

UNIVERSITÉ DE NANTES
FACULTÉ DE PHARMACIE

ÉCOLE DOCTORALE BIOLOGIE SANTÉ

Année 2013

Contribution des cellules NK KIR⁺ au contrôle de
l'infection à cytomégalovirus :
implication en greffes allogéniques

THÈSE DE DOCTORAT

Discipline : Biologie, Médecine et Santé

Spécialité : Immunologie

*Présentée
et soutenue publiquement par*

Zakia DJAOUD

le 21 octobre 2013, devant le jury ci-dessous :

Dr. Anne CAIGNARD, INSERM UMR 1016 - Université Paris Descartes

Dr. Vincent VIEILLARD, INSERM UMR-S 945 - Université Pierre et Marie Curie

Prof. Nadine GERVOIS, INSERM UMR 892 - Université de Nantes

Directrice de thèse : Dr. Christelle RETIERE, Établissement Français du Sang, Nantes

Remerciements

Je tiens tout d'abord à exprimer ma profonde gratitude au Docteur Christelle Retière pour m'avoir accueillie au sein de son équipe de recherche, pour sa confiance, sa disponibilité et son soutien tout au long de ces trois années de thèse.

J'adresse ensuite mes sincères remerciements :

- Au Docteur Thierry Schneider de m'avoir accueillie au sein du laboratoire de recherche de l'Établissement Français du Sang, ainsi qu'à l'Association Nationale de la Recherche et de la Technologie (ANRT) pour le financement CIFRE dont j'ai bénéficié pour la réalisation de ce travail.

- Aux Docteurs Anne Caignard et Vincent Vieillard et au Professeur Nadine Gervois, de porter un intérêt pour mon travail de recherche et d'avoir accepté de faire partie de mon jury de thèse.

- Au Docteur Marc Bonneville, pour ses précieuses suggestions.

- Aux Docteurs Béatrice Charreau et Jean-François Fonteneau, membres de mon comité de thèse, pour les conseils prodigués au cours des réunions annuelles.

- Au Docteur Katia Gagne, pour ses conseils, son humour et sa bonne humeur.

- À Gaëlle David, pour son intérêt pour mon travail et sa collaboration et à Catherine Willem et Nolwenn Legrand pour leur aide et leur soutien amical.

- À Pauline Rettman, pour son amitié et tous les moments qu'on a passés ensemble.

- À tous les étudiants et techniciens que j'ai eu la chance d'encadrer ou de côtoyer : Souad Mehlal, Maëva Peneau, Simon Lorand, Sountid Ly, Guillaume Vinet et Marine Freuchet.

- À toutes les équipes des laboratoires HLA, des bioréactifs, des prélèvements et d'immunohématologie ainsi que tous les salariés de l'EFS avec qui j'ai pu avoir des échanges tout au long de ces trois années.

- À tous les donneurs de sang !

- Au Docteur Céline Bressollette, au Professeur Berthe-Marie Imbert-Marcille et à tous les membres de l'EA4271 pour les interactions enrichissantes qu'on a eues, notamment au cours des journal-clubs.

- À l'équipe du Docteur Béatrice Charreau, pour leur collaboration dans le projet NK-EC.

- À Joëlle Denetz, Grégory Koné et Chantal Denain pour leur disponibilité au niveau de l'école doctorale.

Pour finir, j'exprime toute ma reconnaissance et mon affection à mon mari, à mes parents et à mon frère qui a toujours cru en moi.

«C'est ce que nous pensons déjà connaître qui nous empêche souvent d'apprendre.»
Claude Bernard, Cahier de Notes, 1850-1860.

À Pierre.

SOMMAIRE

LISTE DES ABREVIATIONS	1
LISTE DES FIGURES ET TABLEAUX	4
INTRODUCTION GENERALE	5
I. L'immunité innée et l'immunité adaptative	6
II. Les cellules <i>Natural Killer</i>	12
1. Historique	12
2. Caractéristiques générales	12
2.1. La lyse spontanée	13
2.1.1. La reconnaissance du «soi manquant» («missing self»)	13
2.1.2. La reconnaissance du soi induit par le stress cellulaire	14
2.1.3. La reconnaissance du non-soi infectieux	14
2.2. La cytotoxicité cellulaire dépendante de l'anticorps	15
3. Les récepteurs des cellules NK	17
3.1. Les <i>Killer cell Immunoglobulin-like Receptors</i> (KIR)	17
3.1.1. Les gènes KIR	18
3.1.2. Nomenclature et classification des récepteurs KIR	20
3.1.3. Ligands des récepteurs KIR	22
3.2. Les récepteurs de la famille des <i>Immunoglobulin-like transcripts</i> (ILT)	24
3.3. Les hétérodimères CD94/NGG2	25
3.4. Le NKR-P1A (CD161)	27
3.5. Le NKG2D	27
3.6. Les récepteurs de cytotoxicité naturelle (NCR)	29
3.6.1. Le NKp46	29
3.6.2. Le NKp44	30
3.6.3. Le NKp30	30
3.7. Le DNAM-1 (<i>DNAX accessory molecule-1</i>)	31
3.8. Le 2B4	31
3.9. Le NKp80	33
3.10. Le CD16	33
3.11. Les TLR	34
3.12. Les récepteurs de costimulation	34
3.13. Les récepteurs aux cytokines et les récepteurs impliqués dans le trafic des cellules NK	35
4. Les grandes fonctions des cellules NK	37
4.1. La cytotoxicité des cellules NK	37
4.2. Production de cytokines par les cellules NK	39
4.3. La prolifération des cellules NK	40
5. Développement des cellules NK	41
5.1. Lieux et étapes du développement des cellules NK	41
5.2. Les sous-types NK	43
5.3. Education et tolérance des cellules NK	45
• Modèles proposés pour l'éducation des cellules NK	46
5.4. «Mémoire» des cellules NK	49
6. Les cellules NK et les greffes	51
6.1. Les cellules NK en greffe de CSH	51
6.1.1. La greffe de CSH	51
6.1.2. L'alloréactivité des cellules NK KIR ⁺ en greffe de CSH	52
6.1.3. Le rôle des récepteurs KIR activateurs en greffe de CSH	54
6.2. Les cellules NK en greffes d'organes solides	55
7. Les cellules NK et les cancers	56

8. Les cellules NK dans le contrôle des infections virales -----	60
8.1. Le CMV -----	61
8.1.1. Historique -----	61
8.1.2. Généralités -----	61
8.1.3. Structure-----	62
a. Le génome viral -----	63
b. La capside -----	64
c. L'enveloppe -----	64
d. Le tégument-----	65
8.1.4. Cycle réplcatif du CMV humain-----	65
a. Phase très précoce -----	66
b. Phase précoce -----	67
c. Phase tardive-----	67
8.1.5. L'infection par le CMV humain -----	69
8.1.6. Echappement du CMV au système immunitaire -----	70
a. Echappement à la reconnaissance par les lymphocytes T CD4+ et T CD8+ -----	70
b. Échappement à la reconnaissance par les cellules NK -----	72
8.2. Autres herpesvirus -----	75
8.3. Le virus influenza -----	76
8.4. Le virus de l'hépatite C-----	76
8.5. Le VIH -----	77
9. Les cellules NK dans le contrôle des infections bactériennes et parasitaires -----	79
10. Les cellules NK et l'autoimmunité -----	80
 OBJECTIFS DU TRAVAIL DE THESE -----	 82
 RESULTATS -----	 86
 PROJET N°1 : ETUDE DU ROLE DES RECEPTEURS KIR DANS LE CONTROLE DE L'INFECTION A CMV DANS UN MODELE DE CELLULES DENDRITIQUES ALLOGENIQUES INFECTEES PAR LE VIRUS. -----	 87
 PROJET N°2 : ETUDE DES SPECIFICITES DES RECEPTEURS KIR2D ET DE LEUR IMPACT SUR LA FORMATION DU REPERTOIRE NK KIR2D.-----	 100
 PROJET N°3 : ETUDE DE L'IMPACT DES PROTEINES VIRALES IE1 ET PP65 SUR LA PROLIFERATION DES SOUS-POPULATIONS NK KIR⁺. -----	 116
 PROJET N°4 : ETUDE DU ROLE DES CELLULES NK DANS LE CONTROLE DE L'INFECTION A CYTOMEGALOVIRUS DANS UN MODELE D'INFECTION DE CELLULES ENDOTHELIALES PRIMAIRES : IMPLICATIONS EN TRANSPLANTATION RENALE.-----	 138
 DISCUSSION ET PERSPECTIVES -----	 162
 BIBLIOGRAPHIE -----	 176
 ANNEXE -----	 219

Liste des abréviations

ADCC : Antibody Dependent Cellular Cytotoxicity
ADN : Acide DésoxyriboNucléique
AICL : Activation Induced C-type Lectin
ARNdb : Acide RiboNucléique double brin
ARNm : Acide RiboNucléique messenger
 β 2m : beta-2-microglobuline
BAT-3 : HLA-B Associated Transcript 3
BCR : B Cell Receptor
CD : Cluster de différenciation
CMH : Complexe Majeur d'Histocompatibilité
CMV : Cytomegalovirus
CPA : Cellule Présentatrice d'Antigène
CpG : Cytosine-phosphate-Guanine
CRE : Cyclic AMP Responsive Element
CSH : Cellules Souches Hématopoïétiques
CTL : Cytotoxic T cell
DAP : DNAX Activation Protein
DC : Dendritic Cell
DNAM-1 : DNAX Accessory Molecule 1
EBV : Epstein-Barr Virus
EFS : Établissement Français du Sang
EGFR : Epidermal Growth Factor Receptor
GALT : Gut Associated Lymphoid Tissue
GM-CSF : Granulocyte Macrophage-Colony Stimulating Factor
GvHD : Graft *versus* Host Disease
GvL : Graft *versus* Leukemia
HA : Hemagglutinine
HAEC : Human Aortic Endothelial Cells
HCV : Hepatitis C Virus
HHV : Human Herpes Virus
HLA : Human Leukocyte Antigen
HSP : Heat Shock Protein
HSV : Herpes Simplex Virus
HUVEC : Human Umbilical Veinule Endothelial Cells
ICAM : InterCellular Adhesion Molecule
iDC : immature DC
IE : Immediate Early
IFN- γ : Interferon gamma

Ig : Immunoglobuline
 IL : Interleukine
 ILT : Immunoglobulin-Like Transcript
 IRL : Internal Repeat Long
 IRS : Internal Repeat Short
 ITAM : Immunoreceptor Tyrosine-based Activation Motif
 ITIM : Immunoreceptor Tyrosine-based Inhibition Motif
 ITSM : Immunoreceptor Tyrosine-based Switch Motif
 KIR : Killer cell Immunoglobulin-like Receptor
 LAL : Leucémie Aigüe Lymphoïde
 LAM : Leucémie Aigüe Myéloïde
 LAMP : Lysosomal-Associated Membrane Protein
 LMC : Leucémie Myéloïde Chronique
 LFA-1 : Leukocyte Function-associated Antigen-1
 LI(L)R : Leukocyte Immunoglobulin-like Receptor
 LLT : Lectin-Like Transcript
 LPG : LipoPhosphoGlycane
 LRC : Leukocyte Receptor Complex
 mC-BP : minor Capsid-Binding Protein
 MCMV : murine CMV
 mCP : minor Capsid Protein
 MCP : Major Capsid Protein
 MIC-A, -B : MHC class I related protein A, B
 MIEP : Major Immediate Early Promotor
 MPR : Mannose-6-Phosphate Receptor
 NCR : Natural Cytotoxicity Receptor
 Nef : Negative factor
 NF κ B : Nuclear Factor-kappa B
 NK : Natural Killer
 NKG2 : Natural-Killer Group 2
 NOD : None-Obese Diabetic
 ORF : Open Reading Frame
 PAMP : Pathogen-Associated Molecular Pattern
 PBMC : Peripheral Blood Mononuclear Cell
 PCR-SSP : Polymerase Chain Reaction-Sequence Specific Primer
 PDGFR : Platelet-Derived Growth Factor-alpha Receptor
 PRR : Pattern Recognition Receptor
 PVR : Polio Virus Receptor
 RAET-1 : Retinoic Acid Early Transcript-1
 RARE : Retinoic Acid Responsive Element
 S1P5 : Sphingosine 1-Phosphate receptor
 SAP : SLAM Associated Protein
 SCID : Severe Combined Immuno-Deficient

SCP : Smallest Capsid Protein
SIDA : Syndrome de l'ImmunoDéficiency Acquis
SLAM : Signaling Lymphocytic Activation Molecule
SyK : Spleen tyrosine Kinase
TAP : Transporter Associated with antigen Processing
TcR : T cell Receptor
TGF- β : Transforming Growth Factor beta
TLR : Toll-Like Receptor
TNF : Tumor Necrosis Factor
TRAIL : TNF related Apoptosis Inducing Ligand
TRL : Terminal Repeat Long
TRS : Terminal Repeat Short
UL : Unique Long
ULBP : UL16 Binding Protein
US : Unique Short
VIH : Virus de l'Immunodéficience Humaine
XLP : syndrome lymphoprolifératif lié à l'X
ZAP 70 : Zeta chain Associated Protein kinase 70

Liste des figures et tableaux

Figure 1 : Le complexe HLA.-----	8
Figure 2 : Structure des molécules HLA de classe I et II. -----	9
Figure 3 : Protagonistes de l'immunité innée et de l'immunité adaptative. -----	11
Figure 4 : Balance entre signaux activateurs et signaux inhibiteurs déterminant l'induction ou l'inhibition de la cytotoxicité des cellules NK.-----	16
Figure 5 : Les récepteurs des cellules NK. -----	17
Figure 6 : Organisation des gènes KIR. -----	20
Figure 7 : Structure des récepteurs KIR.-----	22
Figure 8 : Les récepteurs KIR et leurs ligands. -----	24
Figure 9 : Les voies de signalisation de 2B4.-----	33
Figure 10 : Rôle des récepteurs aux chimiokines dans la migration des cellules NK.-----	36
Figure 11 : La cytotoxicité des cellules NK. -----	39
Figure 12 : Modèle de développement des cellules NK. -----	43
Figure 13 : Sous-types phénotypiques et fonctionnels des cellules NK : CD56 ^{bright} et CD56 ^{dim} . -----	44
Figure 14 : Modèles de l'éducation des cellules NK. -----	47
Figure 15 : L'alloréactivité des cellules NK en greffe de CSH. -----	53
Figure 16 : Structure du CMV humain. -----	62
Figure 17 : Les quatre isomères du génome viral. -----	64
Figure 18 : Le cycle réplicatif du CMV humain. -----	69
Figure 19 : Homologie de la glycoprotéine virale UL18 avec la molécule HLA-A2. -----	73
Figure 20 : Mécanismes d'échappement du CMV aux cellules NK. -----	75
Figure 21 : Alloréactivité des cellules NK en greffes de CSH et de rein, dans l'infection à CMV. -----	175
Tableau 1 : Classification des herpes virus. -----	62
Tableau 2 : Associations génétiques KIR, KIR/HLA, prédisposantes aux maladies auto-immunes. -----	81

INTRODUCTION GÉNÉRALE

I. L'immunité innée et l'immunité adaptative

Le système immunitaire représente l'ensemble des éléments biologiques de défense contre les agents pathogènes. Il est capable de discriminer le « soi » du « non-soi ». Chez les vertébrés, ce système est classiquement divisé en immunité naturelle ou innée et immunité adaptative ou acquise. L'immunité innée (principalement assurée par le système du complément, les polynucléaires, les monocytes, les macrophages, les cellules dendritiques, les lymphocytes $T\gamma\delta$ et les lymphocytes NK) est considérée comme la première ligne de défense contre les agents pathogènes car elle est immédiate et ne nécessite pas d'immunisation préalable. Certaines cellules de l'immunité innée reconnaissent des motifs pathogéniques invariants, nommés PAMP (Pathogen-Associated Molecular Patterns), par un nombre limité de récepteurs connus sous le nom de PRR (Pattern-Recognition Receptors). Ceci conduit notamment à la production de médiateurs inflammatoires (IL-1, TNF- α , IL-6, IFN type 1 et différentes chimiokines) (Medzhitov and Janeway 1997) qui vont recruter différents acteurs immunitaires sur le site de l'inflammation.

L'immunité adaptative est nécessaire pour combattre une plus large gamme de pathogènes. Elle est assurée par les lymphocytes B et T, dotés de récepteurs capables d'une très grande spécificité antigénique. Le récepteur du lymphocyte B, le BCR, est une immunoglobuline membranaire. Lorsqu'il rencontre son antigène, le lymphocyte se différencie en plasmocyte et produit des immunoglobulines solubles, dites anticorps, de même spécificité antigénique, capables de neutraliser le pathogène dans le milieu extracellulaire. C'est la réponse humorale. Le récepteur du lymphocyte T, le TcR, est une protéine membranaire qui, contrairement au BCR, ne fixe pas l'antigène, mais reconnaît un court fragment peptidique de la protéine antigénique. Celui-ci lui est rendu accessible grâce à une fonction, dite *présentation de l'antigène*, qui est assurée par les molécules du CMH (Complexe Majeur d'Histocompatibilité).

Le CMH représente le complexe génique le plus polymorphe chez l'homme. Ce polymorphisme est le déterminant principal de l'acceptation ou du

rejet de greffes entre donneurs et receveurs, ce qui fut à l'origine de sa découverte par Jean Dausset, en 1958, et de sa dénomination. Chez l'homme, le CMH est dénommé HLA (Human Leukocyte Antigen) car la première molécule d'histocompatibilité identifiée avait été repérée sur les leucocytes.

Le complexe génique HLA est localisé sur le bras court du chromosome 6. Pour chaque individu, il y a une expression de deux allotypes portés chacun sur un chromosome. Ainsi, en plus de son important polymorphisme génique et allélique, le système HLA est caractérisé aussi par une codominance et une transmission en haplotype. Le complexe génique HLA est subdivisé en trois régions : le HLA de classe I, le HLA de classe II et le HLA de classe III (Fig.1). Le HLA de classe I comprend trois gènes HLA classiques, les HLA-A, -B et -C. Le HLA de classe II comprend trois gènes HLA classiques, le HLA-DP (DPA et DPB), -DQ (DQA et DQB) et -DR (DRA et DRB). Il existe d'autres gènes HLA de classe I et II dits «non classiques» présentant une structure proche, plus ou moins polymorphe. Enfin, le HLA de classe III est situé entre les HLA de classe I et II et code des protéines qui ne sont pas impliquées dans la présentation antigénique (Fig. 1).

La nomenclature HLA est harmonisée au niveau international. Elle inclut le nom du gène, suivi des numéros de la famille allélique et de l'allèle dans cette famille (séparés par * et :). Exemples : HLA-C*01:06, HLA-DRB1*01:04...

Chromosome 6

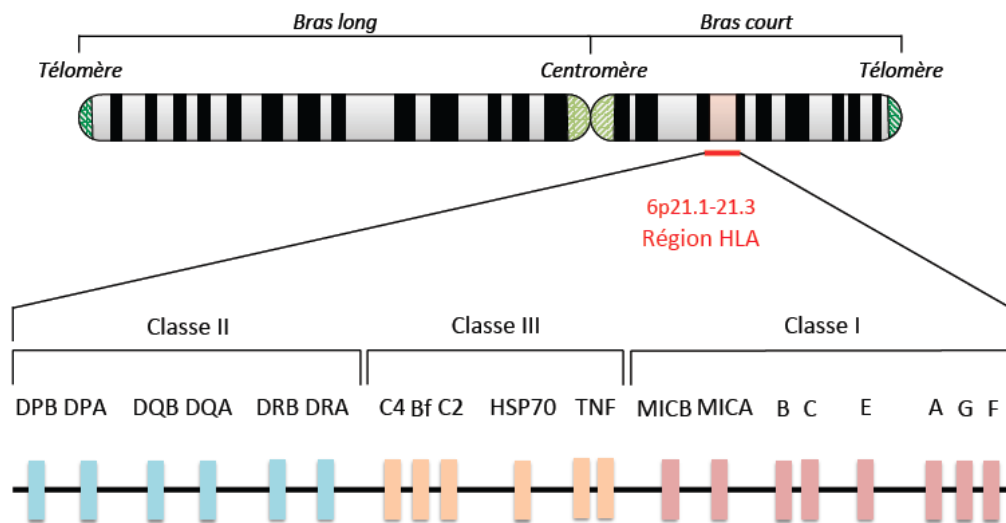


Figure 1 : Le complexe HLA. Le complexe HLA est situé sur le bras court du chromosome 6. Il comprend le HLA de classe I, le HLA de classe II et le HLA de classe III. Le HLA de classe I contient essentiellement des gènes HLA classiques (HLA-A, HLA-B et HLA-C), non classiques (HLA-E, HLA-F et HLA-G) et les gènes MICA et MICB (*MHC class-I-chain-related protein A/B*). Le HLA de classe II comprend des gènes HLA classiques (DP, DQ et DR) ainsi que des gènes non classiques qui ne sont pas représentés ici. Le HLA de classe III, situé entre les HLA de classe I et II, comprend des gènes qui codent notamment des protéines qui font partie du système du complément, les protéines du choc thermique HSP70 et les TNF.

Les molécules HLA de classe I sont exprimées sur pratiquement toutes les cellules nucléées. L'expression des molécules HLA de classe II est limitée, à l'état basal, aux cellules dites *présentatrices de l'antigène* (CPA). Ces deux classes de molécules HLA présentent les antigènes, respectivement aux lymphocytes T CD8⁺ et T CD4⁺. D'autres cellules du système immunitaire, les cellules NK, expriment différents récepteurs capables de reconnaître certaines molécules HLA de classe I.

Les molécules HLA de classe I et II sont des glycoprotéines membranaires hétérodimériques, dont les chaînes α et β s'apparient de façon non covalente. Une molécule HLA de classe I est constituée d'une chaîne α ancrée dans la membrane et possédant trois domaines extracellulaires. Son domaine proximal $\alpha 3$ s'associe à la protéine invariante $\beta 2$ -microglobuline ($\beta 2m$) dont le gène ne fait pas partie du complexe HLA. Les domaines distaux $\alpha 1$ et $\alpha 2$ délimitent le sillon de présentation qui fixe des petits peptides d'environ 9 acides aminés. Une

molécule HLA de classe II est constituée de deux chaînes α et β ancrées dans la membrane et comportant chacune deux domaines extracellulaires. Le sillon de présentation peptidique est délimité par l'appariement des deux domaines distaux $\alpha 1$ et $\beta 1$ et peut fixer des peptides de 12 à 25 acides aminés (Fig. 2).

Le chargement peptidique stabilise la molécule HLA et maintient son expression à la surface cellulaire. Le sillon de présentation lie des peptides dont deux à quatre acides aminés seulement doivent se nicher dans ses «poches d'ancrage». Ainsi, des peptides de séquences différentes peuvent se fixer sur des molécules HLA codées par un même allèle, à partir du moment où ils correspondent aux critères de taille et d'ancrage.

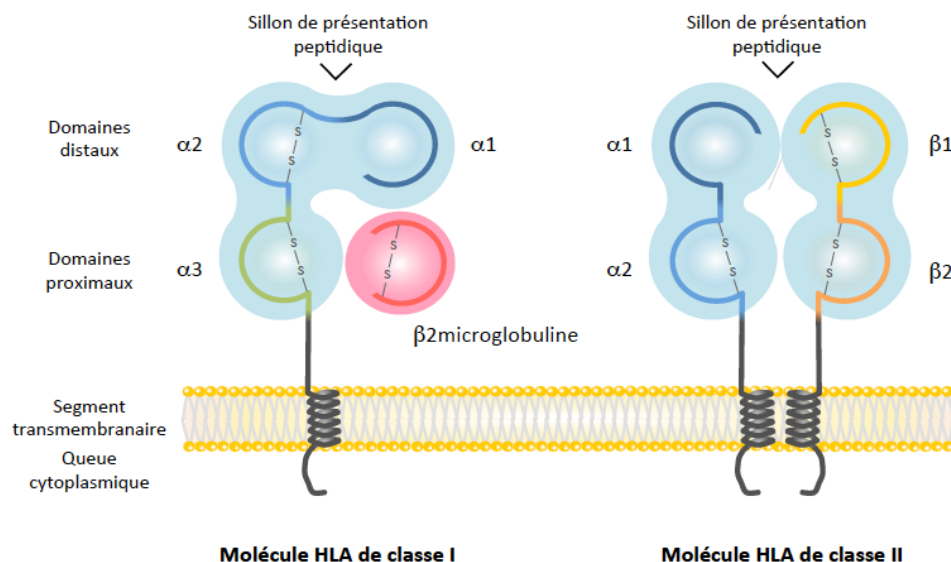


Figure 2 : Structure des molécules HLA de classe I et II. Une molécule HLA de classe I est une glycoprotéine constituée d'une chaîne α à trois domaines extracellulaires. Son domaine proximal $\alpha 3$ s'associe à la protéine $\beta 2m$ et ses domaines distaux $\alpha 1$ et $\alpha 2$ délimitent le sillon de présentation peptidique. Une molécule HLA de classe II est une glycoprotéine constituée de deux chaînes α et β comportant chacune deux domaines extracellulaires. Le sillon de présentation peptidique est délimité par l'appariement des deux domaines distaux $\alpha 1$ et $\beta 1$.

Les lymphocytes T sont dits naïfs avant de rencontrer l'antigène présenté par les molécules HLA et deviennent effecteurs après l'avoir rencontré. Certaines de ces cellules spécialisées se différencient en cellules mémoires capables d'assurer une immunité de longue durée. La large gamme de spécificité des récepteurs d'antigènes exprimés par les lymphocytes B et T s'explique par la variation de la séquence en acides aminés au niveau du site de liaison avec l'antigène (région variable V). Comme la taille du génome dans sa totalité ne suffit pas pour coder chaque variété de récepteur, le système immunitaire a mis en place un mécanisme génétique complexe et ingénieux pour produire ces protéines hautement variables. En effet, dans les lymphocytes en développement, les régions V sont codées par plusieurs segments géniques qui sont assemblés par des réarrangements somatiques de l'ADN.

La distinction entre l'immunité innée et l'immunité adaptative n'est donc pas exclusive. En effet, certaines cellules de l'immunité innée, essentiellement des cellules dendritiques (DC), sont des cellules présentatrices qui capturent l'antigène du pathogène en périphérie. Ces cellules migrent ensuite dans les organes lymphoïdes où elles présentent des peptides antigéniques, chargés sur leurs molécules HLA de classe I et II, aux lymphocytes T CD8⁺ et T CD4⁺, respectivement. Ceci conduit à une activation des lymphocytes T et B, et donc au déclenchement de la réponse adaptative (Fig. 3). Les cellules dendritiques sont ainsi à l'interface de l'immunité innée et de l'immunité adaptative. Elles sont phagocytaires lorsqu'elles sont immatures et deviennent présentatrices de l'antigène, une fois matures.

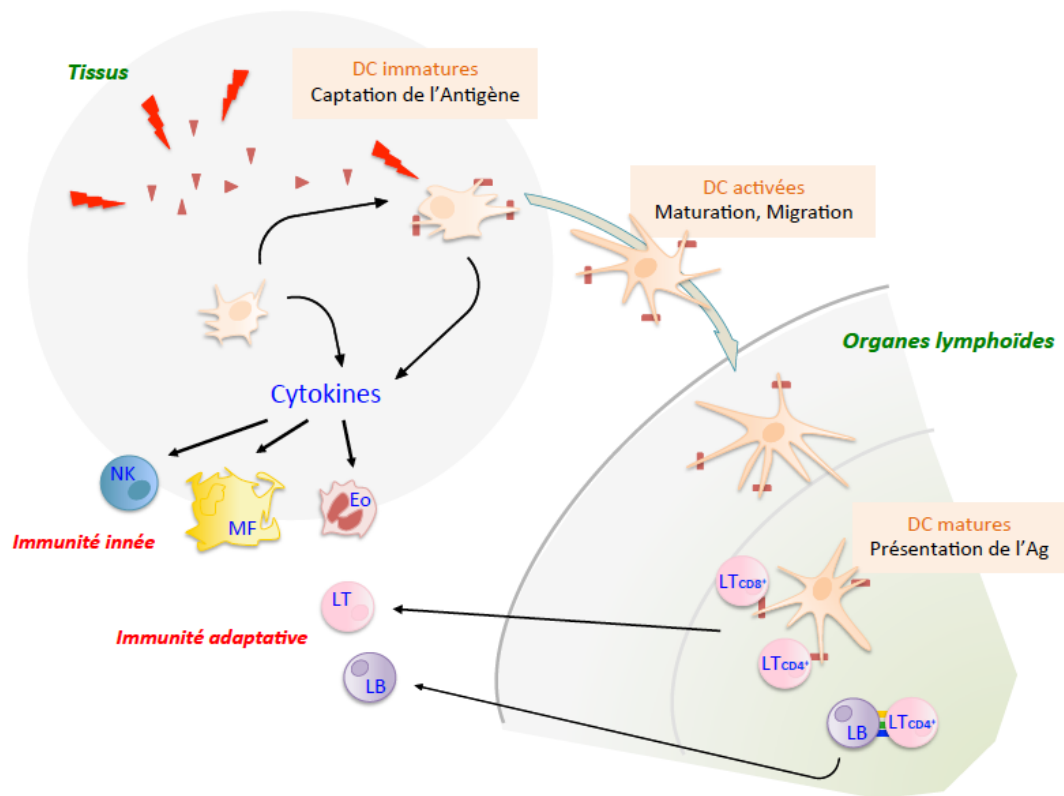


Figure 3 : Protagonistes de l'immunité innée et de l'immunité adaptative. La captation des protéines antigéniques par les DC immatures conduit à la maturation de celles-ci qui vont produire des médiateurs de l'inflammation et recruter différents acteurs de l'immunité innée sur le site inflammatoire. Les DC immatures vont ensuite migrer dans les organes lymphoïdes où elles présentent des peptides antigéniques aux lymphocytes T $CD4^+$ et T $CD8^+$. Les lymphocytes T $CD4^+$ seront ainsi activés et vont activer à leur tour les lymphocytes B. L'ensemble de ces lymphocytes va migrer vers le site inflammatoire pour initier une réponse immunitaire adaptative.

II. Les cellules *Natural Killer*

1. Historique

Les cellules *Natural Killer* (NK) ont été découvertes en 1975 (Herberman, Nunn, and Lavrin 1975; Kiessling, Klein, and Wigzell 1975) lors d'expériences destinées à étudier la capacité des lymphocytes T à lyser des cellules tumorales contre lesquelles des souris avaient été préalablement immunisées. Ces travaux ont montré que certaines cellules, à aspect lymphocytaire granuleux, étaient capables de tuer les cellules tumorales sans immunisation préalable. Ces cellules, capables d'une réactivité naturelle, sont ainsi nommées *Natural Killer*.

Plus tard, des études ont montré que les cellules NK ont une origine lymphoïde commune avec les lymphocytes T (Spits, Lanier, and Phillips 1995) mais, contrairement à ces derniers, elles ne requièrent pas des réarrangements géniques pour leur différenciation et l'acquisition de leurs fonctions (Hackett et al. 1986). On peut néanmoins noter que, les cellules NK peuvent avoir une origine myéloïde dans certaines conditions *in vitro* (Grzywacz et al. 2011).

Les cellules NK font donc partie du système immunitaire inné en raison de leurs récepteurs invariants et de leur capacité à lyser spontanément des cellules cibles sans nécessiter une immunisation préalable.

2. Caractéristiques générales

Les cellules NK sont classiquement définies comme étant CD3⁻ CD56⁺ chez l'homme (Robertson and Ritz 1990) et CD3⁻ NK1.1⁺ (CD161) chez la souris (Emmons and Pollack 1985). Des données plus récentes ont proposé un récepteur activateur, le NKp46, comme récepteur spécifique des cellules NK chez l'homme et la souris (S Sivori et al. 1997; Walzer et al. 2007).

Chez l'homme, ces cellules constituent 2 à 20% des lymphocytes circulants, mais elles sont également retrouvées dans les tissus périphériques comme les poumons, le foie, l'utérus, le pancréas, les tissus lymphoïdes associés au tube digestif (GALT), les articulations ou encore la peau (Shi et al. 2011).

Les cellules NK expriment une multitude de récepteurs activateurs et inhibiteurs dont nous parlerons plus loin. Grâce à ces récepteurs, elles peuvent reconnaître et lyser des cellules cibles dans des contextes singuliers, que nous allons développer ci-après (Fig. 4).

2.1. La lyse spontanée

2.1.1. La reconnaissance du «soi manquant» («missing self»)

La théorie du «soi manquant», énoncée par Klas Kärre en 1986 (Kärre et al. 1986), stipule que les cellules NK sont capables de reconnaître et de lyser les cellules cibles qui n'expriment pas les molécules du CMH de classe I du soi. Pour vérifier cette théorie, Klas Kärre et ses collègues ont inoculé deux lignées cellulaires tumorales, RMA (exprimant des molécules du CMH de classe I) et RMA-S (dépourvue de molécules du CMH de classe I) à des souris. La première lignée s'est développée en tumeurs. En revanche, les souris inoculées avec la lignée RMA-S, dépourvue de molécules du CMH de classe I, étaient en mesure de rejeter ces cellules tumorales. En déplétant les cellules NK des souris, les deux lignées tumorales ont donné des tumeurs chez les souris inoculées.

Cette théorie a été appuyée par la suite avec des études montrant que les cellules tumorales ou infectées par les virus, qui présentent peu de molécules du CMH de classe I à leur surface, ou encore les cellules saines allogéniques, qui n'expriment pas les molécules du CMH de classe I du soi, deviennent susceptibles à la lyse par les cellules NK (Kärre et al. 1986 ; Tay, Szomolanyi-Tsuda, and Welsh 1998 ; Y. Y. Yu, Kumar, and Bennett 1992). Selon cette théorie, les cellules NK seraient capables d'assurer, de cette façon, une immunosurveillance des cellules qui «downrégulent» leurs molécules du CMH de classe I, comme c'est souvent le cas lors de transformations cellulaires ou d'infections virales.

Les molécules du CMH de classe I sont exprimées par toutes les cellules nucléées de l'organisme et représentent le marqueur du soi. Cependant, il est important de souligner que la reconnaissance du « soi manquant » n'est pas suffisante pour déclencher une lyse spontanée par les cellules NK. Pour être cytotoxiques, ces cellules requièrent également une stimulation par des récepteurs activateurs dont les ligands sont exprimés sur les cellules cibles. Ainsi, l'activation ou

l'inhibition des cellules NK résultent d'une balance entre signaux activateurs et signaux inhibiteurs.

2.1.2. La reconnaissance du soi induit par le stress cellulaire

Dans certaines situations de stress, des signaux activateurs peuvent dominer les signaux inhibiteurs médiés par les molécules du CMH de classe I. Ceci peut survenir par exemple lorsque les cellules stressées se mettent à exprimer des ligands du soi pour le récepteur activateur NKG2D. Ces ligands présentent une homologie structurale avec les molécules du CMH de classe I. Chez l'homme, les ligands connus sont MICA, MICB, ULBP1-6 (*UL16 Binding Proteins1-6*) (Bauer et al. 1999 ; Cosman et al. 2001 ; Chalupny et al. 2003). Chez la souris, ce sont les protéines RAE-1, H60, et MULT1. Il est actuellement admis que NKG2D est impliqué dans l'immunité contre les tumeurs et les virus. En effet, la transfection de la lignée tumorale RMA avec RAE-1 ou H60, la rend vulnérable à la lyse par les cellules NK *in vitro* et *in vivo* (Diefenbach et al. 2001 ; Cerwenka, Baron, and Lanier 2001). Par ailleurs, le cytomégalo virus (CMV), aussi bien humain que murin, met en place différents mécanismes pour échapper aux réponses immunes dépendantes du NKG2D, ce qui met en évidence l'importance de ce récepteur.

2.1.3. La reconnaissance du non-soi infectieux

Dans certaines infections virales, les cellules NK peuvent reconnaître directement des protéines virales exprimées à la surface des cellules infectées. Pour cela, les cellules NK engagent généralement les récepteurs de la famille des NCR (NKp30, NKp44 et NKp46) qui interagissent, le plus souvent, avec des hémagglutinines virales (Mandelboim et al. 2001 ; Jarahian et al. 2009 ; Jarahian et al. 2011). Par ailleurs, dans l'infection à MCMV (*murine CMV*), la protéine virale m157 interagit avec le récepteur inhibiteur Ly49I, chez une souche de souris sensible à l'infection, et avec le récepteur activateur Ly49H, chez une autre souche de souris résistante à l'infection (Arase et al. 2002 ; Smith et al. 2002). Dans ce même contexte, un autre récepteur activateur, le Ly49P, reconnaît des

molécules du CMH de classe I associées à la glycoprotéine *m04/gp34* (Pyzik, Gendron-Pontbriand, and Vidal 2011).

D'autre part, le récepteur activateur NKp46 semble interagir aussi avec des ligands bactériens (Vankayalapati et al. 2002 ; Chaushu et al. 2012).

2.2. La cytotoxicité cellulaire dépendante de l'anticorps

Les cellules NK sont également capables d'ADCC (*Antibody Dependent Cellular Cytotoxicity*). En effet, elles expriment à leur surface le CD16 qui est un récepteur de faible affinité pour le fragment Fc-gamma des Ig (FcγIIIA). Dans ce processus, les antigènes tumoraux ou ceux des agents infectieux, exprimés à la surface des cellules cibles, sont recouverts par des IgG spécifiques. L'interaction du CD16 avec celles-ci entraîne une phosphorylation de sa chaîne ζ (Vivier et al. 1991), ce qui déclenche la lyse de la cellule cible par la cellule NK. Le lien entre l'immunité innée et l'immunité adaptative est ainsi établi. Ce mécanisme est aujourd'hui exploité dans des stratégies d'immunothérapie anti-cancéreuse basée sur l'utilisation des anticorps monoclonaux.

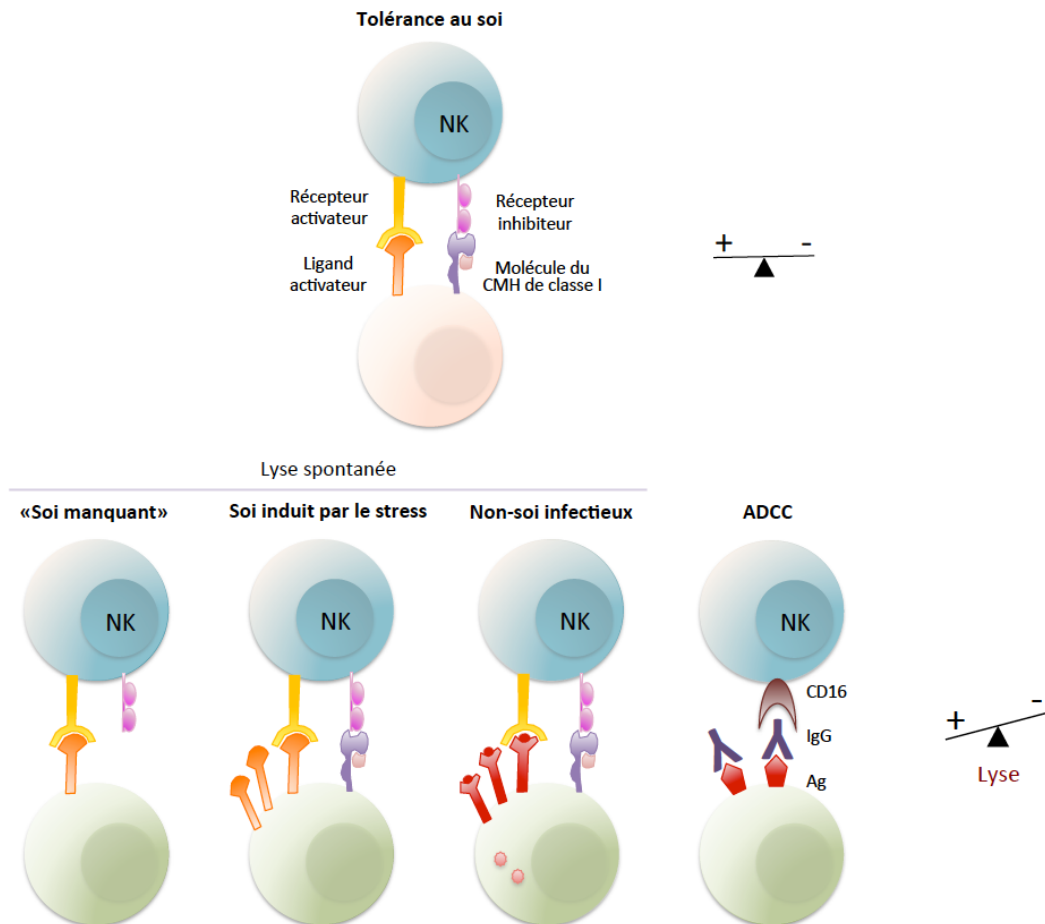


Figure 4 : Balance entre signaux activateurs et signaux inhibiteurs déterminant l'induction ou l'inhibition de la cytotoxicité des cellules NK. La tolérance au soi : l'équilibre entre les signaux médiés par les récepteurs inhibiteurs spécifiques du CMH de classe I, et les signaux médiés par les récepteurs activateurs, permet la tolérance au soi. **Le «soi manquant» :** l'absence d'engagement des récepteurs inhibiteurs spécifiques des molécules du CMH de classe I conduit à l'activation de la cellule NK qui va lyser spontanément la cellule cible. **Le soi induit par le stress :** la cellule «stressée» exprime des ligands du soi pour les récepteurs activateurs. Dans ce cas, les signaux médiés par l'engagement des récepteurs activateurs peuvent dominer les signaux médiés par l'engagement des récepteurs inhibiteurs spécifiques des molécules du CMH de classe I. Ceci conduit à la lyse spontanée de la cellule cible. **Le non soi infectieux :** l'infection d'une cellule cible par un agent pathogène peut conduire à l'expression en surface de protéines issues du pathogène, qui sont reconnues par des récepteurs activateurs, conduisant à une lyse spontanée de la cellule cible. **L'ADCC :** l'interaction du CD16 avec le fragment Fc d'une IgG fixée sur une cellule cible entraîne une activation de la cellule NK qui va lyser la cible.

3. Les récepteurs des cellules NK

L'activation d'une cellule NK dépend d'une balance entre signaux inhibiteurs et signaux activateurs qu'elle reçoit du fait de son grand nombre de récepteurs membranaires (Fig. 5). Le cumul des signaux détermine l'induction spontanée ou non des fonctions effectrices de la cellule NK. Les principaux récepteurs impliqués dans l'induction ou non de ces fonctions sont présentés ci-après.

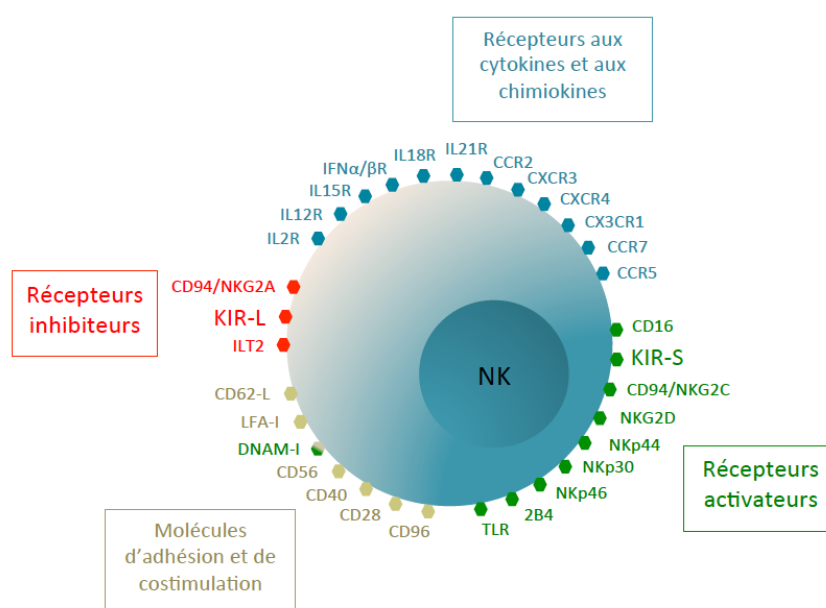


Figure 5 : Les récepteurs des cellules NK. Les cellules NK expriment plusieurs récepteurs de surface qui sont groupés en récepteurs activateurs, récepteurs inhibiteurs, récepteurs aux cytokines et aux chimiokines et molécules d'adhésion et de costimulation.

3.1. Les *Killer cell Immunoglobulin-like Receptors* (KIR)

Les KIR sont des récepteurs de la superfamille des immunoglobulines, découverts en 1990 (Moretta, Tambussi, et al. 1990). Ils reconnaissent les molécules HLA de classe I (Wagtmann et al. 1995) et sont exprimés principalement sur les cellules NK (Moretta, Bottino, et al. 1990 ; Litwin et al. 1994 ; Colonna and Samaridis 1995) et sur les lymphocytes T mémoires (Ferrini et al. 1994 ; Phillips et al. 1995). Ces récepteurs jouent un rôle clé dans la

reconnaissance du «soi manquant» (van Bergen et al. 2009) et dans l'éducation et la tolérance des cellules NK.

3.1.1. Les gènes KIR

Les gènes KIR sont situés sur le chromosome 19q13.4. Ils sont regroupés en 14 gènes (2DL1-2DL5, 3DL1-3DL3, 2DS1-2DS5 et 3DS1) et 2 pseudogènes, dans le complexe des récepteurs leucocytaires (LRC), où se trouvent d'autres gènes qui codent des récepteurs exprimés par les cellules NK comme le NKp46 et l'ILT-2 (Trowsdale et al. 2001). Ils codent des récepteurs KIR inhibiteurs (KIR2DL et KIR3DL) et des récepteurs KIR activateurs (KIR2DS et KIR3DS), dont nous discuterons la nomenclature plus loin.

Les gènes KIR contiennent au maximum 9 exons codants, organisés de la façon suivante : les deux premiers exons codent le peptide signal ; les exons 3-5 codent les domaines Ig extracellulaires D0, D1 et D2 ; l'exon 6 et le début de l'exon 7 codent la partie, dite «stem», qui relie la région transmembranaire, codée par une partie de l'exon 7, au domaine D2 ; la fin de l'exon 7 et les exons 8 et 9 codent la région intracytoplasmique (M. J. Wilson, Torkar, and Trowsdale 1997 ; Trowsdale et al. 2001) (Fig. 6).

Par ailleurs, les gènes KIR sont hautement polymorphes et sont organisés en 2 groupes d'haplotypes, A et B (Uhrberg et al. 1997). Des gènes conservés, KIR3DL3 (extrémité centromérique), KIR3DL2 (extrémité télomérique), KIR2DL4 et le pseudogène KIR3DP1 (centre) délimitent les régions variables où se trouvent les autres gènes KIR (M. J. Wilson et al. 2000 ; Parham 2005) (Fig. 6). Les haplotypes du groupe A possèdent un seul KIR activateur (KIR2DS4) et quatre KIR inhibiteurs (KIR2DL1, KIR2DL3, KIR3DL1 et KIR3DL2). Les haplotypes du groupe B, quant à eux, possèdent des gènes KIR inhibiteurs, mais également des gènes KIR qui sont propres au groupe B (des gènes KIR activateurs KIR2DS1, KIR2DS2, KIR2DS3, KIR2DS5 et KIR3DS1 ; des gènes KIR inhibiteurs KIR2DL2 et KIR2DL5). Ces derniers ont donc une plus grande variabilité car ils possèdent différentes combinaisons de gènes KIR activateurs et inhibiteurs. Le polymorphisme des KIR est dû, non seulement à la diversité des gènes

composant chaque haplotype, mais également à la diversité des allèles de chaque gène. Actuellement, tous les allèles KIR connus sont recensés sur une base de donnée en ligne (*The Immuno Polymorphism Database* (IPD) : (<http://www.ebi.ac.uk/ipd/>)) (Robinson et al. 2005).

Certains polymorphismes alléliques affectent l'expression du récepteur à la surface des cellules. C'est le cas, par exemple, du gène KIR3DL1*004 qui code une protéine détectable en intracellulaire mais pas en surface (Pando et al. 2003).

Par ailleurs, les récepteurs KIR sont exprimés de façon aléatoire sur les cellules NK et ont une distribution clonale (Moretta, Bottino, et al. 1990 ; Ciccone et al. 1992). Des études ont montré que l'expression de ces récepteurs est régulée à un niveau transcriptionnel par méthylation de l'ADN. En effet, les motifs CpG qui chevauchent la région du promoteur sont méthylés quand les gènes KIR sont silencieux et déméthylés quand ils sont actifs (Santourlidis et al. 2002 ; Chan et al. 2003 ; Chan et al. 2005). Une de ces études a également mesuré le degré d'acétylation des histones au niveau des gènes KIR silencieux et actifs et en a conclu que la méthylation des motifs CpG est le principal mécanisme de la transcription des gènes KIR (Chan et al. 2005).

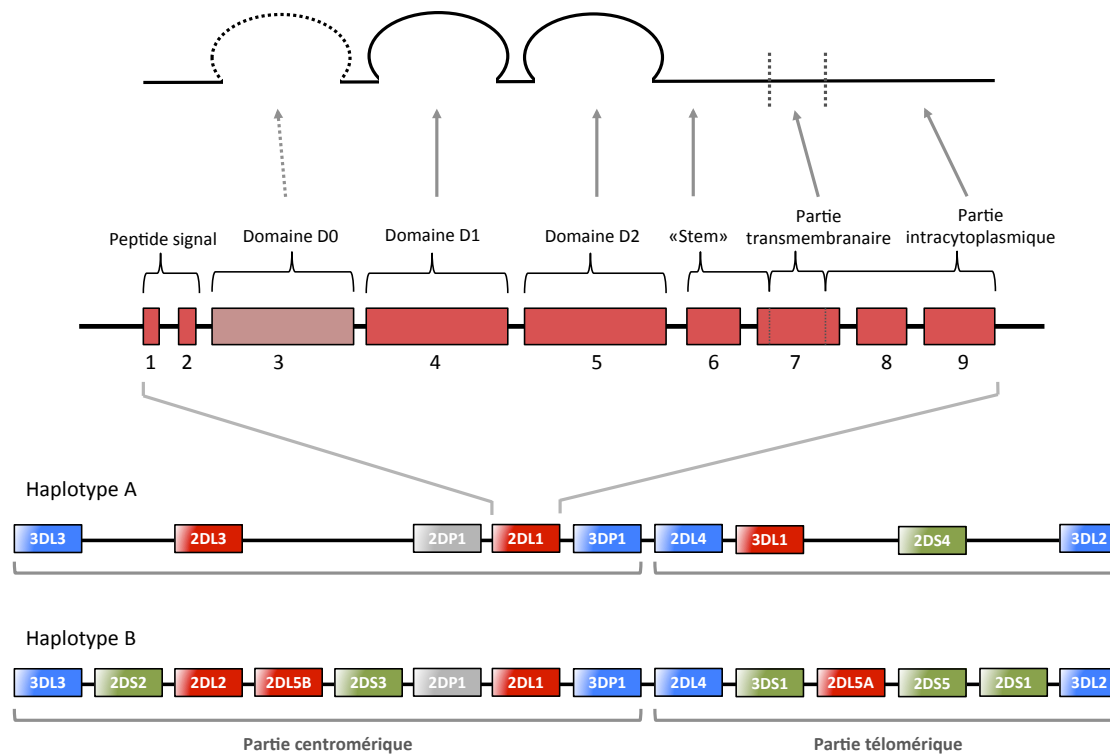


Figure 6 : Organisation des gènes KIR. Les gènes KIR sont organisés en deux groupes d'haplotypes, A et B, dont deux exemples sont illustrés ici. Les gènes conservés, dits «cadres», sont représentés en bleu. Les haplotypes du groupe A possèdent un seul KIR activateur, le KIR2DS4, représenté en vert, et des KIR inhibiteurs, représentés en rouge. Les haplotypes du groupe B possèdent plusieurs KIR activateurs et des KIR inhibiteurs. Le gène KIR2DL1, illustré ici, comprend 8 exons et le pseudoexon 3. Les deux premiers exons codent le peptide signal ; les exons 4-5 codent les domaines Ig extracellulaires D1 et D2 ; l'exon 6 et le début de l'exon 7 codent la partie «stem» qui relie la région transmembranaire au domaine D2. Une partie de l'exon 7 code la partie transmembranaire. La fin de l'exon 7 et les exons 8 et 9 codent la partie intracytoplasmique.

3.1.2. Nomenclature et classification des récepteurs KIR

La nomenclature des KIR a été établie par un comité créé en 2002, chargé de la nomenclature et du recensement des allèles KIR (Marsh et al. 2003 ; Robinson et al. 2005). Cette nomenclature est fonction de la structure des récepteurs (Fig. 7). Ainsi, les KIR sont des protéines de 306 à 456 acides aminés classées en KIR inhibiteurs et KIR activateurs. Ils ont deux ou trois domaines extracellulaires de type Ig (KIR2D et KIR3D). Les récepteurs KIR inhibiteurs diffèrent des KIR activateurs par le fait que les premiers possèdent une partie intracytoplasmique longue (KIR2DL, KIR3DL ; L pour *Long*), avec un ou, le plus souvent, deux motifs ITIM (Immunoreceptor Tyrosine-based Inhibition Motif).

Lorsque les KIR inhibiteurs sont engagés avec les molécules HLA de classe I, les tyrosines des domaines ITIM sont phosphorylées, ce qui conduit au recrutement des phosphatases (Burshtyn et al. 1996 ; Binstadt et al. 1996) et, ainsi, à l'inhibition des signaux délivrés par les récepteurs activateurs. Les KIR activateurs, quant à eux, ont des parties intracytoplasmiques courtes (KIR2DS, KIR3DS ; S pour *Short*) capables de s'associer à la protéine médiatrice DAP12 possédant des motifs ITAM (Immunoreceptor Tyrosine-based Activation Motif), grâce à un acide aminé chargé positivement au niveau de leur partie transmembranaire. L'engagement de ces récepteurs entraîne la phosphorylation des tyrosines des ITAM, ce qui conduit au recrutement des tyrosines kinases Syk et ZAP-70 (Lanier, Corliss, Wu, Leong, et al. 1998). Cependant, il existe une exception à cette dichotomie de la classification des KIR. Il s'agit du récepteur KIR2DL4 dont l'engagement avec son ligand peut délivrer aussi bien un signal activateur qu'un signal inhibiteur. Ce récepteur a une partie intracytoplasmique longue qui possède un seul motif ITIM. Il est également capable de s'associer à la protéine FcεRIγ qui possède des motifs ITAM. Le KIR2DL4 est fortement exprimé sur les cellules NK CD56^{high} et fonctionne le plus souvent comme un récepteur activateur de la production de cytokines par ces cellules (Kikuchi-Maki, Catina, and Campbell 2005; Rajagopalan, Fu, and Long 2001).

Les récepteurs KIR peuvent également être classés en fonction du nombre de domaines extracellulaires qu'ils possèdent. Ainsi, la plupart des KIR2D ont deux domaines extracellulaires, D1 et D2. A l'exception des KIR2DL4 et KIR2DL5 (KIR2D type II) dont les gènes contiennent l'exon 3 mais pas l'exon 4 (Vilches et al. 2000), les gènes de tous les autres KIR2D (KIR2D type I) contiennent 8 exons et le pseudoexon 3. Les KIR3D, quant à eux, ont 3 domaines extracellulaires, D0, D1 et D2 et sont codés par des gènes qui possèdent les neufs exons décrits précédemment. La présence du pseudoexon 3 dans les gènes KIR2D type I laisse suggérer que ces derniers ont évolué à partir des KIR3D (Moesta and Parham 2012).

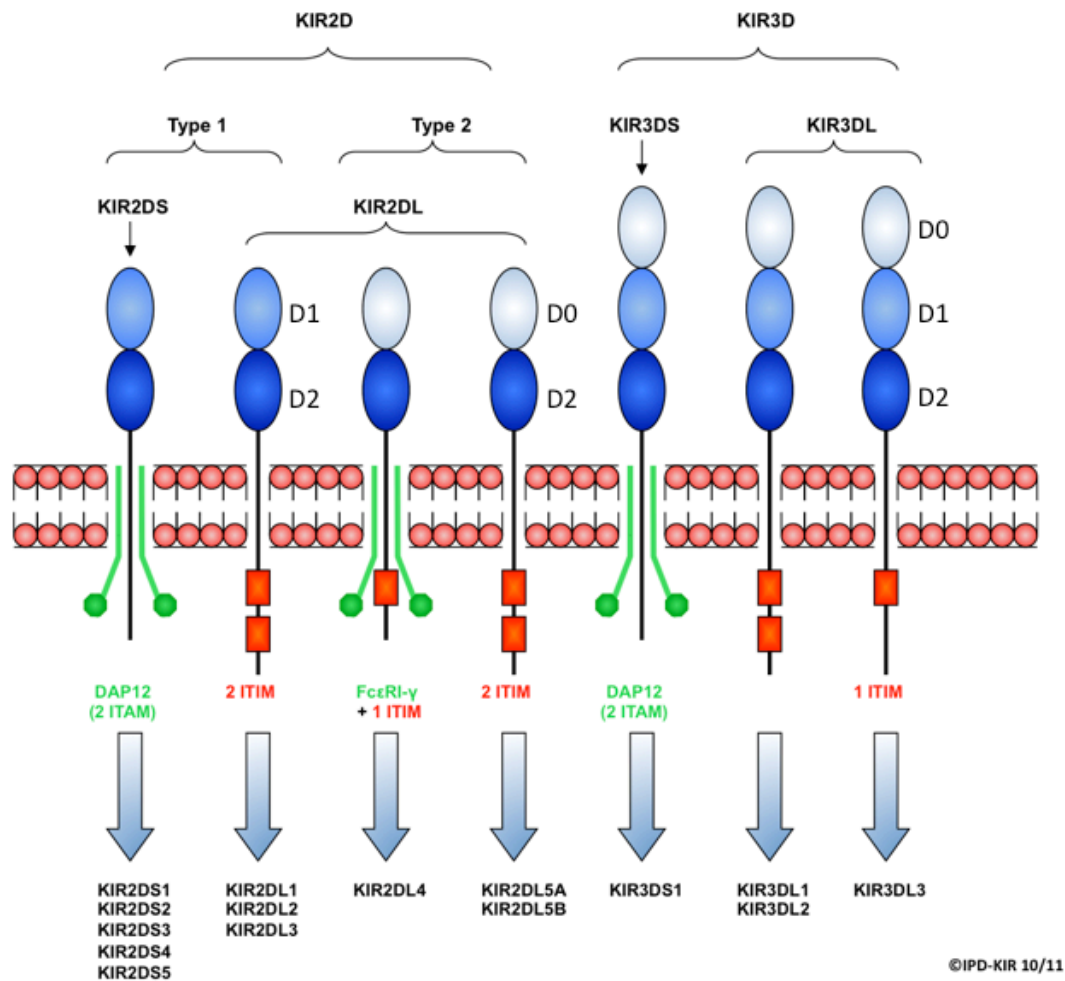


Figure 7 : Structure des récepteurs KIR. (<http://www.ebi.ac.uk/ipd/>). Les récepteurs KIR possèdent deux ou trois domaines *Ig-like* extracellulaires (KIR2D ou KIR3D) et une partie intracytoplasmique longue (KIR2DL, KIR3DL) ou courte (KIR2DS, KIR3DS). Les KIR2D de type I possèdent les domaines D1 et D2. Les KIR2D de type 2 possèdent les domaines D0 et D2. Les KIR3D possèdent les trois domaines D0, D1 et D2. Les KIR2DL, KIR3DL et KIR2DL4 possèdent dans leurs parties intracytoplasmiques un ou deux motifs ITIM. Les KIR2DS, KIR3DS et KIR2DL4 sont capables de s'associer à une protéine adaptatrice qui délivre un signal activateur.

3.1.3. Ligands des récepteurs KIR

Les KIR inhibiteurs reconnaissent les molécules HLA de classe I et sont les récepteurs inhibiteurs les plus impliqués dans la reconnaissance du «soi manquant» et l'éducation des cellules NK chez l'homme. Les récepteurs KIR2DL1, KIR2DL2 et KIR2DL3 sont spécifiques des molécules HLA-Cw : KIR2DL1

reconnaît les molécules HLA-Cw avec une asparagine en position 77 et une lysine en position 80 (groupe C2 : molécules HLA-Cw codées par les allèles HLA-C*02, -C*04, -C*05, -C*06, C*15, -C*16:02, -C*17 et -C*18) tandis que KIR2DL2 et KIR2DL3 reconnaissent les molécules HLA-Cw avec une sérine en position 77 et une asparagine en position 80 (groupe C1 : molécules HLA-Cw codées par les allèles HLA-C*01, -C*03, -C*07, -C*08, -C*12, -C*13, -C*14 et -C*16) (Colonna et al. 1993 ; Wagtmann et al. 1995). L'affinité de ces interactions peut varier d'un récepteur à un autre. Il semblerait par exemple que l'interaction KIR2DL3:HLA-C1 soit relativement plus faible que les interactions KIR2DL2:HLA-C1 et KIR2DL1:HLA-C2 (Winter et al. 1998). Toutefois, KIR2DL2 et KIR2DL3 peuvent aussi reconnaître, avec une moindre affinité, certaines molécules du groupe C2 (Moesta et al. 2008 ; Winter et al. 1998). Le KIR3DL1 reconnaît les molécules HLA-Bw4 et certaines molécules HLA-A avec un motif Bw4. KIR3DL2, quant à lui, lie les molécules HLA-A3 et -A11 (Gumperz et al. 1995 ; D Pende et al. 1996). Il serait intéressant de noter que, parmi les quatre épitopes décrits, C1, C2 et Bw4 sont impliqués dans l'éducation des cellules NK, mais pas A3/11 (Fauriat et al. 2008) . Il est à noter qu'au contraire des autres récepteurs KIR2D qui sont distribués de façon clonale sur les cellules NK, KIR2DL4 est exprimé sur toutes les cellules NK et a pour ligand une molécule HLA de classe I non classique, le HLA-G (Rajagopalan and Long 1999).

La spécificité des KIR activateurs n'est pas aussi bien définie que celle des KIR inhibiteurs et ce, malgré l'homologie de séquence qu'ils présentent au niveau extracellulaire avec ces derniers. Ainsi, le KIR2DS1 reconnaît, comme son homologue KIR2DL1, les molécules HLA-Cw du groupe C2 (Stewart et al. 2005 ; Chewning et al. 2007). Cependant, on ne sait pas encore très bien si les KIR2DS2 et KIR3DS1 partagent les mêmes ligands que leurs homologues inhibiteurs respectifs, KIR2DL2/3 et KIR3DL1. KIR2DS4, lui, est capable de reconnaître quelques rares molécules HLA-Cw appartenant aux groupes C1 et C2 mais aussi des molécules HLA-A11 (Katz et al. 2001 ; Graef et al. 2009). Ce récepteur serait le produit d'une conversion génique du KIR3DL2, ce qui expliquerait sa spécificité pour les molécules HLA-A11 (Graef et al. 2009) (Fig. 8).

Par ailleurs, on sait aujourd'hui que l'interaction des KIR inhibiteurs avec les molécules HLA de classe I peut être modulée par des peptides du soi ou viraux (Malnati et al. 1995 ; Colantonio et al. 2011 ; Fadda et al. 2012). Il serait ainsi concevable que des ligands HLA pour les KIR activateurs ne soient pas encore bien définis simplement parce que les peptides qui déterminent ces interactions ne sont pas encore découverts.

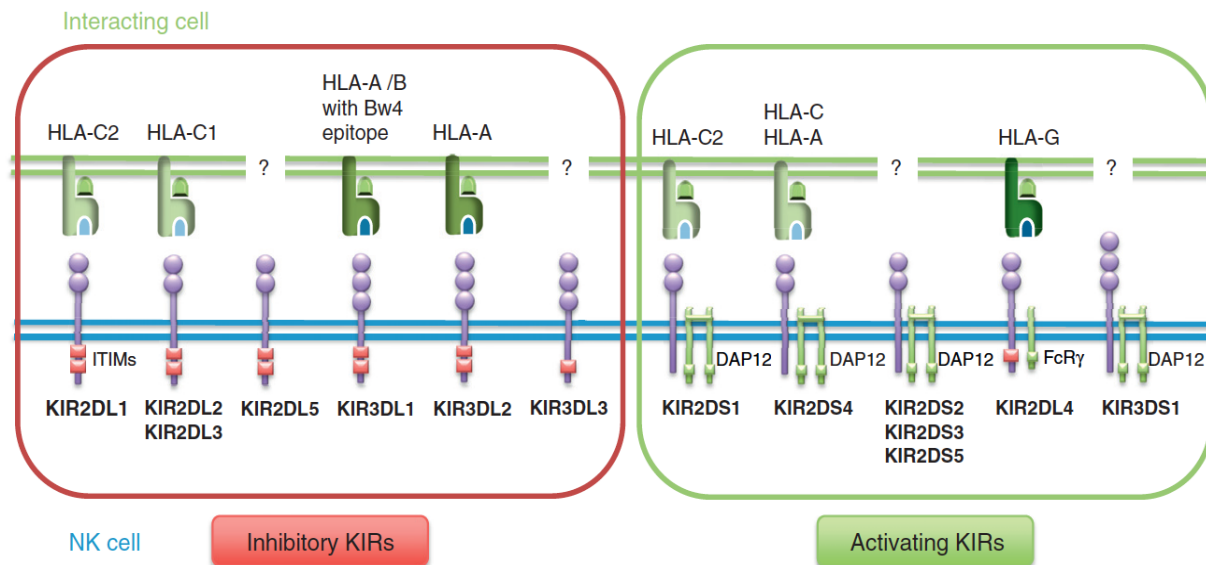


Figure 8 : Les récepteurs KIR et leurs ligands. (Thielens, Vivier, and Romagné 2012). Les récepteurs KIR2DL1 et KIR2DS1 reconnaissent les molécules HLA-Cw du groupe C2. Les récepteurs KIR2DL2 et KIR2DL3 reconnaissent les molécules HLA-Cw du groupe C1. Le KIR3DL1 reconnaît des molécules HLA-A et HLA-B avec un motif Bw4. Les KIR3DL2 et KIR2DS4 reconnaissent les molécules HLA-A11. Le KIR3DL2 reconnaît aussi les molécules HLA-A3. Le KIR2DL4 reconnaît les molécules HLA-G. Les ligands des récepteurs inhibiteurs KIR2DL5 et KIR3DL3, ainsi que ceux des activateurs KIR2DS2, KIR2DS3, KIR2DS5 et KIR3DS1 ne sont pas encore identifiés.

