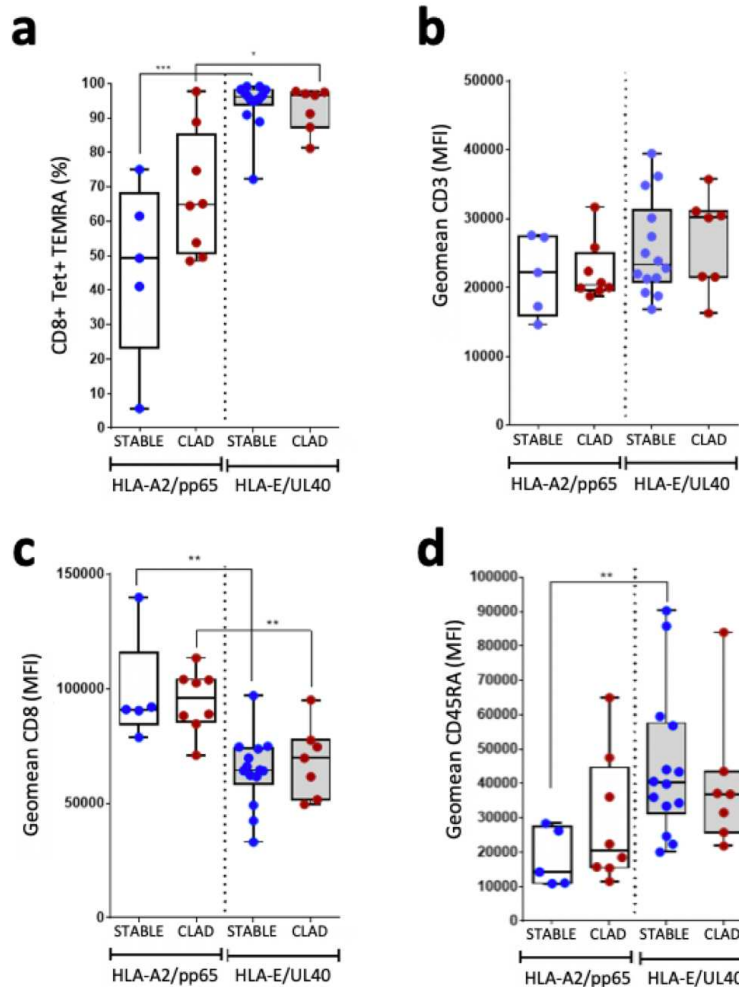


Figure 21 : Fréquence en cellules TEMRA et niveau d'expression de CD3, CD8 et CD45RA des LT CD8 HLA-A2/pp65 et HLA-E/UL40 chez les LTR STABLES et les LTR CLAD.

Après immunomarquage et acquisition de la fluorescence par cytométrie en flux spectrale à l'aide des complexes tétramères HLA/peptide et un panel d'anticorps pour 11 marqueurs de surface cellulaire, les populations T CD8+ spécifiques du HCMV ont été quantifiées, après exclusion des doublets via le FSC/SSC (H et A), sélection des LT vivants puis sélection des populations T CD8+ CD3+ TCRγδ- Tetramer+ (tet+).

(a) Pourcentages de cellules TEMRA définis sur la base de l'expression de CD45RA et l'absence d'expression de CCR7 (CD45RA+ CCR7-). Les résultats sont exprimés en pourcentages de cellules CD45RA+ CCR7- parmi les LT spécifiques du HCMV tet+. Comparaison des 2 types de réponses T CD8+ anti-HCMV, pour les niveaux d'expression de (b) CD3, (c) CD8 et (d) CD45RA chez les LTR STABLES et CLAD. Les résultats sont exprimés en intensités de fluorescence (geomean). Seules les réponses T CD8+ avec suffisamment de cellules spécifiques (>100 cellules) chez les LTR STABLES (en bleu, n = 5 LTR pour les réponses T CD8 HLA-A2/pp65 et n = 14 LTR pour les réponses T CD8 HLA-E/UL40) et chez les LTR CLAD (en rouge, n = 8 LTR pour les réponses T CD8 HLA-A2/pp65 et n = 7 LTR pour les réponses T CD8 HLA-E/UL40) ont pu être analysées. Les valeurs de p-value ont été déterminées à l'aide du test de Mann-Whitney. P-values : * pour p < 0.05, ** pour p < 0.01 et *** p < 0.001.

L'expression de CX3CR1, KLRG1, CD56, CD57, 2B4 et PD1 a été ensuite étudiée sur les cellules T CD8+ tetramer+ (tet+) CD3+ TCRγδ-. Seules les réponses avec un nombre suffisant de cellules (>100 cellules spécifiques) ont été analysées (Figure 22). L'analyse du phénotype des populations T CD8+ anti-HCMV a pu montrer que ces cellules expriment partiellement CX3CR1 et majoritairement KLRG1 sans différence entre les 2 groupes de patients et de

réponses (**Figure 22a et b**). A contrario, les 2 populations T CD8+ spécifiques se distinguent par l'expression de CD56, CD57, PD1 et 2B4. Notre analyse montre une forte expression de CD56, CD57 et 2B4 et une faible expression de PD-1 par les LT CD8 HLA-E/UL40 confirmant nos résultats obtenus chez les patients transplantés rénaux HCMV+ (*cf Partie 2 des « Résultats »*) et étendant donc ce profil phénotypique aux patients receveurs d'une greffe de poumon.

Notre analyse montre que, chez les LTR STABLES, les LT CD8 HLA-E/UL40 expriment presque tous CD56, CD57 et 2B4 et seule une minorité de ces cellules expriment PD1 (valeur médiane <10%). Ce phénotype les distingue des LT CD8 HLA-A2/pp65 qui expriment en majorité 2B4, partiellement PD1 (valeur médiane <45%), CD57 (valeur médiane <80%) et minoritairement CD56 (valeur médiane (<20%)) (**Figure 22 c-f**). Nous retrouvons bien chez les LTR STABLES les caractéristiques phénotypiques de la population T CD8 HLA-E/UL40 que nous avons décrites chez les KTR dans la Partie 2 du chapitre « Résultats ». Si nous comparons le phénotype de ces populations de LT CD8+ entre les patients STABLES et les patients CLAD, il n'existe aucune différence significative entre les 2 groupes de LTR pour la réponse T CD8 HLA-A2 dirigée contre pp65. Cependant, nous montrons que le phénotype des LT CD8 HLA-E/UL40 diffère entre les LTR STABLES et CLAD. Nous observons une perte de l'expression de 2B4 et CD56 ainsi que l'acquisition de l'expression de PD1 par un pourcentage plus important de LT CD8 HLA-E/UL40 chez les LTR CLAD par rapport aux LTR STABLES. Ces résultats indiquent donc une altération partielle et sélective du phénotype des LT CD8 HLA-E/UL40 chez les patients CLAD.

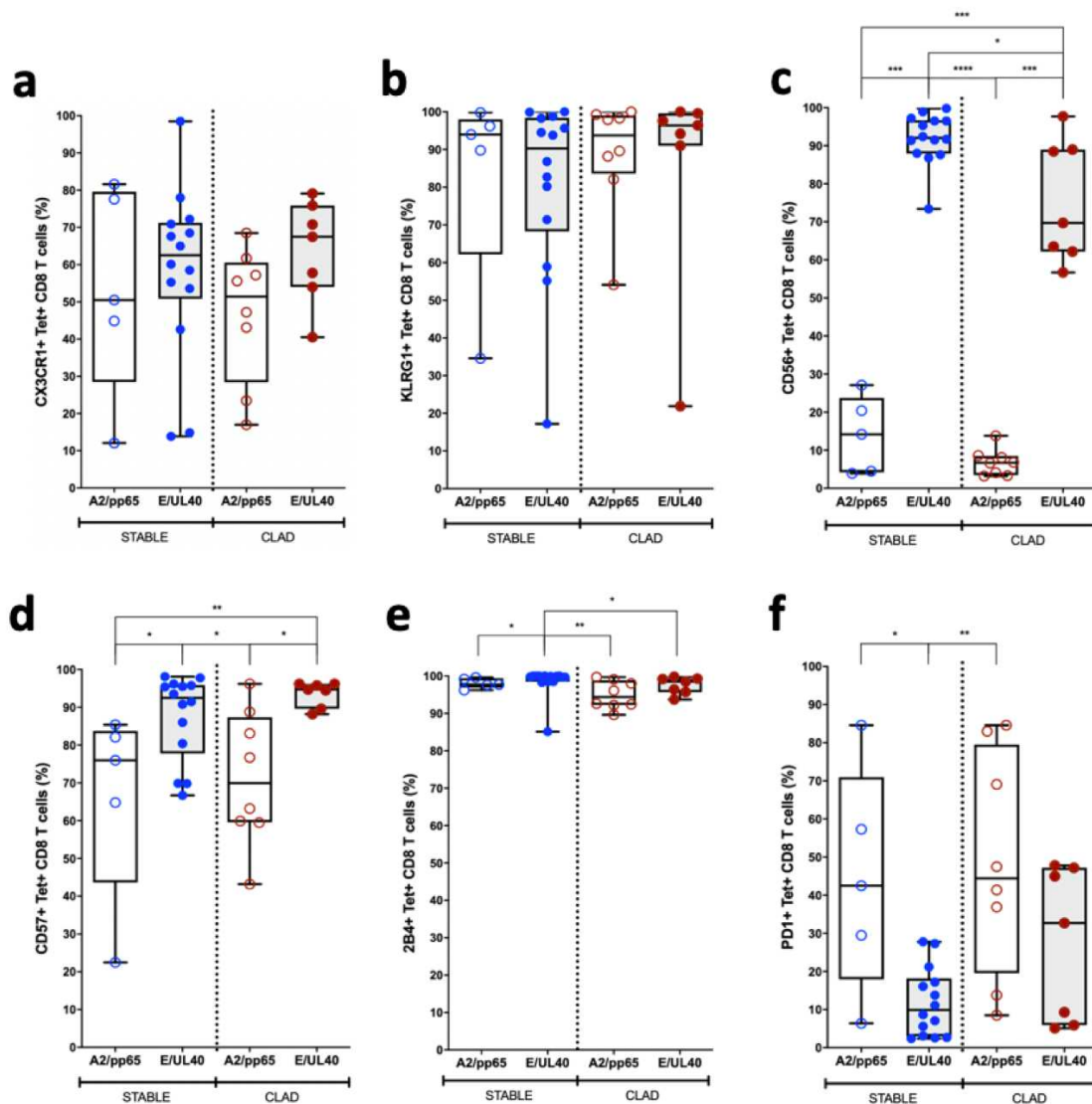


Figure 22 : Phénotype des cellules mémoires T CD8 HLA-A2/pp65 et HLA-E/UL40 chez les LTR STABLES et les LTR CLAD possédant au moins une réponse anti-HCMV.

Après immunomarquage et acquisition de la fluorescence par cytométrie en flux spectrale à l'aide des complexes tétramères HLA/peptide et un panel d'anticorps de 11 marqueurs de surface cellulaire, les populations T CD8+ spécifiques du HCMV ont été définies après exclusion des doublets via le FSC/SSC (H et A), puis sélection des populations T CD8+ CD3+ TCRγδ- Tetramer+ (tet+).

L'expression de (a) CX3CR1 (b) KLRG1 (c) CD56 (d) CD57 (e) 2B4 et (f) PD1 par les populations T CD8 spécifiques du HCMV sont montrées sur cette figure. Les résultats sont exprimés comme les pourcentages de cellules positives parmi les cellules T CD8+ spécifiques du HCMV chez les LTR STABLES (en bleu, n = 5 LTR pour les réponses T CD8 HLA-A2/pp65 et n = 14 LTR pour les réponses T CD8 HLA-E/UL40) et les LTR CLAD (en rouge, n = 8 LTR pour les réponses T CD8 HLA-A2/pp65 et n = 7 LTR pour les réponses T CD8 HLA-E/UL40) avec un nombre de cellules spécifiques suffisamment important pour l'analyse du phénotype (>100 cellules). Les valeurs de p-value ont été déterminées à l'aide du test de Mann-Whitney. P-values : * pour p < 0.05, ** pour p < 0.01, *** p < 0.001 et **** p < 0.0001.

Pour vérifier l'altération du phénotype des T CD8 HLA-E/UL40 chez les patients du groupe CLAD, nous avons réalisé une analyse non supervisée des données de cytométrie spectrale présentées ci-dessus, à l'aide du logiciel OMIQ™ de Dotmatics (www.omic.ai, www.dotmatics.com), sur 9 LTR possédant une réponse T CD8 HLA-E/UL40 et 9 LTR

possédant une réponse T CD8 HLA-A2/pp65. Cette analyse a été réalisée sur un même nombre de cellules spécifiques (205 cellules) pour toutes les réponses T CD8+ étudiées de manière à ne pas avoir de biais entre les réponses. Après une sélection des cellules lymphocytaires T CD3+ TCRγδ- CD8+ Tetramer+ TEMRA (CD45RA+ CCR7-) vivantes, l'algorithme a utilisé les marqueurs CD56, KLRG1, 2B4, CD57, PD1, CX3CR1 pour identifier des clusters d'expression et donc des sous-populations de phénotypes distincts parmi les LT CD8+ reconnus par les deux types de tétramères. Nous avons choisi d'utiliser le mode de représentation Optsne (T-distributed stochastic neighbor embedding) pour visualiser les clusters identifiant les cellules selon leurs niveaux d'expression de CD56, CD57, CX3CR1, KLRG1, 2B4 et PD1. Neuf clusters d'expression ont été identifiés. Cette analyse permet de visualiser une ségrégation des 2 populations de LT CD8+ spécifiques du HCMV (T CD8 HLA-E/UL40 ou T CD8 HLA-A2/pp65) selon leur phénotype avec en particulier des clusters de LT CD8+ présentant des co-expressions variables de CD56, CD57 et CX3CR1 qui caractérisent les LT CD8 HLA-E/UL40. La comparaison des 2 optsne fait ressortir 2 profils phénotypiques assez distincts entre les LT CD8 HLA-E/UL40 et les LT CD8 HLA-A2/pp65 (**Figure 23a**). Ces 2 profils phénotypiques sont conservés parmi les différents individus pour les 2 types de réponses. Ce résultat confirme donc par une approche non supervisée la différence de phénotype entre ces deux sous-populations montrée ci-dessus par l'analyse supervisée. La **Figure 23b** reprend l'analyse non supervisée en distinguant cette fois pour chacune des populations reconnues par les tétramères soit HLA-E/UL40 soit HLA-A2/pp65, les patients STABLES des patients CLAD. Pour les LT CD8 HLA-A2/pp65, nous observons peu de différences dans les clusters identifiés par OMIQ pour les deux types de patients. En revanche pour les LT CD8 HLA-E/UL40, les clusters obtenus par l'utilisation des marqueurs de surface montrent chez les patients CLAD un profil de phénotype qui se distingue de celui des patients STABLES et qui se rapproche du phénotype mis en évidence pour les LT CD8 HLA-A2/pp65. Cette méthode nous a donc permis de confirmer par une autre approche d'analyse les résultats issus de l'analyse FlowJo et conforte le fait d'une altération probable du phénotype de la réponse T CD8 anti-HCMV HLA-E/UL40 chez les patients transplantés qui vont développer un CLAD.

La **Figure 24** indique l'expression des marqueurs CD57, CD56, 2B4, PD1, CD8 et CD45RA dans les différents clusters identifiés par OMIQ pour les 2 types de réponses restreintes par HLA-A2 et HLA-E et pour les patients STABLES et CLAD.

Ainsi, dans cette étude nous montrons que la survenue du CLAD chez les LTR HCMV+ est associée à une altération à la fois quantitative et qualitative du profil d'expression des LT CD8 HLA-E/UL40.

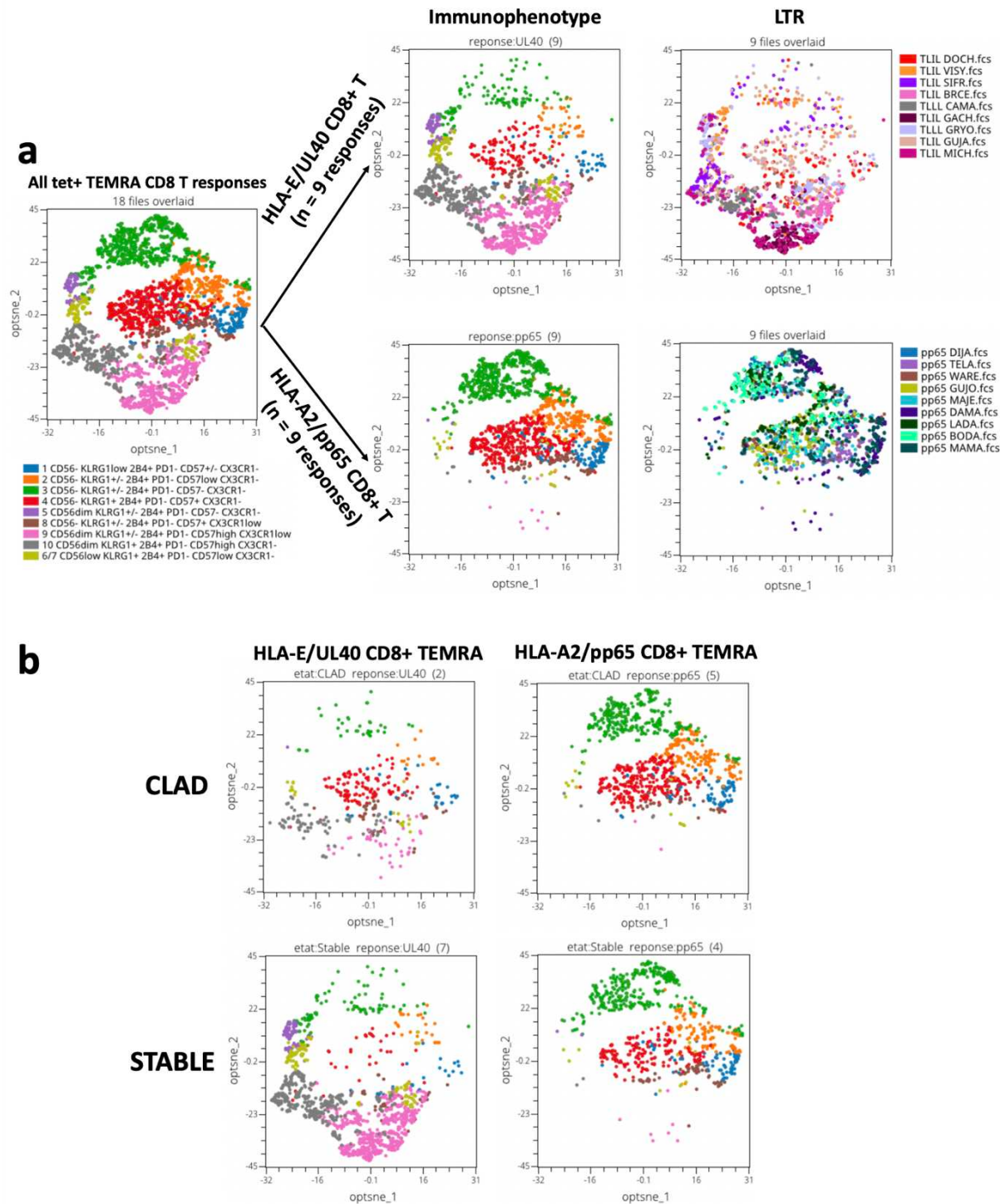


Figure 23 : Profil d'expression qualitative des LT CD8+ anti-HCMV chez les LTR STABLES et CLAD par analyse non supervisée des données de cytométrie spectrale.

Analyse non supervisée, à l'aide du logiciel OMIQ, de 9 réponses T CD8 HLA-E/UL40 et de 9 réponses T CD8 HLA-A2/pp65 identifiées chez des LTR STABLES et CLAD. Après sélection sur les populations vivantes T CD3+ TCRγδ- CD8+ tet+ TEMRA (CD45RA+ CCR7-), une sélection secondaire a été réalisée pour analyser un nombre identique de cellules pour toutes les réponses étudiées. Optsne identifiant 9 clusters cellulaires en fonction des niveaux

d'expression CD57, CD56, CX3CR1, KLRG1, 2B4 et PD1. (a) Optsne identifiant 9 clusters à partir de l'ensemble des 18 réponses T CD8 TEMRA et ségrégation en fonction du type de réponses T CD8+ anti-HCMV (T CD8 HLA-E/UL40 ou T CD8 HLA-A2/pp65) et pour chacun des LTR (b) Répartition des 9 clusters cellulaires selon le type de réponses T CD8+ anti-HCMV (T CD8 HLA-E/UL40 ou T CD8 HLA-A2/pp65) parmi les LTR STABLES ou CLAD.

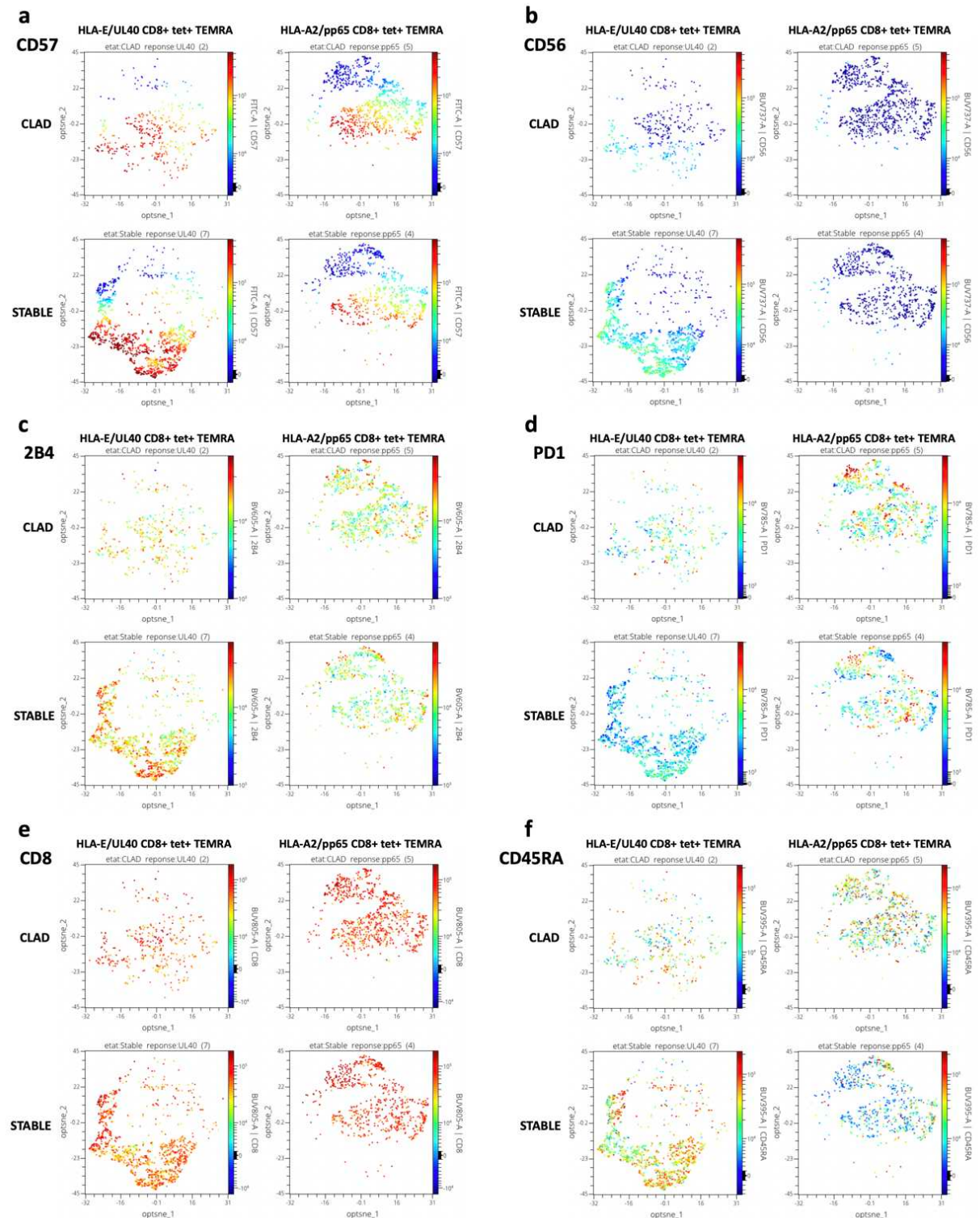


Figure 24 : Localisation des marqueurs étudiés dans les clusters cellulaires définis pour les LT CD8+ anti-HCMV chez les LTR STABLES et CLAD par l'analyse non supervisée des données de cytométrie en flux.

Analyse non supervisée, à l'aide du logiciel OMIQ, de 9 réponses T CD8 HLA-E/UL40 et de 9 réponses T CD8 HLA-A2/pp65 identifiées chez des LTR STABLES et CLAD. Après sélection sur les populations vivantes T CD3+ TCR $\gamma\delta$ -CD8+ tet+ TEMRA (CD45RA+ CCR7-), une sélection secondaire a été réalisée pour analyser un nombre identique de cellules pour toutes les réponses étudiées. Outils pour la visualisation de l'expression des marqueurs étudiés (CD57, CD56, CX3CR1, KLRG1, 2B4 et PD1) dans les 9 clusters cellulaires identifiés. Visualisation des niveaux d'expression de (a) CD57, (b) CD56, (c) 2B4, (d) PD1, (e) CD8 et (f) CD45RA selon le type de réponses T CD8+ anti-HCMV (T CD8 HLA-E/UL40 ou T CD8 HLA-A2/pp65) chez les LTR STABLES ou CLAD.

3.3. Distribution des populations lymphocytaires au cours de l'infection par le HCMV et altérations associées au CLAD

Dans une seconde partie, nous avons analysé le développement des réponses HLA-A2/pp65 et HLA-E/UL40 après une primo-infection à HCMV chez les patients transplantés dans le contexte global des réponses immunes induites par le HCMV. Pour cela nous avons utilisé des échantillons sanguins prélevés avant (1 échantillon par patient) et après l'infection (1 à 4 échantillons par patient). Un total de 18 patients qui ont reçu une transplantation pulmonaire entre 2009 et 2012 issus de la cohorte COLT et qui ont fait une primo-infection par le HCMV post-transplantation ont été inclus dans cette étude. Les 18 patients ont été répartis en 2 groupes : LTR CLAD (n = 5) et LTR STABLES (n = 13) d'un CLAD post-transplantation. Les dates de primo-infection étaient connues et nous avions à disposition un échantillon de PBMC prélevé avant la primo-infection et 1 à 4 échantillons post-infection. Au total 41 échantillons de PBMC issus de 13 LTR STABLES dont 28 échantillons prélevés après la primo-infection ont été utilisés. La période de suivi des réponses post-infection est de 294 ± 204 jours pour un groupe de 13 patients transplantés STABLES (**Figure 25a**). Pour les LTR CLAD, nous avons 16 échantillons de PBMC issus de 5 patients dont 12 échantillons de PBMC prélevés après la primo-infection. La période de suivi des réponses post-infection est de 416 ± 190 jours pour un groupe de 5 patients CLAD (592 jours en moyenne avant le diagnostic du CLAD) (**Figure 25b-c et Tableau 9**).

Nous avons utilisé un panel de tétramères et de 13 anticorps pour mettre en évidence l'expression des molécules NKG2A, NKG2C, HLA-E, TCR $\gamma\delta$ 2, TCR $\gamma\delta$, CD4, CD8, CD3, CD57, CD56, CD16, CD158 et CD19 dans un protocole d'immunomarquage inspiré de celui de notre article présenté dans la Partie 1 du chapitre « Résultats » (Rousselière et al., 2021). L'analyse non supervisée des différents marqueurs phénotypiques au moyen du logiciel d'analyse OMIQ™ a permis de définir les principales populations lymphocytaires (LB, LT $\alpha\beta$ CD4+, LT $\alpha\beta$ CD8+, LT $\gamma\delta$ et les NK et sous populations de NK) au cours de l'infection à HCMV, de les visualiser et de les quantifier.

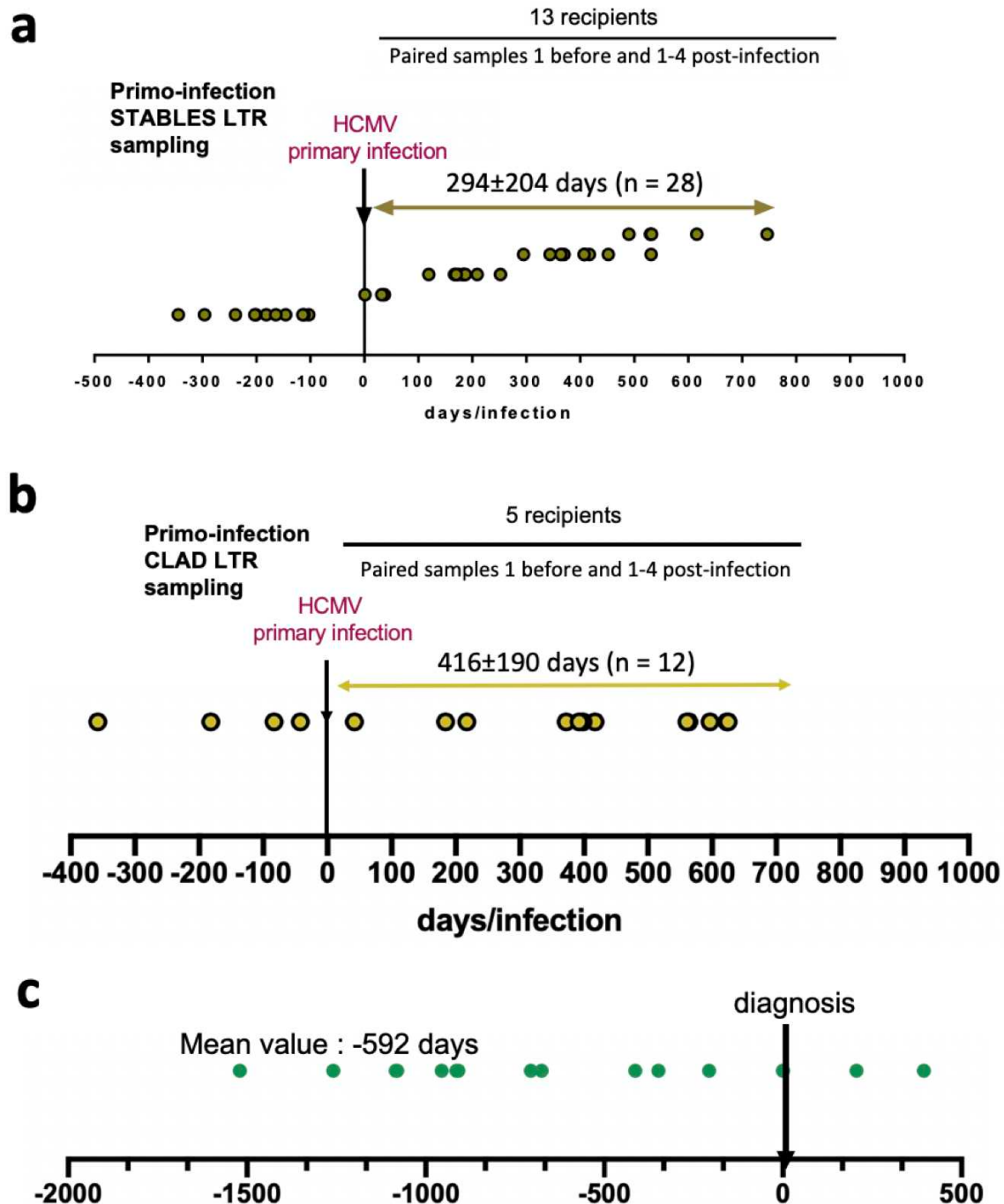


Figure 25 : Distribution des échantillons sanguins analysés.