3.2. Les récepteurs de la famille des *Immunoglobulin-like transcripts (ILT)*

Les ILT sont une autre famille de récepteurs inhibiteurs de type Ig. Ils sont également appelés LI(L)R (*Leukocyte Immunoglobulin-Like Receptors*) ou MIR (*Monocyte-macrophage Inhibitory Receptors*). Les récepteurs ILT ont beaucoup d'homologie de séquence avec les KIR et, tout comme ces derniers,

leurs gènes font partie du complexe LRC sur le chromosome 19q13.4. Les ILT sont exprimés à la surface des lymphocytes B, des lymphocytes T, des cellules NK et des cellules d'origine myéloïde comme les monocytes, les cellules dendritiques et les macrophages (Samaridis and Colonna 1997 ; Colonna et al. 1997 ; Borges et al. 1997). Parmi les 13 récepteurs identifiés, seuls deux reconnaissent les molécules HLA de classe I, l'ILT-2 et l'ILT-4. L'ILT2 (LILRB1 ou LIR-1 ou CD85j) est le seul récepteur ILT exprimé sur les cellules NK (Colonna et al. 1997; Cosman et al. 1997). Ce dernier a quatre domaines extracellulaires et quatre motifs ITIM. Il reconnaît un large panel de molécule HLA de classe I, y compris la molécule HLA-G (Colonna et al. 1997 ; Cosman et al. 1997 ; Allan et al. 1999). De plus, l'ILT-2 reconnaît également, et avec beaucoup plus d'affinité, la protéine virale UL18 qui est un homologue des molécules HLA de classe I (Cosman et al. 1997 ; Chapman, Heikeman, and Bjorkman 1999). En effet, comme nous le verrons plus tard, l'expression de l'UL18 à la surface des cellules infectées est un mécanisme mis au point par le virus pour inhiber l'activation des cellules NK qui s'opère suite à la diminution des molécules HLA de classe I à la surface des cellules infectées.

3.3. Les hétérodimères CD94/NKG2

Les hétérodimères CD94/NKG2 sont des récepteurs de la superfamille des lectines de type C dont les gènes sont situés sur le chromosome 12p12.3-p13.2 (Houchins et al. 1991 ; Renedo et al. 1997). Le gène CD94 est étroitement lié à 4 gènes de la famille NKG2 (NKG2A/B, NKG2C, NKG2E et NKG2F) (Houchins et al. 1991). Contrairement aux gènes KIR, ces gènes ont un polymorphisme limité (Shum et al. 2002). CD94 peut être exprimé à la surface des cellules NK sous forme homodimérique ou hétérodimérique, avec le NKG2A/B ou le NKG2C, grâce à un pont disulfure (Lazetic et al. 1996). Par ailleurs, NKG2A porte dans sa partie intracytoplasmique deux motifs ITIM et le complexe CD94/NKG2A se comporte alors comme un récepteur inhibiteur (Houchins et al. 1991 ; Carretero et al. 1997). Le complexe CD94/NKG2C, quant à lui, se comporte comme un récepteur activateur et s'associe à la protéine médiatrice DAP12 pour transduire le signal activateur et rester stable à la surface cellulaire (Lanier, Corliss, Wu, and Phillips 1998). Bien que le NKG2E présente une homologie de séquence avec le NKG2C,

on ne sait pas encore si ce récepteur est capable de recruter la protéine médiatrice DAP12 et de transmettre un signal activateur chez l'homme (Lanier, Corliss, Wu, Leong, et al. 1998). En revanche, des études ont pu montrer que le NKG2E murin peut s'associer à DAP12 (Vance, Jamieson, and Raulet 1999). Enfin, NKG2F possède un segment transmembranaire et un domaine intracytoplasmique mais il est dépourvu de domaine de type lectine extracellulaire du fait d'un codon stop rompant prématurément la formation de la protéine (Plougastel and Trowsdale 1997).

Les hétérodimères CD94/NKG2A, B et C sont exprimés sur les cellules NK, les lymphocytes $T\gamma\delta$ et certains lymphocytes $T\alpha\beta$ CD8⁺ (Aramburu et al. 1990). Ils reconnaissent la molécule HLA de classe I non classique, HLA-E (V. M. Braud et al. 1998 ; N. Lee et al. 1998). Cependant, le complexe inhibiteur CD94/NKG2A semble avoir plus d'affinité pour le HLA-E que le complexe activateur CD94/NKG2C (Valés-Gómez et al. 1999). Contrairement aux molécules HLA de classe I classique, le HLA-E présente un faible polymorphisme allélique. Son expression à la surface cellulaire est stabilisée par le chargement de peptides issus des séquences signal des molécules HLA de classe I classiques (Borrego et al. 1998 ; N. Lee et al. 1998 ; Aldrich et al. 1994 ; V. Braud, Jones, and McMichael 1997). Ainsi, la diminution de l'expression de ces dernières induit la diminution de l'expression du HLA-E. Toutefois, l'interaction des récepteurs CD94/NKG2 avec leur ligand HLA-E peut être modulée par la nature du peptide chargé sur le HLA-E (Llano et al. 1998 ; Valés-Gómez et al. 1999). En effet, il a été montré que le HLA-E peut fixer un peptide issu de la protéine du choc thermique, hsp60, induisant une inhibition de son interaction avec le NKG2A. Ainsi, le HLA-E permet aux cellules NK NKG2A⁺ d'éliminer les cellules stressées (Michaëlsson et al. 2002). D'une autre manière, une protéine du CMV, l'UL40, présente à son extrémité N-terminale un peptide capable de se fixer sur la molécule HLA-E afin de stabiliser son expression à la surface cellulaire et d'échapper à la réponse NK en maintenant l'interaction avec le NKG2A (P Tomasec et al. 2000).

Bien qu'il puisse être exprimé seul sur les cellules, l'homodimère CD94 ne reconnaît pas la molécule HLA-E et il est incapable de transduire un signal car il ne possède pas de domaine cytoplasmique (Lazetic et al. 1996). L'expression des

récepteurs CD94/NKG2 est modulée par l'environnement cytokinique et l'état d'activation des cellules (Freud and Caligiuri 2006).

3.4. Le NKR-P1A (CD161)

Les NKR-P1 sont des récepteurs transmembranaires de la superfamille des lectines de type C. Six gènes de cette famille ont été identifiés chez la souris (Plougastel et al. 2001), tandis que chez l'homme, un seul gène situé sur le chromosome 12, le NKR-P1A (ou KLRB1), est connu. Le récepteur NKR-P1A, ou CD161, est exprimé sur les cellules NK immatures (I. M. Bennett et al. 1996) et les lymphocytes T sous forme d'homodimères assemblés grâce à des ponts disulfures (Lanier, Chang, and Phillips 1994). Sur les lymphocytes T, le CD161 se comporte comme un récepteur activateur car il a été montré que son engagement avec un anti-CD161 active la prolifération des thymocytes immatures (Poggi et al. 1996). En revanche, le CD161 se comporte comme un récepteur inhibiteur sur les cellules NK (Lanier, Chang, and Phillips 1994). Plus récemment, le LLT1 (*Lectin-Like Transcript*) a été identifié comme étant le ligand physiologique du CD161. Ainsi, l'interaction LLT1:CD161 augmente la production d'IFN- γ par les lymphocytes T et inhibe aussi bien la cytotoxicité des cellules NK que leur production de cytokines (Aldemir et al. 2005 ; Rosen et al. 2005). Le ligand LLT1 est essentiellement exprimé sur les ostéoclastes mais aussi sur les cellules dendritiques activées par la voie des TLR (*Toll-Like Receptors*) et sur les lymphocytes B (Rosen et al. 2008). Ces données suggèrent un rôle de ce récepteur dans le *cross-talk* entre les cellules NK et les CPA.

3.5. Le NKG2D

Le NKG2D est un récepteur transmembranaire activateur de la superfamille des lectines de type C. Il est codé par le gène KLRK1 (*Killer cell Lectin-like Receptor subfamily K, member 1*), peu polymorphe, situé sur le chromosome 12 (Houchins et al. 1991). Le NKG2D diffère des autres récepteurs NKG2 par le fait qu'il ne s'associe pas au CD94 et qu'il ne présente pas une importante homologie de séquence avec ceux-ci (J. Wu et al. 1999). Il est exprimé sous forme d'homodimères sur toutes les cellules NK, les lymphocytes T $\gamma\delta$ et sur

les lymphocytes T CD8⁺ activés (Bauer et al. 1999). Pour transduire un signal activateur et rester stable à la surface cellulaire, le NKG2D s'associe avec 4 molécules de DAP10 en formant un complexe hexamérique (J. Wu et al. 1999). NKG2D est l'un des récepteurs des cellules NK les mieux caractérisés. Ses ligands sont les molécules du CMH de classe I non classiques qui ne s'associent pas à la β 2m et qui ne fixent pas de peptides. Chez l'homme, ces protéines sont MICA et MICB (Bauer et al. 1999) et les ULBP1-6 ou RAET1 (*cytomegalovirus UL16-Binding Proteins 1-6* ou *Retinoic Acid Early Transcript 1*) (Cosman et al. 2001 ; Chalupny et al. 2003). MICA et B sont des protéines très polymorphes (plus de 70 allèles MICA et 30 allèles MICB sont décrits) (Fernández-Messina, Reyburn, and Valés-Gómez 2012) qui n'ont pas d'homologues chez la souris. Les ULBP1 et 2 ont été les deux premiers ligands identifiés du groupe ULBP et sont les seules protéines, avec l'ULBP6, à lier réellement la protéine du CMV UL16 (Cosman et al. 2001). Les homologues murins des ULBP sont H60 et Rae-1 (Diefenbach et al. 2001).

Bien que des ARNm pour MICA/B et ULBP puissent être trouvés dans des cellules saines, l'expression de ces ligands à la surface cellulaire n'est pas suffisante pour activer les cellules NK NKG2D⁺ dans des situations physiologiques (Fernández-Messina, Reyburn, and Valés-Gómez 2012). En revanche, dans des situations de stress cellulaire, comme les transformations malignes ou les infections virales, ces ligands sont fortement exprimés sur les cellules stressées, ce qui active les acteurs immunitaires exprimant le NKG2D comme les cellules NK (Diefenbach et al. 2000 ; Cerwenka et al. 2000 ; D Pende et al. 2001 ; Smith et al. 2002 ; Sirén et al. 2004). Ainsi, le NKG2D joue un rôle très important dans l'immunosurveillance tumorale et le contrôle des infections virales.

Par ailleurs, il serait intéressant de noter que l'expression du NKG2D peut aussi être induite par la présence de ligands solubles ou encore des cytokines comme l'IL-2 et l'IL-15 (Dhanji and Teh 2003 ; Dann et al. 2005). D'un autre côté, l'IL-21, lorsqu'elle est sécrétée avec l'IL-2, peut induire une baisse de l'expression du NKG2D (Burgess et al. 2006).

3.6. Les récepteurs de cytotoxicité naturelle (NCR)

Les NCR (Natural Cytotoxicity Receptors) sont des récepteurs activateurs qui jouent un rôle clé dans la cytotoxicité des cellules NK indépendamment du CMH de classe I (C Bottino et al. 2000). Les trois NCR connus chez l'homme, NKp46, NKp44 et NKp30, sont des récepteurs de la superfamille des Ig identifiés par l'équipe de Moretta A. (S Sivori et al. 1997 ; M Vitale et al. 1998 ; M Vitale et al. 1998 ; Cantoni et al. 1999 ; D Pende et al. 1999).

3.6.1. Le NKp46

Codé par le gène NCR1 qui se trouve dans la région LRC sur le chromosome 19, le récepteur NKp46 est une glycoprotéine de 46kDa exprimée par toutes les cellules NK, qu'elles soient quiescentes ou activées. Il possède deux domaines de type Ig extracellulaires et une partie intracytoplasmique courte associée aux protéines médiatrices FcεR1γ et CD3ζ qui contiennent, respectivement, un et trois motifs ITAM (S Sivori et al. 1997 ; Westgaard et al. 2004). Bien qu'il soit aussi détecté sur certains lymphocytes T intra-épithéliaux de patients souffrant de la maladie coeliaque (Meresse et al. 2006), ou sur des lymphocytes T CD8⁺ de sang de cordon ombilical stimulés *in vitro* avec de l'IL-15 ou encore sur certaines lymphocytes CD3⁺ CD56⁺ (Jianhua Yu et al. 2011), le NKp46 est considéré comme le récepteur spécifique des cellules NK chez l'homme et la souris (Walzer et al. 2007). Les ligands de NKp46 semblent très variés, mais ils ne sont pas encore tous définis. Par exemple, il a été montré qu'il reconnaît certaines hémagglutinines (HA) virales (Mandelboim et al. 2001 ; Jarahian et al. 2011) ou encore les protéoglycanes à héparane sulfate membranaires (Bloushtain et al. 2004).

Par ailleurs, une étude très récente a montré que NKp46 est impliqué dans une « downrégulation » de l'activité des cellules NK, associée à l'inactivation du facteur de transcription Helios. De cette façon, NKp46 permet le développement optimal des réponses T antivirales et anti-tumorales (Narni-Mancinelli et al. 2012).

3.6.2. Le NKp44

Codé par le gène NCR2 situé sur le chromosome 6, le NKp44 est une glycoprotéine de 44 kDa exprimée par les cellules NK activées (M Vitale et al. 1998). Parce qu'il n'est pas exprimé sur d'autres populations lymphocytaires, le NKp44 a été proposé comme un marqueur spécifique des cellules NK activées (M Vitale et al. 1998).

Pour pouvoir transduire un signal activateur et rester stable à la surface cellulaire, le NKp44 recrute la protéine médiatrice DAP12. Ses ligands ne sont pas encore bien définis. Il reconnaît, comme le NKp46, des HA virales (Tal I Arnon et al. 2001 ; Ho et al. 2008). Par ailleurs, il a été montré que dans l'infection au VIH (Virus de l'Immunodéficience Humaine), un peptide issu de la glycoprotéine virale gp41 induit l'expression d'un ligand cellulaire du NKp44 par les lymphocytes T CD4⁺, rendant ainsi celles-ci très vulnérables à la lyse NK (Vieillard, Strominger, and Debré 2005).

3.6.3. Le NKp30

Codé par le gène NCR3 situé sur le chromosome 6, le NKp30 est une glycoprotéine de 30 kDa exprimée sur toutes les cellules NK (D Pende et al. 1999). Comme les autres NCR, il s'associe à des protéines médiatrices porteuses de motifs ITAM, comme le CD3 ζ , pour transduire son signal activateur (D Pende et al. 1999). Ses ligands ne sont pas tous bien définis. Il peut notamment reconnaître, comme les autres NCR, des HA virales (Jarahian et al. 2011). De plus, une étude a montré que la protéine du CMV, pp65, interagit avec NKp30 pour inhiber l'activation des cellules NK (Tal I Arnon et al. 2005a). Un autre ligand, BAT-3 (*HLA-B-Associated Transcript 3*), une protéine nucléaire impliquée dans l'apoptose, peut être exposée de façon ectopique à la membrane des cellules transformées et être reconnue par NKp30 en activant les cellules NK (Pogge von Strandmann et al. 2007). Enfin, récemment, des études ont montré que le NKp30 reconnaît une autre protéine du soi induite par le stress. Il s'agit de la protéine B7-H6 retrouvée à la surface de nombreuses lignées tumorales. L'engagement de NKp30 avec B7-H6 induit l'activation des cellules NK aboutissant à la lyse de ces

lignées (Brandt et al. 2009). L'expression de B7-H6 est également induite dans des situations inflammatoires sur les monocytes activés et les neutrophiles (Matta et al. 2013).

Par ailleurs, NKp30 joue un rôle important dans le *cross-talk* des cellules NK avec les DC immatures et matures. En effet, il semblerait que les DC soient capables d'activer les cellules NK via le NKp30 en augmentant leur prolifération, leur production d'IFN- γ ainsi que leur potentiel cytotoxique (Ferlazzo et al. 2002).

3.7. Le DNAM-1 (*DNAX accessory molecule-1*)

Codée par un gène situé sur le chromosome 18, DNAM-1 (CD226) est une glycoprotéine membranaire de la superfamille des Ig, exprimée sur la majorité des cellules T, les cellules NK, les monocytes, les macrophages et les cellules dendritiques (Shibuya et al. 1996). C'est une molécule d'adhésion impliquée dans l'induction de la cytotoxicité des cellules NK. Ses ligands sont le récepteur du poliovirus (PVR ou CD155) et la nectine-2 (CD112) (Cristina Bottino et al. 2003) qui peuvent être exprimés dans différents types de tumeurs comme les mélanomes (Casado et al. 2009), les leucémies (Sanchez-Correa et al. 2012) et les carcinomes ovariens (Carlsten et al. 2009). Ainsi, DNAM-1 est important pour l'élimination des cellules tumorales puisqu'il joue les rôles de costimulateur des lymphocytes T sur les cellules non présentatrices de l'antigène, et de récepteur activateur des cellules NK (Gilfillan et al. 2008). Son activité dans l'immunosurveillance des tumeurs a été récemment mise en évidence *in vivo* sur des souris déficientes en DNAM-1 (Iguchi-Manaka et al. 2008).

3.8. Le 2B4

Le récepteur 2B4 (CD244) appartient à la famille des SLAM (*Signaling Lymphocyte Activation Molecule*). Il est exprimé sur toutes les cellules NK, les lymphocytes T $\gamma\delta$, les polynucléaires basophiles, les monocytes et certains lymphocytes T CD8⁺ mémoires (McNerney, Lee, and Kumar 2005). Son ligand, le CD48 (Brown et al. 1998), est exprimé sur les cellules d'origines lymphoïde et myéloïde et son expression peut être augmentée par des cytokines comme l'IFN- γ ainsi que par l'infection à l'EBV (*Epstein-Barr Virus*) (Tissot et al. 1997 ; S.

Yokoyama et al. 1991). L'engagement de 2B4 avec le CD48 peut déclencher aussi bien un signal activateur qu'un signal inhibiteur (Fig. 9). En effet, il a été montré que CD48 active les cellules NK matures en interagissant avec 2B4 chez un individu sain (Tangye et al. 2000). En revanche, chez les individus souffrant du syndrome lymphoprolifératif lié à l'X (XLP) et qui présentent une déficience en protéine SAP (*SLAM-Associated Protein*) fonctionnelle, 2B4 inhibe les fonctions des cellules NK et des lymphocytes T (Parolini et al. 2000). Cela s'explique par le fait que 2B4 possède quatre motifs ITSM (*Immunoreceptor Tyrosine-based Switch Motif*) capables de recruter des protéines médiatrices qui peuvent être activatrices ou inhibitrices. Dans un contexte physiologique, c'est la protéine activatrice SAP qui est recrutée. En l'absence de SAP, 2B4 se lie à des phosphatases qui vont véhiculer un signal inhibiteur (K.-M. Lee et al. 2004 ; Chlewicki et al. 2008). 2B4 se comporte également comme un récepteur inhibiteur dans les premiers stades du développement des cellules NK (Simona Sivori et al. 2002).

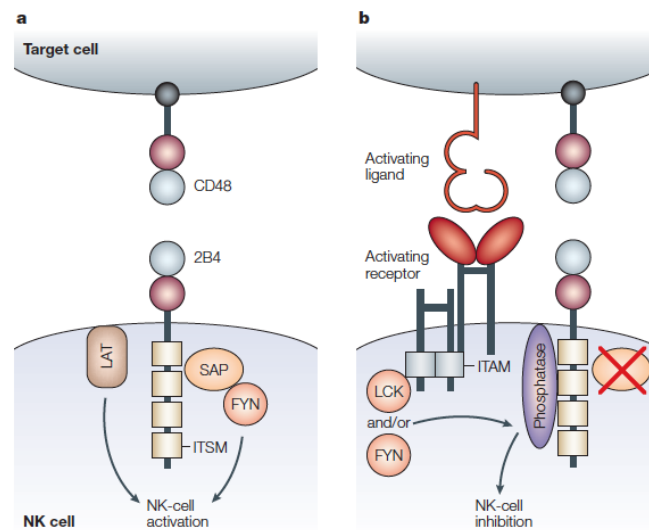


Figure 9 : Les voies de signalisation de 2B4. (Kumar and McNerney 2005). Les motifs ITSM peuvent recruter des kinases et des phosphatases. **a.** L'engagement de 2B4 conduit à l'activation des cellules NK matures. Le motif ITSM lie la protéine SAP qui va recruter à son tour la kinase FYN. La protéine LAT (*Linker for activation of T cells*) s'associe aussi à 2B4 et avec la kinase FYN, active la cellule NK. **b.** L'inhibition des cellules NK via 2B4 survient en l'absence d'une protéine SAP fonctionnelle dans les cellules NK immatures ou les cellules NK des patients souffrant de XLP. Lorsqu'un récepteur activateur est engagé simultanément avec 2B4, les motifs ITSM de 2B4 sont phosphorylés par les kinases LCK et FYN, ce qui conduit au recrutement de phosphatases qui vont inhiber l'activation de la cellule NK.

3.9. Le NKp80

NKp80 est un récepteur homodimérique de type lectine C exprimé à la surface de toutes les cellules NK et de certains lymphocytes CD3⁺ CD56⁺ (M Vitale et al. 2001). Son ligand est le AICL (*Activation-Induced C-type Lectin*) (Welte et al. 2006). L'interaction NKp80:AICL participe à l'activation de la cytotoxicité des cellules NK contre les cellules myéloïdes malignes et au *cross-talk* des cellules NK avec les monocytes. Le signal activateur s'opère par un motif atypique, un héli-ITAM, et le recrutement de la protéine kinase Syk (Dennehy, Klimosch, and Steinle 2011).

3.10. Le CD16

Le CD16 est exprimé sur la majorité des cellules NK (Ravetch and Perussia 1989 ; Lanier et al. 1989), essentiellement sur les cellules NK CD56^{dim}, mais aussi

sur les macrophages, les monocytes activés (Phillips, Chang, and Lanier 1991) et certains lymphocytes T (Lanier, Kipps, and Phillips 1985). Pour transduire un signal activateur, le CD16 s'associe aux chaînes Fc ϵ R1 γ ou CD3 ζ , qui contiennent des motifs ITAM (Lanier, Yu, and Phillips 1989 ; Lanier, Yu, and Phillips 1991). L'engagement du CD16 conduit ainsi à une cascade de signalisation intracellulaire aboutissant à la production de cytokines (Anegón et al. 1988) mais surtout à l'ADCC décrite précédemment. Il est, néanmoins, intéressant de noter que l'activation des cellules NK *in vitro* ou l'engagement direct du CD16 conduit à la diminution rapide de l'expression de ce dernier à la surface cellulaire (Cecchetti et al. 2007).

3.11. Les TLR

Les cellules NK expriment aussi des TLR pour une reconnaissance directe des agents pathogènes (Hornung et al. 2002). La stimulation *in vitro* des cellules NK avec des PAMPs, comme une protéine de *Klebsiella pneumoniae*, la flagelline, l'ARNdb ou des îlots CpG non-méthylés de l'ADN bactérien, conduit à la production de défensines et de cytokines, comme l'IFN- γ et le TNF- α , ainsi qu'à une augmentation de la cytotoxicité vis-à-vis des cellules tumorales (Chalifour et al. 2004 ; Simona Sivori et al. 2004) .

3.12. Les récepteurs de costimulation

Des études ont montré que les cellules NK activées peuvent aussi exprimer des molécules de costimulation comme des récepteurs de la famille CD2 (Tangye, Phillips, and Lanier 2000) et le CD40 ligand (Carbone et al. 1997). D'autres travaux ont décrit le rôle des CD80 (B7-1) et CD86 (B7-2), exprimés sur différentes cellules cibles, dans l'activation des cellules NK en envoyant un signal activateur via le CD28. (J. L. Wilson et al. 1999 ; Galea-Lauri et al. 1999). La stimulation des cellules NK avec le ligand du CD27, le CD70, augmente aussi leur prolifération et leur production d'IFN- γ en présence de l'IL-2 (Sugita et al. 1992). De plus, les cellules NK activées expriment OX40 ligand qui interagit avec OX40 exprimé sur les lymphocytes T CD4⁺, suggérant un *cross-talk* entre ces deux types cellulaires (Zingoni et al. 2004). Le CD96 (Tactile) est également un

récepteur de costimulation. Comme DNAM-1, il reconnaît le PVR (CD155) et renforce la cytotoxicité des cellules NK (Fuchs et al. 2004).

3.13. Les récepteurs aux cytokines et les récepteurs impliqués dans le trafic des cellules NK

Les cellules NK expriment des récepteurs pour différentes cytokines impliquées dans leur développement et l'optimisation de leurs fonctions, comme l'IL-15R, l'IL-12R, l'IL-2R, et l'IFN α/β R. Pour leur migration et leur recrutement au niveau des sites tumoraux et inflammatoires, les cellules NK peuvent également exprimer une multitude de récepteurs aux chimiokines. Par exemple, CCR2, CXCR3 et CCR5 sont importants pour leur recrutement au niveau des sites tumoraux. Dans les infections virales, c'est surtout CXCR3 qui est essentiel pour le «*homing*» des cellules NK, tandis que dans les infections bactériennes, le rôle de CCR5 semble dominant (Walzer and Vivier 2011) (Fig. 10). Le CX3CR1, le récepteur de la fractalkine (CX3CL1), est indispensable pour la migration des cellules NK dans le système nerveux central (Huang et al. 2006). D'autres études ont montré que des cellules NK CD56^{bright} sont présentes dans les ganglions lymphoïdes (Fehniger et al. 2003 ; Ferlazzo et al. 2004) où elles peuvent interagir avec les cellules dendritiques. Ces cellules expriment le CCR7 et la L-sélectine (CD62L), deux protéines qui seraient également importantes dans la migration des cellules NK dans les organes lymphoïdes. De plus, des travaux ont décrit un rôle crucial de l'interaction du CX3CR1 avec la fractalkine dans le *cross-talk* des cellules NK avec les cellules dendritiques (Pallandre et al. 2008).

Il est intéressant de noter aussi que le ligand de CXCR4, la chimiokine CXCL12, est produit en quantité importante dans la moelle osseuse, ce qui permet la rétention des cellules souches hématopoïétiques (CSH) dans cette dernière. L'expression de CXCR4 diminue à la surface des cellules NK au cours de leur maturation. Ceci leur permet une désensibilisation au CXCL12 et une migration en périphérie (Mayol et al. 2011). À l'opposé de CXCR4, une autre molécule indispensable pour la migration des cellules NK en périphérie, la S1P5 (*Sphingosine 1-Phosphate Receptor*), est graduellement exprimée sur les cellules NK au cours de leur maturation (Mayol et al. 2011).

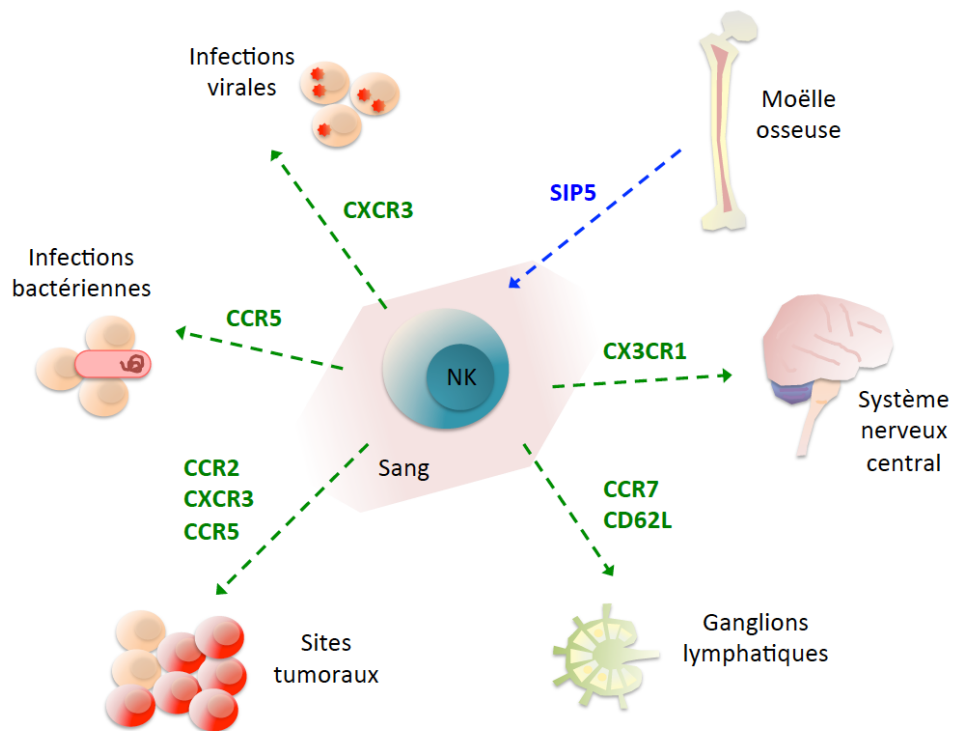


Figure 10 : Rôle des récepteurs aux chimiokines dans la migration des cellules NK.
 Illustration des principaux récepteurs aux chimiokines impliqués dans la migration des cellules NK vers différents organes et sites inflammatoires.

4. Les grandes fonctions des cellules NK

Comme nous l'avons vu précédemment, les cellules NK sont connues pour leur capacité à lyser rapidement les cellules tumorales ou infectées, sans immunisation préalable. L'interaction des cellules NK avec les cellules cibles se fait par la formation de synapses immunologiques qui sont renforcées par l'interaction entre l'intégrine LFA-1 (*Leukocyte Function-associated Antigen-1*), exprimée sur les cellules NK, et ICAM-1 (*InterCellular Adhesion Molecule 1*), exprimée sur les cellules cibles (Bryceson and Long 2008). Ces synapses conduisent à la cytotoxicité vis-à-vis de ces cibles par la libération de granules lytiques ou l'expression de ligands pour les récepteurs de mort cellulaire, à la production de cytokines ou encore à la prolifération des cellules NK. L'activation des fonctions effectrices des cellules NK est le résultat de l'intégration des multiples signaux activateurs et inhibiteurs transmis par les récepteurs décrits précédemment. Par ailleurs, l'amplitude de la réponse NK peut être modulée par la nature des cytokines environnantes, secrétées par les autres cellules immunitaires, comme les IFN de type I (α et β), l'IL-2, l'IL-12, l'IL-15, l'IL-18 et l'IL-21 (Zwirner and Domaica 2010)

4.1. La cytotoxicité des cellules NK

Comme les CTL, les cellules NK lysent leurs cibles essentiellement par le moyen des granules lytiques (Fig. 11). Ces granules sont des lysosomes sécrétoires qui contiennent des granzymes A et B, des perforines et des granulysines. Les granzymes A sont des sérines protéinases (Pasternack et al. 1986). Les granzymes B sont essentiellement des procaspases (Darmon, Nicholson, and Bleackley 1995). Les perforines, quant à elles, sont des protéines qui perméabilisent la membrane plasmique (Liu et al. 1986) pour permettre aux granzymes B de pénétrer dans la cellule cible et de déclencher les voies de l'apoptose. Il faut noter cependant que le récepteur au mannose 6-phosphate (MPR), lorsqu'il est exprimé par la cellule cible, peut servir de récepteur aux granzymes permettant ainsi leur internalisation dans la cellule (Motyka et al. 2000). Les perforines jouent un rôle clé dans l'immunosurveillance tumorale. En effet, il a été montré que des souris déficientes en perforine développent plus

facilement des tumeurs (van den Broek et al. 1996). Enfin, les granulysines sont des protéines antimicrobiennes (Stenger et al. 1998).

L'exocytose de ces granules cytotoxiques, suite à l'activation des cellules NK, est ce qu'on appelle la dégranulation.

Les LAMP (*Lysosome-Associated Membrane Protein*), qui représentent environ 50% des protéines de la membrane lysosomale, sont des glycoprotéines qui joueraient un rôle de revêtement de la membrane lysosomale dans le but de la protéger contre l'action lytique des enzymes qu'elle contient. LAMP-1 (CD107a) est utilisé, essentiellement en cytométrie en flux, comme marqueur fonctionnel de dégranulation. Il a été montré que son expression à la surface des cellules activées est bien corrélée à la capacité de lyse et de production de cytokines par les cellules NK (Alter, Malenfant, and Altfeld 2004).

Les cellules NK peuvent engager d'autres mécanismes pour tuer leurs cibles (Fig. 11). Il s'agit de l'utilisation des protéines de la famille TNF (*Tumor Necrosis Factor*), comme TNF, TRAIL et FasL. Ces molécules sont des protéines transmembranaires connues pour leur capacité d'induire l'apoptose des cellules cibles après interaction avec leur récepteurs (TNF-R, TRAIL-R et Fas) exprimés sur ces dernières. Elles sont importantes dans l'immunosuveillance des cellules tumorales qui expriment ces récepteurs de mort cellulaire (Takeda et al. 2001). Elles jouent aussi un rôle dans l'élimination des cellules trop inflammatoires par les cellules NK, telles que les neutrophiles, dans le but de contrôler l'intensité de la réponse immunitaire au cours d'une inflammation (Thorén et al. 2012). L'expression de ces protéines par les cellules NK peut être induite par la présence de cytokines comme l'IL-2, l'IL-15 ou l'IFN- γ (Mark J Smyth et al. 2003).

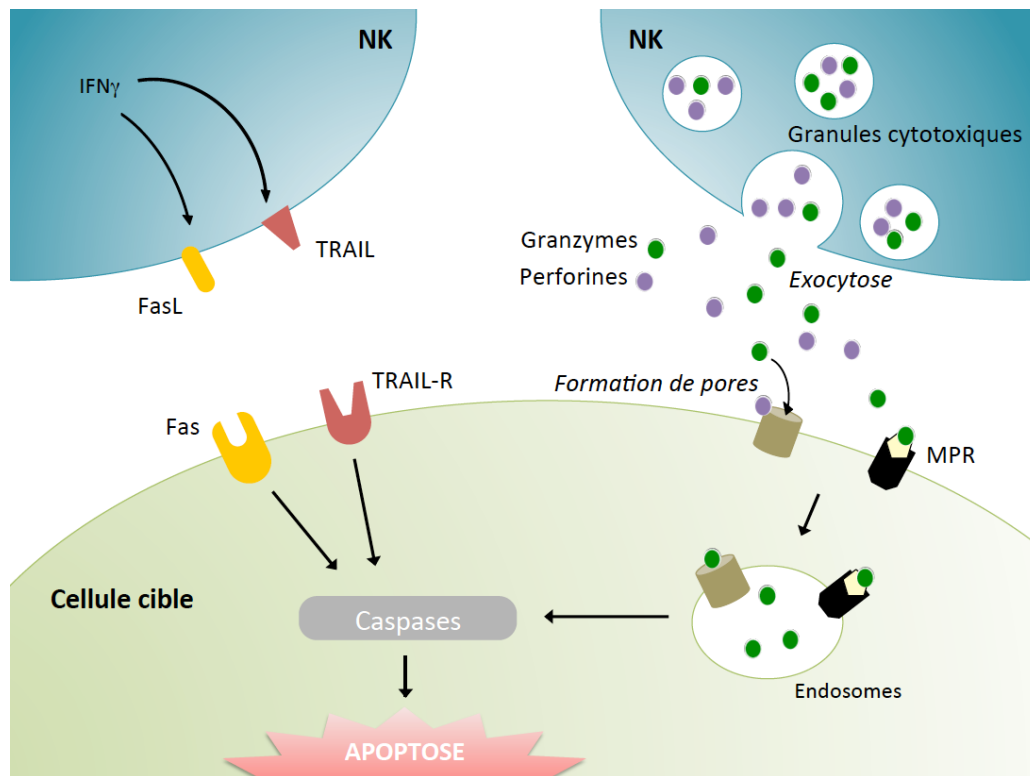


Figure 11 : La cytotoxicité des cellules NK. Les cellules NK lysent leurs cibles via deux mécanismes différents. Elles sécrètent des granules cytotoxiques, qui contiennent des granzymes et des perforines, dans l'espace intercellulaire. Les perforines réalisent des pores sur la membrane plasmique qui permettent la pénétration des granzymes dans la cellule cible. Les granzymes peuvent aussi être endocytés après fixation sur le MPR. Les granzymes vont ensuite déclencher l'apoptose en activant les caspases. Des membres de la famille TNF comme FasL et TRAIL sont exprimés sur les cellules NK et régulés par certaines cytokines comme l'IFN- γ . Ces ligands sont reconnus par leurs récepteurs respectifs, Fas et TRAIL-R, qui sont des récepteurs de mort cellulaire exprimés sur les cellules cibles et capables de déclencher l'apoptose en activant les caspases.

4.2. Production de cytokines par les cellules NK

Les cellules NK activées sont capables de produire différentes cytokines, en particulier l'IFN- γ , mais aussi le TNF- α , le GM-CSF (*Granulocyte Macrophage-Colony Stimulating Factor*), le TGF- β , l'IL-10 et des chimiokines comme CCL3 (MIP-1a), CCL4 (MIP-1b) et CCL5 (RANTES). De cette façon, les cellules NK sont à l'interface de l'immunité innée et de l'immunité adaptative. En effet, par la production de l'IFN- γ , les cellules NK sont capables de recruter différents types cellulaires au niveau inflammatoire mais aussi d'induire la maturation des cellules dendritiques qui vont initier la réponse adaptative de type Th1. L'IFN- γ est aussi essentiel dans l'immunosurveillance tumorale (Ikeda, Old, and

Schreiber 2002). En plus de son rôle dans l'induction de l'apoptose des cellules cibles, le TNF- α joue un rôle clé dans la formation des centres germinatifs dans les organes lymphoïdes secondaires (Matsumoto et al. 1996). Le GM-CSF est important pour la maturation des cellules dendritiques et des macrophages et c'est aussi un facteur de croissance pour les polynucléaires (Tarr 1996). Enfin, le TGF- β et l'IL-10 sont deux cytokines produites tardivement et jouent un rôle important dans l'immunomodulation de la réponse inflammatoire (Mehrotra et al. 1998 ; Horwitz, Gray, and Ohtsuka 1999). Les chimiokines, quant à elles, permettent aux cellules NK d'attirer les différents acteurs de l'immunité innée et de l'immunité adaptative sur les sites inflammatoires ou tumoraux.

4.3. La prolifération des cellules NK

La prolifération des cellules NK dépend de la présence de cytokine comme l'IL-2, l'IL-12 et l'IL-15.

In vivo, il a été montré qu'à l'état basal, l'IL-15 est essentielle pour l'homéostasie et la prolifération des cellules NK (Lodolce et al. 1998). Plus encore, dans les infections virales, son expression accrue conduit à une forte activité cytotoxique des cellules NK mais aussi à leur prolifération (Nguyen et al. 2002). Il est à noter qu'en l'absence de l'IL-15, l'IL-12 peut prendre le relais pour induire la prolifération des cellules NK (J. C. Sun, Ma, and Lanier 2009). La première source de l'IL-15, notamment durant les infections virales, est la cellule dendritique. De ce fait, cette dernière joue un rôle clé dans la prolifération des cellules NK (Guimond et al. 2010). Par ailleurs, le concept de l'expansion clonale introduit pour les lymphocytes T et B ne semblait pas s'appliquer aux cellules NK. Cependant, les données récentes sur l'expansion de la population NK NKG2C⁺ chez les individus humains séropositifs pour le CMV (Gumá et al. 2004 ; Foley, Cooley, Verneris, Pitt, et al. 2012 ; Béziat et al. 2012) et de la population NK Ly49H⁺ chez les souris infectées par le CMV (Dokun et al. 2001), tendent à remettre ce dogme en question.

In vitro, il existe plusieurs protocoles d'expansion des cellules NK. Le plus utilisé est la culture des cellules avec de l'IL-2 et des cellules nourricières comme des lignées tumorales ou des lignées lymphocytaires immortalisées (Luhm et al. 2002 ; Clémenceau et al. 2006).

5. Développement des cellules NK

5.1. Lieux et étapes du développement des cellules NK

Les cellules NK se développent principalement dans la moelle osseuse (Haller and Wigzell 1977) et, contrairement aux lymphocytes T, elles ne requièrent pas le thymus pour leur différenciation. Néanmoins, il existe une population cellulaire CD34⁺ dans les ganglions lymphoïdes, capables de se différencier en cellules NK CD56^{high} (Freud et al. 2005). Des cellules NK immatures ont été également décrites dans le foie (Sungjin Kim et al. 2002) et dans le thymus (Vosshenrich et al. 2006). Ces données suggèrent que les cellules NK pourraient finir leur maturation dans d'autres tissus que la moelle osseuse.

La différenciation des progéniteurs NK est essentiellement gouvernée par l'IL-15 (Puzanov, Bennett, and Kumar 1996). En effet, des souris qui n'expriment pas l'IL-15 ou son récepteur, IL-15Ra, présentent une diminution drastique de leur nombre de cellules NK (Kennedy et al. 2000 ; Lodolce et al. 1998).

Chez l'homme, les seules informations concernant l'origine médullaire des cellules NK proviennent des études réalisées *in vitro* à partir de progéniteurs CD34⁺ cultivés avec des cellules stromales (J S Miller, Alley, and McGlave 1994 ; J S Miller, Verfaillie, and McGlave 1992). Cinq stades de développement des cellules NK ont ainsi été décrits (Freud and Caligiuri 2006) (Fig. 12) :

- Les progéniteurs des cellules NK ou pro-NK (stade 1) : elles sont de phénotype CD34⁺ CD45RA⁺ CD117⁻ CD94⁻. Elles n'expriment pas le CD122 (sous-unité b du récepteur à l'IL-2 et l'IL-15) et ne répondent donc pas à l'IL-2 et l'IL-15. A ce stade, les cellules sont encore multi-potentes et peuvent se différencier en lymphocytes T ou en DC myéloïdes.

- Les pré-NK (Stade 2) : elles sont de phénotype CD34⁺ CD45RA⁺ CD117⁺ CD94⁻. A ce stade, les pré-NK sont capables de répondre à l'IL-2 et l'IL-15 mais peuvent encore donner des lymphocytes T ou des DC.

- Les cellules NK immatures (iNK) (stade 3) : à ce stade, les cellules sont incapables de se différencier en lymphocytes T ou en DC. Elles sont de phénotype CD34⁻ CD117⁺ CD94⁻ et commencent à exprimer des récepteurs fonctionnels

associés aux cellules NK comme le CD2, le CD7, le CD56, le CD161, le 2B4 et le NKp44.

Ces cellules se distinguent des pré-NK par leur expression du CD127 (IL-7Ra). Néanmoins, elles sont incapables de produire de l'IFN- γ et de la perforine au contact de cibles cellulaires déficientes en molécules du CMH de classe I. Elles n'expriment pas non plus certains récepteurs trouvés sur les cellules NK matures comme le complexe CD94/NKG2, le NKG2D, le NKp46, le CD16 et les KIR. Par ailleurs, ces cellules sont localisées dans les organes lymphoïdes secondaires et pourraient probablement participer à la régulation de l'immunité en produisant du GM-CSF (Freud et al. 2006).

- Les cellules NK CD56^{bright} (stade 4): la transition vers ce stade est marquée par l'acquisition du CD94/NKG2A et d'autres récepteurs comme le NKG2D, le NKp46, la détection possible du CD122 ainsi que la diminution de l'expression des CD117 et CD127. Certaines de ces cellules sont désormais capables de produire de l'IFN- γ et de lyser des cellules cibles par la voie des perforines et la voie Fas/Fas-ligand.

- Les cellules NK CD56^{dim} CD94^{+/-} CD16⁺ (stade 5) : ce stade semble être l'étape finale du développement des cellules NK puisqu'elles acquièrent le CD16 et les KIR, ce qui est cohérent avec les données indiquant que les KIR sont exprimés à un stade tardif de la maturation NK (Simona Sivori et al. 2003) .

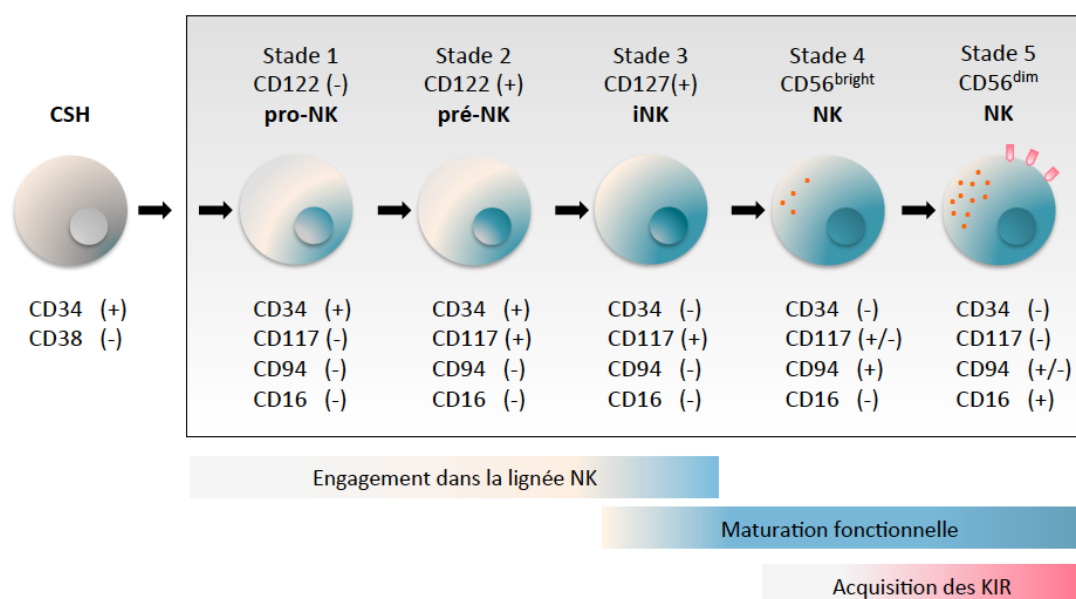


Figure 12 : Modèle de développement des cellules NK. (D'après Freud and Caligiuri, 2006). Les cellules NK sont issues des CSH. Leur maturation peut avoir lieu dans les organes lymphoïdes secondaires (représentés par le carré gris). À partir du stade 3, les cellules NK entament une maturation fonctionnelle qui leur permet de produire des cytokines. Au stade 5, les cellules NK acquièrent les KIR et le CD16, ce qui leur confère un potentiel cytotoxique.

5.2. Les sous-types NK

Deux types de cellules NK sont définis en fonction de l'intensité de l'expression de CD56 : CD56^{dim} et CD56^{bright} (Fig. 13). Une autre molécule de surface est également utilisée dans ce classement. Il s'agit du récepteur CD16. Ainsi, les cellules CD56^{dim} CD16^{bright} ont une activité cytotoxique marquée et elles représentent au moins 90% des cellules NK circulantes (M A Cooper, Fehniger, and Caligiuri 2001 ; Poli et al. 2009). La sous-population NK CD56^{bright} CD16^{dim}, quant à elle, se trouve majoritairement dans les organes lymphoïdes secondaires et présente une faible activité cytotoxique. Elle semble plutôt jouer un rôle immunomodulateur en sécrétant différentes cytokines comme l'IFN- γ , le TNF- α , l'IL-10, l'IL-13 et le GM-CSF (M A Cooper et al. 2001). En tenant compte des étapes de développement décrites ci-dessus, ces deux sous-populations NK sont en fait à deux stades différents de développement NK. Ainsi, les NK CD56^{bright} sont des précurseurs des NK CD56^{dim}.

Toutefois, les niveaux d'expression de CD56 et CD16 ne suffisent pas pour distinguer les sous-populations NK. Dans une étude récente, l'équipe de Caligiuri

a classé ces cellules également en fonction de leur niveau d'expression du CD94. Selon cette étude, les cellules $CD94^{high}CD56^{dim}$ produisent moins d'IFN- γ que les cellules NK $CD56^{bright}$ mais en produisent beaucoup plus que les cellules $CD94^{low}CD56^{dim}$. Ces cellules $CD94^{high}CD56^{dim}$ sont, en revanche, plus cytotoxiques que les cellules $CD56^{bright}$, mais beaucoup moins que les cellules $CD94^{low}CD56^{dim}$. Ces résultats suggèrent que les cellules NK $CD94^{high}CD56^{dim}$ sont à un stade intermédiaire de développement entre $CD56^{bright}$ et $CD94^{low}CD56^{dim}$ (Jianhua Yu et al. 2010).

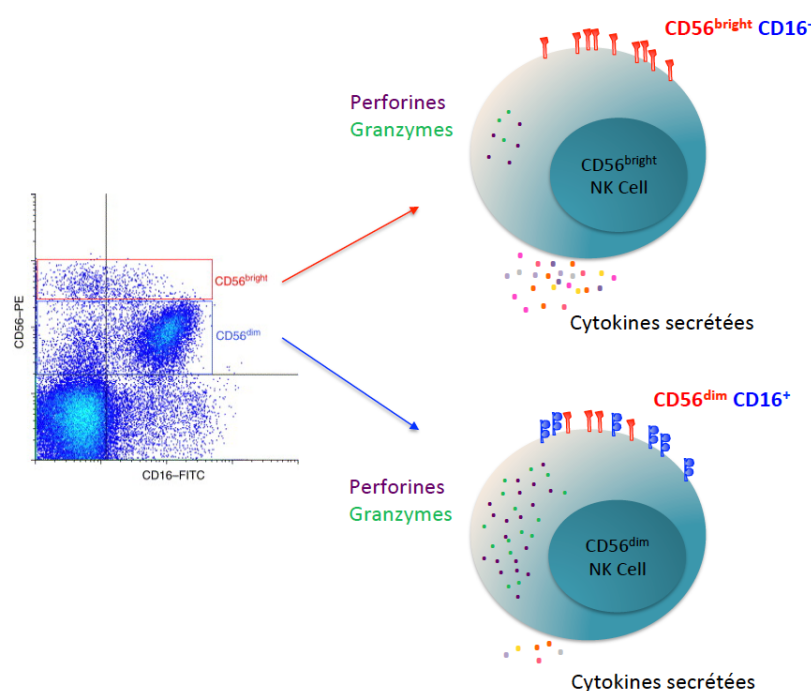


Figure 13 : Sous-types phénotypiques et fonctionnels des cellules NK : $CD56^{bright}$ et $CD56^{dim}$. (Le density plot est extrait de (M A Cooper, Fehniger, and Caligiuri 2001)). Les cellules NK $CD56^{bright}CD16^{-}$ se trouvent majoritairement dans les organes lymphoïdes secondaires. Elles sont peu cytotoxiques mais produisent beaucoup de cytokines. Les cellules NK $CD56^{dim}CD16^{+}$ représentent 90% des lymphocytes NK circulants. Elles sont très cytotoxiques mais produisent peu de cytokines.

5.3. Education et tolérance des cellules NK

Le phénomène de «résistance hybride», observé il y a près de 50 ans, a fait les bases des travaux réalisés sur la théorie de l'éducation des cellules NK.

La résistance hybride avait été décrite sur des souris hybrides qui rejetaient les greffes de CSH provenant de parents homozygotes (CUDKOWICZ and STIMPFLING 1964). Ces observations n'étaient pas en accord avec le modèle établi selon lequel le rejet s'opère par les lymphocytes T et ne se produit que lorsque le greffon exprime des molécules du CMH différentes de celles du receveur. L'implication des cellules NK dans la résistance hybride a été décrite par Murphy et ses collaborateurs qui ont observé le même type de rejet sur des souris SCID (*Severe Combined Immuno-Deficient*), dépourvues de lymphocytes B et T (Murphy, Kumar, and Bennett 1987). Enfin, la découverte du récepteur Ly49 spécifique des molécules du CMH de classe I chez la souris (Karlhofer, Ribaldo, and Yokoyama 1992) a pu expliquer comment les cellules NK interagissent avec ces molécules.

Comme nous l'avons vu précédemment, les récepteurs NK inhibiteurs spécifiques des molécules HLA de classe I sont essentiellement les KIR mais aussi le récepteur NKG2A, qui reconnaît la molécule HLA-E (V. M. Braud et al. 1998 ; Vance et al. 1998), et le récepteur ILT-2 qui reconnaît un large panel de molécule HLA de classe I, y compris la molécule HLA-G (Colonna et al. 1997 ; Cosman et al. 1997 ; Allan et al. 1999). Des études menées sur des souris et chez des humains déficients en CMH de classe I ont montré que ces individus avaient des cellules NK peu fonctionnelles (P Höglund et al. 1991 ; Liao et al. 1991). On pensait que les cellules NK peu fonctionnelles étaient propres à ces individus ; il est maintenant admis que des cellules NK peu fonctionnelles existent chez des individus sains et que l'interaction des récepteurs NK inhibiteurs avec les molécules du CMH de classe I est indispensable pour le développement fonctionnel des cellules NK et la tolérance au soi (Anfossi et al. 2006 ; Brodin et al. 2009 ; Fernandez et al. 2005 ; Johansson et al. 2005 ; Sungjin Kim et al. 2005). Par ailleurs, comme les gènes du CMH de classe I et ceux des récepteurs inhibiteurs sont localisés sur des chromosomes différents, aucun mécanisme ne peut assurer pour chaque récepteur la présence de son ligand. Ainsi, seules les

cellules NK qui expriment des récepteurs inhibiteurs pour des molécules du CMH de classe I du soi sont éduquées et donc fonctionnelles. La capacité des cellules NK à rejeter des greffes de CSH *in vivo* est, également, étroitement liée à ce phénomène d'éducation.

- Modèles proposés pour l'éducation des cellules NK.

Plusieurs modèles ont été proposés pour décrire l'éducation des cellules NK par les molécules du CMH de classe I (Fig. 14).

- **«Arming» ou «licensing»** : dans ce modèle, seules les cellules NK ayant engagé leurs récepteurs inhibiteurs avec les molécules du CMH de classe I correspondantes acquièrent des capacités fonctionnelles. Cette interaction donnerait lieu à une maturation fonctionnelle de ces cellules. Le nom de «licensing» a été utilisé pour la première fois par Kim et Yokoyama (Sungjin Kim et al. 2005 ; W. M. Yokoyama and Kim 2006).

- **«Desarming»** : ce modèle suggère que les cellules NK qui n'expriment pas les récepteurs inhibiteurs pour les molécules du CMH de classe I du soi sont «désarmées» pour maintenir la tolérance au soi. Ces cellules seraient peu fonctionnelles à cause de stimulations persistantes qui ne sont pas compensées par des signaux inhibiteurs (Raulet and Vance 2006).

La différence entre les deux modèles est que dans le premier, les cellules NK sont peu réactives par défaut, tandis que dans le deuxième modèle, ces cellules sont réactives dans leur état initial.

- **Interaction en cis** : ce modèle est basé sur la capacité des récepteurs inhibiteurs Ly49 de lier des molécules du CMH de classe I situées sur la même membrane cellulaire et de transmettre ainsi un signal inhibiteur (Doucey et al. 2004 ; Chalifour et al. 2009 ; Back et al. 2009).

- **«Tuning» ou «rhéostat»** : dans ce modèle, l'éducation des cellules NK s'opère de façon quantitative. En effet, des données récentes montrent que la réactivité des cellules NK décroît ou augmente en fonction de la force du signal inhibiteur reçu (Johansson et al. 2005 ; Joncker et al. 2009 ; Brodin, Kärre, and Höglund 2009 ; Brodin et al. 2009). Ce dernier modèle peut être compatible avec les différents modèles précédemment décrits.

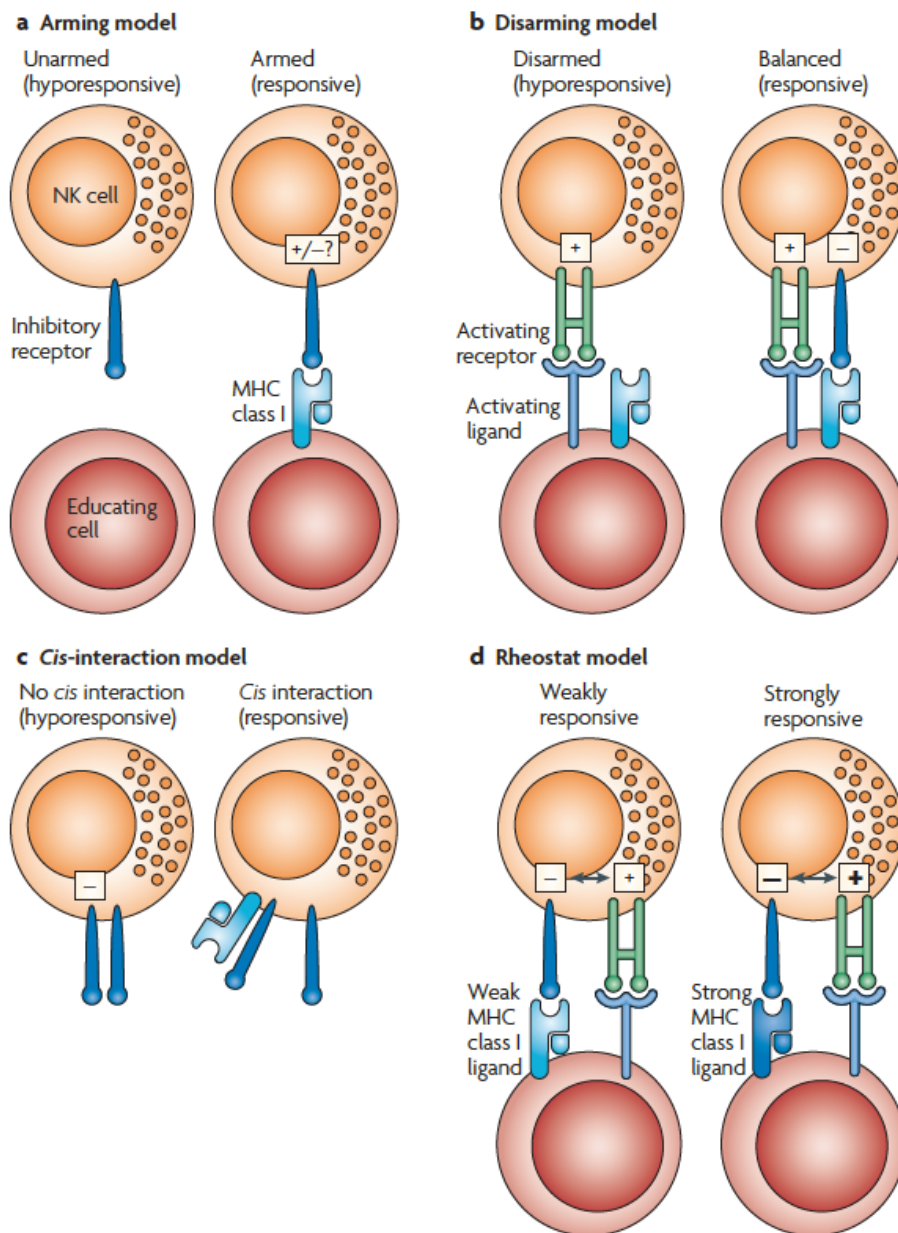


Figure 14 : Modèles de l'éducation des cellules NK. **a.** «*Arming*» : La cellule NK ayant engagé son récepteur inhibiteur avec la molécule du CMH de classe I correspondante acquiert des capacités fonctionnelles. **b.** «*Disarming*» : la cellule NK est initialement réactive, mais en l'absence d'engagement de récepteurs inhibiteurs spécifiques des molécules du CMH de classe I, elle devient anergique. Lorsqu'il y a engagement des récepteurs inhibiteurs, la cellule redevient de nouveau réactive. **c.** Interaction en «*Cis*» : basé sur la capacité des récepteurs inhibiteurs de lier des molécules du CMH de classe I situées sur la même membrane cellulaire, rendant ainsi ces cellules réactives. **d.** «*Rhéostat*» : basé sur la force du signal inhibiteur reçu par la cellule NK. (Petter Höglund and Brodin 2010).

Chez l'homme, les récepteurs KIR inhibiteurs ont un rôle clé dans l'éducation des cellules NK. En effet, il a été montré que les cellules NK KIR2DL1⁺, NK KIR2DL2/3⁺ et NK KIR3DL1⁺, issus d'individus qui expriment les ligands HLA de classe I correspondants (respectivement : les molécules HLA-Cw du groupe C2, du groupe C1 et molécules présentant le motif Bw4), répondent plus à la stimulation par les cellules déficientes en molécules HLA de classe I ou par l'engagement du CD16 (Anfossi et al. 2006 ; Junli Yu et al. 2007). Les autres récepteurs inhibiteurs, comme le NKG2A et l'ILT-2, semblent avoir un rôle plus modeste dans l'éducation des cellules NK (Junli Yu et al. 2007).

Par ailleurs, il est intéressant de noter que des récepteurs activateurs pourraient également être impliqués dans l'éducation des cellules NK. Une équipe a montré que le récepteur activateur KIR2DS1 régule négativement la réponse des cellules NK chez des donneurs homozygotes pour les molécules HLA-C2. L'éducation des cellules NK via un KIR activateur pourrait être un mécanisme supplémentaire pour assurer la tolérance au soi (Fauriat et al. 2010). Une autre interaction, n'impliquant pas les molécules HLA de classe I, semble intervenir dans la tolérance au soi. Il s'agit de l'interaction du récepteur activateur 2B4, exprimé précocement au cours de la maturation des cellules NK, avec son ligand CD48. L'engagement de ce récepteur avec son ligand génère un signal inhibiteur aux stades précoces du développement des cellules NK. Ces résultats pourraient alors expliquer la tolérance au soi des lymphocytes NK durant les premiers stades de leur existence (Simona Sivori et al. 2002), du fait que ces cellules expriment les récepteurs activateurs avant les récepteurs spécifiques du soi dans leur maturation.

D'autres études suggèrent que les cellules NK nécessitent un « priming » pour acquérir leurs fonctions effectrices optimales, notamment par l'IL-15 (Lucas et al. 2007) et l'IL-18 (Chaix et al. 2008). Par ailleurs, Kim et ses collaborateurs avaient montré que l'addition d'IL-2 ou de poly I:C peut rendre les cellules NK non éduquées fonctionnelles (Sungjin Kim et al. 2005). Il a aussi été montré que les cellules NK non éduquées peuvent acquérir leurs fonctions

effectrices après stimulation avec de l'IL-15 sans pour autant devenir autoréactive (Juelke et al. 2009). Ceci implique que la « non » éducation des cellules NK pourrait être réversible dans certaines situations *in vivo*. En effet, le rôle des cellules NK non éduquées dans des situations physiopathologiques, comme les infections virales et bactériennes ou les affections cancéreuses est, aujourd'hui, peu connu. Néanmoins, il a été observé que les cellules NK non éduquées produisent autant d'IFN- γ que les cellules NK éduquées lors d'une infection bactérienne *in vivo* avec *Listeria minicytogenes* (Fernandez et al. 2005). Une autre étude, plus récente, a montré que chez des souris infectées par le MCMV, les cellules NK non éduquées sont plus aptes à contrôler l'infection (Orr, Murphy, and Lanier 2010). Ces données suggèrent donc que l'éducation des cellules NK peut être un phénomène réversible qui permet à des cellules NK, potentiellement autoréactives, d'épargner les cellules saines du soi.

5.4. «Mémoire» des cellules NK

La mémoire immunologique est une caractéristique du système immunitaire adaptatif. Elle consiste en une persistance de longue durée de lymphocytes mémoires, spécifiques d'un antigène, capables d'accomplir rapidement une expansion clonale et des fonctions effectrices suite à une seconde exposition au même antigène. Il était communément admis que les cellules NK, qui font classiquement partie de l'immunité innée et qui ont une demi-vie de 17 jours en moyenne (Jamieson et al. 2004), sont dépourvues de mémoire immunologique. Cependant, des études récentes ont montré que certaines cellules NK peuvent vivre plus longtemps dans le foie et effectuer une réponse secondaire rapide et robuste. Les premiers travaux qui ont mis en évidence l'existence des cellules NK mémoires ont été réalisés sur un modèle d'hypersensibilité de contact aux haptènes, médiée par les cellules NK, dans des souris dépourvues de lymphocytes B et T (souris Rag2^{-/-}). Cette réaction d'hypersensibilité inattendue a persisté au moins 1 mois après le premier contact chimique et était bien spécifique de l'haptène auquel les souris ont été préalablement exposées. Curieusement, ces cellules NK mémoires étaient toutes Ly49⁺ et ne se trouvaient que dans le foie (O'Leary et al. 2006). D'autres études

ont montré la présence de cellules NK mémoires CXCR6⁺ dans certaines infections virales (Paust et al. 2010). Lanier et ses collègues ont mis en évidence une population NK mémoire dans l'infection à MCMV chez la souche de souris C57BL/6. Ces souris sont connues pour être résistantes à l'infection à MCMV grâce à l'expression d'un récepteur activateur Ly49H, sur les cellules NK, qui reconnaît la protéine virale m157 (Smith et al. 2002). Le transfert adoptif des cellules NK Ly49H⁺ à d'autres souris Ly49H⁻ infectées par le MCMV induit une expansion clonale des cellules NK Ly49H⁺ mais pas des NK Ly49H⁻ (100x dans la rate et 1000x dans le foie). Après contrôle de l'infection, ces cellules diminuent en nombre et restent viables pendant plusieurs mois dans les organes lymphoïdes et non lymphoïdes. Un autre transfert adoptif de ces cellules mémoires à des souris naïves, suivi d'une infection virale, induit une expansion cellulaire secondaire, avec une protection immunitaire dix fois plus efficace que la protection assurée par des cellules NK Ly49H⁺ matures issues d'une autre souris naïve (J. C. Sun, Beilke, and Lanier 2009).

D'autres travaux montrent que des cellules NK activées *in vitro* avec des cytokines et transférées à des souris naïves peuvent persister pendant presque un mois dans l'organisme et sont capables d'une forte production de cytokines suite à une deuxième stimulation (Megan A Cooper et al. 2009).

Chez l'homme, des études ont montré une expansion des cellules NK NKG2C⁺ chez les individus séropositifs pour le CMV. Ces cellules sont majoritairement KIR⁺ CD57⁺ NKG2A⁻ (Gumá et al. 2004 ; Foley, Cooley, Verneris, Pitt, et al. 2012 ; Béziat et al. 2012). Suite à une allogreffe de CSH, les cellules NK NKG2C⁺ provenant des donneurs séropositifs pour le CMV contrôlent mieux la réactivation virale que celles qui proviennent des donneurs séronégatifs (Foley, Cooley, Verneris, Curtsinger, et al. 2012).

L'ensemble de ces données confirme donc l'existence de cellules NK mémoires, dont l'éventuel intérêt thérapeutique et la relevance, notamment en présence des effecteurs adaptatifs classiques, reste encore à définir.

6. Les cellules NK et les greffes

6.1. Les cellules NK en greffe de CSH

6.1.1. La greffe de CSH

L'allogreffe de CSH est une thérapie visant à traiter des hémopathies malignes et des aplasies médullaires. Les CSH proviennent d'un donneur sain apparenté ou non apparenté. Le plus souvent, ce donneur est un membre de la fratrie (dans ce cas, la greffe est généralement géno-identique). En l'absence d'un donneur géno-identique, l'alternative est de rechercher un donneur non apparenté sur le fichier international (greffe phéno-identique). Dans ce dernier cas de figure, les CSH peuvent provenir de la moelle osseuse ou du sang périphérique d'un volontaire sain ou encore de sang de cordon ombilical (ou sang placentaire). En greffe de moelle osseuse ou de cellules souches périphériques, une compatibilité des gènes HLA entre donneur et receveur au niveau 10/10 est recherchée (2 allèles HLA-A, 2 allèles HLA-B, 2 allèles HLA-C, 2 allèles HLA-DRB1 et 2 allèles HLA-DQB1). En greffe de sang de cordon, la compatibilité des gènes HLA entre donneur et receveur est faible puisque seuls les gènes HLA-A, -B et -DRB1 sont pris en compte. Dans ce cas, certaines incompatibilités, notamment au niveau des gènes HLA-C peuvent être rencontrées. Ainsi, la greffe de CSH est une situation allogénique dont les conséquences immunobiologiques et cliniques sont variables. Lorsqu'il y a une disparité HLA entre donneur et receveur, la confrontation des deux systèmes immunitaires peut conduire, dans un cas, à une réaction de l'hôte contre le greffon (*Host versus Graft*, HvG), responsable du rejet de la greffe. Ceci a rarement lieu grâce notamment au conditionnement myéloablatif du receveur. Dans un autre cas, elle peut conduire à une réaction du greffon contre l'hôte (*Graft versus Host*, GvH). Il s'agit de l'activation des lymphocytes T du donneur qui vont attaquer les tissus de l'hôte comme la peau, les poumons et le système digestif. Dans certains cas, cette réaction peut être aigüe et conduire à la maladie du greffon contre l'hôte (*Graft-versus-Host disease*, GvHD) qui compromet définitivement le devenir de la greffe. Enfin, une autre réaction, plus bénéfique

pour le pronostic de la greffe, est l'éradication des cellules tumorales du receveur par les cellules immunitaires du donneur. C'est l'effet GvL (*Graft versus Leukemia*).