Distribution des échantillons issus de PBMCs par rapport à la date de la primo-infection pour (a) les 13 LTR STABLES et (b) les 5 LTR CLAD. (c) Distribution des échantillons issus de PBMC par rapport à la date du diagnostic du CLAD pour les 5 LTR qui vont ou ont développé un CLAD post-transplantation.

L'impact de l'infection à HCMV sur la distribution des différentes populations lymphocytaires B, NK, T $\alpha\beta$ CD8+, T $\alpha\beta$ CD4+, T $\alpha\beta$ CD4- CD8-, et les sous-populations T $\gamma\delta$ (T TCR $\gamma\delta$ $\delta 2+$ et $\delta 2-$) chez les LTR a été analysé (Figure 26). La Figure 26a montre la visualisation en 2 dimensions d'une analyse utilisant l'algorithme optsne comparant les clusters identifiant

les principales populations immunes avant et après infection à HCMV pour l'ensemble des échantillons étudiés. L'analyse quantitative de la distribution des populations de cellules immunes montre que la fréquence des populations NK totaux, T $\alpha\beta$ CD4+ et T TCR $\gamma\delta$ δ 2+ n'est pas significativement différente après la primo-infection à HCMV, avec cependant une tendance vers une fréquence plus basse de LT TCR $\gamma\delta$ δ 2+ après l'infection. Nous observons une diminution significative des LB ($p = 0,0124$) et une augmentation significative des LT $\alpha\beta$ CD8+ totaux ($p = 0,0024$) et des LT TCR $\gamma\delta$ δ 2- ($p < 0,0001$) après l'infection à HCMV chez les patients transplantés (**Figure 26a**). Lorsque l'on compare la distribution des réponses post-infection entre les patients du groupe STABLE et ceux du groupe CLAD (**Figure 26b**), on observe une diminution significative des NK ($p = 0,0304$) et des LT TCR $\gamma\delta$ δ 2+ ($p = 0,0114$) chez les LTR du groupe CLAD. Les autres variations observées dans le groupe CLAD (diminution des LB, augmentation des LT $\alpha\beta$ CD4+ et diminution des LT TCR $\gamma\delta$ δ 2-) ne sont pas significatives.

Ces résultats suggèrent que l'empreinte du HCMV sur l'immunité des patients est différente chez les patients du groupe CLAD.

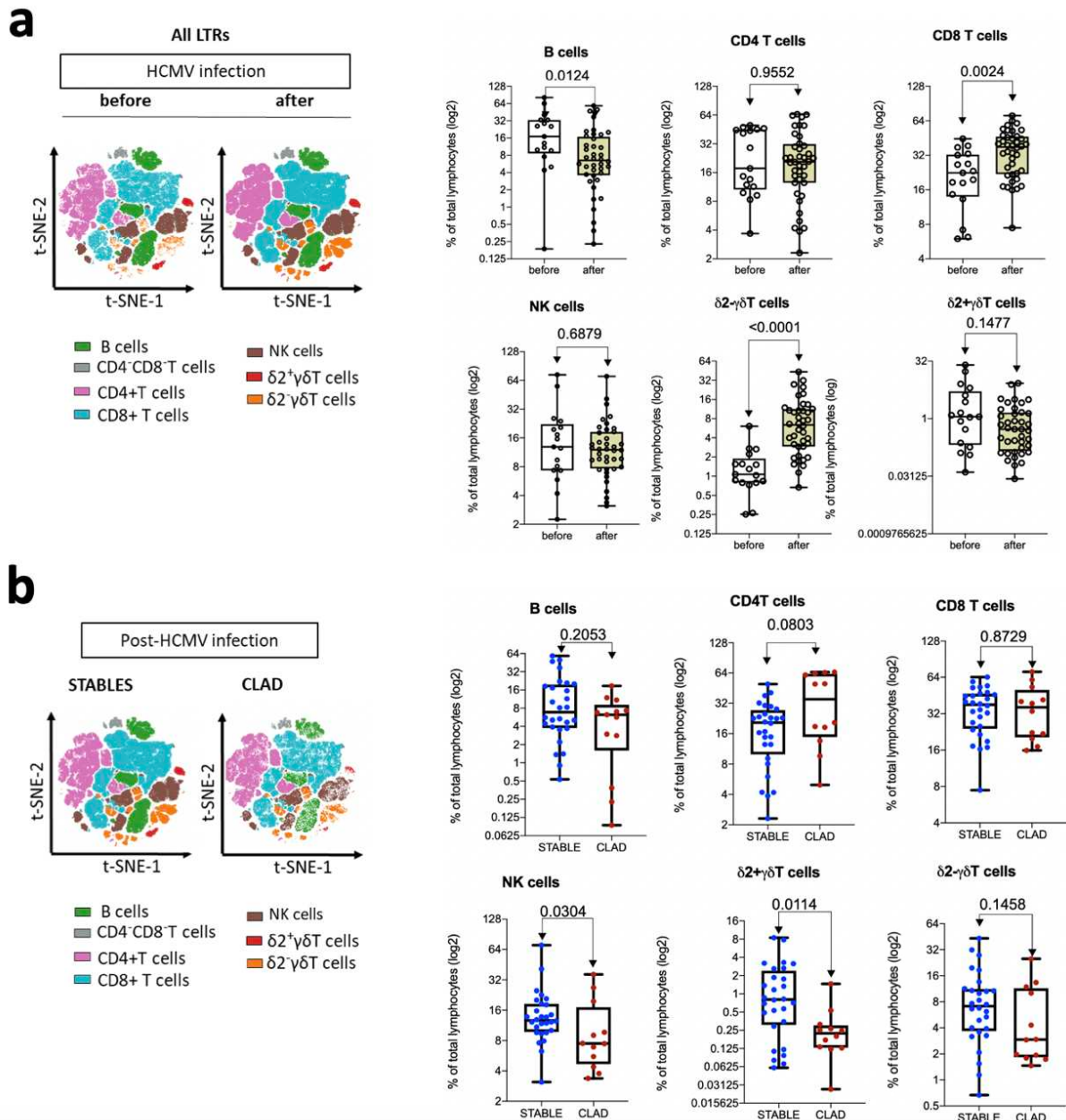


Figure 26 : Distribution des populations lymphocytaires après une primo-infection à HCMV chez les LTR STABLES et CLAD.

Analyse non supervisée, à l'aide du logiciel OMIQ, de l'ensemble des échantillons issus des LTR STABLES et CLAD. Les clusters de l'optune ont été obtenus après sélection des singulets et des lymphocytes vivants et une sélection secondaire pour homogénéiser les résultats. **(a)** Analyse opstne montrant la distribution des populations lymphocytaires B, NK totaux, T αβ CD4⁻ CD8⁻, T αβ CD4⁺, T αβ CD8⁺, T γδ (TCRδ2⁺ et TCRγδ2⁻) et leurs fréquences (en %) avant (n = 17 échantillons) et après (n = 40 échantillons) la primo-infection à HCMV chez les LTR (n = 18 LTR). **(b)** Analyse opstne montrant la distribution des populations lymphocytaires B, NK, T αβ CD4⁻ CD8⁻, T αβ CD4⁺, T αβ CD8⁺, T TCRγδ (TCRδ2⁺ et TCRγδ2⁻) et leurs fréquences (en %) après la primo-infection à HCMV chez les LTR STABLES (n = 28 échantillons et n = 13 LTR STABLES) et CLAD (n = 12 échantillons et n = 5 LTR CLAD). Les différentes populations ont été clusterisées et définies grâce aux marqueurs cellulaires TCRγδ2, TCRγδ, CD4, CD8, CD3 et CD19. Les cellules B sont CD3⁻ CD8⁻ CD4⁻ TCRγδ2⁻ TCRγδ⁻ CD19⁺. Les cellules NK sont CD3⁻ CD8⁺/CD4⁻ TCRγδ2⁻ TCRγδ⁻ CD19⁻. Les cellules T αβ CD4⁺ sont CD3⁺ CD8⁻ CD4⁺ TCRγδ2⁻ TCRγδ⁻ CD19⁻. Les cellules T αβ CD8⁺ sont CD3⁺ CD8⁺ CD4⁻ TCRγδ2⁻ TCRγδ⁻ CD19⁻. Les cellules T TCR γδ 2⁺ sont CD3⁺ CD8⁻ CD4⁻ TCRγδ2⁺ TCRγδ⁺ CD19⁻. Les cellules T TCR γδ 2⁻ sont CD3⁺ CD8⁺/CD4⁻ TCRγδ2⁻ TCRγδ⁺ CD19⁻. Les cellules T αβ CD4⁻ CD8⁻ sont CD3⁺ CD8⁻ CD4⁻ TCRγδ2⁻ TCRγδ⁻ CD19⁻. Les valeurs de p-value ont été déterminées à l'aide du test de Mann-Whitney.

De façon complémentaire, nous avons également utilisé le logiciel FlowJo pour une analyse supervisée des sous populations de cellules NK (**Figure 27**). La fréquence de ces sous population était en effet trop faible pour être étudiée dans une analyse non supervisée. La sélection des sous-populations a été réalisée à l'aide d'une stratégie manuelle de sélection en utilisant les marqueurs phénotypiques CD19⁻, CD3⁺, TCRgd⁻, CD16⁺, CD56⁺ (bright ou dim), CD57^{+/-}, NKG2C^{+/-}. Les NK CD56^{dim} sont en majorité des NK circulants présents en périphérie et dotés d'une activité cytotoxique. Les NK CD56^{dim} expriment plus le récepteur CD16, la perforine et le granzyme et sont capables d'induire la cytolyse de cibles cellulaires par ADCC. A l'inverse, les NK CD56^{bright} sont présents surtout dans les organes lymphoïdes secondaires et les tissus, ils ne présentent pas d'activité cytotoxique directe mais ont la capacité de produire de grandes quantités de cytokines et possèdent une forte capacité proliférative (Smith et al., 2020)

Nous montrons (**Figure 27**) que l'infection à HCMV induit une augmentation significative du pourcentage de NK exprimant NKG2C seul ou en association avec le CD57 dans la cohorte globale (STABLE+CLAD) et dans le groupe des patients STABLES pour les populations NK CD56 bright et dim. Cette augmentation n'est pas observée pour le groupe de patients CLAD. Les patients du groupe CLAD se distinguent donc des STABLES par une absence d'augmentation post-infection des sous populations de NK CD56^{dim} et NK CD56^{bright} exprimant NKG2C seul ou en association avec le CD57. La diminution des cellules NK chez les patients CLAD montrée dans la **Figure 26** pourrait donc refléter l'absence de ces sous populations de NK NKG2C⁺ et NK NKG2C⁺CD57⁺.

Ainsi, le CLAD semble être associé à des modifications de la fréquence et de la distribution des populations lymphocytaires modulées par l'infection à HCMV avec notamment une réduction significative des LT CD8 HLA-E/UL40, des NK et des LT $\gamma\delta$.

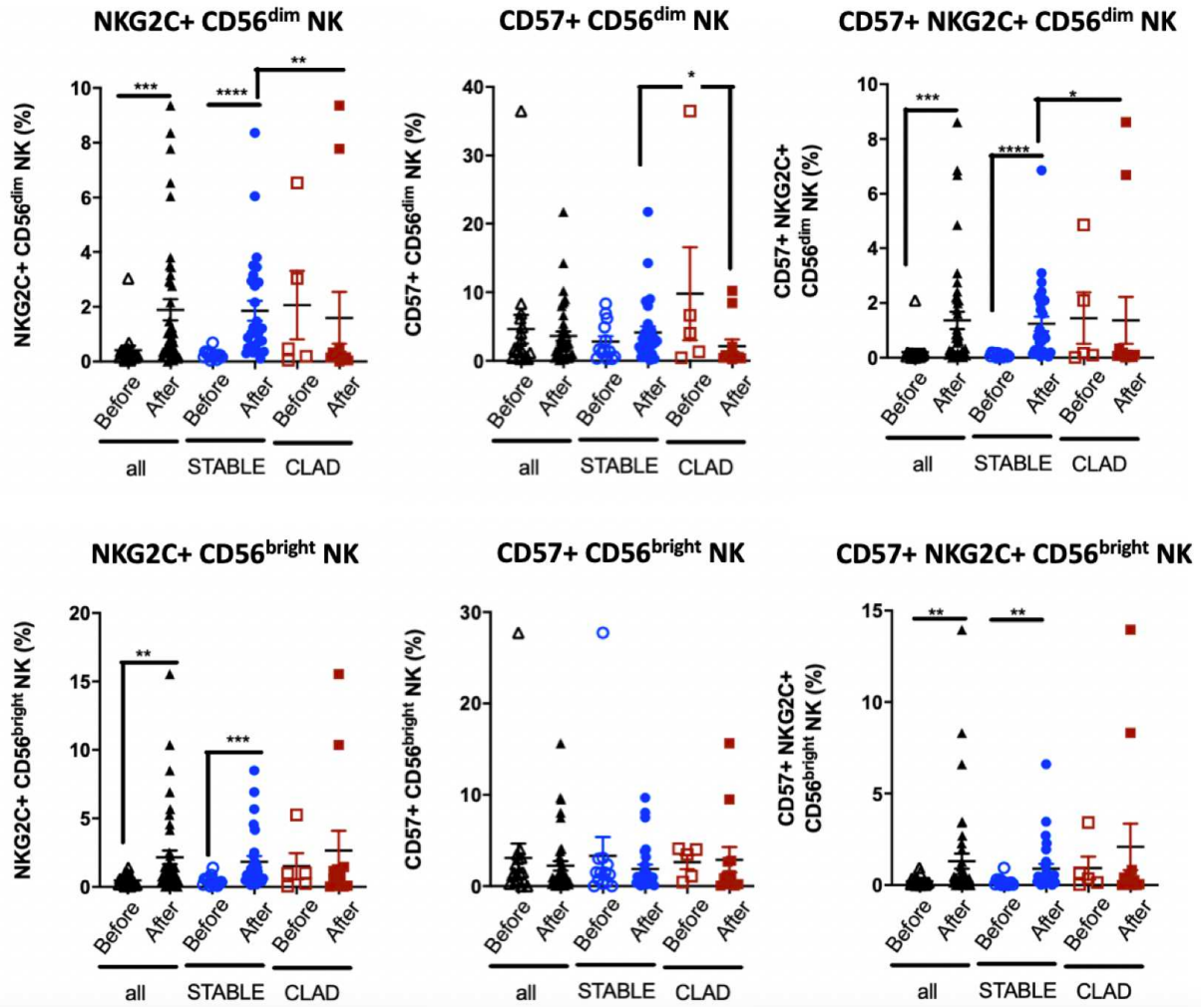


Figure 27 : Fréquence des sous-populations NK CD16⁺ CD56^{dim} ou NK CD16⁺ CD56^{bright} exprimant ou non CD57 et/ou NKG2C avant et après une primo-infection chez les LTR STABLES et CLAD.

Analyse supervisée réalisée sur l'ensemble des échantillons (all, n = 17 échantillons avant et n = 40 échantillons après la primo-infection), issus des LTR STABLES (n = 13 échantillons avant et n = 28 échantillons après la primo-infection) ou des LTR CLAD (n = 4 échantillons avant et n = 12 échantillons après la primo-infection) des sous-populations NK. Les cellules NK sont sous-divisées en fonction de leur niveau d'expression de CD56 et leur expression ou non de CD57 et/ou NKG2C. Les fréquences des sous-populations avant et après la primo-infection sont représentées chez tous les LTR ou en distinguant les LTR STABLES et CLAD et exprimées en % par rapport aux lymphocytes vivants. Les valeurs de p-value ont été déterminées à l'aide du test de Mann-Whitney. P-values : * pour p < 0.05, ** pour p < 0.01, *** p < 0.001 et **** p < 0.0001.

Nous avons ensuite comparé la distribution des populations lymphocytaires post-primo-infection chez les LTR STABLES qui possédaient (R, n = 11 échantillons) ou non (NR, n = 17 échantillons) au moins une réponse T CD8 HLA-E/UL40 par des analyses non supervisées. (Figure 28a). Nous montrons que la présence d'une réponse T CD8 HLA-E/UL40 est associée à une nette augmentation de cellules T CD8+ (p = 0,0041) et à une tendance non significative vers des fréquences plus élevées de LT TCRγδ δ2+ (p = 0,1755) et δ2- (p = 0,0659) (Figure 28b).

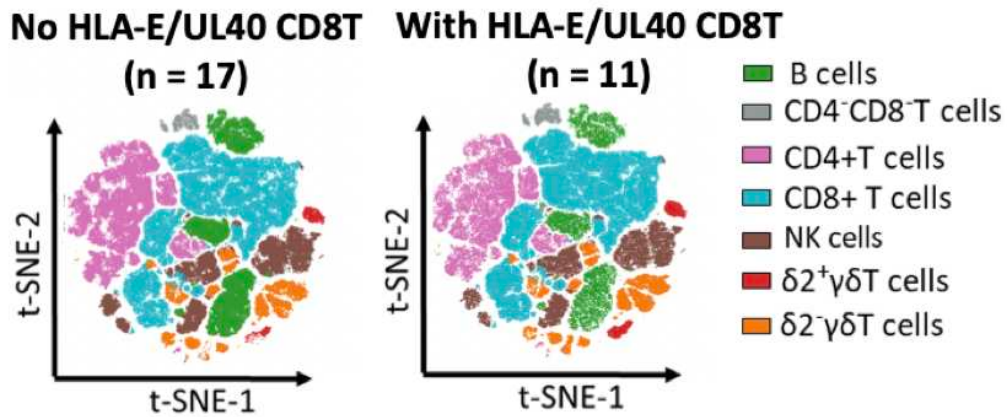
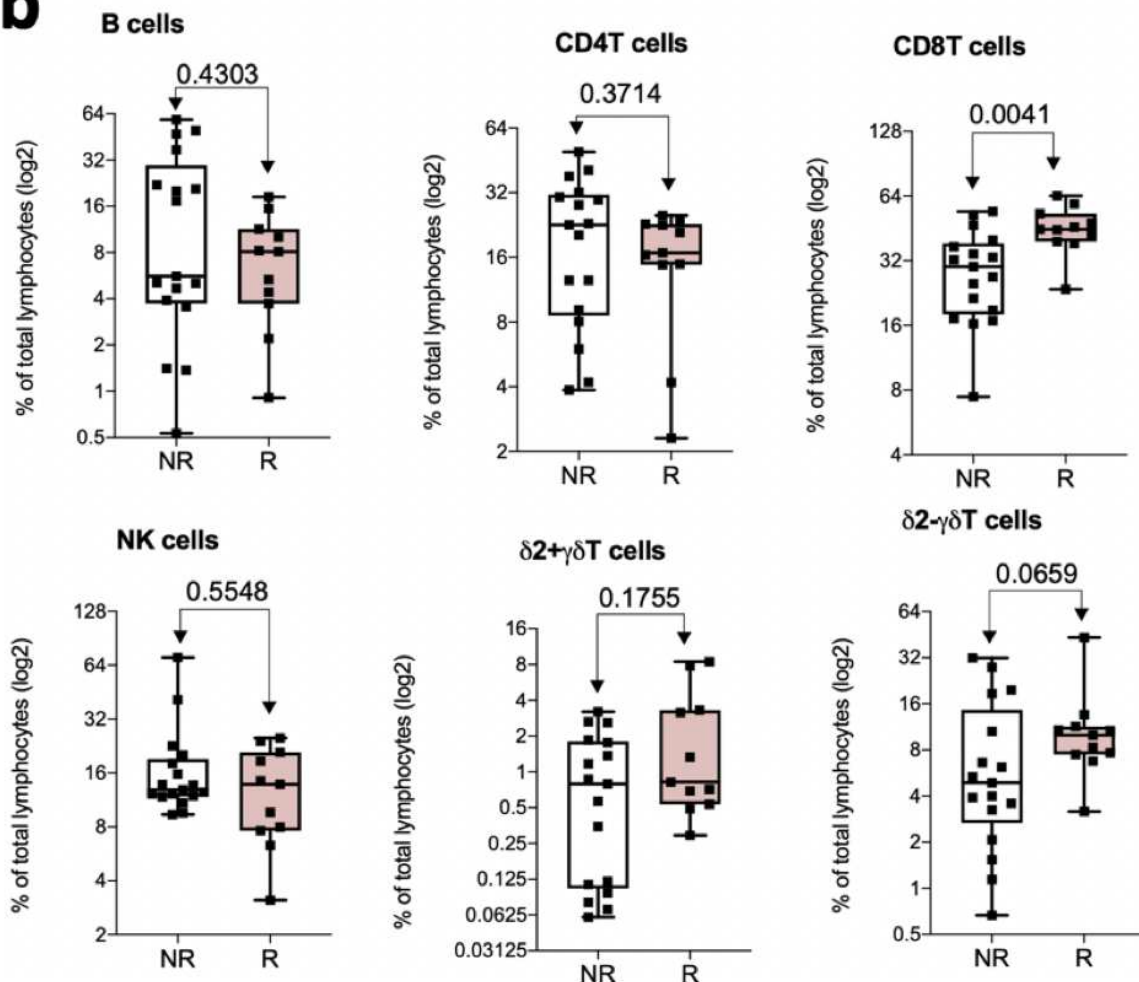
a**b**

Figure 28 : Distribution des populations lymphocytaires après une primo-infection à HCMV chez les LTR STABLES possédant ou non au moins une réponse T CD8 HLA-E/UL40.

Analyse non supervisée, à l'aide du logiciel OMIQ, des échantillons post-primo-infection issus des LTR STABLES possédant (R) ou non (NR) au moins une réponse T CD8 HLA-E/UL40. Les clusters de l'optstne ont été obtenus après sélection des singulets et des lymphocytes vivants et une sélection secondaire pour homogénéiser les résultats. (a) Analyse opstne montrant la distribution des populations lymphocytaires B, NK, T αβ CD4⁻ CD8⁻, T αβ CD4⁺, T αβ CD8⁺, T TCRγδ (TCRδ2⁺ et TCRγδ2⁻) après la primo-infection à HCMV chez les LTR R (n = 11 échantillons) ou NR (n = 17 échantillons). (b) Fréquence (en %) des différents clusters de populations

lymphocytaires B, NK, T $\alpha\beta$ CD4⁻ CD8⁻, T $\alpha\beta$ CD4⁺, T $\alpha\beta$ CD8⁺, T TCR $\gamma\delta$ (TCR δ 2⁺ et TCR $\gamma\delta$ 2⁻) parmi les lymphocytes vivants après la primo-infection à HCMV chez les LTR STABLES R (n = 11 échantillons) ou NR (n = 17 échantillons). Les différentes populations ont été clusterisées et définies grâce aux marqueurs cellulaires TCR $\gamma\delta$ 2, TCR $\gamma\delta$, CD4, CD8, CD3 et CD19. Les cellules B sont CD3⁻ CD8⁻ CD4⁻ TCR $\gamma\delta$ 2⁻ TCR $\gamma\delta$ ⁻ CD19⁺. Les cellules NK sont CD3⁻ CD8^{+/-} CD4⁻ TCR $\gamma\delta$ 2⁻ TCR $\gamma\delta$ ⁻ CD19⁻. Les cellules T $\alpha\beta$ CD4 sont CD3⁺ CD8⁻ CD4⁺ TCR $\gamma\delta$ 2⁻ TCR $\gamma\delta$ ⁻ CD19⁻. Les cellules T $\alpha\beta$ CD8 sont CD3⁺ CD8⁺ CD4⁻ TCR $\gamma\delta$ 2⁻ TCR $\gamma\delta$ ⁻ CD19⁻. Les cellules T TCR $\gamma\delta$ δ 2⁺ CD3⁺ CD8⁻ CD4⁻ TCR $\gamma\delta$ 2⁺ TCR $\gamma\delta$ ⁺ CD19⁻. Les cellules T TCR $\gamma\delta$ δ 2⁻ CD3⁺ CD8^{+/-} CD4⁻ TCR $\gamma\delta$ 2⁻ TCR $\gamma\delta$ ⁺ CD19⁻. Les cellules T $\alpha\beta$ CD4⁻ CD8⁻ sont CD3⁺ CD8⁻ CD4⁻ TCR $\gamma\delta$ 2⁻ TCR $\gamma\delta$ ⁻ CD19⁻. Les valeurs de p-value ont été déterminées à l'aide du test de Mann-Whitney.

Discussion

I. Apports et limites de la cytométrie en flux spectrale à notre étude

Le premier axe de ce travail de thèse a consisté à mettre au point un protocole d'immunomarquage et d'analyse pour l'étude des populations lymphocytaires au cours d'une infection à HCMV. La technique de cytométrie en flux spectrale présentait de nombreux avantages dont celui de pouvoir étudier un plus large panel de marqueurs de surface cellulaire que la cytométrie conventionnelle. L'analyse simultanée de nombreux marqueurs est permise par la mesure du spectre d'émission complet des fluorochromes utilisés permettant la discrimination de spectres très similaires (Nolan & Condello, 2013). Le challenge technique était d'associer des anticorps dirigés contre des antigènes de surface permettant de discriminer les différentes populations lymphocytaires (lymphocytes B, T $\alpha\beta$ CD4+, T $\alpha\beta$ CD8+, T $\gamma\delta$, NK) et des tétramères HLA/peptide pour inclure dans l'étude l'analyse des populations spécifiques des peptides viraux pp65 et UL40. Pour l'étude spécifique des LT CD8 HLA-E/UL40 la nécessité de bloquer les récepteurs CD94-NKG2A/C au moyen d'un anticorps anti-CD94 bloquant était une contrainte supplémentaire. La cytométrie spectrale nous a permis d'associer 20 fluorochromes pour le marquage des anticorps et des tétramères. Ce travail de mise au point méthodologique a abouti à la publication d'un article (**Article 1**, Rousselière et al., 2021). Il a également été utilisé avec des modifications dans les Parties 2 et 3 du chapitre « Résultats » pour comparer des phénotypes et des profils de réponses immunes dans un contexte d'infection à HCMV chez des patients transplantés rénaux ou pulmonaires. Avec ces deux études, nous avons vérifié que le changement de technique entre les études des KTR (cytométrie en flux conventionnelle) et des LTR (cytométrie en flux spectrale) n'engendrait pas une différence de sensibilité de la détection de nos populations spécifiques étudiées. En effet, la cytométrie en flux spectrale a pour avantage théorique d'améliorer la détection des événements rares de l'ordre 0,01% (Idziorek et al., 2018). Nous montrons que les fréquences de LT CD8 HLA-E/UL40 et HLA-A2/pp65 allant de 0,1 à plus de 30% chez les KTR et les HV HCMV+ et jusqu'à 18,1% chez les LTR HCMV+, dans ces 2 études sont similaires à celles obtenues dans l'étude précédemment menée par notre équipe (Jouand et al., 2018), les résultats obtenus avec ces deux techniques de cytométrie sont donc comparables.

La cytométrie de flux spectrale permet d'associer un plus grand nombre de fluorochromes que celui utilisé dans notre étude (jusqu'à plus de 40, 60 étant la limite théorique) (Bonilla et al., 2021). Par conséquent notre protocole pourrait être étendu pour inclure d'autres marqueurs et ainsi ajouter au profil d'expression, un profil d'activité fonctionnelle par exemple en incluant des anticorps pour mettre en évidence des marqueurs de prolifération (Ki-67), d'activité cytotoxique (GzmB, CD107a, perforine), de production intracellulaire de cytokines (IFN γ , IL-2, TNF α), mais aussi d'activation précoce (CD69), d'apoptose, de senescence,...Cependant une limite importante de cette approche multiparamétrique est le nombre de cellules nécessaires pour réaliser les immunomarquages. En effet, plusieurs millions de cellules sont souvent nécessaires pour réaliser *in fine* des analyses des sous populations rares que ce soit après une sélection manuelle des populations (analyse supervisée) ou une analyse non supervisée (ou semi-supervisée) au moyen d'algorithmes tel que OMIQ™. Tout au long de ce travail, nous avons été confrontés à cette limite quantitative. Nous avons utilisé des échantillons congelés de PBMC issus de biocollections cliniques (DIVAT pour les transplantés rénaux et COLT pour les transplantés pulmonaires). Outre la rareté de ces échantillons, le nombre variable et parfois faible de PBMC viables post-décongélation, conséquence des difficultés inhérentes aux biocollections et/ou également parfois au statut infectieux, pathologique ou immunodéprimé des patients, a souvent été une limite pour nos expériences.

II. Identification des LT CD8 HLA-E/UL40 comme des TEMRA CD56+ PD1-

La Partie 2 du chapitre « Résultats » avait pour objectifs (1) de mieux définir le phénotype des LT CD8 HLA-E/UL40, (2) de comparer ce phénotype à celui des LT CD8 HLA-A2/pp65, utilisés comme « archétype » d'une réponse T $\alpha\beta$ CD8+ spécifique du HCMV (3) d'étudier la dynamique de ce phénotype au cours d'une réponse primaire (priming) ou secondaire (restimulation/réactivation du HCMV) et au cours d'une infection chronique (latence virale) et (4) de comparer le phénotype des LT CD8 HLA-E/UL40 à celui d'autres populations impliquées dans le contrôle de l'infection par le HCMV. Nous montrons que le phénotype des deux types de réponses évolue de façon identique au cours des différentes phases de l'infection. Cela est illustré en particulier par l'expression dynamique des récepteurs 4-1BB, 2B4, Lag-3, Tim-3, TIGIT et KLRG1 post-infection (**Article 2, Figure 7** de l'article 2)

caractéristique des réponses T CD8+ lors des infections virales chroniques (Thimme et al., 2005; Rahman et al., 2011; Manieri et al., 2017).

Nous montrons que LT CD8 HLA-E/UL40 et HLA-A2/pp65 se distinguent par leur expression de co-récepteurs du TCR tels que CD3, CD8 et CD45RA. Les LT CD8 HLA-A2/pp65 expriment faiblement le CD3 et fortement le CD8 (CD3^{low} CD8^{high}) alors que les LT CD8 HLA-E/UL40 expriment des niveaux de CD3 identiques à ceux des LT CD8+ totaux mais des niveaux faibles de CD8 (CD3^{med} CD8^{low}). L'engagement du complexe TCR-CD3 avec le HLA associé à un peptide conduit à l'augmentation de l'endocytose et à la dégradation du complexe conduisant à la downrégulation à la surface du complexe TCR-CD3 (Alcover et al., 2018). On peut donc supposer que la plus faible expression de CD3 à la surface des LT CD8 HLA-A2/pp65 traduit leur activation récente et peut être plus récente que celle des LT CD8 HLA-E/UL40. Cet argument est soutenu par nos observations montrant que l'apparition des LT CD8 HLA-E/UL40 est probablement plus précoce que celle des LT CD8 HLA-A2/pp65 après une infection et donc leur activation pourrait elle aussi précéder celle des LT CD8 HLA-A2/pp65. Les deux populations de LT CD8+ se distinguent aussi par des niveaux d'expression différents de CD8. Le CD8 n'est pas indispensable pour entraîner l'activation du TCR (Alcover et al., 2018) mais il permet une bonne stabilisation du complexe TCR-CD3. On peut donc supposer que les 2 populations de LT CD8+ spécifiques anti-HCMV étudiées ne possèdent pas la même affinité pour les co-récepteurs CD3 et CD8. Les LT CD8 HLA-E/UL40 pourraient compenser leur moins bonne affinité pour le CD8 par une plus forte expression de CD3 et inversement pour les LT CD8 HLA-A2/pp65. Dans notre étude nous avons utilisé des monomères HLA-A*02 :01 mutés en position 245 (ALA245VAL) pour réduire la fixation non spécifique des tétramères sur les molécules CD8 comme montré dans la littérature (Bodinier et al., 2000). En l'absence de cette mutation nous avons observé une forte fixation non spécifique des tétramères HLA-A2 (*résultats non montrés*). Cette fixation non spécifique n'est pas observée (*résultats non montrés*) pour les tétramères HLA-E (la séquence de HLA-E qui ne possède pas la valine en position 245) ce qui pourrait aussi être en faveur d'une plus faible affinité des LT CD8 HLA-E/UL40 pour le CD8.

Une autre caractéristique des LT CD8 HLA-E/UL40 est leur forte expression de CD45RA. Cette glycoprotéine est une des isoformes de CD45 (Rheinländer et al., 2018). CD45 est maintenant connu comme ayant pour ligand la protéine UL11, lors de l'infection à HCMV, qui est produite par les cellules infectées par le virus et exprimée à leur surface. Une étude a

montré que la liaison de UL11 avec CD45RA ou encore CD45RO conduit à une perturbation de la signalisation du TCR et à l'inhibition de la prolifération des cellules T (Gabaev et al., 2011). Le HCMV utilise la protéine UL11 comme un mécanisme d'immunoévasion pour éviter la lyse des cellules infectées. Toutefois, cette même équipe a montré que cet effet inhibiteur *in vitro* n'est pas applicable aux cellules T CD8+ spécifiques du HCMV (Gabaev et al., 2014). On peut émettre l'hypothèse que les LT CD8+ spécifiques du HCMV et en particulier les LT CD8 HLA-E/UL40 contrecarrent ce mécanisme d'immunoévasion par une forte expression en CD45RA. Ce qui serait cohérent avec l'étude menée en 2017, montrant que l'effet activateur ou inhibiteur de CD45 est dépendant de sa concentration de même pour UL11 (Zischke et al., 2017).

Ce travail nous a permis d'identifier un ensemble de marqueurs définissant les LT CD8 HLA-E/UL40 comme des LT CD8+ effecteurs mémoires CD45RA+/CCR7- (TEMRA) CD56+ CD57+ PD-1-. A l'issue de l'article 2 (**Figure 6B**), nous avons testé la possibilité d'utiliser uniquement ce phénotype sans utiliser de tétramères pour détecter les populations de LT CD8 HLA-E/UL40 dans des échantillons de PBMC. Ces expériences nous ont permis de montrer que des TEMRA CD56+ CD57+ PD-1- sont présents chez des individus pour lesquels aucun LT CD8+ HLA-E/UL40 n'a été détecté au moyen des tétramères utilisés. Ils représentent en moyenne 2% des LT CD8+ sanguins totaux. Nous ne pouvons pas exclure que des LT CD8 HLA-E/UL40 soient cependant présents dans ces échantillons mais que les peptides UL40 utilisés dans cette expérience n'aient pas permis de les détecter. En effet, comme montré dans de nombreux travaux et dans notre étude précédente (Jouand et al., 2018) la séquence du peptide leader de la protéine virale UL40 est fortement polymorphe (Garrigue et al., 2008; Heatley et al., 2013; Hammer et al., 2018) et la reconnaissance des LT CD8 HLA-E/UL40 est très spécifique du peptide. Il faudrait donc pour vérifier ce point, répéter ces expériences sur des échantillons sanguins après le séquençage de l'ADN viral *UL40* pour utiliser un tétramère HLA-E contenant le peptide UL40 spécifique de la souche HCMV infectant le patient testé. Nous pourrions aussi utiliser les 11 tétramères HLA-E/UL40 déjà développés et utilisés dans l'étude précédant mon travail de thèse (Jouand et al., 2018). Une autre explication à la détection de TEMRA CD56+ CD57+ PD-1- dans ces échantillons pourrait aussi indiquer que d'autres réponses LT CD8 dirigées contre des complexes HLA-E/peptide autres que HLA-E/UL40 pourraient présenter le même phénotype. Dans ce cas, le phénotype TEMRA CD56+ CD57+ PD-1- pourrait être appliqué à d'autres réponses telles que, par exemple, des LT CD8 dirigés contre des peptides

viraux (VIH, VHC, EBV), bactériens (tB) ou autres (hsp60, ...). Il serait donc intéressant de poursuivre cette étude en élucidant le phénotype d'autres populations de LT CD8 HLA-E-restreintes dans d'autres contextes pathologiques ou ces réponses ont été décrites (infections mais aussi diabète, sclérose en plaque, ...). D'un autre côté, nous montrons aussi dans cette figure que lorsque des LT CD8 HLA-E/UL40 sont détectés au moyen de tétramères HLA-E/UL40 la population de TEMRA CD56+ CD57+ PD1- détectée avec un set d'anticorps uniquement est beaucoup plus importante que chez les individus sans réponse détectée. Pour les 3 individus HCMV+ testés les TEMRA CD56+ CD57+ PD1- représentent en moyenne 14% des LT CD8 circulants. Ce résultat suggère donc que la population de TEMRA CD56+ CD57+ PD1- est plus importante dans ce petit groupe d'individus. La différence de pourcentage observée selon le mode de détection (tétramères ou phénotype) peut elle aussi être partiellement expliquée par le fait que seul 2 complexes HLA-E/UL40 aient été utilisés et que d'autres réponses dirigées contre d'autres peptides UL40 peuvent coexister. Si cet argument était vérifié il pourrait étendre le phénotype TEMRA CD56+ CD57+ PD1- à l'ensemble des LT CD8 HLA-E/UL40. Dans ce cas, ce phénotype pourrait permettre d'étudier les populations LT CD8 HLA-E/UL40 sans restriction peptidique et serait un outil utile pour le monitoring de ces cellules dans des cohortes de patients. On peut aussi imaginer affiner ce phénotype en identifiant d'autres marqueurs discriminants pour les LT CD8 HLA-E/UL40.

Dans ce travail nous montrons que les LT CD8 HLA-E/UL40 partagent certains traits phénotypiques avec des sous populations de NK et de T $\gamma\delta$ et partagent l'expression de CD56, CD57, NKG2C, CD158 et des niveaux faibles ou nuls de PD1. Concernant PD1, dans d'autres contextes infectieux tels que l'infection à VIH, au virus de l'immunodéficience du singe/ simian immunodeficiency virus (SIV), au VHB et VHC, la surexpression de PD1 diminue la capacité de prolifération et de production de cytokines donc à tuer les cellules infectées (Day et al., 2006; Petrovas et al., 2006; Trautmann et al., 2006; Velu et al., 2007; Zhang et al., 2008). Il a été montré que les LT CD8+ spécifiques du HCMV expriment moins PD1 que ceux spécifiques du VIH, de l'EBV et du VHC (van den Berg et al., 2019), ce qui impliquerait que les réponses T CD8+ anti-HCMV ne perdent pas totalement leurs capacités de prolifération et de production de cytokines.

L'expression de CD57 est une caractéristique majeure des deux populations de LT CD8+ spécifiques du HCMV de notre étude. CD57 a principalement été considéré comme un marqueur de réplication des cellules senescentes (Nielsen et al., 2013). Sous une stimulation

persistante les cellules T mémoires peuvent exprimer le CD57, ces cellules ont des télomères courts, une activité télomérase faible mais aussi une expression faible de gènes associés au cycle cellulaire et une capacité de prolifération faible (Nielsen et al., 2013). Toutefois, il a été montré plus récemment que les LT CD8⁺ CD57⁺ CD28⁻ pouvaient proliférer (Ahmed et al., 2020), s'ils étaient dans un milieu cytokinique particulier et étaient hautement cytotoxiques suggérant que les fonctions exactes de CD57 restent à élucider (Pedroza-Seres et al., 2007; Chattopadhyay et al., 2008; Chong et al., 2008).

III. Les LT CD8 HLA-E/UL40 : des cellules T mémoires à la frontière entre l'immunité innée et adaptative ?

Dans ce travail nous montrons que les LT CD8 HLA-E/UL40 partagent certains traits phénotypiques avec des sous populations de NK NKG2C⁺ CD57⁺ et les LT TCR $\gamma\delta$ δ 2⁻. Nous montrons que le profil CD8^{low} CD45RA^{high} CD56⁺ CD57^{high} CD158⁺ PD1⁻ des LT CD8 HLA-E/UL40 est partagé avec les cellules NK CD57⁺ et les LT TCR $\gamma\delta$ δ 2⁻ (**Article 2, Figure 6**). Ce qui est cohérent avec les études réalisées précédemment qui ont montré le partage de caractéristiques communes entre les NK et les LT (Sun et al., 2009; Foley et al., 2012; Lee et al., 2015; Couzi et al., 2015). Ces résultats suggérant que les LT CD8 HLA-E/UL40 sont à la frontière entre l'immunité innée et adaptative. L'expression de CD56 est souvent associée à des cellules NK ou T présentant une forte activité cytotoxique (Pievani et al., 2011; Van Acker et al., 2017). Des travaux réalisés au cours de la dernière décade ont proposé le terme CIK (Cytokine-induced killer cells) pour définir un ensemble de cellules exprimant CD56. Les CIK sont une population hétérogène d'effecteurs terminalement différenciés CD3⁺/⁻ CD56⁺ qui incluent en majorité des cellules NK et T $\gamma\delta$. Ils possèdent une capacité de prolifération élevée et ont une activité anti-tumorale non restreinte au CMH ce qui font des CIK des cellules intéressantes en immunothérapie adoptive dans le contexte du cancer (Schmeel et al., 2014). Le pouvoir thérapeutique des cellules CIK a déjà été testé dans des essais cliniques en adjuvant de traitement curatif des patients atteints de carcinome hépatocellulaire et ont permis de prolonger la survie générale et sans récurrence des patients jusqu'à 5 ans après l'arrêt des injections répétées de CIK (Lee et al., 2019; Yoon et al., 2019). En 2020, une amélioration de la survie sans progression du cancer et générale a été montrée dans 27 essais et 9 essais qui ont reporté un taux de survie à 5 ans significativement plus élevé chez les patients traités avec

des CIK (Zhang & Schmidt-Wolf, 2020). L'activité anti-tumorale des CIK repose sur leur forte activité cytotoxique. D'après notre étude, les LT CD8 HLA-E/UL40 présentent des caractéristiques de cellules NK dont l'expression de CD56, sont capables de produire des effecteurs cytotoxiques, ont un taux de prolifération important par rapport aux autres LT CD8+, et correspondent donc à la définition des CIK. Des études proposent des protocoles de générations de populations CIK spécifiques du HCMV issus de cellules T CD8 HLA-A2/pp65 (Luah et al., 2019) comme approche d'immunothérapie dans le traitement préemptif de patients à risque d'infection à CMV et de rechute leucémique imminente après une transplantation de cellules souches allogéniques (Pfirrmann et al., 2015). Il serait donc intéressant à la fois de rechercher si les protocoles déjà établis d'expansion des CIK permettent d'amplifier les LT CD8 HLA-E/UL40 chez des sujets HCMV+ et de tester au moins *in vitro* les capacités cytotoxiques des LT CD8 HLA-E/UL40 pour des cellules tumorales exprimant HLA-E.

IV. Réponse lymphocytaire T CD8 HLA-E/UL40 et survenue du CLAD en transplantation pulmonaire.

Dans la Partie 3 du chapitre « Résultats » nous avons recherché un lien entre la présence des LT CD8 HLA-E/UL40 induits en réponse à une infection par le HCMV et la survenue du CLAD chez les receveurs d'une transplantation pulmonaire.

Cette étude nous a permis de confirmer plusieurs observations faites dans la Partie 2 du chapitre « Résultats » telles que la fréquence des réponses T CD8 HLA-E/UL40, le phénotype de ces réponses et la comparaison avec la fréquence et le phénotype des LT CD8 HLA-A2/pp65. Chez les LTR, les LT CD8 HLA-E/UL40 se caractérisent aussi par un phénotype de TEMRA CD56+ CD57+ PD1-. Cependant si ce phénotype est observé chez les patients STABLES, ce phénotype est modifié chez les patients qui vont développer un CLAD. Cette altération se caractérise par une perte de CD56 et l'acquisition de PD1 donc plus globalement à un phénotype qui va se rapprocher de celui des LT CD8 HLA-A2/pp65. Ce résultat indique que le phénotype des LT CD8 HLA-E/UL40 n'est pas figé et qu'il peut être modifié. Les causes de cette plasticité sont inconnues. Nous ne savons pas non plus si cette modification est transitoire avec un retour au phénotype antérieur ou stable dans le temps une fois acquise. Aucun changement n'est en revanche observé pour les réponses T CD8 HLA-A2/pp65 qui

conservent un phénotype stable post-infection chez ces patients. Concernant les conséquences attendues de cette altération phénotypique, plusieurs hypothèses peuvent être émises. Un changement de fonction est fort probable compte tenu des molécules régulées (CD56, PD1). L'acquisition de ce profil d'expression proche de celui des LT CD8 HLA-A2/pp65 pourrait indiquer des fonctions identiques ou proches de celles des LT CD8 HLA-A2/pp65 mais avec peut être des cibles cellulaires différentes. En effet si les LT CD8 HLA-A2/pp65 peuvent reconnaître toutes cellules présentant un peptide pp65 associé à des molécules HLA-A2, les LT CD8 HLA-E/UL40 ne peuvent reconnaître que des peptides UL40 présentés par des molécules HLA-E. Comme montré précédemment les molécules HLA-E ne sont pas ubiquitaires, leur expression est restreinte à certains types cellulaires normaux ou pathologiques tels que l'ensemble des cellules hématopoïétiques, les cellules endothéliales vasculaires et de nombreuses cellules tumorales (Derré et al., 2006; Coupel et al., 2007). On peut donc supposer que dans certaines conditions pathologiques telles que l'infection par le HCMV, l'expression de HLA-E est augmentée ou maintenue malgré l'inhibition par le virus des molécules du HLA-Ia (HLA-A, -B, -C). HLA-E fournirait ainsi une cible moléculaire pour l'activation, la prolifération des LT CD8 HLA-E/UL40 qui une fois activés peuvent tuer les cellules infectées. L'exploration fonctionnelle des populations de LT CD8 dirigés contre HLA-E/UL40 ou HLA-A2/pp65 issus de patients STABLES ou CLAD reste à faire pour comparer la fonction de ces populations selon le contexte post-greffe. On peut toutefois souligner que ces modifications (réduction de la fréquence des réponses T CD8 HLA-E/UL40 chez les LTR et changement partiel de phénotype) sont des événements observés précocement (environ 2 ans, valeur médiane des échantillons analysés : 30 mois) avant le diagnostic du CLAD.

Notre façon d'aborder le rôle des LT CD8 HLA-E/UL40 a été d'analyser la globalité des réponses immunes post-infection avec pour objectif d'identifier une possible signature immune du CLAD liée à l'immunité anti-HCMV. Nous montrons que pour l'ensemble des LTR étudiés, le profil immunitaire post-infection évolue vers une diminution des LB contre-balançée par une augmentation des LT $\alpha\beta$ CD8+, des LT TCR $\gamma\delta$ $\delta 2^-$ et des NK NKG2C+CD57+. Si l'augmentation des LT $\alpha\beta$ CD8+, des LT TCR $\gamma\delta$ $\delta 2^-$ et des NK NKG2C+ CD57+ en réponse à l'infection est bien établie (Déchanet, et al., 1999 (a); Déchanet, et al., 1999 (b); Puig-Pey et al., 2010; Couzi et al., 2011; Foley et al., 2012; Roux et al., 2013; Ataya et al., 2020, 2021) en revanche la diminution du compartiment B est peu décrite. Frasca *et al.* ont montré que les individus HCMV+ ont une capacité réduite à développer une réponse humorale après

vaccination associée à moins de LB mémoires et une réponse anticorps de plus faible affinité (Frasca et al., 2015). Plus récemment, l'étude de Zabalza *et al.* a indiqué que l'infection à HCMV favorise l'expansion des LB transitionnels (CD38^{high} CD10+) au dépend des LB mémoires (CD38^{low/-} CD10- IgD- CD27+), qui, selon le contexte pathologique, peuvent influencer le profil inflammatoire des patients (Zabalza et al., 2020). Nos résultats confirment donc la modulation du compartiment des LB post-infection. Dans notre travail l'utilisation d'un marquage CD19 pour identifier les populations B est probablement une limite et une étude incluant des marqueurs de sous-populations B permettrait peut-être d'observer des régulations plus spécifiques à ce contexte infectieux.

La comparaison de la globalité des réponses immunes post-infection entre les LTR STABLES et CLAD a révélé des changements spécifiques aux LTR CLAD. Nos résultats indiquent que dans le groupe de patients CLAD le compartiment des cellules immunes contient moins de NK totaux, moins de NK NKG2C+CD57+ et moins de LT $\gamma\delta$ que celui des patients STABLES. Cette diminution relative en cellules NK et T $\gamma\delta$ semble se faire au profit du compartiment T CD4+ qui semble augmenter, la tendance est à confirmer car la différence est non significative. Pour relier ces événements à la survenue du CLAD plusieurs pistes sont possibles. Tout d'abord la baisse des cellules NK et T $\gamma\delta$, qui sont très impliquées dans le contrôle du HCMV, pourrait indiquer un moins bon contrôle de l'infection chez les patients CLAD avec des infections plus sévères, plus d'épisodes de réactivation. Compte tenu des effets directs et lytiques du virus HCMV sur les tissus cela pourrait induire des lésions cellulaires, tissulaires et vasculaires favorisant la survenue du CLAD. En effet, l'infection à HCMV est un facteur de risque de développement du CLAD (Snyder et al., 2010; Paraskeva et al., 2011; Stern et al., 2014). La taille de notre cohorte n'était hélas pas suffisante pour explorer un lien avec la sévérité de l'infection HCMV. De plus si l'augmentation du compartiment T CD4+ est confirmée, elle pourrait aussi favoriser l'émergence de réponses alloimmunes dirigées contre le greffon. Des travaux suggérant une possible cross-réactivité des réponses anti-virales et allogéniques ont été publiés (Heutinck et al., 2016; D'Orsogna et al., 2017) mais ce phénomène reste peu connu. Cependant, à ce stade de l'interprétation, il convient de souligner une limite importante et inhérente à notre étude restreinte aux populations lymphocytaires du sang. Nous ne pouvons en effet pas exclure que la diminution des populations NK et T $\gamma\delta$ mais aussi des LT CD8 HLA-E/UL40 observée chez les patients CLAD reflète en fait la présence de ces cellules dans le greffon. En faveur de cet argument, les travaux du groupe de Sullivan qui ont

montré l'association entre la présence de LT CD8 HLA-E/UL40 et la survenue du BOS (un des phénotypes du CLAD) (Sullivan et al., 2015). Il serait donc important de poursuivre et de compléter notre étude par une analyse parallèle des biopsies des patients inclus dans notre projet pour une analyse de l'infiltrat cellulaire. Cette étude pourrait se faire soit par immunohistochimie au moyen d'anticorps et de tétramères fluorescents soit par une approche plus globale de transcriptomique (RNA-Seq) soit une approche combinant les deux méthodes. Malgré tout, si la présence des cellules NK et T $\gamma\delta$ reste à vérifier dans les greffons, leur diminution dans le sang reste tout de même une signature précoce du CLAD qui, si elle était confirmée, pourrait être utile pour développer un test non invasif pour le suivi et la stratification des LTR à risque de développer un CLAD.

En faveur d'un rôle protecteur des cellules NKG2C+, l'association de l'expansion de ces cellules avec un faible titre de HCMV dans le sang alors que la délétion du gène NKG2C a été décrit comme un facteur de risque de virémie et de maladie à CMV dans le contexte de la transplantation pulmonaire (Vietzen et al., 2018; Harpur et al., 2019). Une étude menée en 2019, a montré que l'expansion des cellules NK NKG2C+ était associée à un risque accru de CLAD (Calabrese et al., 2019). Les résultats de cette étude sont différents des nôtres, ce qui peut être expliqué par le fait que les expériences de l'étude de Calabrese ont été réalisées avec des échantillons de LBA et non avec des échantillons de PBMC. Les échantillons de LBA permettent une analyse des réponses immunitaires localisées dans le poumon alors que nos échantillons de PBMC permettent la vision de ces réponses dans le sang circulant. Les cellules constituant ces réponses ne sont pas en contact avec le même environnement immunitaire (cellules, cytokines, ...) pouvant modifier leurs phénotypes et potentiellement leurs fonctions.

Quant au rôle des LT CD8 HLA-E/UL40 dans le contexte de la transplantation pulmonaire, il a pu être abordé chez les patients STABLES uniquement. La présence d'une réponse T CD8 HLA-E/UL40 chez les LTR STABLES est associée à une augmentation du nombre de cellules T $\alpha\beta$ CD8+, à une tendance à plus de LT TCR $\gamma\delta$ $\delta 2^-$, deux populations importantes pour le contrôle efficace de l'infection. L'expansion des LT $\alpha\beta$ CD8+ effecteurs capables de reconnaître et de lyser les cellules infectées via leur TCR en sécrétant de l'IFN γ , du TNF α , du GzmB et de la perforine est une caractéristique de l'empreinte du HCMV sur le système immunitaire (Zhou et al., 2009; van den Berg et al., 2019). Il a été montré qu'*in vitro* les LT TCR $\gamma\delta$ $\delta 2^-$ sont capables de reconnaître et de lyser les cellules infectées grâce à leur capacité de production d'IFN γ et de TNF α , de perforine et de GzmB (Déchanet et al., 1999 (b); Halary et al., 2005; Vermijlen et

al., 2010; Couzi et al., 2012). De plus, l'expansion de ces cellules après l'infection à HCMV a été corrélée avec la résolution de la virémie (Kaminski et al., 2016). L'ensemble de ces éléments suggère que la présence des LT CD8 HLA-E/UL40 est corrélée à une augmentation des réponses immunes possédant un rôle protecteur vis-à-vis de l'infection. Cela pourrait suggérer un lien entre ces différentes populations tel que par exemple un effet régulateur des LT $\alpha\beta$ CD8⁺ sur les LT $\gamma\delta$ ou l'inverse via des interactions récepteurs/ligands spécifiques et/ou via la production de cytokines favorisant leur prolifération. Ces mécanismes restent à démontrer.

Conclusion

Ce travail de thèse a permis d'améliorer la connaissance des LT CD8 restreints par les molécules HLA-E induits en réponse à une infection à HCMV. Notre étude complète la description du phénotype de ces LT CD8⁺ rapportée dans des études précédentes (Pietra et al., 2001; Romagnani et al., 2002; Mazzarino et al., 2005; Allard et al., 2012; Jouand et al., 2018; Sullivan et al., 2021). Ce travail identifie aussi quelques marqueurs spécifiques et discriminants qui suggèrent que cette population pourrait se distinguer par un phénotype propre et établit une base pour la mise au point de tests de détection de ces cellules. Nos résultats orientent également vers un phénotype de LT CD8 CD56⁺ à forte capacité cytotoxique et proliférative proche de celles rapportées pour les cellules NK et T $\gamma\delta$ et avec une restriction HLA faible, les molécules HLA-E étant faiblement polymorphes. Dans le contexte de la transplantation pulmonaire, nous montrons que la présence et l'intégrité des LT CD8 HLA-E/UL40 chez les receveurs sont plutôt associées à une bonne survie du greffon. Par conséquent, le suivi post-infection des LT CD8 HLA-E/UL40 pourrait, à plus long terme, si son intérêt est confirmé fournir un outil diagnostique pour l'identification et la stratification des patients à risque de développer un CLAD.

Bibliographie

Abate, D., Fiscon, M., Saldan, A., Cofano, S., Mengoli, C., Sgarabotto, D., d'Agostino, C., Barzon, L., Cusinato, R., Toscano, G., Feltrin, G., Gambino, A., Gerosa, G., & Palù, G. (2012). Human Cytomegalovirus-Specific T-Cell Immune Reconstitution in Preemptively Treated Heart Transplant Recipients Identifies Subjects at Critical Risk for Infection. *Journal of Clinical Microbiology*, 50(6), 1974-1980. <https://doi.org/10.1128/JCM.06406-11>

Abate, D., Saldan, A., Fiscon, M., Cofano, S., Paciolla, A., Furian, L., Eksler, B., Biasolo, M. A., Cusinato, R., Mengoli, C., Bonfante, L., Rossi, B., Rigotti, P., Sgarabotto, D., Barzon, L., & Palù, G. (2010). Evaluation of Cytomegalovirus (CMV)-Specific T Cell Immune Reconstitution Revealed That Baseline Antiviral Immunity, Prophylaxis, or Preemptive Therapy but not Antithymocyte Globulin Treatment Contribute to CMV-Specific T Cell Reconstitution in Kidney Transplant Recipients. *The Journal of Infectious Diseases*, 202(4), 585-594. <https://doi.org/10.1086/654931>

Ahmed, R., Miners, K. L., Lahoz-Beneytez, J., Jones, R. E., Roger, L., Baboonian, C., Zhang, Y., Wang, E. C. Y., Hellerstein, M. K., McCune, J. M., Baird, D. M., Price, D. A., Macallan, D. C., Asquith, B., & Ladell, K. (2020). CD57+ Memory T Cells Proliferate In Vivo. *Cell Reports*, 33(11), 108501. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2020.108501>

Ahn, K., Gruhler, A., Galocha, B., Jones, T. R., Wiertz, E. J. H. J., Ploegh, H. L., Peterson, P. A., Yang, Y., & Früh, K. (1997). The ER-Luminal Domain of the HCMV Glycoprotein US6 Inhibits Peptide Translocation by TAP. *Immunity*, 6(5), 613-621. [https://doi.org/10.1016/S1074-7613\(00\)80349-0](https://doi.org/10.1016/S1074-7613(00)80349-0)

Albright, E. R., & Kalejta, R. F. (2016). Canonical and Variant Forms of Histone H3 Are Deposited onto the Human Cytomegalovirus Genome during Lytic and Latent Infections. *Journal of Virology*, 90(22), 10309-10320. <https://doi.org/10.1128/JVI.01220-16>

Alcover, A., Alarcón, B., & Di Bartolo, V. (2018). Cell Biology of T Cell Receptor Expression and Regulation. *Annual Review of Immunology*, 36(1), 103-125. <https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-042617-053429>

Allard, M., Oger, R., Vignard, V., Percier, J.-M., Fregni, G., Périer, A., Caignard, A., Charreau, B., Bernardeau, K., Khammari, A., Dréno, B., & Gervois, N. (2011). Serum Soluble HLA-E in Melanoma : A New Potential Immune-Related Marker in Cancer. *PLoS ONE*, 6(6), e21118. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0021118>

Allard, M., Tonnerre, P., Nedellec, S., Oger, R., Morice, A., Guilloux, Y., Houssaint, E., Charreau, B., & Gervois, N. (2012). HLA-E-Restricted Cross-Recognition of Allogeneic Endothelial Cells by CMV-Associated CD8 T Cells : A Potential Risk Factor following Transplantation. *PLoS ONE*, 7(11), e50951. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0050951>

Antona, D., Lepoutre, A., Fonteneau, L., Baudon, C., Halftermeyer-Zhou, F., Le Strat, Y., & Lévy-Bruhl, D. (2017). Seroprevalence of cytomegalovirus infection in France in 2010.