6.1.2. L'alloréactivité des cellules NK KIR⁺ en greffe de CSH

Suite à une allogreffe de CSH, les cellules NK sont les premières à reconstituer le système immunitaire (Chklovskaya et al. 2004). Pour cause d'incompatibilité KIR inhibiteurs-ligands HLA (gènes KIR inhibiteurs présents, ligands HLA absents) entre donneur et receveur, ces cellules peuvent être alloréactives vis-à-vis des cellules du receveur dans le contexte de reconnaissance du «soi manquant», décrit précédemment (Fig. 15). Ruggeri et ses collaborateurs ont mis en évidence le rôle de l'alloréactivité des cellules NK dans l'effet GvL. En effet, ils ont montré la capacité des cellules NK alloréactives à lyser les cellules leucémiques issues de patients atteints de leucémie aigüe myéloïde (LAM) ou de leucémie myéloïde chronique (LMC), *in vitro* (L Ruggeri et al. 1999). De la même façon, ces cellules ont la capacité d'éradiquer les cellules leucémiques de LAM humaines, *in vivo*, dans un modèle de souris NOD/SCID, et de prévenir la GvHD en éliminant les cellules présentatrices de l'antigène qui initient la réponse T (Loredana Ruggeri et al. 2002). De plus, l'étude rétrospective à partir des données cliniques sur le devenir des greffes de CSH HLA haploidentiques, après déplétion des lymphocytes T, chez 57 patients atteints de LAM et 35 patients atteints de LAL (Leucémie Aiguë Lymphoïde), indique que lorsqu'il y a une incompatibilité KIR-ligand HLA, et donc une alloréactivité dans le sens GvH, il n'y a pas de rejet de greffe ni de GvHD. Plus encore, l'incompatibilité KIR-ligands HLA semble être un facteur prédictif de survie des patients atteints de LAM. En revanche, cette incompatibilité dans le sens GvH ne semble pas avoir d'effet sur les LAL *in vitro* (L Ruggeri et al. 1999) et *in vivo* (Loredana Ruggeri et al. 2002). Par ailleurs, une autre étude rétrospective sur des patients ayant reçu des greffons HLA-identiques, déplétés en lymphocytes T, pour traiter des LAM, montre également un effet bénéfique de l'incompatibilité KIR-ligands HLA, dans le sens GVH, sur le devenir de la greffe et l'incidence des rechutes (Hsu et al. 2005). Ces données suggèrent que l'alloréactivité observée ne passe pas

forcément par les cellules NK KIR⁺ éduquées puisque dans cette dernière étude, les donneurs et les receveurs sont HLA-identiques.

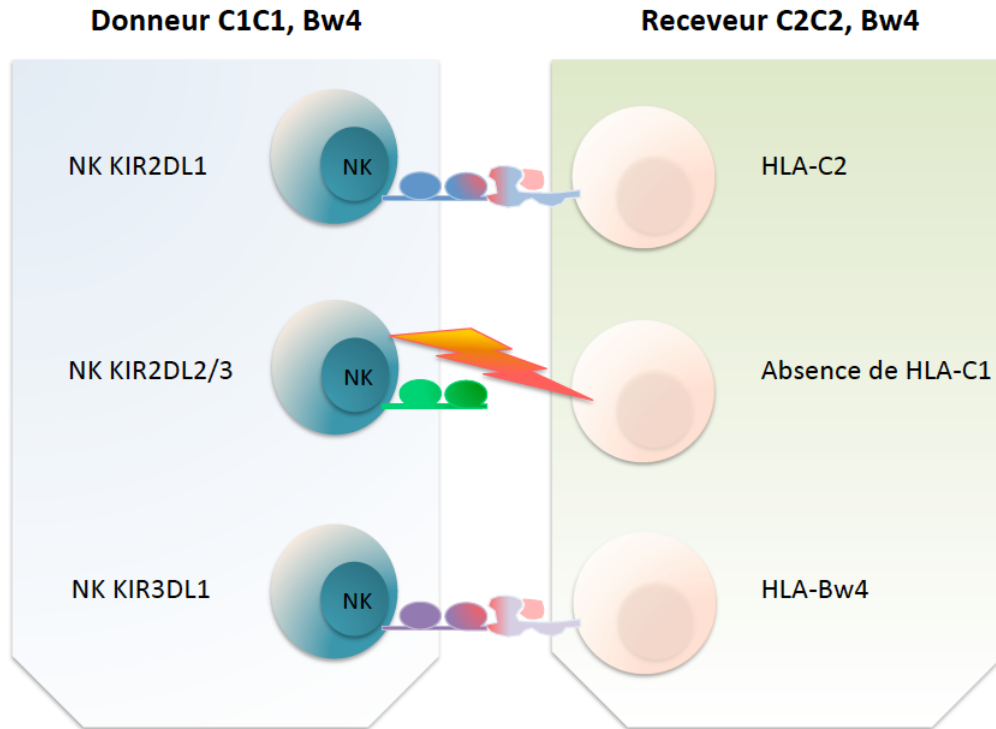


Figure 15 : L'alloréactivité des cellules NK en greffe de CSH. Dans le contexte de la greffe de CSH, les cellules NK KIR⁺ du donneur interagissent avec les cellules du receveur qui peuvent exprimer des molécules HLA de classe I différentes en terme de ligands KIR. Dans cette illustration, les cellules NK KIR2DL1⁺ et NK KIR3DL1⁺ sont inhibées chez un receveur HLA-C2C2 et HLA-Bw4, mais les cellules NK KIR2DL2/3⁺ sont alloréactives à cause de l'absence des molécules HLA-C1.

D'autres travaux sur le rôle de l'incompatibilité KIR-ligands HLA en greffe de CSH ont donné des résultats variables (Bignon and Gagne 2005). Ainsi, l'effet bénéfique de l'alloréactivité des cellules NK sur le pronostic de la greffe n'est pas un phénomène constant. Les meilleurs résultats, avec un net avantage de survie, sont observés sur des patients atteints de leucémies d'origine myéloïde et non lymphoïde et qui ont reçu des greffons non HLA-identiques, déplétés en lymphocytes T, avec un taux important de cellules CD34⁺ (Loredana Ruggeri et al. 2006).

6.1.3. Le rôle des récepteurs KIR activateurs en greffe de CSH

Certaines équipes ont montré que la présence des gènes KIR activateurs chez le donneur améliore le pronostic de la greffe. En effet, une étude réalisée sur 65 patients montre que la présence des gènes KIR2DS1 et KIR2DS2 chez le donneur diminue les risques de rechute après une allogreffe de CSH HLA-identique (Verheyden et al. 2005). De plus, la présence des gènes KIR activateurs chez le donneur diminue les taux de réactivation du CMV chez le receveur, ce qui améliore le pronostic de la greffe (M. Cook et al. 2006 ; Chen et al. 2006).

Au contraire, d'autres travaux montrent l'effet néfaste de la présence des gènes KIR activateurs dans le devenir de la greffe, principalement à cause de l'augmentation de l'incidence des GvHD (M. A. Cook et al. 2004 ; Bishara et al. 2004 ; J. Y. Sun et al. 2005). Néanmoins, il serait important de noter que la présence des KIR activateurs sur les lymphocytes T peut aussi augmenter l'alloréactivité de ces derniers, ce qui peut conduire, par conséquence, à une GvHD. En effet, ces GvHD n'ont pas lieu lorsque il y a une forte déplétion des lymphocytes T des greffons. Dans ces conditions, les greffes réalisées à partir de donneurs qui portent des gènes KIR activateurs ne causent pas de GvHD mais sont plutôt associées à un meilleur taux de survie et un faible niveau d'infections opportunistes (Loredana Ruggeri et al. 2006).

Toutefois, parce qu'elles ne tiennent pas compte des mécanismes de l'éducation et de tolérance au soi, et parce que les ligands des KIR activateurs ne sont pas encore bien connus, ces études génétiques sont utiles mais pas suffisantes pour comprendre l'impact des KIR activateurs sur le pronostic de la greffe.

Par ailleurs, la divergence des résultats est liée également au caractère multiparamétrique de la greffe qui est très dépendant des centres greffeurs (variabilité des traitements, choix des donneurs, déplétion ou non des lymphocytes T...etc.).

6.2. Les cellules NK en greffes d'organes solides

Le rôle des cellules NK est moins documenté en greffe d'organes solides. Néanmoins, il semblerait que la compatibilité KIR-HLA soit associée à un meilleur pronostic des greffes de rein et du foie (Kunert et al. 2007 ; Hanvesakul et al. 2008). Ces données ont cependant été contestées par d'autres auteurs qui n'ont pas observé de différences dans le rejet de la greffe et la survie des patients en fonction de leur génotypes KIR, HLA-Cw et HLA-Bw4 (T Hien Tran et al. 2005 ; T H Tran et al. 2009). Dans la transplantation rénale, le problème majeur qui compromet le devenir de la greffe est l'infection à CMV. Des travaux récents suggèrent que l'absence des ligands HLA-C pour les récepteurs KIR inhibiteurs et la présence des gènes KIR activateurs chez le receveur sont associées à un faible taux d'infection à CMV après la greffe (Hadaya et al. 2008). De même, une autre étude a montré que le taux d'infection à CMV, après une transplantation rénale, est inversement corrélé au nombre de gènes KIR activateurs présents chez le receveur (Stern et al. 2008).

Dans les transplantations hépatiques visant à traiter la cirrhose liée à l'hépatite C, la réactivation du virus de l'hépatite C est aussi un problème majeur. Une équipe a décrit une association de la présence du gène KIR2DL3 chez le receveur avec la progression vers une fibrose hépatique. Les incompatibilités KIR-HLA favoriseraient cette progression des hépatites récurrentes vers des fibroses uniquement en présence du KIR2DL3 chez le receveur (de Arias et al. 2009). La présence de deux autres gènes, KIR2DL2 et KIR2DS2, chez le receveur, serait, quant à elle, associée à un meilleur résultat du traitement des hépatites C récurrentes après une transplantation du foie (Askar et al. 2009).

7. Les cellules NK et les cancers

Il est, aujourd'hui, communément admis que le système immunitaire adaptatif joue un rôle important dans l'immunosurveillance des cancers (G. P. Dunn et al. 2002). Les cellules NK, de par leur capacité à reconnaître le «soi-manquant» par les récepteurs KIR inhibiteurs, ainsi que leur expression de plusieurs récepteurs activateurs qui peuvent reconnaître des ligands tumoraux, jouent également un rôle clé dans cette immunosurveillance des cancers. L'effet antitumoral des cellules NK a tout d'abord été décrit *in vitro* avec, notamment, les travaux qui ont conduit à leur découverte (Herberman, Nunn, and Lavrin 1975 ; Kiessling, Klein, and Wigzell 1975). Par la suite, grâce à des études réalisées avec des tumeurs induites dans des modèles murins, le rôle antitumoral des cellules NK a été mis en évidence *in vivo* (M J Smyth, Crowe, and Godfrey 2001 ; S Kim et al. 2000). Chez l'homme, le rôle anti-tumoral des cellules NK *in vivo*, a été démontré dans une étude faite à partir de transplantations allogéniques de CSH visant à traiter les leucémies myéloïdes (Loredana Ruggeri et al. 2002).

La plupart des cellules tumorales perdent l'expression des molécules HLA de classe I à leur surface, ce qui les rend vulnérables à la lyse par les cellules NK KIR⁺. Néanmoins, bien que le rôle des KIR dans la cytotoxicité anti-cancéreuse des cellules NK soit incontestable, certaines combinaisons KIR-ligand HLA, comme KIR2DL2/L3-HLA-C1 ou KIR3DL1-Bw4 semblent récurrentes chez des patients atteints de mélanomes (Naumova et al. 2007). De même, la présence de tous les récepteurs KIR inhibiteurs semble plus fréquente chez les individus atteints de certains cancers (Arnheim, Dillner, and Sanjeevi 2005 ; Verheyden et al. 2005). Par ailleurs, il existe des lignées tumorales qui expriment assez fortement les molécules HLA de classe I, ce qui les rend résistantes aux cellules NK. C'est le cas, par exemple, de certaines lignées issues de carcinomes rénaux (Gati et al. 2004) ou du médulloblastome (Fernandez et al. 2005). Les récepteurs KIR activateurs sont aussi impliqués dans la reconnaissance tumorale. En effet, il a été montré que la présence des gènes KIR3DS1 et KIR2DS1 est protectrice contre une affection respiratoire maligne liée au

papillomavirus (Bonagura et al. 2010). De la même façon, ces deux gènes sont associés à une protection contre le lymphome de Hodgkin (Besson et al. 2007).

La cytotoxicité des cellules NK contre les cellules cancéreuses est très souvent déclenchée par l'engagement d'autres récepteurs activateurs, comme le NKG2D, les NCR, le NKp80, 2B4 et DNAM-1. Ces récepteurs reconnaissent des protéines du soi qui sont très peu exprimées par les cellules saines mais qui sont induites dans des situations de stress tumoral. Le rôle du NKG2D dans l'immunosurveillance des cancers a été bien documenté, aussi bien *in vitro* (Bauer et al. 1999 ; D Pende et al. 2001 ; Jamieson et al. 2002) que *in vivo*, sur des modèles murins (Diefenbach et al. 2001 ; Cerwenka, Baron, and Lanier 2001). Chez l'homme, il a été montré que le polymorphisme NKG2D est associé à une susceptibilité au cancer (Hayashi et al. 2006). Bien que leurs ligands tumoraux ne soient pas encore bien caractérisés, les NCR sont essentiels pour la réponse NK anti-cancéreuse. En effet, le blocage de ces récepteurs avec des anticorps spécifiques inhibe la lyse des cellules tumorales par les cellules NK *in vitro* (Pessino et al. 1998 ; D Pende et al. 2001). De même, des souris ayant une mutation du gène NKp46 ne peuvent pas rejeter des cellules cancéreuses qui expriment un ligand du NKp46 (Halftack et al. 2009). Le NKp30, quant à lui, reconnaît, comme nous l'avons déjà vu, le B7-H6 exprimé sur diverses lignées tumorales, ce qui les rend sensibles à la lyse NK (Brandt et al. 2009). Une autre étude a montré le rôle de 2B4 dans le rejet des tumeurs qui expriment le CD48 (Vaidya et al. 2005). Enfin, le CD112 et le CD155, ligands du récepteur DNAM-1, sont exprimés sur des lignées tumorales et activent les cellules NK *in vitro* (El-Sherbiny et al. 2007 ; Carlsten et al. 2007). DNAM- 1 et NKG2D sont fortement exprimés sur les cellules NK chez les patients atteints de mélanomes métastatique de stade IV et sont aussi très impliqués dans la lyse des cellules cancéreuses (Fregni et al. 2011). De plus, il a été montré que l'injection de cellules tumorales à des souris déficientes en DNAM-1 conduit à un développement plus rapide des tumeurs *in vivo* (Iguchi-Manaka et al. 2008 ; Gilfillan et al. 2008).

Plusieurs travaux ont démontré la capacité des cellules NK à infiltrer les tumeurs (Schleypen et al. 2003 ; Schleypen et al. 2006 ; Kornstein, Stewart, and Elder 1987 ; Carrega et al. 2008 ; Delahaye et al. 2011). Ainsi, leur présence est un facteur pronostique positif dans certains cancers (Coca et al. 1997 ; Ishigami et al. 2000 ; Takanami, Takeuchi, and Giga 2001 ; Villegas et al. 2002).

Cependant, dans le microenvironnement tumoral, différents événements peuvent influencer l'expression des récepteurs des cellules NK ainsi que leurs ligands. Il a par exemple été montré que, pour échapper au système immunitaire, la tumeur peut tourner à son avantage les phénomènes inflammatoires en supprimant précocement l'immunité antitumorale (Swann et al. 2008). En effet, le TGF- β , présent dans certains sites tumoraux, peut induire une «downregulation» des ligands du NKG2D (Eisele et al. 2006), du NKG2D lui-même et du NKp30 (Castriconi et al. 2003). De même, l'exposition prolongée des cellules NK à des cellules tumorales peut les rendre peu cytotoxiques en induisant une baisse de l'expression des récepteurs activateurs comme le NKG2D, le NKp30 et le NKp44 (Pietra et al. 2012). Dans le cas des mélanomes, il a été montré une production de molécules HLA-E solubles par les cellules tumorales qui est augmentée après un traitement avec des cytokines inflammatoires. Le rôle de ces molécules HLA-E solubles dans l'immunomodulation des réponses T et NK via une interaction avec le complexe inhibiteur CD94/NKG2A y avait été suggéré (Derré et al. 2006 ; Allard et al. 2011 ; Coupel et al. 2007)

D'autres études décrivent des altérations phénotypiques et fonctionnelles des cellules NK en périphérie. C'est le cas dans le cancer du sein, chez des patientes atteintes de tumeurs invasives, où il y a une diminution progressive de l'expression des récepteurs NKp30, NKG2D, DNAM-1 et CD16 avec, en parallèle, une augmentation de l'expression du NKG2A sur les cellules NK (Mamessier et al. 2011). Chez les patientes atteintes du cancer du col de l'utérus, on retrouve aussi des altérations similaires des cellules NK (Garcia-Iglesias et al. 2009).

Pour finir, différentes immunothérapies utilisant les propriétés antitumorales des cellules NK sont développées (ou sont en cours de

développement) pour soigner les cancers. En effet, des essais de transfert adoptif de cellules NK allogéniques, pré-activées avec de l'IL-2, ont donné des résultats satisfaisants sur quelques patients atteints de LAM (Jeffrey S Miller et al. 2005). Plus récemment, un anticorps, 1-7F9, spécifique des récepteurs KIR2DL1/2/3, a été développé dans le but d'empêcher l'interaction des récepteurs KIR inhibiteurs avec les molécules HLA-Cw exprimées sur les cellules tumorales. Des essais précliniques, *in vitro* et *in vivo* sur des modèles murins, ont montré que cet anticorps est capable de bloquer de façon stable les récepteurs KIR et d'augmenter la cytotoxicité des cellules NK vis-à-vis de cellules tumorales issues de LAM autologues (Romagné et al. 2009). D'autres stratégies utilisant les anticorps monoclonaux dirigés contre des antigènes tumoraux ont été développées. Elles ont pour but d'induire, notamment, de puissantes ADCC par les effecteurs immunitaires, en particulier les cellules NK. L'exemple en est le rituximab dirigé contre le CD20 dans le traitement des lymphomes B (Kohrt et al. 2012).

D'autres chercheurs se sont intéressés aux récepteurs NKG2D et DNAM-1. En effet, comme nous venons de le voir, ces deux récepteurs jouent un rôle important dans la reconnaissance et la lyse des cellules cancéreuses. Ainsi, certaines équipes ont développé des drogues qui ont des propriétés anti-cancéreuses mais qui sont également capables d'induire l'expression des ligands des récepteurs NKG2D et DNAM-1 par les cellules tumorales (Morisaki, Onishi, and Katano 2012).

L'activation endogène des cellules NK est aussi une approche utilisée pour potentialiser les réponses anti-tumorales de ces cellules. Pour cela, diverses cytokines sont utilisées, notamment l'IL-2. En dépit du manque d'activité convaincante de l'IL-2 comme monothérapie, des travaux récents ont décrit une augmentation de survie sans rechute après 3 ans, chez les patients atteints de LAM ayant reçu une immunothérapie à l'IL-2 combinée avec l'histamine dihydrochloride (Brune et al. 2006 ; Romero et al. 2009).

8. Les cellules NK dans le contrôle des infections virales

En plus de leurs propriétés anti-tumorales, les cellules NK jouent un rôle clé dans les défenses contre les infections virales. Chez l'homme, ce rôle a été mis en évidence chez un patient déficient en cellules NK qui a développé des infections herpétiques sévères, malgré la présence d'un taux normal de lymphocytes T et B fonctionnels (Biron, Byron, and Sullivan 1989 ; Gazit et al. 2004).

Pour contrôler les infections virales, les cellules NK peuvent être activées en reconnaissant directement les cellules infectées. Néanmoins, pour une réponse optimale, elles requièrent également la présence de cytokines comme les IFN de type I et certaines cytokines pro-inflammatoires comme, l'IL-12, l'IL-15 et l'IL-18 (Zwirner and Domaica 2010). Dans les infections virales, la source principale de l'IL-12 et des IFN de type I est la DC. En retour, l'IFN- γ produite par les cellules NK activées induit la maturation des DC, qui vont initier la réponse adaptative, ainsi que le recrutement des autres acteurs de l'immunité innée sur le site de l'infection.

En l'absence d'une interaction directe avec les cellules cibles, ces cytokines environnantes, liées à l'infection, peuvent être suffisantes pour initier une production de l'IFN- γ ou la prolifération des cellules NK.

Ainsi, les cellules NK exercent une pression immunitaire importante sur les virus, ce qui peut conduire ces derniers à mettre au point différents mécanismes pour échapper au contrôle de ces cellules.

Le but ici et dans les paragraphes suivants, n'est pas de dresser une liste exhaustive des infections virales dans lesquelles les cellules NK sont impliquées, mais d'en présenter brièvement quelques exemples parmi les plus documentés, en insistant sur l'infection à CMV et sur le rôle des récepteurs KIR dans ces réponses antivirales.

8.1. Le CMV

8.1.1. Historique

C'est en 1904 que Ribbert a décrit pour la première fois la présence de cellules volumineuses à inclusions intranucléaires dans les glandes parotides d'enfants mort-nés. Dans le même temps, Jesionek et Kiolemenoglou ont fait les mêmes observations sur des tissus pulmonaires, rénaux et hépatiques de fœtus morts de la syphilis. C'est ensuite en 1921 que Goodpasture et Talbot proposent le nom de *cytomégalie* pour désigner ces inclusions nucléaires mais aussi cytoplasmiques. Enfin, en 1926 Cole et Kuttner émettent l'hypothèse d'une étiologie virale aux affections observées nommées alors *maladie à inclusions cytomégaliqes* (Farber and Wolbach 1932). Dans les années 1950, Margaret Smith isole le virus à partir des glandes salivaires d'un nourrisson (SMITH 1956) et Row l'isole à partir de tissus adénoïdiens (souche AD169) d'un enfant sain (ROWE et al. 1956). Le nom de cytomégalo virus a été proposé par Weller et al en 1960 (WELLER, HANSHAW, and SCOTT 1960).

8.1.2. Généralités

Le CMV humain est un β herpesvirus (*β human herpesvirus-5*, HHV5) appartenant à la famille des *Herpesviridae* dans laquelle il existe huit virus infectant l'homme, classés en trois sous-familles : les alpha-, beta- et gammaherpesvirinae (Tableau 1). Comme les autres membres de sa famille, le CMV a la capacité de rester à l'état latent dans différents types cellulaires. Des formes de latence ont été décrites notamment dans les monocytes du sang périphérique et les CSH de la moelle osseuse (Gandhi and Khanna 2004). Cependant, le CMV se caractérise par une étroite spécificité de l'hôte et un cycle répliatif long.

Tableau 1 : Classification des herpes virus.

Identification			Génome
Désignation	Nom usuel (abréviation anglo-saxone)	Sous-famille	Taille (kpb)
HHV-1	Herpès simplex 1 (HSV-1)	α	152
HHV-2	Herpès simplex 2 (HSV-2)	α	152
HHV-3	Virus de la varicelle (VZV)	α	125
HHV-4	Virus d'Epstein Barr (EBV)	γ	172
HHV-5	Cytomegalovirus Humain (HCMV)	β	248
HHV-6	Roseolovirus	β	159
HHV-7	Roseolovirus	β	145
HHV-8	Virus du sarcome de Kaposi (KSHV)	α	230

8.1.3. Structure

Le CMV est un gros virus d'environ 150 à 200 nm de diamètre. C'est un virus à ADN linéaire double brin dont le génome fait environ 230 kpb (MCGAVRAN and SMITH 1965). Il est constitué d'une nucléocapside icosaédrique de 100 nm de diamètre, séparée d'une enveloppe glycoprotéique par le tégument. L'enveloppe, qui est donc la couche externe du virion, est formée d'une bicouche lipidique qui présente de nombreuses glycoprotéines à sa surface (Fig. 16).

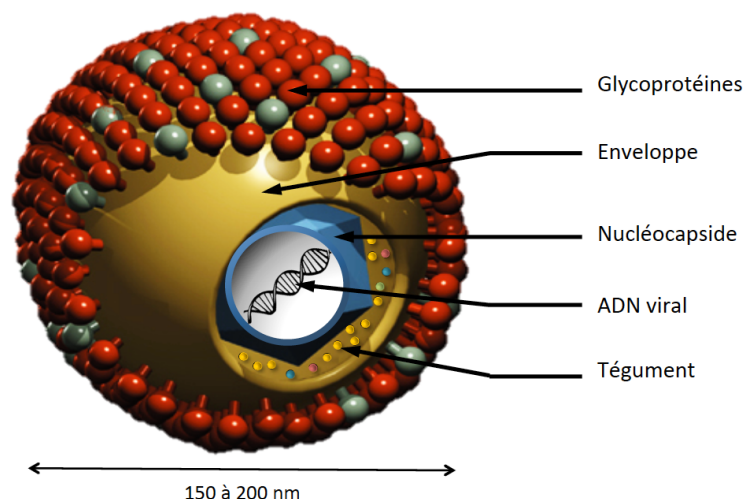


Figure 16 : Structure du CMV humain. (D'après Crough and Khanna 2009). Le CMV est un virus à ADN linéaire double brin. Il est constitué d'une nucléocapside icosaédrique, séparée d'une enveloppe glycoprotéique par le tégument. L'enveloppe est formée d'une bicouche lipidique qui présente de nombreuses glycoprotéines à sa surface.

a. Le génome viral

Le génome du CMV est constitué de deux régions uniques non répétées : une région longue (*Unique Long*, UL ; 82% du génome) et une région courte (*Unique Short*, US ; 18% du génome). Ces deux régions sont encadrées par deux paires de séquences répétées appelées « b » et « c ». « b » représente les séquences TRL (*Terminal Repeat Long*) et IRL (*Internal Repeat Long*). « c » représente les séquences TRS (*Terminal Repeat Short*) et IRS (*Internal Repeat Short*). Au cours de la réplication virale, le virus subit un réarrangement interne où les deux régions peuvent s'inverser donnant ainsi quatre isomères possibles de la molécule d'ADN. Une séquence répétée terminale, appelée « a », de longueur variable (700 à 900 pb), cadre les deux extrémités du génome. Cette séquence se retrouve aussi à la jonction des segments UL et US, entre les éléments IRL et IRS (Fig. 17). Elle joue un rôle dans la réplication virale en permettant la circularisation de l'ADN et son encapsidation (Spaete and Mocarski 1985 ; Kemble and Mocarski 1989). Le génome de la souche de laboratoire AD169 a été complètement séquencé et contient plus de 200 cadres ouverts de lectures (*Open Reading Frames*, ORF). Ces cadres de lecture sont nommés en fonction de leur localisation dans les séquences UL, US, TRL, IRL ou IRS et sont numérotés séquentiellement (UL1, UL2... US1, US2..., etc.). Beaucoup de ces ORF codent des protéines non nécessaires à la réplication du virus et le produit de la majorité des gènes n'a toujours pas été identifiés (Drouet et al. 2003). Les différentes souches du CMV humain présentent 95% d'homologie de séquence entre elles et peu d'homologie avec les souches de CMV des autres espèces animales. Par ailleurs, il serait intéressant de noter que les souches cliniques possèdent au minimum 19 gènes supplémentaires, non retrouvés dans les souches de laboratoires. Ces gènes, impliqués dans la virulence et le tropisme cellulaire, seraient probablement perdus au cours des nombreux passages en culture (Cha et al. 1996).

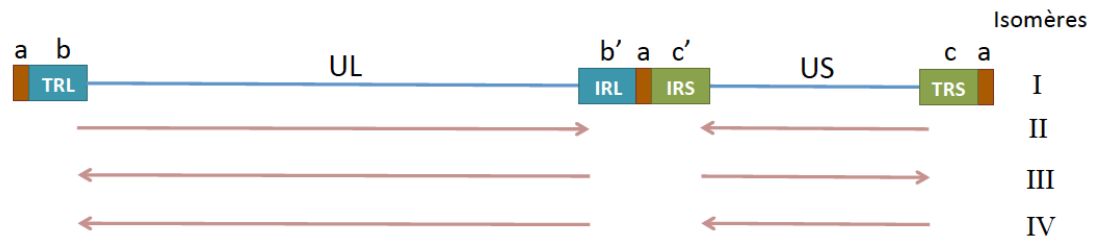


Figure 17 : Les quatre isomères du génome viral. Le génome du CMV est constitué de deux régions uniques non répétées, UL et US. Ces régions sont encadrées par deux paires de séquences répétées, b (TRL et IRL) et c (IRS et TRS). Au cours de la réplication virale, le virus subit des réarrangements internes où les deux régions peuvent s'inverser donnant les quatre isomères possibles du génome viral. Une séquence répétée, a, cadre chaque extrémité du génome et se retrouve aussi à la jonction des séquences IRL et IRS.

b. La capside

La protéine majeure de la capside (*Major Capsid Protein*, MCP) est codée par le gène UL86 (Chee et al. 1989). Elle forme les unités de base des pentamères et des hexamères qui sont à la base de la structure icosaédrique. C'est aussi l'une des protéines les plus conservées du virus. La protéine mineure de la capside (*minor Capsid Protein*, mCP) est codée par le gène UL85. Elle est située à l'intérieur de la capside et permet l'ancrage de l'ADN viral. La protéine mineure de fixation de la capside (*minor Capsid-Binding Protein*, mC-BP) est codée par le gène UL46. Elle s'associe à deux unités de mCP pour former des triplexes localisés entre les capsomères. La plus petite protéine de la capside (*Smallest Capsid Protein* SCP ; UL48–49) sert à la cohésion de celle-ci. Enfin, l'UL80 codent des protéines impliquées essentiellement dans l'assemblage de la capside (Britt 2007).

c. L'enveloppe

L'enveloppe est constituée d'une bicouche lipidique avec plusieurs glycoprotéines à sa surface, dont les plus connues sont les gB, gH, gL, gO, gM, gN et gp48, codées respectivement par les gènes UL55, UL75, UL115, UL74, UL100, UL73 et UL4. Ces glycoprotéines sont relativement bien conservées et portent des épitopes de souche. La plupart d'entre elles sont essentielles pour l'attachement, la fusion et la pénétration du virus dans les cellules cibles (Britt

2007). La glycoprotéine gB est particulièrement immunogène et constitue une cible pour les anticorps neutralisants.

d. Le tégument

La majorité des protéines du tégument sont des phosphoprotéines. pp65 (ou UL83), qui représente 95% des protéines du tégument, est retrouvée dans le noyau cellulaire immédiatement après l'infection virale (Gallina et al. 1996). Une autre phosphoprotéine, pp150 (ou UL32), semble présente dans le cytoplasme et le noyau des cellules infectées (Hensel et al. 1995 ; Sanchez et al. 2000). Certaines protéines, moins abondantes, peuvent toutefois jouer un rôle dans la réplication virale, comme pp71 (ou UL82). pp28 (ou UL99) est une phosphoprotéine très immunogène qui est aussi importante pour la régulation de l'expression des gènes viraux (Britt 2007).

8.1.4. Cycle réplcatif du CMV humain

Le CMV peut infecter différents types cellulaires comme les monocytes, les DC, les macrophages, les cellules endothéliales, les fibroblastes, les cellules épithéliales, les cellules musculaires lisses, les cellules stromales, les progéniteurs des cellules neuronales et les neurones (Sinzger and Jahn 1996 ; Plachter, Sinzger, and Jahn 1996 ; Sinzger et al. 1996 ; Luo, Schwartz, and Fortunato 2008). Ce tropisme diffère cependant entre les souches cliniques et les souches de laboratoires qui sont moins virulentes.

Les mécanismes utilisés par le CMV pour pénétrer dans la cellule sont largement étudiés. Néanmoins, les détails de ce procédé demeurent incomplets. Les glycoprotéines de surface semblent jouer un rôle crucial dans cette entrée dans la cellule. En effet, l'attachement du CMV commence par des interactions de basse affinité entre les glycoprotéines gB, gM/N et les protéoglycanes d'héparane sulfate exprimées à la surface cellulaire (Compton, Nowlin, and Cooper 1993). Cependant, ces interactions nécessitent l'engagement d'autres récepteurs cellulaires qui ne sont pas encore bien définis, bien que de nombreuses molécules aient été proposées comme étant des récepteurs du CMV. Il avait été montré que des protéines du tégument, et non de l'enveloppe, fixent la $\beta 2m$

(Grundy, McKeating, and Griffiths 1987 ; Grundy et al. 1987). Ces données suggèrent un modèle dans lequel le virus fixe indirectement les molécules HLA de classe I via la $\beta 2m$. Plus tard, d'autres travaux ont montré que la $\beta 2m$ n'est pas nécessaire pour une infection *in vitro* avec le CMV ou pour la propagation *in vivo* du virus (Beersma et al. 1991 ; Q. H. Wu et al. 1994 ; Polić et al. 1996). Huang et ses collaborateurs ont proposé l'EGFR (*Epidermal Growth Factor Receptor*) comme récepteur spécifique du CMV humain (X. Wang et al. 2003). Cependant, il n'y a pas de résultats concluants sur le rôle indispensable de l'EGFR dans le relargage des particules virales dans le cytoplasme. De plus, l'EGFR n'est pas exprimé sur tous les types cellulaires permissifs au CMV. D'autres récepteurs comme le DC-SIGN qui permet l'infection des DC (Halary et al. 2002) ou le PDGFR (*Platelet-Derived Growth Factor-alpha Receptor*) qui interagit avec la glycoprotéine gB ont été également proposés (Soroceanu, Akhavan, and Cobbs 2008).

Le cycle naturel de l'infection à CMV oscille entre la primo-infection, la latence et des épisodes de réactivation du virus.

Lorsque l'infection est active, le cycle du CMV varie entre 96 et 120 heures, en fonction du type cellulaire. L'infection commence par la fixation du virus à la membrane cellulaire, la fusion des deux membranes virale et cellulaire et le relargage de la nucléocapside dans le cytoplasme (Fig. 18). Aussitôt l'ADN viral est libéré, il est transloqué dans le noyau. La transcription des gènes viraux se fait alors en trois phases coordonnées :

a. Phase très précoce

Cette phase correspond à l'expression de gènes très précoces (*Immediate Early*, IE) dont les produits sont des transactivateurs utiles aux transcriptions virales ultérieures. Les protéines principales de cette phase sont IE1 (72 kDa) et IE2 (86 kDa), codées respectivement par les gènes UL123 et UL122, sous le contrôle d'un puissant promoteur viral nommé MIEP (*Major Immediate Early Promoter*). Ce dernier comporte aussi des sites pour différents facteurs de transcription cellulaire comme NF- κ B (*Nuclear Factor-kappa B*) (DeMeritt,

Milford, and Yurochko 2004), CRE (*Cyclic AMP Responsive Element*) (Stamminger, Fickenscher, and Fleckenstein 1990) ou encore RARE (*Retinoic Acid Responsive Element*) (Ghazal et al. 1992). IE2 se comporte comme un régulateur de la transcription cellulaire et a la capacité de se fixer à l'ADN de la cellule. IE1 interagit avec la chromatine et d'autres protéines cellulaires mais ne peut pas lier l'ADN. En revanche, les deux protéines sont indispensables pour la réplication virale (White et al. 2004 ; Reinhardt et al. 2005). Des protéines mineures très précoces comme TRS1 et IRS1 sont aussi des protéines régulatrices nécessaires à la réplication virale (Blankenship and Shenk 2002)

b. Phase précoce

Cette phase correspond à l'expression de gènes précoces (*Early*, E) dont les produits sont des protéines impliquées dans la synthèse de l'ADN viral. La production de ces protéines est dépendante de l'origine lytique de réplication (*ori-Lyt*), située près du centre de la séquence UL. Ensemble, les protéines UL84 et IE2 (avec accessoirement les produits de UL112-113) initient la réplication en agissant spécifiquement sur la région *ori-Lyt*, environ 12 heures après l'infection (Sarisky and Hayward 1996 ; Reid, Ellsmore, and Stow 2003). La polymérase virale, codée par le gène UL54, et sa protéine accessoire, pUL44 (*pUL54 associated processivity factor*), commencent alors la synthèse de l'ADN selon le modèle du cercle roulant qui aboutit à la formation de concatémères d'ADN. Chaque unité du génome est délimitée par des séquences portant des motifs conservés nommés *pac-1* et *pac-2* (*packaging signal*). La protéine kinase UL97 serait, quant à elle, nécessaire pour empêcher l'agrégation de pp65 dans le noyau (Prichard et al. 2005).

c. Phase tardive

Cette phase correspond à l'expression de gènes tardifs (*Late*, L) dont les produits sont essentiellement des protéines de structure du virion. Durant cette phase a lieu aussi l'encapsidation de l'ADN viral et l'assemblage de toutes les protéines de structure. Certains gènes très précoces ou précoces peuvent continuer à s'exprimer durant cette phase. Le clivage des concatémères d'ADN et

leur transfert dans les nucléocapsides néoformées nécessitent la présence de protéines virales codées essentiellement par les gènes UL56 et UL89. La protéine pUL56, grâce à ses domaines d'interaction avec l'ADN, reconnaît les séquences *pac*. Sa fixation à ce niveau active le premier clivage de l'ADN et la liaison du complexe pUL56/ADN à une autre protéine, la pUL89. Le complexe pUL56/pUL89/ADN, ainsi formé, va interagir avec la protéine pUL104. Cette dernière, dite *portail de la capsid*, va permettre le transfert de l'ADN dans la capsid (Bogner, Radsak, and Stinski 1998 ; Scheffczik et al. 2002 ; Britt 2007). Ces protéines sont appelées *terminases* car elles interviennent à la phase terminale de la maturation de l'ADN. Ainsi, le génome viral est encapsidé à la fin de la phase tardive dans le noyau. Les protéines du tégument vont ensuite s'associer à la nucléocapsid avant l'acquisition de l'enveloppe. Les mécanismes de l'acquisition de cette dernière ne sont pas encore bien définis. Néanmoins, certains travaux suggèrent que la membrane provient du système endosomal de la cellule (Tooze et al. 1993 ; Fraile-Ramos et al. 2001). Enfin, les virions néoformés vont être véhiculés vers la membrane plasmique et excrétés dans le milieu extracellulaire, environ 96 heures après l'infection de la cellule.

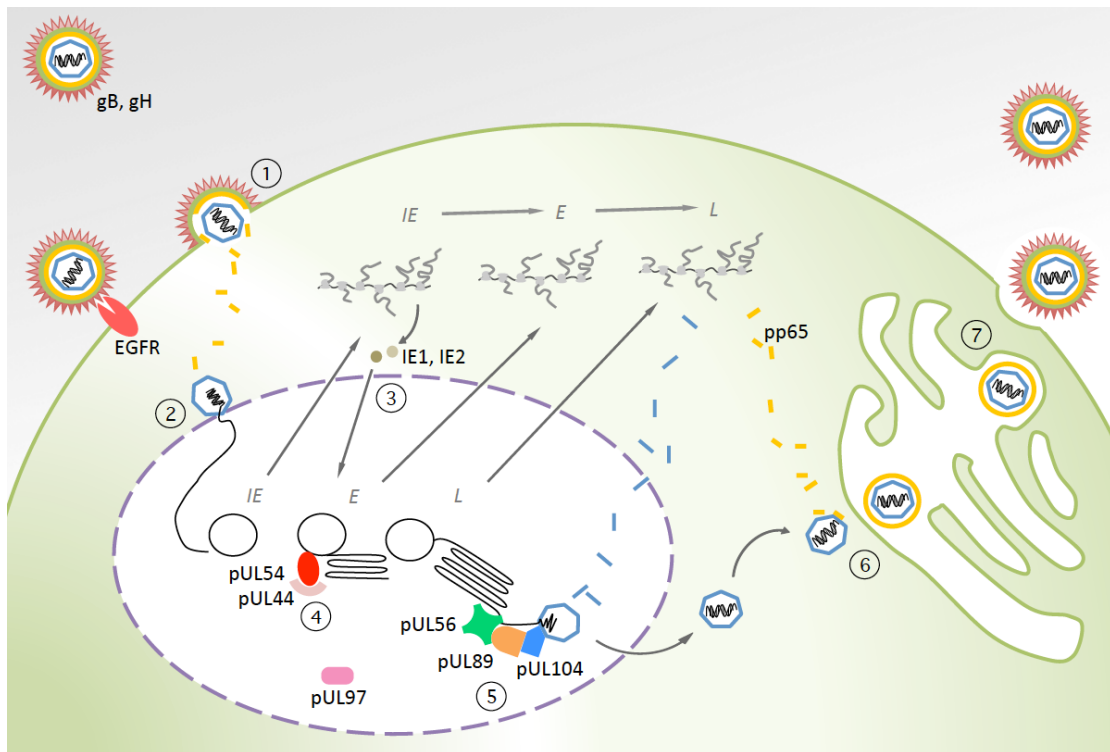


Figure 18 : Le cycle réplcatif du CMV humain. (1) Fusion du virion et entrée de la capside par endocytose. (2) Pénétration de l'ADN viral dans le noyau et circularisation. (3) Expression des gènes très précoces et synthèse des protéines transactivatrices IE et des protéines de la phase précoce E. (4) Réplication de l'ADN selon le modèle du cercle roulant et la formation des concatémères d'ADN. (5) Expression des gènes tardifs. Maturation et encapsidation de l'ADN viral. (6) Tégumentation et formation de l'enveloppe. (7) Exocytose des virions néoformés.

8.1.5. L'infection par le CMV humain

L'infection par le CMV est endémique. Elle évolue sans influence saisonnière, avec une séroprévalence plus importante dans les pays pauvres ($\approx 90\%$) comparativement aux pays riches ($\approx 50\%$). Le CMV se transmet par contact direct, via les liquides physiologiques (le sang, la salive, le lait, l'urine, le sperme, les sécrétions vaginales...etc.), ou par voie iatrogène (transfusions sanguines, greffes). Après l'infection, le virus n'est jamais éliminé et reste à l'état latent dans l'organisme durant toute la vie de l'individu. Des épisodes de réactivation asymptomatique sont toutefois possibles.

Ainsi, chez un individu immunocompétent, l'infection à CMV est asymptomatique et restreinte aux glandes salivaires et aux reins. En revanche, chez des sujets immunodéprimés, l'infection s'étend à d'autres tissus en touchant différents

types cellulaires comme les fibroblastes, les cellules endothéliales, les cellules musculaires, et les cellules d'origine myéloïde (Sinzger and Jahn 1996 ; Plachter, Sinzger, and Jahn 1996 ; Sinzger et al. 1996 ; Luo, Schwartz, and Fortunato 2008).

8.1.6. Echappement du CMV au système immunitaire

Le CMV code plus de 200 protéines potentiellement immunogènes. Au cours de la primo-infection, il initie une puissante réponse immunitaire commençant par une forte activation de l'immunité innée. Celle-ci conduit notamment à l'instauration d'une immunité adaptative durable, avec des anticorps neutralisants et des lymphocytes T CD4⁺ et T CD8⁺ spécifiques du virus. Cependant, afin de rester à l'état latent dans l'organisme, le CMV mobilise 10 à 20% de son génome pour échapper au système immunitaire. En effet, de nombreuses protéines virales sont impliquées dans l'inhibition de la reconnaissance par les lymphocytes T CD4⁺ et T CD8⁺ et par les cellules NK, trois types cellulaires décrits comme des protagonistes majeurs dans le contrôle de l'infection à CMV.

a. Echappement à la reconnaissance par les lymphocytes T CD4⁺ et T CD8⁺

Le taux de lymphocytes T spécifiques du CMV chez les individus séropositifs est bien plus important que celui observé dans d'autres infections virales. En effet, environ 10% des populations lymphocytaires T CD4⁺ et T CD8⁺ mémoires du sang périphérique sont spécifiques du CMV (Sylwester et al. 2005). Malgré la large spécificité des réponses T dans l'infection à CMV, de nombreuses études se sont penchées sur les lymphocytes T spécifiques des protéines pp65 (UL83) et IE1 (UL123) (Retière et al. 2000 ; Sylwester et al. 2005 ; Bunde et al. 2005), considérées comme deux protéines immunodominantes du CMV (plus de 50% des individus ont des lymphocytes spécifiques des deux protéines). Néanmoins, il existe d'autres molécules très immunogènes, comme les produits des gènes UL48, UL55, UL122, UL32, UL99 et UL82 (Sylwester et al. 2005). Pour échapper à la reconnaissance par les lymphocytes T, le CMV code différentes protéines impliquées dans l'inhibition de la présentation d'épitopes viraux via les molécules du CMH de classes I et II. En effet, la séquence virale US code plusieurs

glycoprotéines qui ont la capacité d'inhiber l'expression des molécules HLA de classe I à la surface des cellules infectées. La première des protéines à être exprimée durant l'infection virale est la gpUS3 qui retient les molécules HLA de classe I dans le RE, altérant ainsi la reconnaissance par les lymphocytes T CD8⁺ précocement au cours de la réplication virale (del Val et al. 1992 ; T. R. Jones et al. 1996). De plus, la gpUS3 peut également inhiber le chargement peptidique à la surface des molécules HLA de classe I en fixant la tapasine (*TAP associated glycoprotein*) (Park et al. 2004). Les glycoprotéines gpUS2 et gpUS11, quant à elles, se lient aux molécules HLA de classe I et les transportent hors du RE, pour être dégradées par le protéasome (Ahn et al. 1996 ; Wiertz, Jones, et al. 1996 ; Wiertz, Tortorella, et al. 1996). Le gène viral US6 code une autre glycoprotéine, la gpUS6, capable de se lier aux protéines de transport des antigènes TAP-1 et TAP-2, inhibant ainsi le chargement peptidique et l'expression des molécules HLA de classe I (Lehner et al. 1997 ; Hewitt, Gupta, and Lehner 2001). Deux glycoprotéines virales, la gpUS8 et la gpUS10, sont également capables de fixer les molécules HLA de classe I dans le RE. Cependant, aucune de ces protéines ne baisse l'expression des molécules HLA à la surface cellulaire. Leur mode d'action dans l'infection à CMV est aujourd'hui mal connu (Tirabassi and Ploegh 2002 ; Furman et al. 2002). Par ailleurs, la gpUS3 peut aussi inhiber l'expression des molécules HLA de classe II à la surface cellulaire en empêchant leur assemblage et leur transport vers la membrane plasmique (Hegde et al. 2002). Comme pour les molécules HLA de classe I, la glycoprotéine gpUS2 se lie également aux molécules HLA de classe II pour les transporter dans le cytosol et les faire dégrader par le protéasome (Tomazin et al. 1999 ; Hegde and Johnson 2003). Enfin, la protéine du téguement pp65 peut aussi induire une accumulation des molécules HLA de classe II dans les lysosomes ce qui conduit à une dégradation de leur chaîne α et, ainsi, à une diminution de leur expression à la surface cellulaire (Odeberg et al. 2003). D'autres travaux ont montré qu'aussi bien au cours d'une infection productive ou de la latence, le CMV peut aussi moduler l'expression des molécules HLA de classes I et II en produisant sa propre cytokine immunomodulatrice, la cmvIL-10 (ou la LAcmvIL-10 (*Latency-Associated cmvIL-10*)), capable de se lier au récepteur de l'IL-10 humaine (Kotenko et al. 2000 ; Jenkins et al. 2008).

b. Échappement à la reconnaissance par les cellules NK

Les individus qui ont des déficits en cellules NK fonctionnelles sont très sensibles à l'infection par le CMV (Biron, Byron, and Sullivan 1989 ; Gazit et al. 2004). Chez la souris, de nombreuses études ont montré le rôle crucial joué par les cellules NK dans le contrôle de l'infection par le MCMV, notamment dans des modèles de transfert adoptif de cellules NK à des souris SCID infectées par le virus (Welsh et al. 1991) . Enfin, la preuve indirecte de l'importance des cellules NK dans le contrôle de l'infection est suggérée par l'impressionnant mécanisme mis en place par le virus pour échapper à ce contrôle (Fig. 20).

Nous venons de voir que pour empêcher la reconnaissance par les lymphocytes T, le CMV code différentes protéines pour inhiber l'expression des molécules HLA de classe I à la surface des cellules infectées. Ceci devrait rendre ces dernières très susceptibles à la lyse par les cellules NK qui sont capables de reconnaître le «soi-manquant». Cependant, le virus code une glycoprotéine homologue des molécules HLA de classe I, la gpUL18 (Beck and Barrell 1988) (Fig. 19). Cette protéine lie la $\beta 2m$ et fixe le récepteur inhibiteur ILT-2 (LIR-1) avec 1000 fois plus d'affinité que les molécules HLA de classe I (Cosman et al. 1997 ; Chapman, Heikeman, and Bjorkman 1999), inhibant ainsi les cellules NK ILT-2⁺ (Prod'homme et al. 2007).

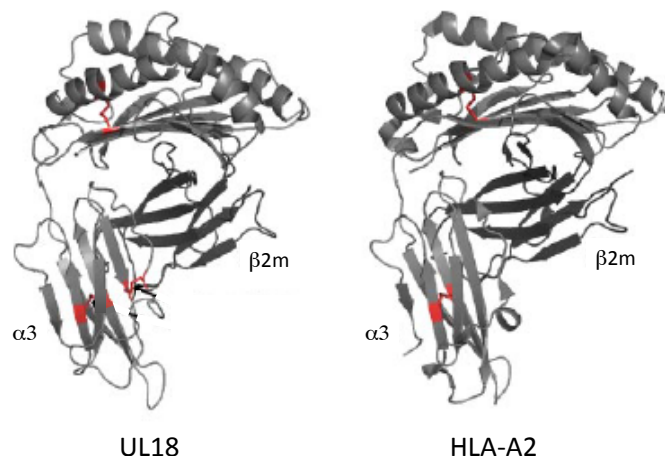


Figure 19 : Homologie de la glycoprotéine virale UL18 avec la molécule HLA-A2. (Wagner, Ljunggren, and Achour 2008). Les chaînes lourdes de la protéine UL18 et de la molécule HLA-A2 sont représentées en gris clair. Les protéines $\beta 2m$ sont représentées en gris foncé. Les ponts disulfures nécessaires à la structure tridimensionnelle des complexes protéiques sont représentés en rouge.

Le CMV utilise aussi la molécule HLA-E pour inhiber les cellules NK CD94/NKG2A⁺. Pour ce faire, le virus code une glycoprotéine, la gpUL40, dont le peptide signal est capable de se fixer à la molécule HLA-E permettant ainsi le maintien de son expression à la surface cellulaire et une interaction avec le complexe inhibiteur CD94/NKG2A (P Tomasec et al. 2000 ; Ulbrecht et al. 2000 ; E. C. Y. Wang et al. 2002). Néanmoins, il serait intéressant de rappeler ici que la molécule HLA-E est aussi le ligand du complexe activateur CD94/NKG2C (V. M. Braud et al. 1998). De plus, chez les individus séropositifs pour le CMV, il y a une expansion des cellules NK NKG2C⁺ (Gumá et al. 2004 ; Foley, Cooley, Verneris, Pitt, et al. 2012 ; Béziat et al. 2012). Aussi, bien que l'hétérodimère CD94/NKG2A semble avoir plus d'affinité pour le HLA-E dans une situation physiologique (Valés-Gómez et al. 1999), il serait bien probable que cette expansion cellulaire liée à la séropositivité au CMV soit le résultat d'une activation sélective des cellules NK CD94/NKG2C⁺ dans ce contexte afin de contrôler l'infection.

Par ailleurs, pour prévenir l'activation des cellules NK, le CMV code des protéines connues pour leur capacité à empêcher l'expression des ligands des récepteurs activateurs, comme NKG2D et DNAM-1, à la surface des cellules infectées : la gpUL16 se lie aux protéines de stress MICB, ULBP1, ULBP2 et ULBP6 (Cosman et al. 2001 ; Eagle et al. 2009) pour les retenir en intracellulaire et bloquer leur

interaction avec le récepteur NKG2D (C. Dunn et al. 2003 ; Rölle et al. 2003). De même, le gène viral UL112 code un microRNA, miR-UL112, capable de réduire l'expression de MICB sur les cellules infectées (Stern-Ginossar et al. 2007). Le gène UL142 code une protéine qui retient MICA et ULBP3 dans le cis-Golgi, empêchant ainsi leur expression à la membrane plasmique (Wills et al. 2005 ; Chalupny et al. 2006 ; Ashiru et al. 2009 ; N. J. Bennett et al. 2010). Cependant, l'important polymorphisme des gènes MICA permet à l'hôte de contrer l'inhibition de l'expression de certaines molécules MICA. En effet, l'un des allèles MICA les plus répandus est MICA*008 dont la protéine a une forme intracellulaire tronquée, résistante à la rétention par l'UL142 (Zou et al. 2005). Une autre protéine virale, codée par le gène UL141, inhibe l'expression des ligands des récepteurs DNAM-1 (CD226) et Tactile (CD96), en l'occurrence nectine-2 (CD112) et PVR (CD155), à la surface des cellules infectées (Peter Tomasec et al. 2005 ; Prod'homme et al. 2010). Pour finir, la protéine du tégument pp65 peut se fixer sur le récepteur activateur NKp30 et le dissocier du CD3 ζ , inhibant ainsi la transduction du signal activateur et la cytotoxicité des cellules NK (Tal I Arnon et al. 2005a).

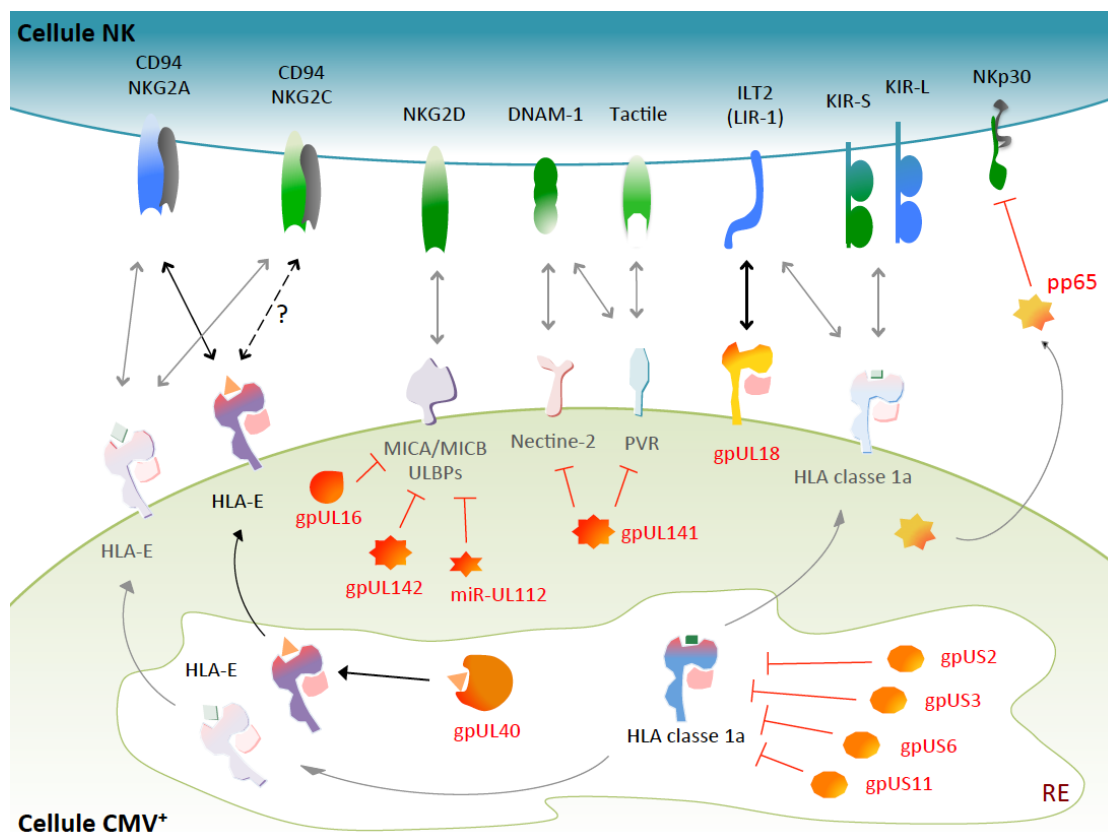


Figure 20 : Mécanismes d'échappement du CMV aux cellules NK. Les glycoprotéines gpUS2, gpUS3, gpUS6 et gpUS11 inhibent l'expression des molécules HLA de classe I à la surface de la cellule infectée par le CMV, afin d'échapper à la reconnaissance par les lymphocytes T CD8⁺. Pour échapper à la reconnaissance par les cellules NK, plusieurs protéines virales sont produites au cours du cycle de réplication du CMV : Le peptide signal de la gpUL40 peut se fixer sur la molécule HLA-E permettant ainsi l'expression de celle-ci à la surface cellulaire et son interaction avec le récepteur inhibiteur CD94/NKG2A. La gpUL18 est un homologue des molécules HLA de classe I qui fixe la $\beta 2m$ et interagit, avec une très forte affinité, avec le récepteur inhibiteur ILT2. Les gpUL16 et gpUL142, ainsi que le microRNA miR-UL112, inhibent l'expression des ligands du récepteur activateur NKG2D, MICA/B et ULBPs. La gpUL141 inhibe l'expression de PVR et Nectine-2 qui sont les ligands des récepteurs activateurs DNAM-1 et Tactile. La phosphoprotéine pp65 inhibe le récepteur activateur NKp30.

8.2. Autres herpesvirus

Bien que leur rôle dans le contrôle des autres infections herpétiques ne soit pas aussi bien documenté que dans l'infection à CMV, les cellules NK semblent essentielles pour maintenir la latence des herpesvirus. En effet, les patients souffrant d'une déficience de cellules NK fonctionnelles développent différentes infections liées aux herpesvirus comme le virus varicelle-zona (VZV)

ou le virus herpes simplex (HSV) (Biron, Byron, and Sullivan 1989 ; Gazit et al. 2004 ; Etzioni et al. 2005 ; Orange 2002).

Une étude menée *in vitro* a montré que la réactivation de l'EBV dans les lymphocytes B transformés rend ceux-ci sensibles à la lyse NK par une «downrégulation» des molécules HLA de classe I et HLA-E ainsi qu'une augmentation de l'expression des protéines ULBP-1 et CD112, ligands respectifs des récepteurs NKG2D et DNAM-1 (Pappworth, Wang, and Rowe 2007). De plus, un syndrome lymphoprolifératif associé à l'EBV a été décrit chez un patient souffrant d'une immunodéficience sélective des cellules NK (Eidenschenk et al. 2006).

Des études épidémiologiques ont mis en évidence le rôle protecteur de la présence des gènes KIR2DS1 et KIR3DS1 dans le développement du lymphome de Hodgkin (Besson et al. 2007).

8.3. Le virus influenza

Les cellules NK sont activées lorsqu'elles sont cultivées avec des DC autologues infectées avec le virus influenza A. De plus, le blocage des récepteurs activateurs NKG2D et NKp46 inhibe cette activation (Draghi et al. 2007). En effet, le premier ligand décrit du récepteur NKp46 est l'HA du virus influenza (Mandelboim et al. 2001). Un autre NCR reconnaît aussi l'HA du virus de la grippe. Il s'agit du récepteur activateur NKp44 (T I Arnon et al. 2001 ; Ho et al. 2008). Par ailleurs, dans un modèle d'infection *in vitro* avec le virus influenza, une étude a montré que les cellules NK KIR2DL3⁺, issues d'individus HLA-C1, sont plus activées que les cellules NK KIR2DL1⁺, issues d'individus HLA-C2 (Ahlenstiel et al. 2008). Une autre équipe a décrit très récemment le rôle néfaste de la présence de certains gènes KIR associés à l'haplotype B, en l'occurrence KIR3DS1, KIR2DS5 et KIR2DL5, dans l'exacerbation des phénomènes inflammatoires liés à l'infection au virus influenza A (H1N1) (Aranda-Romo et al. 2012).

8.4. Le virus de l'hépatite C

Des études épidémiologiques ont montré une association entre le polymorphisme des gènes KIR et HLA avec la clairance du virus de l'hépatite C

(HCV). En effet, Khakoo et ses collaborateurs ont montré que la présence chez l'individu du gène inhibiteur KIR2DL3 et son ligand HLA-C1 est directement impliquée dans l'élimination du virus (Khakoo et al. 2004). Bien que les récepteurs inhibiteurs KIR2DL2 et KIR2DL3 reconnaissent les molécules HLA-Cw du groupe C1, KIR2DL2 fixe les molécules HLA-Cw du groupe C1 avec plus d'affinité que KIR2DL3 (Winter et al. 1998). Ainsi, d'après Khakoo, la faible interaction KIR2DL3:HLA-C1 serait plus protectrice car le signal inhibiteur délivré est plus facilement dominé par les autres signaux activateurs. Ceci n'est pas, par exemple, le cas des autres interactions plus fortes comme KIR2DL1:HLA-C2 et KIR2DL2:HLA-C1. Cependant, cet effet du KIR2DL3 et son ligand n'est observé que chez les individus qui ont une faible charge virale (Khakoo et al. 2004). De même, une équipe espagnole a montré l'effet protecteur de la combinaison génétique KIR3DS1/HLA-Bw4I80 (motifs Bw4 avec une isoleucine en position 80), contre le développement d'un carcinome hépatique chez les patients infectés par le virus de l'hépatite C (Antonio López-Vázquez et al. 2005). Un autre travail réalisé sur des patients atteints de l'hépatite C ou de l'hépatite B, décrit une expansion des cellules NK CD56^{dim} NKG2C⁺ liée à la séropositivité de ces patients pour le CMV. Ces cellules amplifiées expriment des récepteurs KIR spécifiques du soi, en particulier les KIR2DL2/3, et sont capables d'un grand potentiel de dégranulation et d'une importante production de granzymes B et de cytokines (IFN- γ et TNF- α) (Béziat et al. 2012).

Par ailleurs, le virus de l'hépatite C a mis au point un mécanisme pour échapper à la réponse NK. Pour cela, il engage une protéine majeure du tégument, la protéine E2, pour fixer le CD81, également utilisé par le virus pour rentrer dans les cellules (Pileri et al. 1998), afin d'inhiber la cytotoxicité des cellules NK, leur prolifération et leur production d'IFN- γ (Crotta et al. 2002).

8.5. Le VIH

Comme pour l'hépatite C, des études épidémiologiques ont décrit une association des polymorphismes des gènes KIR et HLA avec la progression de l'infection par le VIH vers le SIDA (Martin et al. 2002 ; Martin et al. 2007 ; Alter et al. 2007 ; Boulet, Kleyman, et al. 2008). Des travaux ont montré que les individus infectés par le VIH, mais qui expriment des allèles HLA-B qui codent des

molécules avec un motif Bw4 ne développent pas rapidement la maladie (Flores-Villanueva et al. 2001). Cette protection est plus significative lorsque les individus possèdent une combinaison d'allèles HLA-B, qui codent des molécules HLA-Bw4 avec une isoleucine en position 80, certains allèles KIR3DL1 et le KIR3DS1 (Martin et al. 2002 ; Martin et al. 2007). Bien que le ligand du KIR3DS1 n'est pas encore défini, des données montrent que les cellules NK KIR3DS1⁺ mais non KIR3DS1⁻ suppriment, *in vitro*, la réplication du VIH dans des cellules qui expriment des molécules HLA-B avec des motifs Bw4 (Alter et al. 2007). De façon curieuse, l'un des allèles KIR3DL1 les plus protecteurs est le KIR3DL1*004 (Martin et al. 2007). Or, l'allèle KIR3DL1*004 code une protéine qui n'est pas exprimée à la surface des cellules NK (Pando et al. 2003). Ainsi, le mécanisme d'action de ce récepteur reste inconnu.

Par ailleurs, le VIH a mis au point différents moyens pour échapper à la réponse immunitaire des cellules NK. Par exemple, au niveau des cellules infectées par le virus, il y a une augmentation de l'expression des molécules HLA-E, ce qui permet d'inhiber les cellules NK en interagissant avec le complexe inhibiteur CD94/NKG2A (Nattermann et al. 2005 ; Martini et al. 2005). De même, la protéine virale Nef (*Negative Factor*) diminue préférentiellement l'expression des molécules HLA-A et HLA-B mais pas celle des molécules HLA-Cw (Cohen et al. 1999). Ainsi, les cellules infectées par le VIH ne sont pas reconnues par les CTL, mais engagent leurs molécules HLA-Cw avec les récepteurs KIR inhibiteurs des cellules NK. De cette façon, le virus réussit à échapper aussi bien aux CTL qu'aux cellules NK. De plus, la protéine Nef induit aussi une diminution de l'expression des ligands du récepteur NKG2D à la surface des cellules infectées pour échapper à la réponse NK (Cerboni et al. 2007).

9. Les cellules NK dans le contrôle des infections bactériennes et parasitaires

Bien que le rôle antitumoral et antiviral des cellules NK ait été le mieux documenté, celles-ci suscitent un intérêt croissant dans les défenses antibactériennes et antiparasitaires. Les cellules NK seraient importantes dans le contrôle de l'infection à *Mycobacterium tuberculosis* : il a été montré que chez les patients tuberculeux, les cellules NK fraîchement isolées du sang périphérique peuvent présenter des déficits fonctionnels (Maertzdorf et al. 2011). Au cours de la tuberculose, les cellules NK sont essentiellement activées par les récepteurs NKp46 et NKG2D. Elles peuvent alors éliminer les monocytes infectés et produire de l'IFN- γ qui soutient une réponse T de type Th1 (Vankayalapati et al. 2002 ; Vankayalapati et al. 2005). De plus, bien que le ligand n'ait pas été identifié, une équipe a montré que le récepteur NKp44 reconnaît directement le *Mycobacterium* (Esin et al. 2008).

De la même façon, les cellules NK sont indispensables dans le contrôle de nombreuses infections parasitaires comme le paludisme, la toxoplasmose, la leishmaniose et les trypanosomiasés (Korbel, Finney, and Riley 2004). L'activation des cellules NK est, le plus souvent, médiée par les cytokines environnantes liées à l'infection. Toutefois, les cellules NK peuvent être activées, dans certains cas, par des contacts directs avec le parasite ou les cellules infectées. Ceci a été décrit notamment dans la leishmaniose, où le lipophosphoglycane (LPG) active les cellules NK en interagissant avec le TLR2 dont l'expression est augmentée au cours de la parasitose (Becker et al. 2003). Dans le paludisme, les cellules NK sont activées par un contact direct avec des globules rouges infectés avec *Plasmodium falciparum* (Artavanis-Tsakonas et al. 2003 ; Mavoungou, Luty, and Kremsner 2003).