Arnon, T. I., Achdout, H., Levi, O., Markel, G., Saleh, N., Katz, G., Gazit, R., Gonen-Gross, T., Hanna, J., Nahari, E., Porgador, A., Honigman, A., Plachter, B., Mevorach, D., Wolf, D. G., & Mandelboim, O. (2005). Inhibition of the NKp30 activating receptor by pp65 of human cytomegalovirus. *Nature Immunology*, 6(5), 515-523. <https://doi.org/10.1038/ni1190>

Arthurs, S. K., Eid, A. J., Pedersen, R. A., Kremers, W. K., Cosio, F. G., Patel, R., & Razonable, R. R. (2008). Delayed-Onset Primary Cytomegalovirus Disease and the Risk of Allograft Failure and Mortality after Kidney Transplantation. *Clinical Infectious Diseases*, 46(6), 840-846. <https://doi.org/10.1086/528718>

Åsberg, A., Humar, A., Rollag, H., Jardine, A. G., Kumar, D., Aukrust, P., Ueland, T., Bignamini, A. A., & Hartmann, A. (2016). Lessons Learned From a Randomized Study of Oral Valganciclovir Versus Parenteral Ganciclovir Treatment of Cytomegalovirus Disease in Solid Organ Transplant Recipients : The VICTOR Trial. *Clinical Infectious Diseases*, 62(9), 1154-1160. <https://doi.org/10.1093/cid/ciw084>

Åsberg, A., Humar, A., Rollag, H., Jardine, A. G., Mouas, H., Pescovitz, M. D., Sgarabotto, D., Tuncer, M., Noronha, I. L., Hartmann, A., & on behalf of the VICTOR Study Group†. (2007). Oral Valganciclovir Is Noninferior to Intravenous Ganciclovir for the Treatment of Cytomegalovirus Disease in Solid Organ Transplant Recipients. *American Journal of Transplantation*, 7(9), 2106-2113. <https://doi.org/10.1111/j.1600-6143.2007.01910.x>

Ashiru, O., Bennett, N. J., Boyle, L. H., Thomas, M., Trowsdale, J., & Wills, M. R. (2009). NKG2D Ligand MICA Is Retained in the cis-Golgi Apparatus by Human Cytomegalovirus Protein UL142. *Journal of Virology*, 83(23), 12345-12354. <https://doi.org/10.1128/JVI.01175-09>

Atabani, S. F., Smith, C., Atkinson, C., Aldridge, R. W., Rodriguez-Perálvarez, M., Rolando, N., Harber, M., Jones, G., O’Riordan, A., Burroughs, A. K., Thorburn, D., O’Beirne, J., Milne, R. S. B., Emery, V. C., & Griffiths, P. D. (2012). Cytomegalovirus Replication Kinetics in Solid Organ Transplant Recipients Managed by Preemptive Therapy. *American Journal of Transplantation*, 12(9), 2457-2464. <https://doi.org/10.1111/j.1600-6143.2012.04087.x>

Atalay, R., Zimmermann, A., Wagner, M., Borst, E., Benz, C., Messerle, M., & Hengel, H. (2002). Identification and Expression of Human Cytomegalovirus Transcription Units Coding for Two Distinct Fc Receptor Homologs. *J. VIROL.*, 76, 13.

Ataya, M., Redondo-Pachón, D., Llinàs-Mallol, L., Yélamos, J., Alari-Pahissa, E., Pérez-Sáez, M. J., Altadill, M., Raïch-Regué, D., Vilches, C., Pascual, J., Crespo, M., & López-Botet, M. (2021). Long-Term Evolution of the Adaptive NKG2C+ NK Cell Response to Cytomegalovirus Infection in Kidney Transplantation : An Insight on the Diversity of Host–Pathogen Interaction. *The Journal of Immunology*, 207(7), 1882-1890. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.2100055>

Ataya, M., Redondo-Pachón, D., Llinàs-Mallol, L., Yélamos, J., Heredia, G., Pérez-Sáez, M. J., Vila, J., Costa-García, M., Raïch-Regué, D., Vilches, C., Pascual, J., Crespo, M., & López-Botet, M. (2020). Pretransplant adaptive NKG2C+ NK cells protect against cytomegalovirus

infection in kidney transplant recipients. *American Journal of Transplantation*, 20(3), 663-676. <https://doi.org/10.1111/ajt.15658>

AuCoin, D. P., Smith, G. B., Meiering, C. D., & Mocarski, E. S. (2006). Betaherpesvirus-Conserved Cytomegalovirus Tegument Protein ppUL32 (pp150) Controls Cytoplasmic Events during Virion Maturation. *Journal of Virology*, 80(16), 8199-8210. <https://doi.org/10.1128/JVI.00457-06>

Avery, R. K., Arav-Boger, R., Marr, K. A., Kraus, E., Shoham, S., Lees, L., Trollinger, B., Shah, P., Ambinder, R., Neofytos, D., Ostrander, D., Forman, M., & Valsamakis, A. (2016). Outcomes in Transplant Recipients Treated With Foscarnet for Ganciclovir-Resistant or Refractory Cytomegalovirus Infection. *Transplantation*, 100(10), e74-e80. <https://doi.org/10.1097/TP.0000000000001418>

Azevedo, L. S., Pierrotti, L. C., Abdala, E., Costa, S. F., Strabelli, T. M. V., Campos, S. V., Ramos, J. F., Latif, A. Z. A., Litvinov, N., Maluf, N. Z., Filho, H. H. C., Pannuti, C. S., Lopes, M. H., dos Santos, V. A., da Cruz Gouveia Linardi, C., Yasuda, M. A. S., & de Sousa Marques, H. H. (2015). Cytomegalovirus infection in transplant recipients. *Clinics*, 70(7), 515-523. [https://doi.org/10.6061/clinics/2015\(07\)09](https://doi.org/10.6061/clinics/2015(07)09)

Barry, P. A., Pratt-Lowe, E., Peterlin, B. M., & Luciw, P. A. (1990). Cytomegalovirus activates transcription directed by the long terminal repeat of human immunodeficiency virus type 1. *Journal of Virology*, 64(6), 2932-2940. <https://doi.org/10.1128/jvi.64.6.2932-2940.1990>

Bate, S. L., Dollard, S. C., & Cannon, M. J. (2010). Cytomegalovirus Seroprevalence in the United States : The National Health and Nutrition Examination Surveys, 1988–2004. *Clinical Infectious Diseases*, 50(11), 1439-1447. <https://doi.org/10.1086/652438>

Beam, E., Lesnick, T., Kremers, W., Kennedy, C. C., & Razonable, R. R. (2016). Cytomegalovirus disease is associated with higher all-cause mortality after lung transplantation despite extended antiviral prophylaxis. *Clinical Transplantation*, 30(3), 270-278. <https://doi.org/10.1111/ctr.12686>

Bechtel, J. T., & Shenk, T. (2002). Human Cytomegalovirus UL47 Tegument Protein Functions after Entry and before Immediate-Early Gene Expression. *Journal of Virology*, 76(3), 1043-1050. <https://doi.org/10.1128/JVI.76.3.1043-1050.2002>

Beck, S., & Barrell, B. G. (1988). Human cytomegalovirus encodes a glycoprotein homologous to MHC class-I antigens. *Nature*, 331(6153), 269-272. <https://doi.org/10.1038/331269a0>

Bennett, D., Bergantini, L., Ferrara, P., Cusi, M. G., Scolletta, S., Montagnani, F., Paladini, P., Sestini, P., Refini, R. M., Luzzi, L., Fossi, A., & Bargagli, E. (2022). Cytomegalovirus Infection Is Associated with Development of Chronic Lung Allograft Dysfunction. *Lung*, 200(4), 513-522. <https://doi.org/10.1007/s00408-022-00551-0>

Benoist, G., Leruez-Ville, M., Magny, J. F., Jacquemard, F., Salomon, L. J., & Ville, Y.

(2013). Management of Pregnancies with Confirmed Cytomegalovirus Fetal Infection. *Fetal Diagnosis and Therapy*, 33(4), 203-214. <https://doi.org/10.1159/000342752>

Berry, R., Watson, G. M., Jonjic, S., Degli-Esposti, M. A., & Rossjohn, J. (2020). Modulation of innate and adaptive immunity by cytomegaloviruses. *Nature Reviews Immunology*, 20(2), 113-127. <https://doi.org/10.1038/s41577-019-0225-5>

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 : Innate immunity. *European Journal of Immunology*, 42(2), 447-457. <https://doi.org/10.1002/eji.201141826>

Bhella, D., Rixon, F. J., & Dargan, D. J. (2000). Cryomicroscopy of human cytomegalovirus virions reveals more densely packed genomic DNA than in herpes simplex virus type 1. *Journal of Molecular Biology*, 295(2), 155-161. <https://doi.org/10.1006/jmbi.1999.3344>

Biolatti, M., Dell'Oste, V., Andrea, M. D., & Landolfo, S. (2018). The human cytomegalovirus tegument protein pp65 (pUL83) : A key player in innate immune evasion. *New Microbiologica*, 8.

Bland, F. A., Lemberg, M. K., McMichael, A. J., Martoglio, B., & Braud, V. M. (2003). Requirement of the Proteasome for the Trimming of Signal Peptide-derived Epitopes Presented by the Nonclassical Major Histocompatibility Complex Class I Molecule HLA-E. *Journal of Biological Chemistry*, 278(36), 33747-33752. <https://doi.org/10.1074/jbc.M305593200>

Blees, A., Janulienė, D., Hofmann, T., Koller, N., Schmidt, C., Trowitzsch, S., Moeller, A., & Tampé, R. (2017). Structure of the human MHC-I peptide-loading complex. *Nature*, 551(7681), 525-528. <https://doi.org/10.1038/nature24627>

Bodinier, M., Peyrat, M.-A., Tournay, C., Davodeau, F., Romagne, F., Bonneville, M., & Lang, F. (2000). Efficient detection and immunomagnetic sorting of specific T cells using multimers of MHC class I and peptide with reduced CD8 binding. *Nature Medicine*, 6(6), 707-710. <https://doi.org/10.1038/76292>

Boegel, S., Löwer, M., Bukur, T., Sorn, P., Castle, J. C., & Sahin, U. (2018). HLA and proteasome expression body map. *BMC Medical Genomics*, 11(1), 36. <https://doi.org/10.1186/s12920-018-0354-x>

Boivin, G., Goyette, N., Farhan, M., Ives, J., & Elston, R. (2012). Incidence of cytomegalovirus UL97 and UL54 amino acid substitutions detected after 100 or 200 days of valganciclovir prophylaxis. *Journal of Clinical Virology*, 53(3), 208-213. <https://doi.org/10.1016/j.jcv.2011.12.019>

Bonaros, N., Mayer, B., Schachner, T., Laufer, G., & Kocher, A. (2007). CMV-hyperimmune globulin for preventing cytomegalovirus infection and disease in solid organ

transplant recipients : A meta-analysis. *Clinical Transplantation*, 0(0), 070816071748001-???
<https://doi.org/10.1111/j.1399-0012.2007.00750.x>

Bonilla, D. L., Reinin, G., & Chua, E. (2021). Full Spectrum Flow Cytometry as a Powerful Technology for Cancer Immunotherapy Research. *Frontiers in Molecular Biosciences*, 7, 612801. <https://doi.org/10.3389/fmolb.2020.612801>

Borrego, F., Ulbrecht, M., Weiss, E. H., Coligan, J. E., & Brooks, A. G. (1998). Recognition of Human Histocompatibility Leukocyte Antigen (HLA)-E Complexed with HLA Class I Signal Sequence–derived Peptides by CD94/NKG2 Confers Protection from Natural Killer Cell–mediated Lysis. *Journal of Experimental Medicine*, 187(5), 813-818. <https://doi.org/10.1084/jem.187.5.813>

Bottino, C., Castriconi, R., Pende, D., Rivera, P., Nanni, M., Carnemolla, B., Cantoni, C., Grassi, J., Marcenaro, S., Reymond, N., Vitale, M., Moretta, L., Lopez, M., & Moretta, A. (2003). Identification of PVR (CD155) and Nectin-2 (CD112) as Cell Surface Ligands for the Human DNAM-1 (CD226) Activating Molecule. *Journal of Experimental Medicine*, 198(4), 557-567. <https://doi.org/10.1084/jem.20030788>

Braud, V. M., Allan, D. S. J., O’Callaghan, C. A., Söderström, K., D’Andrea, A., Ogg, G. S., Lazetic, S., Young, N. T., Bell, J. I., Phillips, J. H., Lanier, L. L., & McMichael, A. J. (1998). HLA-E binds to natural killer cell receptors CD94/NKG2A, B and C. *Nature*, 391(6669), 795-799. <https://doi.org/10.1038/35869> (a)

Braud, V. M., Allan, D. S. J., Wilson, D., & McMichael, A. J. (1998). TAP- and tapasin-dependent HLA-E surface expression correlates with the binding of an MHC class I leader peptide. *Current Biology*, 8(1), 1-10. [https://doi.org/10.1016/S0960-9822\(98\)70014-4](https://doi.org/10.1016/S0960-9822(98)70014-4) (b)

Braud, V., Yvonne Jones, E., & McMichael, A. (1997). The human major histocompatibility complex class Ib molecule HLA-E binds signal sequence-derived peptides with primary anchor residues at positions 2 and 9. *European Journal of Immunology*, 27(5), 1164-1169. <https://doi.org/10.1002/eji.1830270517>

Brennan, D. C., Legendre, C., Patel, D., Mange, K., Wiland, A., McCague, K., & Shihab, F. S. (2011). Cytomegalovirus Incidence Between Everolimus Versus Mycophenolate in De Novo Renal Transplants : Pooled Analysis of Three Clinical Trials: Everolimus Versus Mycophenolate and CMV Incidence. *American Journal of Transplantation*, 11(11), 2453-2462. <https://doi.org/10.1111/j.1600-6143.2011.03674.x>

Brocchieri, L., Kledal, T. N., Karlin, S., & Mocarski, E. S. (2005). Predicting Coding Potential from Genome Sequence : Application to Betaherpesviruses Infecting Rats and Mice. *Journal of Virology*, 79(12), 7570-7596. <https://doi.org/10.1128/JVI.79.12.7570-7596.2005>

Browne, H., Smith, G., & Minson, T. (1990). A complex between the MHC class I homologue encoded by human cytomegalovirus and. *Nature*, 347, 3.

Calabrese, D. R., Chong, T., Wang, A., Singer, J. P., Gottschall, M., Hays, S. R., Golden, J. A., Kukreja, J., Lanier, L. L., Tang, Q., & Greenland, J. R. (2019). NKG2C Natural Killer Cells in

Bronchoalveolar Lavage Are Associated With Cytomegalovirus Viremia and Poor Outcomes in Lung Allograft Recipients. *Transplantation*, 103(3), 493-501. <https://doi.org/10.1097/TP.0000000000002450>

Cannon, M. J., Schmid, D. S., & Hyde, T. B. (2010). Review of cytomegalovirus seroprevalence and demographic characteristics associated with infection: CMV seroprevalence. *Reviews in Medical Virology*, 20(4), 202-213. <https://doi.org/10.1002/rmv.655>

Cantisán, S., Lara, R., Montejo, M., Redel, J., Rodríguez-Benot, A., Gutiérrez-Aroca, J., González-Padilla, M., Bueno, L., Rivero, A., Solana, R., & Torre-Cisneros, J. (2013). Pretransplant Interferon- γ Secretion by CMV-Specific CD8⁺ T Cells Informs the Risk of CMV Replication After Transplantation: Utility of Pretransplant QuantiFERON-CMV. *American Journal of Transplantation*, 13(3), 738-745. <https://doi.org/10.1111/ajt.12049>

Carbone, J. (2016). The Immunology of Posttransplant CMV Infection: Potential Effect of CMV Immunoglobulins on Distinct Components of the Immune Response to CMV. *Transplantation*, 100(Supplement 3S), S11-S18. <https://doi.org/10.1097/TP.0000000000001095>

Celik, A. A., Kraemer, T., Huyton, T., Blasczyk, R., & Bade-Döding, C. (2016). The diversity of the HLA-E-restricted peptide repertoire explains the immunological impact of the Arg107Gly mismatch. *Immunogenetics*, 68(1), 29-41. <https://doi.org/10.1007/s00251-015-0880-z>

Cerboni, C., Mousavi-Jazi, M., Wakiguchi, H., Carbone, E., Kärre, K., & Söderström, K. (2001). Synergistic effect of IFN- γ and human cytomegalovirus protein UL40 in the HLA-E-dependent protection from NK cell-mediated cytotoxicity. *European Journal of Immunology*, 31(10), 2926-2935. [https://doi.org/10.1002/1521-4141\(200110\)31:10<2926::AID-IMMU2926>3.0.CO;2-2](https://doi.org/10.1002/1521-4141(200110)31:10<2926::AID-IMMU2926>3.0.CO;2-2)

Chalupny, N. J., Rein-Weston, A., Dosch, S., & Cosman, D. (2006). Down-regulation of the NKG2D ligand MICA by the human cytomegalovirus glycoprotein UL142. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 346(1), 175-181. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2006.05.092>

Chapman, T. L., Heikema, A. P., & Bjorkman, P. J. (1999). The Inhibitory Receptor LIR-1 Uses a Common Binding Interaction to Recognize Class I MHC Molecules and the Viral Homolog UL18. *Immunity*, 11(5), 603-613. [https://doi.org/10.1016/S1074-7613\(00\)80135-1](https://doi.org/10.1016/S1074-7613(00)80135-1)

Charpak-Amikam, Y., Kubsch, T., Seidel, E., Oiknine-Djian, E., Cavaletto, N., Yamin, R., Schmiedel, D., Wolf, D., Gribaudo, G., Messerle, M., Cicin-Sain, L., & Mandelboim, O. (2017). Human cytomegalovirus escapes immune recognition by NK cells through the downregulation of B7-H6 by the viral genes US18 and US20. *Scientific Reports*, 7(1), 8661. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-08866-2>

Chattopadhyay, P. K., Betts, M. R., Price, D. A., Gostick, E., Horton, H., Roederer, M., & De Rosa, S. C. (2008). The cytolytic enzymes granzyme A, granzyme B, and perforin:

Expression patterns, cell distribution, and their relationship to cell maturity and bright CD57 expression. *Journal of Leukocyte Biology*, 85(1), 88-97. <https://doi.org/10.1189/jlb.0208107>

Chemaly, R. F., Chou, S., Einsele, H., Griffiths, P., Avery, R., Razonable, R. R., Mullane, K. M., Kotton, C., Lundgren, J., Komatsu, T. E., Lischka, P., Josephson, F., Douglas, C. M., Umeh, O., Miller, V., Ljungman, P., & Resistant Definitions Working Group of the Cytomegalovirus Drug Development Forum. (2019). Definitions of Resistant and Refractory Cytomegalovirus Infection and Disease in Transplant Recipients for Use in Clinical Trials. *Clinical Infectious Diseases*, 68(8), 1420-1426. <https://doi.org/10.1093/cid/ciy696>

Chemaly, R. F., Ullmann, A. J., Stoelben, S., Richard, M. P., Bornhäuser, M., Groth, C., Einsele, H., Silverman, M., Mullane, K. M., Brown, J., Nowak, H., Kölling, K., Stobernack, H. P., Lischka, P., Zimmermann, H., Rübsamen-Schaeff, H., Champlin, R. E., & Ehninger, G. (2014). Letemovir for Cytomegalovirus Prophylaxis in Hematopoietic-Cell Transplantation. *New England Journal of Medicine*, 370(19), 1781-1789. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1309533>

Chen, D. H., Jiang, H., Lee, M., Liu, F., & Zhou, Z. H. (1999). Three-Dimensional Visualization of Tegument/Capsid Interactions in the Intact Human Cytomegalovirus. *Virology*, 260(1), 10-16. <https://doi.org/10.1006/viro.1999.9791>

Chen, G., Yang, X., Ko, A., Sun, X., Gao, M., Zhang, Y., Shi, A., Mariuzza, R. A., & Weng, N. (2017). Sequence and Structural Analyses Reveal Distinct and Highly Diverse Human CD8 + TCR Repertoires to Immunodominant Viral Antigens. *Cell Reports*, 19(3), 569-583. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2017.03.072>

Chong, L. K., Aicheler, R. J., Llewellyn-Lacey, S., Tomasec, P., Brennan, P., & Wang, E. C. Y. (2008). Proliferation and interleukin 5 production by CD8hiCD57+ T cells. *European Journal of Immunology*, 38(4), 995-1000. <https://doi.org/10.1002/eji.200737687>

Connolly, S. A., Jardetzky, T. S., & Longnecker, R. (2021). The structural basis of herpesvirus entry. *Nature Reviews Microbiology*, 19(2), 110-121. <https://doi.org/10.1038/s41579-020-00448-w>

Cortese, M., Calò, S., D'Aurizio, R., Lilja, A., Pacchiani, N., & Merola, M. (2012). Recombinant Human Cytomegalovirus (HCMV) RL13 Binds Human Immunoglobulin G Fc. *PLoS ONE*, 7(11), e50166. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0050166>

Costa, C., Astegiano, S., Terlizzi, M. E., Sidoti, F., Curtoni, A., Solidoro, P., Baldi, S., Bergallo, M., & Cavallo, R. (2011). Evaluation and Significance of Cytomegalovirus-Specific Cellular Immune Response in Lung Transplant Recipients. *Transplantation Proceedings*, 43(4), 1159-1161. <https://doi.org/10.1016/j.transproceed.2011.03.024>

Costa-Garcia, M., Vera, A., Moraru, M., Vilches, C., López-Botet, M., & Muntasell, A. (2015). Antibody-Mediated Response of NKG2C^{bright} NK Cells against Human Cytomegalovirus. *The Journal of Immunology*, 194(6), 2715-2724. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1402281>

Coupel, S., Moreau, A., Hamidou, M., Horejsi, V., Soullillou, J.-P., & Charreau, B. (2007). Expression and release of soluble HLA-E is an immunoregulatory feature of endothelial cell

activation. *Blood*, 109(7), 2806-2814. <https://doi.org/10.1182/blood-2006-06-030213>

Courivaud, C., Bamoulid, J., Chalopin, J.-M., Gaiffe, E., Tiberghien, P., Saas, P., & Ducloux, D. (2013). Cytomegalovirus Exposure and Cardiovascular Disease in Kidney Transplant Recipients. *The Journal of Infectious Diseases*, 207(10), 1569-1575. <https://doi.org/10.1093/infdis/jit064>

Couzi, L., Lafarge, X., Pitard, V., Neau-Cransac, M., Dromer, C., Billes, M.-A., Lacaille, F., Moreau, J.-F., Merville, P., & Déchanet-Merville, J. (2011). Gamma-delta T cell expansion is closely associated with cytomegalovirus infection in all solid organ transplant recipients : Letter to the editors. *Transplant International*, 24(5), e40-e42. <https://doi.org/10.1111/j.1432-2277.2010.01181.x>

Couzi, L., Pitard, V., Moreau, J.-F., Merville, P., & Déchanet-Merville, J. (2015). Direct and indirect effects of cytomegalovirus-induced $\gamma\delta$ T cells after kidney transplantation. *Frontiers in Immunology*, 13.

Couzi, L., Pitard, V., Netzer, S., Garrigue, I., Lafon, M., Moreau, J., Taupin, J., Merville, P., & Déchanet-Merville, J. (2009). Common Features of $\gamma\delta$ T Cells and CD8+ $\alpha\beta$ T Cells Responding to Human Cytomegalovirus Infection in Kidney Transplant Recipients. *The Journal of Infectious Diseases*, 200(9), 1415-1424. <https://doi.org/10.1086/644509>

Couzi, L., Pitard, V., Sicard, X., Garrigue, I., Hawchar, O., Merville, P., Moreau, J.-F., & Déchanet-Merville, J. (2012). Antibody-dependent anti-cytomegalovirus activity of human $\gamma\delta$ T cells expressing CD16 (Fc γ RIIIa). *Blood*, 119(6), 1418-1427. <https://doi.org/10.1182/blood-2011-06-363655>

Crough, T., & Khanna, R. (2009). Immunobiology of Human Cytomegalovirus : From Bench to Bedside. *Clinical Microbiology Reviews*, 22(1), 76-98. <https://doi.org/10.1128/CMR.00034-08>

Cui, X., Freed, D. C., Wang, D., Qiu, P., Li, F., Fu, T.-M., Kauvar, L. M., & McVoy, M. A. (2017). Impact of Antibodies and Strain Polymorphisms on Cytomegalovirus Entry and Spread in Fibroblasts and Epithelial Cells. *Journal of Virology*, 91(13), e01650-16. <https://doi.org/10.1128/JVI.01650-16>

Danger, R., Royer, P.-J., Reboulleau, D., Durand, E., Loy, J., Tissot, A., Lacoste, P., Roux, A., Reynaud-Gaubert, M., Gomez, C., Kessler, R., Mussot, S., Dromer, C., Brugière, O., Mornex, J.-F., Guillemain, R., Dahan, M., Knoop, C., Botturi, K., ... The COLT and SysCLAD Consortia. (2018). Blood Gene Expression Predicts Bronchiolitis Obliterans Syndrome. *Frontiers in Immunology*, 8, 1841. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.01841>

Dassa, L., Seidel, E., Oiknine-Djian, E., Yamin, R., Wolf, D. G., Le-Trilling, V. T. K., & Mandelboim, O. (2018). The Human Cytomegalovirus Protein UL148A Downregulates the NK Cell-Activating Ligand MICA To Avoid NK Cell Attack. *Journal of Virology*, 92(17), e00162-18. <https://doi.org/10.1128/JVI.00162-18>

Davey, M. S., Willcox, C. R., Joyce, S. P., Ladell, K., Kasatskaya, S. A., McLaren, J. E.,

Hunter, S., Salim, M., Mohammed, F., Price, D. A., Chudakov, D. M., & Willcox, B. E. (2017). Clonal selection in the human V δ 1 T cell repertoire indicates $\gamma\delta$ TCR-dependent adaptive immune surveillance. *Nature Communications*, 8(1), 14760. <https://doi.org/10.1038/ncomms14760>

Davis, M. G., Kenney, S. C., Kamine, J., Pagano, J. S., & Huang, E. S. (1987). Immediate-early gene region of human cytomegalovirus trans-activates the promoter of human immunodeficiency virus. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 84(23), 8642-8646. <https://doi.org/10.1073/pnas.84.23.8642>

Davison, A. J., & Bhella, D. (2007). Comparative genome and virion structure. In A. Arvin, G. Campadelli-Fiume, E. Mocarski, P. S. Moore, B. Roizman, R. Whitley, & K. Yamanishi (Éds.), *Human Herpesviruses: Biology, Therapy, and Immunoprophylaxis*. Cambridge University Press. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK47392/>

Davison, A. J., Dolan, A., Akter, P., Addison, C., Dargan, D. J., Alcendor, D. J., McGeoch, D. J., & Hayward, G. S. (2003). The human cytomegalovirus genome revisited : Comparison with the chimpanzee cytomegalovirus genome. *Journal of General Virology*, 84(4), 1053-1053. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-84-4-1053>

Day, C. L., Kaufmann, D. E., Kiepiela, P., Brown, J. A., Moodley, E. S., Reddy, S., Mackey, E. W., Miller, J. D., Leslie, A. J., DePierres, C., Mncube, Z., Duraiswamy, J., Zhu, B., Eichbaum, Q., Altfeld, M., Wherry, E. J., Coovadia, H. M., Goulder, P. J. R., Klenerman, P., ... Walker, B. D. (2006). PD-1 expression on HIV-specific T cells is associated with T-cell exhaustion and disease progression. *Nature*, 443(7109), 350-354. <https://doi.org/10.1038/nature05115>

Day, E. K., Carmichael, A. J., ten Berge, I. J. M., Waller, E. C. P., Sissons, J. G. P., & Wills, M. R. (2007). Rapid CD8+ T Cell Repertoire Focusing and Selection of High-Affinity Clones into Memory Following Primary Infection with a Persistent Human Virus : Human Cytomegalovirus. *The Journal of Immunology*, 179(5), 3203-3213. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.179.5.3203>

Déchanet, J., Merville, P., Berge, F., Bone-Mane, G., Taupin, J.-L., Michel, P., Joly, P., Bonneville, M., Potaux, L., & Moreau, J.-F. (1999). Major Expansion of $\gamma\delta$ T Lymphocytes following Cytomegalovirus Infection in Kidney Allograft Recipients. *The Journal of Infectious Diseases*, 8. (a)

Déchanet, J., Merville, P., Lim, A., Retière, C., Pitard, V., Lafarge, X., Michelson, S., Méric, C., Hallet, M.-M., Kourilsky, P., Potaux, L., Bonneville, M., & Moreau, J.-F. (1999). Implication of $\gamma\delta$ T cells in the human immune response to cytomegalovirus. *Journal of Clinical Investigation*, 103(10), 1437-1449. <https://doi.org/10.1172/JCI5409> (b)

Del Fante, C., Scudeller, L., Oggionni, T., Viarengo, G., Cemmi, F., Morosini, M., Cascina, A., Meloni, F., & Perotti, C. (2015). Long-Term Off-Line Extracorporeal Photochemotherapy in Patients with Chronic Lung Allograft Rejection Not Responsive to Conventional Treatment : A 10-Year Single-Centre Analysis. *Respiration*, 90(2), 118-128. <https://doi.org/10.1159/000431382>

Della Chiesa, M., Falco, M., Bertaina, A., Muccio, L., Alicata, C., Frassoni, 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 α - β Umbilical Cord Blood. *The Journal of Immunology*, 192(4), 1471-1479. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1302053>

Derré, L., Corvaisier, M., Charreau, B., Moreau, A., Godefroy, E., Moreau-Aubry, A., Jotereau, F., & Gervois, N. (2006). Expression and Release of HLA-E by Melanoma Cells and Melanocytes : Potential Impact on the Response of Cytotoxic Effector Cells. *The Journal of Immunology*, 177(5), 3100-3107. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.177.5.3100>

de Villartay, J.-P. (2005). A novel immunodeficiency associated with hypomorphic RAG1 mutations and CMV infection. *Journal of Clinical Investigation*, 115(11), 3291-3299. <https://doi.org/10.1172/JCI25178>

Dioverti, M. V., Lahr, B. D., Germer, J. J., Yao, J. D., Gartner, M. L., & Razonable, R. R. (2017). Comparison of Standardized Cytomegalovirus (CMV) Viral Load Thresholds in Whole Blood and Plasma of Solid Organ and Hematopoietic Stem Cell Transplant Recipients with CMV Infection and Disease. *Open Forum Infectious Diseases*, 4(3). <https://doi.org/10.1093/ofid/ofx143>

Dock, J. N., & Effros, R. B. (2011). Role of CD8 T Cell Replicative Senescence in Human Aging and in HIV-mediated Immunosenescence. *Aging and Disease*, 2(5), 16.

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., Griffiths, P. D., Sinzger, C., McSharry, B. P., Wilkinson, G. W. G., & Davison, A. J. (2004). Genetic content of wild-type human cytomegalovirus. *Journal of General Virology*, 85(5), 1301-1312. <https://doi.org/10.1099/vir.0.79888-0>

D'Orsogna, L., van den Heuvel, H., van Kooten, C., Heidt, S., & Claas, F. H. J. (2017). Infectious pathogens may trigger specific allo-HLA reactivity via multiple mechanisms. *Immunogenetics*, 69(8-9), 631-641. <https://doi.org/10.1007/s00251-017-0989-3>

Duncan, S. R., Paradis, I. L., Yousem, S. A., Similo, S. L., Grgurich, W. F., Williams, P. A., Dauber, J. H., & Griffith, B. P. (1992). Sequelae of Cytomegalovirus Pulmonary Infections in Lung Allograft Recipients. *American Review of Respiratory Disease*, 146(6), 1419-1425. <https://doi.org/10.1164/ajrccm/146.6.1419>

Dunn, C., Chalupny, N. J., Sutherland, C. L., Dosch, S., Sivakumar, P. V., Johnson, D. C., & Cosman, D. (2003). Human Cytomegalovirus Glycoprotein UL16 Causes Intracellular Sequestration of NKG2D Ligands, Protecting Against Natural Killer Cell Cytotoxicity. *Journal of Experimental Medicine*, 197(11), 1427-1439. <https://doi.org/10.1084/jem.20022059> (b)

Dunn, W., Chou, C., Li, H., Hai, R., Patterson, D., Stolc, V., Zhu, H., & Liu, F. (2003). Functional profiling of a human cytomegalovirus genome. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100(24), 14223-14228. <https://doi.org/10.1073/pnas.2334032100> (a)

Durand, C. M., Marr, K. A., Arnold, C. A., Tang, L., Durand, D. J., Avery, R. K., Valsamakis, A., & Neofytos, D. (2013). Detection of Cytomegalovirus DNA in Plasma as an Adjunct Diagnostic for Gastrointestinal Tract Disease in Kidney and Liver Transplant Recipients. *Clinical Infectious Diseases*, 57(11), 1550-1559. <https://doi.org/10.1093/cid/cit521>

Dzabic, M., Rahbar, A., Yaiw, K.-C., Naghibi, M., Religa, P., Fellstrom, B., Larsson, E., & Soderberg-Naucleer, C. (2011). Intra-graft Cytomegalovirus Protein Expression Is Associated With Reduced Renal Allograft Survival. *Clinical Infectious Diseases*, 53(10), 969-976. <https://doi.org/10.1093/cid/cir619>

Egli, A., Humar, A., & Kumar, D. (2012). State-of-the-Art Monitoring of Cytomegalovirus-Specific Cell-Mediated Immunity After Organ Transplant : A Primer for the Clinician. *Clinical Infectious Diseases*, 55(12), 1678-1689. <https://doi.org/10.1093/cid/cis818>

Ehl, S. (2005). A variant of SCID with specific immune responses and predominance of T cells. *Journal of Clinical Investigation*, 115(11), 3140-3148. <https://doi.org/10.1172/JCI25221>

Eid, A. J., Arthurs, S. K., Deziel, P. J., Wilhelm, M. P., & Razonable, R. R. (2010). Clinical Predictors of Relapse after Treatment of Primary Gastrointestinal Cytomegalovirus Disease in Solid Organ Transplant Recipients : Predictors of Relapse of GI CMV Disease after SOT. *American Journal of Transplantation*, 10(1), 157-161. <https://doi.org/10.1111/j.1600-6143.2009.02861.x>

El Chaer, F., Shah, D. P., & Chemaly, R. F. (2016). How I treat resistant cytomegalovirus infection in hematopoietic cell transplantation recipients. *Blood*, 128(23), 2624-2636. <https://doi.org/10.1182/blood-2016-06-688432>

Elkington, R., Walker, S., Crough, T., Menzies, M., Tellam, J., Bharadwaj, M., & Khanna, R. (2003). Ex Vivo Profiling of CD8 α -T-Cell Responses to Human Cytomegalovirus Reveals Broad and Multispecific Reactivities in Healthy Virus Carriers. *Journal of Virology*, 77, 15.

Emery, V. C., Sabin, C. A., Cope, A. V., Gor, D., Hassan-Walker, A. F., & Griffiths, P. D. (2000). Application of viral-load kinetics to identify patients who develop cytomegalovirus disease after transplantation. *The Lancet*, 355(9220), 2032-2036. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(00\)02350-3](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(00)02350-3)

Fahnestock, M. L., Johnson, J. L., Renny Feldman, R. M., Neveu, J. M., Lane, W. S., & J. Bjorkman, P. (1995). The MHC class I homolog encoded by human cytomegalovirus binds endogenous peptides. *Immunity*, 3(5), 583-590. [https://doi.org/10.1016/1074-7613\(95\)90129-9](https://doi.org/10.1016/1074-7613(95)90129-9)

Farber, D. L., Yudanin, N. A., & Restifo, N. P. (2014). Human memory T cells : Generation, compartmentalization and homeostasis. *Nature Reviews Immunology*, 14(1), 24-35. <https://doi.org/10.1038/nri3567>

Felício, L. P., Porto, I. O. P., Mendes-Junior, C. T., Veiga-Castelli, L. C., Santos, K. E., Vianello-Brondani, R. P., Sabbagh, A., Moreau, P., Donadi, E. A., & Castelli, E. C. (2014).

Worldwide HLA-E nucleotide and haplotype variability reveals a conserved gene for coding and 3' untranslated regions : Worldwide HLA-E variability in coding and 3' UTR. *Tissue Antigens*, 83(2), 82-93. <https://doi.org/10.1111/tan.12283>

Fielding, C. A., Aicheler, R., Stanton, R. J., Wang, E. C. Y., Han, S., Seirafian, S., Davies, J., McSharry, B. P., Weekes, M. P., Antrobus, P. R., Prod'homme, V., Blanchet, F. P., Sugrue, D., Cuff, S., Roberts, D., Davison, A. J., Lehner, P. J., Wilkinson, G. W. G., & Tomasec, P. (2014). Two Novel Human Cytomegalovirus NK Cell Evasion Functions Target MICA for Lysosomal Degradation. *PLoS Pathogens*, 10(5), e1004058. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1004058>

Fielding, C. A., Weekes, M. P., Nobre, L. V., Ruckova, E., Wilkie, G. S., Paulo, J. A., Chang, C., Suárez, N. M., Davies, J. A., Antrobus, R., Stanton, R. J., Aicheler, R. J., Nichols, H., Vojtesek, B., Trowsdale, J., Davison, A. J., Gygi, S. P., Tomasec, P., Lehner, P. J., & Wilkinson, G. W. G. (2017). Control of immune ligands by members of a cytomegalovirus gene expansion suppresses natural killer cell activation. *ELife*, 6, e22206. <https://doi.org/10.7554/eLife.22206>

Fisher, C. E., Knudsen, J. L., Lease, E. D., Jerome, K. R., Rakita, R. M., Boeckh, M., & Limaye, A. P. (2017). Risk Factors and Outcomes of Ganciclovir-Resistant Cytomegalovirus Infection in Solid Organ Transplant Recipients. *Clinical Infectious Diseases*, 65(1), 57-63. <https://doi.org/10.1093/cid/cix259>

Foley, B., Cooley, S., Verneris, M. R., Pitt, M., Curtsinger, J., Luo, X., Lopez-Vergès, S., Lanier, L. L., Weisdorf, D., & Miller, J. S. (2012). Cytomegalovirus reactivation after allogeneic transplantation promotes a lasting increase in educated NKG2C⁺ natural killer cells with potent function. *Blood*, 119(11), 2665-2674. <https://doi.org/10.1182/blood-2011-10-386995>

Fornara, C., Lilleri, D., Revello, M. G., 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. *Journal of Clinical Immunology*, 31(6), 1054-1064. <https://doi.org/10.1007/s10875-011-9577-8>

Forte, E., Zhang, Z., Thorp, E. B., & Hummel, M. (2020). Cytomegalovirus Latency and Reactivation : An Intricate Interplay With the Host Immune Response. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 10. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2020.00130>

Fouts, A. E., Chan, P., Stephan, J.-P., Vandlen, R., & Feierbach, B. (2012). Antibodies against the gH/gL/UL128/UL130/UL131 Complex Comprise the Majority of the Anti-Cytomegalovirus (Anti-CMV) Neutralizing Antibody Response in CMV Hyperimmune Globulin. *Journal of Virology*, 86(13), 7444-7447. <https://doi.org/10.1128/JVI.00467-12>

Fowler, K. B., & Boppana, S. B. (2018). Congenital cytomegalovirus infection. *Seminars in Perinatology*, 42(3), 149-154. <https://doi.org/10.1053/j.semperi.2018.02.002>

Frasca, D., Diaz, A., Romero, M., Landin, A. M., & Blomberg, B. B. (2015). Cytomegalovirus (CMV) seropositivity decreases B cell responses to the influenza vaccine. *Vaccine*, 33(12), 1433-1439. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2015.01.071>

Freeman, M. L., Lederman, M. M., & Gianella, S. (2016). Partners in Crime : The Role of CMV in Immune Dysregulation and Clinical Outcome During HIV Infection. *Current HIV/AIDS Reports*, 13(1), 10-19. <https://doi.org/10.1007/s11904-016-0297-9>

Fulkerson, H. L., Nogalski, M. T., Collins-McMillen, D., & Yurochko, A. D. (2021). Overview of Human Cytomegalovirus Pathogenesis. In A. D. Yurochko (Éd.), *Human Cytomegaloviruses* (Vol. 2244, p. 1-18). Springer US. https://doi.org/10.1007/978-1-0716-1111-1_1

Furman, M. H., Ploegh, H. L., & Tortorella, D. (2002). Membrane-specific, Host-derived Factors Are Required for US2- and US11-mediated Degradation of Major Histocompatibility Complex Class I Molecules. *Journal of Biological Chemistry*, 277(5), 3258-3267. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109765200>

Furukawa, T., Hornberger, E., Sakuma, S., & Plotkin, S. A. (1975). Demonstration of immunoglobulin G receptors induced by human cytomegalovirus. *Journal of Clinical Microbiology*, 2(4), 332-336. <https://doi.org/10.1128/jcm.2.4.332-336.1975>

Gabaev, I., Elbasani, E., Ameres, S., Steinbrück, L., Stanton, R., Döring, M., Lenac Rovis, T., Kalinke, U., Jonjic, S., Moosmann, A., & Messerle, M. (2014). Expression of the Human Cytomegalovirus UL11 Glycoprotein in Viral Infection and Evaluation of Its Effect on Virus-Specific CD8 T Cells. *Journal of Virology*, 88(24), 14326-14339. <https://doi.org/10.1128/JVI.01691-14>

Gabaev, I., Steinbrück, L., Pokoyski, C., Pich, A., Stanton, R. J., Schwinzer, R., Schulz, T. F., Jacobs, R., Messerle, M., & Kay-Fedorov, P. C. (2011). The human cytomegalovirus UL11 protein interacts with the receptor tyrosine phosphatase CD45, resulting in functional paralysis of T cells. *PLoS Pathogens*, 7(12), e1002432. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002432>

Gaballa, A., Alagrafi, F., Uhlin, M., & Stikvoort, A. (2021). Revisiting the Role of $\gamma\delta$ T Cells in Anti-CMV Immune Response after Transplantation. *Viruses*, 13(6), 1031. <https://doi.org/10.3390/v13061031>

Gallant, J. E., Moore, R. D., Richman, D. D., Keruly, J., Chaisson, R. E., & Zidovudine Epidemiology Study Group. (1992). Incidence and Natural History of Cytomegalovirus Disease in Patients with Advanced Human Immunodeficiency Virus Disease Treated with Zidovudine. *Journal of Infectious Diseases*, 166(6), 1223-1227. <https://doi.org/10.1093/infdis/166.6.1223>

Gao, G. F., Tormo, J., Wyer, J. R., McMichael, A. J., Stuart, D. I., Bell, J. I., Jones, E. Y., & Jakobsen, B. K. (1997). Crystal structure of the complex between human CD8 $\alpha\alpha$ and HLA-A2. *Nature*, 387, 5.

Garrigue, I., Corte, M. F.-D., Magnin, N., Recordon-Pinson, P., Couzi, L., Lebrette, M.-E., Schrive, M.-H., Roncin, L., Taupin, J.-L., Déchanet-Merville, J., Fleury, H., & Lafon, M.-E. (2008). UL40 Human Cytomegalovirus Variability Evolution Patterns Over Time in Renal Transplant Recipients. *Transplantation*, 86(6), 826-835. <https://doi.org/10.1097/TP.0b013e3181859edd>

Genini, E., Percivalle, E., Sarasini, A., Revello, M. G., Baldanti, F., & Gerna, G. (2011). Serum antibody response to the gH/gL/pUL128–131 five-protein complex of human cytomegalovirus (HCMV) in primary and reactivated HCMV infections. *Journal of Clinical Virology*, 52(2), 113-118. <https://doi.org/10.1016/j.jcv.2011.06.018>

George, M. J., Snyderman, D. R., Werner, B. G., Griffith, J., Falagas, M. E., Dougherty, N. N., & Rubin, R. H. (1997). The Independent Role of Cytomegalovirus as a Risk Factor for Invasive Fungal Disease in Orthotopic Liver Transplant Recipients. *The American Journal of Medicine*, 103(2), 106-113. [https://doi.org/10.1016/S0002-9343\(97\)80021-6](https://doi.org/10.1016/S0002-9343(97)80021-6)

Geraghty, D. E., Stockscheider, M., Ishitani, A., & Hansen, J. A. (1992). Polymorphism at the HLA-E locus predates most HLA-A and -B polymorphism. *Human Immunology*, 33(3), 174-184. [https://doi.org/10.1016/0198-8859\(92\)90069-Y](https://doi.org/10.1016/0198-8859(92)90069-Y)

Gerna, G., Lilleri, D., Fornara, C., Comolli, G., Lozza, L., Campana, C., Pellegrini, C., Meloni, F., & Rampino, T. (2006). Monitoring of Human Cytomegalovirus-Specific CD4+ and CD8+ T-Cell Immunity in Patients Receiving Solid Organ Transplantation. *American Journal of Transplantation*, 6(10), 2356-2364. <https://doi.org/10.1111/j.1600-6143.2006.01488.x>

Gerna, Kabanova, & Lilleri. (2019). Human Cytomegalovirus Cell Tropism and Host Cell Receptors. *Vaccines*, 7(3), 70. <https://doi.org/10.3390/vaccines7030070>

Gewurz, B. E., Gaudet, R., Tortorella, D., Wang, E. W., Ploegh, H. L., & Wiley, D. C. (2001). Antigen presentation subverted : Structure of the human cytomegalovirus protein US2 bound to the class I molecule HLA-A2. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 98(12), 6794-6799. <https://doi.org/10.1073/pnas.121172898>

Gibson, L., Piccinini, G., Lilleri, D., Revello, M. G., Wang, Z., Markel, S., Diamond, D. J., & Luzuriaga, K. (2004). Human Cytomegalovirus Proteins pp65 and Immediate Early Protein 1 Are Common Targets for CD8+ T Cell Responses in Children with Congenital or Postnatal Human Cytomegalovirus Infection. *The Journal of Immunology*, 172(4), 2256-2264. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.172.4.2256>

Gilbert, M. J., Riddell, S. R., Plachter, B., & Greenberg, P. D. (1996). Cytomegalovirus selectively blocks antigen processing and presentation of its immediate–early gene product. *Nature*, 383(6602), 720-722. <https://doi.org/10.1038/383720a0>

Grant, E. J., Nguyen, A. T., Lobos, C. A., Szeto, C., Chatzileontiadou, D. S. M., & Gras, S. (2020). The unconventional role of HLA-E : The road less traveled. *Molecular Immunology*, 120, 101-112. <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2020.02.011>

Gretch, D. R., Gehrz, R. C., & Stinski, M. F. (1988). Characterization of a Human Cytomegalovirus Glycoprotein Complex (gcl). *Journal of General Virology*, 69(6), 1205-1215. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-69-6-1205>

Griffiths, P. (2006). CMV as a cofactor enhancing progression of AIDS. *Journal of Clinical Virology*, 35(4), 489-492. <https://doi.org/10.1016/j.jcv.2005.10.016>

Griffiths, P. D., Stanton, A., McCarrell, E., Smith, C., Osman, M., Harber, M., Davenport, A., Jones, G., Wheeler, D. C., O'Beirne, J., Thorburn, D., Patch, D., Atkinson, C. E., Pichon, S., Sweny, P., Lanzman, M., Woodford, E., Rothwell, E., Old, N., ... Burroughs, A. K. (2011). Cytomegalovirus glycoprotein-B vaccine with MF59 adjuvant in transplant recipients : A phase 2 randomised placebo-controlled trial. *The Lancet*, 377(9773), 1256-1263. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(11\)60136-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(11)60136-0)

Griffiths, P., & Reeves, M. (2021). Pathogenesis of human cytomegalovirus in the immunocompromised host. *Nature Reviews Microbiology*, 19(12), 759-773. <https://doi.org/10.1038/s41579-021-00582-z>

Grimsley, C., Kawasaki, A., Gassner, C., Sageshima, N., Nose, Y., Hatake, K., Geraghty, D. E., & Ishitani, A. (2002). Definitive high resolution typing of HLA-E allelic polymorphisms : Identifying potential errors in existing allele data: Grimsley et al : HLA-E PCR-SSP typing. *Tissue Antigens*, 60(3), 206-212. <https://doi.org/10.1034/j.1399-0039.2002.600302.x>

Grimsley, C., & Ober, C. (1997). Population genetic studies of HLA-E. *Human Immunology*, 52(1), 33-40. [https://doi.org/10.1016/S0198-8859\(96\)00241-8](https://doi.org/10.1016/S0198-8859(96)00241-8)

Grob, J. P., Prentice, H. G., Hoffbrand, A. V., Tate, T., Grundy, J. E., Griffiths, P. D., Hughes, M. D., Wimperis, J. Z., & Brenner, M. K. (1987). IMMUNE DONORS CAN PROTECT MARROW-TRANSPLANT RECIPIENTS FROM SEVERE CYTOMEGALOVIRUS INFECTIONS. *The Lancet*, 329(8536), 774-776. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(87\)92800-5](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(87)92800-5)

Gruffat, H., Marchione, R., & Manet, E. (2016). Herpesvirus Late Gene Expression : A Viral-Specific Pre-initiation Complex Is Key. *Frontiers in Microbiology*, 7. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00869>

Grundy, E., Super, M., Sweny, P., & Lui, S. F. (1988). SYMPTOMATIC CYTOMEGALOVIRUS INFECTION IN SEROPOSITIVE KIDNEY RECIPIENTS: REINFECTION WITH DONOR VIRUS RATHER THAN REACTIVATION OF RECIPIENT VIRUS. *The Lancet*, 4.

Guberina, H., da Silva Nardi, F., Michita, R. T., Dolff, S., Bienholz, A., Heinemann, F. M., Wilde, B., Trilling, M., Horn, P. A., Kribben, A., Witzke, O., & Rebmann, V. (2018). Susceptibility of HLA-E*01:03 Allele Carriers to Develop Cytomegalovirus Replication After Living-Donor Kidney Transplantation. *The Journal of Infectious Diseases*, 217(12), 1918-1922. <https://doi.org/10.1093/infdis/jix638>

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(12), 3664-3671. <https://doi.org/10.1182/blood-2004-05-2058>

Gunsar, F. (2003). Late hepatic artery thrombosis after orthotopic liver transplantation. *Liver Transplantation*, 9(6), 605-611. <https://doi.org/10.1053/jlts.2003.50057>

Hakimi, Z., Aballéa, S., Ferchichi, S., Scharn, M., Odeyemi, I. A., Toumi, M., & Saliba, F. (2017). Burden of cytomegalovirus disease in solid organ transplant recipients : A national matched cohort study in an inpatient setting. *Transplant Infectious Disease*, 19(5), e12732.

<https://doi.org/10.1111/tid.12732>

Halary, F., Pitard, V., Dlubek, D., Krzysiek, R., de la Salle, H., Merville, P., Dromer, C., Emilie, D., Moreau, J.-F., & Déchanet-Merville, J. (2005). Shared reactivity of V δ 2neg $\gamma\delta$ T cells against cytomegalovirus-infected cells and tumor intestinal epithelial cells. *Journal of Experimental Medicine*, 201(10), 1567-1578. <https://doi.org/10.1084/jem.20041851>

Hammer, Q., & Romagnani, C. (2017). About Training and Memory. In *Advances in Immunology* (Vol. 133, p. 171-207). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/bs.ai.2016.10.001>

Hammer, Q., Rückert, T., Borst, E. M., Dunst, J., Haubner, A., Durek, P., Heinrich, F., Gasparoni, G., Babic, M., Tomic, A., Pietra, G., Nienen, M., Blau, I. W., Hofmann, J., Na, I.-K., Prinz, I., Koenecke, C., Hemmati, P., Babel, N., ... Romagnani, C. (2018). Peptide-specific recognition of human cytomegalovirus strains controls adaptive natural killer cells. *Nature Immunology*, 19(5), 453-463. <https://doi.org/10.1038/s41590-018-0082-6>

Hantz, S., Garnier-Geoffroy, F., Mazon, M.-C., Garrigue, I., Merville, P., Mengelle, C., Rostaing, L., Saint Marcoux, F., Essig, M., Rerolle, J.-P., Cotin, S., Germi, R., Pillet, S., Lebranchu, Y., Turlure, P., Alain, S., on behalf of the French CMV Resistance Survey Study Group, Herbein, G., Coquette, A., ... Ribaud, P. (2010). Drug-resistant cytomegalovirus in transplant recipients : A French cohort study. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 65(12), 2628-2640. <https://doi.org/10.1093/jac/dkq368>

Harpur, C. M., Stankovic, S., Kanagarajah, A., Widjaja, J. M. L., Levvey, B. J., Cristiano, Y., Snell, G. I., Brooks, A. G., Westall, G. P., & Sullivan, L. C. (2019). Enrichment of Cytomegalovirus-induced NKG2C⁺ Natural Killer Cells in the Lung Allograft. *Transplantation*, 103(8), 1689-1699. <https://doi.org/10.1097/TP.0000000000002545>

Heatley, S. L., Pietra, G., Lin, J., Widjaja, J. M. L., Harpur, C. M., Lester, S., Rossjohn, J., Szer, J., Schwarzer, A., Bradstock, K., Bardy, P. G., Mingari, M. C., Moretta, L., Sullivan, L. C., & Brooks, A. G. (2013). Polymorphism in Human Cytomegalovirus UL40 Impacts on Recognition of Human Leukocyte Antigen-E (HLA-E) by Natural Killer Cells. *Journal of Biological Chemistry*, 288(12), 8679-8690. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.409672>

Hertoghs, K. M. L., Moerland, P. D., van Stijn, A., Remmerswaal, E. B. M., Yong, S. L., van de Berg, P. J. E. J., van Ham, S. M., Baas, F., ten Berge, I. J. M., & van Lier, R. A. W. (2010). Molecular profiling of cytomegalovirus-induced human CD8⁺ T cell differentiation. *Journal of Clinical Investigation*, 120(11), 4077-4090. <https://doi.org/10.1172/JCI42758>

Heutinck, K. M., Yong, S. L., Tonneijck, L., van den Heuvel, H., van der Weerd, N. C., van der Pant, K. A. M. I., Bemelman, F. J., Claas, F. H. J., & ten Berge, I. J. M. (2016). Virus-Specific CD8⁺ T Cells Cross-Reactive to Donor-Alloantigen Are Transiently Present in the Circulation of Kidney Transplant Recipients Infected With CMV and/or EBV. *American Journal of Transplantation*, 16(5), 1480-1491. <https://doi.org/10.1111/ajt.13618>

Hewitt, E. W. (2001). The human cytomegalovirus gene product US6 inhibits ATP binding by TAP. *The EMBO Journal*, 20(3), 387-396. <https://doi.org/10.1093/emboj/20.3.387>

Hoare, H. L., Sullivan, L. C., Pietra, G., Clements, C. S., Lee, E. J., Ely, L. K., Beddoe, T., Falco, M., Kjer-Nielsen, L., Reid, H. H., McCluskey, J., Moretta, L., Rossjohn, J., & Brooks, A. G. (2006). Structural basis for a major histocompatibility complex class Ib-restricted T cell response. *Nature Immunology*, 7(3), 256-264. <https://doi.org/10.1038/ni1312>

Hsu, J.-L., van den Boomen, D. J. H., Tomasec, P., Weekes, M. P., Antrobus, R., Stanton, R. J., Ruckova, E., Sugrue, D., Wilkie, G. S., Davison, A. J., Wilkinson, G. W. G., & Lehner, P. J. (2015). Plasma Membrane Profiling Defines an Expanded Class of Cell Surface Proteins Selectively Targeted for Degradation by HCMV US2 in Cooperation with UL141. *PLOS Pathogens*, 11(4), e1004811. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1004811>

Humar, A., Gregson, D., Caliendo, A. M., McGeer, A., Malkan, G., Krajden, M., Corey, P., Greig, P., Walmsley, S., Levy, G., & Mazzulli, T. (1999). CLINICAL UTILITY OF QUANTITATIVE CYTOMEGALOVIRUS VIRAL LOAD DETERMINATION FOR PREDICTING CYTOMEGALOVIRUS DISEASE IN LIVER TRANSPLANT RECIPIENTS1: *Transplantation*, 68(9), 1305-1311. <https://doi.org/10.1097/00007890-199911150-00015>

Humar, A., Lebranchu, Y., Vincenti, F., Blumberg, E. A., Punch, J. D., Limaye, A. P., Abramowicz, D., Jardine, A. G., Voulgari, A. T., Ives, J., Hauser, I. A., & Peeters, P. (2010). The Efficacy and Safety of 200 Days Valganciclovir Cytomegalovirus Prophylaxis in High-Risk Kidney Transplant Recipients. *American Journal of Transplantation*, 10(5), 1228-1237. <https://doi.org/10.1111/j.1600-6143.2010.03074.x>

Idziorek, T., Cazareth, J., Blanc, C., Jouy, N., Bourdely, P., & Corneau, A. (2018). Que la lumière soit. Et si ce n'était plus seulement vrai !: Évolution de la cytométrie : Du conventionnel à la masse (en passant par le spectre). *médecine/sciences*, 34(5), 439-447. <https://doi.org/10.1051/medsci/20183405017>

Isaacson, M. K., & Compton, T. (2009). Human Cytomegalovirus Glycoprotein B Is Required for Virus Entry and Cell-to-Cell Spread but Not for Virion Attachment, Assembly, or Egress. *Journal of Virology*, 83(8), 3891-3903. <https://doi.org/10.1128/JVI.01251-08>

Jackson, S. E., Sedikides, G. X., Mason, G. M., Okecha, G., & Wills, M. R. (2017). Human Cytomegalovirus (HCMV)-Specific CD4+ T Cells Are Polyfunctional and Can Respond to HCMV-Infected Dendritic Cells In Vitro. *Journal of Virology*, 91(6), e02128-16. <https://doi.org/10.1128/JVI.02128-16>

Jean Beltran, P. M., & Cristea, I. M. (2014). The life cycle and pathogenesis of human cytomegalovirus infection : Lessons from proteomics. *Expert Review of Proteomics*, 11(6), 697-711. <https://doi.org/10.1586/14789450.2014.971116>

Jouand, N., Bressollette-Bodin, C., Gérard, N., Giral, M., Guérif, P., Rodallec, A., Oger, R., Parrot, T., Allard, M., Cesbron-Gautier, A., Gervois, N., & Charreau, B. (2018). HCMV triggers frequent and persistent UL40-specific unconventional HLA-E-restricted CD8 T-cell responses with potential autologous and allogeneic peptide recognition. *PLOS Pathogens*, 14(4), e1007041. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1007041>

Kabani, N., & Ross, S. A. (2020). Congenital Cytomegalovirus Infection. *The Journal of*

Infectious Diseases, 221(Supplement_1), S9-S14. <https://doi.org/10.1093/infdis/jiz446>

Kacer, M., Kielberger, L., Bouda, M., & Reischig, T. (2015). Valganciclovir versus valgacyclovir prophylaxis for prevention of cytomegalovirus : An economic perspective. *Transplant Infectious Disease*, 17(3), 334-341. <https://doi.org/10.1111/tid.12383>

Kaiser, B. K., Pizarro, J. C., Kerns, J., & Strong, R. K. (2008). Structural basis for NKG2A/CD94 recognition of HLA-E. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(18), 6696-6701. <https://doi.org/10.1073/pnas.0802736105>

Kalejta, R. F. (2008). Tegument Proteins of Human Cytomegalovirus. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 72(2), 249-265. <https://doi.org/10.1128/MMBR.00040-07>

Kalejta, R. F., & Albright, E. R. (2020). Expanding the Known Functional Repertoire of the Human Cytomegalovirus pp71 Protein. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 10. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2020.00095>

Kaminski, H., Couzi, L., Déchanet-Merville, J., & Merville, P. (2015). Intérêt de l'immuno-surveillance dans l'infection à cytomégalo virus en transplantation rénale : Mise au point et perspectives. *Néphrologie & Thérapeutique*, 11(6), 465-473. <https://doi.org/10.1016/j.nephro.2015.03.005>

Kaminski, H., & Fishman, J. A. (2016). The Cell Biology of Cytomegalovirus : Implications for Transplantation. *American Journal of Transplantation*, 16(8), 2254-2269. <https://doi.org/10.1111/ajt.13791>

Kaminski, H., Garrigue, I., Couzi, L., Taton, B., Bachelet, T., Moreau, J.-F., Déchanet-Merville, J., Thiébaud, R., & Merville, P. (2016). Surveillance of $\gamma\delta$ T Cells Predicts Cytomegalovirus Infection Resolution in Kidney Transplants. *Journal of the American Society of Nephrology*, 27(2), 637-645. <https://doi.org/10.1681/ASN.2014100985>

Kanevskiy, L., Erokhina, S., Kobyzeva, P., Streltsova, M., Sapozhnikov, A., & Kovalenko, E. (2019). Dimorphism of HLA-E and its Disease Association. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(21), 5496. <https://doi.org/10.3390/ijms20215496>

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(6055), 675-678. <https://doi.org/10.1038/319675a0>

Kayawake, H., Tanaka, S., Yamada, Y., Yutaka, Y., Ohsumi, A., Nakajima, D., Hamaji, M., Nagao, M., & Date, H. (2022). Cytomegalovirus Infection After Lung Transplantation. *The Journal of Heart and Lung Transplantation*, 41(4), S395. <https://doi.org/10.1016/j.healun.2022.01.1553>

Khairallah, C., Déchanet-Merville, J., & Capone, M. (2017). $\gamma\delta$ T Cell-Mediated Immunity to Cytomegalovirus Infection. *Frontiers in Immunology*, 8. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.00105>

Kim, W. R., Badley, A. D., Wiesner, R. H., Porayko, M. K., Seaberg, E. C., Keating, M. R., Evans, R. W., Dickson, E. R., Krom, R. A. F., & Paya, C. V. (2000). THE ECONOMIC IMPACT OF CYTOMEGALOVIRUS INFECTION AFTER LIVER TRANSPLANTATION: *Transplantation*, 69(3), 357-361. <https://doi.org/10.1097/00007890-200002150-00008>

Kim, Y., Park, B., Cho, S., Shin, J., Cho, K., Jun, Y., & Ahn, K. (2008). Human Cytomegalovirus UL18 Utilizes US6 for Evading the NK and T-Cell Responses. *PLoS Pathogens*, 4(8), e1000123. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000123>

Kliem, V., Fricke, L., Wollbrink, T., Burg, M., Radermacher, J., & Rohde, F. (2008). Improvement in Long-Term Renal Graft Survival due to CMV Prophylaxis with Oral Ganciclovir : Results of a Randomized Clinical Trial. *American Journal of Transplantation*, 8(5), 975-983. <https://doi.org/10.1111/j.1600-6143.2007.02133.x>

Knapp, L. A., Cadavid, L. F., & Watkins, D. I. (1998). The MHC-E Locus Is the Most Well Conserved of All Known Primate Class I Histocompatibility Genes. *The Journal of Immunology*, 9.