Enfin, parce qu'elles sont capables de produire de grandes quantités d'IFN- γ pour initier une puissante réponse T de type Th1 et pour recruter d'autres cellules de l'immunité innée sur le site de l'infection, les cellules NK sont cruciales pour lutter contre les infections bactériennes et parasitaires.

10. Les cellules NK et l'autoimmunité

De nombreuses études ont montré une association entre certains gènes KIR, en particulier ceux appartenant à l'haplotype B, ou certaines combinaisons KIR/HLA, et les maladies auto-immunes (Tableau 2). En effet, il a par exemple été montré que la présence du gène KIR2DS1 avec l'allèle HLA-C*06 augmente la susceptibilité au psoriasis (Łuszczek et al. 2004 ; Suzuki et al. 2004). De même, la présence du KIR2DS2 avec le HLA-C1 augmente les risques de développer un diabète de type I lorsqu'il n'y a pas de HLA-C2 et Bw4 qui pourraient engager les récepteurs KIR inhibiteurs (van der Slik et al. 2003). Ainsi, tandis que KIR2DL3, lorsqu'il est présent avec son ligand HLA-C1, semble protecteur, les KIR2DL2/2DS2 ont été associés à différentes maladies auto-immunes comme l'arthrite rhumatoïde (Yen et al. 2001), la colite ulcéreuse (D. C. Jones et al. 2006), l'arthrite liée au psoriasis (Nelson et al. 2004) et le diabète de type I (van der Slik et al. 2003). Par ailleurs, comme les haplotypes KIR qui ont le KIR2DS2 sans le KIR2DL2 sont rares, il est difficile d'évaluer l'impact de chacun de ces deux gènes sur la susceptibilité à l'auto-immunité. Toutefois, une étude réalisée sur 12 patients atteints de sclérodémie montre que tous ces patients ont le KIR2DS2 mais n'ont pas la forme inhibitrice KIR2DL2 (Momot et al. 2004). Dans ce dernier cas, il semblerait qu'une perturbation de l'équilibre habituel entre le KIR2DS2 et le KIR2DL2 soit la cause de la susceptibilité à la maladie.

Tableau 2 : Associations génétiques KIR, KIR/HLA, prédisposantes aux maladies auto-immunes.

Maladies auto-immunes	Associations KIR, KIR/HLA, prédisposantes à la maladie	Références
Arthrite psoriasique	Présence du KIR2DS1 Présence du KIR2DS2 + absence du KIR2DL3 et du HLA-C1	Williams et al, 2005 Nelson et al, 2004
Sclérodermie	Présence du KIR2DS2 + absence du KIR2DL2	Momot et al, 2004
Diabète de type I	Présence des KIR2DL2 et KIR2DS2 Présence du KIR2DS2 + HLA-C1	Nikitina-Zake et al, 2004 Van der Slik et al, 2003
Arthrite rhumatoïde	Présence du KIR2DS2	Yen al, 2001
Lupus érythémateux disséminé	Présence des KIR2DL2 et KIR2DS1 Présence du KIR2DS1 + absence du KIR2DS2	Hou et al, 2010 Pellet et al, 2007
Maladie de Crohn	Présence du KIR2DL2/L3 + présence du HLA-C1	Hollenbach et al, 2009
Colite ulcéreuse	Présence des KIR2DL2 et KIR2DS2 + absence du KIR2DL3 et du HLA-C1	Jones et al, 2006
Psoriasis vulgaris	Présence du KIR2DS1, haplotype KIR B	Suzuki et al, 2004 Luszczek et al, 2004
Syndrome de Gougerot-Sjögren	Présence du KIR2DS2 + absence du KIR2DL2 La présence de HLA-C1 est encore plus prédisposante à la maladie	Lowe et al, 2009
Sclérose en plaques	Présence des KIR2DL5 et KIR3DS1	Garcia Laon et al, 2011

Afin de comprendre les mécanismes par lesquels ces associations peuvent être à l'origine des prédispositions aux maladies auto-immunes, ces études génétiques nécessitent néanmoins une base cellulaire pour mettre en évidence les interactions des récepteurs KIR avec leurs ligands et l'implication sur l'autoréactivité des cellules NK.

OBJECTIFS DU TRAVAIL DE THÈSE

L'infection à CMV représente une complication majeure en greffe de CSH ainsi qu'en greffe de rein. Suite à une allogreffe de CSH et au cours de la reconstitution immunitaire, les cellules NK sont les premières à apparaître dans le sang périphérique. Le rôle bénéfique de l'alloréactivité de ces cellules NK sur le pronostic de la greffe et la diminution des rechutes a été démontré par de nombreuses études génétiques, impliquant essentiellement les incompatibilités KIR-HLA. Cependant, le rôle de ces dernières et la contribution des récepteurs KIR dans le contrôle cellulaire NK de l'infection à CMV n'ont pas encore été explorés.

Durant ces dernières années, différents travaux ont décrit une amplification de la population cellulaire NK NKG2C⁺ KIR⁺ chez les individus séropositifs pour le CMV (Foley, Cooley, Verneris, Curtsinger, et al. 2012 ; Béziat et al. 2012 ; Béziat, Liu, et al. 2013a). Il semblerait, de plus, que dans un contexte de greffe allogénique de CSH, les cellules NK NKG2C⁺ provenant de donneurs séropositifs pour le CMV et exprimant les récepteurs KIR, contrôlent mieux la réactivation du CMV que celles qui proviennent des donneurs séronégatifs (Foley, Cooley, Verneris, Curtsinger, et al. 2012).

C'est dans ce contexte que nous avons développé les différentes théories et approches expérimentales nécessaires à la réalisation de ce travail de thèse. De plus, la situation de notre équipe de recherche au sein de l'Établissement Français du Sang est un avantage conséquent puisqu'elle nous permet d'avoir accès à de nombreux prélèvements sanguins d'individus sains CMV⁻ et CMV⁺, dont les génotypes KIR et HLA sont réalisés, respectivement au laboratoire de recherche et au laboratoire HLA.

L'objectif du premier projet de thèse était d'abord, d'identifier les récepteurs KIR qui sont co-exprimés avec le NKG2C sur les cellules NK amplifiées de notre cohorte d'individus séropositifs pour le CMV, et ce, en tenant compte de l'environnement autologue HLA. Le but était, ensuite, d'évaluer le potentiel cytotoxique des cellules NK NKG2C⁺, exprimant ou non les récepteurs KIR. Pour ce faire nous avons mis en place un modèle *in vitro* utilisant des DC immatures (iDC) allogéniques, infectées ou non par une souche endothéliotrope

du CMV (VHL-E). Enfin, à partir de cellules NK KIR⁺ triées et amplifiées *in vitro* et des iDC infectées ou non par le CMV, nous avons réalisé des expériences de dégranulation dont l'issu était de déterminer le rôle de ces populations NK KIR⁺ dans le contrôle de l'infection à CMV dans un contexte allogénique, ou encore de mettre en évidence d'éventuels mécanismes mis en place par le virus pour échapper à ce contrôle.

Le modèle cellulaire NK-iDC a soulevé plusieurs questions mécanistiques qui nous ont conduits à étudier la formation du répertoire NK KIR2D à partir des PBMC d'une cohorte de 156 donneurs de sang, et à caractériser les interactions des récepteurs KIR2D avec leurs ligands HLA-C. Au cours de ce deuxième projet, nous avons ainsi revisité la spécificité des récepteurs KIR2DL1/2/3 et KIR2DS1/2, en terme de ligands HLA-C, et déterminé l'impact fonctionnel de l'engagement de ces récepteurs avec leurs ligands respectifs sur l'alloréactivité des cellules NK.

Pour étudier la contribution des récepteurs KIR au contrôle de l'infection à CMV par les cellules NK, nous avons mis au point une deuxième approche expérimentale, présentée ici sous la forme du projet 3, qui consistait à étudier la fonctionnalité des cellules NK KIR⁺ vis-à-vis de lignées B-EBV transfectées de façon stable avec deux protéines majeures du CMV, IE1 et pp65. Ce modèle cellulaire permet de cibler spécifiquement ces deux protéines immunodominantes, indépendamment des mécanismes d'échappement qui pourraient biaiser l'interprétation des résultats.

Le quatrième projet mené au cours de cette thèse est réalisé en collaboration avec le Dr Béatrice Charreau. Il s'agissait d'étudier le rôle des lymphocytes NK dans le contrôle de l'infection à CMV, dans un modèle d'infection de cellules endothéliales primaires issues de donneurs de reins. La réactivation du CMV représentant, comme nous l'avons vu, la complication majeure en greffe de rein, l'objectif de ce travail était de mieux comprendre les interactions des cellules NK avec les cellules endothéliales, infectées ou non par le CMV. Pour ce faire, nous avons ciblé les récepteurs KIR mais aussi les récepteurs activateurs

CD94/NKG2C et NKG2D. A long terme, ce projet a pour but d'identifier des sous-populations NK qui pourraient être impliquées plus spécifiquement dans le contrôle de l'infection à CMV dans un contexte mimant la greffe de rein.

Ce travail de thèse devrait permettre de mieux comprendre les interactions des récepteurs KIR2D avec leurs ligands HLA-C dans un contexte allogénique et d'infection à CMV. Les résultats obtenus ici pourraient à terme contribuer à sélectionner les donneurs qui pourraient mieux contrôler les réactivations à CMV, en fonction de leurs génotypes KIR et HLA. Ce travail contribuerait également à l'établissement des règles de l'alloréactivité des cellules NK impliquant les récepteurs KIR et à la définition des critères permettant de sélectionner les donneurs de CSH, en fonction des combinaisons KIR/HLA bénéfiques pour le devenir de la greffe.

RÉSULTATS

RESULTATS

PROJET N°1 : Étude du rôle des récepteurs KIR dans le contrôle de l'infection à CMV dans un modèle de cellules dendritiques allogéniques infectées par le virus.

Amplified NKG2C⁺ NK cells in cytomegalovirus (CMV) infection preferentially express KIR2DL: functional impact in controlling CMV-infected dendritic cells

Zakia Djaoud, Gaëlle David, Céline Bressollette, Catherine Willem, Pauline Rettman, Katia Gagne, Nolwenn Legrand, Souad Mehlal, Anne Cesbron, Berthe-Marie Imbert-Marcille, Christelle Retière.

The Journal of Immunology (2013), 191 : 2708-2716

L'infection à CMV est asymptomatique chez les sujets immunocompétents mais peut être associée à une morbidité importante chez les sujets bénéficiant d'une allogreffe de CSH. Au cours de la reconstitution hématopoïétique, les premiers lymphocytes à apparaître en périphérie sont les cellules NK. Les lymphocytes T ne reconstituent le système immunitaire que deux à trois mois après la greffe, ce qui peut avoir comme conséquence une réactivation des virus latents, comme le CMV. Ainsi, les cellules NK sont cruciales durant cette période pour leur effet GvL, mais aussi pour les défenses anti-virales.

Ces dernières années, de nombreux travaux ont décrit une expansion des cellules NK NKG2C⁺, exprimant les récepteurs KIR spécifiques du soi, chez les individus séropositifs pour le CMV (Gumá et al. 2004 ; Béziat et al. 2012 ; Béziat, Liu, et al. 2013a ; Foley, Cooley, Verneris, Pitt, et al. 2012). Dans l'allogreffe de CSH, il a été montré que la réactivation du CMV est associée à une expansion de cellules NK NKG2C⁺KIR⁺ capables de mieux contrôler l'infection (Foley, Cooley, Verneris, Curtsinger, et al. 2012). Cependant, l'implication directe du récepteur NKG2C dans ce contrôle n'a jamais été démontrée. Par ailleurs, la co-expression des récepteurs KIR avec le NKG2C sur les cellules NK amplifiées chez les individus CMV⁺ soulève la question de leur contribution fonctionnelle au contrôle de l'infection. Bien qu'il ait été montré que la réactivation du CMV induit la maturation rapide des cellules NK améliorant ainsi leur effet GvL bénéfique pour le devenir de la greffe (Della Chiesa et al. 2012), la modulation de l'alloréactivité des cellules NK KIR⁺ par le CMV en greffe allogénique de CSH n'a jamais été explorée.

Pour répondre à ces questions, nous avons d'abord mené une étude phénotypique à partir des PBMC de notre cohorte de donneurs de sang de l'EFS-PL, dont la sérologie CMV ainsi que les génotypes KIR et HLA sont connus. Cette partie du travail avait pour but d'identifier les récepteurs KIR qui sont co-exprimés avec le NKG2C sur les cellules NK amplifiées chez les individus séropositifs pour le CMV. Nous avons alors montré que le récepteur KIR2DL3 est co-exprimé avec le NKG2C sur les cellules NK amplifiées des individus CMV⁺, quelque soit l'environnement HLA-C. Le KIR2DL1 est exprimé sur les cellules NK NKG2C⁺ uniquement dans un environnement HLA-C2.

Pour étudier ensuite la contribution de ces récepteurs KIR au contrôle de l'infection à CMV par les cellules NK, nous avons mis au point un modèle cellulaire *in vitro* basé sur l'utilisation de DC immatures (iDC), infectées ou non par le CMV, comme cibles allogéniques pour des études fonctionnelles des cellules NK.

Le choix de ce modèle cellulaire n'est pas anodin. En effet, il a été montré que les monocytes sont le site majeur de la persistance du CMV en périphérie (Taylor-Wiedeman et al. 1991), et que leur différenciation en cellules dendritiques peut réactiver le virus (Sinclair 2008). De plus, les iDC sont susceptibles à l'infection *in vitro* par des souches endothélotrope du CMV, comme le VHL/E (Riegler et al. 2000), conduisant à une «downrégulation» des molécules HLA de classe I et II (Moutaftsi et al. 2002). Par ailleurs, des études ont décrit un «*cross-talk*» des DC avec les cellules NK, mettant en jeu notamment des molécules de costimulation ou des récepteurs comme DNAM-I et NKp30 (Massimo Vitale et al. 2005 ; Ferlazzo et al. 2002 ; Gerosa et al. 2002 ; Daniela Pende et al. 2006). Pour toutes ces raisons, la DC représente une bonne cible pour les cellules NK dans l'infection à CMV.

L'étude phénotypique des iDC infectées ou non par le CMV a révélé une «downrégulation» des molécules HLA de classe I sur les cellules infectées, y compris les molécules HLA-Cw et HLA-E. On peut noter, néanmoins, que la molécule HLA-E n'est que faiblement exprimée sur les iDC.

Le potentiel cytotoxique des cellules NK vis-à-vis des iDC, infectées ou non par le virus, a été ensuite évalué par cytométrie en flux avec des études de dégranulation et de production d'IFN- γ . Ainsi, nous avons validé notre modèle cellulaire en montrant que les iDC infectées par le CMV échappent à la reconnaissance par les lymphocytes T spécifiques du complexe HLA-A2-pp65 mais sont très bien reconnues par les cellules NK. Aussi, nous avons montré que l'expression des récepteurs KIR2D sur les cellules NK est indispensable pour une meilleure dégranulation et production d'IFN- γ au contact des iDC allogéniques infectées par le CMV.

Afin de déterminer l'impact de l'infection à CMV sur la modulation de l'alloréactivité des cellules NK KIR2DL1⁺ et NK KIR2DL3⁺, des études de dégranulation sont réalisées à partir de ces populations NK KIR⁺ triées et amplifiées in vitro et des iDC C1C1 ou C2C2 infectées ou non par le virus.

Nos résultats montrent une contribution fonctionnelle des récepteurs KIR2DL1 et KIR2DL3 au contrôle des iDC C2C2 infectées par le CMV. L'alloréactivité des cellules NK KIR2DL1⁺ vis-à-vis des iDC C1C1 n'est pas modulée par l'infection de celles-ci. En revanche, dans toutes les expériences réalisées, les cellules NK KIR2DL3⁺ n'étaient pas activées par les iDC C1C1 infectées par le CMV. Ce dernier résultat suggère un éventuel mécanisme d'échappement du CMV à la reconnaissance par les cellules NK KIR2DL3⁺.

Les résultats obtenus dans ce premier projet pourraient à terme contribuer à sélectionner les donneurs qui pourraient mieux contrôler les réactivations à CMV, en fonction de leurs génotypes KIR et HLA.

Amplified NKG2C⁺ NK Cells in Cytomegalovirus (CMV) Infection Preferentially Express Killer Cell Ig-like Receptor 2DL: Functional Impact in Controlling CMV-Infected Dendritic Cells

Zakia Djaoud,* Gaëlle David,* Céline Bressollette,[†] Catherine Willem,* Pauline Rettman,* Katia Gagne,*^{‡,§} Nolwenn Legrand,* Souad Mehlal,* Anne Cesbron,*^{‡,§} Berthe-Marie Imbert-Marcille,[†] and Christelle Retière*

CMV infection represents a major complication in hematopoietic stem cell transplantation, which compromises graft outcome. Downregulation of HLA class I expression is one mechanism by which CMV evades T cell-mediated immune detection, rendering infected cells vulnerable to killer cell Ig-like receptor (KIR)⁺ NK cells. In this study, we observed that the amplified NKG2C⁺ NK cell population observed specifically in CMV seropositive individuals mainly expressed KIR2DL receptors. We have shown that HLA class I expression was downregulated on CMV-infected immature dendritic cells (iDCs), which escape to HLA-A2-pp65-specific T lymphocytes but strongly trigger the degranulation of KIR2D⁺ NK cells. CMV infection conferred a vulnerability of C2C2⁺ iDCs to educated KIR2DL1⁺ and KIR2DL3⁺ NK cell subsets. Alloreactivity of KIR2DL1⁺ NK cell subsets against C1C1⁺ iDCs was maintained independently of CMV infection. Unexpectedly, CMV-infected C1C1⁺ iDCs did not activate KIR2DL3⁺ NK cell reactivity, suggesting a potential CMV evasion to KIR2DL3 NK cell recognition. Altogether, the coexpression of KIR and NKG2C on expanded NK cell subsets could be related to a functional contribution of KIR in CMV infection and should be investigated in hematopoietic stem cell transplantation, in which the beneficial impact of CMV infection has been reported on the graft-versus-leukemia effect. *The Journal of Immunology*, 2013, 191: 000–000.

Human CMV is a β -herpesvirus that establishes a latent infection in healthy individuals but causes a high rate of morbidity in immunocompromised patients and during fetal development. For an effective defense against CMV, both innate and adaptive immune responses are involved (1). Thanks to different inhibitory receptors, NK cells are able to detect the loss of HLA class I molecules from autologous cells, a situation that can occur when cells are perturbed by viral infection or tumor transformation (the “missing self” hypothesis) (2). Indeed, NK cells express different inhibitory receptors for self-HLA class I molecules, including CD94/NKG2A, killer cell Ig-like receptors (KIRs) and ILT2 (LILRB1). The CD94/NKG2A receptor recognizes leader peptides of most HLA-A, -B, -C, and -G molecules presented by the

HLA-E molecule (3). Nevertheless, inhibitory KIRs display a more specific recognition of different HLA class I ligands. For example, HLA-C allotypes with asparagine at position 80 (C1 ligands) are recognized by KIR2DL2/3 whereas HLA-C allotypes with lysine at position 80 (C2 ligands) are recognized by KIR2DL1 (4). Additionally, ILT2 recognizes all HLA class I molecules. Moreover, the interaction between HLA class I molecules and inhibitory receptors is essential in NK cell acquisition of self-tolerance and functional abilities (5).

Soon after infection, different viral proteins downregulate HLA class I molecule expression on infected cells, leading to escape from CMV-specific T lymphocytes, but they render these infected cells vulnerable to NK cell lysis (6). Furthermore, CMV may also escape NK surveillance by maintaining the expression of nonclassical HLA class I molecules, HLA-E and HLA-G, serving as ligands for the inhibitory receptors CD94/NKG2A and ILT2 (7). Recently it has been shown that expansion of NK cells expressing the activating NKG2C counterpart is associated with CMV infection (8–12). Furthermore, CMV has developed different strategies to prevent the expression of ligands for some activating NK cell receptors (13, 14). However, no document discusses the involvement of KIR NK cells in controlling CMV infection or the potential CMV evasion to KIR NK cells. The hypothesis of a prospective role of KIR NK cells in controlling CMV is reinforced by the knowledge gained from the murine model. In fact, Ly49 receptors, analogous to KIR receptors, are mainly engaged to control murine CMV infections (15).

In allogeneic hematopoietic stem cell transplantation (HSCT), CMV infections are considered a major complication, which may compromise graft outcome. After transplantation, lymphoid T cell reconstitution is delayed, resulting in reactivation of latent viral

*Etablissement Français du Sang–Pays de la Loire, EA4271, Immunovirologie et Polymorphisme Génétique, 44011 Nantes Cedex 01, France; [†]Université de Nantes, EA4271, 44000 Nantes, France; [‡]LabEx Transplantex; and [§]Human Leukocyte Antigen Laboratory, Etablissement Français du Sang, Nantes, 44011 Nantes Cedex 01, France

Received for publication April 29, 2013. Accepted for publication June 30, 2013.

This work was supported by the Etablissement Français du Sang–Pays de la Loire and by grants from the International Research Group on Hematopoietic Cell Transplantation, the Agence de la BioMédecine, the Etablissement Français du Sang 2010-06, and Nantes Atlantique Greffe de Moelle Osseuse. Z.D. is a Ph.D. student supported by Conventions Industrielles de Formation par la Recherche Grant 447/2011. P.R. is a Ph.D. student supported by Etablissement Français du Sang/Région des Pays de la Loire/Nantes University.

Address correspondence and reprint requests to Dr. Christelle Retière, Etablissement Français du Sang–Pays de la Loire, EA4271, Immunovirologie et Polymorphisme Génétique, 34 Boulevard Jean Monnet, 44011 Nantes Cedex 01, France. E-mail: christelle.retiere@efs.sante.fr

Abbreviations used in this article: HSCT, hematopoietic stem cell transplantation; iDC, immature dendritic cell; KIR, killer cell Ig-like receptor; SSP, sequence-specific primer.

Copyright © 2013 by The American Association of Immunologists, Inc. 0022-1767/13/\$16.00

infections such as CMV. However, NK cells that rapidly reconstitute hematopoiesis and play a crucial role in mediating the graft-versus-leukemia (GVL) effect constitute the first line of defense against viral infection. In HLA haploidentical HSCT, NK cell alloreactivity is due to the presence in the donor of NK cells expressing KIR that recognize HLA class I allotypes present in the donor but absent in the recipient (16). KIR genotypic studies have revealed the beneficial effect of activating KIR genes against CMV infection or reactivation in different graft contexts (16–18). During acute CMV infection, NKG2C⁺ NK cells expand in HSCT recipients and predominately express KIR (9). However, the contribution of NKG2C in eliminating CMV-infected cells via NK cells has not been demonstrated. It is possible that NKG2C mainly constitutes a CMV infection marker. Thus, the coexpression of NKG2C with KIR on this expanded NK cell population questions the functional KIR contribution to CMV infection control. Moreover, although a recent report suggests the beneficial impact of early CMV infection on the GVL effect in HSCT (19), whether CMV modulates KIR NK cell alloreactivity in an HSCT context has not been investigated. Thus, to address these questions, we have set up a cell culture model based on a CMV-infected immature monocyte-derived dendritic cells (iDCs) as target cells, taking into account the HLA environment, to investigate not only the functional contribution of KIR NK cell subsets in controlling CMV infection but also the impact of CMV in modulating KIR NK cell alloreactivity.

Materials and Methods

PBMCs and cell lines

PBMCs were isolated from citrate-phosphate-dextrose blood from healthy adult volunteers by gradient centrifugation on Ficoll-Hypaque (Lymphoprep; Axis-Shield, Oslo, Norway). All blood donors were recruited at the Blood Transfusion Center (Etablissement Français du Sang, Nantes, France) and informed consent was obtained from all individuals. CMV serological status was determined using the chemiluminescent immunoassay LIAISON CMV IgG II (DiaSorin). EBV-B cell lines were obtained by EBV transformation of peripheral B cells using EBV supernatant harvested from the cell line B95-8 (American Type Culture Collection). B cells were isolated from PBMCs obtained from healthy individuals. The HLA class I-deficient acute myeloid leukemia K562 cell line was used to determine the degranulation potential of NK cells. K562 cells and EBV-B lymphocytes were cultured in RPMI 1640 medium (Life Technologies, Paisley, U.K.) containing glutamine (Life Technologies) and penicillin-streptomycin (Life Technologies) and supplemented with 10% FBS (Life Technologies). *Mycoplasma* tests performed by PCR were negative for all cell lines.

HLA and KIR genotyping

Genomic DNA was extracted from PBMCs using a classical salting-out method (20). HLA-A, -B, and -Cw genes were typed via molecular techniques using PCR-sequence-specific primer (SSP) kit from GenoVision (Olerup SSP HLA-A, -B, and -Cw, BioNoBis, Montfort l'Amaury, France) under the conditions recommended by the manufacturer. KIR genes were typed via molecular techniques using PCR-SSP methods under the conditions recommended by the manufacturers, as described previously (21, 22).

Isolation of monocyte and generation of iDCs

Monocytes were separated from lymphocytes by using a high-density hyperosmotic Percoll density gradient (Sigma-Aldrich) (23) and cultured for 6 d in RPMI 1640 medium (Life Technologies) containing glutamine (Life Technologies), penicillin-streptomycin (Life Technologies), and supplemented with 10% human AB serum (Life Technologies), IL-5 (200 U/ml; CellGenix), and GM-CSF (1000 U/ml; CellGenix).

NK cell isolation and amplification

PBMCs were isolated as previously described (24, 25). Thereafter, NK cells were amplified after *in vitro* stimulation with irradiated C1⁺ and C2⁺ allogeneic PBMCs and EBV-B cells used as feeders following the

PBMC/EBV-B cell ratio at 10:1. All amplified KIR2D NK cells were NKG2C negative.

Isolation and amplification of CMV-specific T cell lymphocytes

CMV-specific T lymphocytes were sorted from HLA-A2⁺ CMV seropositive blood donors using anti-CD3-PerCP (SK7; BD Biosciences) and HLA-A*02:01-pp65 (NLVPMVATV) (tetramer-allophycocyanin, obtained after tetramerization of HLA-A2-pp65 monomer [plateforme Structure Fédérative de Recherche François Bonamy, Nantes, France] with allophycocyanin-streptavidin [AnaSpec]). Sorted cells were stimulated with irradiated feeder cells (allogeneic PBMCs and a mix of two irradiated EBV-B cell lines) and 1 µg/ml PHA-P (L-7132; Sigma-Aldrich). After 2 wk, specific stimulation using pp65 (1 mg/ml)-loaded autologous EBV-B cells (E:T ratio of 10:1) was performed. pp65-Specific lymphocyte amplification was monitored by flow cytometry using HLA-A2-pp65-PE pentamer (Proimmune, Oxford, U.K.).

CMV preparation and infection of iDCs

Stock suspensions of CMV strain VHL/E (provided by the Prof. James Waldman, Columbus, OH) were produced as previously described (26). Of note, the full genomic sequence of VHL/E is not available and thus its genetic content has not been established. Infectivity titration of the virus was performed on iDCs. After overnight coculture of iDCs alone or with VHL/E, cells were washed and resuspended in RPMI 1640, 10% FBS.

Phenotypic analysis by flow cytometry

The NK cell surface phenotype was determined by three- or four-color flow cytometry using the following mouse anti-human mAbs: anti-KIR2DL1-FITC (143211; R&D Systems), anti-KIR2DL2/2DL3/2DS2-PE (GL183; Beckman Coulter), anti-KIR2DL1/2/3/2DS1/2-FITC (1A6) (27), anti-NKp46-allophycocyanin (9E2; Becton Dickinson), anti-NKG2C-PE (134591; R&D Systems), anti-NKG2A (Z199; Beckman Coulter), anti-CD3-PerCP (SK7; BD Biosciences), anti-CD56-allophycocyanin (B159; BD Biosciences), anti-NKG2D (ID11; BD Biosciences), anti-NKp30 (Z25; Beckman Coulter), and anti-NKp44 (Z231; Beckman Coulter). iDCs were stained with the following mouse anti-human mAbs: anti-HLA-A, -B, -C (F41-IE3H1D2; EFS), anti-HLA-C (L31; MediaPharma), anti-HLA-E-PE (3D12; Miltenyi Biotec), anti-CD40-PE (5C3; BD Biosciences), anti-CD80-PE (L307.4; BD Biosciences), anti-CD83-allophycocyanin (HB15e; BD Biosciences), anti-CD86-PE (2331; BD Biosciences), anti-HLA-A, -B, -C-AF⁶⁴⁷ (F41-IE3H1D2; EFS), anti-MICA/B-PE (6D4; BD Biosciences), and isotype-matched controls (IgG1 from BD Pharmingen, IgG2a from R&D Systems). Thereafter, iDCs were washed, fixed, and permeabilized for a staining with major immediate-early IE-1 protein-specific mAb (8B1.2; Millipore), which was conjugated to FITC (Sigma-Aldrich) (28).

CD107a mobilization assay detected by flow cytometry

PBMCs and NK cells were preincubated with anti-CD107a (H4A3; BD Biosciences). NK cell degranulation was assessed after incubation for 5 h alone (negative control), with K562 cells, or with uninfected or CMV-infected allogeneic iDCs (E:T ratio of 10:1). Cell surface staining was performed using the following mouse anti-human mAbs: anti-KIR2DL1/2/3/2DS1/2-FITC (27), anti-NKG2C-PE (134591; R&D Systems), anti-NKp46-allophycocyanin (9E2; Becton Dickinson), anti-KIR2DL1-FITC (143211; R&D Systems), anti-KIR2DL2/3/2DS2-PE (GL183; Beckman Coulter, Immunotech), and NKG2A-FITC or -PE (Z199; Beckman Coulter). HLA-C, HLA-E, and KIR2D neutralization were performed using anti-HLA class I (W6/32; R&D Systems), anti-HLA-E (3D12; BioLegend), and anti-KIR2DL1/2/3/2DS2 (8C11) (27) mAbs, respectively. All flow cytometry data were collected using a FACSCalibur (BD Biosciences) and analyzed using FlowJo 7.6.1 software (Tree Star).

Statistical analyses

Comparisons of NK cell frequencies between two different series of individuals were performed using ANOVA test. A *p* value of <0.05 was considered to be statistically significant.

Results

Preferential expression of KIR2DL on amplified NKG2C⁺ NK cells in CMV seropositive individuals

Recently, some studies have shown that a variable expansion of NK cell subsets coexpressing NKG2C and KIR are associated with CMV infection (8–11). We therefore assessed the expression of KIR and NKG2C to determine what NK cell subsets are mainly

observed in CMV seropositive individuals ($n = 31$) compared with seronegative individuals ($n = 29$) (Fig. 1). By four-color flow cytometry, three different NK cell subsets were defined on the basis of NKG2C and KIR2D expression (NKG2C⁺KIR2D⁻, NKG2C⁺KIR2D⁺, and NKG2C⁻KIR2D⁺) using a KIR2DL1/L2/L3/2DS1/S2-specific mAb (1A6) (27) and NKG2C-specific mAb in CMV⁻ versus CMV⁺ individuals (Fig. 1A). In agreement with previous reports, the frequencies of NKG2C⁺ and NKG2C⁺KIR2D⁺ NK cells are significantly higher in CMV seropositive than seronegative individuals ($p = 0.004$ and $p = 0.005$, respectively) (Fig. 1B). NKG2C⁺ NK cells did not express NKG2A and preferentially expressed CD57 (data not shown), as previously described in HSCT recipients and immunocompetent CMV seropositive individuals (9). Interestingly, expansion of the NKG2C⁺KIR2D⁺ NK cell population in CMV seropositive individuals is associated to the AA KIR genotype (Fig. 1C), although the probability is not significant ($p = 0.08$), which is confirmed by preferential expression of inhibitory KIR on the NKG2C⁺ NK cell subset (Fig. 1D). Indeed, of the 12 individuals with an NKG2C⁺KIR2D⁺ NK cell frequency superior to the mean value (6.8%), 11 are KIR2DL3 genotyped and coexpressed KIR2DL3 and NKG2C⁺ whatever the HLA background (2 C2C2, 4 C1C1, and 5 C1C2 individuals) (Fig. 1D). However, only one individual (C1C2) coexpressed KIR2DL1 with KIR2DL3 and NKG2C (Fig. 1D). In B⁺ KIR genotyped individuals, activating KIR2DS2 was coexpressed on NKG2C⁺ cells in one KIR2DL3⁻KIR2DL2/S2⁺ C2C2 genotyped individual

(data not shown). KIR2DS1 expression was evaluated using the combination of KIR2DL1/2DL2/2DL3/2DS2-specific 8C11 and KIR2DL1/S1-specific EB6 mAbs in 2 KIR2DS1 genotyped individuals, and no KIR2DS1 expression was observed on expanded NKG2C⁺ NK cells. Of note, all three KIR3DS1 genotyped individuals expressed KIR3DS1 on the expanded KIR2DL3⁺NKG2C⁺ NK cell subset. KIR3DL1 was coexpressed with NKG2C⁺ and KIR2DL3⁺ in 5 of 10 individuals expressing KIR3DL1 (data not shown).

Downregulation of HLA class I molecule expression on CMV-infected iDCs

It has been previously reported that monocyte-derived DCs are susceptible to in vitro CMV infection by the endothelial cell-adapted strain VHL/E (29). Thus, after 48 h of CMV infection, iDCs were stained with an mAb specific for the CMV major immediate-early IE-1 protein (Fig. 2A). Based on the percentage of IE-1⁺ cells, 50% of values from 20 independent experiments are comprised between first quartile (Q1 = 39.5%) and the third quartile (Q3 = 56%) around a median of 48% (Fig. 2B). Interestingly, HLA ligands of NK receptors as HLA class I and especially HLA-C molecules (ligands of KIR2DL) were downregulated on CMV-infected iDCs. In the same line, the nonclassical HLA-E molecule (ligand of CD94/NKG2A or CD94/NKG2C), weakly expressed on iDCs, was downregulated on CMV-infected iDCs (Fig. 2C). As previously described, CMV infection does not induce maturation of iDCs (30).

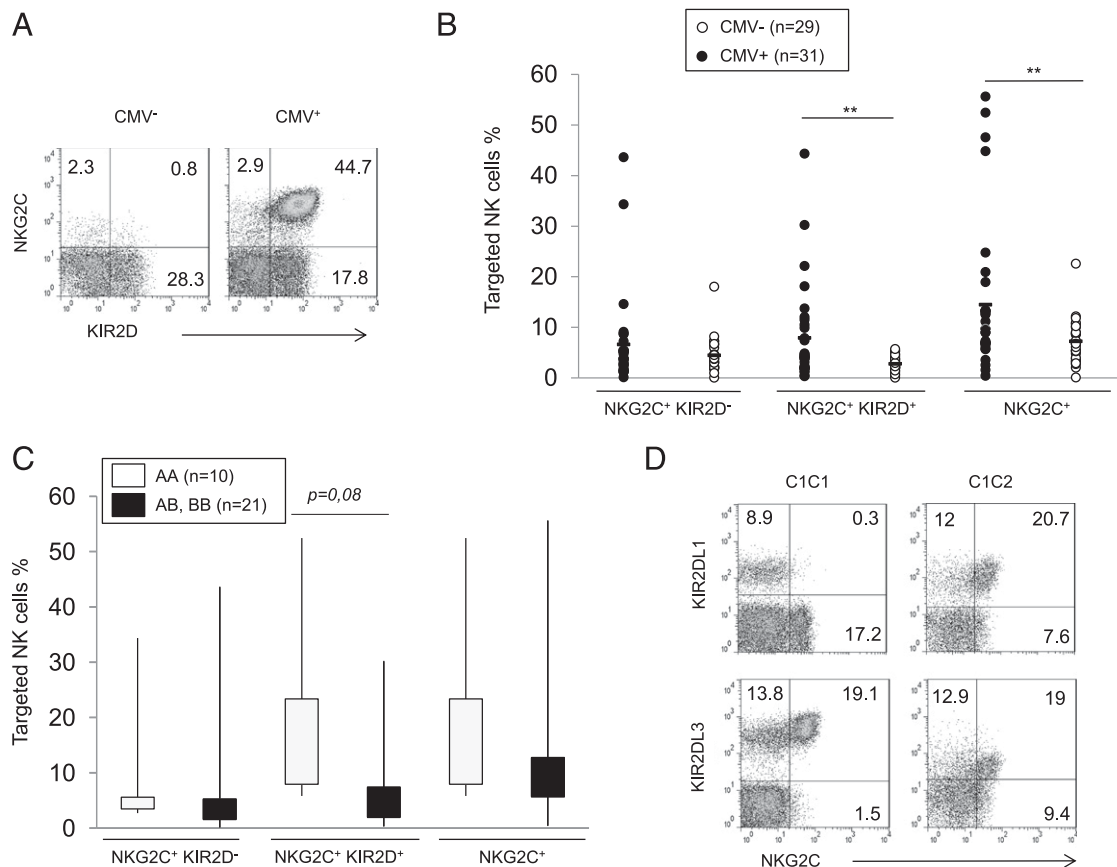


FIGURE 1. Preferential expression of KIR2DL on amplified NKG2C⁺ NK cells in human CMV seropositive individuals. **(A)** Representative density plots illustrating NK cell phenotype from CMV⁻ and CMV⁺ individuals. NK cells were stained with anti-CD56, anti-NKG2C, and anti-KIR2DL1/L2/L3/2DS1/S2 (1A6) mAbs. **(B)** Scatter plots displaying the NKG2C⁺KIR2D⁻, NKG2C⁺KIR2D⁺, and NKG2C⁺ NK cell frequencies from CMV⁻ ($n = 29$) and CMV⁺ ($n = 31$) individuals. **(C)** Summary box and whisker plot showing the frequency of NKG2C⁺KIR2D⁻, NKG2C⁺KIR2D⁺, and NKG2C⁺ NK cells from CMV⁺ AA KIR genotyped ($n = 10$) and AB and BB KIR genotyped ($n = 21$) individuals. **(D)** Representative density plots of four C1C1 and one C1C2 CMV⁺ individuals. KIR2DL3⁺NKG2C⁺ and KIR2DL1⁺NKG2C⁺ NK cells are targeted with anti-NKG2C and GL183 and with anti-NKG2C and EB6, respectively. Statistical significance (** $p < 0.01$) between both groups was determined using an ANOVA test.

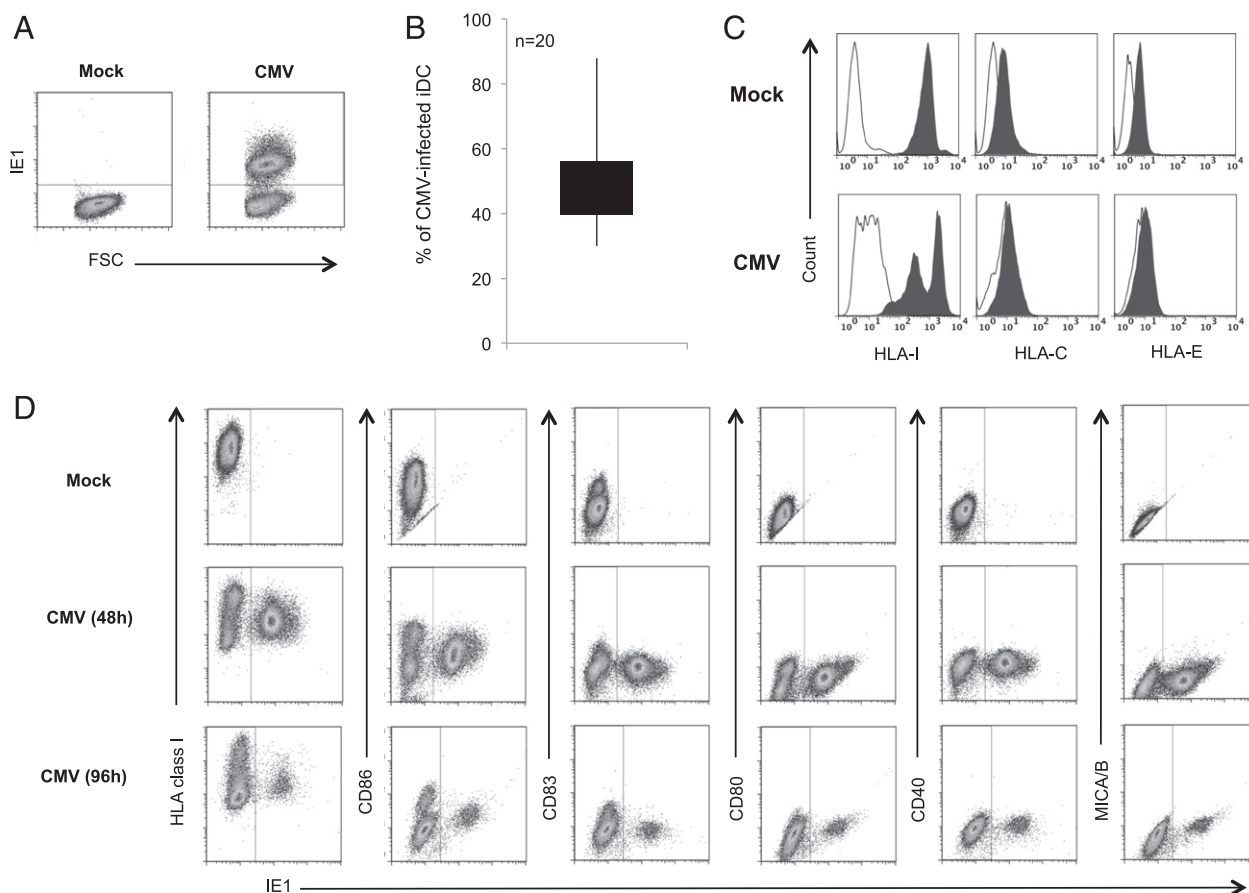


FIGURE 2. Downregulation of HLA class I molecule expression on CMV-infected iDCs. iDCs were generated from monocytes in the presence of GM-CSF and IL-4. On day 6 of the culture, they were infected with the endotheliotrope VHL/E CMV strain. Cell surface phenotype of CMV-infected iDCs was performed at 48 h postinfection by three-color flow cytometry. CMV-infected and noninfected iDCs were discriminated using FITC-conjugated IE1-specific mAb. **(A)** Representative density plots of noninfected and CMV-infected iDCs. **(B)** Summary box and whisker plot showing the frequency of IE1⁺ iDCs for 20 experiments performed. **(C)** Forty-eight hours postinfection, iDCs were surface labeled with specific mAbs for HLA class I, HLA-C, and HLA-E (open histograms represent isotype control, and filled histograms, specific staining). Results of a representative experiment of four performed are shown (50% IE1⁺ cells). **(D)** Representative density plots of flow cytometry analysis of mock-infected iDCs and CMV-infected iDC phenotype using HLA class I, CD86, CD83, CD80, CD40, and MICA/B-specific mAbs.

However, the expression of CD86 decreased on CMV-infected iDCs compared with uninfected iDCs (Fig. 2C, 2D). Moreover, the uninfected iDC subset in CMV-treated cultures present two levels of expression of HLA class I, that is, CD86 and CD83 molecules. Similar results were obtained at 96 h after infection (Fig. 2D). This could be explained by binding of viral products or soluble factors. Experiments were performed with UV-inactivated virus in the same conditions to confirm that the productive CMV infection of iDCs is necessary to modulate the biology of CMV-treated iDCs (data not shown).

CMV-infected iDCs escape to HLA-A2-pp65-specific CD8⁺ T cell recognition but activate NK cell degranulation

Consistent with previous reports indicating that several viral proteins inhibit HLA class I expression on CMV-infected cells to escape to T lymphocyte response, we further evaluate our in vitro model in assessing the CD107a mobilization of HLA-A2-pp65-specific T lymphocytes against CMV-infected iDCs versus uninfected iDCs. HLA-A2-pp65-specific T lymphocytes, targeted using HLA-A2-pp65 pentamer (Fig. 3A), reacted against pp65-loaded HLA-A2⁺ iDCs, but not against uninfected HLA-A2⁺ iDCs and CMV-infected HLA-A2⁺ iDCs (Fig. 3B). This result obtained in our cellular model is consistent with the ability of CMV to escape to T lymphocyte response by inhibiting HLA class I expression on

iDCs. We therefore investigated NK cell ability to recognize decreased expression of HLA class I molecules on CMV-infected iDCs by focusing on NKp46⁺ NK cells (Fig. 3C). Interestingly, NK cells reacted against CMV-infected iDCs almost as well as against an HLA class I-deficient K562 cell line, used as a positive control of degranulation, as illustrated for one individual (Fig. 3D) and confirmed for six individuals with a significant probability ($p = 0.01$) (Fig. 3E).

KIRs are required for a robust response against allogeneic CMV-infected iDCs

It has been reported that KIRs are required on NKG2C⁺ NK cells for a strong production of IFN- γ (9). Nevertheless, the role of KIRs in triggering NK cell degranulation is undocumented. To investigate the functional reactivity of NKG2C⁺KIR2D⁻, NKG2C⁻KIR2D⁺, and NKG2C⁺KIR2D⁺ NK cell subsets (Fig. 4A) against allogeneic CMV-infected iDCs, degranulation assays were carried out with PBMCs from CMV⁺ individuals ($n = 6$) stimulated overnight with IL-2 (Fig. 4B). As seen previously, PBMCs were incubated alone or in the presence of K562 cells, mock-infected iDCs, or CMV-infected iDCs (E:T ratio = 10:1). All of these NK cell populations reacted significantly against CMV-infected iDCs ($p = 0.02$ for NKG2C⁺KIR2D⁻ NK cells, $p = 0.0006$ for NKG2C⁻KIR2D⁺ NK cells, and $p = 3.5 \times 10^{-5}$ for NKG2C⁺KIR2D⁺ NK

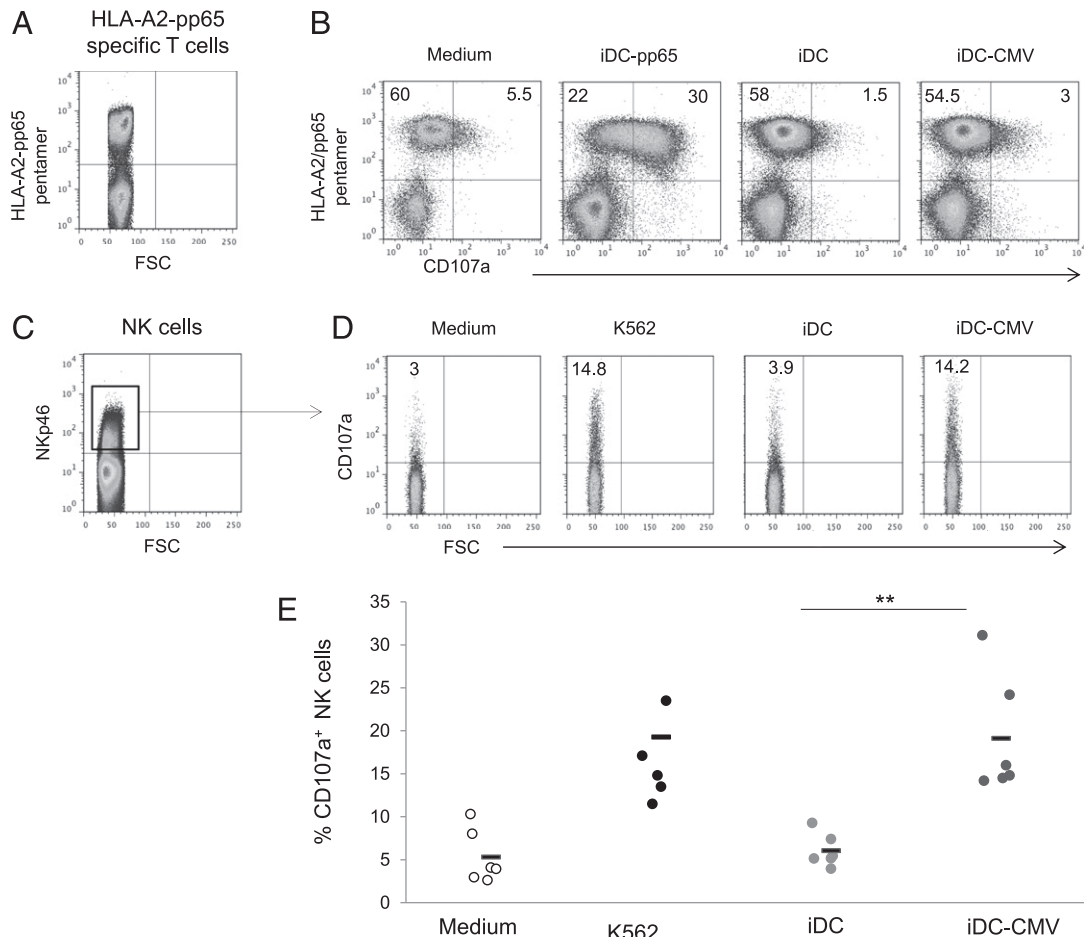


FIGURE 3. CMV-infected iDCs escape to HLA-A2-pp65-specific CD8⁺ T cell recognition but activate NK cell degranulation. **(A)** HLA-A2-pp65-specific T cells were cell sorted and amplified in vitro from CMV seropositive individuals and targeted as CD3⁺HLA-A2-pp65-pentamer⁺. **(B)** After 2 wk of stimulation, these cells were phenotyped by flow cytometry and were incubated for 5 h alone or in the presence of mock-infected, pp65-loaded, or human CMV-infected allogeneic iDC HLA-A2⁺ at an E:T ratio of 10:1. Results of CD107a mobilization obtained for a representative experiment of three performed are shown. Percentages of CD107a⁺ HLA-A2-pp65-specific T cells observed by flow cytometry are indicated on the density plots for all conditions of stimulation. **(C)** NK cells are targeted as NKp46⁺ cells. **(D)** PBMCs stimulated overnight with IL-2 were incubated for 5 h alone or in the presence of K562 cells as positive control or mock- or CMV-infected allogeneic iDCs at an E:T ratio of 10:1. Surface CD107a expression on NKp46⁺ cells was analyzed by flow cytometry. Representative density plots from six experiments are shown. The percentage of CD107a⁺ NK cells is indicated on each density plot. **(E)** Dot representation displaying the percentage of CD107a⁺ NK cells from all six experiments. Statistical significance (** $p < 0.01$) between both groups was determined using an ANOVA test.

cells). However, NK cells bearing KIR2D receptors (NKG2C⁺KIR2D⁺ and NKG2C⁺KIR2D⁻ NK cell subsets) reacted more robustly than did NKG2C⁺KIR2D⁻ NK cells. Indeed, when KIR2D receptors were neutralized with anti-KIR2DL1/2/3/2DS2 mAb, NKG2C⁺KIR2D⁺ NK cell degranulation against CMV-infected iDCs was decreased by half (Fig. 4C). Otherwise, because NKG2C⁺ NK cells are mostly NKG2A⁻ (Fig. 4C), we neutralized HLA-E molecules with anti-HLA-E mAb to assess the impact of NKG2C on NK cell degranulation against CMV-infected iDCs. The NKG2C⁺KIR2D⁺ NK cell degranulation was slightly decreased in this blocking condition (Fig. 4C). These results suggest a predominant impact of KIR2DL in triggering NK cell response against CMV-infected iDCs. Based on our results showing a decreased expression of HLA class I molecules on CMV-infected iDCs and the expansion of NKG2C⁺KIR2D⁺ NK cell subsets in CMV infection, we hypothesized that the absence of inhibitory KIR engagement with the cognate ligand and the activating NKG2C engagement with HLA-E on human CMV-infected iDCs might both contribute to drive the expansion process.

C1C1 but not C2C2 allogeneic iDCs activate KIR2DL1⁺ NK cell degranulation following the self-missing model

To determine the nature of KIR2DL receptors involved in the NK cell response to CMV-infected iDCs, we first focused on NK cell subsets expressing well-characterized inhibitory KIR2DL1, which recognizes HLA-C molecules of C2 group. KIR2DL1⁺ NK cells were sorted from KIR2DS1⁻ genotyped C2⁺ individuals and amplified following polyclonal stimulation. The phenotype (KIR2DL, NKG2A, NKp44, NKp30, and NKG2D) of the studied NK cell lines was stable following culture alone or coculture with iDCs or CMV-infected iDCs for 5 h. All selected and amplified NK cells did not express the inhibitory receptor ILT2 (data not shown). However, most amplified NK cells expressed the NKG2A marker (Fig. 5A). Thus, NKG2A expression on KIR2D NK cells may inhibit NK cell response and override the signal mediated by KIR2D receptors. We therefore assessed the function of KIR2DL1⁺ KIR2DL2/3/S2⁻NKG2A⁻ NK cells. We showed that the degranulation of C2⁺ educated KIR2DL1⁺ NK cells, controlled with K562, is strongly induced in contact to C1C1 allogeneic iDCs ($p = 0.002$) but not in contact to C2C2 allogeneic iDCs (Fig. 5B). These results

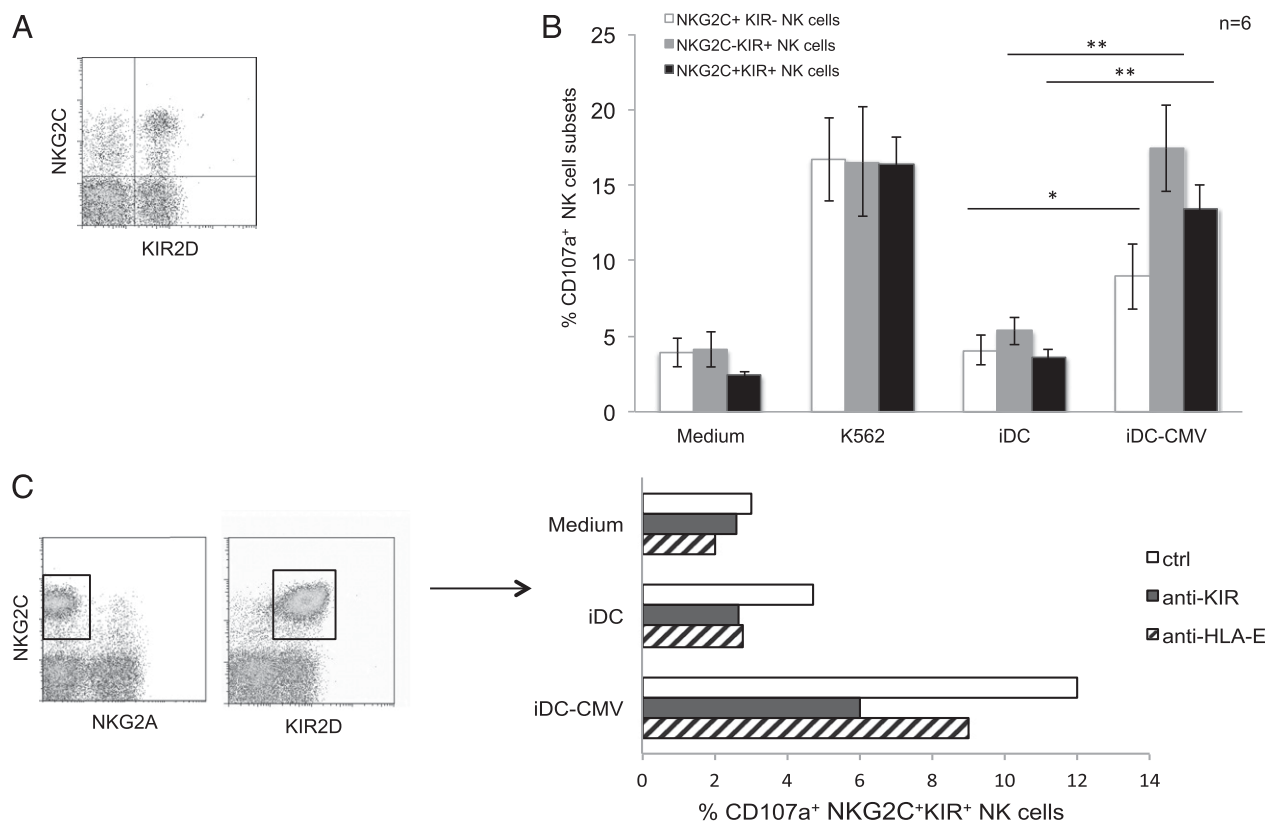


FIGURE 4. NKG2C⁺ NK cells increased in CMV seropositive individuals require KIR2D for a robust degranulation against allogeneic CMV-infected iDCs. Degranulation assays were carried out with PBMCs from CMV⁺ individuals ($n = 6$) stimulated overnight with IL-2. CD107a expression on Nkp46⁺ cells was analyzed by flow cytometry after incubation of PBMCs alone or in the presence of K562 cells or mock-infected or CMV-infected iDCs for 5 h at an E:T ratio of 10:1. **(A)** Representative density plot illustrating NKG2C KIR2D NK cell phenotype from CMV⁺ individual. **(B)** Bars indicate the mean of CD107a⁺ NK cell percentages for all NKG2C⁺KIR2D⁻, NKG2C⁺KIR2D⁺, and NKG2C⁻KIR2D⁺ NK cell subsets observed in all culture conditions: medium, K562 cells, mock-infected, or CMV-infected allogeneic iDCs $\pm$ SD. **(C)** Degranulation assays were performed on an NKG2C⁺KIR2D⁺NKG2A⁻ gated NK cell population. Results of CD107a mobilization obtained for a representative experiment of three performed were presented after culture alone (medium) or stimulation with iDCs or CMV-infected iDCs. Bars indicate CD107a⁺NKG2C⁺KIR2D⁺ NK cell percentage observed by flow cytometry. KIR2D receptors were blocked with 8C11 mAb and isotype control. HLA-E molecules expressed on iDCs were blocked with 3D12 mAb and isotype control. Statistical significance ($*p < 0.05$, $**p < 0.01$) between both groups was determined using an ANOVA test.

validated our in vitro model to explore the impact of CMV infection of iDCs on KIR⁺ NK cell degranulation.

CMV infection of C2C2⁺ iDCs triggers alloreactivity of C2⁺ KIR2DL1⁺ NK cells

CMV infection of C2C2⁺ iDCs activated significantly KIR2DL1⁺ NK cell degranulation ($p = 0.0003$) (Fig. 5C). This result suggests that HLA class I downregulation in CMV-infected C2C2⁺ iDCs was sufficient to trigger KIR2DL1⁺ NK cell cytotoxicity. To confirm this point, we evaluated CMV infection of C1C1⁺ iDCs on KIR2DL1⁺ NK cell degranulation. Indeed, when KIR2DL1⁺ NK cells were incubated in the presence of CMV-treated C1C1⁺ iDCs, the frequency of CD107a⁺KIR2DL1⁺ NK cells was high and similar to that observed in the presence of mock-infected C1C1⁺ iDCs (Fig. 5C). The activation of KIR2DL1⁺ NK cell degranulation with only CMV-infected C2C2⁺ iDCs but not CMV-infected C1C1⁺ iDCs supports the hypothesis that the protective KIR2DL1/C2 interaction is directly targeted. Furthermore, we investigated the function of unlicensed C1C1⁺KIR2DL1⁺ NK cells in controlling CMV infection, taking into account published works on mice indicating that “unlicensed” NK cells dominate the response to murine CMV infection (31). However, the degranulation of C1C1⁺KIR2DL1⁺ NK cells, which is low against the standard HLA class I-deficient K562 cell line, was not triggered against C1C1⁺ iDCs infected or not with CMV (data not shown). Taken together, these results

support the functional contribution of C2⁺KIR2DL1⁺ NK cells in response to CMV-infected iDCs.

KIR2DL3⁺ NK cells respond to CMV-infected allogeneic C2C2⁺ iDCs but not to CMV-infected allogeneic C1C1⁺ iDCs

Additionally, we investigated the role of KIR2DL3⁺ NK cells in the response to CMV-infected allogeneic iDCs. KIR2DL3⁺ NK cells were sorted and in vitro amplified from KIR2DS1⁻/L2⁻/S2⁻ genotyped C1C1⁺ individuals (Fig. 5D). Fifteen days after stimulation, we foremost assessed the degranulation of KIR2DL3⁺KIR2DL1⁻/L2⁻/S2⁻NKG2A⁻ NK cells against allogeneic iDCs. Both C1C1⁺ and C2C2⁺ iDCs inhibited KIR2DL3⁺ NK cell degranulation (Fig. 5E). Indeed, when HLA-C molecules were neutralized with anti-HLA class I mAb, C2C2⁺ iDC-mediated KIR2DL3⁺ NK cell degranulation was partially restored, showing the functional interaction of KIR2DL3 with C2 ligand (Fig. 5G). These results are in accordance with recently reported data showing that KIR2DL3 could recognize not only the expected group of HLA-C molecules belonging to the C1 group, but also those belonging to C2 group (32–34). To determine whether the decreased HLA class I expression on CMV-infected iDCs impacts the KIR2DL3⁺ NK cell function, degranulation of the KIR2DL3⁺ NK cell subset against CMV-infected iDCs has been evaluated. CMV infection of C2C2⁺ iDCs activated significantly KIR2DL3⁺ NK cell degranulation ($p = 0.01$) (Fig. 5F). This result may imply that HLA class I

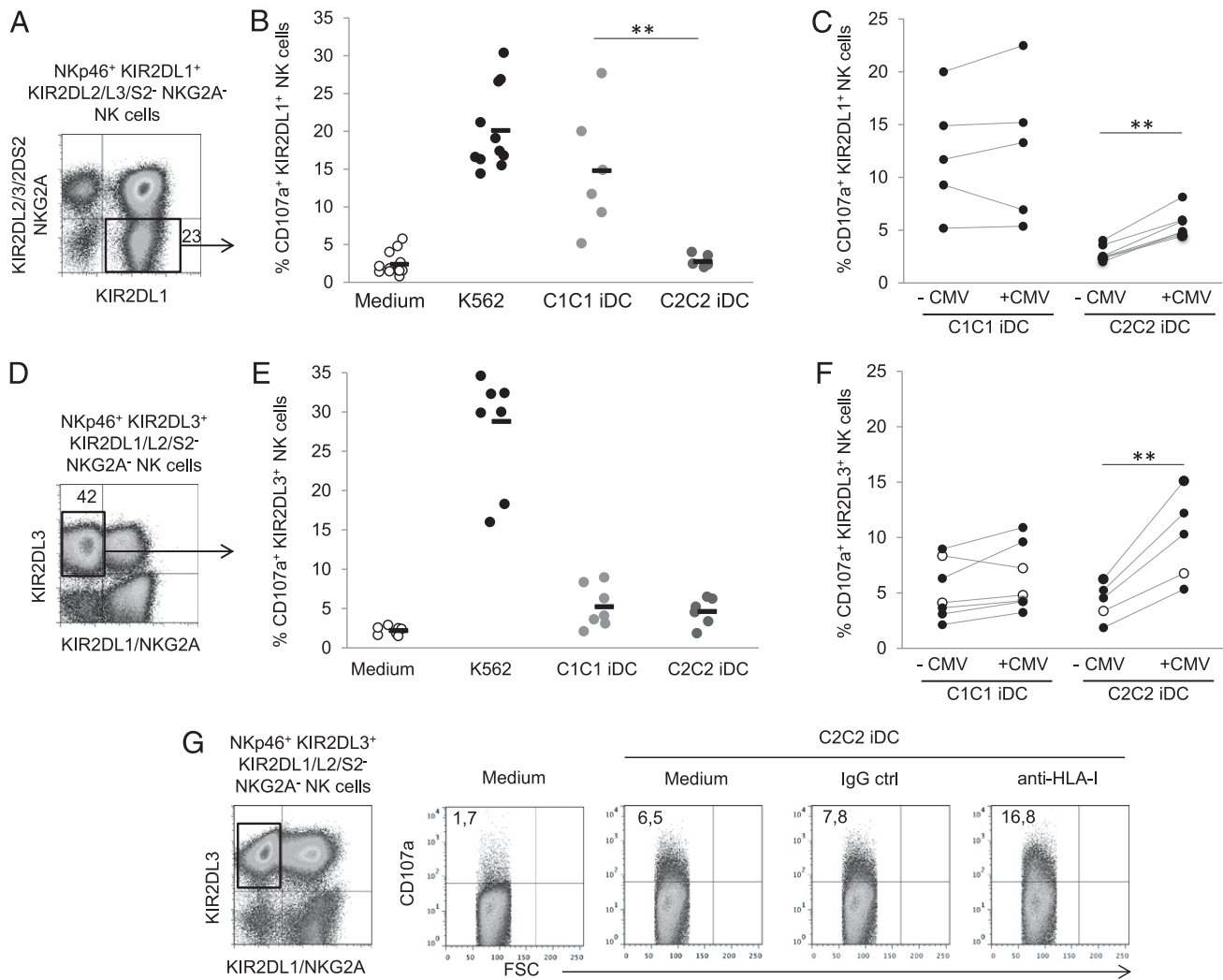


FIGURE 5. CMV-infected allogeneic C2C2⁺ iDCs activate KIR2DL1⁺ and KIR2DL3⁺ NK cell subsets. Mobilization assay has been performed on sorted and in vitro-amplified KIR2DL1⁺ NK cells from C2⁺ individuals and KIR2DL3⁺ NK cells from C1⁺ individuals. **(A)** Representative density plot illustrating the phenotype of targeted KIR2DL1⁺ NK cells in functional assay, assessed by flow cytometry using a combination of KIR2DL1-specific mAbs and a mix of KIR2DL2/3/2DS2 and NKG2A-specific mAbs. The cells were isolated from negative KIR2DS1 genotyped individuals. **(B)** Dot representation displaying the percentage of CD107a⁺KIR2DL1⁺ NK cells in all culture conditions: medium ($n = 13$), K562 cells ($n = 13$), C1C1⁺ iDCs ($n = 6$), and C2C2⁺ iDC ($n = 7$) at an E:T ratio of 10:1. **(C)** Dot representation displaying the percentage of CD107a⁺KIR2DL1⁺ NK cells in the presence of mock- or CMV-infected C1C1⁺ iDCs ($n = 6$) or C2C2⁺ iDCs ($n = 7$) at an E:T ratio of 10:1. KIR2DL1⁺ NK cells were isolated from CMV⁻ individuals. **(D)** Representative density plot illustrating the phenotype of targeted KIR2DL3⁺ NK cells in functional assay, assessed by flow cytometry using a combination of KIR2DL3-specific mAbs and a mix of KIR2DL1/S1 and NKG2A-specific mAbs. The cells were isolated from negative KIR2DL2/S2 genotyped individuals. **(E)** Dot representation displaying the percentage of CD107a⁺KIR2DL3⁺ NK cells in all culture conditions: medium ($n = 7$), K562 cells ($n = 7$), C1C1⁺ iDCs ($n = 7$), and with C2C2⁺ iDCs ($n = 6$). **(F)** Dot representation displaying the percentage of CD107a⁺KIR2DL3⁺ NK cells in the presence of mock- or CMV-infected C1C1⁺ iDCs ($n = 7$) or C2C2⁺ iDCs ($n = 5$). KIR2DL3⁺ NK cells isolated from CMV⁻ and CMV⁺ individuals are indicated by black and white circles, respectively. **(G)** Representative density plots of three experiments performed displaying the percentage of CD107a⁺KIR2DL3⁺ NK cells after coculture with C2C2⁺ iDCs. Target cells were incubated with blocking HLA class I mAb at a concentration of 10 μ g/ml for 30 min or IgG control, prior to coculture with NK cells. Statistical significance (** $p \leq 0.01$) between both groups was determined using an ANOVA test.

downregulation on CMV-infected C2C2⁺ iDCs is sufficient to trigger KIR2DL3⁺ NK cell reactivity. However, CMV infection of C1C1⁺ iDCs did not activate KIR2DL3⁺ NK cell degranulation (Fig. 5F). These findings support the functional contribution of KIR2DL3⁺ NK cells in response to CMV infection of C2C2⁺ iDCs, but they suggest a potential evasion of CMV to KIR2DL3⁺ NK cell control of C1C1⁺ target cells.