Knight, A., Madrigal, A. J., Grace, S., Sivakumaran, J., Kottaridis, P., Mackinnon, S., Travers, P. J., & Lowdell, M. W. (2010). The role of Vδ2-negative γδ T cells during cytomegalovirus reactivation in recipients of allogeneic stem cell transplantation. *Blood*, 116(12), 2164-2172. <https://doi.org/10.1182/blood-2010-01-255166>

Koller, B. H., Geraghty, D. E., Shimizu, Y., & DeMars, R. (1988). HLA-E. A novel HLA class I gene expressed in resting T lymphocytes. *The Journal of Immunology*, 9.

Kotton, C. N., Kumar, D., Caliendo, A. M., Huprikar, S., Chou, S., Danziger-Isakov, L., & Humar, A. (2018). The Third International Consensus Guidelines on the Management of Cytomegalovirus in Solid-organ Transplantation. *Transplantation*, 102(6), 900-931. <https://doi.org/10.1097/TP.0000000000002191>

Kraemer, T., Celik, A. A., Huyton, T., Kunze-Schumacher, H., Blasczyk, R., & Bade-Döding, C. (2015). HLA-E : Presentation of a Broader Peptide Repertoire Impacts the Cellular Immune Response—Implications on HSCT Outcome. *Stem Cells International*, 2015, 1-12. <https://doi.org/10.1155/2015/346714>

Kuijpers, T. W., Vossen, M. T., Gent, M.-R., Davin, J.-C., Roos, M. T., Wertheim-van Dillen, P. M., Weel, J. F., Baars, P. A., & van Lier, R. A. (2003). Frequencies of Circulating Cytolytic, CD45RA+ CD27–, CD8+ T Lymphocytes Depend on Infection with CMV. *The Journal of Immunology*, 170(8), 4342-4348. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.170.8.4342>

Kumar, D., Chernenko, S., Moussa, G., Cobos, I., Manuel, O., Preiksaitis, J., Venkataraman, S., & Humar, A. (2009). Cell-Mediated Immunity to Predict Cytomegalovirus Disease in High-Risk Solid Organ Transplant Recipients. *American Journal of Transplantation*, 9(5), 1214-1222. <https://doi.org/10.1111/j.1600-6143.2009.02618.x>

La Rosa, C., Krishnan, A., Longmate, J., Martinez, J., Manchanda, P., Lacey, S. F., Limaye, A. P., & Diamond, D. J. (2008). Programmed Death–1 Expression in Liver Transplant Recipients

as a Prognostic Indicator of Cytomegalovirus Disease. *The Journal of Infectious Diseases*, 197(1), 25-33. <https://doi.org/10.1086/523652>

Lafarge, X., Merville, P., Cazin, M.-C., Berge, F., Potaux, L., Moreau, J.-F., & Dechanet-Merville, J. (2001). Cytomegalovirus Infection in Transplant Recipients Resolves When Circulating. *The Journal of Infectious Diseases*, 9.

Lampen, M. H., Hassan, C., Sluijter, M., Geluk, A., Dijkman, K., Tjon, J. M., de Ru, A. H., van der Burg, S. H., van Veelen, P. A., & van Hall, T. (2013). Alternative peptide repertoire of HLA-E reveals a binding motif that is strikingly similar to HLA-A2. *Molecular Immunology*, 53(1-2), 126-131. <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2012.07.009>

Lanier, L. L. (1998). NK CELL RECEPTORS. *Annual Review of Immunology*, 35.

Lanier, L. L. (2008). Up on the tightrope : Natural killer cell activation and inhibition. *Nature Immunology*, 9(5), 495-502. <https://doi.org/10.1038/ni1581>

Lee, J., Zhang, T., Hwang, I., Kim, A., Nitschke, L., Kim, M., Scott, J. M., Kamimura, Y., Lanier, L. L., & Kim, S. (2015). Epigenetic Modification and Antibody-Dependent Expansion of Memory-like NK Cells in Human Cytomegalovirus-Infected Individuals. *Immunity*, 42(3), 431-442. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2015.02.013>

Lee, J.-H., Lee, J. H., Lim, Y.-S., Yeon, J. E., Song, T.-J., Yu, S. J., Gwak, G.-Y., Kim, K. M., Kim, Y. J., Lee, J. W., & Yoon, J.-H. (2019). Sustained efficacy of adjuvant immunotherapy with cytokine-induced killer cells for hepatocellular carcinoma : An extended 5-year follow-up. *Cancer Immunology, Immunotherapy*, 68(1), 23-32. <https://doi.org/10.1007/s00262-018-2247-4>

Lee, N., Llano, M., Carretero, M., Ishitani, A., Navarro, F., López-Botet, M., & Geraghty, D. E. (1998). HLA-E is a major ligand for the natural killer inhibitory receptor CD94/NKG2A. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 95(9), 5199-5204. <https://doi.org/10.1073/pnas.95.9.5199>

Lee, S.-O., Hwang, S., Park, J., Park, B., Jin, B.-S., Lee, S., Kim, E., Cho, S., Kim, Y., Cho, K., Shin, J., & Ahn, K. (2005). Functional dissection of HCMV US11 in mediating the degradation of MHC class I molecules. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 330(4), 1262-1267. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2005.03.112>

Lehner, P. J., Karttunen, J. T., Wilkinson, G. W. G., & Cresswell, P. (1997). The human cytomegalovirus US6 glycoprotein inhibits transporter associated with antigen processing-dependent peptide translocation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 94(13), 6904-6909. <https://doi.org/10.1073/pnas.94.13.6904>

Lemberg, M. K., Bland, F. A., Weihofen, A., Braud, V. M., & Martoglio, B. (2001). Intramembrane Proteolysis of Signal Peptides : An Essential Step in the Generation of HLA-E Epitopes. *The Journal of Immunology*, 167(11), 6441-6446. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.167.11.6441>

Leruez-Ville, M., Foulon, I., Pass, R., & Ville, Y. (2020). Cytomegalovirus infection during pregnancy : State of the science. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 223(3), 330-349. <https://doi.org/10.1016/j.ajog.2020.02.018>

Leruez-Ville, M., Magny, J.-F., Couderc, S., Pichon, C., Parodi, M., Bussi res, L., Guilleminot, T., Ghout, I., & Ville, Y. (2017). Risk Factors for Congenital Cytomegalovirus Infection Following Primary and Nonprimary Maternal Infection. *Clinical Infectious Diseases*, 65(3), 398-404. <https://doi.org/10.1093/cid/cix337>

Lilley, B. N., & Ploegh, H. L. (2004). A membrane protein required for dislocation of misfolded proteins from the ER. *Nature*, 429(6994), 834-840. <https://doi.org/10.1038/nature02592>

Linares, L., Sanclemente, G., Cervera, C., Hoyo, I., Cof n, F., Ricart, M. J., Pérez-Villa, F., Navasa, M., Marcos, M. A., Ant n, A., Pumarola, T., & Moreno, A. (2011). Influence of Cytomegalovirus Disease in Outcome of Solid Organ Transplant Patients. *Transplantation Proceedings*, 43(6), 2145-2148. <https://doi.org/10.1016/j.transproceed.2011.05.007>

Lindau, P., Mukherjee, R., Gutschow, M. V., Vignali, M., Warren, E. H., Riddell, S. R., Makar, K. W., Turtle, C. J., & Robins, H. S. (2019). Cytomegalovirus Exposure in the Elderly Does Not Reduce CD8 T Cell Repertoire Diversity. *The Journal of Immunology*, 202(2), 476-483. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1800217>

Lisboa, L. F., Åsberg, A., Kumar, D., Pang, X., Hartmann, A., Preiksaitis, J. K., Pescovitz, M. D., Rollag, H., Jardine, A. G., & Humar, A. (2011). The Clinical Utility of Whole Blood Versus Plasma Cytomegalovirus Viral Load Assays for Monitoring Therapeutic Response. *Transplantation*, 91(2), 231-236. <https://doi.org/10.1097/TP.0b013e3181ff8719>

Liu, L. L., Landskron, J., Ask, E. H., Enqvist, M., Sohlberg, E., Traherne, J. A., Hammer, Q., Goodridge, J. P., Larsson, S., Jayaraman, J., Oei, V. Y. S., Schaffer, M., Task n, K., Ljunggren, H.-G., Romagnani, C., Trowsdale, J., Malmberg, K.-J., & Béziat, V. (2016). Critical Role of CD2 Co-stimulation in Adaptive Natural Killer Cell Responses Revealed in NKG2C-Deficient Humans. *Cell Reports*, 15(5), 1088-1099. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2016.04.005>

Ljungman, P., Boeckh, M., Hirsch, H. H., Josephson, F., Lundgren, J., Nichols, G., Pikis, A., Razonable, R. R., Miller, V., & Griffiths, P. D. (2017). Definitions of Cytomegalovirus Infection and Disease in Transplant Patients for Use in Clinical Trials : Table 1. *Clinical Infectious Diseases*, 64(1), 87-91. <https://doi.org/10.1093/cid/ciw668>

Llano, M., Gum , M., Ortega, M., Angulo, A., & López-Botet, M. (2003). Differential effects of US2, US6 and US11 human cytomegalovirus proteins on HLA class Ia and HLA-E expression : Impact on target susceptibility to NK cell subsets. *European Journal of Immunology*, 33(10), 2744-2754. <https://doi.org/10.1002/eji.200324182>

López-Botet, M., Muntasell, A., & Vilches, C. (2014). The CD94/NKG2C+ NK-cell subset on the edge of innate and adaptive immunity to human cytomegalovirus infection. *Seminars in Immunology*, 26(2), 145-151. <https://doi.org/10.1016/j.smim.2014.03.002>

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. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(36), 14725-14732. <https://doi.org/10.1073/pnas.1110900108>

Lowance, D., Neumayer, H.-H., Legendre, C. M., Squifflet, J.-P., Kovarik, J., Brennan, P. J., Norman, D., Mendez, R., Keating, M. R., Coggon, G. L., Crisp, A., & Lee, I. C. (1999). Valacyclovir for the Prevention of Cytomegalovirus Disease after Renal Transplantation. *New England Journal of Medicine*, 340(19), 1462-1470. <https://doi.org/10.1056/NEJM199905133401903>

Luah, Y. H., Sundar Raj, K., Koh, M. B. C., & Linn, Y. C. (2019). A novel simplified method of generating cytomegalovirus-specific cytokine-induced killer cells of high specificity and superior potency with GMP compliance. *Clinical Immunology*, 205, 83-92. <https://doi.org/10.1016/j.clim.2019.06.007>

Lurain, N. S., & Chou, S. (2010). Antiviral Drug Resistance of Human Cytomegalovirus. *Clinical Microbiology Reviews*, 23(4), 689-712. <https://doi.org/10.1128/CMR.00009-10>

Madalosso, C., de Souza, N. F., Ilstrup, D. M., Wiesner, R. H., & Krom, R. A. F. (1998). CYTOMEGALOVIRUS AND ITS ASSOCIATION WITH HEPATIC ARTERY THROMBOSIS AFTER LIVER TRANSPLANTATION: *Transplantation*, 66(3), 294-297. <https://doi.org/10.1097/00007890-199808150-00003>

Maier, S., Grzeschik, M., Weiss, E. H., & Ulbrecht, M. (2000). Implications of HLA-E allele expression and different HLA-E ligand diversity for the regulation of NK cells. *Human Immunology*, 61(11), 1059-1065. [https://doi.org/10.1016/S0198-8859\(00\)00190-7](https://doi.org/10.1016/S0198-8859(00)00190-7)

Manieri, N. A., Chiang, E. Y., & Grogan, J. L. (2017). TIGIT : A Key Inhibitor of the Cancer Immunity Cycle. *Trends in Immunology*, 38(1), 20-28. <https://doi.org/10.1016/j.it.2016.10.002>

Manuel, O., Husain, S., Kumar, D., Zayas, C., Mawhorter, S., Levi, M. E., Kalpoe, J., Lisboa, L., Ely, L., Kaul, D. R., Schwartz, B. S., Morris, M. I., Ison, M. G., Yen-Lieberman, B., Sebastian, A., Assi, M., & Humar, A. (2013). Assessment of Cytomegalovirus-Specific Cell-Mediated Immunity for the Prediction of Cytomegalovirus Disease in High-Risk Solid-Organ Transplant Recipients : A Multicenter Cohort Study. *Clinical Infectious Diseases*, 56(6), 817-824. <https://doi.org/10.1093/cid/cis993>

Marlin, R., Pappalardo, A., Kaminski, H., Willcox, C. R., Pitard, V., Netzer, S., Khairallah, C., Lomenech, A.-M., Harly, C., Bonneville, M., Moreau, J.-F., Scotet, E., Willcox, B. E., Faustin, B., & Déchanet-Merville, J. (2017). Sensing of cell stress by human $\gamma\delta$ TCR-dependent recognition of annexin A2. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 114(12), 3163-3168. <https://doi.org/10.1073/pnas.1621052114>

Marty, F. M., Ljungman, P., Chemaly, R. F., Maertens, J., Dadwal, S. S., Duarte, R. F., Haider, S., Ullmann, A. J., Katayama, Y., Brown, J., Mullane, K. M., Boeckh, M., Blumberg, E. A., Einsele, H., Snyderman, D. R., Kanda, Y., DiNubile, M. J., Teal, V. L., Wan, H., ... Badshah, C. (2017).

Lettermovir Prophylaxis for Cytomegalovirus in Hematopoietic-Cell Transplantation. *New England Journal of Medicine*, 377(25), 2433-2444. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1706640>

Mason, G. M., Jackson, S., Okecha, G., Poole, E., Sissons, J. G. P., Sinclair, J., & Wills, M. R. (2013). Human Cytomegalovirus Latency-Associated Proteins Elicit Immune-Suppressive IL-10 Producing CD4+ T Cells. *PLoS Pathogens*, 9(10), e1003635. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003635>

Mason, G. M., Poole, E., Sissons, J. G. P., Wills, M. R., & Sinclair, J. H. (2012). Human cytomegalovirus latency alters the cellular secretome, inducing cluster of differentiation (CD)4+ T-cell migration and suppression of effector function. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(36), 14538-14543. <https://doi.org/10.1073/pnas.1204836109>

Mattes, F. M., Hainsworth, E. G., Hassan-Walker, A. F., Burroughs, A. K., Sweny, P., Griffiths, P. D., & Emery, V. C. (2005). Kinetics of Cytomegalovirus Load Decrease in Solid-Organ Transplant Recipients after Preemptive Therapy with Valganciclovir. *The Journal of Infectious Diseases*, 191(1), 89-92. <https://doi.org/10.1086/425905>

Mazzarino, P., Pietra, G., Vacca, P., Falco, M., Colau, D., Coulie, P., Moretta, L., & Mingari, M. C. (2005). Identification of effector-memory CMV-specific T lymphocytes that kill CMV-infected target cells in an HLA-E-restricted fashion. *European Journal of Immunology*, 35(11), 3240-3247. <https://doi.org/10.1002/eji.200535343>

Mccarthy, J. M., Karim, M. A., Krueger, H., & Keown, P. A. (1993). THE COST IMPACT OF CYTOMEGALOVIRUS DISEASE IN RENAL TRANSPLANT RECIPIENTS: *Transplantation*, 55(6), 1277-1282. <https://doi.org/10.1097/00007890-199306000-00013>

McKeating, J. A., Griffiths, P. D., & Weiss, R. A. (1990). HIV susceptibility conferred to human fibroblasts by cytomegalovirus-induced Fe receptor. *Nature*, 343, 3.

McLaughlin-Taylor, E., Pande, H., Forman, S. J., Tanamachi, B., Li, C.-R., Zaia, J. A., Greenberg, P. D., & Riddell, S. R. (1994). Identification of the major late human cytomegalovirus matrix protein pp65 as a target antigen for CD8+ virus-specific cytotoxic T lymphocytes. *Journal of Medical Virology*, 43(1), 103-110. <https://doi.org/10.1002/jmv.1890430119>

Meyer, K. C., Raghu, G., Verleden, G. M., Corris, P. A., Aurora, P., Wilson, K. C., Brozek, J., Glanville, A. R., & the ISHLT/ATS/ERS BOS Task Force Committee. (2014). An international ISHLT/ATS/ERS clinical practice guideline: Diagnosis and management of bronchiolitis obliterans syndrome. *European Respiratory Journal*, 44(6), 1479-1503. <https://doi.org/10.1183/09031936.00107514>

Michaëlsson, J., Teixeira de Matos, C., Achour, A., Lanier, L. L., Kärre, K., & Söderström, K. (2002). A Signal Peptide Derived from hsp60 Binds HLA-E and Interferes with CD94/NKG2A Recognition. *Journal of Experimental Medicine*, 196(11), 1403-1414. <https://doi.org/10.1084/jem.20020797>

Miconnet, I., Marrau, A., Farina, A., Taffé, P., Vigano, S., Harari, A., & Pantaleo, G.

(2011). Large TCR Diversity of Virus-Specific CD8 T Cells Provides the Mechanistic Basis for Massive TCR Renewal after Antigen Exposure. *The Journal of Immunology*, 186(12), 7039-7049. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1003309>

Miller, M. S., & Hertel, L. (2009). Onset of Human Cytomegalovirus Replication in Fibroblasts Requires the Presence of an Intact Vimentin Cytoskeleton. *Journal of Virology*, 83(14), 7015-7028. <https://doi.org/10.1128/JVI.00398-09>

Mingari, M. C., Schiavetti, F., Ponte, M., Vitale, C., Maggi, E., Romagnani, S., Demarest, J., Pantaleo, G., Fauci, A. S., & Moretta, L. (1996). Human CD8+ T lymphocyte subsets that express HLA class I-specific inhibitory receptors represent oligoclonally or monoclonally expanded cell populations. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 93(22), 12433-12438. <https://doi.org/10.1073/pnas.93.22.12433>

Miranda, B. L. M., Gelmini, G. F., Risti, M., Hauer, V., da Silva, J. S., Roxo, V. M. M. S., Bicalho, M. da G., & Malheiros, D. (2020). HLA-E genotyping and its relevance in kidney transplantation outcome. *HLA*, 95(5), 457-464. <https://doi.org/10.1111/tan.13806>

Müller, S., Zocher, G., Steinle, A., & Stehle, T. (2010). Structure of the HCMV UL16-MICB Complex Elucidates Select Binding of a Viral Immuno-evasin to Diverse NKG2D Ligands. *PLoS Pathogens*, 6(1), e1000723. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000723>

Munoz-Price, L. S., Slifkin, M., Ruthazer, R., Poutsika, D. D., Hadley, S., Freeman, R., Rohrer, R., Angelis, M., Cooper, J., Fairchild, R., Barefoot, L., Bloom, J., Fitzmaurice, S., & Snyderman, D. R. (2004). The Clinical Impact of Ganciclovir Prophylaxis on the Occurrence of Bacteremia in Orthotopic Liver Transplant Recipients. *Clinical Infectious Diseases*, 39(9), 1293-1299. <https://doi.org/10.1086/425002>

Munting, A., & Manuel, O. (2021). Viral infections in lung transplantation. *Journal of Thoracic Disease*, 13(11), 6673-6694. <https://doi.org/10.21037/jtd-2021-24>

Murphy, E., Yu, D., Grimwood, J., Schmutz, J., Dickson, M., Jarvis, M. A., Hahn, G., Nelson, J. A., Myers, R. M., & Shenk, T. E. (2003). Coding potential of laboratory and clinical strains of human cytomegalovirus. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100(25), 14976-14981. <https://doi.org/10.1073/pnas.2136652100>

Nattermann, J., Nischalke, H. D., Hofmeister, V., Ahlenstiel, G., Zimmermann, H., Leifeld, L., Weiss, E. H., Sauerbruch, T., & Spengler, U. (2005). The HLA-A2 Restricted T Cell Epitope HCV Core35–44 Stabilizes HLA-E Expression and Inhibits Cytolysis Mediated by Natural Killer Cells. *The American Journal of Pathology*, 166(2), 443-453. [https://doi.org/10.1016/S0002-9440\(10\)62267-5](https://doi.org/10.1016/S0002-9440(10)62267-5) (b)

Nattermann, J., Nischalke, H. D., Hofmeister, V., Kupfer, B., Ahlenstiel, G., Feldmann, G., Rockstroh, J., Weiss, E. H., Sauerbruch, T., & Spengler, U. (2005). HIV-1 Infection Leads to Increased HLA-E Expression Resulting in Impaired Function of Natural Killer Cells. *Antiviral Therapy*, 13. (a)

Ndjamen, B., Joshi, D. S., Fraser, S. E., & Bjorkman, P. J. (2016). Characterization of

Antibody Bipolar Bridging Mediated by the Human Cytomegalovirus Fc Receptor gp68. *Journal of Virology*, 90(6), 3262-3267. <https://doi.org/10.1128/JVI.02855-15>

Nelson, C. S., Huffman, T., Jenks, J. A., Cisneros de la Rosa, E., Xie, G., Vandergrift, N., Pass, R. F., Pollara, J., & Permar, S. R. (2018). HCMV glycoprotein B subunit vaccine efficacy mediated by nonneutralizing antibody effector functions. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 115(24), 6267-6272. <https://doi.org/10.1073/pnas.1800177115>

Nemčovičová, I., Benedict, C. A., & Zajonc, D. M. (2013). Structure of Human Cytomegalovirus UL141 Binding to TRAIL-R2 Reveals Novel, Non-canonical Death Receptor Interactions. *PLoS Pathogens*, 9(3), e1003224. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003224>

Nguyen, C., & Kamil, J. (2018). Pathogen at the Gates : Human Cytomegalovirus Entry and Cell Tropism. *Viruses*, 10(12), 704. <https://doi.org/10.3390/v10120704>

Nielsen, C. M., White, M. J., Goodier, M. R., & Riley, E. M. (2013). Functional Significance of CD57 Expression on Human NK Cells and Relevance to Disease. *Frontiers in Immunology*, 4. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2013.00422>

Nitzsche, A., Paulus, C., & Nevels, M. (2008). Temporal Dynamics of Cytomegalovirus Chromatin Assembly in Productively Infected Human Cells. *Journal of Virology*, 82(22), 11167-11180. <https://doi.org/10.1128/JVI.01218-08>

Nolan, J. P., & Condello, D. (2013). Spectral Flow Cytometry. *Current Protocols in Cytometry*, 63(1). <https://doi.org/10.1002/0471142956.cy0127s63>

O'Callaghan, C. A., Tormo, J., Willcox, B. E., Braud, V. M., Jakobsen, B. K., Stuart, D. I., McMichael, A. J., Bell, J. I., & Jones, E. Y. (1998). Structural Features Impose Tight Peptide Binding Specificity in the Nonclassical MHC Molecule HLA-E. *Molecular Cell*, 1(4), 531-541. [https://doi.org/10.1016/S1097-2765\(00\)80053-2](https://doi.org/10.1016/S1097-2765(00)80053-2)

Odeberg, J., Plachter, B., Brandén, L., & Söderberg-Nauclér, C. (2003). Human cytomegalovirus protein pp65 mediates accumulation of HLA-DR in lysosomes and destruction of the HLA-DR α -chain. *Blood*, 101(12), 4870-4877. <https://doi.org/10.1182/blood-2002-05-1504>

O'Leary, N. A., Wright, M. W., Brister, J. R., Ciufu, S., Haddad, D., McVeigh, R., Rajput, B., Robbertse, B., Smith-White, B., Ako-Adjei, D., Astashyn, A., Badretdin, A., Bao, Y., Blinkova, O., Brover, V., Chetvernin, V., Choi, J., Cox, E., Ermolaeva, O., ... Pruitt, K. D. (2016). Reference sequence (RefSeq) database at NCBI : Current status, taxonomic expansion, and functional annotation. *Nucleic Acids Research*, 44(D1), D733-D745. <https://doi.org/10.1093/nar/gkv1189>

Pachnio, A., Ciaurriz, M., Begum, J., Lal, N., Zuo, J., Beggs, A., & Moss, P. (2016). Cytomegalovirus Infection Leads to Development of High Frequencies of Cytotoxic Virus-Specific CD4⁺ T Cells Targeted to Vascular Endothelium. *PLOS Pathogens*, 12(9), e1005832. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1005832>

Paech, C., Albrecht, V., Putke, K., Schöfl, G., Schöne, B., Schmidt, A. H., Lange, V., & Klussmeier, A. (2021). HLA-E diversity unfolded : Identification and characterization of 170 novel HLA-E alleles. *HLA*, 97(5), 389-398. <https://doi.org/10.1111/tan.14195>

Pahima, H., Puzzovio, P. G., & Levi-Schaffer, F. (2019). 2B4 and CD48 : A powerful couple of the immune system. *Clinical Immunology*, 204, 64-68. <https://doi.org/10.1016/j.clim.2018.10.014>

Pain, M., Royer, P.-J., Loy, J., Girardeau, A., Tissot, A., Lacoste, P., Roux, A., Reynaud-Gaubert, M., Kessler, R., Mussot, S., Dromer, C., Brugière, O., Mornex, J.-F., Guillemain, R., Dahan, M., Knoop, C., Botturi, K., Pison, C., Danger, R., ... the COLT Consortium. (2017). T Cells Promote Bronchial Epithelial Cell Secretion of Matrix Metalloproteinase-9 via a C-C Chemokine Receptor Type 2 Pathway : Implications for Chronic Lung Allograft Dysfunction. *American Journal of Transplantation*, 17(6), 1502-1514. <https://doi.org/10.1111/ajt.14166>

Palmer, S. M. (2010). Extended Valganciclovir Prophylaxis to Prevent Cytomegalovirus After Lung Transplantation : A Randomized, Controlled Trial. *Annals of Internal Medicine*, 152(12), 761. <https://doi.org/10.7326/0003-4819-152-12-201006150-00003>

Panagou, E., Zakout, G., Keshani, J., Smith, C., Irish, D., Mackinnon, S., Kottaridis, P., Fielding, A., & Griffiths, P. D. (2016). Cytomegalovirus pre-emptive therapy after hematopoietic stem cell transplantation in the era of real-time quantitative PCR : Comparison with recipients of solid organ transplants. *Transplant Infectious Disease*, 18(3), 405-414. <https://doi.org/10.1111/tid.12542>

Papanicolaou, G. A., Silveira, F. P., Langston, A. A., Pereira, M. R., Avery, R. K., Uknis, M., Wijatyk, A., Wu, J., Boeckh, M., Marty, F. M., & Villano, S. (2019). Maribavir for Refractory or Resistant Cytomegalovirus Infections in Hematopoietic-cell or Solid-organ Transplant Recipients : A Randomized, Dose-ranging, Double-blind, Phase 2 Study. *Clinical Infectious Diseases*, 68(8), 1255-1264. <https://doi.org/10.1093/cid/ciy706>

Paraskeva, M., Bailey, M., Levvey, B. J., Griffiths, A. P., Kotsimbos, T. C., Williams, T. P., Snell, G., & Westall, G. (2011). Cytomegalovirus Replication Within the Lung Allograft Is Associated With Bronchiolitis Obliterans Syndrome : CMV in the Allograft Is Associated With BOS. *American Journal of Transplantation*, 11(10), 2190-2196. <https://doi.org/10.1111/j.1600-6143.2011.03663.x>

Park, B., Kim, Y., Shin, J., Lee, S., Cho, K., Früh, K., Lee, S., & Ahn, K. (2004). Human Cytomegalovirus Inhibits Tapasin-Dependent Peptide Loading and Optimization of the MHC Class I Peptide Cargo for Immune Evasion. *Immunity*, 20(1), 71-85. [https://doi.org/10.1016/S1074-7613\(03\)00355-8](https://doi.org/10.1016/S1074-7613(03)00355-8)

Park, B., Spooner, E., Houser, B. L., Strominger, J. L., & Ploegh, H. L. (2010). The HCMV membrane glycoprotein US10 selectively targets HLA-G for degradation. *Journal of Experimental Medicine*, 207(9), 2033-2041. <https://doi.org/10.1084/jem.20091793>