Discussion

Recent studies have reported the expansion of NKG2C⁺ NK cells expressing self-specific inhibitory KIR (8–10) in CMV infection. Our data provide evidence that inhibitory KIR2DL3 is preferentially coexpressed with NKG2C on amplified NK cells in CMV

seropositive individuals whatever the HLA-C background, and even KIR2DL3 seems to recognize the HLA-C ligand from the C1 and C2 groups with a lower affinity to C2 ligands (32). Our results are in agreement with a previous report revealing the expansion of NKG2C⁺KIR2DL2/2DS2/2DL3⁺ NK cells in a T⁺B⁺NK⁺ SCID patient with a CMV infection representing 80% of NK cells (35). In contrast to Charoudeh et al. (12) who reported a specific expansion of NK cells expressing the inhibitory receptors KIR2DL1 and KIR2DL3 in response to in vitro exposure to CMV, we observed preferential KIR2DL3 coexpression on NKG2C⁺ NK cells but seldom KIR2DL1 coexpression. Similarly, we observed mainly inhibitory KIRs coexpressed on NKG2C⁺ NK cells. Additionally, our phenotypic study showed a frequent coexpression of KIR3DL1

or KIR3DS1 on NKG2C⁺ KIR2DL3⁺ NK cells in CMV seropositive individuals, whatever the Bw4 environment. Thus, the predominant expression of KIR2DL3 suggests a driven clonal-like expansion of KIR2DL3⁺NKG2C⁺ NK cells during CMV infection that can coexpress another KIR as KIR3DL1 or KIR3DS1, as previously described for Ly49H⁺ NK cells in mice challenged with murine CMV (36). Moreover, numerous hypotheses regarding HIV-1 infection (37) and recent data (12) suggest a potential impact of KIR3DL1/S1 in controlling CMV infection. The role of KIR3DL1/S1 engagement in CMV infection should be investigated to answer this point.

We showed that NK cells bearing KIR2D receptors react more robustly than do KIR2D[−]NKG2C⁺ NK cells. Indeed, KIR2D⁺ NK cell subsets degranulated and secreted INF- γ (data not shown) more than did the KIR2D[−]NKG2C⁺ NK cell subset in response to CMV-infected iDCs. Our results are in accordance with previous results showing that KIRs are required for robust IFN- γ production (9). As previously described (38), degranulation of C2⁺ educated KIR2DL1⁺ NK cells is strongly induced in contact to allogeneic C1C1⁺ iDCs but not in contact to C2C2⁺ iDCs. We demonstrated that infection of C2C2⁺ iDCs with CMV significantly enhances KIR2DL1⁺ NK cell degranulation. Thus, HLA class I downregulation observed on CMV-infected iDCs seems sufficient to activate KIR2DL1⁺ NK cells. Interestingly, KIR2DL1⁺ NK cell alloreactivity against C1C1⁺ iDCs is maintained with CMV infection. Additionally, KIR2DL1⁺ and KIR2DL3⁺ NK cell subsets reacted against CMV-infected C2C2⁺ iDCs. This point could explain recent work showing that early CMV infection is associated with a reduced risk of relapse in acute myeloid leukemia patients undergoing allogeneic HCT (19). Thus, it is possible that CMV infection activates and mobilizes the NK cell subset able to recognize “missing-self” and that expanded NKG2C⁺KIR2D⁺ NK cells constitute boosted alloreactive NK cells that are more efficient against leukemia cells.

Recent studies performed on a large cohort has revealed the expansion of activating KIR⁺ (KIR2DS2, KIR3DS1, KIR2DS4) NK cell subsets independently of NKG2C, suggesting a contribution of both activating KIR⁺ and NKG2C⁺ NK cell subsets in CMV infection (11). In a murine model, activating Ly49H recognition of the viral protein m157 drove expansion of the cells that control murine CMV infection (15). Thus, we evaluated amplified and sorted C2[−]KIR2DS1⁺ NK cell degranulation against C1C1⁺ and C2C2⁺ iDCs infected or not by CMV. In our model, we did not observe a potential activation of KIR2DS1⁺ NK cells stimulated with CMV-infected iDCs (data not shown). However, the CMV seronegative status of the studied individuals may explain the absence of the KIR2DS1⁺ NK cell response. Indeed, it is possible that “memory” status of NK cells expanded during CMV infection is necessary to involve KIR2DS1 engagement with viral ligands.

Interestingly, we show that KIR2DL3 recognizes not only C1 but also C2 ligands, as demonstrated in our cellular model using C1C1 or C2C2 iDCs. In contrast, KIR2DL1⁺ NK cells recognize only C2C2⁺ iDCs. These results are in accordance with previous works indicating that KIR2DL3 interacts with HLA-C molecules belonging to C1 and C2 groups (32). Additionally, KIR2DL3⁺ NK cell degranulation is significantly increased in contact to CMV-infected C2C2⁺ iDCs, probably due to the decreased expression of HLA class I molecules on CMV-infected C2C2⁺ iDCs. Unexpectedly, KIR2DL3⁺ NK cell degranulation is not increased in contact to CMV-infected C1C1 iDCs. This last result suggests a potential evasion of CMV to KIR2DL3⁺ NK cell control in HLA-C1 environment as observed in our model at 48 h postinfection and confirmed at 96 h postinfection (data not shown). However, we do not exclude that KIR2DL3⁺ NK cell degranulation is activated by CMV-infected target cells earlier or later during the viral cycle.

The existence of multiple CMV strategies to escape immune system control opens a range of hypotheses. Indeed, the high frequency of KIR2DL3⁺ NK cells observed in CMV infection may lead to an antiviral immune pressure mediated in vivo by these KIR2DL3⁺ NK cells. The modulation of KIR/HLA interactions by viruses has been reported for some inhibitory KIR (39–43). This suggests that viral CMV peptides may increase the affinity of C1 ligands for inhibitory KIR2DL3 and prevent the activation of specific KIR2DL3⁺ NK cells.

Different groups have recently reported a specific NK cell phenotype marked by the acquisition of CD57, NKG2C, and KIR on NK cells in different viral infections including in nonexclusive fashion CMV (44), hantavirus (45), chikungunya virus (46), and HIV-1 (47). Interestingly, all of these viruses developed evasion strategies based on HLA class I downregulation to escape T cell recognition. Although the ligand of NKG2C is still elusive in CMV infection, it is conceivable that NKG2C⁺KIR2DL⁺ NK cell expansion is mutually driven by the recognition of HLA-E by CD94/NKG2C and the absence of engagement of KIR2DL with specific HLA KIR ligands on CMV-infected cells. Additionally, the large specificity of KIR2DL3 may explain its frequent expression on NKG2C⁺ NK cells associated to CMV infection.

In conclusion, our results provide evidence that inhibitory KIR2DL3 is preferentially coexpressed with NKG2C on amplified NK cells in CMV infection. Our findings support the functional contribution of KIR2DL1⁺ and KIR2DL3⁺ NK cell subsets in controlling CMV infection in C2⁺ recipients of allogeneic HSCT, suggesting a beneficial impact of CMV on GVL effect in this clinical context. In C2[−] recipients, the beneficial KIR2DL1⁺ NK cell alloreactivity is maintained despite infection, whereas CMV seems to have developed a strategy to escape to KIR2DL3⁺ NK cell control. This study opens new perspectives of investigation to determine the molecular mechanisms involved in KIR2DL3 NK cell escape employed by CMV.

Acknowledgments

We are grateful to all the donors for participating in this study. We thank Dr. Marc Bonneville (Unité Mixte de Recherche 892, Nantes, France) for advice and Dr. Joanna Ashton (Britt House, Nantes, France) for help in editing the manuscript.

Disclosures

The authors have no financial conflicts of interest.

References

1. Biron, C. A., H. C. Su, and J. S. Orange. 1996. Function and regulation of natural killer (NK) cells during viral infections: characterization of responses in vivo. *Methods* 9: 379–393.
2. Kärre, K. 2002. NK cells, MHC class I molecules and the missing self. *Scand. J. Immunol.* 55: 221–228.
3. Braud, V. M., D. S. Allan, C. A. O’Callaghan, K. Söderström, A. D’Andrea, G. S. Ogg, S. Lazetic, N. T. Young, J. I. Bell, J. H. Phillips, et al. 1998. HLA-E binds to natural killer cell receptors CD94/NKG2A, B and C. *Nature* 391: 795–799.
4. Moretta, L., and A. Moretta. 2004. Killer immunoglobulin-like receptors. *Curr. Opin. Immunol.* 16: 626–633.
5. Anfossi, N., P. André, S. Guia, C. S. Falk, S. Roetynck, C. A. Stewart, V. Breso, C. Frassati, D. Reviron, D. Middleton, et al. 2006. Human NK cell education by inhibitory receptors for MHC class I. *Immunity* 25: 331–342.
6. Yewdell, J. W., and A. B. Hill. 2002. Viral interference with antigen presentation. *Nat. Immunol.* 3: 1019–1025.
7. Wilkinson, G. W. G., P. Tomasec, R. J. Stanton, M. Armstrong, V. Prod’homme, R. Aicheler, B. P. McSharry, C. R. Rickards, D. Cochrane, S. Llewellyn-Lacey, et al. 2008. Modulation of natural killer cells by human cytomegalovirus. *J. Clin. Virol.* 41: 206–212.
8. Gumá, M., A. Angulo, C. Vilches, N. Gómez-Lozano, N. Malats, and M. López-Botet. 2004. Imprint of human cytomegalovirus infection on the NK cell receptor repertoire. *Blood* 104: 3664–3671.
9. Foley, B., S. Cooley, M. R. Verneris, M. Pitt, J. Curtsinger, X. Luo, S. Lopez-Vergés, L. L. Lanier, D. Weisdorf, and J. S. Miller. 2012. Cytomegalovirus

- reactivation after allogeneic transplantation promotes a lasting increase in educated NKG2C⁺ natural killer cells with potent function. *Blood* 119: 2665–2674.
10. Béziat, V., O. Dalgard, T. Asselah, P. Halfon, P. Bedossa, A. Boudifa, B. Hervier, I. Theodorou, M. Martinot, P. Debré, et al. 2012. CMV drives clonal expansion of NKG2C⁺ NK cells expressing self-specific KIRs in chronic hepatitis patients. *Eur. J. Immunol.* 42: 447–457.
 11. Béziat, V., L. L. Liu, J.-A. Malmberg, M. A. Ivarsson, E. Sohlberg, A. T. Björklund, C. Retière, E. Sverremark-Ekström, J. Traherne, P. Ljungman, et al. 2013. NK cell responses to cytomegalovirus infection lead to stable imprints in the human KIR repertoire and involve activating KIRs. *Blood* 121: 2678–2688.
 12. Charoudeh, H. N., G. Terszowski, K. Czaja, A. Gonzalez, K. Schmitter, and M. Stern. 2013. Modulation of the natural killer cell KIR repertoire by cytomegalovirus infection. *Eur. J. Immunol.* 43: 480–487.
 13. Cosman, D., N. Fanger, L. Borges, M. Kubin, W. Chin, L. Peterson, and M. L. Hsu. 1997. A novel immunoglobulin superfamily receptor for cellular and viral MHC class I molecules. *Immunity* 7: 273–282.
 14. Kubin, M., L. Cassiano, J. Chalupny, W. Chin, D. Cosman, W. Fanslow, J. Mühlberg, A. M. Rousseau, D. Ulrich, and R. Armitage. 2001. ULBP1, 2, 3: novel MHC class I-related molecules that bind to human cytomegalovirus glycoprotein UL16, activate NK cells. *Eur. J. Immunol.* 31: 1428–1437.
 15. Babić, M., A. Krmpotić, and S. Jonjić. 2011. All is fair in virus-host interactions: NK cells and cytomegalovirus. *Trends Mol. Med.* 17: 677–685.
 16. Stern, M., H. Elsässer, G. Hönger, J. Steiger, S. Schaub, and C. Hess. 2008. The number of activating KIR genes inversely correlates with the rate of CMV infection/reactivation in kidney transplant recipients. *Am. J. Transplant.* 8: 1312–1317.
 17. Cook, M., D. Briggs, C. Craddock, P. Mahendra, D. Milligan, C. Fegan, P. Darbyshire, S. Lawson, E. Boxall, and P. Moss. 2006. Donor KIR genotype has a major influence on the rate of cytomegalovirus reactivation following T-cell replete stem cell transplantation. *Blood* 107: 1230–1232.
 18. Chen, C., M. Busson, V. Rocha, M.-L. Appert, V. Lepage, N. Dulphy, P. Haas, G. Socié, A. Toubert, D. Charron, and P. Loiseau. 2006. Activating KIR genes are associated with CMV reactivation and survival after non-T-cell depleted HLA-identical sibling bone marrow transplantation for malignant disorders. *Bone Marrow Transplant.* 38: 437–444.
 19. Della Chiesa, M., M. Falco, M. Podestà, F. Locatelli, L. Moretta, F. Frasson, and A. Moretta. 2012. Phenotypic and functional heterogeneity of human NK cells developing after umbilical cord blood transplantation: a role for human cytomegalovirus? *Blood* 119: 399–410.
 20. Miller, S. A., D. D. Dykes, and H. F. Polesky. 1988. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res.* 16: 1215.
 21. Marsh, S. G. E., P. Parham, B. Dupont, D. E. Geraghty, J. Trowsdale, D. Middleton, C. Vilches, M. Carrington, C. Witt, L. A. Guethlein, et al. 2003. Killer-cell immunoglobulin-like receptor (KIR) nomenclature report, 2002. *Tissue Antigens* 62: 79–86.
 22. Denis, L., J. Sivula, P.-A. Gourraud, N. Kerdudou, R. Chout, C. Ricard, J.-P. Moisan, K. Gagne, J. Partanen, and J.-D. Bignon. 2005. Genetic diversity of KIR natural killer cell markers in populations from France, Guadeloupe, Finland, Senegal and Réunion. *Tissue Antigens* 66: 267–276.
 23. Repnik, U., M. Knezevic, and M. Jeras. 2003. Simple and cost-effective isolation of monocytes from buffy coats. *J. Immunol. Methods* 278: 283–292.
 24. Morvan, M., C. Willem, K. Gagne, N. Kerdudou, G. David, V. Sébille, G. Folléa, J.-D. Bignon, and C. Retière. 2009. Phenotypic and functional analyses of KIR3DL1⁺ and KIR3DS1⁺ NK cell subsets demonstrate differential regulation by Bw4 molecules and induced KIR3DS1 expression on stimulated NK cells. *J. Immunol.* 182: 6727–6735.
 25. Morvan, M., G. David, V. Sébille, A. Perrin, K. Gagne, C. Willem, N. Kerdudou, L. Denis, B. Clémenceau, G. Folléa, et al. 2008. Autologous and allogeneic HLA KIR ligand environments and activating KIR control KIR NK-cell functions. *Eur. J. Immunol.* 38: 3474–3486.
 26. Garrett, J. S., J. C. Narus, J. F. Bohnsack, D. E. Carling, K. G. Grieves, W. J. Waldman, and R. E. Shaddy. 1995. Effects of cytomegalovirus infection on growth factor production in endothelial cells and fibroblasts. *Pediatr. Res.* 38: 1003–1008.
 27. David, G., M. Morvan, K. Gagne, N. Kerdudou, C. Willem, A. Devys, M. Bonneville, G. Folléa, J.-D. Bignon, and C. Retière. 2009. Discrimination between the main activating and inhibitory killer cell immunoglobulin-like receptor positive natural killer cell subsets using newly characterized monoclonal antibodies. *Immunology* 128: 172–184.
 28. Imbert-Marcille, B. M., N. Robillard, A. S. Poirier, M. Coste-Burel, D. Cantarovich, N. Milpied, and S. Billaudel. 1997. Development of a method for direct quantification of cytomegalovirus antigenemia by flow cytometry. *J. Clin. Microbiol.* 35: 2665–2669.
 29. Riegler, S., H. Hebart, H. Einsele, P. Brossart, G. Jahn, and C. Sinzger. 2000. Monocyte-derived dendritic cells are permissive to the complete replicative cycle of human cytomegalovirus. *J. Gen. Virol.* 81: 393–399.
 30. Moutafsi, M., A. M. Mehl, L. K. Borysiewicz, and Z. Tabi. 2002. Human cytomegalovirus inhibits maturation and impairs function of monocyte-derived dendritic cells. *Blood* 99: 2913–2921.
 31. Orr, M. T., W. J. Murphy, and L. L. Lanier. 2010. “Unlicensed” natural killer cells dominate the response to cytomegalovirus infection. *Nat. Immunol.* 11: 321–327.
 32. Moesta, A. K., P. J. Norman, M. Yawata, N. Yawata, M. Gleimer, and P. Parham. 1950. 2008. Synergistic polymorphism at two positions distal to the ligand-binding site makes KIR2DL2 a stronger receptor for HLA-C than KIR2DL3. *J. Immunol.* 180: 3969–3979.
 33. Pende, D., S. Marcenaro, M. Falco, S. Martini, M. E. Bernardo, D. Montagna, E. Romeo, C. Cognet, M. Martinetti, R. Maccario, et al. 2009. Anti-leukemia activity of alloreactive NK cells in KIR ligand-mismatched haploidentical HSCT for pediatric patients: evaluation of the functional role of activating KIR and redefinition of inhibitory KIR specificity. *Blood* 113: 3119–3129.
 34. Schönberg, K., M. Stribar, J. Enczmann, J. C. Fischer, and M. Uhrberg. 2011. Analyses of HLA-C-specific KIR repertoires in donors with group A and B haplotypes suggest a ligand-instructed model of NK cell receptor acquisition. *Blood* 117: 98–107.
 35. Kuijpers, T. W., P. A. Baars, C. Dantin, M. van den Burg, R. A. W. van Lier, and E. Roosnek. 2008. Human NK cells can control CMV infection in the absence of T cells. *Blood* 112: 914–915.
 36. Arase, H., E. S. Mocarski, A. E. Campbell, A. B. Hill, and L. L. Lanier. 2002. Direct recognition of cytomegalovirus by activating and inhibitory NK cell receptors. *Science* 296: 1323–1326.
 37. Carrington, M., M. P. Martin, and J. van Bergen. 2008. KIR-HLA intercourse in HIV disease. *Trends Microbiol.* 16: 620–627.
 38. Sivori, S., S. Carlomagno, M. Falco, E. Romeo, L. Moretta, and A. Moretta. 2011. Natural killer cells expressing the KIR2DS1-activating receptor efficiently kill T-cell blasts and dendritic cells: implications in haploidentical HSCT. *Blood* 117: 4284–4292.
 39. Brackenridge, S., E. J. Evans, M. Toebes, N. Goonetilleke, M. K. P. Liu, K. di Gleria, T. N. Schumacher, S. J. Davis, A. J. McMichael, and G. M. Gillespie. 2011. An early HIV mutation within an HLA-B*57-restricted T cell epitope abrogates binding to the killer inhibitory receptor 3DL1. *J. Virol.* 85: 5415–5422.
 40. Stewart-Jones, G. B. E., K. di Gleria, S. Kollnberger, A. J. McMichael, E. Y. Jones, and P. Bowness. 2005. Crystal structures and KIR3DL1 recognition of three immunodominant viral peptides complexed to HLA-B*2705. *Eur. J. Immunol.* 35: 341–351.
 41. Fadda, L., G. M. O'Connor, S. Kumar, A. Piechocka-Trocha, C. M. Gardiner, M. Carrington, D. W. McVicar, and M. Altfeld. 2011. Common HIV-1 peptide variants mediate differential binding of KIR3DL1 to HLA-Bw4 molecules. *J. Virol.* 85: 5970–5974.
 42. Hansasuta, P., T. Dong, H. Thananchai, M. Weekes, C. Willberg, H. Aldemir, S. Rowland-Jones, and V. M. Braud. 2004. Recognition of HLA-A3 and HLA-A11 by KIR3DL2 is peptide-specific. *Eur. J. Immunol.* 34: 1673–1679.
 43. Alter, G., D. Heckerman, A. Schneidewind, L. Fadda, C. M. Kadie, J. M. Carlson, C. Oniangue-Ndza, M. Martin, B. Li, S. I. Khakoo, et al. 2011. HIV-1 adaptation to NK-cell-mediated immune pressure. *Nature* 476: 96–100.
 44. Lopez-Vergès, S., J. M. Milush, B. S. Schwartz, M. J. Pando, J. Jarjoura, V. A. York, J. P. Houchins, S. Miller, S.-M. Kang, P. J. Norris, et al. 2011. Expansion of a unique CD57⁺NKG2C^{hi} natural killer cell subset during acute human cytomegalovirus infection. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 108: 14725–14732.
 45. Björkström, N. K., T. Lindgren, M. Stoltz, C. Fauriat, M. Braun, M. Evander, J. Michaëlsson, K.-J. Malmberg, J. Klingström, C. Ahlm, and H.-G. Ljunggren. 2011. Rapid expansion and long-term persistence of elevated NK cell numbers in humans infected with hantavirus. *J. Exp. Med.* 208: 13–21.
 46. Petitdemange, C., P. Becquart, N. Wauquier, V. Béziat, P. Debré, E. M. Leroy, and V. Vieillard. 2011. Unconventional repertoire profile is imprinted during acute chikungunya infection for natural killer cells polarization toward cytotoxicity. *PLoS Pathog.* 7: e1002268.
 47. Gumá, M., C. Cabrera, I. Erkizia, M. Bofill, B. Clotet, L. Ruiz, and M. López-Botet. 2006. Human cytomegalovirus infection is associated with increased proportions of NK cells that express the CD94/NKG2C receptor in aviremic HIV-1-positive patients. *J. Infect. Dis.* 194: 38–41.

RESULTATS

PROJET N°2 : Étude des spécificités des récepteurs KIR2D et de leur impact sur la formation du répertoire NK KIR2D.

Large spectrum of HLA-C recognition by KIR2DL2 and KIR2DL3 and restricted C1 specificity of KIR2DS2: dominant impact of KIR2DL2/2DS2 on KIR2D NK cell repertoire formation

Gaëlle David*, **Zakia Djaoud***, Catherine Willem, Nolwenn Legrand, Pauline Rettman, Katia Gagne, Anne Cesbron, Christelle Retière.

* Premier co-auteur

The Journal of Immunology (2013)

L'éducation fonctionnelle des cellules NK KIR⁺ au cours de leur développement requiert notamment un engagement des récepteurs KIR avec les molécules HLA de classe I (Anfossi et al. 2006). Le potentiel cytotoxique des cellules NK KIR⁺ acquis au cours de cette éducation est d'autant plus grand que le nombre de copies de gènes KIR est important (Béziat, Traherne, et al. 2013b). Cependant, l'engagement des récepteurs KIR avec leurs ligands n'explique pas la formation du répertoire NK KIR⁺ puisqu'il existe des cellules NK qui expriment des KIR dont les ligands HLA ne sont pas présents dans l'environnement. Les modalités de la formation d'un répertoire NK KIR fonctionnel sont sujettes à controverses. Certains auteurs proposent une acquisition séquentielle des récepteurs KIR qui est dépendante de l'environnement HLA (Schönberg et al. 2011). D'autres suggèrent une acquisition plus aléatoire qui ne dépend pas de la présence des molécules HLA du soi (Andersson et al. 2009).

Par ailleurs, la spécificité des récepteurs KIR2DL a bien été documentée. En effet, le KIR2DL1 reconnaît les molécules HLA-Cw du groupe C2 (Lys80), tandis que les KIR2DL2 et KIR2DL3 reconnaissent les molécules HLA-Cw du groupe C1 (Asn80). La spécificité des récepteurs KIR2DS est en revanche moins connue. Comme son homologue inhibiteur, le récepteur KIR2DS1 reconnaît les molécules ww du groupe C2 (Chewning et al. 2007 ; Morvan et al. 2008). Le KIR2DS3 n'est pas exprimé à la surface cellulaire et son rôle fonctionnel n'est pas encore déterminé (VandenBussche et al. 2009). Enfin, la spécificité du récepteur activateur KIR2DS2 n'est pas documentée, notamment à cause du manque d'anticorps capables de le discriminer de sa forme inhibitrice.

Dans cette étude, nous avons revisité les spécificités des récepteurs KIR2DL et KIR2DS1, identifié le ligand du KIR2DS2 et déterminé l'impact fonctionnel de l'engagement de ces récepteurs, avec leurs ligands respectifs, sur l'alloréactivité des cellules NK et la formation du répertoire cellulaire NK KIR2D.

Notre approche expérimentale a été validée en étudiant l'alloréactivité des cellules NK KIR2DL1⁺ et NK KIR2DS1⁺ vis-à-vis de différentes lignées B221 exprimant de façon stable des molécules HLA-Cw des groupes C1 et C2.

Au contraire du KIR2DL1 qui ne reconnaît que les molécules HLA-Cw du groupe C2, nous avons montré que les cellules NK KIR2DL2⁺ et NK KIR2DL3⁺ activées

sont inhibées par les lignées B221-HLA-C, indépendamment de la nature C1 ou C2 des molécules HLA-Cw de ces cibles.

Les clones cellulaires NK KIR2DS2⁺ KIR2DL2⁻ sont alloréactifs vis-à-vis des cellules B221-HLA-C1, quelque soit leur typage HLA-C. Cependant, le signal activateur médié par l'engagement du KIR2DS2 avec les molécules HLA-C1 est dominé par le signal inhibiteur médié par le KIR2DL2 lorsque celui-ci est co-exprimé avec le KIR2DS2 sur les cellules NK. En revanche, l'engagement simultané du KIR2DL1 avec le KIR2DS2 a un effet additif augmentant l'alloréactivité des cellules NK KIR2DL1⁺ KIR2DS2⁺ vis-à-vis des cellules B221-HLA-C1.

Pour établir un lien entre les interactions KIR2D:HLA-Cw et la formation du répertoire NK KIR2D, nous avons réalisé une étude phénotypique de ce répertoire sur une cohorte de 159 individus dont les génotypes KIR et HLA sont connus. Les récepteurs KIR2DL2 et KIR2DL3 sont ainsi les plus représentés dans le répertoire KIR2D. En l'absence du KIR2DL1, le taux des cellules NK exprimant ces récepteurs est encore plus important. Ceci suggère un ajustement homéostatique de la distribution des récepteurs KIR2D. Chez les individus C2C2 et en l'absence des gènes KIR2DL2/S2, les KIR2DL1/S1 sont les plus représentés. De plus, nos résultats suggèrent que le KIR2DL2 et les activateurs KIR2DS1 et KIR2DS2 limitent l'expression du KIR2DL1. Ces données proposent ainsi une acquisition continue des récepteurs KIR au cours du développement des cellules NK, qui peut être fonction de l'environnement HLA-C mais aussi de l'expression cellulaire des différents KIR2D qui partagent ou non les mêmes spécificités.

Large Spectrum of HLA-C Recognition by Killer Ig-like Receptor (KIR)2DL2 and KIR2DL3 and Restricted C1 Specificity of KIR2DS2: Dominant Impact of KIR2DL2/KIR2DS2 on KIR2D NK Cell Repertoire Formation

Gaëlle David,^{*,1} Zakia Djaoud,^{*,1} Catherine Willem,^{*} Nolwenn Legrand,^{*} Pauline Rettman,^{*} Katia Gagne,^{*,†,‡} Anne Cesbron,^{*,†,‡} and Christelle Retière^{*}

The interactions of killer Ig-like receptor 2D (KIR2D) with HLA-C ligands contribute to functional NK cell education and regulate NK cell functions. Although simple alloreactive rules have been established for inhibitory KIR2DL, those governing activating KIR2DS function are still undefined, and those governing the formation of the KIR2D repertoire are still debated. In this study, we investigated the specificity of KIR2DL1/2/3 and KIR2DS1/2, dissected each KIR2D function, and assessed the impact of revisited specificities on the KIR2D NK cell repertoire formation from a large cohort of 159 KIR and HLA genotyped individuals. We report that KIR2DL2⁺ and KIR2DL3⁺ NK cells reacted similarly against HLA-C⁺ target cells, irrespective of C1 or C2 allele expression. In contrast, KIR2DL1⁺ NK cells specifically reacted against C2 alleles, suggesting a larger spectrum of HLA-C recognition by KIR2DL2 and KIR2DL3 than KIR2DL1. KIR2DS2⁺ KIR2DL2[−] NK cell clones were C1-reactive irrespective of their HLA-C environment. However, when KIR2DS2 and KIR2DL2 were coexpressed, NK cell inhibition via KIR2DL2 overrode NK cell activation via KIR2DS2. In contrast, KIR2DL1 and KIR2DS2 had an additive enhancing effect on NK cell responses against C1C1 target cells. KIR2DL2/3/S2 NK cells predominated within the KIR repertoire in KIR2DL2/S2⁺ individuals. In contrast, the KIR2DL1/S1 NK cell compartment is dominant in C2C2 KIR2DL2/S2[−] individuals. Moreover, our results suggest that together with KIR2DL2, activating KIR2DS1 and KIR2DS2 expression limits KIR2DL1 acquisition on NK cells. Altogether, our results suggest that the NK cell repertoire is remodeled by the activating and inhibitory KIR2D and their cognate ligands. *The Journal of Immunology*, 2013, 191: 000–000.

Natural killer cells constitute the first line of defense against viral infections and tumor cells. These effectors of innate immunity discriminate self and nonself via inhibitory receptors that recognize HLA class I molecules in an allelic fashion. The absence or default of HLA class I expression on altered cells is a well-established characteristic of virally transformed and tumor cells, and leads to enhanced NK cell proliferation,

cytotoxicity, and cytokine production (1). These functional abilities confer to alloreactive NK cells a preponderant contribution to cell responses in allogeneic hematopoietic stem cell transplantation (HSCT) (2, 3). Similarly, a semiallogeneic context observed in pregnancy constitutes a new HLA environment that requires a complete modulation of self HLA molecules to avoid activation of NK cells via inhibitory receptors. Among inhibitory receptors, killer Ig-like receptors (KIRs) recognize mainly HLA-C molecules. The nonclassical HLA-E molecule presents a peptide from the signal peptide of HLA class I molecules and constitutes a second line of self-presentation. This molecule is recognized by the inhibitory heterodimer CD94/NKG2A, which is acquired before KIRs on NK cells during development (4). Finally, ILT-2 recognizes all HLA class I molecules by engaging the conserved β 2-microglobulin and α 3 domain of HLA class I molecules. KIRs are clonally expressed (5) on NK cells, leading to large combinations of KIR expression in different proportions of each KIR NK cell subset (6). During development, NK cells acquire a functional potential that is, in part, determined by the capacities of each NK cell to engage its inhibitory receptors with self HLA class I molecules (7). In addition, the number of KIR gene copies contributes to increased NK cell responsiveness (8). Different theories have been proposed to explain the formation of the KIR NK cell repertoire. Some groups have proposed a model following a sequential acquisition of KIR that is dependent on the HLA environment (9). In parallel, based on combinatorial analysis of KIR NK cells from haplotype AA individuals, Malmberg's group (10) has proposed that the variegated

*EA4271 – “Immunovirologie et Polymorphisme Génétique”, Etablissement Français du Sang/Pays de la Loire, Université de Nantes, 44011 Nantes Cedex 01, France; [†]Laboratoire d'Histocompatibilité, Etablissement Français du Sang, 44011 Nantes Cedex 01, France; and [‡]Laboratoire d'Excellence Transplantex, Université de Strasbourg, 67085 Strasbourg, France

¹G.D. and Z.D. contributed equally to this work.

Received for publication June 14, 2013. Accepted for publication September 2, 2013.

This work was supported by the Etablissement Français du Sang (EFS)/Pays de la Loire and by grants from the International Research Group on Hematopoietic Cell Transplantation (IRGHET), Agence de la BioMédecine, EFS 2010-06, and Nantes Atlantique Greffe de Moelle Osseuse. Z.D. is a Ph.D. student supported by Industrial Agreements for Training Through Research Grant 447/2011. P.R. is a Ph.D. student supported by EFS/Région des Pays de la Loire/Nantes University.

Address correspondence and reprint requests to Dr. Christelle Retière, EA4271 – “Immunovirologie et Polymorphisme Génétique”, Etablissement Français du Sang/Pays de la Loire, Université de Nantes, 34 Boulevard Jean Monnet, 44011 Nantes Cedex 01, France. E-mail address: christelle.retiere@efs.sante.fr

The online version of this article contains supplemental material.

Abbreviations used in this article: HSCT, hematopoietic stem cell transplantation; KIR, killer Ig-like receptor.

Copyright © 2013 by The American Association of Immunologists, Inc. 0022-1767/13/\$16.00

repertoires are generated through sequential and random acquisition of KIRs in a manner that is independent of the presence or absence of cognate HLA class I molecules. Thus, the impact of self HLA class I molecules on the frequency of all KIR NK subsets is still debated. Even though NK receptor-specific genes are not located in chromosome 6 like the HLA gene complex, the HLA environment appears nevertheless an important determinant to the formation and function of the NK cell repertoire.

The KIR gene family comprises 16 genes and is located on chromosome 19. KIR2DL1, KIR2DL2, and KIR2DL3 recognize HLA-C molecules depending on the nature of amino acid at position 80 and leads to two groups of ligands: C1 (Asn⁸⁰) and C2 (Lys⁸⁰). Thus, KIR2DL1 recognizes HLA-C molecules of C2 group, and KIR2DL2 and KIR2DL3, which are allelic genes, recognize HLA-C molecules of C1 group (11). KIR2DL2 presents a weaker affinity to C2 ligand (12) with the N77K80 motif (13). Activating KIR specificity is less well documented even though KIR2DS1 recognizes HLA-C of group C2 as its inhibitory counterpart (14, 15). KIR2DS3 is not expressed at the cell surface (16), and its function is questionable especially because the gene is missing from some populations such as the Yucpa group studied by Parham's group (17). If the alloreactive rules of C2 specific KIR2DS1⁺ NK cells are well understood, those involving KIR2DS2 are less documented. This is largely explained by the absence of Abs distinguishing the activating KIR2DS2 and inhibitory KIR2DL2 forms. Studies to date have mainly relied on the use of Abs specific for KIR2DL2/3 and KIR2DS2 as the GL183, which does not allow differentiation between inhibitory and activating forms. This may induce a possible bias in the interpretation of results involving two functional receptors with opposite signals but sharing potentially the same ligands, most likely because of the high homology of the extracellular portion of KIR2DL2 and KIR2DS2. Thus, we dissected the main inhibitory KIR2DL1/2/3 and activating KIR2DS1/2 reactivity from primary NK cells from HLA and KIR genotyped individuals. Our experimental approach has been validated in studying alloreactive KIR2DL1 and KIR2DS1 NK cell subsets against a wide range of target cell lines expressing different HLA-C ligands from C1 and C2 groups. Taking into account all revisited specificities of the main inhibitory KIR2DL1/2/3, activating KIR2DS1/2 and the alloreactive rules, we analyzed phenotypically the KIR NK cell repertoire from a large cohort of 159 KIR and HLA genotyped individuals to evaluate the influence of KIR ligand expression on NK cell repertoire formation.

Materials and Methods

Cells (PBMCs and cell lines)

PBMCs were isolated as previously described (15, 18). All blood donors were recruited at the Blood Transfusion Center (Etablissement Français du Sang, Nantes, France), and informed consent was given by all donors. HLA class I-deficient 721.221 lymphoblastoid cells, referred to as 221 cells, were used as positive control to assess NK cell degranulation. HLA-C*03:04 (C1), HLA-C*08:02 (C1), HLA-C*04:01 (C2), HLA-C*02:02 (C2), HLA-C*06:02 (C2), HLA-C*07:01 (C1), and HLA-C*15:01 (C2) transfected 221 cells were used to evaluate NK cell degranulation of different KIR2D NK cell subsets. HLA-C*02:02, HLA-C*03:04, HLA-C*04:03, and HLA-C*07:01 transfected 221 cells were provided by Prof. P. Parham. HLA-C*08:02, HLA-C*02:02, HLA-C*06:02, and HLA-C*15:01 transfected 221 cells were obtained by stable transfection of 221 cell line by electroporation (BioRad) using, respectively, pcNeo-HLA-C*08:02 (provided by Dr. Agnès Moreau, INSERM Unite Mixte de Recherche 892, Nantes, France), pcNeo-HLA-C*06:02 (provided by Dr. Agnès Moreau, INSERM Unite Mixte de Recherche 892), and HLA-C*15:01 (provided by Dr. Frédérique Triebel, Immunetec S.A., Chatenay-Malabry, France). All HLA-C cDNA encoded sequences were verified by DNA sequencing as described: HLA-C polymorphic exons were amplified using the HLA-C.exon 1.68G (5'-GGCCTGACCGAGACCTG-3') forward primer and the HLA-C.exon 4.661C (5'-CCTCAGGGTGGCCTCATG-3') reverse primer. Amplification of exons 2 and 3 of the HLA-C

locus was performed in 50 µl using 80 ng DNA, 0.2 mM dNTP (Invitrogen), 1 U Taq Gold polymerase (Applied Biosystems), 1× Taq Gold buffer (Applied), 2.5 mM MgCl₂ Gold (Applied), and 1 µM of each primer. Amplification presequencing was performed in a GeneAmp PCR System 9700 thermal cycler (Applied Biosystem). The PCR amplification program included one denaturation step of 95°C for 10 min, 36 cycles of 96°C for 20 s, 60°C for 30 s, and 72°C for 3 min, followed by a final elongation step of 72°C for 10 min. Products were electrophoresed on 2% agarose gels. HLA-C cDNA sequencing was performed by the Sequencing Core Facility (SFR François Bonamy, Nantes, France) using an ABI 3730 automatic system (Applied). HLA-C cDNA sequence data files were analyzed using Assign software (Conexio Genomics, Applecross, Australia) with IPD-HLA database version 3.9.0 (July 2012). The 221 cell line and HLA-C-transfected 221 cell lines were cultured in RPMI 1640 medium (Life Technologies, Paisley, U.K.) containing glutamine (Life Technologies) and penicillin-streptomycin (Life Technologies), and supplemented with 10% FBS (Life Technologies). *Mycoplasma* tests performed by PCR were negative for all cell lines.

HLA and KIR genotyping

HLA class I allele assignment and KIR gene content typing were performed as previously described (15, 18). KIR haplotypes were determined as previously described (6). The A haplotypes correspond to seven KIR genes, including KIR2DS4 as the only activating KIR gene. In contrast, B haplotypes are characterized by the presence of more than one activating KIR gene and the absence of the KIR2DS4 gene.

KIR NK cell line and clone isolation and amplification

PBMCs were stained with anti-CD3 mAb (X35, a gift from Dr. Franck Vérité, Etablissement Français du Sang, Rennes), and CD3⁺ cells were depleted using murine IgG coupled magnetic Dynabeads according to the manufacturer's instructions (Dyna, Oslo, Norway). Then cells were labeled with appropriate mAb combinations, and the cells were sorted using a FACSCalibur equipped with a fluidic sort module (BD Biosciences). Sorted cells were amplified after in vitro stimulation with irradiated allogeneic PBMCs and HLA-C*03:04 (C1) and HLA-C*04:01 (C2) transfected 221 cell lines used as feeders following the PBMC/EBV-B cells ratio at 10:1. KIR2DS2⁺ NK cells were cloned at 0.3 cell/well from the selected and amplified lines under limiting conditions in 96-well U-bottom microtiter plates with 50,000 irradiated autologous lymphocytes and 5000 irradiated HLA-C*03:04 (C1) and HLA-C*04:01 (C2) transfected 221 cell lines in a final volume of 100 µl. Growing colonies with a probability of monoclonality of 95% were kept for further analysis. NK cell lines and clones were cultured in RPMI 1640 medium (Life Technologies, Paisley, U.K.) containing glutamine (Life Technologies) and penicillin-streptomycin (Life Technologies), and supplemented with 10% human serum (Etablissement Français du Sang, Nantes, France) and 200 U/ml IL-2 (Chiron, Suresnes, France). Cells were maintained for 3 wk and expanded in their culture medium containing IL-2 without restimulation with feeders before functional analysis to decrease their spontaneous degranulation.

KIR2DL2 RT-PCR

Total RNA was purified from isolated KIR2DS2⁺ NK clones using NucleoSpin RNAXS (Macherey-Nagel). Qualitative KIR2DL2 RT-PCR was performed using a One-Step PrimeScript RT-PCR kit (TaKaRa, Japan) with KIR2DL2-specific primers from Thompson et al. (19).

Phenotypic analysis by flow cytometry

The NK cell-surface phenotype was determined by three- or four-color flow cytometry using the following mouse anti-human mAbs: anti-KIR2DL1-FITC (143211; R&D Systems), anti-KIR2DL1/2DS1-PE (EB6), anti-KIR2DL2/2DS2-PE (GL183; Beckman Coulter Immunotech, Marseille, France), anti-CD3-PerCP (SK7), anti-CD56-allophycocyanin (B159; BD Biosciences), anti-KIR2DL1/2/3/2DS2-FITC (8C11), anti-KIR2DL3/2DS2 (1F12), and anti-KIR2DL1/2/3/2DS1/2-FITC (1A6), generated and characterized in our laboratory and previously described (20). The KIR2DS2⁺ NK cell clone phenotype was determined using the following mouse anti-human mAbs: anti-KIR2DS4 (FES172; Beckman Coulter), anti-KIR3DL1/3DS1 (Z27; Beckman Coulter), anti-NKp30 (Z25; Beckman Coulter) anti-NKp44 (Z231; Beckman Coulter), anti-NKG2D (ID11; BD Biosciences), anti-2B4 (2-69; BD Biosciences), anti-ILT2 (GHI/75; BD Biosciences), anti-NKG2A (Z199; Beckman Coulter), and anti-CD16 (NKP15; BD Biosciences).

CD107a mobilization assay detected by flow cytometry

NK cells were preincubated with anti-CD107a (H4A3; BD Biosciences). NK cell degranulation was assessed after incubation for 5 h alone (negative

control), or with different target cells (E:T ratio = 10:1) with brefeldin A (Sigma) at 10 μ g/ml for the last 4 h. Cell-surface staining was performed using the anti-human KIR mAbs mentioned in the previous section and NKG2A-FITC or -PE (Z199; Beckman Coulter). All flow cytometry data were collected using a FACSCalibur (BD Biosciences) and analyzed using FlowJo 7.6.1 software (TreeStar).

Statistical analyses

Comparisons of NK cell frequencies between two different series of individuals were performed using ANOVA test. The p values < 0.05 were considered to be statistically significant. Top and bottom whiskers represent values of the top and bottom 25% of cases, respectively; boxed area represents interquartile range.

Results

C1[−] activated KIR2DL2⁺ and KIR2DL3⁺ NK cells present a similar degranulation potential to their C1⁺ counterparts

As a first step, we studied degranulation of KIR2DL NK subpopulations expressing either KIR2DL1, KIR2DL2, or KIR2DL3 using appropriate combinations of KIR-specific Abs targeting each of these receptors as previously described (20) (Fig. 1A). Thus, KIR2DL1⁺ KIR2DL2/3/S1/2[−] NK cells were sorted using a combination of KIR2DL1/2/3/S2-specific 8C11 and KIR2DL2/3/S2-specific GL183 Abs from KIR2DS1[−] genotyped individuals (Fig. 1A). KIR2DL2⁺ KIR2DL1/3/S1/2[−] NK cells were sorted using a combination of a mix of KIR2DL3/S2-specific 1F12 with KIR2DL1-specific 143211 Abs and KIR2DL2/3/S2-specific GL183 from KIR2DS1[−] genotyped individuals (Fig. 1A). KIR2DL3⁺ KIR2DL1/2/S1/2[−] NK cells were sorted using a combination of KIR2DL2/3/S2-specific GL183 and KIR2DL1/S1-specific EB6 Abs from KIR2DL2/S2[−] genotyped individuals (Fig. 1A). All sorted KIR2DL NK cells were expanded after *in vitro* stimulation. NK cells expressing inhibitory NKG2A receptors were systematically excluded from functional studies. KIR2DL1 recognized HLA-C*04:01 (i.e., a “C2 allele”), but not HLA-C*03:04 (i.e., a “C1 allele”; Fig. 1B). However, KIR2DL2⁺ (Fig. 1C) and KIR2DL3⁺ NK cells (Fig. 1D) similarly recognized both HLA-C*03:04 (C1) and HLA-C*04:01 (C2) molecules as shown by the CD107a upregulation assay. The same profile has been obtained for IFN- γ production with a lower frequency of positive cells (data not shown). Moreover, KIR2DL2⁺ and KIR2DL3⁺ NK cells from C1⁺ individuals showed a similar degranulation potential to NK cells from C1[−] individuals, as assessed against the HLA class I-deficient 221 cell line (Fig. 1C, 1D). This result was also observed for KIR2DL2⁺ and KIR2DL3⁺ NK cells amplified with 221 cells as feeders, eliminating a possible education of these NK cells by HLA-C molecules expressed by feeders (data not shown). In contrast, KIR2DL1⁺ NK cells showed efficient degranulation against the 221 cell line only in C2⁺ individuals (Fig. 1B). Although variable from one individual to another, the frequency of CD107a⁺ KIR2DL2⁺ or CD107a⁺ KIR2DL3⁺ NK cells did not correlate with the presence or absence of particular C1 or C2 alleles. Altogether, these results suggest that the stringent C2 specificity of KIR2DL1 confers an NK education only in C2⁺ individuals; in contrast, some HLA class I molecules previously identified as C2 ligands could be recognized by KIR2DL2 and KIR2DL3 receptors and could mediate, at least to some extent, education of KIR2DL2/3 NK cells. Thus, a preactivation of these KIR2DL NK cell subsets, notably by cytokine stimulation, seems sufficient to decrease their activation threshold.

Broad HLA-C specificity of KIR2DL2⁺ and KIR2DL3⁺ NK cells but restricted C2 specificity of KIR2DL1⁺ NK cells

To investigate the range of C2 specificity of KIR2DL2 and KIR2DL3, we evaluated the ability of KIR2DL NK cell subsets to recognize different C1 and C2 ligands, when compared with control KIR2DL1⁺ cells (Fig. 1E). All HLA-C transfected 221 cell lines

similarly expressed HLA class I molecules except 221-C*15:02, which is less recognized by KIR2DL2 and KIR2DL3 NK cells (Fig. 1F). The C2 specificity of KIR2DL1 was confirmed toward four different HLA ligands: HLA-C*04:01, C*02:02, C*06:02, and C*15:01 with a hierarchy of recognition. Indeed, HLA-C*04:01 inhibited more efficiently KIR2DL1 NK cell degranulation than HLA-C*02:02 and HLA-C*15:01. HLA-C*06:02 was less but variably recognized by KIR2DL1 NK cells. Although the C1 allele HLA-C*03:04 was not recognized by KIR2DL1, another C1 allele HLA-C*08:02 (C1) partially inhibited KIR2DL1 NK cell degranulation. The same hierarchy of C2 allele-induced inhibition was also observed with KIR2DL2 and KIR2DL3 NK cells. Indeed, these cells, irrespective of their C1 molecule, were strongly inhibited by HLA-C*04:01, inhibited at an intermediate level by HLA-C*15:02, and less inhibited by HLA-C*02:02 and C*06:02. In contrast with KIR2DL1 cells, HLA-C*08:02 (C1) was less recognized than HLA-C*03:04 (C1) by KIR2DL2⁺ and KIR2DL3⁺ NK cell subsets. These results suggest broad HLA-C specificity of KIR2DL2 and KIR2DL3 cells, and a hierarchy of recognized HLA-C ligands within each C1 and C2 group.

Stringent C2 alloreactivity of KIR2DS1⁺ NK cells

In parallel with KIR2DL, we investigated C2 specificity of KIR2DS1 NK cells to validate our experimental approach before investigating HLA-C specificity of KIR2DS2 in this setting. We previously showed that different functional capabilities (degranulation, IFN- γ secretion, and proliferation) of KIR2DS1⁺ NK cell lines were triggered by 221-HLA-C*04:01⁺ (C2) cells, only among C2[−] individuals (15). In this study, we confirmed degranulation of sorted and *in vitro* expanded KIR2DS1⁺ KIR2DL2/3/S2[−] NKG2A[−] NK cells (Fig. 2A) by a broad panel of HLA-C1 transfected 221 cells (Fig. 2B), as illustrated for one representative individual (Fig. 2C). Interestingly, HLA-C*02:02 induced stronger CD107a expression than HLA-C*04:01 and HLA-C*06:02 by KIR2DS1⁺ NK cells. We cloned KIR2DS1⁺ KIR2D[−] NK cells and confirmed the absence of KIR2DS1⁺ NK cell alloreactivity against C2⁺ target cells in C2⁺ individuals (Fig. 2D). In contrast, C2[−] KIR2DS1⁺ NK cell clones showed strong alloresponsiveness against HLA-C*04:01- and HLA-C*02:02- (C2) target cells (Fig. 2D). The C2 specificity of KIR2DS1 was confirmed for four clones isolated from three C2[−] individuals. Our results suggest that KIR2DS1 shows stringent C2 specificity, like its inhibitory counterpart, KIR2DL1.

C1 specificity of KIR2DS2

To address the specificity of KIR2DS2 NK cells and reassess the rules governing activation of KIR2DS2⁺ NK cells, we used KIR2DS2⁺ KIR2DL1/3/S1[−] NK cell lines from KIR2DL3[−] genotyped individuals, obtained after sorting with a combination of the KIR2DL3/S2-specific 1F12 and KIR2DL1/S1-specific EB6 Abs (20), and subsequent *in vitro* expansion (Fig. 3A). Because the KIR2DS2⁺ NK cell population can coexpress the inhibitory KIR2DL2, we cloned KIR2DS2⁺ KIR2DL1/S1[−] NK cells and discriminated KIR2DS2⁺ clones from KIR2DS2[−] ones by KIR2DL2 RT-PCR analysis (Fig. 3B). Fig. 3C illustrates the degranulation of two KIR2DS2⁺ (KIR2DL2[−] and KIR2DL2⁺) NK cell clones isolated from the same individual against 221, 221-C1 (HLA-C*03:04), and 221-C2 (HLA-C*04:01) cell lines. In accordance with their KIR2DL2 RNA profile, the degranulation of KIR2DS2⁺ KIR2DL2[−] NK cell clones was strongly activated by the 221-C1 (HLA-C*03:04) cell line, but not by 221 or 221-C2 (HLA-C*04:01) cell lines. In contrast, degranulation of KIR2DS2⁺ KIR2DL2⁺ NK cell clones was strongly inhibited by both 221-C1 (HLA-C*03:04) and 221-C2 (HLA-C*04:01) cell lines. This observation confirms not only the broader specificity of KIR2DL2 NK cells (Fig. 1C), but also the

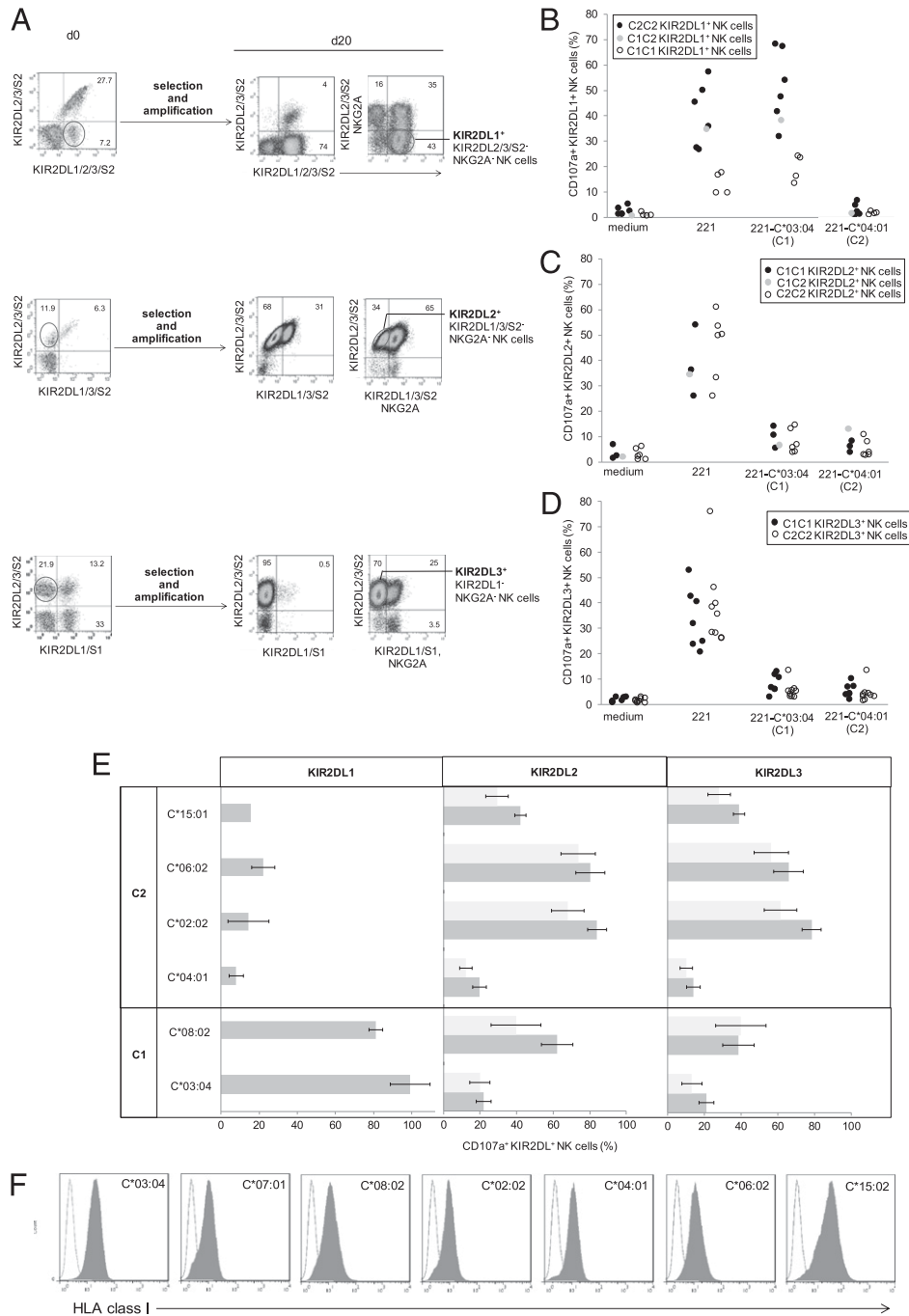


FIGURE 1. Comparable degranulation potential of C1[−] and C1⁺ activated KIR2DL2⁺ and KIR2DL3⁺ NK cells because of a large HLA-C specificity. **(A)** After depletion of CD3⁺ cells from PBMCs, KIR2DL1⁺ KIR2DL2/3/S1/2[−] NK cells (NKp46⁺ 8C11⁺ GL183[−]) were cell sorted (7.2% of the population; day 0 [d0]) and amplified in vitro with irradiated allogeneic PBMCs and EBV-B cells as feeders. After 3 wk of stimulation (d20), the phenotype of these sorted and stimulated NK cells was assessed by flow cytometry and is illustrated for 1 representative KIR2DL1⁺ genotyped individual out of 11 studied individuals. Seventy-four percent of these amplified cells are KIR2DL1⁺ KIR2DL2/3/S1/2[−] NK cells (NKp46⁺ 8C11⁺ GL183[−]) and 43% are NKG2A[−]. Following the same protocol, KIR2DL2⁺ KIR2DL1/3/S1/2[−] NK cells (NKp46⁺ 1F12[−] 143211[−] GL183⁺) were cell sorted (11.9% of the population; d0) and amplified in vitro. After 3 wk of stimulation, the phenotype of these sorted and stimulated cells was assessed by flow cytometry and is illustrated for 1 representative KIR2DL2⁺ 2DL3[−] genotyped individual out of 10 studied individuals. Sixty-eight percent of these amplified cells are KIR2DL2⁺ KIR2DL1/3/S1/2[−] NK cells (NKp46⁺ 1F12[−] 143211[−] GL183⁺) and 34% are NKG2A[−]. Finally, KIR2DL3⁺ KIR2DL1/2/S1/2[−] NK cells (NKp46⁺ GL183⁺ EB6[−]) were cell sorted (21.9% of the population; d0) and amplified in vitro. The phenotype of these sorted and stimulated cells is illustrated for 1 representative KIR2DL3⁺ KIR2DL2[−] genotyped individual out of 15 studied individuals. Ninety-five percent of these amplified cells are KIR2DL3⁺ KIR2DL1/2/S1/2[−] NK cells (NKp46⁺ GL183⁺ EB6[−]) and 70% are NKG2A[−]. Scatter plots displaying the CD107a⁺ KIR2DL⁺ NK cell frequency determined after 5-h degranulation assay at an E:T ratio of 1:1 in different stimulation conditions: medium, 221 cells, HLA-C*03:04 (C1) and HLA-C*04:01 (C2) transfected 221 cells **(B)** for selected and amplified KIR2DL1⁺ KIR2DL2/3/S1/2[−] NKG2A[−] NK cells from C2⁺ ($n = 7$) and C2[−] ($n = 4$) individuals; **(C)** for selected and amplified KIR2DL2⁺ KIR2DL1/3/S1/2[−] NKG2A[−] NK cells from C1⁺ ($n = 4$) and C1[−] ($n = 6$) individuals; and **(D)** for selected and amplified KIR2DL3⁺ KIR2DL1/2/S1/2[−] NKG2A[−] NK cells from C1⁺ ($n = 7$) and C1[−] ($n = 8$) individuals. **(E)** Bars represent the mean of CD107a⁺ KIR2DL⁺ NK cell percentages (± SD) evaluated with a larger panel of C1 (HLA-C*03:01 and C*08:02) and C2 (HLA-C*04:01, C*02:02, C*06:02, and C*15:01) transfected 221 cells from previously studied individuals in (B)–(D). Educated NK cells (C1⁺ KIR2DL2⁺, C1⁺ KIR2DL3⁺, and (Figure legend continues)

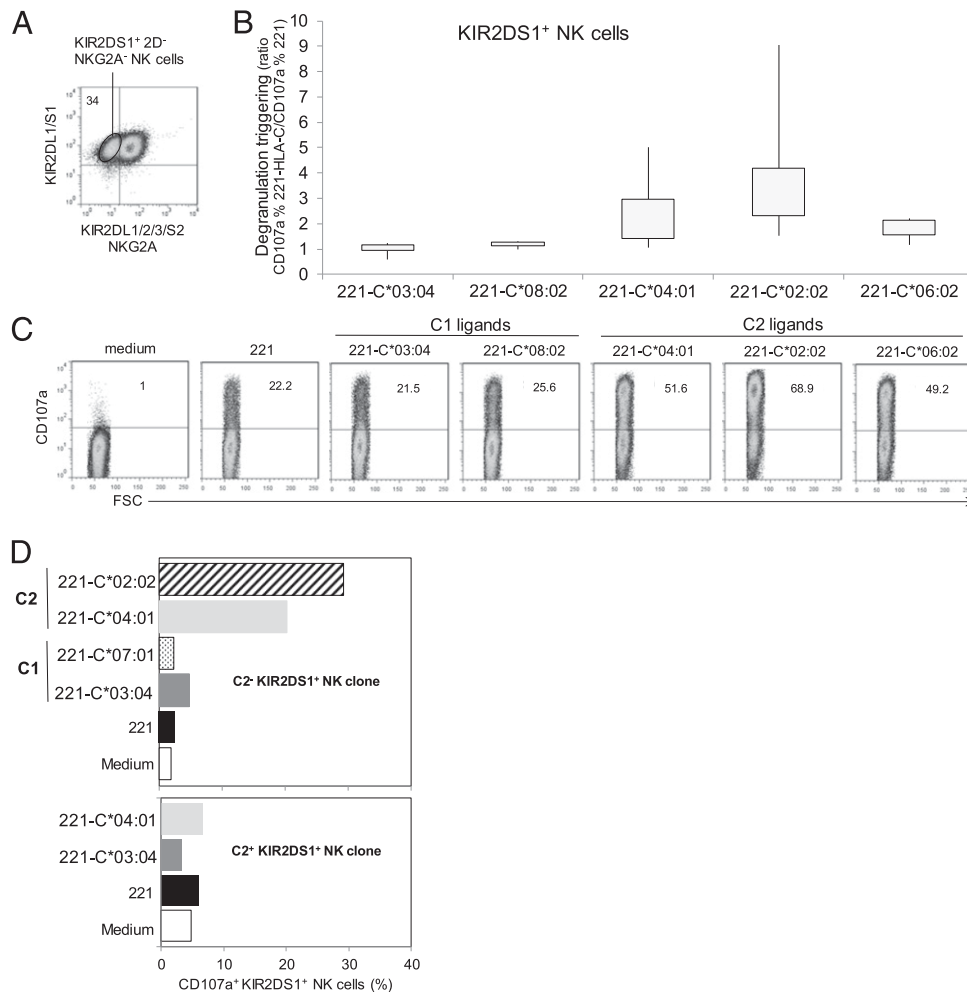


FIGURE 2. Stringent C2 alloreactivity of KIR2DS1⁺ NK cells. **(A)** After depletion of CD3⁺ cells from PBMCs, KIR2DS1⁺ KIR2DL1/2/3/S2⁻ NK cells (NKp46⁺ EB6⁺ 8C11⁻) were cell sorted and amplified in vitro with irradiated allogeneic PBMCs and EBV-B cells as feeders. After 3 wk of stimulation, the phenotype of these sorted and stimulated cells was assessed by flow cytometry and is illustrated for one representative KIR2DS1⁺ genotyped individual of eight studied individuals. Thirty-four percent of these amplified cells are KIR2DS1⁺ KIR2DL1/2/3/S2⁻ NKG2A⁻ NK cells (NKp46⁺ EB6⁺ 8C11⁻ NKG2A⁻). **(B)** Summary box and whisker plot summarizing the percentages of CD107a⁺ KIR2DS1⁺ NK cells after 5-h incubation alone or in the presence of 221 cells as positive control, at an E:T ratio of 1:1, for eight experiments performed. To homogenize the data obtained from independent experiments, the data are presented as the ratio of the degranulation obtained with HLA-C transfected 221 cells to the degranulation obtained with untransfected 221 cells. **(C)** Representative density plots of KIR2DS1⁺ KIR2DL1/2/3/S2⁻ NKG2A⁻ (NKp46⁺ EB6⁺ 8C11⁻ NKG2A⁻) NK cell degranulation observed in the different culture conditions. **(D)** Bars indicate the percentage of CD107a⁺ KIR2DS1⁺ NK cells from one C2⁻ representative KIR2DS1⁺ NK cell clone out of four clones isolated from three different C2⁻ individuals and one C2⁺ KIR2DS1⁺ NK cell clone in a degranulation assay following the E:T ratio of 1:1 with different HLA-C transfected 221 target cells.

dominant effect of NKR-induced inhibitory over activating signals. To determine the impact of the HLA-C environment on C1 reactivity of KIR2DS2⁺ NK cells, we evaluated the degranulation of 27 KIR2DS2⁺ KIR2DL2⁻ NK cell clones (Fig. 4A) and 14 KIR2DS2⁺ KIR2DL2⁺ NK cell clones (Fig. 4B) derived from 10 individuals (2 C1C1, 4 C1C2, and 4 C2C2) against 221, 221-C1 (HLA-C*03:04), and 221-C2 cells (HLA-C*04:01). Of note, we could not generate KIR2DS2⁺ KIR2DL2⁺ NK clones from C1C1 individuals. NK cell degranulation toward the 221 cell line varied from one KIR2DS2⁺ NK cell clone to another. Because this variability could be linked to expression of other inhibitory or activating NKRs, we assessed expression of unengaged inhibitory receptors, like KIR3DL1 and ILT2, and activating receptors (e.g., KIR2DS4, NKp30, NKp44, NKG2D,

2B4, and CD16). For some clones, KIR3DL1 and NCR expression could explain a high reactivity toward 221 target cells of some clones, such as the 1F9 clone from D9 individual. However, this heterogeneity was most probably linked to previous in vitro stimulation of NK cell clones. A CD107a mobilization assay showed increased degranulation of KIR2DS2⁺ NK cell clones with the 221-C1 (HLA-C*03:04) cell line in contrast with 221 and 221-C2 (HLA-C*04:01) counterparts, irrespective of the HLA-C background of individuals, even though few KIR2DS2⁺ KIR2DL1/2/2DS1⁻ clones were obtained from C1C1 individuals. Overall, the degranulation patterns of KIR2DS2⁺ KIR2DL2⁻ clones were similar in C1⁺ ($n = 11$) versus C1⁻ individuals ($n = 8$), because these clones were stimulated by the 221-C1 (HLA-C*03:04) cell line

C2⁺ KIR2DL1⁺) are indicated in light gray and uneducated NK cells (C1⁻ KIR2DL2⁺, C1⁻ KIR2DL3⁺, and C2⁻ KIR2DL1⁺) in dark gray. To homogenize the data obtained from independent experiments, we present the data as the degranulation obtained with HLA-C transfected 221 cells relative to the degranulation obtained with untransfected 221 cells at an E:T ratio of 1:1. **(F)** Histograms represent HLA class I expression of different HLA-C transfected 221 cell lines (filled) and 221 cell line as negative control (open).

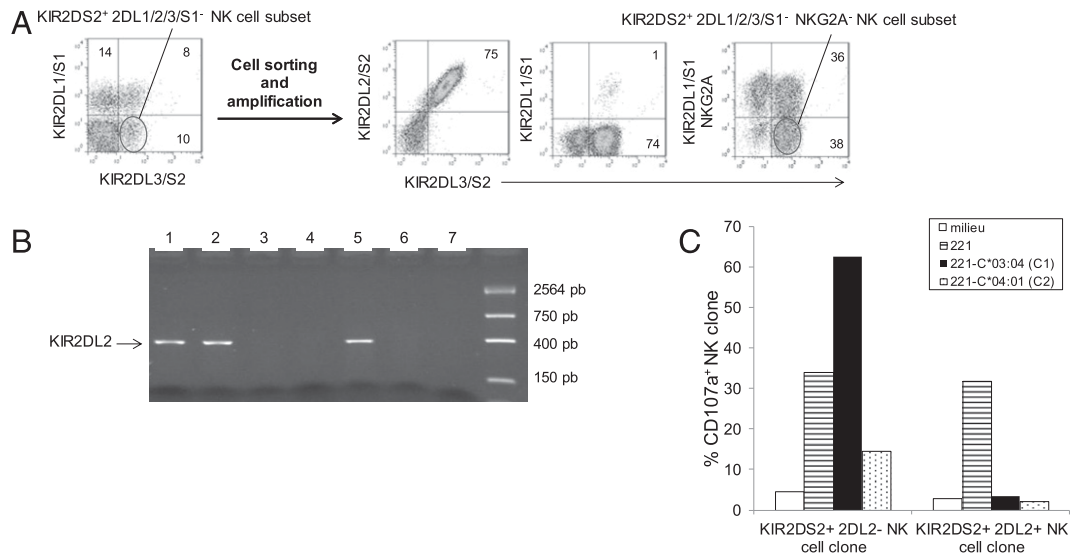


FIGURE 3. C1 specificity of KIR2DS2. **(A)** After depletion of CD3⁺ cells from PBMCs, KIR2DS2⁺ KIR2DL1/3/2DS1⁻ NK cells (Nkp46⁺ EB6⁻ 1F12⁺) were cell sorted (10% of the population; d0) from KIR2DL3⁻ genotyped individuals and amplified in vitro with irradiated allogeneic PBMCs and EBV-B cells as feeders. After 3 wk of stimulation, the phenotype of these sorted and stimulated cells was assessed by flow cytometry and is illustrated for 1 representative KIR2DS2⁺ genotyped individual of 10 studied individuals. Seventy-four percent of these amplified cells are KIR2DS2⁺ KIR2DL1/3/2DS1⁻ NK cells (Nkp46⁺ EB6⁻ 1F12⁺) and 38% are NKG2A⁻. **(B)** Visualization of specific KIR2DL2 RT-PCR products on a 2% agarose gel in 0.5× Tris Borate EDTA Buffer with Sequence Specific Primer Size Marker (One Lambda). RNA was extracted from KIR2DS2⁺ KIR2DL1/3/S1⁻ NK cell clones of interest and specific RT-PCR was then performed using KIR2DL2-specific PCR-SSP primers showing a specific RT-PCR product at 383 bp for some KIR2DS2⁺ clones. **(C)** Histograms illustrating the degranulation of one KIR2DS2⁺ KIR2DL2⁻ NK cell clone and one representative KIR2DS2⁺ KIR2DL2⁺ NK cell clone in different culture conditions: medium, 221, HLA-C*03:04 (C1), and HLA-C*04:01 (C2) transfected 221 target cells at an ET ratio of 1:1.

(Fig. 4C), but not by 221 or 221-C2 (HLA-C*04:01) counterparts. These results suggest that, in contrast with KIR2DS1 NK cells, which are C2 alloreactive only from the C2⁻ environment, KIR2DS2 NK cells are C1-reactive irrespective of their HLA-C haplotype. In parallel, degranulation of KIR2DS2⁺ KIR2DL2⁺ clones is inhibited by both 221-C1 (HLA-C*03:04) and 221-C2 (HLA-C*04:01), in line with results obtained with KIR2DL2⁺ cell lines (Fig. 1), regardless of the HLA-C background and NK cell phenotype (Fig. 4B). The inhibitory C1-KIR2DL2 signaling bypassed the activating C1-KIR2DS2 signaling, highlighting the preponderant impact of KIR2DL2 on NK cell inhibition.

Additive effect of KIR2DL1 and KIR2DS2 against C1⁺ target cells

Taking into account that activation of KIR2DS2 in the presence of a C1 ligand should have an additive effect on the activation mediated by the lack of engagement of KIR2DL1, we then evaluated the impact of the coexpression of KIR2DS2 and KIR2DL1 on recognition of C1C1⁺ target cells. To this end, we sorted KIR2DL1⁺ KIR2DS2⁺ NK cells from KIR2DS1 and KIR2DL3 negative genotyped C2⁺ individuals using anti-KIR2DL3/2DS2 (1F12)- and anti-KIR2DL1/S1 (EB6)-specific Abs (Fig. 5A). The sorted KIR2DL1⁺ KIR2DS2⁺ cells were cloned and phenotyped by KIR2DL2 RT-PCR as previously described (Fig. 3B), to discriminate KIR2DL2⁺ NK cell clones. We observed a functionally additive effect of KIR2DL1 and KIR2DS2 on the recognition of the 221-HLA-C*03:04 (C1) cell line (Fig. 5B, 5C). C2 ligands, like HLA-C*02:02 and HLA-C*04:01, engaged KIR2DL1 receptors and inhibited KIR2DS2⁺ KIR2DL1⁺ NK cell degranulation.

The nature of KIR2D and HLA-C ligand affects the composition of the NK cell repertoire

To determine the functional impact of HLA-C-specific KIR2DL and KIR2DS receptor expression, we evaluated the phenotypic distribution of each KIR2D NK cell subset: KIR2DL1/S1⁺ KIR2DL2/3/

S2⁻, KIR2DL1/S1⁻ KIR2DL2/3/S2⁺, and KIR2DL1/S1⁺ KIR2DL2/3/S2⁺ NK cell subsets within KIR2DL1/2/3/S1/2 NK cells, in a cohort of 159 KIR and HLA genotyped individuals (Supplemental Table I). Because almost all studied individuals were KIR2DL1⁺ genotyped (96%), this analysis was performed according to KIR2DL2, KIR2DL3, and KIR2DS2 genotype and HLA-C environment (Fig. 6A). In this cohort, all KIR2DL2⁺ individuals were KIR2DS2⁺ genotyped; thus, we assigned the individuals in one of three groups determined by the presence of KIR2DL3, KIR2DL2/3/S2, and KIR2DL2/S2 genes. All studied populations were similarly represented, regardless of the HLA-C (C1C1, C1C2, or C2C2) environment (data not shown). However, KIR2DL1/S1⁺ KIR2DL2/3/S2⁻ NK cell frequency was significantly decreased in KIR2DL2/S2⁺ individuals with a C2⁺ haplotype (Fig. 6A, Supplemental Table II). The double-stained population frequency was not significantly different in the studied groups. The KIR2DL2/3/S2⁺ KIR2DL1/S1⁻ NK cell frequency was significantly higher in KIR2DL2/S2⁺ compared with KIR2DL3⁺ individuals (Fig. 6A, Supplemental Table II) with all HLA-C molecules, and in KIR2DL2/3/S2⁺ compared with KIR2DL3⁺ individuals with C1C1 and C2C2 molecules. Finally, we analyzed the distribution of each KIR2D NK cell subset, as defined by their mean frequencies in the pool of KIR2DL1/2/3/S1/2 NK cells (Fig. 6B), according to KIR2DL2, KIR2DL3, and KIR2DS2 genotypes and expression of either C1 or C2 molecules. The KIR2DL1/S1⁺ NK cell subset predominated in KIR2DL3⁺ individuals, and its mean frequency increased with the number of C2 alleles (mean frequencies are 36.1, 38.4, and 47.2%, respectively, in C1C1, C1C2, and C2C2 environments). In contrast, the presence of KIR2DL2 and KIR2DS2 correlated with increased mean frequencies of KIR2DL2/3/S2⁺ NK cells, particularly in KIR2DL2/S2⁺ individuals. Although KIR2DL2 and KIR2DL3 recognized a broad spectrum of HLA-C ligands, the higher affinity of KIR2DL2 than KIR2DL3 toward HLA-C ligands could account for decreased frequency of the KIR2DL1⁺ NK cell pool in the former individuals. The six individuals with a KIR2DL1⁻

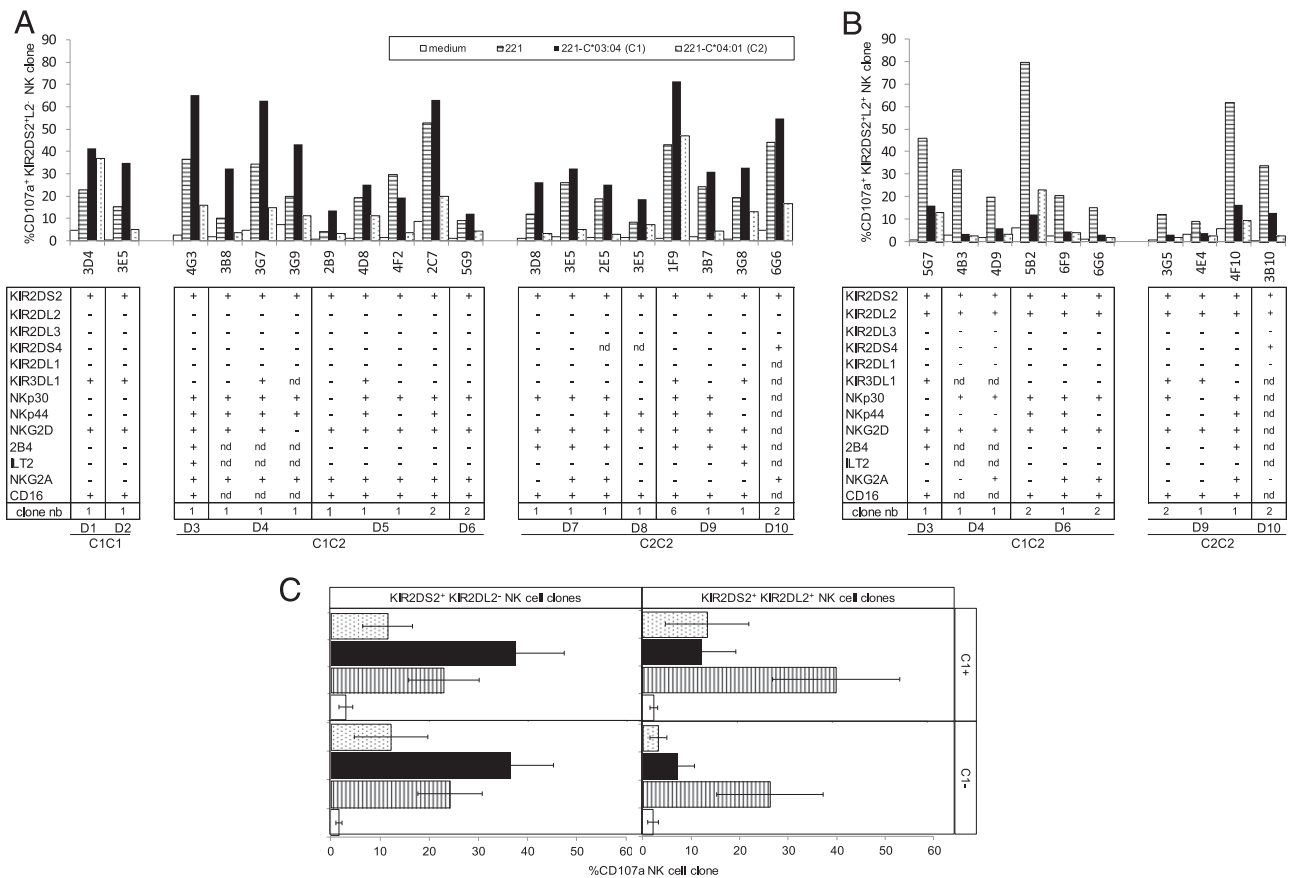


FIGURE 4. C1 reactivity of KIR2DS2⁺ KIR2DL2⁻ NK cell clones regardless of the HLA-C background. Histograms represent the percentage of (A) CD107a⁺ KIR2DS2⁺ KIR2DL2⁻ NK cell clones and (B) KIR2DS2⁺ KIR2DL2⁺ NK cell clones isolated from C1C1, C1C2, and C2C2 individuals in different conditions of degranulation assay: medium, 221, HLA-C*03:04 (C1), and HLA-C*04:01 (C2) transfected 221 target cells at an ET ratio of 1:1. (C) Bars indicate the mean of the percentage of CD107a⁺ KIR2DS2⁺ KIR2DL2⁻ NK cell clones (±SD) and CD107a⁺ KIR2DS2⁺ KIR2DL2⁺ NK cell clones (±SD), grouped following C1⁺ and C1⁻ background, in different culture conditions: medium, 221, HLA-C*03:04 (C1), and HLA-C*04:01 (C2) transfected 221 target cells at an E:T ratio of 1:1.

genotype in our cohort were KIR2DL2/S2⁺ KIR2DL3⁻. We observed a significantly higher KIR2DL2/3/S2⁺ NK cell frequency (mean = 36.1 ± 5) in these individuals when compared with KIR2DL1⁺ KIR2DL2/S2⁺ 2DL3⁻ individuals (mean = 20.3 ± 5 , $p = 0.005$; Fig. 6C), possibly as a result of compensatory KIR2DL2/S2 expression in the absence of KIR2DL1 expression. Thus, KIR2DL1 substitution by KIR2DL2 is phenotypically marked in the KIR2D repertoire and possibly allows maintenance of self C2 recognition.

Significant impact of KIR2DS1 and KIR2DS2 expression on KIR2D NK cell repertoire formation

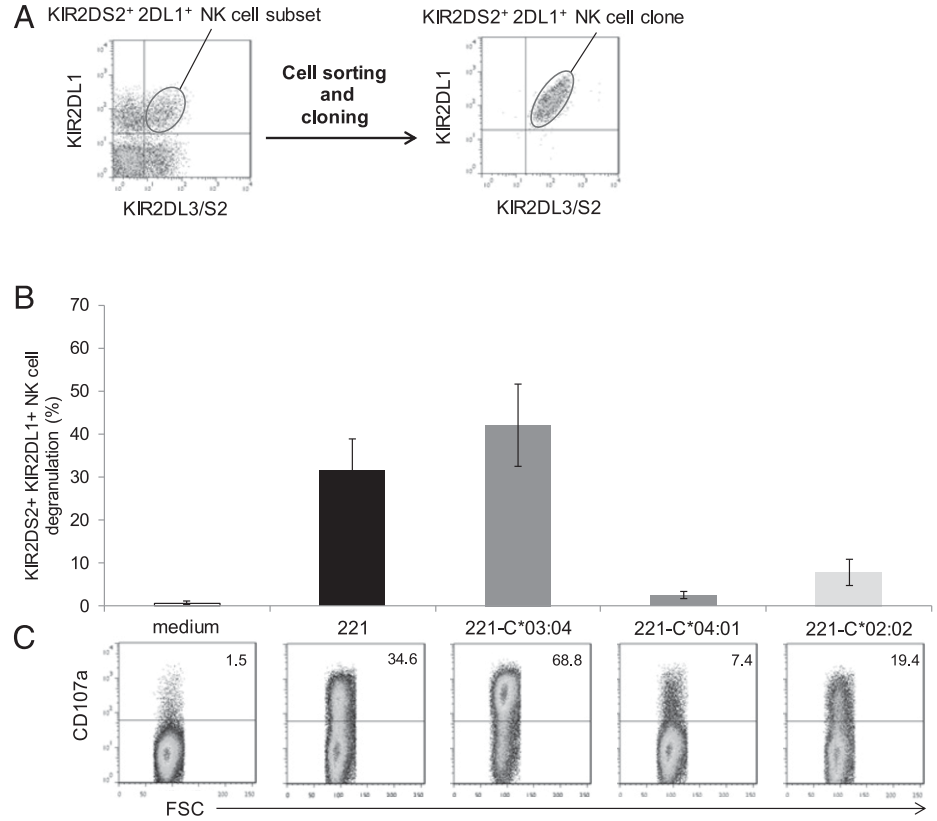
To determine the impact of KIR2DS1 gene on the KIR2DL1/S1 NK cell compartment, we assessed the frequency of KIR2DL1⁺ 2DS1⁻, KIR2DL1⁺ 2DS1⁺, and KIR2DL1⁻ 2DS1⁺ NK cell subsets (Fig. 7A). Taking into account only the HLA-C environment, no difference in frequency was observed. However, a significantly decreased frequency of KIR2DL1⁺ 2DS1⁻ NK cells was observed particularly in B⁺ haplotypes regardless of the HLA-C molecules, linked directly to KIR2DS1 expression (Fig. 7A, Supplemental Table II). The KIR2DL1⁻ KIR2DS1⁺ NK cell subset is significantly more represented in BB than AB haplotypes because of the increased number of KIR2DS1 allele copies. KIR2DS1 expression contributed to a significantly increased KIR2DL1/S1 NK cell pool, expressed with or without KIR2DL1 on NK cells (Fig. 7C, 7D). Using a 1F12/GL183 Ab combination (20), we investigated the frequency of KIR2DL2⁺ 2DL3/S2⁻ and KIR2DL3/S2⁺ NK cell subsets accord-

ing to KIR2DL2, KIR2DL3, and KIR2DS2 genes and HLA-C environment (Fig. 7B, 7E). In accordance with the fact that KIR2DL2 and KIR2DL3 segregate as alleles (21), we observed that KIR2DL2⁺ KIR2DL3/S2⁻ NK cell frequency is significantly higher in KIR2DL2/S2⁺ than KIR2DL2/3/S2⁺ genotyped individuals with a C2C2 haplotype (Fig. 7B). However, KIR2DL2⁺ KIR2DL3/S2⁻ NK cell frequency was not twice in KIR2DL2/S2⁺ genotyped individuals that was observed in KIR2DL2/3/S2⁺ individuals with only one KIR2DL2 allele (Fig. 7E), which suggests either coexpression of KIR2DL2 with KIR2DS2, or decreased expression of KIR2DL2. Thus, the expression of the KIR2DS1 contributes to broaden significantly the pool of KIR2DL1/S1 NK cells even though it significantly limits the KIR2DL1⁺ 2DS1⁻ cell subset frequency. In addition, C1 reactive KIR2DS2 expression seems to function to enlarge the KIR2DL2/3/S2 NK cell pool, and it is conceivable that its additive effect with KIR2DL1 may contribute to limit KIR2DL1 expression on NK cells. In summary, our results suggest that together with KIR2DL2, activating KIR2DS1 and KIR2DS2 expression limits KIR2DL1 acquisition on NK cells.

Discussion

In this study, we revisited the HLA-C specificity of the main KIR2DL and determined C1 reactivity of KIR2DS2 from selected KIR2DL⁺ or KIR2DS⁺ NK cell lines and clones, and investigated these specificities on KIR2D NK cell formation. Our results are in accordance with numerous studies (9, 12, 13, 17, 22–28), and notably

FIGURE 5. Additive effect of KIR2DL1 and KIR2DS2 against C1⁺ target cells. **(A)** After depletion of CD3⁺ cells from PBMCs, KIR2DS2⁺ KIR2DL1⁺ KIR2DL2/3/S1⁻ NK cells (NKp46⁺ EB6⁺ IF12⁺) were cell sorted from C2⁺ KIR2DL3/S1⁻ genotyped individuals and amplified in vitro with irradiated allogeneic PBMCs and EBV-B cells as feeders. After 3 wk of stimulation, NK cells were cloned and only KIR2DL2⁻ NK cell clones verified by RT-PCR have been selected. The phenotype of one representative KIR2DS2⁺ KIR2DL1⁺ KIR2DL2/3/S1⁻ NK cell clone is shown. **(B)** CD107a mobilization assay was performed on four KIR2DS2⁺ KIR2DL1⁺ KIR2DL2/3/S1⁻ NK cell clones isolated from one C2⁺ individual. These results were confirmed for eight KIR2DS2⁺ KIR2DL1⁺ KIR2DL2/3/S1⁻ NK cell clones isolated from two different C2⁺ individuals. Bars indicate the mean of CD107⁺ NK cell percentages ($\pm$ SD) in different culture conditions: medium, 221, HLA-C*03:04 (C1), and HLA-C*04:01 (C2) transfected 221 target cells at an E:T ratio of 10:1. **(C)** Representative density plots of KIR2DS2⁺ KIR2DL1⁺ KIR2DL2/3/S1⁻ (NKp46⁺ EB6⁺ IF12⁺) NK cell degranulation observed in the different culture conditions.



those obtained by Winter et al. (13) showing that KIR2DL2 and KIR2DL3 recognize C2 allotypes using NK92 infected with Vac-KIR2DL2 or -KIR2DL3. More recently, Moesta et al. (12) have shown that KIR2DL2 is a stronger receptor for HLA-C ligand than

KIR2DL3. However, among C2 allotypes, we showed that HLA-C*04:01 ligand is better recognized than the other evaluated ligands (HLA-C*02:02, -C*06:02, and -C*15:01). These results are in line with a recent observation drawn from an analysis of

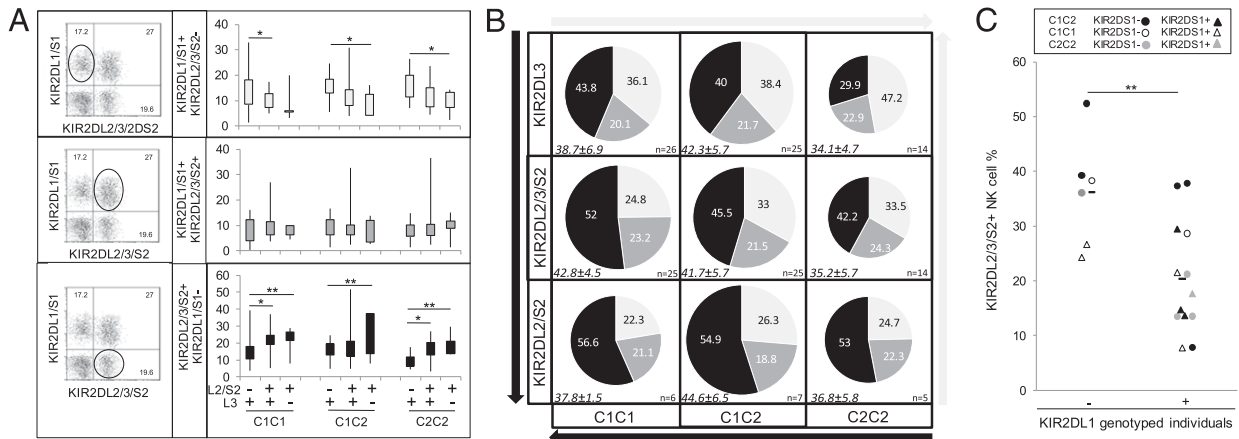


FIGURE 6. The nature of KIR2D and HLA-C ligands directs the structure of the NK cell repertoire. **(A)** Representative density plot illustrating the different KIR2D NK cell subsets in the large cohort of HLA and KIR genotyped individuals (Supplemental Table I) grouped according to the presence of KIR2DL2/3 and 2DS2 genes (KIR2DL3⁺, KIR2DL2/3/S2⁺, and KIR2DL2/S2⁺) and HLA-C haplotype (C1C1, C1C2, and C2C2). KIR2DL1/S1⁺ KIR2DL2/3/S2⁻ (EB6⁺ GL183⁻) NK cell subset is indicated in white, KIR2DL1/S1⁺ KIR2DL2/3/S2⁺ (EB6⁺ GL183⁺) NK cell subset is indicated in gray, and KIR2DL1/S1⁻ KIR2DL2/3/S2⁺ (EB6⁻ GL183⁺) NK cell subset is indicated in black. Box and whisker plot summarizing the frequency of each KIR2D NK cell subset out of all NK cells. **(B)** Pie charts depict the pattern of KIR2D composition in nine groups of individuals distributed following the presence of KIR2DL2/3 and 2DS2 genes (KIR2DL3⁺, KIR2DL2/3/S2⁺, and KIR2DL2/S2⁺) and HLA-C molecules (C1C1, C1C2, and C2C2). We summed KIR2DL1/S1⁺ KIR2DL2/3/S2⁻, KIR2DL1/S1⁺ KIR2DL2/3/S2⁺, and KIR2DL1/S1⁻ KIR2DL2/3/S2⁺ NK cell subsets, weighting them according to their frequency indicated in the pie chart. The size of the pie chart is proportional to the frequency of KIR2D NK cells (KIR2DL1/2/3/2DS1/2), and it is indicated ($\pm$ SD) in the bottom left of each group in italics. The number of studied individuals in each group is indicated in the bottom right. **(C)** Scatter plots represent KIR2DL2/3/S2⁺ NK cell frequency in KIR2DL1⁻ (n=6) and KIR2DL1⁺ (n=13) genotyped individuals. The mean frequency is indicated in each group by a black feature. Individuals have been identified following KIR2DS1 genotype and HLA-C molecules (C1C1, C1C2, and C2C2). Statistical significance (* $p < 0.05$, ** $p \leq 0.001$) between two groups was determined using the one-way ANOVA test (Supplemental Table II).

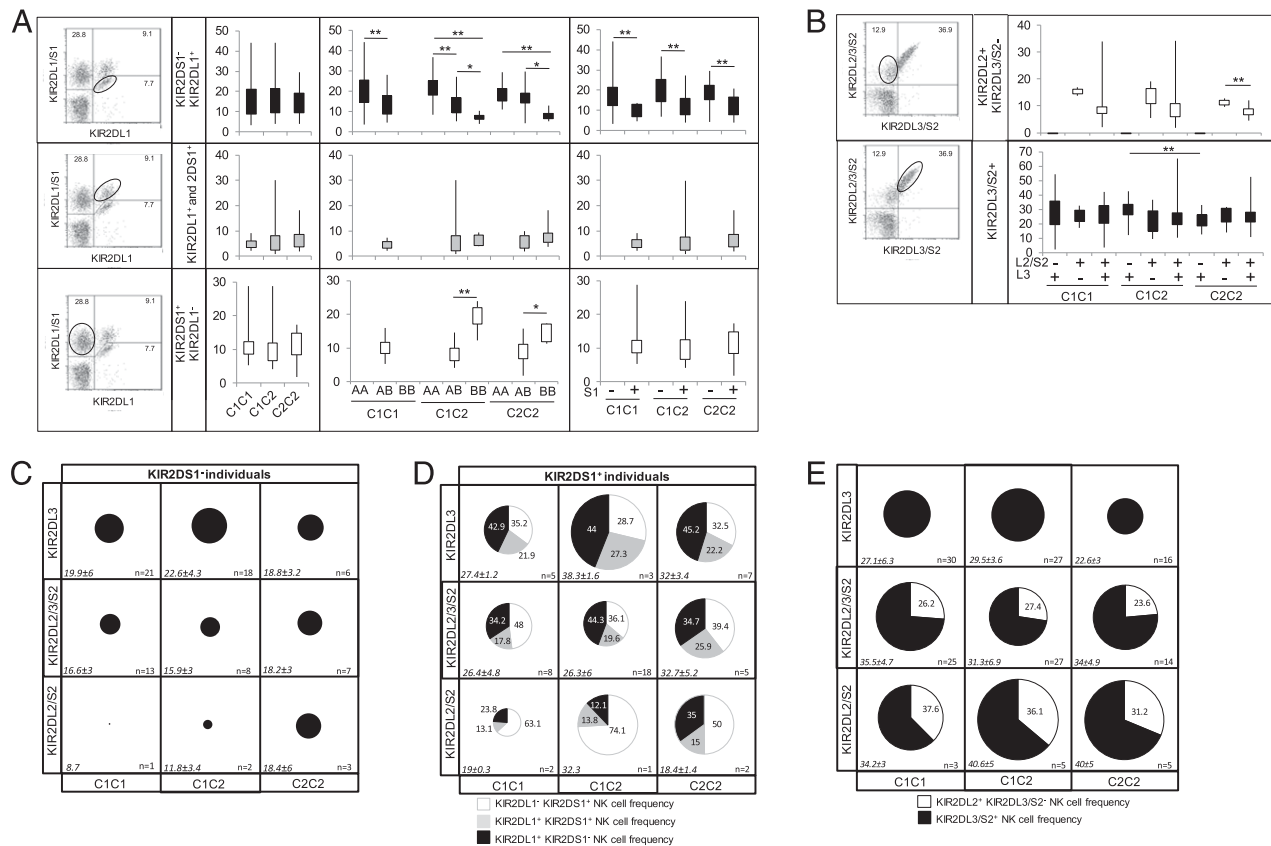


FIGURE 7. Significant impact of KIR2DS1 and KIR2DS2 expression on KIR2D NK cell repertoire formation. Representative density plot illustrating the different NK cell subsets expressing (A) KIR2DL1 or/and KIR2DS1, studied in the large cohort of HLA and KIR genotyped individuals (Supplemental Table I) grouped according to the HLA-C molecules (C1C1, C1C2, and C2C2), KIR haplotype (AA, AB, and BB), and presence or absence of the KIR2DS1 gene. KIR2DL1⁺S1⁻ (EB6^{low} 143211⁺) NK cell subset is indicated in black, KIR2DL1⁺S1⁺ (EB6^{high} 143211⁺) NK cell subset is indicated in gray, and KIR2DL1⁻S1⁺ (EB6^{high} 143211⁻) NK cell subset is indicated in white. (B) Representative density plot illustrating the different NK cell subsets expressing KIR2DL2 and/or KIR2DL2/3/S2 studied in individuals grouped in function of the presence of KIR2DL2/3 and 2DS2 genes (KIR2DL3⁺, KIR2DL2/3/S2⁺, and KIR2DL2/S2⁺) and HLA-C molecules (C1C1, C1C2, and C2C2). KIR2DL2⁺DL3⁺2DS2⁻ (1F12⁻ GL183⁺) NK cell subset is indicated in white; KIR2DL2⁻DL3⁺2DS2⁺ (1F12⁺ GL183⁺) NK cell subset is indicated in black. Box and whisker plot summarizing the frequency of each KIR2D NK cell subset out of all NK cells. Pie charts show the KIR2DL1 NK cell subset in nine groups of (C) KIR2DS1⁻ genotyped individuals and (D) KIR2DS1⁺ genotyped individuals distributed following the presence of KIR2DL2/3 and 2DS2 genes (KIR2DL3⁺, KIR2DL2/3/S2⁺, and KIR2DL2/S2⁺) and HLA-C molecules (C1C1, C1C2, and C2C2). We summed KIR2DL1⁺S1⁻, KIR2DL1⁺S1⁺, and KIR2DL1⁻S1⁺ NK cell subsets, weighting them according to their frequency indicated in the pie chart. (E) Pie charts depict the pattern of KIR2D composition in the KIR2DL2/3/2DS2 NK cell pool in nine groups of individuals distributed following the presence of KIR2DL2/3 and 2DS2 genes (KIR2DL3⁺, KIR2DL2/3/S2⁺, and KIR2DL2/S2⁺) and HLA-C molecules (C1C1, C1C2, and C2C2). We summed KIR2DL2⁺DL3⁺2DS2⁻ and KIR2DL2⁻DL3⁺2DS2⁺ NK cell subsets, weighting them according to their frequency indicated in the pie chart. The size of the pie chart is proportional to the frequency of KIR NK cell pool and it is indicated ($\pm$ SD) in the bottom left of each group in italics. The number of studied individuals in each group is indicated in the bottom right. Statistical significance ($*p < 0.05$, $**p \leq 0.001$) between two groups was determined using the one-way ANOVA test (Supplemental Table II).

a large panel of single-HLA class I molecule beads based on Luminex, which showed a broader pattern of HLA-C recognition by KIR2DL2-Fc fusion protein, even using unloaded HLA class I molecules (12). Recently, we have shown that KIR2DL3⁺ NK cell lines equally recognized either C1C1 or C2C2 immature dendritic cells (29). The low affinity of the KIR2DL2/3 to HLA-C ligand is likely reinforced and stabilized within the immune synapse by other receptor–ligand interactions, thus allowing functional KIR–HLA interactions. Besides the wide spectrum of HLA-C recognition by KIR2DL2 and KIR2DL3, another important message of our study is the ability of activated KIR2DL2⁺ and KIR2DL3⁺ NK cells to recognize the “missing-self” irrespective of their HLA-C background. Our results are in agreement with those of Anfossi et al. (7), who suggested education of KIR2DL3⁺ NK cells mainly from a C1⁺ environment. Indeed, we observed that resting C1⁻ KIR2DL3⁺ NK cells are less receptive to missing-self activation (data not shown); however, KIR2DL3 engagement with C2 ligands during NK development or cytokine stimulation could enhance the

response to missing-self after a preactivation, resulting in a decrease of their activation threshold. This point is essential in particular pathological contexts, such as viral infection, tumor processes, and HSCT, where activation could increase the missing-self response of poorly educated cells such as C1⁻ KIR2DL3⁺ NK cells or KIR2DL2⁺ NK cells.

In contrast with other approaches based on soluble KIR–Ig proteins, KIR2D transfected cells, or a vaccinia expression system, our results were drawn from NK cells purified from different individuals with a physiological KIR2D expression. The more sensitive cellular model probably allows assessment of low-avidity interactions between of KIR2D and HLA-C, which could explain discordant results with those obtained with binding assays using KIR2D–Ig fusion proteins (13). This is typically the case for soluble KIR2DS receptors, which did not bind to any of the HLA class I molecules expressed on a large panel of transfected cells (13). In our cellular model, we showed that KIR2DS2 recognizes only C1 ligands, in contrast with its inhibitory KIR2DL2 form, in

all HLA-C environments. Failed C1/KIR2DS2 interactions using soluble KIR2DS2-Ig fusion proteins or KIR2DS2 tetramers (30) would suggest weak affinities. Thus, the few substitutions between the extracellular parts of both receptors could explain these apparent discrepancies. KIR2DS1 and KIR2DS2 show a lower affinity than their inhibitory counterparts with overlapping specificity, ensuring that inhibition signals override activation signals. However, in the absence of inhibitory KIR signals, the engagement of activating KIR2DS is sufficient to trigger NK cell responses.

The broader specificity of KIR2DL2 and KIR2DL3 toward HLA-C alleles also recognized by KIR2DL1 would explain the predominant expression of this compartment within the KIR2D NK cell repertoire. KIR2DL1 is predominantly represented in a C2C2 environment in the presence of KIR2DL3, but its representation is decreased in the presence of KIR2DL2 and KIR2DS2 genes. One possible explanation for this is that KIR2DL2 is a stronger competitor than KIR2DL3 for C2 ligands, explaining its predominant representation in the KIR2D NK cell pool in a C2C2 environment. Moreover, the high proportion of KIR2DS1⁺ NK cells in the KIR2DL1/S1 pool could contribute to the decreased frequency of KIR2DL1⁺ 2DS1⁻ NK cells. Thus, all inhibitory and activating KIR2D are functional, but the strength of HLA-C affinity is different, ensuring a hierarchy between these KIR2D, and explains, in part, the formation of the NK cell repertoire depending on the HLA-C environment. In this regard, we observed in KIR2DL1⁻ genotyped individuals that KIR2DL2/3/2DS2 expression was significantly increased compared with KIR2DL1⁺ genotyped counterparts, suggesting an adjustment of the KIR2D repertoire formation after the distribution of each pool. This observation may not be compatible with a sequential acquisition of KIR with KIR2DL1 expression after KIR2DL2 and KIR2DL3 as proposed by Uhrberg's group (9). It is likely that the adjustment is more continuous and that the KIR2D expression can be readjusted according to other KIR2D expressed, as previously proposed (10).

The C2-expressing fetuses carried by group A KIR homozygous mothers constitute a risk factor for pre-eclampsia (31) and recurrent miscarriage (32) during pregnancy. In contrast, fetal C1 homozygosity and maternal group B KIR haplotype are protective (31, 32). Thus, it is conceivable that strong inhibitory KIR2DL2 maintains proper inhibition of NK cell responses against C1 fetal cells, whereas the weak inhibitor KIR2DL3, which is potentially efficient in C2 individuals on activated NK cells, may not properly inhibit NK cell response against allogeneic C2 ligands, resulting in pre-eclampsia or miscarriage. Moreover, although KIR2DL2 and KIR2DL3 segregate as alleles, only KIR2DL3 was associated with resistance to hepatitis C virus (33). The weaker interaction between KIR2DL3 and C1 ligand could be reinforced by particular peptides of viral or endogenous origin (34). In an HSCT context, it has been documented that KIR2DL2/3 and KIR2DS2 are predominantly expressed during hematopoietic reconstitution (35). In this activated context, KIR2DL2⁺ and KIR2DL3⁺ NK cells from C2C2 donors should ensure the missing-self recognition to compensate the default of functional KIR2DL1⁺ NK cell recovery.

A previous study has defined five types of NK cell repertoire based on KIR dominant or NKG2A dominant expression, receptor-null expression, single-receptor expression, KIR-KIR coexpression, and NKG2A-KIR coexpression, and revealed a balance of KIR/NKG2A (36). This study was performed mainly from AA haplotype individuals and it would be interesting to investigate these types of repertoires taking into account the presence or absence of KIR2DL2/S2 and KIR2DS1 genes. Moreover, different affinities for the same HLA-C ligand have been shown for different KIR2DL3 allele products (12, 17), and this affinity can be modulated by the nature of loaded peptide (23). Thus, the formation of the KIR2D

NK repertoire is probably finely adjusted depending on the KIR2DL polymorphism and on the other NK cell subsets. In this regard, we have recently shown the impact of KIR3DL1 allelic nature on KIR3DL1 NK repertoire formation (37). These recent investigations suggest primary expression of KIR3DL1 followed by KIR2D acquisition. The impact of allelic KIR3DL1 and a Bw4 environment on KIR2D NK cell repertoire should be studied in a larger cohort. Altogether, our results suggest that the nature of the HLA-C-specific activating and inhibitory KIR2D expressed and the ligand environment directs the structure of NK cell repertoire.

Acknowledgments

We are grateful to all the donors for participating in this study. We thank Dr. Marc Bonneville (Unité Mixte de Recherche 892, Nantes, France) for advice and Britt House (Hesingue, France) for help in the editing of the manuscript.

Disclosures

The authors have no financial conflicts of interest.

References

- Kärre, K. 2002. NK cells, MHC class I molecules and the missing self. *Scand. J. Immunol.* 55: 221–228.
- Ruggeri, L., M. Capanni, M. Casucci, I. Volpi, A. Tosti, K. Perruccio, E. Urbani, R. S. Negrin, M. F. Martelli, and A. Velardi. 1999. Role of natural killer cell alloreactivity in HLA-mismatched hematopoietic stem cell transplantation. *Blood* 94: 333–339.
- Ruggeri, L., M. Capanni, E. Urbani, K. Perruccio, W. D. Shlomchik, A. Tosti, S. Posati, D. Rogaia, F. Frasson, F. Aversa, et al. 2002. Effectiveness of donor natural killer cell alloreactivity in mismatched hematopoietic transplants. *Science* 295: 2097–2100.
- Sivori, S., C. Cantoni, S. Parolini, E. Marcenaro, R. Conte, L. Moretta, and A. Moretta. 2003. IL-21 induces both rapid maturation of human CD34⁺ cell precursors towards NK cells and acquisition of surface killer Ig-like receptors. *Eur. J. Immunol.* 33: 3439–3447.
- Santouridis, S., H.-I. Trompeter, S. Weinhold, B. Eisermann, K. L. Meyer, P. Wernet, and M. Uhrberg. 2002. Crucial role of DNA methylation in determination of clonally distributed killer cell Ig-like receptor expression patterns in NK cells. *J. Immunol.* 169: 4253–4261.
- Uhrberg, M., N. M. Valiante, B. P. Shum, H. G. Shilling, K. Lienert-Weidenbach, B. Corliss, D. Tyan, L. L. Lanier, and P. Parham. 1997. Human diversity in killer cell inhibitory receptor genes. *Immunity* 7: 753–763.
- Anfossi, N., P. André, S. Guia, C. S. Falk, S. Roetynck, C. A. Stewart, V. Bresco, C. Frassati, D. Reviron, D. Middleton, et al. 2006. Human NK cell education by inhibitory receptors for MHC class I. *Immunity* 25: 331–342.
- Béziat, V., J. A. Traherne, L. L. Liu, J. Jayaraman, M. Enqvist, S. Larsson, J. Trowsdale, and K.-J. Malmberg. 2013. Influence of KIR gene copy number on natural killer cell education. *Blood* 121: 4703–4707.
- Schönberg, K., M. Stribar, J. Enczmann, J. C. Fischer, and M. Uhrberg. 2011. Analyses of HLA-C-specific KIR repertoires in donors with group A and B haplotypes suggest a ligand-instructed model of NK cell receptor acquisition. *Blood* 117: 98–107.
- Andersson, S., C. Fauriat, J.-A. Malmberg, H.-G. Ljunggren, and K.-J. Malmberg. 2009. KIR acquisition probabilities are independent of self-HLA class I ligands and increase with cellular KIR expression. *Blood* 114: 95–104.
- Mandelboim, O., H. T. Reyburn, M. Valés-Gómez, L. Pazmany, M. Colonna, G. Borsellino, and J. L. Strominger. 1996. Protection from lysis by natural killer cells of group 1 and 2 specificity is mediated by residue 80 in human histocompatibility leukocyte antigen C alleles and also occurs with empty major histocompatibility complex molecules. *J. Exp. Med.* 184: 913–922.
- Moesta, A. K., P. J. Norman, M. Yawata, N. Yawata, M. Gleimer, and P. Parham. 2008. Synergistic polymorphism at two positions distal to the ligand-binding site makes KIR2DL2 a stronger receptor for HLA-C than KIR2DL3. *J. Immunol.* 180: 3969–3979.
- Winter, C. C., J. E. Gumperz, P. Parham, E. O. Long, and N. Wagtmann. 1998. Direct binding and functional transfer of NK cell inhibitory receptors reveal novel patterns of HLA-C allotype recognition. *J. Immunol.* 161: 571–577.
- Chewning, J. H., C. N. Gudme, K. C. Hsu, A. Selvakumar, and B. Dupont. 2007. KIR2DS1-positive NK cells mediate alloresponse against the C2 HLA-KIR ligand group in vitro. *J. Immunol.* 179: 854–868.
- Morvan, M., G. David, V. Sébille, A. Perrin, K. Gagne, C. Willem, N. Kerdudou, L. Denis, B. Clémenceau, G. Folléa, et al. 2008. Autologous and allogeneic HLA KIR ligand environments and activating KIR control KIR NK-cell functions. *Eur. J. Immunol.* 38: 3474–3486.
- VandenBussche, C. J., T. J. Mulrooney, W. R. Frazier, S. Dakshanamurthy, and C. K. Hurley. 2009. Dramatically reduced surface expression of NK cell receptor KIR2DS3 is attributed to multiple residues throughout the molecule. *Genes Immun.* 10: 162–173.

17. Gendzekhadze, K., P. J. Norman, L. Abi-Rached, T. Graef, A. K. Moesta, Z. Layrisse, and P. Parham. 2009. Co-evolution of KIR2DL3 with HLA-C in a human population retaining minimal essential diversity of KIR and HLA class I ligands. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 106: 18692–18697.
18. Morvan, M., C. Willem, K. Gagne, N. Kerdudou, G. David, V. Sébille, G. Folléa, J.-D. Bignon, and C. Retière. 2009. Phenotypic and functional analyses of KIR3DL1+ and KIR3DS1+ NK cell subsets demonstrate differential regulation by Bw4 molecules and induced KIR3DS1 expression on stimulated NK cells. *J. Immunol.* 182: 6727–6735.
19. Thompson, A., A. R. van der Slik, F. Koning, and J. van Bergen. 2006. An improved RT-PCR method for the detection of killer-cell immunoglobulin-like receptor (KIR) transcripts. *Immunogenetics* 58: 865–872.
20. David, G., M. Morvan, K. Gagne, N. Kerdudou, C. Willem, A. Devys, M. Bonneville, G. Folléa, J.-D. Bignon, and C. Retière. 2009. Discrimination between the main activating and inhibitory killer cell immunoglobulin-like receptor positive natural killer cell subsets using newly characterized monoclonal antibodies. *Immunology* 128: 172–184.
21. Middleton, D., A. Meenagh, and P. A. Gourraud. 2007. KIR haplotype content at the allele level in 77 Northern Irish families. *Immunogenetics* 59: 145–158.
22. Hilton, H. G., L. Vago, A. M. Older Aguilar, A. K. Moesta, T. Graef, L. Abi-Rached, P. J. Norman, L. A. Guethlein, K. Fleischhauer, and P. Parham. 2012. Mutation at positively selected positions in the binding site for HLA-C shows that KIR2DL1 is a more refined but less adaptable NK cell receptor than KIR2DL3. *J. Immunol.* 189: 1418–1430.
23. Boyington, J. C., A. G. Brooks, and P. D. Sun. 2001. Structure of killer cell immunoglobulin-like receptors and their recognition of the class I MHC molecules. *Immunol. Rev.* 181: 66–78.
24. Fischer, J. C., H. Ottinger, S. Ferencik, M. Sribar, M. Punzel, D. W. Beelen, M. A. Schwan, H. Grosse-Wilde, P. Wernet, and M. Uhrberg. 2007. Relevance of C1 and C2 epitopes for hemopoietic stem cell transplantation: role for sequential acquisition of HLA-C-specific inhibitory killer Ig-like receptor. *J. Immunol.* 178: 3918–3923.
25. Maenaka, K., T. Juji, D. I. Stuart, and E. Y. Jones. 1999. Crystal structure of the human p58 killer cell inhibitory receptor (KIR2DL3) specific for HLA-Cw3-related MHC class I. *Structure* 7: 391–398.
26. Maenaka, K., T. Juji, T. Nakayama, J. R. Wyer, G. F. Gao, T. Maenaka, N. R. Zaccari, A. Kikuchi, T. Yabe, K. Tokunaga, et al. 1999. Killer cell immunoglobulin receptors and T cell receptors bind peptide-major histocompatibility complex class I with distinct thermodynamic and kinetic properties. *J. Biol. Chem.* 274: 28329–28334.
27. Moesta, A. K., and P. Parham. 2012. Diverse functionality among human NK cell receptors for the C1 epitope of HLA-C: KIR2DS2, KIR2DL2, and KIR2DL3. *Front. Immunol.* 3: 336.
28. Pende, D., S. Marcenaro, M. Falco, S. Martini, M. E. Bernardo, D. Montagna, E. Romeo, C. Cognet, M. Martinetti, R. Maccario, et al. 2009. Anti-leukemia activity of alloreactive NK cells in KIR ligand-mismatched haploidentical HSC-T for pediatric patients: evaluation of the functional role of activating KIR and redefinition of inhibitory KIR specificity. *Blood* 113: 3119–3129.
29. Djaoud, Z., G. David, C. Bressollette, C. Willem, P. Rettman, K. Gagne, N. Legrand, S. Mehlal, A. Cesbron, B.-M. Imbert-Marcille, and C. Retière. 2013. Amplified NKG2C⁺ NK cells in cytomegalovirus (CMV) infection preferentially express killer cell Ig-like receptor 2DL: Functional impact in controlling CMV-infected dendritic cells. *J. Immunol.* 191: 2708–2716.
30. Saulquin, X., L. N. Gastinel, and E. Vivier. 2003. Crystal structure of the human natural killer cell activating receptor KIR2DS2 (CD158j). *J. Exp. Med.* 197: 933–938.
31. Hiby, S. E., J. J. Walker, K. M. O'shaughnessy, C. W. G. Redman, M. Carrington, J. Trowsdale, and A. Moffett. 2004. Combinations of maternal KIR and fetal HLA-C genes influence the risk of preeclampsia and reproductive success. *J. Exp. Med.* 200: 957–965.
32. Hiby, S. E., L. Regan, W. Lo, L. Farrell, M. Carrington, and A. Moffett. 2008. Association of maternal killer-cell immunoglobulin-like receptors and parental HLA-C genotypes with recurrent miscarriage. *Hum. Reprod.* 23: 972–976.
33. Khakoo, S. I., C. L. Thio, M. P. Martin, C. R. Brooks, X. Gao, J. Astemborski, J. Cheng, J. J. Goedert, D. Vlahov, M. Hilgartner, et al. 2004. HLA and NK cell inhibitory receptor genes in resolving hepatitis C virus infection. *Science* 305: 872–874.
34. Borhis, G., P. S. Ahmed, B. Mbiribindi, M. M. Naiyer, D. M. Davis, M. A. Purbhoo, and S. I. Khakoo. 2013. A peptide antagonist disrupts NK cell inhibitory synapse formation. *J. Immunol.* 190: 2924–2930.
35. Miller, J. S., and V. McCullar. 2001. Human natural killer cells with polyclonal lectin and immunoglobulinlike receptors develop from single hematopoietic stem cells with preferential expression of NKG2A and KIR2DL2/L3/S2. *Blood* 98: 705–713.
36. Yawata, M., N. Yawata, M. Draghi, A.-M. Little, F. Partheniou, and P. Parham. 2006. Roles for HLA and KIR polymorphisms in natural killer cell repertoire selection and modulation of effector function. *J. Exp. Med.* 203: 633–645.
37. Gagne, K., C. Willem, N. Legrand, Z. Djaoud, G. David, P. Rettman, C. Bressollette-Bodin, D. Senitzer, J. Esbelin, A. Cesbron-Gautier, et al. 2013. Both the nature of KIR3DL1 alleles and the KIR3DL1/S1 allele combination affect the KIR3DL1 NK-cell repertoire in the French population. *Eur. J. Immunol.* 43: 1085–1098.

Supplemental table I. Distribution of studied individuals (n=159) following KIR and HLA-C haplotypes

KIR GENES															KIR HAPLOTYPE			HLA-C HAPLOTYPE		
2DL1	2DL2	2DL3	2DL4	2DL5	3DL1	3DL2	3DL3	2DS1	2DS2	2DS3	2DS4	1D	2DS5	3DS1	AA (55)	AB (93)	BB (11)	C1C1 (61)	C1C2 (62)	C2C2 (36)
+	-	+	+	-	+	+	+	-	-	-	-	+	-	-	36			12	17	7
+	-	+	+	-	+	+	+	-	-	-	+	+	-	-	16			9	5	2
+	-	+	+	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	3			1	2	
+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	-	-		1		1		
+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+		11		4	3	4
+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+		1		1		
+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	+	+		1		1		
+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+		1		1		1
+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-	+	+		1		1		
+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-	+	+			1			1
+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+			1			1
-	+	-	+	-	+	+	+	-	+	-	-	+	-	-		1			1	
-	+	-	+	-	+	+	+	-	+	-	+	+	-	-		2			1	1
-	+	-	+	-	+	+	+	-	+	-	+	+	-	-		1		1		
-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+		1		1		
-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+		1			1	
+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+		1		1		
+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	-	-	+	+	-		1			1	1
+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+		1				1
+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-	+		2			1	1
+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	-		2		1	1	
+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-		1				1
+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+		3		1	1	1
+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+		1		1		
+	+	+	+	-	+	+	+	-	+	-	-	+	-	-		9		4		5
+	+	+	+	-	+	+	+	-	+	-	+	+	-	-		3		3		
+	+	+	+	-	+	+	+	-	+	-	+	-	-	-		4		2		
+	+	+	+	-	+	+	+	-	+	-	+	+	-	-		1			1	
+	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	+	-	-		1			1	
+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	-	-		1		4	2	2
+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	-	+		1		1		
+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-		1				1
+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	-		1		1		
+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	-		1			1	
+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	-		2		1	1	
+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-		1				1
+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+		1			1	
+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+		1				
+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+		1		1		
+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+		6		2	4	
+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+		2		1	1	
+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+		5		1	4	
+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+		6		3	3	
+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+		3		1	2	
+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+		1		1		
+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+			1			
+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+			6	2	4	
+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+			1	1		

Supplemental Table II. ANOVA test performed according to KIR haplotypes, KIR genes and HLA-C haplotypes of studied individuals

		% median (number)			p-value
		AA	AB	BB	
KIR2DL1 ⁺ KIR2DS1 ⁻ NK cells	C1C1	19.57 (21)	12.50 (27)		0.003
		21.64 (18)	13.31 (27)		8.6x10 ⁻⁵
	C1C2		13.31 (27)	7.14 (4)	0.03
		21.64 (18)		7.14 (4)	0.002
	C2C2	18.39 (16)	17 (19)		ns
		18.39 (16)	17 (19)	7.37 (5)	0.01
KIR2DL1 ⁻ KIR2DS1 ⁺ NK cells	C1C1		7.04 (16)		
	C1C2		8.04 (18)	20.11 (4)	1.2x10 ⁻⁵
	C2C2		8.73 (9)	14.66 (5)	0.03
KIR2DL1 ⁺ KIR2DS1 ⁻ NK cells		KIR2DS1 ⁻	KIR2DS1 ⁺		
	C1C1	19.2 (35)	9.58 (14)		0.002
	C1C2	20.27 (28)	10.39 (22)		0.0004
	C2C2	18.39 (16)	12.88 (14)		0.01
KIR2DL1/S1 ⁺ KIR2DL2/3/S2 ⁻ NK cells		KIR2DL3 ⁺	KIR2DL2/S2 ⁺	KIR2DL2/3/S2 ⁺	
		14.48 (26)	6.01 (5)		*ns
	C1C1		6.01 (5)	10.15 (25)	ns
		14.48 (26)		10.15 (25)	0.03
	C1C2	14.99 (25)	5.49 (5)		0.01
		14.99 (25)	5.49 (5)	12.80 (25)	ns
		14.99 (25)		12.80 (25)	ns
	C2C2	15.27 (14)	10.31 (5)		0.049
KIR2DL2/3/S2 ⁺ KIR2DL1/S1 ⁻ NK cells		15.27 (14)	10.31 (5)	13.06 (25)	ns
				13.06 (25)	ns
	C1C1	14.93 (26)	25.47 (6)		0.05
		14.93 (26)	25.47 (6)	20.63 (25)	ns
		14.93 (26)		20.63 (25)	0.01
	C1C2	16.3 (25)	37.39 (7)		0.001
		16.3 (25)	37.39 (7)	18.01 (25)	ns
		16.3 (25)		18.01 (25)	ns
KIR2DL2 ⁻ KIR2DL3/S2 ⁺ NK cells	C2C2	9.7 (14)	19.45 (5)		0.0006
		9.7 (14)	19.45 (5)	14.95 (25)	ns
		9.7 (14)		14.95 (25)	0.01
	C1C1	27.08 (30)	26.47 (3)		ns
		27.08 (30)	26.47 (3)	26.03 (25)	ns
		27.08 (30)		26.03 (25)	ns
KIR2DL2 ⁺ KIR2DL3/S2 ⁻ NK cells	C1C2	29.52 (27)	26.55 (5)		ns
		29.52 (27)	26.55 (5)	22.15 (27)	ns
		29.52 (27)		22.15 (27)	0.06
	C2C2	22.58 (16)	27.17 (5)		ns
		22.58 (16)	27.17 (5)	26.02 (14)	ns
		22.58 (16)		26.02 (14)	ns
KIR2DL2 ⁺ KIR2DL3/S2 ⁻ NK cells	C1C1		15.31 (2)	8.57 (25)	ns
	C1C2		14.02 (5)	7.79 (26)	ns
	C2C2		11.75 (5)	7.34 (14)	0.004

*ns : non significant

RESULTATS

PROJET N°3 : Etude de l'impact des protéines virales IE1 et pp65 sur la prolifération des sous-populations NK KIR⁺.

EBV-B lymphocytes stably expressing pp65 phosphoprotein inhibit KI2DL3⁺ NK cell proliferation

Zakia Djaoud, Gaëlle David, Catherine Willem, Pauline Rettman, Katia Gagne, Nolwenn Legrand, Anne Cesbron, Berthe-Marie Imbert-Marcille, Christelle Retière.

Projet en cours

Afin de s'affranchir des différents mécanismes d'échappement mis en place par le CMV pouvant biaiser l'interprétation des résultats d'une étude du rôle des cellules NK KIR⁺ dans l'infection à CMV, nous avons développé un modèle d'amplification cellulaire *in vitro* utilisant des lignées B-EBV (LeP et Col) transfectées de façon stable pour exprimer deux protéines immunodominantes du CMV, IE1 et pp65. Ce modèle mime l'amplification des cellules NK en greffe de CSH. Il est utilisé notamment pour évaluer l'impact de l'environnement HLA sur la prolifération des sous-populations NK KIR⁺ (Morvan et al. 2008 ; Morvan et al. 2009).

Les lignées B-EBV LeP et CoL ont été, respectivement, transfectées avec les plasmides pRC/CMV-IE1 et pRC/CMV-pp65 dans le cadre d'un précédent projet, ayant pour objectif l'étude du répertoire lymphocytaire T spécifique de ces deux protéines virales (Retière et al. 2000). L'approche expérimentale consiste donc à stimuler des PBMC avec les lymphocytes B-EBV, transfectés ou non avec les protéines virales, selon un rapport PBMC:B-EBV de 10:1. L'étude a été réalisée à partir de 10 individus dont les génotypes KIR et HLA sont connus. La prolifération des cellules NK et des différentes sous populations NK KIR⁺ a été ensuite évaluée par cytométrie en flux en utilisant différentes combinaisons d'anticorps permettant de discriminer les récepteurs KIR activateurs des inhibiteurs.

Ainsi, après deux semaines de culture, les cellules NK sont préférentiellement amplifiées dans toutes les conditions de stimulation (Morvan et al. 2008 ; Morvan et al. 2009). La protéine IE1 ne semble pas affecter la prolifération des cellules NK. En revanche, la protéine pp65 inhibe significativement la prolifération des cellules NK, en particulier celle des cellules NK KIR2DL3⁺.

Ces résultats préliminaires corroborent ceux observés dans le premier projet concernant la résistance des iDC C1C1, infectées par le CMV, aux cellules NK KIR2DL3⁺ (Djaoud et al. 2013). En effet, il semblerait que le CMV ait développé un moyen pour échapper à la reconnaissance par ces cellules.

La protéine pp65 présente une séquence d'adressage nucléaire et ne devrait donc pas permettre une interaction directe avec le récepteur KIR2DL3. Nous avons alors émis l'hypothèse d'une présentation d'un peptide, issu de la protéine pp65, sur les molécules HLA-Cw de la lignée CoL-pp65 (HLA-Cw4 (C1) et HLA-Cw7 (C2)) utilisée dans l'étude, augmentant ainsi l'affinité du KIR2DL3 pour ces molécules. Cette hypothèse est appuyée par des données bibliographiques montrant une modulation de l'interaction des récepteurs KIR avec les molécules HLA par des peptides viraux (Hansasuta et al. 2004 ; Stewart-Jones et al. 2005 ; Colantonio et al. 2011 ; Fadda et al. 2012). Pour la vérifier, nous avons refait des expériences d'amplification des cellules NK après stimulation avec la lignées CoL-pp65 et CoL chargée avec huit peptides pp65 différents qui ont une affinité pour les molécules HLA-Cw de cette lignée. Les lymphocytes B-EBV CoL-pp65 inhibent l'amplification des cellules NK KIR2DL3⁺ mais aucun peptide n'impacte leur prolifération. L'identification d'un potentiel peptide qui serait responsable du renforcement de l'interaction KIR2DL3:HLA-Cw est ainsi une tâche difficile, vu que les peptides sont définis sur un site de prédiction des peptides pouvant se fixer sur les molécules HLA (http://www.bimas.cit.nih.gov/molbio/hla_bind/) et que ceux qui ont le plus d'affinité pour les molécules HLA-Cw ne forment pas forcément les complexes HLA-C-peptide les mieux reconnus par les récepteurs KIR. En effet, il semblerait que la reconnaissance du complexe HLA-C-peptide par les récepteurs KIR soit dépendante des acides aminés en position 7 et 8 (Stewart et al. 2005 ; Hansasuta et al. 2004 ; Fadda et al. 2012) qui sont le plus souvent une sérine ou une alanine (Boyington et al. 2000).

Afin de compléter cette étude, plusieurs lignées B-EBV homozygotes, de typages HLA-C différents (C1 ou C2), ont été transfectées de façon stable pour exprimer la protéine pp65. Des cellules B221 exprimant pp65 seront intégrées à l'étude pour déterminer si la protéine interagit directement avec le KIR2DL3 ou si l'interaction nécessite une présentation peptidique sur les molécules HLA-Cw. Des tests fonctionnels, comme la dégranulation ou la production d'IFN- γ , seront réalisés pour évaluer l'impact de la protéine pp65 sur les fonctions des cellules NK KIR2DL3⁺ dans différents contextes HLA-Cw ou en l'absence de molécules HLA-Cw. Par ailleurs, la possible inhibition des cellules NK NKp30⁺ via pp65 (Tal

I Arnon et al. 2005a) sera évaluée en bloquant l'interaction ou en ciblant la population NK KIR2DL3⁺ NKp30⁻.

Bien que ce travail ne soit pas encore terminé, il nous permet d'investiguer un champ particulier, en l'occurrence l'échappement du CMV via la protéine pp65, dans le cadre de l'étude du rôle des cellules NK KIR⁺ dans le contrôle de l'infection à CMV.

**EBV-B lymphocytes stably expressing pp65 phosphoprotein inhibit
K12DL3⁺ NK cell proliferation**

Zakia Djaoud¹, Gaëlle David¹, Catherine Willem¹, Pauline Rettman¹, Souad Mehla¹,
Katia Gagne¹, Nolwenn Legrand¹, Anne Cesbron^{1,3}, Berthe-Marie Imbert-Marcille²,
Christelle Retière¹.

Institutional affiliations:

¹Etablissement Français du Sang, EA4271, Nantes; ²Université de Nantes,
EA4271, Nantes; ³HLA laboratory, EFS, Nantes, France.

Corresponding author: Dr Christelle RETIERE, Etablissement Français du Sang-Pays
de la Loire, EA4271 “Immunovirologie et Polymorphisme Génétique”, 34 boulevard
Jean Monnet, 44011 Nantes cedex 01, France. Email: christelle.retiere@efs.sante.fr ;
Tel: 33-2-40-12-33-00; Fax: 33-2-40-12-33-33.

Abstract:

Natural killer (NK) cells provide a central defense against viral pathogens. In human, the response to CMV infection involves the expansion of specific NK cell subsets with a mature phenotype characterized by an increase of NKG2C⁺ KIR⁺ NK cells. However, CMV devotes many genes to evade the NK cell mediated immune pressure. In this study, we tested the impact of IE1 and pp65, two immunodominant proteins, using EBV-B cell lines stably expressing these CMV proteins on the proliferation of main KIR NK cell subsets. We showed that IE1 had no impact on KIR NK cell proliferation. However, pp65 significantly limits NK cell proliferation, and drastically KIR2DL3⁺ NK cell subset proliferation. Because the intracellular expression of pp65 in transfected EBV-B cells does not allow a direct interaction of the protein with KIR2DL3, we suggest that the KIR2DL3:HLA-Cw interaction should be reinforced by a pp65 peptide, even we did not demonstrate the impact of few pp65 peptides presenting a high affinity to HLA-Cw molecules on KIR2DL3⁺ NK cell proliferation.

Introduction

NK cells play a key role in the first line immune response to viral infections with the ability to directly kill infected cells, without prior sensitization, produce cytokine and cross-talk with adaptive immune system (1, 2). NK cell activation is controlled by a balance between activating and inhibitory signals mediated by a number of surface receptors, including activating and inhibitory killer cell immunoglobulin-like receptors (KIR) that interact with human leukocyte antigen (HLA) class I molecules expressed on target cells (3). Thanks to the inhibitory KIR, NK cells are able to detect the loss of HLA class I molecules from autologous cells, a situation that can occur when cells are perturbed by viral infection or tumor transformation (the “missing self” hypothesis) (4).

Specificity of inhibitory KIR2D for HLA-C allotypes is dictated by the presence or absence of asparagine (C1 group) or lysine (C2 group) at position 80 of the HLA-C molecule. Indeed, KIR2DL1 recognizes HLA-C molecules belonging to C2 group whereas KIR2DL2 and KIR2DL3 recognize HLA-C molecules belonging to C1 group (5). However, recent studies indicate that this division of specificity is not necessarily strict (6–9). Activating KIR have been associated with viral disease outcome (10–12), especially that of CMV infection or reactivation in graft contexts (13–15). However, the contribution of inhibitory KIR in controlling CMV infection is still not well understood.

In previous study, we have reported the crucial role of KIR2DL on NK cell degranulation against CMV infected immature dendritic cells (iDC). Otherwise, we have shown that KIR2DL3⁺ NK cell degranulation was not increased in contact to CMV-infected C1C1 iDC (16). We, thus, hypothesized a potential evasion of CMV to KIR2DL3⁺ NK cell control in our experimental conditions.

To check this hypothesis, we have developed in the current study an *in vitro* model, using EBV-B lymphocytes stably expressing IE1 (Immediate Early I) and pp65, to explore the impact of these two major CMV proteins, on KIR NK cell proliferation. Arnon et al. have shown the role of pp65 on NK cell killing inhibition via a direct interaction with NKp30 (17). However, until today, little is known about the role of these CMV proteins in NK cell immune response in general and KIR NK cell reactivity in particular.

Materials and Methods

Cells

PBMC were isolated from citrate-phosphate-dextrose blood from healthy adult volunteers by gradient centrifugation on Ficoll-Hypaque (Lymphoprep, Axis-Shield, PoC AS, Oslo, Norway). All blood donors were recruited at the Blood Transfusion Center (Etablissement Français du Sang, Nantes, France) and informed consent was obtained from all individuals. hCMV serological status was determined using the chemiluminescent immunoassay LIAISON® CMV IgG II (DiaSorin). B lymphoblastoid cells were derived by EBV transformation from PBMC and stably transfected with plasmidic vectors (pRC/CMV) coding either pp65 or IE1 proteins (18). Mycoplasma tests performed by PCR were negative for all cell lines.

In vitro model of NK-cell expansion

Amplification of NK cells was evaluated using an *in vitro* model based on a protocol described by Clémenceau et al. (19) and adapted in our laboratory to investigate the proliferation of KIR NK cell subsets (20). Two millions of PBMC were cultured in 24-well flat-bottomed plates with irradiated allogeneic EBV-B-cell lines at a ratio (PBMC:EBV-B cells) of 10:1. Cells were grown in Cellgro SCGM serum-free medium containing 10% human AB serum, 50 U/mL penicillin, 50 µg/mL streptomycin and 200 IU/mL IL-2 (Chiron, Suresnes, France). The culture medium was replaced weekly with new Cellgro medium containing fresh IL-2. Cell phenotyping was performed for all conditions of stimulation at days 0, 6, 10 and 15.

Synthetic peptides

pp65 peptide sequences with HLA-Cw4 and HLA-Cw7 binding motif were identified and characterized using the BIMAS “HLA Peptide Binding Predictions” program (Table II) and then were purchased from GeneCust. Their identity purity was greater than 95%.

Binding of pp65 peptides to HLA-Cw molecules

Briefly, individual pp65 peptides were added, at a final concentration of 1 µg/ml, to EBV-B CoL cell line (1×10^6 cells/ml). After 1h of co-incubation at 37°C in 500 µl RPMI 1640, cells were washed, irradiated and co-cultured with PBMC at a ratio (PBMC:EBV-B cells) of 10:1. The binding assay has been previously validated by the study of HLA-A2-pp65 specific T lymphocytes degranulation against pp65 loaded HLA-A2⁺ iDC (16)

HLA and KIR genotyping

HLA allele assignment and KIR gene content typing were performed as previously described (20, 21).

Phenotypic analysis by flow cytometry

The NK cell surface phenotype was determined by four-color flow cytometry using the following mouse anti-human mAbs : anti-KIR2DL1-FITC (143211, R&D Systems), anti-KIR2DL1/2DS1-PE (EB6, Beckman Coulter), anti-KIR2DL2/L3/2DS2-PE (GL183, Beckman Coulter), anti-KIR3DL1/3DS1-PE (Z27, Beckman Coulter), anti-CD56-APC (B159, BD Biosciences), anti-CD3-PerCP (SK7, BD Biosciences), anti-KIR2DL3/2DS2 (1F12), anti-KIR2DL1/2/3/2DS1/2-FITC (1A6), anti-KIR2DL2/L3/2DS2-FITC (4A8) and anti-KIR2DL1/L2/L3/2DS2-FITC (8C11), generated and characterized in our laboratory and previously described (22). The EBV-B cell surface expression of HLA class I molecules was determined by one-color flow cytometry using anti-HLA-A,-B,-C -AF⁶⁴⁷ (F41-IE3H1D2, EFS). All flow cytometry data were collected using a FACSCalibur (BD Biosciences) and analyzed using FlowJo 7.6 software (TreeStar).

Statistical analyses

Comparisons of NK cell frequencies between two different series of individuals were performed using the one-way analysis of variance (ANOVA) test. *p*-values <0.05 were considered to be statistically significant.