Pass, R. F., Zhang, C., Evans, A., Simpson, T., Andrews, W., Huang, M.-L., Corey, L., Hill, J., Davis, E., Flanagan, C., & Cloud, G. (2009). Vaccine Prevention of Maternal Cytomegalovirus

Infection. *New England Journal of Medicine*, 360(12), 1191-1199.
<https://doi.org/10.1056/NEJMoa0804749>

Paya, C., Humar, A., Dominguez, E., Washburn, K., Blumberg, E., Alexander, B., Freeman, R., Heaton, N., Pescovitz, M. D., & Valganciclovir Solid Organ Transplant Study Group. (2004). Efficacy and Safety of Valganciclovir vs. Oral Ganciclovir for Prevention of Cytomegalovirus Disease in Solid Organ Transplant Recipients. *American Journal of Transplantation*, 4(4), 611-620. <https://doi.org/10.1111/j.1600-6143.2004.00382.x>

Pedroza-Seres, M., Linares, M., Voorduyn, S., Enrique, R.-R., Lascurain, R., Garfias, Y., & Jimenez-Martinez, M. C. (2007). Pars planitis is associated with an increased frequency of effector-memory CD57+ T cells. *British Journal of Ophthalmology*, 91(10), 1393-1398. <https://doi.org/10.1136/bjo.2007.116277>

Peggs, K. S., Thomson, K., Samuel, E., Dyer, G., Armoogum, J., Chakraverty, R., Pang, K., Mackinnon, S., & Lowdell, M. W. (2011). Directly Selected Cytomegalovirus-Reactive Donor T Cells Confer Rapid and Safe Systemic Reconstitution of Virus-Specific Immunity Following Stem Cell Transplantation. *Clinical Infectious Diseases*, 52(1), 49-57. <https://doi.org/10.1093/cid/ciq042>

Perera, L., Shao, L., Patel, A., Evans, K., Meresse, B., Blumberg, R., Geraghty, D., Groh, V., Spies, T., Jabri, B., & Mayer, L. (2007). Expression of nonclassical class I molecules by intestinal epithelial cells: *Inflammatory Bowel Diseases*, 13(3), 298-307. <https://doi.org/10.1002/ibd.20026>

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., Wilce, M. C. J., Brooks, A. G., & Rossjohn, J. (2008). CD94-NKG2A recognition of human leukocyte antigen (HLA)-E bound to an HLA class I leader sequence. *Journal of Experimental Medicine*, 205(3), 725-735. <https://doi.org/10.1084/jem.20072525>

Petrovas, C., Casazza, J. P., Brenchley, J. M., Price, D. A., Gostick, E., Adams, W. C., Precopio, M. L., Schacker, T., Roederer, M., Douek, D. C., & Koup, R. A. (2006). PD-1 is a regulator of virus-specific CD8+ T cell survival in HIV infection. *Journal of Experimental Medicine*, 203(10), 2281-2292. <https://doi.org/10.1084/jem.20061496>

Pfirrmann, V., Oelsner, S., Rettinger, E., Huenecke, S., Bonig, H., Merker, M., Wels, W. S., Cinatl, J., Schubert, R., Klingebiel, T., & Bader, P. (2015). Cytomegalovirus-specific cytokine-induced killer cells: Concurrent targeting of leukemia and cytomegalovirus. *Cytotherapy*, 17(8), 1139-1151. <https://doi.org/10.1016/j.jcyt.2015.04.011>

Pietra, G., Romagnani, C., Falco, M., Vitale, M., Castriconi, R., Pende, D., Millo, E., Anfossi, S., Biassoni, R., Moretta, L., & Mingari, M. C. (2001). The analysis of the natural killer-like activity of human cytolytic T lymphocytes revealed HLA-E as a novel target for TCR α/β -mediated recognition. *European Journal of Immunology*, 31(12), 3687-3693. [https://doi.org/10.1002/1521-4141\(200112\)31:12<3687::AID-IMMU3687>3.0.CO;2-C](https://doi.org/10.1002/1521-4141(200112)31:12<3687::AID-IMMU3687>3.0.CO;2-C)

Pietra, G., Romagnani, C., Mazzarino, P., Falco, M., Millo, E., Moretta, A., Moretta, L.,

& Mingari, M. C. (2003). HLA-E-restricted recognition of cytomegalovirus-derived peptides by human CD8⁺ cytolytic T lymphocytes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100(19), 10896-10901. <https://doi.org/10.1073/pnas.1834449100>

Pievani, A., Borleri, G., Pende, D., Moretta, L., Rambaldi, A., Golay, J., & Introna, M. (2011). Dual-functional capability of CD3⁺CD56⁺ CIK cells, a T-cell subset that acquires NK function and retains TCR-mediated specific cytotoxicity. *Blood*, 118(12), 3301-3310. <https://doi.org/10.1182/blood-2011-02-336321>

Pignoloni, B., Fionda, C., Dell'Oste, V., Luganini, A., Cippitelli, M., Zingoni, A., Landolfo, S., Gribaudo, G., Santoni, A., & Cerboni, C. (2016). Distinct Roles for Human Cytomegalovirus Immediate Early Proteins IE1 and IE2 in the Transcriptional Regulation of MICA and PVR/CD155 Expression. *The Journal of Immunology*, 197(10), 4066-4078. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1502527>

Pipelng, M. R., John, E. R., Orens, J. B., Lechtzin, N., & McDyer, J. F. (2011). Primary Cytomegalovirus Phosphoprotein 65-Specific CD8⁺ T-Cell Responses and T-bet Levels Predict Immune Control During Early Chronic Infection in Lung Transplant Recipients. *The Journal of Infectious Diseases*, 204(11), 1663-1671. <https://doi.org/10.1093/infdis/jir624>

Pitard, V., Roumanes, D., Lafarge, X., Couzi, L., Garrigue, I., Lafon, M.-E., Merville, P., Moreau, J.-F., & Dechanet-Merville, J. (2008). Long-term expansion of effector/memory V 2- T cells is a specific blood signature of CMV infection. *Blood*, 112(4), 1317-1324. <https://doi.org/10.1182/blood-2008-01-136713>

Potena, L., Grigioni, F., Magnani, G., Lazzarotto, T., Musuraca, A. C., Ortolani, P., Coccolo, F., Fallani, F., Russo, A., & Branzi, A. (2009). Prophylaxis Versus Preemptive Anti-cytomegalovirus Approach for Prevention of Allograft Vasculopathy in Heart Transplant Recipients. *The Journal of Heart and Lung Transplantation*, 28(5), 461-467. <https://doi.org/10.1016/j.healun.2009.02.009>

Prod'homme, V., Griffin, C., Aicheler, R. J., Wang, E. C. Y., McSharry, B. P., Rickards, C. R., Stanton, R. J., Borysiewicz, L. K., López-Botet, M., Wilkinson, G. W. G., & Tomasec, P. (2007). The Human Cytomegalovirus MHC Class I Homolog UL18 Inhibits LIR-1⁺ but Activates LIR-1⁻ NK Cells. *The Journal of Immunology*, 178(7), 4473-4481. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.178.7.4473>

Prod'homme, V., Sugrue, D. M., Stanton, R. J., Nomoto, A., Davies, J., Rickards, C. R., Cochrane, D., Moore, M., Wilkinson, G. W. G., & Tomasec, P. (2010). Human cytomegalovirus UL141 promotes efficient downregulation of the natural killer cell activating ligand CD112. *Journal of General Virology*, 91(8), 2034-2039. <https://doi.org/10.1099/vir.0.021931-0>

Puig-Pey, I., Bohne, F., Benítez, C., López, M., Martínez-Llordella, M., Oppenheimer, F., Lozano, J. J., González-Abraldes, J., Tisone, G., Rimola, A., & Sánchez-Fueyo, A. (2010). Characterization of $\gamma\delta$ T cell subsets in organ transplantation: $\Gamma\delta$ T cells in allograft transplantation. *Transplant International*, 23(10), 1045-1055. <https://doi.org/10.1111/j.1432-2277.2010.01095.x>

Pump, W., Kraemer, T., Huyton, T., Hò, G.-G., Blasczyk, R., & Bade-Doeding, C. (2019). Between Innate and Adaptive Immune Responses : NKG2A, NKG2C, and CD8+ T Cell Recognition of HLA-E Restricted Self-Peptides Acquired in the Absence of HLA-Ia. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(6), 1454. <https://doi.org/10.3390/ijms20061454>

Radtke, J., Dietze, N., Spetzler, V. N., Fischer, L., Achilles, E.-G., Li, J., Scheidat, S., Thaiss, F., Nashan, B., & Koch, M. (2016). Fewer cytomegalovirus complications after kidney transplantation by de novo use of mTOR inhibitors in comparison to mycophenolic acid. *Transplant Infectious Disease*, 18(1), 79-88. <https://doi.org/10.1111/tid.12494>

Rahman, A. H., Zhang, R., Blosser, C. D., Hou, B., DeFranco, A. L., Maltzman, J. S., Wherry, E. J., & Turka, L. A. (2011). Antiviral memory CD8 T-cell differentiation, maintenance, and secondary expansion occur independently of MyD88. *Blood*, 117(11), 3123-3130. <https://doi.org/10.1182/blood-2010-11-318485>

Ramanan, P., & Razonable, R. R. (2013). Cytomegalovirus Infections in Solid Organ Transplantation : A Review. *Infection & Chemotherapy*, 45(3), 260. <https://doi.org/10.3947/ic.2013.45.3.260>

Ravens, S., Schultze-Florey, C., Raha, S., Sandrock, I., Drenker, M., Oberdörfer, L., Reinhardt, A., Ravens, I., Beck, M., Geffers, R., von Kaisenberg, C., Heuser, M., Thol, F., Ganser, A., Förster, R., Koenecke, C., & Prinz, I. (2017). Human $\gamma\delta$ T cells are quickly reconstituted after stem-cell transplantation and show adaptive clonal expansion in response to viral infection. *Nature Immunology*, 18(4), 393-401. <https://doi.org/10.1038/ni.3686>

Razonable, R. R., Brown, R. A., Wilson, J., Groettum, C., Kremers, W., Espy, M., Smith, T. F., & Paya, C. V. (2002). The clinical use of various blood compartments for cytomegalovirus (CMV) DNA quantitation in transplant recipients with CMV disease: *Transplantation*, 73(6), 968-973. <https://doi.org/10.1097/00007890-200203270-00025> (a)

Razonable, R. R., & Hayden, R. T. (2013). Clinical Utility of Viral Load in Management of Cytomegalovirus Infection after Solid Organ Transplantation. *Clinical Microbiology Reviews*, 26(4), 703-727. <https://doi.org/10.1128/CMR.00015-13>

Razonable, R. R., & Humar, A. (2019). Cytomegalovirus in solid organ transplant recipients—Guidelines of the American Society of Transplantation Infectious Diseases Community of Practice. *Clinical Transplantation*, 33(9). <https://doi.org/10.1111/ctr.13512>

Razonable, R. R., Humar, A., & the AST Infectious Diseases Community of Practice. (2013). Cytomegalovirus in Solid Organ Transplantation : CMV in Solid Organ Transplantation. *American Journal of Transplantation*, 13(s4), 93-106. <https://doi.org/10.1111/ajt.12103>

Razonable, R. R., Paya, C. V., & Smith, T. F. (2002). Role of the Laboratory in Diagnosis and Management of Cytomegalovirus Infection in Hematopoietic Stem Cell and Solid-Organ Transplant Recipients. *Journal of Clinical Microbiology*, 40(3), 746-752. <https://doi.org/10.1128/JCM.40.3.746-752.2002> (b)

Razonable, R. R., Rivero, A., Rodriguez, A., Wilson, J., Daniels, J., Jenkins, G., Larson, T.,

Hellinger, W. C., Spivey, J. R., & 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. *The Journal of Infectious Diseases*, 184(11), 1461-1464. <https://doi.org/10.1086/324516>

Rea, F., Potena, L., Yonan, N., Wagner, F., & Calabrese, F. (2016). Cytomegalovirus Hyper Immunoglobulin for CMV Prophylaxis in Thoracic Transplantation. *Transplantation*, 100(Supplement 3S), S19-S26. <https://doi.org/10.1097/TP.0000000000001096>

Reeves, M. B., Lehner, P. J., Sissons, J. G. P., & Sinclair, J. H. (2005). An in vitro model for the regulation of human cytomegalovirus latency and reactivation in dendritic cells by chromatin remodelling. *Journal of General Virology*, 86(11), 2949-2954. <https://doi.org/10.1099/vir.0.81161-0> (a)

Reeves, M. B., MacAry, P. A., Lehner, P. J., Sissons, J. G. P., & Sinclair, J. H. (2005). Latency, chromatin remodeling, and reactivation of human cytomegalovirus in the dendritic cells of healthy carriers. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 102(11), 4140-4145. <https://doi.org/10.1073/pnas.0408994102> (b)

Reischig, T., Jindra, P., Hes, O., Švecová, M., Klaboch, J., & Třeška, V. (2007). Valacyclovir Prophylaxis Versus Preemptive Valganciclovir Therapy to Prevent Cytomegalovirus Disease After Renal Transplantation. *American Journal of Transplantation*, 0(0), 071105081616004-??? <https://doi.org/10.1111/j.1600-6143.2007.02031.x>

Reischig, T., Jindra, P., Mareš, J., Čechura, M., Švecová, M., Hes, O., Opatrný, K., & Třeška, V. (2005). Valacyclovir for Cytomegalovirus Prophylaxis Reduces the Risk of Acute Renal Allograft Rejection. *Transplantation*, 79(3), 317-324. <https://doi.org/10.1097/01.TP.0000150024.01672.CA>

Reischig, T., Kacer, M., Jindra, P., Hes, O., Lysak, D., & Bouda, M. (2015). Randomized Trial of Valganciclovir Versus Valacyclovir Prophylaxis for Prevention of Cytomegalovirus in Renal Transplantation. *Clinical Journal of the American Society of Nephrology*, 10(2), 294-304. <https://doi.org/10.2215/CJN.07020714>

Remmerswaal, E. B. M., Havenith, S. H. C., Idu, M. M., van Leeuwen, E. M. M., van Donselaar, K. A. M. I., ten Brinke, A., van der Bom-Baylon, N., Bemelman, F. J., van Lier, R. A. W., & ten Berge, I. J. M. (2012). Human virus-specific effector-type T cells accumulate in blood but not in lymph nodes. *Blood*, 119(7), 1702-1712. <https://doi.org/10.1182/blood-2011-09-381574>

Rentenaar, R. J., Gamadia, L. E., van derHoek, N., van Diepen, F. N. J., Boom, R., Weel, J. F. L., Wertheim-van Dillen, P. M. E., van Lier, R. A. W., & ten Berge, I. J. M. (2000). Development of virus-specific CD4+ T cells during primary cytomegalovirus infection. *Journal of Clinical Investigation*, 105(4), 541-548. <https://doi.org/10.1172/JCI8229>

Rheinländer, A., Schraven, B., & Bommhardt, U. (2018). CD45 in human physiology and clinical medicine. *Immunology Letters*, 196, 22-32. <https://doi.org/10.1016/j.imlet.2018.01.009>

Robinson, J., Halliwell, J. A., Hayhurst, J. D., Flicek, P., Parham, P., & Marsh, S. G. E. (2015). The IPD and IMGT/HLA database : Allele variant databases. *Nucleic Acids Research*, 43(D1), D423-D431. <https://doi.org/10.1093/nar/gku1161>

Rölle, A., Jäger, D., & Momburg, F. (2018). HLA-E Peptide Repertoire and Dimorphism—Centerpieces in the Adaptive NK Cell Puzzle? *Frontiers in Immunology*, 9, 2410. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.02410>

Romagnani, C., Pietra, G., Falco, M., Millo, E., Mazzarino, P., Biassoni, R., Moretta, A., Moretta, L., & Mingari, M. C. (2002). Identification of HLA-E-specific alloreactive T lymphocytes : A cell subset that undergoes preferential expansion in mixed lymphocyte culture and displays a broad cytolytic activity against allogeneic cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99(17), 11328-11333. <https://doi.org/10.1073/pnas.172369799>

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., Herrero, J. I., Jara, P., Morales, J. M., Navarro, M., Oppenheimer, F., Prieto, M., Pulpón, L. A., Rimola, A., Serón, D., & Ussetti, P. (2014). The impact of the prevention strategies on the indirect effects of CMV infection in solid organ transplant recipients. *Transplantation Reviews*, 28(2), 84-91. <https://doi.org/10.1016/j.trre.2014.01.001>

Romo, N., Magri, G., Muntasell, A., Heredia, G., Baía, D., Angulo, A., Guma, M., & López-Botet, M. (2011). Natural killer cell-mediated response to human cytomegalovirus-infected macrophages is modulated by their functional polarization. *Journal of Leukocyte Biology*, 90(4), 717-726. <https://doi.org/10.1189/jlb.0311171>

Rossjohn, J., Gras, S., Miles, J. J., Turner, S. J., Godfrey, D. I., & McCluskey, J. (2015). T Cell Antigen Receptor Recognition of Antigen-Presenting Molecules. *Annual Review of Immunology*, 33(1), 169-200. <https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-032414-112334>

Rousselière, A., Delbos, L., Bressollette, C., Berthaume, M., & Charreau, B. (2021). Mapping and Characterization of HCMV-Specific Unconventional HLA-E-Restricted CD8 T Cell Populations and Associated NK and T Cell Responses Using HLA/Peptide Tetramers and Spectral Flow Cytometry. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(1), 263. <https://doi.org/10.3390/ijms23010263>

Roux, A., Mourin, G., Larsen, M., Fastenackels, S., Urrutia, A., Gorocho, G., Autran, B., Donner, C., Sidi, D., Sibony-Prat, J., Marchant, A., Stern, M., Sauce, D., & Appay, V. (2013). Differential Impact of Age and Cytomegalovirus Infection on the $\gamma\delta$ T Cell Compartment. *The Journal of Immunology*, 191(3), 1300-1306. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1202940>

Roy, S., Ly, D., Castro, C. D., Li, N.-S., Hawk, A. J., Altman, J. D., Meredith, S. C., Piccirilli, J. A., Moody, D. B., & Adams, E. J. (2016). Molecular Analysis of Lipid-Reactive V δ 1 $\gamma\delta$ T Cells Identified by CD1c Tetramers. *The Journal of Immunology*, 196(4), 1933-1942. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1502202>

Royer, P.-J., Olivera-Botello, G., Koutsokera, A., Aubert, J.-D., Bernasconi, E., Tissot, A.,

Pison, C., Nicod, L., Boissel, J.-P., & Magnan, A. (2016). Chronic Lung Allograft Dysfunction : A Systematic Review of Mechanisms. *Transplantation*, 100(9), 12.

Sallusto, F., Lenig, D., & Lanzavecchia, A. (1999). Two subsets of memory T lymphocytes with distinct homing potentials and effector functions. *Nature*, 401, 5.

Sarmiento, E., Navarro, J., Fernandez-Yañez, J., Palomo, J., Muñoz, P., & Carbone, J. (2014). Evaluation of an immunological score to assess the risk of severe infection in heart recipients. *Transplant Infectious Disease*, 16(5), 802-812. <https://doi.org/10.1111/tid.12284>

Sato, M., Waddell, T. K., Wagnetz, U., Roberts, H. C., Hwang, D. M., Haroon, A., Wagnetz, D., Chaparro, C., Singer, L. G., Hutcheon, M. A., & Keshavjee, S. (2011). Restrictive allograft syndrome (RAS) : A novel form of chronic lung allograft dysfunction. *The Journal of Heart and Lung Transplantation*, 30(7), 735-742. <https://doi.org/10.1016/j.healun.2011.01.712>

Saunders, P. M., Vivian, J. P., O'Connor, G. M., Sullivan, L. C., Pymm, P., Rossjohn, J., & Brooks, A. G. (2015). A bird's eye view of NK cell receptor interactions with their MHC class I ligands. *Immunological Reviews*, 267(1), 148-166. <https://doi.org/10.1111/imr.12319>

Sauter, J., Putke, K., Schefzyk, D., Pruschke, J., Solloch, U. V., Bernas, S. N., Massalski, C., Daniel, K., Klussmeier, A., Hofmann, J. A., Lange, V., & Schmidt, A. H. (2021). HLA-E typing of more than 2.5 million potential hematopoietic stem cell donors : Methods and population-specific allele frequencies. *Human Immunology*, 82(7), 541-547. <https://doi.org/10.1016/j.humimm.2020.12.008>

Scheinberg, P., Melenhorst, J. J., Brenchley, J. M., Hill, B. J., Hensel, N. F., Chattopadhyay, P. K., Roederer, M., Picker, L. J., Price, D. A., Barrett, A. J., & Douek, D. C. (2009). The transfer of adaptive immunity to CMV during hematopoietic stem cell transplantation is dependent on the specificity and phenotype of CMV-specific T cells in the donor. *Blood*, 114(24), 5071-5080. <https://doi.org/10.1182/blood-2009-04-214684>

Scheper, W., van Dorp, S., Kersting, S., Pietersma, F., Lindemans, C., Hol, S., Heijhuurs, S., Sebestyen, Z., Gründer, C., Marcu-Malina, V., Marchant, A., Donner, C., Plachter, B., Vermijlen, D., van Baarle, D., & Kuball, J. (2013). $\gamma\delta$ T cells elicited by CMV reactivation after allo-SCT cross-recognize CMV and leukemia. *Leukemia*, 27(6), 1328-1338. <https://doi.org/10.1038/leu.2012.374>

Schmeel, F., Schmeel, L., Gast, S.-M., & Schmidt-Wolf, I. (2014). Adoptive Immunotherapy Strategies with Cytokine-Induced Killer (CIK) Cells in the Treatment of Hematological Malignancies. *International Journal of Molecular Sciences*, 15(8), 14632-14648. <https://doi.org/10.3390/ijms150814632>

Schoeppler, K. E., Lyu, D. M., Grazia, T. J., Crossno, J. T., Vandervest, K. M., & Zamora, M. R. (2013). Late-Onset Cytomegalovirus (CMV) in Lung Transplant Recipients : Can CMV Serostatus Guide the Duration of Prophylaxis?: Lung Transplant Cytomegalovirus Prophylaxis. *American Journal of Transplantation*, 13(2), 376-382. <https://doi.org/10.1111/j.1600-6143.2012.04339.x>

Schottstedt, V., Blümel, J., Burger, R., Drosten, C., Gröner, A., Gürtler, L., Heiden, M., Hildebrandt, M., Jansen, B., Montag-Lessing, T., Offergeld, R., Pauli, G., Seitz, R., Schlenkrich, U., Strobel, J., Willkommen, H., & Wirsing von König, C.-H. (2010). Human Cytomegalovirus (HCMV) – Revised. *Transfusion Medicine and Hemotherapy*, 37(6), 365-375. <https://doi.org/10.1159/000322141>

Seidel, E., Le, V. T. K., Bar-On, Y., Tsukerman, P., Enk, J., Yamin, R., Stein, N., Schmiedel, D., Oiknine Djian, E., Weisblum, Y., Tirosh, B., Stastny, P., Wolf, D. G., Hengel, H., & Mandelboim, O. (2015). Dynamic Co-evolution of Host and Pathogen : HCMV Downregulates the Prevalent Allele MICA*008 to Escape Elimination by NK Cells. *Cell Reports*, 10(6), 968-982. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2015.01.029>

Sester, M., Leboeuf, C., Schmidt, T., & Hirsch, H. H. (2016). The “ABC” of Virus-Specific T Cell Immunity in Solid Organ Transplantation. *American Journal of Transplantation*, 16(6), 1697-1706. <https://doi.org/10.1111/ajt.13684>

Sester, M., Sester, U., Gärtner, B. C., Girndt, M., Meyerhans, A., & Köhler, H. (2002). Dominance of virus-specific CD8 T cells in human primary cytomegalovirus infection. *Journal of the American Society of Nephrology: JASN*, 13(10), 2577-2584.

Sester, M., Sester, U., Gartner, B., Heine, G., Girndt, M., Mueller-Lantzsch, N., Meyerhans, A., & Kohler, H. (2001). LEVELS OF VIRUS-SPECIFIC CD4 T CELLS CORRELATE WITH CYTOMEGALOVIRUS CONTROL AND PREDICT VIRUS-INDUCED DISEASE AFTER RENAL TRANSPLANTATION1: *Transplantation*, 71(9), 1287-1294. <https://doi.org/10.1097/00007890-200105150-00018>

Sester, U., Gartner, B. C., Wilkens, H., Schwaab, B., Wossner, R., Kindermann, I., Girndt, M., Meyerhans, A., Mueller-Lantzsch, N., Schafers, H.-J., Sybrecht, G. W., Kohler, H., & Sester, M. (2005). Differences in CMV-Specific T-Cell Levels and Long-Term Susceptibility to CMV Infection after Kidney, Heart and Lung Transplantation. *American Journal of Transplantation*, 5(6), 1483-1489. <https://doi.org/10.1111/j.1600-6143.2005.00871.x>

Sharpe, H. R., Bowyer, G., Brackenridge, S., & Lambe, T. (2019). HLA-E : Exploiting pathogen-host interactions for vaccine development. *Clinical and Experimental Immunology*, 196(2), 167-177. <https://doi.org/10.1111/cei.13292>

Shibuya, A., Campbell, D., Hannum, C., Yssel, H., Franz-Bacon, K., McClanahan, T., Kitamura, T., Nicholl, J., Sutherland, G. R., Lanier, L. L., & Phillips, J. H. (1996). DNAM-1, A Novel Adhesion Molecule Involved in the Cytolytic Function of T Lymphocytes. *Immunity*, 4(6), 573-581. [https://doi.org/10.1016/S1074-7613\(00\)70060-4](https://doi.org/10.1016/S1074-7613(00)70060-4)

Shiina, T., Hosomichi, K., Inoko, H., & Kulski, J. K. (2009). The HLA genomic loci map : Expression, interaction, diversity and disease. *Journal of Human Genetics*, 54(1), 15-39. <https://doi.org/10.1038/jhg.2008.5>

Sijmons, S., Van Ranst, M., & Maes, P. (2014). Genomic and Functional Characteristics of Human Cytomegalovirus Revealed by Next-Generation Sequencing. *Viruses*, 6(3), 1049-1072. <https://doi.org/10.3390/v6031049>

Silva, M. A., Jambulingam, P. S., Gunson, B. K., Mayer, D., Buckels, J. A. C., Mirza, D. F., & Bramhall, S. R. (2006). Hepatic artery thrombosis following orthotopic liver transplantation : A 10-year experience from a single centre in the United Kingdom. *Liver Transplantation*, 12(1), 146-151. <https://doi.org/10.1002/lt.20566>

Silva, M. C., Yu, Q.-C., Enquist, L., & Shenk, T. (2003). Human Cytomegalovirus UL99-Encoded pp28 Is Required for the Cytoplasmic Envelopment of Tegument-Associated Capsids. *Journal of Virology*, 77(19), 10594-10605. <https://doi.org/10.1128/JVI.77.19.10594-10605.2003>

Sinzger, C., Digel, M., & Jahn, G. (2008). Cytomegalovirus Cell Tropism. In T. E. Shenk & M. F. Stinski (Éds.), *Human Cytomegalovirus* (Vol. 325, p. 63-83). Springer Berlin Heidelberg. https://doi.org/10.1007/978-3-540-77349-8_4

Slavuljica, I., Krmpotic, A., & Jonjić, S. (2011). Manipulation of NKG2D ligands by cytomegaloviruses : Impact on innate and adaptive immune response. *Frontiers in Immunology*. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2011.00085>

Slobedman, B., & Mocarski, E. S. (1999). Quantitative Analysis of Latent Human Cytomegalovirus. *Journal of Virology*, 73(6), 4806-4812. <https://doi.org/10.1128/JVI.73.6.4806-4812.1999>

Smieja, M., Gnarpe, J., Lonn, E., Gnarpe, H., Olsson, G., Yi, Q., Dzavik, V., McQueen, M., & Yusuf, S. (2003). Multiple Infections and Subsequent Cardiovascular Events in the Heart Outcomes Prevention Evaluation (HOPE) Study. *Circulation*, 107(2), 251-257. <https://doi.org/10.1161/01.CIR.0000044940.65226.1F>

Smith, C., Beagley, L., Rehan, S., Neller, M. A., Crooks, P., Solomon, M., Holmes-Liew, C.-L., Holmes, M., McKenzie, S. C., Hopkins, P., Campbell, S., Francis, R. S., Chambers, D. C., & Khanna, R. (2019). Autologous Adoptive T-cell Therapy for Recurrent or Drug-resistant Cytomegalovirus Complications in Solid Organ Transplant Recipients : A Single-arm Open-label Phase I Clinical Trial. *Clinical Infectious Diseases*, 68(4), 632-640. <https://doi.org/10.1093/cid/ciy549>

Smith, S. L., Kennedy, P. R., Stacey, K. B., Worboys, J. D., Yarwood, A., Seo, S., Solloa, E. H., Mistretta, B., Chatterjee, S. S., Gunaratne, P., Allette, K., Wang, Y.-C., Smith, M. L., Sebra, R., Mace, E. M., Horowitz, A., Thomson, W., Martin, P., Eyre, S., & Davis, D. M. (2020). Diversity of peripheral blood human NK cells identified by single-cell RNA sequencing. *Blood Advances*, 4(7), 1388-1406. <https://doi.org/10.1182/bloodadvances.2019000699>

Smith, W., Tomasec, P., Aicheler, R., Loewendorf, A., Nemčovičová, I., Wang, E. C. Y., Stanton, R. J., Macauley, M., Norris, P., Willen, L., Ruckova, E., Nomoto, A., Schneider, P., Hahn, G., Zajonc, D. M., Ware, C. F., Wilkinson, G. W. G., & Benedict, C. A. (2013). Human Cytomegalovirus Glycoprotein UL141 Targets the TRAIL Death Receptors to Thwart Host Innate Antiviral Defenses. *Cell Host & Microbe*, 13(3), 324-335. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2013.02.003>

Snyder, L. D., Finlen-Copeland, C. A., Turbyfill, W. J., Howell, D., Willner, D. A., & Palmer,

S. M. (2010). Cytomegalovirus Pneumonitis Is a Risk for Bronchiolitis Obliterans Syndrome in Lung Transplantation. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 181(12), 1391-1396. <https://doi.org/10.1164/rccm.200911-1786OC>

Sottile, R., Panjwani, M. K., Lau, C. M., Daniyan, A. F., Tanaka, K., Barker, J. N., Brentjens, R. J., Sun, J. C., Le Luque, J.-B., & Hsu, K. C. (2021). Human cytomegalovirus expands a CD8⁺ T cell population with loss of *BCL11B* expression and gain of NK cell identity. *Science Immunology*, 6(63), eabe6968. <https://doi.org/10.1126/sciimmunol.abe6968>

Spada, F. M., Grant, E. P., Peters, P. J., Sugita, M., Melián, A., Leslie, D. S., Lee, H. K., van Donselaar, E., Hanson, D. A., Krensky, A. M., Majdic, O., Porcelli, S. A., Morita, C. T., & Brenner, M. B. (2000). Self-Recognition of CD1 by α/β T Cells: Implications for Innate Immunity. *The Journal of Experimental Medicine*, 192, 12.