Results and Discussion

EBV-B cells expressing stably CMV-pp65 but not IE1 protein inhibit NK cell proliferation

In attempt to evaluate the impact of pp65 and IE1, two CMV major proteins, on NK cell proliferation, we studied NK cell amplification by stimulating PBMC with four irradiated allogeneic EBV-B cell lines: LeP (HLA-A*02, A*25, HLA-B*18, B*44, (Bw6Bw4), HLA-C*05,C*12 (C2C1)), CoL (HLA-A*01, A*01, HLA-B*08, B*35 (Bw6Bw6), HLA-C*04,C*07 (C2C1)), and the same cell lines, LeP-IE1 and CoL-pp65, stably transfected with plasmidic vectors coding IE1 and pp65 proteins, respectively.

Intracellular expression of pp65 and IE1 recombinant proteins by EBV-B cell lines was checked by flow cytometry (18). The EBV-B cell surface expression level of HLA class I molecules was similar between the transfected and untransfected cell lines (data not shown). The frequency of NK (CD3⁻CD56⁺) cells was determined by flow cytometry at day 0 (Figure 1A), 6, 10 (data not shown) and 15 (Figure 1A), following stimulation with each EBV-B cell line (LeP, LeP-IE1, CoL and CoL-pp65). Experiments were carried out using PBMC from 10 (d1-d10) healthy individuals for whom the HLA and KIR genotypes are presented in Table I.

LeP and CoL cell lines similarly stimulated NK cell proliferation. After 2 weeks of culture, the majority of the amplified cells were CD3⁻CD56⁺ NK cells (Figure 1A), as previously described (20). IE1 protein did not affect NK cell proliferation (Figure 1A-B). However, pp65 significantly limited the percentage ($p=0,003$) and absolute number ($p=0,006$) of amplified NK cells (Figure 1A-B). Nevertheless, pp65 inhibited partially the NK cell amplification (Figure 1A-C).

Inhibition of KIR2DL3⁺ NK cell proliferation after stimulation with pp65-transfected EBV-B cell line

Using combination of KIR specific antibodies (23), we investigated the frequency of different KIR2D NK cell subsets expressing only either KIR2DL1, KIR2DS1, KIR2DL2, KIR2DS2/L3 or KIR3DS1 as described in Figure 1A. In our cellular model of NK cell amplification, IE1 did not impact the frequency of all

studied KIR NK cell subsets following a similar profile for all studied individuals (Figure 2A). In contrast, pp65 inhibited significantly the frequency of KIR2DL3/S2⁺ KIR2DL2⁻ (1F12⁺ GL183⁺) NK cell subset from all individuals ($p=0.04$) but did not impact the frequency of the other studied KIR2D NK cell subsets (Figure 2B-C). Because three of all ten studied individuals (D8, D9 and D10) were KIR2DL2/S2⁻ genotyped (Table I), we deduce that pp65 impacts the proliferation of KIR2DL3⁺ NK cells. These results have been confirmed ($p=0.004$) from supplemental KIR2DS2⁻ genotyped individuals (Figure 2B).

The intracellular expression of pp65 suggests that pp65 does not interact directly with KIR2DL3 in the immune synapse. Previously, it has been reported that KIR-HLA interaction is highly peptide specific (24–30) and it can be modulated by viral peptides (31–33). We thus hypothesized that HLA-Cw molecules of EBV-B CoL cell line used in the study, namely HLA-Cw4 (C2) and/or HLA-Cw7 (C1), presented a pp65 peptide that allowed a stronger recognition by KIR2DL3 and, therefore, an inhibition of KIR2DL3⁺ NK cell proliferation. To check this hypothesis, we selected five pp65 peptides that have affinity for HLA-Cw4 and three peptides that have affinity for HLA-Cw7 molecules using the BIMAS “HLA Peptide Binding Predictions” program (Table II). Thus, we have evaluated the frequency of KIR2DL3⁺ NK cell subset after PBMC stimulation using pp65 peptides with CoL and CoL-pp65 EBV-B cell lines (Table II). Experiments were carried out using PBMC from KIR2DS2⁻ genotyped individuals (D8, D9, D10). CoL-pp65 cell line inhibited, as previously observed, the frequency of KIR2DL3⁺ NK cell subset compared to CoL cell line. However, none of the selected pp65 peptides impacted the frequency of KIR2DL3⁺ NK cell subset (Figure 3A-B).

Concluding remarks

Recent reports have shown the expansion of NKG2C⁺ NK cells expressing self-specific inhibitory KIR in CMV infection (34–36). In previous study, we have reported that KIR2DL3 is preferentially co-expressed with NKG2C on these amplified NK cells in CMV seropositive individuals. Moreover, KIR2DL3⁺ NK cells were not activated by CMV-infected C1C1 iDC (16). We then suggested that CMV might have developed a strategy to escape to KIR2DL3⁺ NK cell mediated immune

pressure. To clarify this point, we have set up, in the current study, this *in vitro* model to highlight the impact of IE1 and pp65 on KIR NK cell proliferation. Although IE1 protein does not appear to have an effect on the proliferation of KIR NK cell subsets in our experimental conditions, pp65 inhibits accurately KIR2DL3⁺ NK cell proliferation. CoL-pp65 cell line also inhibited KIR3DS1⁺ NK cell proliferation in some individuals (D1, D2, D6 and D9), but this has not been observed in all studied ones.

The intracellular expression of pp65 in transfected EBV-B cell line does not allow a direct contact of the protein with KIR2DL3. Therefore, the only way of interaction with KIR2DL3 seems to be via a pp65 peptide presentation on HLA-Cw molecules. This hypothesis has been supported by the recent studies showing that KIR:HLA interactions can be modulated by viral peptides (31–33). It is now known that KIR2DL3 is capable to interact with some HLA-Cw molecules belonging to C1 and C2 groups (submitted manuscript, 13-01580-FLR). Thus, because the EBV-B CoL cell line used in the study is HLA-C*04,C*07 (C2C1), we have tested the effect of eight pp65 peptides, that have high affinities for these HLA-Cw molecules, on KIR2DL3⁺ NK cell expansion. Despite the fact that these studied peptides have no impact on NK cell proliferation, it is conceivable that another pp65 peptide that we have not been able to identify can bind an HLA-C molecule and be more recognized by the KIR2DL3 receptor. In fact, it has already been reported that the amino acids in position 7 and 8 can modulate binding to KIR (28, 31, 33) and the small ones like alanine and serine at the position 8 bound well to the receptor (37). Thus, a screening of the complete protein should be necessary to eliminate this hypothesis.

KIR2DL3 receptor, which is predominantly represented in KIR2D repertoire and has broader specificities to HLA-Cw molecules (submitted manuscript, 13-01580-FLR), seems to have a pivotal role in controlling viral infections. Indeed, Khakoo and colleagues showed that genes encoding the inhibitory NK cell receptor KIR2DL3 and its HLA-C1 ligands directly influence resolution of hepatitis C virus infection. Thus, it is conceivable that in CMV infection, CMV has developed a strategy, probably via pp65, to escape to the immune pressure mediated by KIR2DL3⁺ NK cells.

Bibliography

1. Biron, C. A., K. B. Nguyen, G. C. Pien, L. P. Cousens, and T. P. Salazar-Mather. 1999. Natural killer cells in antiviral defense: function and regulation by innate cytokines. *Annu. Rev. Immunol.* 17: 189–220.
2. Cooper, M. A., T. A. Fehniger, and M. A. Caligiuri. 2001. The biology of human natural killer-cell subsets. *Trends Immunol.* 22: 633–640.
3. Jamil, K. M., and S. I. Khakoo. 2011. KIR/HLA interactions and pathogen immunity. *J. Biomed. Biotechnol.* 2011: 298348.
4. Kärre, K. 2008. Natural killer cell recognition of missing self. *Nat. Immunol.* 9: 477–480.
5. Moretta, A., M. Vitale, C. Bottino, A. M. Orengo, L. Morelli, R. Augugliaro, M. Barbaresi, E. Ciccone, and L. Moretta. 1993. P58 molecules as putative receptors for major histocompatibility complex (MHC) class I molecules in human natural killer (NK) cells. Anti-p58 antibodies reconstitute lysis of MHC class I-protected cells in NK clones displaying different specificities. *J. Exp. Med.* 178: 597–604.
6. Moesta, A. K., P. J. Norman, M. Yawata, N. Yawata, M. Gleimer, and P. Parham. 2008. Synergistic polymorphism at two positions distal to the ligand-binding site makes KIR2DL2 a stronger receptor for HLA-C than KIR2DL3. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 180: 3969–3979.
7. Winter, C. C., J. E. Gumperz, P. Parham, E. O. Long, and N. Wagtmann. 1998. Direct binding and functional transfer of NK cell inhibitory receptors reveal novel patterns of HLA-C allotype recognition. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 161: 571–577.
8. Hilton, H. G., L. Vago, A. M. Older Aguilar, A. K. Moesta, T. Graef, L. Abi-Rached, P. J. Norman, L. A. Guethlein, K. Fleischhauer, and P. Parham. 2012. Mutation at positively selected positions in the binding site for HLA-C shows that KIR2DL1 is a more refined but less adaptable NK cell receptor than KIR2DL3. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 189: 1418–1430.
9. Moesta, A. K., and P. Parham. 2012. Diverse functionality among human NK cell receptors for the C1 epitope of HLA-C: KIR2DS2, KIR2DL2, and KIR2DL3. *Front. Immunol.* 3: 336.
10. Martin, M. P., X. Gao, J.-H. Lee, G. W. Nelson, R. Detels, J. J. Goedert, S. Buchbinder, K. Hoots, D. Vlahov, J. Trowsdale, M. Wilson, S. J. O'Brien, and M. Carrington. 2002. Epistatic interaction between KIR3DS1 and HLA-B delays the progression to AIDS. *Nat. Genet.* 31: 429–434.
11. Martin, M. P., G. Nelson, J.-H. Lee, F. Pellett, X. Gao, J. Wade, M. J. Wilson, J. Trowsdale, D. Gladman, and M. Carrington. 2002. Cutting edge: susceptibility to psoriatic arthritis: influence of activating killer Ig-like receptor genes in the absence of specific HLA-C alleles. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 169: 2818–2822.
12. Khakoo, S. I., C. L. Thio, M. P. Martin, C. R. Brooks, X. Gao, J. Astemborski, J. Cheng, J. J. Goedert, D. Vlahov, M. Hilgartner, S. Cox, A.-M. Little, G. J. Alexander, M. E. Cramp, S. J. O'Brien, W. M. C. Rosenberg, D. L. Thomas, and M. Carrington. 2004. HLA and NK cell inhibitory receptor genes in resolving hepatitis C virus infection. *Science* 305: 872–874.
13. Cook, M., D. Briggs, C. Craddock, P. Mahendra, D. Milligan, C. Fegan, P. Darbyshire, S. Lawson, E. Boxall, and P. Moss. 2006. Donor KIR genotype has a major influence on the rate of cytomegalovirus reactivation following T-cell replete stem cell transplantation. *Blood* 107: 1230–1232.
14. Chen, C., M. Busson, V. Rocha, M.-L. Appert, V. Lepage, N. Dulphy, P. Haas, G. Socié, A. Toubert, D. Charron, and P. Loiseau. 2006. Activating KIR genes are associated with

CMV reactivation and survival after non-T-cell depleted HLA-identical sibling bone marrow transplantation for malignant disorders. *Bone Marrow Transplant.* 38: 437–444.

15. Stern, M., H. Elsässer, G. Hönger, J. Steiger, S. Schaub, and C. Hess. 2008. The number of activating KIR genes inversely correlates with the rate of CMV infection/reactivation in kidney transplant recipients. *Am. J. Transplant. Off. J. Am. Soc. Transplant. Am. Soc. Transpl. Surg.* 8: 1312–1317.

16. Djaoud, Z., G. David, C. Bressollette, C. Willem, P. Rettman, K. Gagne, N. Legrand, S. Mehlal, A. Cesbron, B.-M. Imbert-Marcille, and C. Retière. 2013. Amplified NKG2C+ NK Cells in Cytomegalovirus (CMV) Infection Preferentially Express Killer Cell Ig-like Receptor 2DL: Functional Impact in Controlling CMV-Infected Dendritic Cells. *J. Immunol. Baltim. Md 1950*.

17. Arnon, T. I., H. Achdout, O. Levi, G. Markel, N. Saleh, G. Katz, R. Gazit, T. Gonen-Gross, J. Hanna, E. Nahari, A. Porgador, A. Honigman, B. Plachter, D. Mevorach, D. G. Wolf, and O. Mandelboim. 2005. Inhibition of the NKp30 activating receptor by pp65 of human cytomegalovirus. *Nat. Immunol.* 6: 515–523.

18. Retière, C., V. Prod'homme, B. M. Imbert-Marcille, M. Bonneville, H. Vié, and M. M. Hallet. 2000. Generation of cytomegalovirus-specific human T-lymphocyte clones by using autologous B-lymphoblastoid cells with stable expression of pp65 or IE1 proteins: a tool to study the fine specificity of the antiviral response. *J. Virol.* 74: 3948–3952.

19. Clémenceau, B., G. Gallot, R. Vivien, J. Gaschet, M. Campone, and H. Vié. 2006. Long-term preservation of antibody-dependent cellular cytotoxicity (ADCC) of natural killer cells amplified in vitro from the peripheral blood of breast cancer patients after chemotherapy. *J. Immunother. Hagerstown Md 1997* 29: 53–60.

20. Morvan, M., G. David, V. Sébille, A. Perrin, K. Gagne, C. Willem, N. Kerdudou, L. Denis, B. Clémenceau, G. Folléa, J.-D. Bignon, and C. Retière. 2008. Autologous and allogeneic HLA KIR ligand environments and activating KIR control KIR NK-cell functions. *Eur. J. Immunol.* 38: 3474–3486.

21. Morvan, M., C. Willem, K. Gagne, N. Kerdudou, G. David, V. Sébille, G. Folléa, J.-D. Bignon, and C. Retière. 2009. Phenotypic and functional analyses of KIR3DL1+ and KIR3DS1+ NK cell subsets demonstrate differential regulation by Bw4 molecules and induced KIR3DS1 expression on stimulated NK cells. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 182: 6727–6735.

22. David, G., M. Morvan, K. Gagne, N. Kerdudou, C. Willem, A. Devys, M. Bonneville, G. Folléa, J.-D. Bignon, and C. Retière. 2009. Discrimination between the main activating and inhibitory killer cell immunoglobulin-like receptor positive natural killer cell subsets using newly characterized monoclonal antibodies. *Immunology* 128: 172–184.

23. David, G., M. Morvan, K. Gagne, N. Kerdudou, C. Willem, A. Devys, M. Bonneville, G. Folléa, J.-D. Bignon, and C. Retière. 2009. Discrimination between the main activating and inhibitory killer cell immunoglobulin-like receptor positive natural killer cell subsets using newly characterized monoclonal antibodies. *Immunology* 128: 172–184.

24. Malnati, M. S., M. Peruzzi, K. C. Parker, W. E. Biddison, E. Ciccone, A. Moretta, and E. O. Long. 1995. Peptide specificity in the recognition of MHC class I by natural killer cell clones. *Science* 267: 1016–1018.

25. Zappacosta, F., F. Borrego, A. G. Brooks, K. C. Parker, and J. E. Coligan. 1997. Peptides isolated from HLA-Cw*0304 confer different degrees of protection from natural killer cell-mediated lysis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 94: 6313–6318.

26. Rajagopalan, S., and E. O. Long. 1997. The direct binding of a p58 killer cell inhibitory receptor to human histocompatibility leukocyte antigen (HLA)-Cw4 exhibits peptide selectivity. *J. Exp. Med.* 185: 1523–1528.
27. Maenaka, K., T. Juji, T. Nakayama, J. R. Wyer, G. F. Gao, T. Maenaka, N. R. Zaccari, A. Kikuchi, T. Yabe, K. Tokunaga, K. Tadokoro, D. I. Stuart, E. Y. Jones, and P. A. van der Merwe. 1999. Killer cell immunoglobulin receptors and T cell receptors bind peptide-major histocompatibility complex class I with distinct thermodynamic and kinetic properties. *J. Biol. Chem.* 274: 28329–28334.
28. Stewart, C. A., F. Laugier-Anfossi, F. Vély, X. Saulquin, J. Riedmuller, A. Tisserant, L. Gauthier, F. Romagné, G. Ferracci, F. A. Arosa, A. Moretta, P. D. Sun, S. Ugolini, and E. Vivier. 2005. Recognition of peptide-MHC class I complexes by activating killer immunoglobulin-like receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 102: 13224–13229.
29. Thananchai, H., G. Gillespie, M. P. Martin, A. Bashirova, N. Yawata, M. Yawata, P. Easterbrook, D. W. McVicar, K. Maenaka, P. Parham, M. Carrington, T. Dong, and S. Rowland-Jones. 2007. Cutting Edge: Allele-specific and peptide-dependent interactions between KIR3DL1 and HLA-A and HLA-B. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 178: 33–37.
30. Fadda, L., G. Borhis, P. Ahmed, K. Cheent, S. V. Pagon, A. Cazaly, S. Stathopoulos, D. Middleton, A. Mulder, F. H. J. Claas, T. Elliott, D. M. Davis, M. A. Purbhoo, and S. I. Khakoo. 2010. Peptide antagonism as a mechanism for NK cell activation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 107: 10160–10165.
31. Hansasuta, P., T. Dong, H. Thananchai, M. Weekes, C. Willberg, H. Aldemir, S. Rowland-Jones, and V. M. Braud. 2004. Recognition of HLA-A3 and HLA-A11 by KIR3DL2 is peptide-specific. *Eur. J. Immunol.* 34: 1673–1679.
32. Colantonio, A. D., B. N. Bimber, W. J. Neidermyer Jr, R. K. Reeves, G. Alter, M. Altfeld, R. P. Johnson, M. Carrington, D. H. O'Connor, and D. T. Evans. 2011. KIR polymorphisms modulate peptide-dependent binding to an MHC class I ligand with a Bw6 motif. *PLoS Pathog.* 7: e1001316.
33. Fadda, L., C. Körner, S. Kumar, N. H. van Teijlingen, A. Piechocka-Trocha, M. Carrington, and M. Altfeld. 2012. HLA-Cw*0102-restricted HIV-1 p24 epitope variants can modulate the binding of the inhibitory KIR2DL2 receptor and primary NK cell function. *PLoS Pathog.* 8: e1002805.
34. Gumá, M., A. Angulo, C. Vilches, N. Gómez-Lozano, N. Malats, and M. López-Botet. 2004. Imprint of human cytomegalovirus infection on the NK cell receptor repertoire. *Blood* 104: 3664–3671.
35. Foley, B., S. Cooley, M. R. Verneris, M. Pitt, J. Curtsinger, X. Luo, S. Lopez-Vergès, L. L. Lanier, D. Weisdorf, and J. S. Miller. 2012. Cytomegalovirus reactivation after allogeneic transplantation promotes a lasting increase in educated NKG2C+ natural killer cells with potent function. *Blood* 119: 2665–2674.
36. Béziat, V., L. L. Liu, J.-A. Malmberg, M. A. Ivarsson, E. Sohlberg, A. T. Björklund, C. Retière, E. Sverremark-Ekström, J. Traherne, P. Ljungman, M. Schaffer, D. A. Price, J. Trowsdale, J. Michaëlsson, H.-G. Ljunggren, and K.-J. Malmberg. 2013. NK cell responses to cytomegalovirus infection lead to stable imprints in the human KIR repertoire and involve activating KIRs. *Blood* 121: 2678–2688.
37. Boyington, J. C., S. A. Motyka, P. Schuck, A. G. Brooks, and P. D. Sun. 2000. Crystal structure of an NK cell immunoglobulin-like receptor in complex with its class I MHC ligand. *Nature* 405: 537–543.

Figure Legends

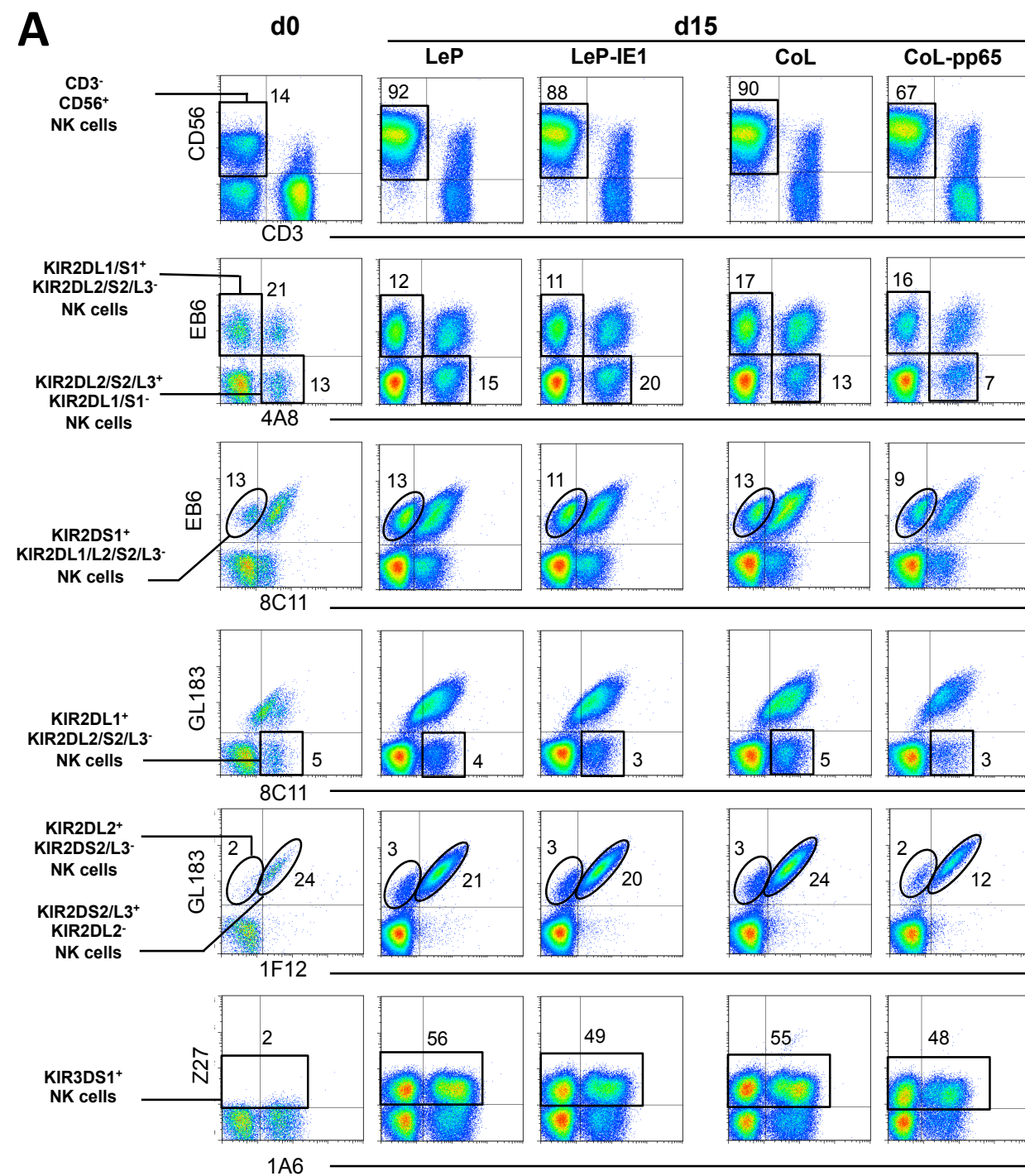
FIGURE 1 : CoL-pp65 cell line inhibits NK cell proliferation. (A) Representative density plots, from ten experiments performed, illustrating KIR NK cell phenotype after two weeks of PBMC stimulation with LeP, LeP-IE1, CoL and CoLpp65 cell lines, at a ratio (PBMC:EBV-B cells) of 10:1. (B) Dot representation displaying the percentages of CD3⁻CD56⁺ NK cells from ten individuals after two weeks of PBMC stimulation with LeP, LeP-IE1, CoL and CoLpp65 cell lines, at a ratio (PBMC:EBV-B cells) of 10:1. (C) Bars indicate the mean of the absolute cell number ($\pm$ SD) at day 15 (N=5) after PBMC stimulation with CoL and CoLpp65 cell lines, at a ratio (PBMC:EBV-B cells) of 10:1. Statistical significance (** $p < 0.01$) between both groups was determined using the one-way analysis of variance (ANOVA) test.

FIGURE 2 : Inhibition of KIR2DL3/2DS2⁺ NK cell proliferation after stimulation with pp65-transfected EBV-B cell line. (A-B) Histograms indicating the rate of KIR NK cell proliferation at day 15 after PBMC stimulation with LeP or CoL cell lines subtracted to the rate of KIR NK cell proliferation after PBMC stimulation with LeP-IE1 or CoL-pp65 cell lines, respectively (KIR2DL1 (N=10); KIR2DS1 (N=10); KIR2DL2 (N=8); KIR2DL3/2DS2 (N=10); KIR3DS1 (N=9)). (C) Density plot illustrating the KIR2DL3/2DS2⁺ NK cell phenotype, assessed by flow cytometry using a combination of KIR2DL3/2DS2 specific mAb (1F12) and KIR2DL2/L3/2DS2 specific mAb (GL183). The dot representation displays the percentages of KIR2DL3/2DS2⁺ NK cells from ten individuals (D1-D10) and five supplemental experiments done with the same individuals, including the KIR2DS2⁻ genotyped ones, after two weeks of PBMC stimulation with CoL and CoLpp65 cell lines, at a ratio (PBMC:EBV-B cells) of 10:1. Statistical significance (** $p = 0.004$) between both groups was determined using the one-way analysis of variance (ANOVA) test.

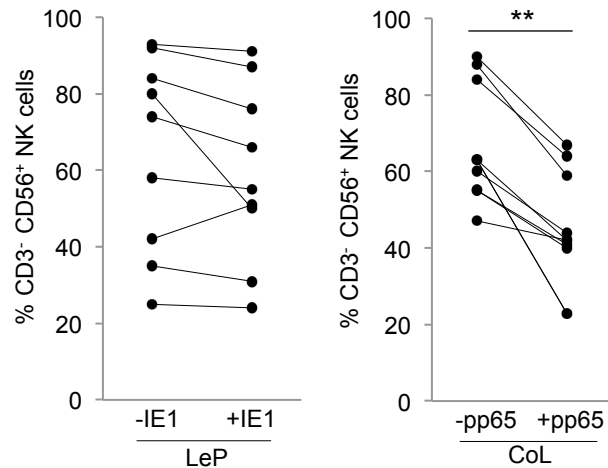
FIGURE 3: Evaluation of the impact of synthetic pp65 peptides on KIR2DL3⁺ NK cell proliferation (A) Representative density plots illustrating KIR2DL3⁺ NK cell phenotype, assessed by flow cytometry using a combination of KIR2DL3/2DS2 specific mAb (1F12) and KIR2DL2/L3/2DS2 specific mAb (GL183), after two weeks of PBMC stimulation with the following EBV-B cell lines, at a ratio (PBMC:EBV-B cells) of 10:1: CoL, CoLpp65, CoL loaded with P1, P2, P3, P4, P5, P6, P7 or P8

(table II). (B) Lines indicate the percentages of KIR2DL3⁺ NK cells for three experiments performed with PBMC from KIR2DS2⁻ genotyped individuals (D8, D9 and D10), after two weeks of stimulation with the EBV-B cell lines named above.

Figure 1



B



C

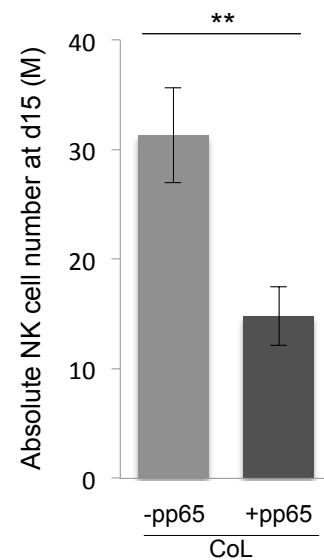
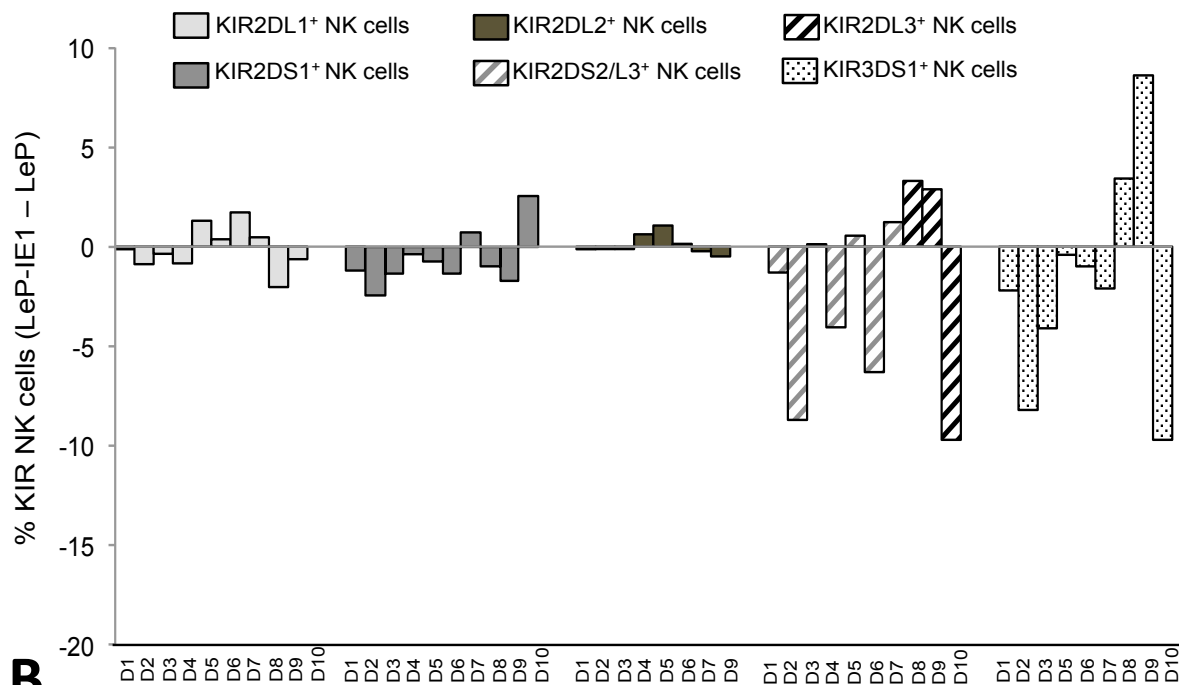
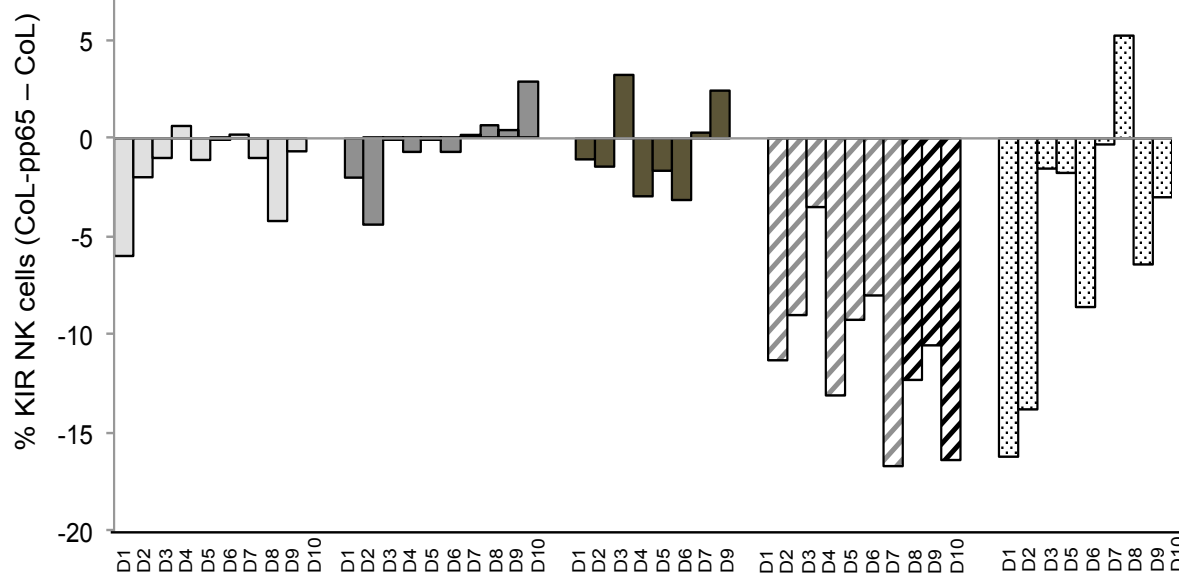


Figure 2

A



B



C

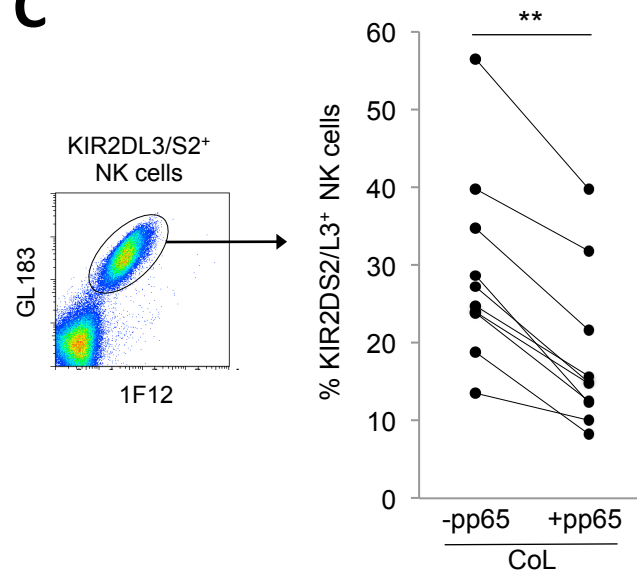
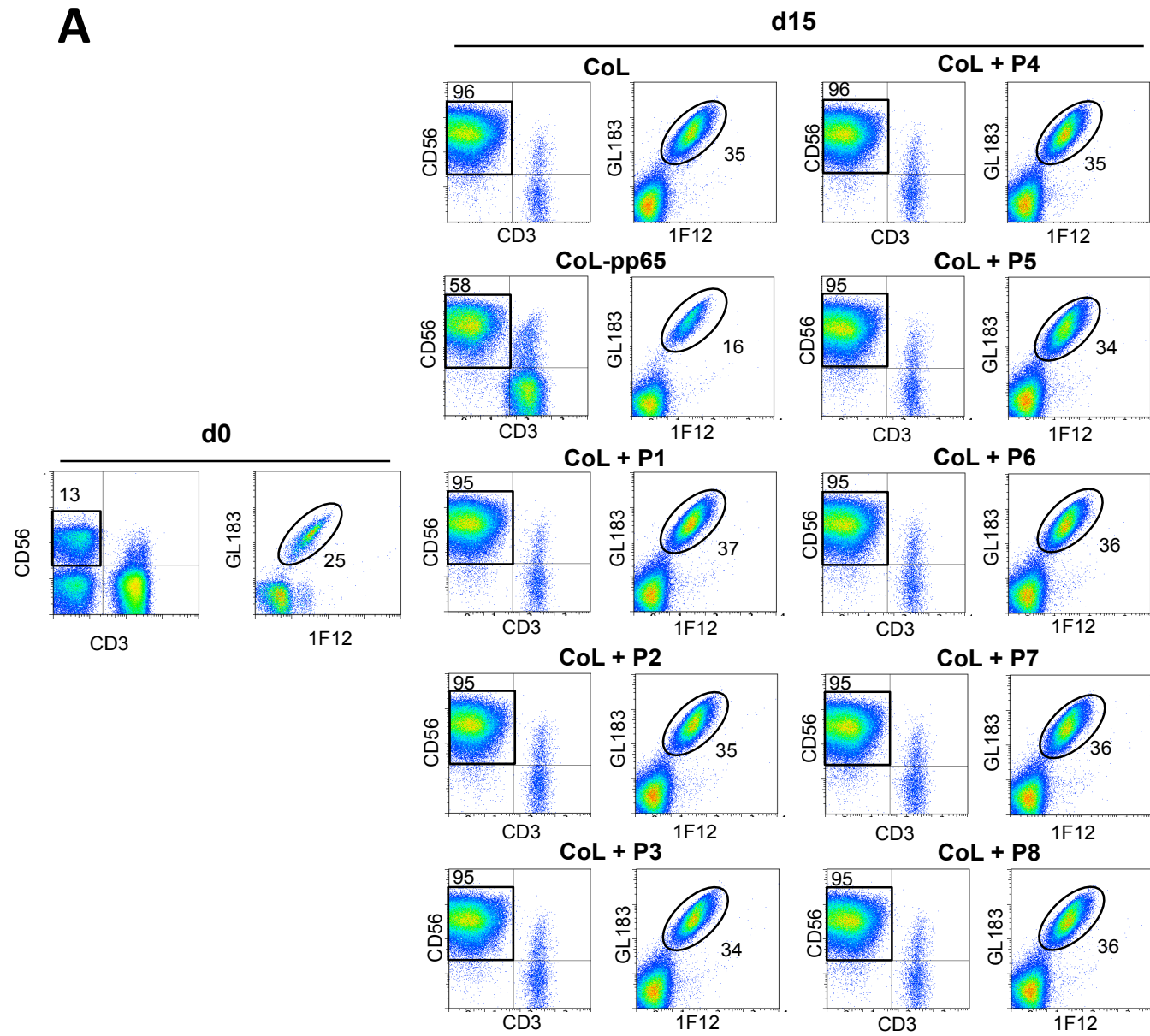


Figure 3

A



B

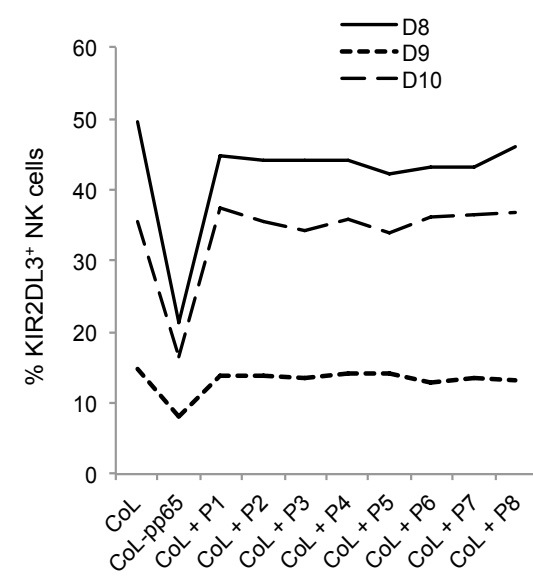


Table I. The HLA and KIR genotypes of individuals included in the study

	CMV status	HLA typing						HLA-C, HLA-B KIR ligands	KIR typing													
		A*	A*	B*	B*	C*	C*		2DL1	2DL2	2DL3	2DL4	2DL5	3DL1	3DL2	3DL3	2DS1	2DS2	2DS3	2DS4	2DS5	3DS1
D1	-	02	11	50	51	06	15	Bw6Bw4, C2C2	+	+	+	+	+	*054/56	+	+	+	+	+	-	+	+
D2	+	01	02	08	51	07	15	Bw4Bw6, C1C2	+	+	+	+	+	*054	+	+	+	+	+	-	+	+
D3	-	02	02	40	51	02	04	Bw6Bw4, C2C2	+	+	+	+	+	*054	+	+	+	+	+	-	+	+
D4	-	01	01	08	08	07	07	Bw6Bw6, C1C1	+	+	+	+	+	*001	+	+	+	+	+	-	-	-
D5	-	02	03	07	40	03	07	Bw6Bw6, C1C1	+	+	+	+	+	*004/019	+	+	+	+	+	-	-	+
D6	-	29	68	14	45	06	08	Bw6Bw6, C2C1	+	+	+	+	+	*004/019	+	+	+	+	+	-	+	+
D7	-	03	03	07	14	07	08	Bw6Bw6, C1C1	+	+	+	+	+	*054	+	+	+	+	-	-	+	+
D8	+	25	30	39	18	07	12	Bw6Bw6, C1C1	+	-	+	+	+	*019	+	+	+	-	-	-	+	+
D9	-	02	24	07	15	03	07	Bw6Bw6, C1C1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+
D10	+	24	24	49	51	06	15	Bw4Bw4, C2C2	+	-	+	+	+	*004/019	+	+	+	-	-	-	+	+

Table II. Predicting of the relative binding strengths of 9-mer CMV-pp65 peptides to the HLA-C*04 and HLA-C*07 molecules

Peptide sequence	Start position	Score (Estimate of a half-time of dissociation to HLA class I molecules)	
		HLA-C*04:01	HLA-C*07:02
VYALPLKML (P1)	113	400.000	7200
LFFFDIDLL (P2)	348	400.000	360
FFFDIDLLL (P3)	349	240.000	1680
QYDPVRALF (P4)	341	216.000	8400
VFPTKDVAL (P5)	187	200.000	432
IPSINVHHY (P6)	123	22.000	24.000
EHPTFTSQY (P7)	365	50	16.000
QEPMSIYVY (P8)	106	100	16.000

RESULTATS

PROJET N°4 :

Etude du rôle des cellules NK dans le contrôle de l'infection à cytomégalovirus dans un modèle d'infection de cellules endothéliales primaires : implications en transplantation rénale.

Zakia Djaoud, Souad Mehlal, Béatrice Charreau, Céline Bressollette, Nolwenn Legrand, Katia Gagne, Christelle Retière.

Etude du rôle des cellules NK dans le contrôle de l'infection à cytomégalo virus dans un modèle d'infection de cellules endothéliales primaires : implications en transplantation rénale.

I- Introduction

La réactivation du CMV constitue la complication virale majeure en greffe de rein (1–3). Les cellules endothéliales, qui représentent l'une des cibles directes du virus lors des transplantations rénales, expriment de façon constitutive la molécule HLA-E (4) et la protéine de stress MICA (5),

Au cours de l'infection à CMV, les gènes ultra-précoces US2, US3, US6 et US11 codent des protéines qui inhibent l'expression des molécules HLA de classe I à la surface des cellules infectées. Cependant, il n'a pas été documenté si ces mécanismes d'échappement s'établissent au sein des HAEC (*Human Aortic Endothelial Cells*). Une diminution d'expression des molécules HLA de classe I au niveau des HAEC infectées par le CMV les rendrait vulnérables à la lyse par les cellules NK qui expriment des récepteurs KIR inhibiteurs. De même, la protéine virale UL40 permet le maintien de l'expression membranaire de la molécule HLA-E et pourrait ainsi induire une lyse des HAEC infectées par le CMV par les cellules NK CD94/NKG2C⁺, observées en fréquences élevées chez les individus séropositifs pour le CMV, notamment dans le contexte de la greffe de rein où le receveur peut être CMV⁺.

La protéine virale UL142, quant à elle, inhibe l'expression de MICA à la surface des cellules infectées (6). Néanmoins, l'UL142 n'affecte pas tous les allèles MICA. En effet, le MICA A5.1, qui est une forme mutée et qui code des molécules avec une partie intracytoplasmique tronquée, n'est pas affecté par l'UL142 (7). MICA A5.1 est un allèle prédominant dans les populations caucasiennes (8) et présente la particularité d'être fortement exprimé par les cellules endothéliales. Cette forte expression est associée à une meilleure cytotoxicité des cellules NK médiée par le récepteur activateur NKG2D (9). Dans le contexte de l'infection à CMV, il est fort probable que la forme tronquée

MICA A5.1 soit maintenue à la membrane cellulaire des cellules endothéliales infectées par le CMV, les rendant vulnérables à la lyse NK médiée par l'homodimère NKG2D.

Les cellules HAEC présentent donc un phénotype différent de celui des iDC que nous avons précédemment étudiées (10), avec notamment une expression constitutive des molécules HLA-E et MICA. Ces différences phénotypiques laissent suggérer un potentiel rôle des cellules NK dans le contrôle de l'infection à CMV des HAEC via les récepteurs activateurs CD94/NKG2C et le NKG2D que nous n'avions pas pu explorer dans le modèle cellulaire NK-iDC, en complément des récepteurs KIR2DL inhibiteurs.

Aussi, en parallèle à l'étude du rôle des cellules NK KIR2DL⁺ dans le contrôle de l'infection des iDC, nous avons mis au point un autre modèle *in vitro* basé sur l'infection des cellules endothéliales primaires HAEC, par le CMV, afin d'évaluer l'impact de l'infection sur leur phénotype au niveau des molécules HLA classiques (HLA-A, -B et -C) et non classiques (HLA-E et MICA) et d'étudier la fonctionnalité des cellules NK qui expriment les récepteurs spécifiques vis-à-vis des HAEC infectées ou non par le virus.

II- Matériels et méthodes

II.1. Techniques de biologie cellulaire

II.1.1. Isolement des cellules mononuclées du sang périphérique

Les PBMC (Peripheral Blood Mononuclear Cells) sont obtenues à partir de poches de sang total prélevé à l'établissement Français du Sang des Pays de la Loire selon le protocole décrit précédemment (10).

II.1.2. Tri et amplification in vitro des populations NK KIR2DL1⁺ et NK KIR2DL3⁺

Les lymphocytes T, marqués avec l'anticorps spécifique du CD3 (Clone DX35, EFS, Rennes), ont été déplétés à l'aide de billes magnétiques (Dynabeads, Invitrogen). Les cellules NK KIR2DL1⁺ KIR2DL2/3/2DS1/2⁻ et NK KIR2DL3⁺ KIR2DL1/2/2DS1/2⁻ ont été triées à partir d'individus C2C2 (n=5) et C1C1 (n=4), respectivement. Les tris ont été réalisés avec un module de tri associé au FACSCalibur (BD Biosciences) en utilisant la combinaison d'anticorps 8C11 (spécifique des KIR2DL1/L2/L3/2DS2) et GL183 (spécifique des KIR2DL2/L3/2DS2). Les cellules sont ensuite stimulées et amplifiées *in vitro* selon le protocole décrit précédemment (Djaoud et al, 2013).

II.1.3. Culture des cellules endothéliales

Les HUVEC (*Human Umbilical Veinule Endothelial Cells*)

Les cellules HUVEC (Promocell) nous ont été fournies par le Dr Céline Bressollette (Faculté de Pharmacie de Nantes, EA4271). Ces cellules sontensemencées en plaques 6 puits dans du milieu EBM2 (Endothelial cell Basal Medium, Lonza) complémenté par les facteurs de croissance fournis par le fournisseur.

Les HAEC

Les HAEC sont des cellules endothéliales humaines primaires issues de donneurs de reins (11). Elles nous ont été fournies par le Dr Béatrice CHARREAU (INSERM UMR1064, Institut de Transplantation Urologie Néphrologie (ITUN), Nantes). Deux types de lignées HAEC de polymorphismes MICA différents sont utilisées dans l'étude : des lignées HAEC homozygotes pour la mutation A5.1 (HAEC MICA A5.1^{+/+}) et des

lignées HAEC sans la mutation A5.1 (HAEC MICA A5.1^{-/-}). Ces cellules sont cultivées dans du milieu ECBM (Endothelial Cell Basal Medium, Promocell) complémenté par les facteurs de croissance fournis par le fournisseur.

II.1.4. Production du CMV et infection des cellules endothéliales

La souche virale VHL/E

Nous avons utilisé la souche endothéiotrope VHL/E du cytomégalo virus fournie par le Pr. James Waldman (Columbus, Ohio, USA). Des lots de virus ont été produits selon le protocole décrit précédemment (10)

Infection des cellules endothéliales

Les HUVEC ont été utilisées uniquement pour la validation du protocole d'infection des cellules endothéliales par la souche VHL/E avant de procéder à l'infection des HAEC. Pour une infection optimale, les cellules ($2 \cdot 10^5$ cellules) sont incubées dans 500 μ l de RPMI avec le CMV (100 μ l de suspension virale) pendant une nuit (15 heures) à 37°C sous 5% de CO₂.

II.1.5. Etude phénotypique par cytométrie en flux

L'étude phénotypique des cellules NK a été réalisée par cytométrie en flux 4 couleurs (FacsCalibur, BD Biosciences) selon le protocole décrit précédemment (10). Les HAEC ont été phénotypées en utilisant les anticorps monoclonaux suivants : anti-HLA-A,-B,-C -AF⁶⁴⁷ (F41-IE3H1D2, EFS), anti-HLA-E-PE (3D12, Miltenyi Biotec), anti-MICA/B-PE (6D4, BD Biosciences), anti-ULBP3-PE (166510, R&D Systems), anti-CD40-PE (5C3, BD, Pharmingen), anti-IE1-AF⁴⁸⁸ (8B1.2 Millipore) et les contrôles isotypiques appariés (IgG1, BD Pharmingen ; IgG2a, R&D Systems). Les HAEC sont ensuite lavées et marquées en intracellulaire avec l'anticorps anti-IE1-AF488 comme décrit précédemment (12). Les données phénotypiques ont été analysées en utilisant le logiciel FlowJo 7.6 (Treestar).

II.1.6. Etudes fonctionnelles des cellules NK

La fonctionnalité des cellules NK a été évaluée sur la base de leur capacité de dégranulation (expression du CD107a) et de production de l'IFN- γ . Les cellules sont préincubées avec un anti-CD107a (H4A3, BD Biosciences) et sont maintenues pendant

5h seules dans du milieu RMPI, 10% SH, IL2 (200 U/ml), ou avec les cellules K562 (utilisées comme contrôle positif de l'activation des cellules NK) et les HAEC infectées ou non par le CMV (ratio effecteur: cible = 10:1 ou 50:1). La brefeldine A (Sigma) est ajoutée après une heure d'incubation à une concentration de 10 µg/ml. Les cellules sont ensuite marquées avec les anticorps monoclonaux suivants : anti-KIR2DL1/2/3/2DS1/2-FITC (1A6) (13), anti-KIR2DL1-FITC (143211, R&D Systems), anti-KIR2DL2/3/2DS2-PE (GL183, Beckman Coulter, Immunotech), anti-NKG2C-PE (134591, R&D Systems), anti-NKG2D (1D11, BD Pharmingen), anti-NKG2A-FITC ou -PE (Z199, Beckman Coulter) et anti-NKp46-APC (9E2, Becton Dickinson). Pour l'étude de la production de l'IFN-γ, les cellules NK sont fixées en PFA 4% pendant 10 min à température ambiante puis une nuit à +4°C. La perméabilisation des cellules NK et le marquage intracellulaire de l'IFN-γ produit ont été effectués à l'aide de l'anti-IFNγ AF⁶⁴⁷ (B27, BD Pharmingen) dilué dans du PBS BSA 0,1%, saponine 0,1%, NaN₃ 0,09%, une heure à température ambiante.

Les données de cytométrie ont été acquises à l'aide d'un FACSCalibur (BD Biosciences, logiciel Cell Quest) et analysées en utilisant le logiciel FlowJo 7.6 (Treestar).

II.2. Techniques de biologie moléculaire

II.2.1. Génotypages HLA et KIR

Les génotypages HLA et KIR ont été réalisés pour tous les individus étudiés selon le protocole décrit précédemment (10).

II.2.2. Détermination des groupes HLA-C1 et C2 des lignées HAEC par PCR SSP :

La détermination des groupes C1 et C2, ligands respectifs des KIR2DL2/L3 et KIR2DL1, a été réalisée à l'aide d'une technique de PCR SSP (14) en utilisant les amorces spécifiques suivantes : C1C2 (F) : 5'-CGC CGC GAG TCC RAG AG-3', C1(R) : 5'-GTT GTA GCC GCG CAG G-3' et C2(R) : 5'-GTT GTA GTA GCC GCG CAG T-3'.

II.3. Tests statistiques

La comparaison de deux échantillons d'effectifs différents a été réalisée en utilisant le test d'analyse de variance à un facteur (ANOVA). Les p -values <0.05 sont considérées statistiquement significatives.

III. Résultats

III.1. Validation du protocole d'infection des cellules endothéliales par le CMV

L'infection cellulaire par la souche VHL/E du CMV a été validée sur les HUVEC, avant d'infecter les HAEC. La figure ci-dessous illustre les taux d'infection des HAEC MICA A5.1^{-/-} et A5.1^{+/+} à J1, J2, J3 et J4 après infection. Le polymorphisme MICA A5.1 n'impacte pas le taux d'infection des HAEC.

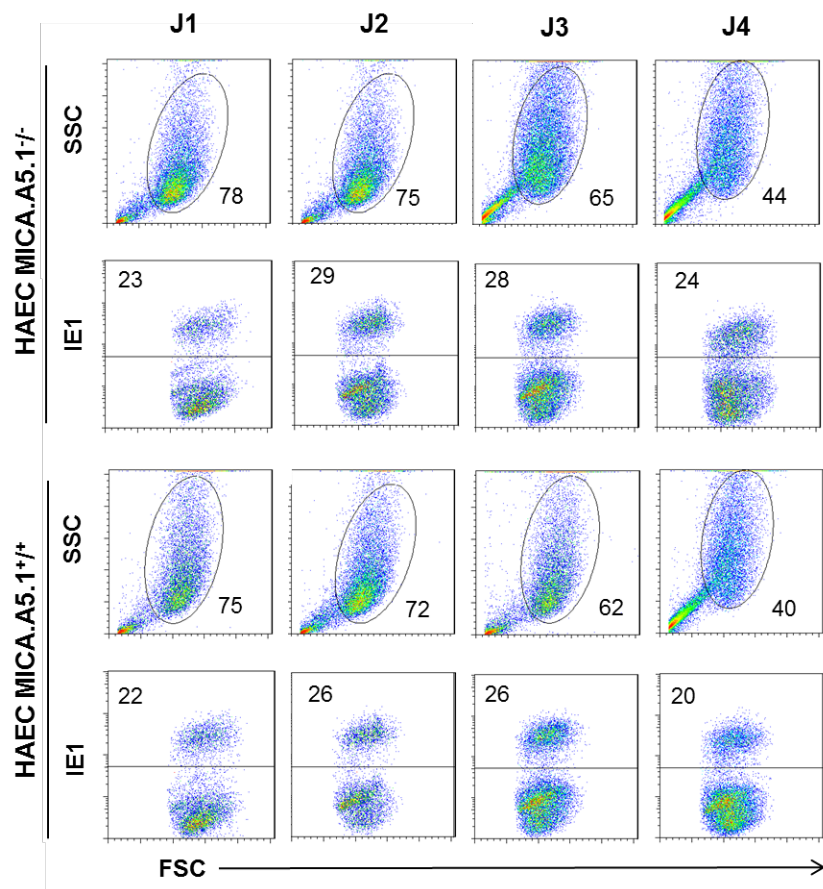


Figure 1 : Validation de l'infection des HAEC par la souche VHL/E du CMV. Density plots d'une expérience, représentative de 3 expériences, illustrant la validation de l'infection par le CMV sur les HAEC MICA A5.1^{-/-} et A5.1^{+/+}. L'infection est validée par un marquage intracellulaire de la protéine ultra précoce IE1.

III.2. Etude de l'interaction NKG2D/ MICA dans le modèle cellulaire NK-HAEC infectées ou non par le CMV

Etude cinétique de l'expression des molécules MICA sur les HAEC au cours de l'infection à CMV

Les HAEC expriment de façon constitutive les molécules MICA, notamment la forme mutée A5.1 qui active plus significativement les cellules NK via le récepteur activateur NKG2D (5, 9).

Avant d'évaluer la fonctionnalité des cellules NK NKG2D⁺ dans notre modèle d'étude, nous avons réalisé, dans un premier temps, une étude cinétique de l'expression des molécules MICA sur les HAEC MICA A5.1^{-/-} et A5.1^{+/+} infectées ou non par le CMV (Figure 2B). Pour une meilleure résolution de l'analyse de l'expression MICA au niveau des HAEC infectées, nous avons ciblé les HAEC infectées ou non par le CMV sur la base de leur expression des molécules HLA de classe I et non sur l'expression intracellulaire IE1. En effet, les cellules infectées (IE1⁺) présentent une plus faible expression des molécules HLA de classe I comparativement aux cellules non infectées (IE1⁻) (Figure 2A).

Cette étude phénotypique confirme une plus forte expression de la molécule MICA sur les HAEC portant la forme mutée MICA A5.1, en absence de virus dans la condition milieu. Par ailleurs, contrairement au MICA «sauvage», la forme mutée n'est pas «downrégulée» lorsque les cellules sont infectées par le CMV (Figure 2B). Le second pic illustrant une expression «downrégulée» correspond au MICB, reconnu aussi par l'anticorps utilisé, et qui est «downrégulé» par la protéine viral UL16 (15) et le micro RNA miR-UL112 (16). Cette observation a été vérifiée avec un anticorps spécifique seulement de MICA (données non montrées). Nos résultats phénotypiques issus du modèle d'infection des HAEC corroborent ceux précédemment décrits (7).

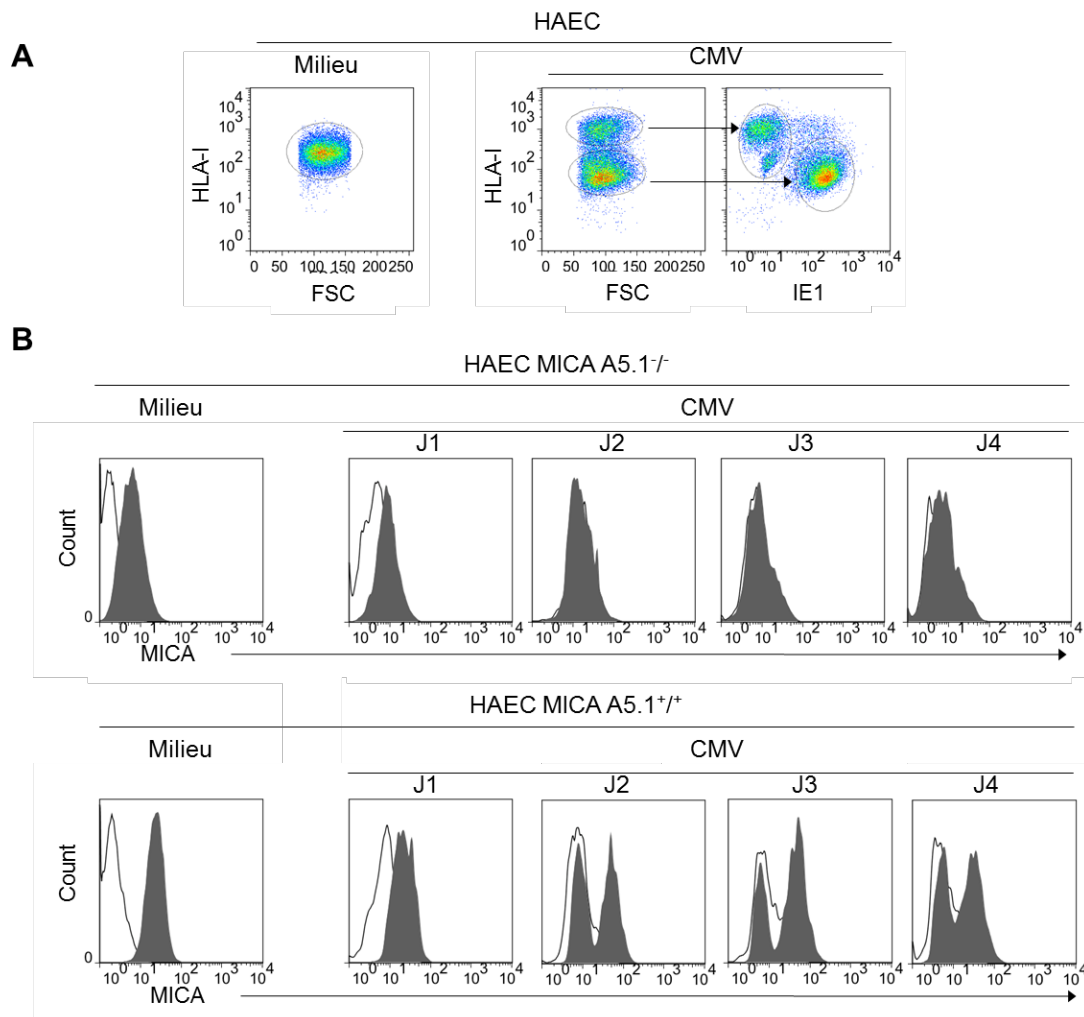


Figure 2 : Etude de l'expression de la molécule MICA sur les HAEC non exposées au CMV et à J1, J2, J3 et J4 après infection. (A) Density plots illustrant les populations HAEC ciblées pour l'étude de l'expression de MICA : les cellules infectées sont identifiées par la faible expression des molécules HLA de classe I. **(B)** Les histogrammes gris illustrent l'expression de la molécule MICA par les lignées HAEC A5.1^{-/-} et A5.1^{+/+} infectées par le CMV (J1, J2, J3, J4) et ciblées par leur faible expression en molécule HLA de classe I, ou non incubées avec le virus en contrôle (milieu). Les contrôles isotypiques correspondant sont représentés en histogrammes blancs.

Etude de la dégranulation des cellules NK NKG2D⁺ vis-à-vis des HAEC MICA A5.1^{-/-} et A5.1^{+/+} infectées ou non par le CMV

Les études de dégranulation des cellules NK NKG2D⁺ vis-à-vis de cibles HAEC MICA A5.1^{-/-} et A5.1^{+/+}, infectées ou non par le CMV, ont été réalisées à J2 et J3 après infection. Les expériences sont effectuées à partir de PBMC de 8 individus, avec des rapports PBMC:EC de 10:1 et 50:1. Afin de limiter le rôle inhibiteur des récepteurs KIR et du CD94/NKG2A, les cellules NK NKp46⁺ NKG2D⁺ KIR⁻ NKG2A⁻ ont été ciblées

dans les différentes expériences avec des combinaisons d'anticorps adaptées (Figure 3A).

Les HAEC infectées par le CMV ont activé les cellules NK NKG2D⁺ ($p<0,05$), indépendamment de la nature du MICA (Figure 3B). Ce résultat s'explique par l'implication d'autres interactions récepteurs NK-ligands EC dans notre modèle, indépendamment de l'interaction NKG2D:MICA. Cependant, à un rapport effecteur:cible plus élevé (50:1), on observe une dégranulation des cellules NK NKG2D⁺ plus importante face aux HAEC A5.1^{+/+} infectées que face aux HAEC A.5^{-/-} infectées. Ce résultat non significatif et préliminaire suggère un rôle de l'interaction NKG2D:MICA A5.1 dans le contrôle de l'infection à CMV par les cellules NK dans le contexte de la greffe de rein.

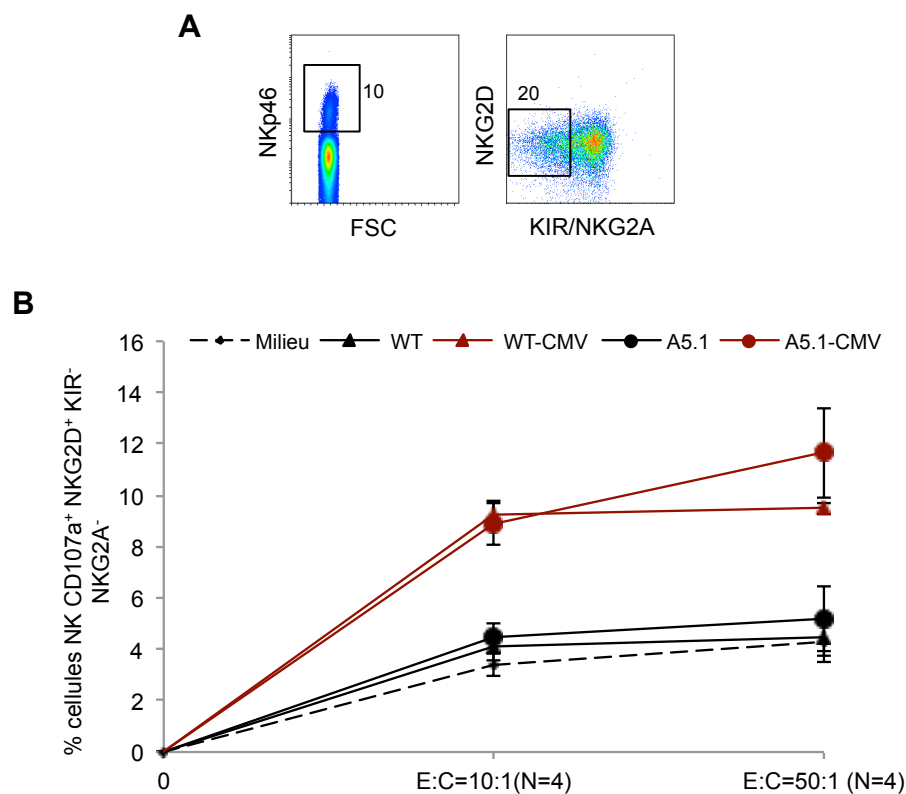


Figure 3 : Etude de la dégranulation des cellules NK NKG2D⁺ vis-à-vis des HAEC MICA A5.1^{+/+} (WT) et A5.1^{-/-} infectées ou non par le CMV. (A) Density plots illustrant la population cellulaire NK NKp46⁺NKG2D⁺KIR⁻NKG2A⁻ ciblée dans l'étude de dégranulation. **(B)** Le graphique indique les moyennes des pourcentages de dégranulation des cellules NK NKG2D⁺ vis-à-vis des HAEC A5.1^{+/+} (WT) et A5.1^{-/-} (A5.1) infectées (en rouge) et non infectées (en noir) avec des rapports PBMC:HAEC=10:1 (n=4) et 50:1 (n=4).

III.3. Etude de l'interaction NKG2C/ HLA-E dans le modèle cellulaire NK-HAEC infectées ou non par le CMV

Des études ont montré l'expansion des cellules NK NKG2C⁺ chez les individus séropositifs pour le CMV (10, 17–19). Précédemment, nous avons montré que les iDC infectées par le CMV n'activent pas significativement les cellules NK NKG2C⁺ et que les récepteurs KIR sont requis pour une meilleure activation des cellules NK par les iDC infectées. Cette observation s'expliquait notamment par la très faible expression de la molécule HLA-E sur les iDC. Etant donné que les HAEC expriment plus fortement la molécule HLA-E que les iDC (4), ce modèle cellulaire pourrait être plus adapté à l'étude de l'interaction NKG2C:HLA-E dans l'infection à CMV.

Etude cinétique de l'expression de la molécule HLA-E sur les HAEC au cours de l'infection à CMV

L'expression des molécules HLA-E à la surface des HAEC a été étudiée à J1, J2, J3 et J4 après l'infection des cellules par le CMV (Figure 4).

La molécule HLA-E est fortement «downrégulée» sur les HAEC infectées, notamment à J3 ($p=0,002$) et J4 ($p=0,008$) après infection. Les HAEC exposées au CMV mais non infectées présentent également une «downrégulation» significative de la molécule HLA-E ($p=0,008$ à J3 et $p=0,01$ à J4) (Figure 4). Ceci pourrait être expliqué par la diminution de l'expression des molécules HLA de classe I classiques et, probablement aussi, par un relargage des molécules HLA-E solubles sous l'effet des cytokines proinflammatoires (4). De plus, à ce stade précoce de l'infection, le rôle de la protéine virale UL40 dans le maintien de l'expression membranaire de la molécule HLA-E ne doit pas être optimal (20).