Stern, M., Hirsch, H., Cusini, A., van Delden, C., Manuel, O., Meylan, P., Boggian, K., Mueller, N. J., & Dickenmann, M. (2014). Cytomegalovirus Serology and Replication Remain Associated With Solid Organ Graft Rejection and Graft Loss in the Era of Prophylactic Treatment. *Transplantation*, 98(9), 1013-1018. <https://doi.org/10.1097/TP.0000000000000160>

Stern-Ginossar, N., Elefant, N., Zimmermann, A., Wolf, D. G., Saleh, N., Biton, M., Horwitz, E., Prokocimer, Z., Prichard, M., Hahn, G., Goldman-Wohl, D., Greenfield, C., Yagel, S., Hengel, H., Altuvia, Y., Margalit, H., & Mandelboim, O. (2007). Host Immune System Gene Targeting by a Viral miRNA. *Science*, 317(5836), 376-381. <https://doi.org/10.1126/science.1140956>

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., Mann, M., Ingolia, N. T., & Weissman, J. S. (2012). Decoding Human Cytomegalovirus. *Science*, 338(6110), 1088-1093. <https://doi.org/10.1126/science.1227919>

Strong, R. K., Holmes, M. A., Li, P., Braun, L., Lee, N., & Geraghty, D. E. (2003). HLA-E Allelic Variants: CORRELATING DIFFERENTIAL EXPRESSION, PEPTIDE AFFINITIES, CRYSTAL STRUCTURES, AND THERMAL STABILITIES. *Journal of Biological Chemistry*, 278(7), 5082-5090. <https://doi.org/10.1074/jbc.M208268200>

Sullivan, L. C., Hoare, H. L., McCluskey, J., Rossjohn, J., & Brooks, A. G. (2006). A structural perspective on MHC class Ib molecules in adaptive immunity. *Trends in Immunology*, 27(9), 413-420. <https://doi.org/10.1016/j.it.2006.07.006>

Sullivan, L. C., Nguyen, T. H. O., Harpur, C. M., Stankovic, S., Kanagarajah, A. R., Koutsakos, M., Saunders, P. M., Cai, Z., Gray, J. A., Widjaja, J. M. L., Lin, J., Pietra, G., Mingari, M. C., Moretta, L., Samir, J., Luciani, F., Westall, G. P., Malmberg, K. J., Kedzierska, K., & Brooks, A. G. (2021). Natural killer cell receptors regulate responses of HLA-E-restricted T cells. *Science Immunology*, 6(58), eabe9057. <https://doi.org/10.1126/sciimmunol.abe9057>

Sullivan, L. C., Walpole, N. G., Farenc, C., Pietra, G., Sum, M. J. W., Clements, C. S., Lee, E. J., Beddoe, T., Falco, M., Mingari, M. C., Moretta, L., Gras, S., Rossjohn, J., & Brooks, A. G.

(2017). A conserved energetic footprint underpins recognition of human leukocyte antigen-E by two distinct $\alpha\beta$ T cell receptors. *Journal of Biological Chemistry*, 292(51), 21149-21158. <https://doi.org/10.1074/jbc.M117.807719>

Sullivan, L. C., Westall, G. P., Widjaja, J. M. L., Mifsud, N. A., Nguyen, T. H. O., Meehan, A. C., Kotsimbos, T. C., & Brooks, A. G. (2015). The Presence of HLA-E-Restricted, CMV-Specific CD8+ T Cells in the Blood of Lung Transplant Recipients Correlates with Chronic Allograft Rejection. *PLOS ONE*, 10(8), e0135972. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0135972>

Sun, J. C., Beilke, J. N., & Lanier, L. L. (2009). Adaptive immune features of natural killer cells. *Nature*, 457(7229), 557-561. <https://doi.org/10.1038/nature07665>

Sund, F., Lidehäll, A.-K., Claesson, K., Foss, A., Tötterman, T. H., Korsgren, O., & Eriksson, B.-M. (2009). CMV-specific T-cell immunity, viral load, and clinical outcome in seropositive renal transplant recipients : A pilot study: CMV-specific immunity in renal transplant patients. *Clinical Transplantation*, 24(3), 401-409. <https://doi.org/10.1111/j.1399-0012.2009.00976.x>

Sylwester, A., Nambiar, K. Z., Caserta, S., Klenerman, P., Picker, L. J., & Kern, F. (2016). A new perspective of the structural complexity of HCMV-specific T-cell responses. *Mechanisms of Ageing and Development*, 158, 14-22. <https://doi.org/10.1016/j.mad.2016.03.002>

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., Nelson, J. A., & Picker, L. J. (2005). Broadly targeted human cytomegalovirus-specific CD4+ and CD8+ T cells dominate the memory compartments of exposed subjects. *Journal of Experimental Medicine*, 202(5), 673-685. <https://doi.org/10.1084/jem.20050882>

Tahara-Hanaoka, S. (2004). Functional characterization of DNAM-1 (CD226) interaction with its ligands PVR (CD155) and nectin-2 (PRR-2/CD112). *International Immunology*, 16(4), 533-538. <https://doi.org/10.1093/intimm/dxh059>

Tandon, R., & Mocarski, E. S. (2008). Control of Cytoplasmic Maturation Events by Cytomegalovirus Tegument Protein pp150. *Journal of Virology*, 82(19), 9433-9444. <https://doi.org/10.1128/JVI.00533-08>

Thimme, R., Appay, V., Koschella, M., Panther, E., Roth, E., Hislop, A. D., Rickinson, A. B., Rowland-Jones, S. L., Blum, H. E., & Pircher, H. (2005). Increased Expression of the NK Cell Receptor KLRG1 by Virus-Specific CD8 T Cells during Persistent Antigen Stimulation. *Journal of Virology*, 79(18), 12112-12116. <https://doi.org/10.1128/JVI.79.18.12112-12116.2005>

Tolkoff-Rubin, N. E., Fishman, J. A., & Rubin, R. H. (2001). The bidirectional relationship between cytomegalovirus and allograft injury. *Transplantation Proceedings*, 33(1-2), 1773-1775. [https://doi.org/10.1016/S0041-1345\(00\)02674-9](https://doi.org/10.1016/S0041-1345(00)02674-9)

Tomasec, P. (2000). Surface Expression of HLA-E, an Inhibitor of Natural Killer Cells, Enhanced by Human Cytomegalovirus gpUL40. *Science*, 287(5455), 1031-1033. <https://doi.org/10.1126/science.287.5455.1031>

Tomtishen III, J. P. (2012). Human cytomegalovirus tegument proteins (pp65, pp71, pp150, pp28). *Virology Journal*, 9(1). <https://doi.org/10.1186/1743-422X-9-22>

Trautmann, L., Janbazian, L., Chomont, N., Said, E. A., Gimmig, S., Bessette, B., Boulassel, M.-R., Delwart, E., Sepulveda, H., Balderas, R. S., Routy, J.-P., Haddad, E. K., & Sekaly, R.-P. (2006). Upregulation of PD-1 expression on HIV-specific CD8+ T cells leads to reversible immune dysfunction. *Nature Medicine*, 12(10), 1198-1202. <https://doi.org/10.1038/nm1482>

Trautmann, L., Rimbert, M., Echasserieu, K., Saulquin, X., Neveu, B., Dechanet, J., Cerundolo, V., & Bonneville, M. (2005). Selection of T Cell Clones Expressing High-Affinity Public TCRs within Human Cytomegalovirus-Specific CD8 T Cell Responses. *The Journal of Immunology*, 175(9), 6123-6132. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.175.9.6123>

Tyl, M. D., Betsinger, C. N., & Cristea, I. M. (2022). Virus–host protein interactions as footprints of human cytomegalovirus replication. *Current Opinion in Virology*, 52, 135-147. <https://doi.org/10.1016/j.coviro.2021.11.016>

Ulbrecht, M., Martinozzi, S., Grzeschik, M., Hengel, H., Ellwart, J. W., Pla, M., & Weiss, E. H. (2000). Cutting Edge : The Human Cytomegalovirus UL40 Gene Product Contains a Ligand for HLA-E and Prevents NK Cell-Mediated Lysis. *The Journal of Immunology*, 164(10), 5019-5022. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.164.10.5019>

Valiante, N. M., & Trinchieri, G. (1993). Identification of a novel signal transduction surface molecule on human cytotoxic lymphocytes. *Journal of Experimental Medicine*, 178(4), 1397-1406. <https://doi.org/10.1084/jem.178.4.1397>

Van Acker, H. H., Capsomidis, A., Smits, E. L., & Van Tendeloo, V. F. (2017). CD56 in the Immune System : More Than a Marker for Cytotoxicity? *Frontiers in Immunology*, 8, 892. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.00892>

van de Berg, P. J., Heutinck, K. M., Raabe, R., Minnee, R. C., Young, S. L., van Donselaar-van der Pant, K. A., Bemelman, F. J., van Lier, R. A., & ten Berge, I. J. (2010). Human Cytomegalovirus Induces Systemic Immune Activation Characterized by a Type 1 Cytokine Signature. *The Journal of Infectious Diseases*, 202(5), 690-699. <https://doi.org/10.1086/655472>

van den Berg, S. P. H., Derksen, L. Y., Drylewicz, J., Nanlohy, N. M., Beckers, L., Lanfermeijer, J., Gessel, S. N., Vos, M., Otto, S. A., de Boer, R. J., Tesselaar, K., Borghans, J. A. M., & van Baarle, D. (2021). Quantification of T-cell dynamics during latent cytomegalovirus infection in humans. *PLOS Pathogens*, 17(12), e1010152. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1010152>

van den Berg, S. P. H., Pardieck, I. N., Lanfermeijer, J., Sauce, D., Klenerman, P., van Baarle, D., & Arens, R. (2019). The hallmarks of CMV-specific CD8 T-cell differentiation. *Medical Microbiology and Immunology*, 208(3-4), 365-373. <https://doi.org/10.1007/s00430-019-00608-7>

Van Laecke, S., Desideri, F., Geerts, A., Van Vlierberghe, H., Berrevoet, F., Rogiers, X., Troisi, R., de Hemptinne, B., Vanholder, R., & Colle, I. (2010). Hypomagnesemia and the risk of new-onset diabetes after liver transplantation. *Liver Transplantation*, 16(11), 1278-1287. <https://doi.org/10.1002/lt.22146>

van Leeuwen, E. M. M., Koning, J. J., Remmerswaal, E. B. M., van Baarle, D., van Lier, R. A. W., & ten Berge, I. J. M. (2006). Differential Usage of Cellular Niches by Cytomegalovirus versus EBV- and Influenza Virus-Specific CD8+ T Cells. *The Journal of Immunology*, 177(8), 4998-5005. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.177.8.4998>

Varnum, S. M., Streblow, D. N., Monroe, M. E., Smith, P., Auberry, K. J., Paša-Tolić, L., Wang, D., Camp, D. G., Rodland, K., Wiley, S., Britt, W., Shenk, T., Smith, R. D., & Nelson, J. A. (2004). Identification of Proteins in Human Cytomegalovirus (HCMV) Particles : The HCMV Proteome. *Journal of Virology*, 78(20), 10960-10966. <https://doi.org/10.1128/JVI.78.20.10960-10966.2004>

Velu, V., Kannanganat, S., Ibegbu, C., Chennareddi, L., Villinger, F., Freeman, G. J., Ahmed, R., & Amara, R. R. (2007). Elevated Expression Levels of Inhibitory Receptor Programmed Death 1 on Simian Immunodeficiency Virus-Specific CD8 T Cells during Chronic Infection but Not after Vaccination. *Journal of Virology*, 81, 10.

Verleden, G. M., Glanville, A. R., Lease, E. D., Fisher, A. J., Calabrese, F., Corris, P. A., Ensor, C. R., Gottlieb, J., Hachem, R. R., Lama, V., Martinu, T., Neil, D. A. H., Singer, L. G., Snell, G., & Vos, R. (2019). Chronic lung allograft dysfunction : Definition, diagnostic criteria, and approaches to treatment—A consensus report from the Pulmonary Council of the ISHLT. *The Journal of Heart and Lung Transplantation*, 38(5), 493-503. <https://doi.org/10.1016/j.healun.2019.03.009>

Verleden, G. M., Raghu, G., Meyer, K. C., Glanville, A. R., & Corris, P. (2014). A new classification system for chronic lung allograft dysfunction. *The Journal of Heart and Lung Transplantation*, 33(2), 127-133. <https://doi.org/10.1016/j.healun.2013.10.022>

Verleden, G. M., Vos, R., Vanaudenaerde, B., Dupont, L., Yserbyt, J., Van Raemdonck, D., & Verleden, S. (2015). Current views on chronic rejection after lung transplantation. *Transplant International*, 28(10), 1131-1139. <https://doi.org/10.1111/tri.12579>

Verleden, S. E., Ruttens, D., Vandermeulen, E., Bellon, H., Dubbeldam, A., De Wever, W., Dupont, L. J., Van Raemdonck, D. E., Vanaudenaerde, B. M., Verleden, G. M., Benden, C., & Vos, R. (2016). Predictors of survival in restrictive chronic lung allograft dysfunction after lung transplantation. *The Journal of Heart and Lung Transplantation*, 35(9), 1078-1084. <https://doi.org/10.1016/j.healun.2016.03.022>

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 $\gamma\delta$ T cell responses in utero. *Journal of Experimental Medicine*, 207(4), 807-821. <https://doi.org/10.1084/jem.20090348>

Vieira Braga, F. A., Hertoghs, K. M. L., van Lier, R. A. W., & van Gisbergen, K. P. J. M.

(2015). Molecular characterization of HCMV-specific immune responses : Parallels between CD8+ T cells, CD4+ T cells, and NK cells. *European Journal of Immunology*, 45(9), 2433-2445. <https://doi.org/10.1002/eji.201545495>

Vietzen, H., Hartenberger, S., Jaksch, P., & Puchhammer-Stöckl, E. (2021). Association between chronic lung allograft dysfunction and human Cytomegalovirus UL40 peptide variants in lung-transplant recipients. *The Journal of Heart and Lung Transplantation*, 40(9), 900-904. <https://doi.org/10.1016/j.healun.2021.05.011>

Vietzen, H., Pollak, K., Honsig, C., Jaksch, P., & Puchhammer-Stöckl, E. (2018). NKG2C Deletion Is a Risk Factor for Human Cytomegalovirus Viremia and Disease After Lung Transplantation. *The Journal of Infectious Diseases*, 217(5), 802-806. <https://doi.org/10.1093/infdis/jix608>

Voogd, L., Ruibal, P., Ottenhoff, T. H. M., & Joosten, S. A. (2022). Antigen presentation by MHC-E : A putative target for vaccination? *Trends in Immunology*, 43(5), 355-365. <https://doi.org/10.1016/j.it.2022.03.002>

Walker, R. C., Marshall, W. F., Strickler, J. G., Wiesner, R. H., Velosa, J. A., Habermann, T. M., McGregor, C. G. A., & Paya, C. V. (1995). Pretransplantation Assessment of the Risk of Lymphoproliferative Disorder. *Clinical Infectious Diseases*, 20(5), 1346-1353. <https://doi.org/10.1093/clinids/20.5.1346>

Walter, E. A., Finch, R. J., Watanabe, K. S., Thomas, E. D., & Riddell, S. R. (1995). Reconstitution of Cellular Immunity against Cytomegalovirus in Recipients of Allogeneic Bone Marrow by Transfer of T-Cell Clones from the Donor. *THE NEW ENGLAND JOURNAL OF MEDICINE*, 7.

Walters, L. C., Harlos, K., Brackenridge, S., Rozbesky, D., Barrett, J. R., Jain, V., Walter, T. S., O'Callaghan, C. A., Borrow, P., Toebes, M., Hansen, S. G., Sacha, J. B., Abdulhaqq, S., Greene, J. M., Früh, K., Marshall, E., Picker, L. J., Jones, E. Y., McMichael, A. J., & Gillespie, G. M. (2018). Pathogen-derived HLA-E bound epitopes reveal broad primary anchor pocket tolerability and conformationally malleable peptide binding. *Nature Communications*, 9(1), 3137. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-05459-z>

Wang, D., Freed, D. C., He, X., Li, F., Tang, A., Cox, K. S., Dubey, S. A., Cole, S., Medi, M. B., Liu, Y., Xu, J., Zhang, Z.-Q., Finnefrock, A. C., Song, L., Espeseth, A. S., Shiver, J. W., Casimiro, D. R., & Fu, T.-M. (2016). A replication-defective human cytomegalovirus vaccine for prevention of congenital infection. *Science Translational Medicine*, 8(362). <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aaf9387>

Wang, D., & Shenk, T. (2005). Human cytomegalovirus virion protein complex required for epithelial and endothelial cell tropism. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 102(50), 18153-18158. <https://doi.org/10.1073/pnas.0509201102>

Wang, G. C., Dash, P., McCullers, J. A., Doherty, P. C., & Thomas, P. G. (2012). T Cell Receptor $\alpha\beta$ Diversity Inversely Correlates with Pathogen-Specific Antibody Levels in Human Cytomegalovirus Infection. *Science Translational Medicine*, 4(128).

<https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3003647>

Weihofen, A., Binns, K., Lemberg, M. K., Ashman, K., & Martoglio, B. (2002). Identification of Signal Peptide Peptidase, a Presenilin-Type Aspartic Protease. *Science*, 296(5576), 2215-2218. <https://doi.org/10.1126/science.1070925>

Weill, D., Lock, B. J., Wewers, D. L., Randall Young, K., Zorn, G. L., Early, L., Kirklin, J. K., & McGiffin, D. C. (2003). Combination Prophylaxis with Ganciclovir and Cytomegalovirus (CMV) Immune Globulin After Lung Transplantation : Effective CMV Prevention Following Daclizumab Induction: Combination CMV Prophylaxis after Lung Transplantation. *American Journal of Transplantation*, 3(4), 492-496. <https://doi.org/10.1034/j.1600-6143.2003.00074.x>

Wiertz, E. J. H. J., Jones, T. R., Sun, L., Bogoy, M., Geuze, H. J., & Ploegh, H. L. (1996). The Human Cytomegalovirus US11 Gene Product Dislocates MHC Class I Heavy Chains from the Endoplasmic Reticulum to the Cytosol. *Cell*, 84(5), 769-779. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)81054-5](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)81054-5) (a)

Wiertz, E. J. H. J., Tortorella, D., Bogoy, M., Yu, J., Mothes, W., Jones, T. R., Rapoport, T. A., & Ploegh, H. L. (1996). Sec61-mediated transfer of a membrane protein from the endoplasmic reticulum to the proteasome for destruction. *Nature*, 384(6608), 432-438. <https://doi.org/10.1038/384432a0> (b)

Willcox, C. R., Pitard, V., Netzer, S., Couzi, L., Salim, M., Silberzahn, T., Moreau, J.-F., Hayday, A. C., Willcox, B. E., & Déchanet-Merville, J. (2012). Cytomegalovirus and tumor stress surveillance by binding of a human $\gamma\delta$ T cell antigen receptor to endothelial protein C receptor. *Nature Immunology*, 13(9), 872-879. <https://doi.org/10.1038/ni.2394>

Wills, M. R., Okecha, G., Weekes, M. P., Gandhi, M. K., Sissons, P. J. G., & Carmichael, A. J. (2002). Identification of Naive or Antigen-Experienced Human CD8⁺ T Cells by Expression of Costimulation and Chemokine Receptors : Analysis of the Human Cytomegalovirus-Specific CD8⁺ T Cell Response. *The Journal of Immunology*, 168(11), 5455-5464. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.168.11.5455>

Witzke, O., Nitschke, M., Bartels, M., Wolters, H., Wolf, G., Reinke, P., Hauser, I. A., Alshuth, U., & Kliem, V. (2018). Valganciclovir Prophylaxis Versus Preemptive Therapy in Cytomegalovirus-Positive Renal Allograft Recipients : Long-term Results After 7 Years of a Randomized Clinical Trial. *Transplantation*, 102(5), 876-882. <https://doi.org/10.1097/TP.0000000000002024>

Wooden, S. L., Kalb, S. R., Cotter, R. J., & Soloski, M. J. (2005). Cutting Edge : HLA-E Binds a Peptide Derived from the ATP-Binding Cassette Transporter Multidrug Resistance-Associated Protein 7 and Inhibits NK Cell-Mediated Lysis. *The Journal of Immunology*, 175(3), 1383-1387. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.175.3.1383>

Wreghitt, T. (1989). Cytomegalovirus infections in heart and heart-lung transplant recipients. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 23(suppl E), 49-60. https://doi.org/10.1093/jac/23.suppl_E.49

Wynn, K. K., Fulton, Z., Cooper, L., Silins, S. L., Gras, S., Archbold, J. K., Tynan, F. E., Miles, J. J., McCluskey, J., Burrows, S. R., Rossjohn, J., & Khanna, R. (2008). Impact of clonal competition for peptide-MHC complexes on the CD8 α T-cell repertoire selection in a persistent viral infection. *Blood*, 111(8), 10.

Xu, B., Pizarro, J. C., Holmes, M. A., McBeth, C., Groh, V., Spies, T., & Strong, R. K. (2011). Crystal structure of a $\gamma\delta$ T-cell receptor specific for the human MHC class I homolog MICA. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(6), 2414-2419. <https://doi.org/10.1073/pnas.1015433108>

Xu, G. J., Kula, T., Xu, Q., Li, M. Z., Vernon, S. D., Ndung'u, T., Ruxrungtham, K., Sanchez, J., Brander, C., Chung, R. T., O'Connor, K. C., Walker, B., Larman, H. B., & Elledge, S. J. (2015). Comprehensive serological profiling of human populations using a synthetic human virome. *Science*, 348(6239), aaa0698-aaa0698. <https://doi.org/10.1126/science.aaa0698>

Yang, Z., & Bjorkman, P. J. (2008). Structure of UL18, a peptide-binding viral MHC mimic, bound to a host inhibitory receptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 6.

Yoo, S. G., Han, K. D., Lee, K. H., La, Y., Kwon, D. E., & Han, S. H. (2019). Impact of Cytomegalovirus Disease on New-Onset Type 2 Diabetes Mellitus : Population-Based Matched Case-Control Cohort Study. *Diabetes & Metabolism Journal*, 43(6), 815. <https://doi.org/10.4093/dmj.2018.0167>

Yoon, J. S., Song, B. G., Lee, J.-H., Lee, H. Y., Kim, S. W., Chang, Y., Lee, Y. B., Cho, E. J., Yu, S. J., Sinn, D. H., Kim, Y. J., Lee, J. H., & Yoon, J.-H. (2019). Adjuvant cytokine-induced killer cell immunotherapy for hepatocellular carcinoma : A propensity score-matched analysis of real-world data. *BMC Cancer*, 19(1), 523. <https://doi.org/10.1186/s12885-019-5740-z>

Young, P. G., Rubin, J., Angarone, M., Flaherty, J., Penugonda, S., Stosor, V., & Ison, M. G. (2016). Ganciclovir-resistant cytomegalovirus infection in solid organ transplant recipients : A single-center retrospective cohort study. *Transplant Infectious Disease*, 18(3), 390-395. <https://doi.org/10.1111/tid.12537>

Yu, X., Jih, J., Jiang, J., & Zhou, Z. H. (2017). Atomic structure of the human cytomegalovirus capsid with its securing tegument layer of pp150. *Science*, 356(6345). <https://doi.org/10.1126/science.aam6892>

Zabalza, A., Vera, A., Alari-Pahissa, E., Munteis, E., Moreira, A., Yélamos, J., Llop, M., López-Botet, M., & Martínez-Rodríguez, J. E. (2020). Impact of cytomegalovirus infection on B cell differentiation and cytokine production in multiple sclerosis. *Journal of Neuroinflammation*, 17(1), 161. <https://doi.org/10.1186/s12974-020-01840-2>

Zamora, M. R. (2004). Cytomegalovirus and Lung Transplantation. *American Journal of Transplantation*, 4(8), 1219-1226. <https://doi.org/10.1111/j.1600-6143.2004.00505.x>

Zhang, Y., & Schmidt-Wolf, I. G. H. (2020). Ten-year update of the international registry on cytokine-induced killer cells in cancer immunotherapy. *Journal of Cellular Physiology*,

235(12), 9291-9303. <https://doi.org/10.1002/jcp.29827>

Zhang, Z., Zhang, J., Wherry, E. J., Jin, B., Xu, B., Zou, Z., Zhang, S., Li, B., Wang, H., Wu, H., Lau, G. K. K., Fu, Y., & Wang, F. (2008). Dynamic Programmed Death 1 Expression by Virus-Specific CD8 T Cells Correlates With the Outcome of Acute Hepatitis B. *Gastroenterology*, 134(7), 1938-1949.e3. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2008.03.037>

Zhou, W., Longmate, J., Lacey, S. F., Palmer, J. M., Gallez-Hawkins, G., Thao, L., Spielberger, R., Nakamura, R., Forman, S. J., Zaia, J. A., & Diamond, D. J. (2009). Impact of donor CMV status on viral infection and reconstitution of multifunction CMV-specific T cells in CMV-positive transplant recipients. *Blood*, 113(25), 6465-6476. <https://doi.org/10.1182/blood-2009-02-203307>

Zischke, J., Mamareli, P., Pokoyski, C., Gabaev, I., Buyny, S., Jacobs, R., Falk, C. S., Lochner, M., Sparwasser, T., Schulz, T. F., & Kay-Fedorov, P. C. (2017). The human cytomegalovirus glycoprotein pUL11 acts via CD45 to induce T cell IL-10 secretion. *PLoS Pathogens*, 13(6), e1006454. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1006454>

Zuhair, M., Smit, G. S. A., Wallis, G., Jabbar, F., Smith, C., Devleesschauwer, B., & Griffiths, P. (2019). Estimation of the worldwide seroprevalence of cytomegalovirus : A systematic review and meta-analysis. *Reviews in Medical Virology*, 29(3), e2034. <https://doi.org/10.1002/rmv.2034>

Titre : Caractérisation des populations lymphocytaires T CD8 spécifiques du cytomégalo-virus et restreintes par HLA-E chez des patients receveurs d'une transplantation rénale ou pulmonaire

Mots clés : Cytomégalo-virus, Lymphocytes T CD8, HLA-E, Transplantation, Rejet chronique

Résumé : L'infection par le cytomégalo-virus (HCMV) est un facteur de risque majeur en transplantation. Le HCMV induit chez l'hôte un ensemble de réponses immunes cellulaires dont la compréhension reste à améliorer pour une meilleure prise en charge des patients transplantés. Nous avons mis au point un protocole d'immunomarquage pour l'analyse quantitative et phénotypique, par cytométrie en flux spectrale pour étudier la diversité des réponses immunes induites par le HCMV. Il nous a permis de caractériser et de suivre des réponses lymphocytaires T et en particulier des T CD8+ dirigés contre des peptides de UL40 présentés par HLA-E (T CD8 HLA-E/UL40) après une infection chez des patients transplantés rénaux et pulmonaires. Nous montrons que les T CD8 HLA-E/UL40 mémoires se caractérisent par un profil

d'expression pour des marqueurs (dont CD56, CD57, PD1, CD62L) qui les distinguent d'autres réponses Tαβ CD8 telles que les T CD8 HLA-A2/pp65 mais les rapprochent d'autres populations impliquées dans le contrôle de l'infection à HCMV (NK NKG2C+ CD57+ et T TCRγδ δ2-). Chez les transplantés pulmonaires séropositifs pour le HCMV, la survenue du rejet chronique (CLAD) est associée à une altération précoce de la fréquence et du profil d'expression des réponses T CD8 HLA-E/UL40 et à une fréquence réduite des cellules NK et des T TCRγδ δ2+. En conclusion, nos résultats suggèrent un lien entre l'immunité anti-HCMV et le rejet chronique. L'identification d'un profil d'expression spécifique aux T CD8 HLA-E/UL40 pourrait aider à mieux détecter et mieux comprendre le rejet chronique.

Title : Characterization of cytomegalovirus-specific and HLA-E-restricted CD8 T lymphocyte populations in kidney or lung transplant recipients.

Keywords : Cytomegalovirus, CD8 T lymphocytes, HLA-E, Transplantation, Chronic rejection

Abstract: Cytomegalovirus (HCMV) infection is a major risk factor in transplantation. HCMV induces in the host a set of cellular immune responses whose understanding still needs to be improved for better management of transplant patients. We set up an immunostaining protocol for the quantitative and phenotypic analysis, by spectral flow cytometry, to study the diversity of immune responses induced by HCMV. This has enabled us to characterize and monitor T cell responses and in particular CD8+ T cells directed against UL40 peptides presented by the HLA-E molecules (HLA-E/UL40 CD8 T) after infection in kidney and lung transplant patients. We show that memory HLA-E/UL40 CD8 T cells are characterized by an unusual expression profile for a set of markers (including CD56, CD57,

PD1, CD62L) that distinguish them from other CD8 αβT responses such as CD8 HLA-A2/pp65 T cells but bring them closer to other populations involved in the control of HCMV infection (NK NKG2C+CD57+ and TCRγδ δ2-T). In HCMV-seropositive lung transplant recipients, the onset of chronic lung allograft rejection (CLAD) is associated with an early alteration in the frequency and expression profile of HLA-E/UL40 CD8 T responses and with a reduced frequency of NK cells and TCRγδ δ2+ T cells. In conclusion, our results suggest a link between anti-HCMV immunity and chronic rejection. The identification of an expression profile specific to HLA-E/UL40 CD8 T cells could help to better detect and better understand chronic lung allograft rejection.