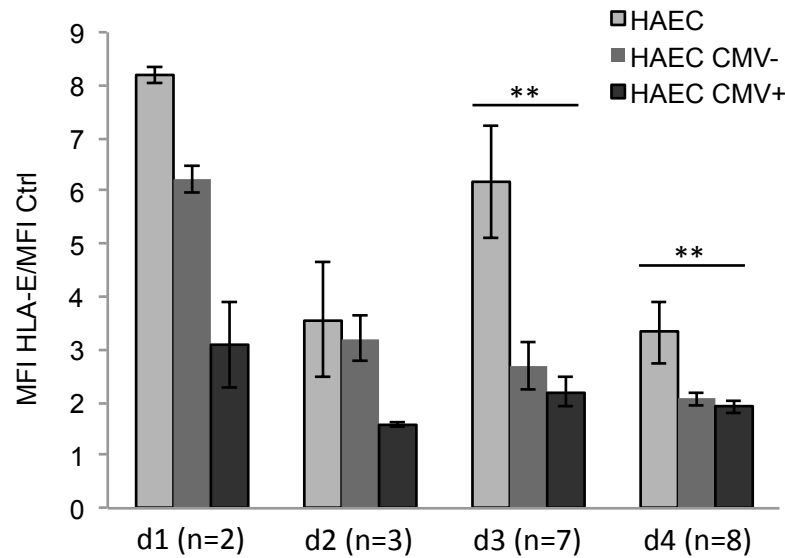


Figure 4 : Etude cinétique de l'expression de la molécule HLA-E sur les HAEC au cours de l'infection à CMV. Le graphique représente les intensités moyennes de fluorescence des molécules HLA-E rapportées à celles du contrôle isotypique (MFI HLA-E/MFI Ctrl) observées sur les HAEC non exposées au CMV (HAEC) (gris clair), les HAEC exposées mais non infectées (HAEC CMV⁻) , (en gris foncé), et, les HAEC infectées (HAEC CMV⁺) (en noir). Le nombre d'expériences réalisées est indiqué pour chaque point de la cinétique. La comparaison des échantillons d'effectifs différents a été réalisée en utilisant le test ANOVA. ($p^{**}<0.01$).

Etudes fonctionnelles des cellules NK NKG2C⁺ vis-à-vis des HAEC infectées ou non par le CMV

Les études de dégranulation des cellules NK NKG2C⁺ vis-à-vis des HAEC infectées ou non par le CMV ont été réalisées à J2 après infection, à un rapport E:C de 50:1 (N=6) et à J4, à un rapport E:C de 10:1 (N=8) (l'expression des molécules HLA-E n'étant pas significativement différente entre ces deux point de cinétique). Les expériences sont effectuées à partir de PBMC d'individus séropositifs pour le CMV, qui présentent une forte expansion des cellules NK NKG2C⁺, identifiés dans le cadre de l'étude de ces populations (10). Afin de limiter le rôle inhibiteur des récepteurs KIR et de l'hétérodimère CD94/NKG2A qui reconnaît la molécule HLA-E (21), les cellules NK Nkp46⁺ NKG2C⁺ KIR⁻ NKG2A⁻ ont été ciblées dans les différentes expériences avec les combinaisons d'anticorps adaptées (Figure 5A).

L'infection des HAEC par le CMV active significativement la dégranulation des cellules NK NKG2C⁺ NKG2A⁻ KIR⁻, et ce, d'autant plus que le rapport effecteur:cible augmente ($p=0,0002$ à un rapport 10 :1 et $p= 7,69.10^{-6}$ à un rapport de 50:1). (Figure 5B). Par ailleurs, nous avons évalué la dégranulation des populations cellulaires NK qui expriment ou non le NKG2C, les KIR2DL et le NKG2A (Figure 5A) afin d'évaluer les populations NK susceptibles de contrôler plus efficacement l'infection à CMV dans le modèle HAEC. Les 3 populations NK dégranulent significativement vis-à-vis des HAEC infectées, comparativement aux HAEC non infectées (NK NKG2C⁺ NKG2A⁻ KIR⁻, $p^{***}<0,00001$, NK NKG2C⁻ NKG2A⁺ KIR⁺, $p^{*}<0,0008$ et NK NKG2C⁺ NKG2A⁺ KIR⁺, $p^{**}<0,00005$) (Figure 5C), mais la seule expression du NKG2C confère une réponse plus forte aux cellules NK suggérant un rôle prépondérant dans ce modèle cellulaire basé sur les HAEC.

Les cellules NK NKG2C⁺ sont également capables d'une forte production d'IFN- γ lorsqu'elles sont activées par les HAEC infectées par le CMV (Figure 5D).

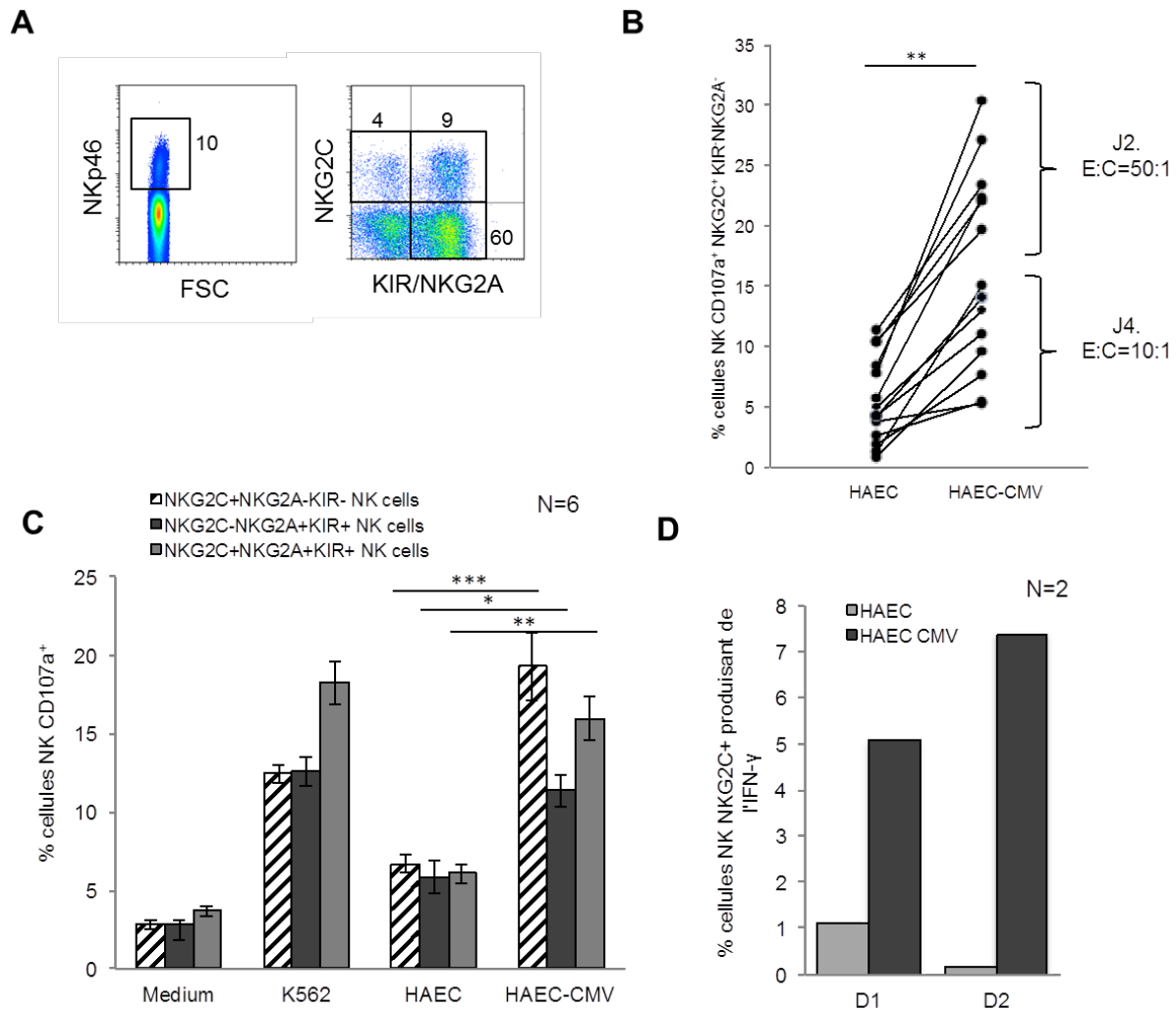


Figure 5 : Etudes fonctionnelles des cellules NK NKG2C⁺ vis-à-vis des HAEC infectées ou non par le CMV. Les études sont réalisées à partir de PBMC d'individus séropositifs pour le CMV (A) Density plots illustrant la population NK ciblée dans les études fonctionnelles. (B) Le graphique représente les pourcentages de dégranulation des cellules NK NKG2C⁺ NKG2A⁻ KIR⁻ vis-à-vis de HAEC infectées ou non par le CMV, à J2 (E:C=50:1) et J4 (E:C=10:1) après infection. (C) Les barres indiquent les moyennes des pourcentages de dégranulation des cellules NK NKG2C⁺ NKG2A⁻ KIR⁻, NK NKG2C⁺ NKG2A⁺ KIR⁺ et NK NKG2C⁻ NKG2A⁺ KIR⁺ vis-à-vis de cellules K562 et de HAEC infectées ou non par le CMV, à J2 (E:C=50:1) après infection (N= 6), $\pm$ DS. (D) les barres indiquent les pourcentages des cellules NK NKG2C⁺ produisant de l'IFN- γ vis-à-vis des HAEC non infectées (barres grises) et infectées par le CMV (barres noires) à partir de PBMC de 2 individus (D1 et D2) à un rapport E:C=10:1. La comparaison des échantillons d'effectifs différents a été réalisée en utilisant le test ANOVA ($p^*<0,0008$, $p^{**}<0,00005$ et $p^{***}<0,00001$).

III.4. Etude de l'interaction KIR2DL/ HLA classe I dans le modèle cellulaire NK-HAEC infectées ou non par le CMV

Dans l'étude précédente basée sur le modèle NK-iDC (10), nous avons montré que la «downrégulation» des molécules HLA de classe I observée sur les iDC infectées par le CMV rendait celles-ci sensibles aux cellules NK KIR2DL1⁺ et NK KIR2DL3⁺. Pour évaluer le rôle de ces deux populations NK dans le contrôle des HAEC infectées par le CMV, nous avons dans un premier temps, réalisé une étude cinétique de l'expression des molécules HLA de classe I à la surface des HAEC au cours de l'infection à CMV et procédé, dans un second temps, à des études de dégranulation des cellules NK KIR2DL1⁺ et NK KIR2DL3⁺ vis-à-vis de HAEC infectées ou non par le CMV.

Etude cinétique de l'expression de la molécule HLA de classe I sur les HAEC au cours de l'infection à CMV

L'expression des molécules HLA de classe I à la surface des HAEC a été étudiée à J1, J2, J3 et J4 après l'infection des cellules par le CMV. L'étude, effectuée chez six individus différents, montre une « downrégulation » des molécules HLA de classe I sur les HAEC dès J1 après l'infection. Cette « downrégulation » est encore plus importante à J3 ($p=0.0006$) et J4 ($p=0.0005$) (Figure 6). Par ailleurs, la population cellulaire exposée au virus mais non infectée présente une «uprégulation» des molécules HLA de classe I (Figure 6). Ceci peut être dû aux cytokines proinflammatoires (IFN- γ) produites dans le milieu de culture.

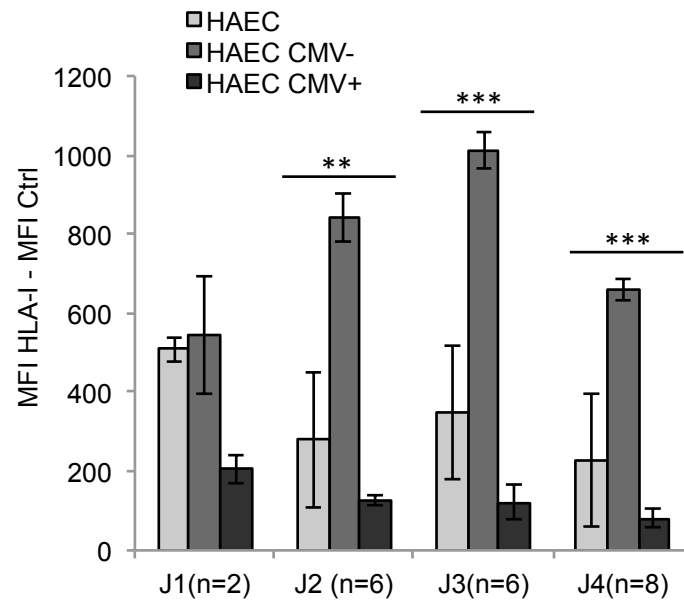


Figure 6 : Etude cinétique de l'expression des molécules HLA de classe I sur les HAEC au cours de l'infection à CMV. Le graphique représente les intensités moyennes de fluorescence des molécules HLA de classe I moins celle du contrôle isotypique (MFI HLA-I - MFI Ctrl) sur les cellules non exposées au CMV (HAEC) en gris clair, sur les HAEC exposées mais non infectées (HAEC CMV-) en gris foncé et, sur les HAEC infectées (HAEC CMV+) en noir. Le nombre d'expériences réalisées est indiqué pour chaque point de la cinétique. La comparaison des échantillons d'effectifs différents a été réalisée en utilisant le test ANOVA. ($p^{**} < 0,05$; $p^{***} < 0,001$)

Etudes de dégranulation des cellules NK KIR2DL1⁺ et NK KIR2DL3⁺ vis-à-vis des HAEC C1C1 et C2C2 infectées ou non par le CMV

Les études de dégranulation des cellules NK KIR2DL1⁺ et NK KIR2DL3⁺ vis-à-vis des HAEC C1C1 et C2C2 infectées ou non par le CMV, ont été réalisées à J3 et J4 après l'infection, à un rapport E:C de 10:1. Les expériences sont effectuées à partir de cellules NK KIR2DL1⁺ (C2C2⁺) et NK KIR2DL3⁺ (C1C1⁺) triées et amplifiées *in vitro* comme décrit précédemment dans le modèle NK-iDC (10) (Figure 7A-D). Les cellules K562 ont été utilisées comme contrôle positif de dégranulation. Les expériences montrent de très faibles pourcentages de dégranulation des cellules NK KIR2DL1⁺ vis-à-vis des HAEC C1C1 et C2C2 (Figure 7B). En présence du virus, la dégranulation des cellules NK KIR2DL1⁺ augmente légèrement dans le contexte C2 (Figure 7C). Ces résultats préliminaires doivent être confortés par d'autres expériences afin de dégager un

potentiel rôle du KIR2DL1 dans le contrôle de l'infection à CMV dans le modèle cellulaire HAEC. Les cellules NK KIR2DL3⁺ ne sont également pas activées par les HAEC C1C1 et C2C2 (Figure 7E). En présence du virus, la dégranulation des cellules NK KIR2DL3⁺ augmente significativement dans le contexte C1 ($p=0,005$) (Figure 7F). Ces données préliminaires, qui doivent être confirmées, suggèrent que la diminution de l'expression des molécules HLA de classe I sur les HAEC infectées par le CMV active la dégranulation des sous-populations NK KIR2DL1⁺ et KIR2DL3⁺ lorsque l'expression de leurs ligands respectifs C2 et C1 est diminuée sur les HAEC.

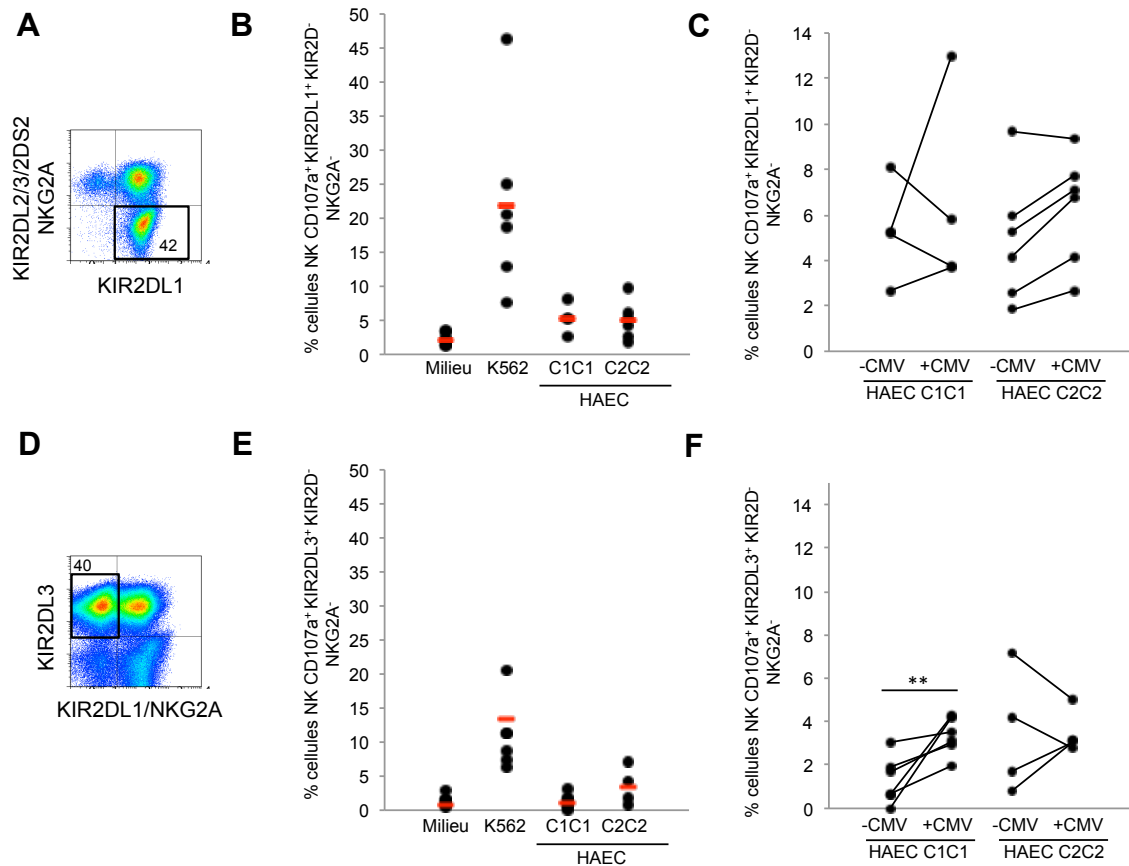


Figure 7 : Etude de dégranulation des cellules NK KIR2DL1⁺ et NK KIR2DL3⁺ vis-à-vis de HAEC C1C1 et C2C2 infectées ou non par le CMV. Les expériences sont réalisées à partir de cellules NK KIR2DL1⁺ (C2C2⁺) et NK KIR2DL3⁺ (C1C1⁺) triées et amplifiées *in vitro* à partir de PBMC génotypées KIR2DS1⁻/2DL2⁻/2DS2⁻ **(A)** Density plot illustrant le phénotype des cellules NK KIR2DL1⁺ ciblées dans l'étude en utilisant la combinaison d'anticorps anti-KIR2DL1 et un mélange d'anticorps spécifiques de KIR2DL2/3/2DS2 (GL183) et NKG2A **(B)** Le graphique représente les pourcentages de dégranulation des cellules NK KIR2DL1⁺ maintenues seules dans le milieu ou au contact des cellules K562 et HAEC C1C1 ou C2C2. **(C)** Le graphique représente les pourcentages de dégranulation des cellules NK KIR2DL1⁺ maintenues au contact des HAEC C1C1 (N= 4) et C2C2 (N=6) infectées ou non par le CMV. **(D)** Density plot illustrant le phénotype des cellules NK KIR2DL3⁺ ciblées dans l'étude en utilisant la combinaison d'anticorps anti-KIR2DL1 et un mélange d'anticorps spécifiques de KIR2DL2/3/2DS2 (GL183) et NKG2A **(E)** Le graphique représente les pourcentages de dégranulation des cellules NK KIR2DL3⁺ maintenues seules dans le milieu ou au contact des cellules K562 et HAEC C1C1 ou C2C2. **(F)** Le graphique représente les pourcentages de dégranulation des cellules NK KIR2DL3⁺ maintenues au contact des HAEC C1C1 (N= 6) et C2C2 (N=4) infectées ou non par le CMV. La comparaison des échantillons d'effectifs différents a été réalisée en utilisant le test ANOVA. ($p^{**}=0,05$)

IV. Discussion

L'infection *in vitro* de cellules endothéliales primaires par le CMV représente un modèle d'étude pertinent du rôle des cellules NK dans le contrôle de l'infection à CMV en transplantation rénale. En effet, les HAEC, prélevées sur des aortes de donneurs de rein, expriment de façon constitutive les molécules MICA, HLA-E et HLA de classe I qui sont les ligands respectifs des récepteurs NKG2D, NKG2C et KIR2DL, exprimés fortement sur les cellules NK. Ainsi, ce modèle offre la possibilité d'explorer les trois principales voies d'activation des cellules NK (22) : le soi induit par le stress cellulaire (interaction NKG2D:MICA), le non soi infectieux (interaction NKG2C:HLA-E-peptide viral) et le soi manquant (interaction KIR2DL:HLA-I).

L'étude phénotypique des HAEC infectées ou non par le CMV a confirmé une plus forte expression de MICA sur les HAEC MICA A5.1^{+/+}, comparativement au HAEC MICA A5.1^{-/-} (9), qui n'est pas «downrégulée» avec l'infection à CMV. Ceci s'explique par une absence d'interaction de la protéine virale UL142 avec cette forme mutée de MICA qui possède une partie intracytoplasmique tronquée (7). Les cellules NK NKG2D⁺ sont significativement activées par les HAEC infectées par le CMV. Avec un rapport effecteur:cible élevé (E:C=50:1), les cellules NK NKG2D⁺ semblent plus activées au contact des HAEC MICA A5.1^{+/+} infectées que les HAEC A5.1^{-/-} infectées. Néanmoins, cette différence n'est pas significative dans nos conditions expérimentales, et ces résultats préliminaires devront être confortés par d'autres expériences, notamment des techniques de blocage de l'interaction NKG2D:MICA A5.1, afin de déterminer l'importance de celle-ci dans le contrôle des HAEC infectées par le CMV.

Ces résultats suggèrent que *in vivo*, il serait possible que les patients ayant reçu des greffes de reins porteurs de la forme tronquée MICA A5.1 seraient capables de mieux contrôler la multiplication virale en éliminant plus efficacement les cellules infectées. Pour répondre à cette hypothèse et identifier des sous-populations NK impliquées dans le contrôle de l'infection à CMV dans le contexte de la transplantation rénale, nous envisageons de réaliser une étude rétrospective, en collaboration avec le Pr Hourmant (CHU de Nantes) et le Dr Charreau (CHU de Nantes), ainsi que le Dr Bressollette (laboratoire de virologie, CHU, Nantes) à partir des données cliniques et sérologiques des receveurs de reins ayant fait ou non une réactivation à CMV, tout en tenant compte du polymorphisme MICA des couples donneurs/receveurs.

Des études ont montré l'expansion des cellules NK NKG2C⁺ chez les individus séropositifs pour le CMV (10, 17–19). Néanmoins, le rôle des cellules NK NKG2C⁺ dans le contrôle de l'infection à CMV n'est pas encore bien défini. Nous avons montré précédemment que les iDC infectées par le CMV n'activent pas fortement les cellules NK NKG2C⁺ KIR⁻. Toutefois, les cellules endothéliales sont connues pour exprimer plus de molécules HLA-E à leur surface (4), ce qui pourrait, dans un contexte d'infection à CMV, soit les rendre plus susceptibles à la lyse NK via l'interaction avec le couple activateur CD94/NKG2C, soit plus résistantes en interagissant avec le couple inhibiteur CD94/NKG2A.

Par ailleurs, la molécule HLA-E est une molécule HLA non classique qui présente, dans un contexte physiologique, des peptides issus des séquences signal d'autres molécules HLA de classe I. Il a été montré que dans une situation de stress, le peptide chargé sur la molécule HLA-E pourrait moduler l'interaction avec les récepteurs CD94/NKG2 (23). Dans le cas de l'infection à CMV, la protéine virale US6 bloque le HLA-E dans le réticulum endoplasmique et empêche ainsi son expression à la surface cellulaire (24). Pour contrer cette vulnérabilité, la protéine virale UL40 cède un peptide qui va se fixer sur le HLA-E et maintenir son expression à la surface des cellules infectées. Cependant, l'UL40 présente un polymorphisme dans sa région N-terminale qui mime la séquence signal des molécule HLA de classe I, ce qui impacte la capacité d'activation et d'inhibition des cellules NK via les récepteurs CD94/NKG2C et CD94/NKG2A, respectivement (25).

L'étude phénotypique des HAEC au cours de l'infection à CMV montre une «downrégulation» de la molécule HLA-E sur les cellules infectées (IE1⁺) mais également sur les cellules «bystander» (IE1⁻). Ceci pourrait s'expliquer, dans les deux cas, par le relargage des molécules HLA-E solubles sous l'effet des cytokines proinflammatoires (4).

Les études fonctionnelles montrent une très forte dégranulation des cellules NK NKG2C⁺ NKG2A⁻ KIR⁻ ainsi qu'une production significative de l'IFN- γ au contact des HAEC infectées par le CMV. Ces résultats seront complétés avec des expériences de blocage de l'interaction CD94/NKG2C:HLA-E, ainsi que l'étude du polymorphisme de la protéine UL40 de la souche VHL/E utilisée dans le projet.

Ces résultats nous laissent suggérer que les receveurs de reins qui sont séropositifs pour le CMV et qui ont une population cellulaire NK NKG2C⁺ amplifiée seraient capables de

mieux contrôler la réactivation du CMV, ce qui corrobore les données connues en greffe de CSH (26).

Des études génétiques ont montré le rôle des récepteurs KIR activateurs dans le contrôle de la réactivation du CMV en greffe de rein (27). Cependant, le rôle des récepteurs KIR inhibiteurs dans ce contexte n'est pas encore documenté. Dans l'approche basée sur le modèle NK-iDC, nous avons montré l'importance des KIR2DL, particulièrement KIR2DL1 et KIR2DL3, dans le contrôle des iDC infectées par le CMV. Ces deux récepteurs inhibiteurs sont également préférentiellement exprimés, avec le récepteur activateur NKG2C, sur les cellules NK des individus séropositifs pour le CMV (10) et sur les cellules NK amplifiées *in vitro* en co-culture avec des fibroblastes infectés par le CMV (28). Par ailleurs, l'étude de l'expression des molécules HLA de classe I à la surface des HAEC infectées par le CMV révèle une chute drastique de cette expression. Ceci devrait rendre ces cellules très vulnérables aux cellules NK KIR2DL. Nos résultats préliminaires suggèrent que Les cellules NK KIR2DL3⁺ sont activées par les HAEC C1C1 infectées par le CMV, ce qui pourrait s'expliquer par la probable «downrégulation» des ligands C1.

Ces données fonctionnelles seront approfondies et complétées par une étude phénotypique de l'expression des molécules HLA-C sur les HAEC infectées ou non par le CMV afin de mieux comprendre l'impact des interactions KIR2DL:HLA-Cw dans le modèle cellulaire NK-HAEC.

Dans sa globalité, cette approche cellulaire *in vitro* nous a permis de montrer une implication plus large des interactions entre récepteurs NK et ligands HLA dans le contrôle de l'infection à CMV, dans le contexte de la greffe rénale. Une étude clinique devrait nous permettre de confirmer les données observées *in vitro* afin d'identifier les marqueurs NK ou HLA prédictifs d'un meilleur contrôle de l'infection à CMV en greffe rénale.

Bibliographie

1. Yang, C. W., Y. O. Kim, Y. S. Kim, S. Y. Kim, I. S. Moon, H. J. Ahn, Y. B. Koh, and B. K. Bang. 1998. Clinical course of cytomegalovirus (CMV) viremia with and without ganciclovir treatment in CMV-seropositive kidney transplant recipients. Longitudinal follow-up of CMV pp65 antigenemia assay. *Am. J. Nephrol.* 18: 373–378.
2. Toupance, O., M. C. Bouedjoro-Camus, J. Carquin, J. L. Novella, S. Lavaud, A. Wynckel, D. Jolly, and J. Chanard. 2000. Cytomegalovirus-related disease and risk of acute rejection in renal transplant recipients: a cohort study with case-control analyses. *Transpl. Int. Off. J. Eur. Soc. Organ Transplant.* 13: 413–419.
3. Sagedal, S., K. P. Nordal, A. Hartmann, M. Degré, E. Holter, A. Foss, K. Osnes, T. Leivestad, P. Fauchald, and H. Rollag. 2000. A prospective study of the natural course of cytomegalovirus infection and disease in renal allograft recipients. *Transplantation* 70: 1166–1174.
4. Coupel, S., A. Moreau, M. Hamidou, V. Horejsi, J.-P. Soulillou, and B. Charreau. 2007. Expression and release of soluble HLA-E is an immunoregulatory feature of endothelial cell activation. *Blood* 109: 2806–2814.
5. Zwirner, N. W., M. A. Fernández-Viña, and P. Stastny. 1998. MICA, a new polymorphic HLA-related antigen, is expressed mainly by keratinocytes, endothelial cells, and monocytes. *Immunogenetics* 47: 139–148.
6. Chalupny, N. J., A. Rein-Weston, S. Dosch, and D. Cosman. 2006. Down-regulation of the NKG2D ligand MICA by the human cytomegalovirus glycoprotein UL142. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 346: 175–181.
7. Zou, Y., W. Bresnahan, R. T. Taylor, and P. Stastny. 2005. Effect of human cytomegalovirus on expression of MHC class I-related chains A. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 174: 3098–3104.
8. Zhang, Y., A. M. Lazaro, B. Lavingia, and P. Stastny. 2001. Typing for all known MICA alleles by group-specific PCR and SSOP. *Hum. Immunol.* 62: 620–631.
9. Tonnerre, P., N. Gérard, M. Chatelais, C. Poli, S. Allard, S. Cury, C. Bressollette, A. Cesbron-Gautier, and B. Charreau. 2013. MICA Variant Promotes Allosensitization after Kidney Transplantation. *J. Am. Soc. Nephrol. JASN*.
10. Djaoud, Z., G. David, C. Bressollette, C. Willem, P. Rettman, K. Gagne, N. Legrand, S. Mehlal, A. Cesbron, B.-M. Imbert-Marcille, and C. Retière. 2013. Amplified NKG2C+ NK Cells in Cytomegalovirus (CMV) Infection Preferentially Express Killer Cell Ig-like Receptor 2DL: Functional Impact in Controlling CMV-Infected Dendritic Cells. *J. Immunol. Baltim. Md 1950*.
11. Le Bas-Bernardet, S., M. Hourmant, S. Coupel, J.-D. Bignon, J.-P. Soulillou, and B. Charreau. 2003. Non-HLA-type endothelial cell reactive alloantibodies in pre-transplant sera of kidney recipients trigger apoptosis. *Am. J. Transplant. Off. J. Am. Soc. Transplant. Am. Soc. Transpl. Surg.* 3: 167–177.
12. Imbert-Marcille, B. M., N. Robillard, A. S. Poirier, M. Coste-Burel, D. Cantarovich, N. Milpied, and S. Billaudel. 1997. Development of a method for direct quantification of cytomegalovirus antigenemia by flow cytometry. *J. Clin. Microbiol.* 35: 2665–2669.
13. David, G., M. Morvan, K. Gagne, N. Kerdudou, C. Willem, A. Devys, M. Bonneville, G. Folléa, J.-D. Bignon, and C. Retière. 2009. Discrimination between the main activating and inhibitory killer cell immunoglobulin-like receptor positive natural killer cell subsets using newly characterized monoclonal antibodies. *Immunology* 128: 172–184.
14. Frohn, C., P. Schlenke, B. Ebel, C. Dannenberg, G. Bein, and H. Kirchner. 1998. DNA typing for natural killer cell inhibiting HLA-Cw groups NK1 and NK2 by PCR-SSP. *J. Immunol. Methods* 218: 155–160.
15. Cosman, D., J. Müllberg, C. L. Sutherland, W. Chin, R. Armitage, W. Fanslow, M. Kubin, and N. J. Chalupny. 2001. ULBPs, novel MHC class I-related molecules, bind to CMV glycoprotein UL16 and stimulate NK cytotoxicity through the NKG2D receptor. *Immunity* 14: 123–133.

16. Stern-Ginossar, N., N. Elefant, A. Zimmermann, D. G. Wolf, N. Saleh, M. Biton, E. Horwitz, Z. Prokocimer, M. Prichard, G. Hahn, D. Goldman-Wohl, C. Greenfield, S. Yagel, H. Hengel, Y. Altuvia, H. Margalit, and O. Mandelboim. 2007. Host immune system gene targeting by a viral miRNA. *Science* 317: 376–381.
17. Gumá, M., A. Angulo, C. Vilches, N. Gómez-Lozano, N. Malats, and M. López-Botet. 2004. Imprint of human cytomegalovirus infection on the NK cell receptor repertoire. *Blood* 104: 3664–3671.
18. Foley, B., S. Cooley, M. R. Verneris, M. Pitt, J. Curtsinger, X. Luo, S. Lopez-Vergès, L. L. Lanier, D. Weisdorf, and J. S. Miller. 2012. Cytomegalovirus reactivation after allogeneic transplantation promotes a lasting increase in educated NKG2C⁺ natural killer cells with potent function. *Blood* 119: 2665–2674.
19. Béziat, V., L. L. Liu, J.-A. Malmberg, M. A. Ivarsson, E. Sohlberg, A. T. Björklund, C. Retière, E. Sverremark-Ekström, J. Traherne, P. Ljungman, M. Schaffer, D. A. Price, J. Trowsdale, J. Michaëlsson, H.-G. Ljunggren, and K.-J. Malmberg. 2013. NK cell responses to cytomegalovirus infection lead to stable imprints in the human KIR repertoire and involve activating KIRs. *Blood* 121: 2678–2688.
20. Wang, E. C. Y., B. McSharry, C. Retiere, P. Tomasec, S. Williams, L. K. Borysiewicz, V. M. Braud, and G. W. G. Wilkinson. 2002. UL40-mediated NK evasion during productive infection with human cytomegalovirus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 99: 7570–7575.
21. Braud, V. M., D. S. Allan, C. A. O’Callaghan, K. Söderström, A. D’Andrea, G. S. Ogg, S. Lazetic, N. T. Young, J. I. Bell, J. H. Phillips, L. L. Lanier, and A. J. McMichael. 1998. HLA-E binds to natural killer cell receptors CD94/NKG2A, B and C. *Nature* 391: 795–799.
22. Vivier, E. 2006. What is natural in natural killer cells? *Immunol. Lett.* 107: 1–7.
23. Michaëlsson, J., C. Teixeira de Matos, A. Achour, L. L. Lanier, K. Kärre, and K. Söderström. 2002. A signal peptide derived from hsp60 binds HLA-E and interferes with CD94/NKG2A recognition. *J. Exp. Med.* 196: 1403–1414.
24. Wilkinson, G. W. G., P. Tomasec, R. J. Stanton, M. Armstrong, V. Prod’homme, R. Aicheler, B. P. McSharry, C. R. Rickards, D. Cochrane, S. Llewellyn-Lacey, E. C. Y. Wang, C. A. Griffin, and A. J. Davison. 2008. Modulation of natural killer cells by human cytomegalovirus. *J. Clin. Virol. Off. Publ. Pan Am. Soc. Clin. Virol.* 41: 206–212.
25. Heatley, S. L., G. Pietra, J. Lin, J. M. L. Widjaja, C. M. Harpur, S. Lester, J. Rossjohn, J. Szer, A. Schwarzer, K. Bradstock, P. G. Bardy, M. C. Mingari, L. Moretta, L. C. Sullivan, and A. G. Brooks. 2013. Polymorphism in human cytomegalovirus UL40 impacts on recognition of human leukocyte antigen-E (HLA-E) by natural killer cells. *J. Biol. Chem.* 288: 8679–8690.
26. Foley, B., S. Cooley, M. R. Verneris, M. Pitt, J. Curtsinger, X. Luo, S. Lopez-Vergès, L. L. Lanier, D. Weisdorf, and J. S. Miller. 2012. Cytomegalovirus reactivation after allogeneic transplantation promotes a lasting increase in educated NKG2C⁺ natural killer cells with potent function. *Blood* 119: 2665–2674.
27. Stern, M., H. Elsässer, G. Hönger, J. Steiger, S. Schaub, and C. Hess. 2008. The number of activating KIR genes inversely correlates with the rate of CMV infection/reactivation in kidney transplant recipients. *Am. J. Transplant. Off. J. Am. Soc. Transplant. Am. Soc. Transpl. Surg.* 8: 1312–1317.
28. Charoudeh, H. N., G. Terszowski, K. Czaja, A. Gonzalez, K. Schmitter, and M. Stern. 2013. Modulation of the natural killer cell KIR repertoire by cytomegalovirus infection. *Eur. J. Immunol.* 43: 480–487.

DISCUSSION ET PERSPECTIVES

Dans le contexte de la greffe allogénique de CSH, l'alloréactivité des cellules NK peut être bénéfique pour le devenir de la greffe par son effet anti-leucémique. Au cours de la reconstitution hématopoïétique, les cellules NK, présentes en très grand nombre, sont ainsi très importantes pour leur rôle antitumoral mais aussi, en l'absence des lymphocytes T, pour contrôler la réactivation du CMV qui peut compromettre le devenir de la greffe. De même, la réactivation du CMV est un problème majeur en greffe de rein et le rôle des cellules NK pourrait être également important dans ce contexte.

Au cours de ce travail de thèse, j'ai orienté mes recherches vers une meilleure compréhension du rôle des récepteurs KIR dans l'alloréactivité des cellules NK, dans un contexte d'infection à CMV. Peu de travaux sont publiés dans ce domaine. López-Botet et ses collaborateurs ont rapporté, il y a quelques années, une expansion des cellules NK NKG2C⁺ chez les individus séropositifs pour le CMV (Gumá et al. 2004). Plus tard, d'autres travaux ont décrit une expansion des cellules NK NKG2C⁺, exprimant les récepteurs KIR spécifiques du soi, chez les individus CMV⁺ (Gumá et al. 2004 ; Foley et al. 2012 ; Béziat et al. 2012 ; Béziat et al. 2013). Dans l'allogreffe de CSH, il semblerait que la réactivation du CMV soit associée à une expansion de cellules NK NKG2C⁺KIR⁺ capables de mieux contrôler l'infection (Foley, Cooley, Verneris, Pitt, et al. 2012). Cependant, la contribution des récepteurs KIR au contrôle cellulaire de l'infection à CMV est mal connue.

Pour identifier les récepteurs KIR exprimés sur les cellules NK NKG2C⁺ amplifiées chez les individus CMV⁺, nous avons réalisé des études phénotypiques sur notre cohorte de donneurs de sang de l'EFS-PL. Ensuite, afin d'étudier l'alloréactivité des cellules NK dans un contexte allogénique d'infection à CMV et d'évaluer les implications fonctionnelles en greffe de CSH ou en greffe de rein, nous avons mis en place différentes approches *in vitro*, complémentaires, basées sur l'utilisation d'iDC ou de cellules endothéliales infectées par le CMV. Une autre approche, visant à amplifier les cellules NK dans un modèle mimant la reconstitution hématopoïétique, a également été développée en utilisant des

lignées B-EBV exprimant de façon stable les protéines immunodominantes du CMV, IE1 et pp65.

L'évaluation du potentiel cytotoxique des cellules NK vis-à-vis des iDC nous a permis de soulever des aspects mécanistiques KIR-HLA que nous avons également approfondis sur un plan phénotypique et fonctionnel.

Nos études phénotypiques ont montré que le récepteur KIR2DL3 est co-exprimé avec le récepteur NKG2C sur les cellules NK amplifiées d'individus CMV⁺, quelque soit l'environnement HLA autologue. Le KIR2DL1, quant à lui, est exprimé sur les cellules NK NKG2C⁺ uniquement dans un environnement HLA-C2. Une expression fréquente des récepteurs KIR3DL1 ou KIR3DS1 sur les cellules NK NKG2C⁺ KIR2DL3⁺ a été observée indépendamment de la nature de l'environnement HLA-B. Nous avons aussi montré que l'expression des récepteurs KIR2D sur les cellules NK est indispensable pour une meilleure dégranulation et production d'IFN- γ au contact des iDC allogéniques infectées par le CMV. En effet, le blocage de ces récepteurs inhibe de façon conséquente la dégranulation des cellules NK KIR2D⁺ au contact des iDC infectées par le virus. Ces résultats sont conformes à ceux de B. Foley qui a montré que la présence des récepteurs KIR sur les cellules NK NKG2C⁺ est requise pour une forte production d'IFN- γ dans l'infection à CMV (Foley, Cooley, Verneris, Pitt, et al. 2012).

Ces données préliminaires nous ont conduits à étudier l'alloréactivité des populations lymphocytaires NK KIR2DL1⁺ HLA-C2⁺ et NK KIR2DL3⁺ HLA-C1⁺ dans l'infection à CMV. Pour ce faire, des études de dégranulation, contre des cibles iDC C1C1 ou C2C2 infectées ou non par le CMV, ont été réalisées à partir de ces populations NK KIR⁺ triées et amplifiées *in vitro*. Comme attendu, les cellules NK KIR2DL1⁺ sont inhibées par les iDC C2C2 mais présentent une forte alloréactivité face aux iDC C1C1. Cependant, de façon inattendue, aussi bien les iDC C1C1 que les iDC C2C2 sont capables d'inhiber la dégranulation des cellules NK KIR2DL3⁺. De plus, le blocage des molécules HLA-Cw sur les iDC C2C2 lève cette inhibition. Ces données, suggérant une reconnaissance de certaines molécules HLA-C2 par le récepteur KIR2DL3, ont été confirmées dans l'étude des spécificités des principaux récepteurs KIR2D que nous avons réalisée au laboratoire, et corroborées par les travaux de Parham et ses collaborateurs qui

ont montré que les récepteurs KIR2DL2/KIR2DL3 peuvent reconnaître certaines molécules HLA-Cw appartenant au groupe C2 (Moesta et al. 2008).

L'infection des iDC par le CMV induit une baisse de l'expression des molécules HLA-Cw à leur surface. Ainsi, les iDC C2C2 infectées par le virus activent significativement les cellules NK KIR2DL1⁺ mais aussi les cellules NK KIR2DL3⁺. Ces résultats peuvent expliquer en partie l'expression de ces récepteurs KIR sur les cellules NK NKG2C⁺ amplifiées chez les individus séropositifs pour le CMV. En effet, il est bien probable qu'au cours de l'infection à CMV, les cellules NK capables de reconnaître les molécules HLA-E et le «soi manquant» soient mobilisées en périphérie et subissent une expansion clonale pour mieux contrôler l'infection. Ceci est corroboré par les résultats d'une étude récente montrant que, suite à une greffe de sang de cordon ombilical, la réactivation du CMV induit la maturation des cellules NK, qui expriment rapidement les récepteurs NKG2C et KIR (Della Chiesa et al. 2012).

De façon intéressante, l'alloréactivité des cellules NK KIR2DL1⁺ face aux iDC C1C1 est maintenue dans l'infection à CMV. En revanche, dans toutes les expériences réalisées, les iDC C1C1 infectées par le virus ne sont pas capables d'activer les cellules NK KIR2DL3⁺. Ce dernier résultat suggère un éventuel mécanisme d'échappement du CMV à la reconnaissance par les cellules NK KIR2DL3⁺. Cette dernière hypothèse n'est pas à exclure car la pression immunologique exercée par ces cellules peut être suffisamment importante pour que le virus tente de s'adapter à son environnement. Aussi, le récepteur KIR2DL3, lorsqu'il est présent dans un environnement HLA-C1, semble impliqué dans l'élimination du virus de l'hépatite C. D'après Khakoo, l'interaction, relativement faible, du KIR2DL3 avec son ligand HLA-C1 serait plus protectrice contre l'infection à HCV car le signal inhibiteur qu'elle délivre est plus facilement dominé par les autres signaux activateurs (Khakoo et al. 2004). De ce fait, il serait possible que, contrairement au HCV, le CMV ait réussi à développer un mécanisme pour renforcer l'interaction KIR2DL3:HLA-C1. Cela pourrait être, par exemple, la présentation d'un peptide viral à la surface des molécules HLA-C1. En effet, la modulation de l'interaction des récepteurs KIR inhibiteurs avec leurs ligands par des peptides viraux a été déjà rapportée pour d'autres virus (Hansasuta et al. 2004 ; Stewart-Jones et al. 2005 ; Colantonio et al. 2011 ; Fadda

et al. 2012). Par ailleurs, il n'est pas exclu que les cellules NK KIR2DL3⁺ puissent mieux répondre à l'infection précocement au cours du cycle réplcatif du CMV. Le potentiel cytotoxique des cellules NK KIR2DL3⁺ qui, comme nous l'avons montré, peuvent reconnaître le «soi-manquant» indépendamment de l'environnement HLA-C autologue dans lequel elles ont évolué, peut être plus important *in vivo*, dans un environnement cytokinique lié à l'infection.

Nos résultats suggèrent ainsi une contribution fonctionnelle des récepteurs KIR2D, en particulier KIR2DL1 et KIR2DL3, dans le contrôle de l'infection à CMV chez les receveurs C2⁺, suite à une allogreffe de CSH. L'alloréactivité de ces cellules dans ce contexte pourrait aussi avoir un effet GvL bénéfique pour le devenir de la greffe. Les cellules NK KIR2DL1⁺, issues de donneurs C2⁺, sont très alloréactives chez un receveur C1⁺ et cette alloréactivité est maintenue avec l'infection. En revanche, les cellules NK KIR2DL3⁺ semblent incapables de contrôler l'infection dans ce contexte allogénique. Ce travail ouvre ainsi un champ d'investigation dont l'objet sera de déterminer les mécanismes moléculaires par lesquels le virus échappe à la reconnaissance par les cellules NK KIR2DL3⁺ dans un environnement HLA-C1.

Par ailleurs, le rôle des récepteurs KIR activateurs dans le contrôle de l'infection à CMV reste à explorer. Malmberg KJ et ses collaborateurs ont décrit une expansion des cellules NK exprimant les récepteurs KIR activateurs (KIR2DS2, KIR2DS4 et KIR3DS1) chez les individus CMV⁺ (Béziat, Liu, et al. 2013a). Cependant, la contribution de ces récepteurs au contrôle cellulaire de l'infection n'est pas connue. Nous avons montré que les cellules NK KIR2DS2⁺/L2⁻ sont alloréactives vis-à-vis de cibles exprimant les molécules HLA-C1, et que cette alloréactivité augmente en présence du récepteur inhibiteur KIR2DL1. Il serait ainsi intéressant d'évaluer le potentiel cytotoxique des cellules NK KIR2DS2⁺/L2⁻/L1⁻ et NK KIR2DS2⁺/L2⁻/L1⁺ vis-à-vis d'iDC C1C1 infectées par le CMV. En effet, l'interaction du récepteur KIR2DS2 avec les molécules HLA-C1 pourrait être renforcée dans un contexte infectieux.

Le rôle des récepteurs KIR3DL1/S1 dans la lutte antivirale semble tout aussi prépondérant, notamment dans l'infection au VIH (Martin et al. 2002 ; A López-Vázquez et al. 2005 ; Barbour et al. 2007 ; Martin et al. 2007 ; Boulet, Sharafi, et al. 2008 ; Boulet, Kleyman, et al. 2008). Il serait par conséquent important

d'étudier le rôle de ces récepteurs dans le contrôle de l'infection à CMV, dans nos conditions expérimentales.

L'étude NK-iDC a soulevé plusieurs questions mécanistiques concernant notamment la reconnaissance des molécules HLA-Cw du groupe C2 par le récepteur KIR2DL3. De ce fait, parce que nous avons généré au laboratoire des anticorps monoclonaux qui nous permettent de discriminer les récepteurs KIR activateurs des inhibiteurs (David et al. 2009), nous avons revisité la spécificité des principaux récepteurs KIR2DL, mais aussi caractérisé celle de l'activateur KIR2DS2 et l'impact de ces spécificités et de l'environnement HLA autologue sur la formation du répertoire KIR2D. Ainsi, à partir de clones ou lignées cellulaires NK KIR2DS2⁺ KIR2DL⁺ ou NK KIR2DS2⁺ KIR2DL⁻, nous avons montré que le KIR2DS2 peut interagir avec une molécule HLA-Cw du groupe C1. Nos résultats concernant les KIR2DL2 et KIR2DL3 sont en accord avec ceux observés dans l'étude NK-iDC et d'autres travaux montrant que ces récepteurs peuvent reconnaître des molécules HLA-Cw des groupes C1 et C2 (Winter et al. 1998 ; Maenaka et al. 1999 ; Moesta et al. 2008 ; Gendzekhadze et al. 2009). Parmi les molécules HLA-Cw utilisées dans l'étude (HLA-Cw4, -Cw2, -Cw6 et -Cw15), HLA-Cw4 semble interagir le plus fortement avec les récepteurs KIR2DL2 et KIR2DL3. Par ailleurs, les cellules NK KIR2DL2/3⁺ activées sont capables de reconnaître le «soi manquant» quelque soit l'environnement HLA-C autologue dans lequel elles ont évolué. Il est important de souligner ici que ces résultats ne contredisent pas ceux de Anfossi *et al.* qui décrivent une éducation fonctionnelle des cellules NK KIR2DL3⁺ uniquement dans un environnement C1⁺ (Anfossi et al. 2006). Nous avons aussi observé cette éducation fonctionnelle, dans des tests de dégranulation et de production d'IFN- γ , faits à partir de cellules NK KIR2DL2/3⁺ C1⁺ fraîchement isolées, et donc non activées. En effet, dans les expériences réalisées à partir de cellules NK stimulées et activées *in vitro*, les faibles interactions des récepteurs KIR2DL2 et KIR2DL3, avec leurs ligands spécifiques, pourraient être renforcées et stabilisées dans des synapses immunologiques engageant des récepteurs de costimulation induits par cet état d'activation. Cette théorie a été appuyée par des expériences montrant que les cellules NK KIR2DL2⁺ et NK KIR2DL3⁺ amplifiées, après stimulation avec une lignée B221

dépourvues de molécules HLA de classe I, sont aussi capables de reconnaître le «soi-manquant» ou d'être inhibées par des cibles exprimant les molécules HLA-C1 ou C2.

Ce point essentiel nous permet de suggérer une fois de plus l'importance du récepteur KIR2DL3, mais aussi celle du KIR2DL2, dans la réactivité des cellules NK dans des contextes d'activation, comme cela peut être le cas au cours d'immunopathologies ou de greffes allogéniques.

Certains travaux sur la caractérisation des ligands des récepteurs KIR2D ont été réalisés à partir de protéines KIR solubles ou bien, à partir de cellules transfectées avec des ADNc codant les récepteurs KIR ou des vecteurs viraux, comme le virus de la vaccine. Dans ces études, les récepteurs KIR2DS ne sont capables de reconnaître aucune molécule HLA-Cw (Winter et al. 1998). La discordance de ces données avec les nôtres pourrait s'expliquer par le fait que, dans notre modèle, les interactions entre les cellules NK et leurs cibles cellulaires, engageant les récepteurs KIR2D, peuvent avoir une avidité relativement plus forte.

Nous avons suggéré que le récepteur KIR2DS2 a une plus faible affinité pour les molécules HLA-C1 que son homologue KIR2DL2 inhibiteur. Cependant, en l'absence de ce dernier, l'engagement du KIR2DS2 avec une molécule HLA-C1 suffit pour activer les cellules NK. Ces résultats sont corroborés par une autre étude qui a décrit une interaction très faible mais détectable de tétramères KIR2DS2 avec les molécules HLA-C1 (Stewart et al. 2005). De même, comme nous l'avons vu dans la section «*Les cellules NK et l'autoimmunité*», un risque de développement du diabète de type I est associé à la présence du gène KIR2DS2 et de HLA-C1 en l'absence de HLA-C2 et HLA-Bw4 (van der Slik et al. 2003).

La large spécificité des récepteurs KIR2DL2 et KIR2DL3 pour les molécules HLA-Cw, comparativement à celle de KIR2DL1, pourrait expliquer leur expression prédominante dans le répertoire KIR2D. KIR2DL1 est fortement représenté dans un environnement C2C2, en présence du KIR2DL3, mais est moins représenté en présence des KIR2DL2 et KIR2DS2. Ceci nous permet de suggérer, comme Uhrberg *et al* (Schönberg et al. 2011), que parce que c'est un récepteur d'assez forte affinité pour les ligands C2, le KIR2DL2 est aussi un bon compétiteur pour le KIR2DL1. De plus, la fréquence des cellules NK KIR2DS1⁺ est inversement

corrélée à celle des cellules NK KIR2DL1⁺. Ainsi, dans un environnement C2⁺, tous ces récepteurs KIR2D sont fonctionnels. Leurs affinités pour les molécules HLA-Cw déterminent donc en partie la formation du répertoire NK KIR2D. Par ailleurs, chez les individus qui n'expriment pas le KIR2DL1, nous avons observé une augmentation significative de la fréquence des cellules NK KIR2DL2/3/2DS2⁺, suggérant un ajustement homéostatique de la distribution des KIR2D. Ces données proposent une acquisition continue des KIR qui peut être fonction de l'environnement HLA-C mais aussi de l'expression cellulaire des différents KIR2D. Ceci ne correspond pas au modèle d'acquisition séquentielle des KIR, avec l'acquisition du KIR2DL2 avant celle du KIR2DL1 (Schönberg et al. 2011). Miller et McCullar ont montré dans un modèle d'étude *in vitro* du développement des cellules NK à partir de CSH issues de sang de cordon ombilical, que les cellules NK différenciées exprimaient préférentiellement les KIR2DL2/3 et le KIR2DS2 et que cette expression devait être génétiquement programmée car elle a été observée dans toutes les expériences réalisées. Ces auteurs montrent que l'acquisition de ces KIR nécessite un contact avec les cellules stromales et des cytokines, comme l'IL-2 et l'IL-15, mais ne requiert pas la présence des molécules HLA de classe I. D'après eux, l'expression des KIR serait stable mais dynamique car de nouveaux récepteurs sont acquis au fil du temps. (J S Miller and McCullar 2001). La modulation des interactions KIR:HLA-Cw avec des peptides du soi, ou issus de protéines virales, peut être un argument supplémentaire pour une acquisition continue des KIR qui dépend aussi du contexte immunopathologique dans lequel évoluent les cellules NK. L'expansion de la population cellulaire NK NKG2C⁺ KIR2DL3⁺ dans l'infection à CMV pourrait en être un bon exemple.

Dans une étude récente, nous avons montré l'impact de la nature et des combinaisons des allèles KIR3DL1 sur la formation du répertoire NK KIR3DL1⁺. Nous y avons aussi suggéré une acquisition séquentielle des KIR3D avant celle des KIR2D (Gagne et al. 2013). Il serait ainsi probable que la formation du répertoire KIR2D soit également influencée par le polymorphisme KIR2DL. Par ailleurs, ce travail ouvre comme perspective l'investigation de l'impact des différents allèles KIR3DL1 sur la formation du répertoire cellulaire NK KIR2D⁺.

Les données rapportées ici peuvent contribuer à l'établissement des règles de l'alloréactivité des cellules NK impliquant les récepteurs KIR2D et les molécules HLA-Cw, et à la définition des critères permettant de sélectionner les donneurs de CSH, en fonction des combinaisons KIR/HLA bénéfiques pour le devenir de la greffe (Loredana Ruggeri et al. 2006).

Pour étudier la contribution des récepteurs KIR au contrôle de l'infection à CMV par les cellules NK, et pouvoir éventuellement expliquer certains résultats observés dans l'étude NK-iDC, nous avons développé une deuxième approche expérimentale qui consistait à évaluer l'impact des deux protéines immunodominantes du CMV, IE1 et pp65, sur la prolifération des cellules NK KIR⁺. Pour cela, des PBMC ont été stimulées *in vitro* avec les lignées B-EBV LeP (C1C2) et CoL (C1C2) et les mêmes lignées, LeP-IE1 et CoL-pp65, transfectées de façon stable avec les deux protéines virales et utilisées antérieurement pour étudier le répertoire T CD8⁺ spécifique de ces protéines (Retière et al. 2000). Grâce à des combinaisons d'anticorps spécifiques des récepteurs KIR, nous avons évalué les pourcentages des différentes sous-populations NK KIR⁺ par cytométrie en flux à J0, J6, J10 et J15 pour chaque stimulation. De la même façon, les fréquences des cellules NK (CD3⁻ CD56⁺) et leur nombre absolu ont également été déterminés pour chaque condition expérimentale. Ce modèle d'amplification des cellules NK a été antérieurement validé dans notre laboratoire au cours d'une étude de l'alloréactivité des cellules NK KIR2DS1⁺ afin de mimer l'amplification des cellules NK en post-greffe de CSH (Morvan et al. 2008). Ainsi, après deux semaines de culture cellulaire, la majorité des cellules amplifiées sont CD3⁻ CD56⁺ dans toutes les conditions expérimentales. La présence de la protéine virale IE1 ne semble pas affecter la prolifération des cellules NK et les fréquences des populations NK KIR⁺. En revanche, la lignée CoL-pp65 inhibe très significativement la prolifération des cellules NK, en particulier la population NK KIR2DL3/S2⁺ KIR2DL2⁻. Parmi les dix individus étudiés, trois ne possèdent pas le gène KIR2DS2. Nous avons alors conclu que la population ciblée par pp65 est la population NK KIR2DL3⁺. Ce résultat a été confirmé avec cinq expériences supplémentaires utilisant notamment les individus qui n'expriment pas le KIR2DS2.

La protéine pp65 présente une séquence d'adressage nucléaire et ne devrait donc pas permettre une interaction directe avec le KIR2DL3 dans la synapse immunologique. Par ailleurs, de nombreuses équipes ont décrit une modulation des interactions KIR:HLA par des peptides, notamment des peptides viraux (Hansasuta et al. 2004 ; Stewart-Jones et al. 2005 ; Colantonio et al. 2011 ; Fadda et al. 2012). Nous avons ainsi émis l'hypothèse d'une présentation d'un peptide, issu de la protéine pp65, sur les molécules HLA-Cw de la lignée CoL-pp65, en l'occurrence HLA-Cw4 (C2) et/ou HLA-Cw7 (C1), augmentant l'affinité du récepteur KIR2DL3 pour ces molécules. Pour vérifier cette hypothèse, nous avons choisi huit peptides pp65 qui ont une affinité pour les molécules HLA-Cw4 ou HLA-Cw7, en utilisant un site de prédiction des peptides pouvant se fixer sur les molécules HLA. Les pourcentages des cellules NK KIR2DL3⁺ ont été ensuite évalués 2 semaines après une stimulation des PBMC (KIR2DS2⁻) avec la lignée CoL-pp65 et la lignée CoL chargée avec les différents peptides sélectionnés. La lignée CoL-pp65 inhibait, l'amplification des cellules NK KIR2DL3⁺ mais aucun peptide n'avait un impact sur la prolifération des cellules NK. L'identification d'un potentiel peptide qui serait responsable du renforcement de l'interaction KIR2DL3:HLA-Cw est une tâche difficile. En effet, la reconnaissance du complexe HLA-C-peptide par les récepteurs KIR semble très dépendante des acides aminés en position 7 et 8 (Stewart et al. 2005 ; Hansasuta et al. 2004 ; Fadda et al. 2012) qui sont le plus souvent une sérine ou une alanine (Boyington et al. 2000).

Ces résultats préliminaires corroborent ceux observés dans l'étude NK-iDC concernant la résistance des iDC C1C1, infectées par le CMV, à la lyse par les cellules NK KIR2DL3⁺. En effet, il semblerait que le CMV ait développé un moyen pour échapper à la reconnaissance par ces dernières.

Pour comprendre le mécanisme par lequel la protéine pp65 inhibe la prolifération des cellules NK KIR2DL3⁺, et évaluer l'influence de l'environnement HLA-C sur cette inhibition, nous avons transfecté des lignées B-EBV homozygotes pour différentes molécules HLA-Cw (C1 et C2) avec le plasmide pRC/CMVpp65 (Retière et al, 2000). De la même façon, pour déterminer si la protéine pp65 interagit directement avec le KIR2DL3 ou si l'interaction nécessite une présentation peptidique sur les molécules HLA-Cw, des cellules B221, dépourvues de molécules HLA de classe I, seront transfectées avec le même

plasmide et intégrées à des études de la fonctionnalité des cellules NK KIR2DL3⁺ (dégranulation, production d'IFN- γ et prolifération), après stimulation avec les différentes cibles exprimant ou non la protéine pp65.

Par ailleurs, il a été montré que la protéine pp65 inhibe les cellules NK en interagissant avec le récepteur activateur NKp30 (Tal I Arnon et al. 2005b). De ce fait, pour ne pas biaiser les résultats, il serait impératif de réaliser les expériences en bloquant cette interaction ou en ciblant les cellules NK KIR2DL3⁺ NKp30⁻.

L'alloréactivité des cellules NK dans l'infection à CMV pourrait être influencée par la nature des cibles allogéniques infectées par le virus. En effet, les iDC expriment peu de molécules HLA-E et n'expriment pas les protéines de stress MICA ou MICB. Par conséquent, dans le modèle NK-iDC, nous avons privilégié l'étude des interactions KIR:HLA. Cependant, dans le contexte de la transplantation rénale, les cellules endothéliales sont des cibles du CMV et expriment de façon constitutive les molécules HLA-E et MICA. Nous avons ainsi développé, en collaboration avec le Dr Béatrice Charreau, un modèle *in vitro* d'infection de cellules endothéliales primaires (HAEC), prélevées sur des aortes de donneurs de rein. Ce modèle est pertinent car il nous permet d'explorer trois principales voies d'activation des cellules NK: le soi induit par le stress cellulaire (interaction NKG2D:MICA), le non-soi infectieux (interaction NKG2C:HLA-E-peptide viral) et le «soi manquant» (interaction KIR2DL:HLA-I).

Par ailleurs, le MICA.A5.1 est une forme mutée de MICA qui est fortement exprimée sur les HAEC MICA.A5.1^{+/+} et qui n'est pas affectée par la protéine virale UL142 (Zou et al. 2005). Ces données ont été confirmées par nos analyses phénotypiques des HAEC MICA.A5.1^{+/+} et MICA.A5.1^{-/-}, infectées ou non par le CMV. Les études de dégranulation montrent une activation faible mais reproductible, des cellules NK NKG2D⁺ par les HAEC infectées par le CMV. Cette activation semble légèrement plus significative vis-à-vis des HAEC MICA.A5.1^{+/+}, avec un rapport effecteur/cible élevé. Des expériences supplémentaires avec un blocage de l'interaction NKG2D/MICA.A5.1 seront menées pour confirmer ces résultats préliminaires et déterminer l'importance de cette interaction dans le contrôle des HAEC infectées par le CMV.

Ces données suggèrent une meilleure capacité à contrôler la réactivation du CMV chez les patients ayant subi des greffes de rein à partir de donneurs porteurs de la forme MICA A5.1. Ce travail nous offre comme perspective la réalisation d'une étude rétrospective sur une cohorte nantaise, en collaboration avec le Pr Hourmant, le Dr Charreau et le Dr Bressollette, à partir des données cliniques et sérologiques des receveurs de reins ayant eu ou non une réactivation à CMV, tout en tenant compte du polymorphisme MICA des couples donneurs/receveurs.

Contrairement au modèle NK-iDC où nous avons montré que les iDC allogéniques infectées par le CMV n'activent pas fortement les cellules NK NKG2C⁺KIR⁻, les HAEC infectées par le virus activent très significativement ces cellules. Ainsi, malgré la «downrégulation» des molécules HLA-E observée à la surface des HAEC après deux et quatre jours d'infection, le nombre de molécules HLA-E exprimées en surface reste suffisant pour activer les cellules NK NKG2C⁺, indépendamment de l'engagement des récepteurs KIR. Ceci n'est pas le cas des iDC qui expriment très faiblement ces molécules. Par ailleurs, le complexe inhibiteur CD94/NKG2A, qui n'est pas, ou peu, co-exprimé avec l'hétérodimère CD94/NKG2C sur les cellules NK, ne peut interférer avec l'interaction CD94/NKG2C-HLA-E. Ces données pourraient expliquer l'amplification des cellules NK NKG2C⁺ chez les individus séropositifs pour le CMV que nous n'avons pas pu comprendre avec le modèle NK-iDC. Pour compléter ces résultats, le polymorphisme de la protéine UL40 de la souche VHL/E utilisée dans le projet sera étudié afin d'identifier la nature du peptide signal présenté sur les molécules HLA-E au cours de l'infection.

L'étude phénotypique des HAEC infectées ou non par le CMV a révélé une diminution drastique des molécules HLA de classe I à la surface des cellules infectées. Pour évaluer la vulnérabilité de ces cellules à la lyse par les cellules NK KIR2DL1⁺ et NK KIR2DL3⁺, des expériences de dégranulation et de production d'IFN- γ ont été réalisées à partir de cellules NK KIR⁺ triées et amplifiées *in vitro*. Les résultats ne sont pas très concluants à l'heure actuelle et nécessitent une étude de l'expression des molécules HLA-Cw sur les HAEC infectées ou non par le CMV afin de mieux comprendre l'impact des interactions KIR2DL:HLA-Cw dans ce modèle cellulaire.

Cette approche cellulaire NK-HAEC nous a permis de montrer une implication plus riche des interactions entre les récepteurs NK et leurs ligands HLA dans le contrôle de l'infection à CMV dans un contexte mimant celui de la greffe rénale. Une étude clinique devrait nous permettre de confirmer les données observées *in vitro* afin d'identifier les marqueurs NK ou HLA prédictifs d'un meilleur contrôle de l'infection à CMV en transplantation rénale.

Les effecteurs NK impliqués dans le contrôle de l'infection à CMV semblent différents en fonction des cibles cellulaires infectées par le virus, qui n'expriment pas les mêmes ligands. Nos travaux suggèrent un rôle majeur des sous-populations NK KIR⁺ dans le contrôle de l'infection à CMV en greffe de CSH, alors que dans le contexte de la transplantation rénale, la population NK NKG2C⁺ amplifiée chez les receveurs CMV⁺ semble plus efficace pour contrôler l'infection. Ces travaux seront poursuivis afin d'appuyer ces données et un intérêt sera porté aux récepteurs KIR activateurs dans le modèle NK-iDC. Nos travaux soulèvent l'impact des génotypes KIR et HLA sur la constitution phénotypique et fonctionnelle du répertoire NK KIR⁺ et montrent la prévalence des récepteurs KIR2DL2/3 et leur large spectre de reconnaissance des molécules HLA-Cw. Les récepteurs KIR peuvent aussi être exprimés sur les lymphocytes T mémoires, et surtout les lymphocytes T spécifiques du CMV. L'impact de l'environnement HLA sur la fonctionnalité des lymphocytes T KIR⁺ n'a jamais été exploré. Aussi, nous poursuivons au laboratoire cette voie d'investigation afin de mieux comprendre le rôle fonctionnel des récepteurs KIR dans le compartiment T.

Une meilleure connaissance des populations NK impliquées dans le contrôle de l'infection à CMV doit permettre de mieux sélectionner les donneurs sur des bases immunogénétiques (KIR, HLA, MICA), afin d'optimiser un effet GvL et antiviral, et ce de façon dépendante de la nature de la greffe puisque le contexte allogénique influe fortement sur la nature des sous-populations NK impliquées dans ce contrôle (fig. 21).

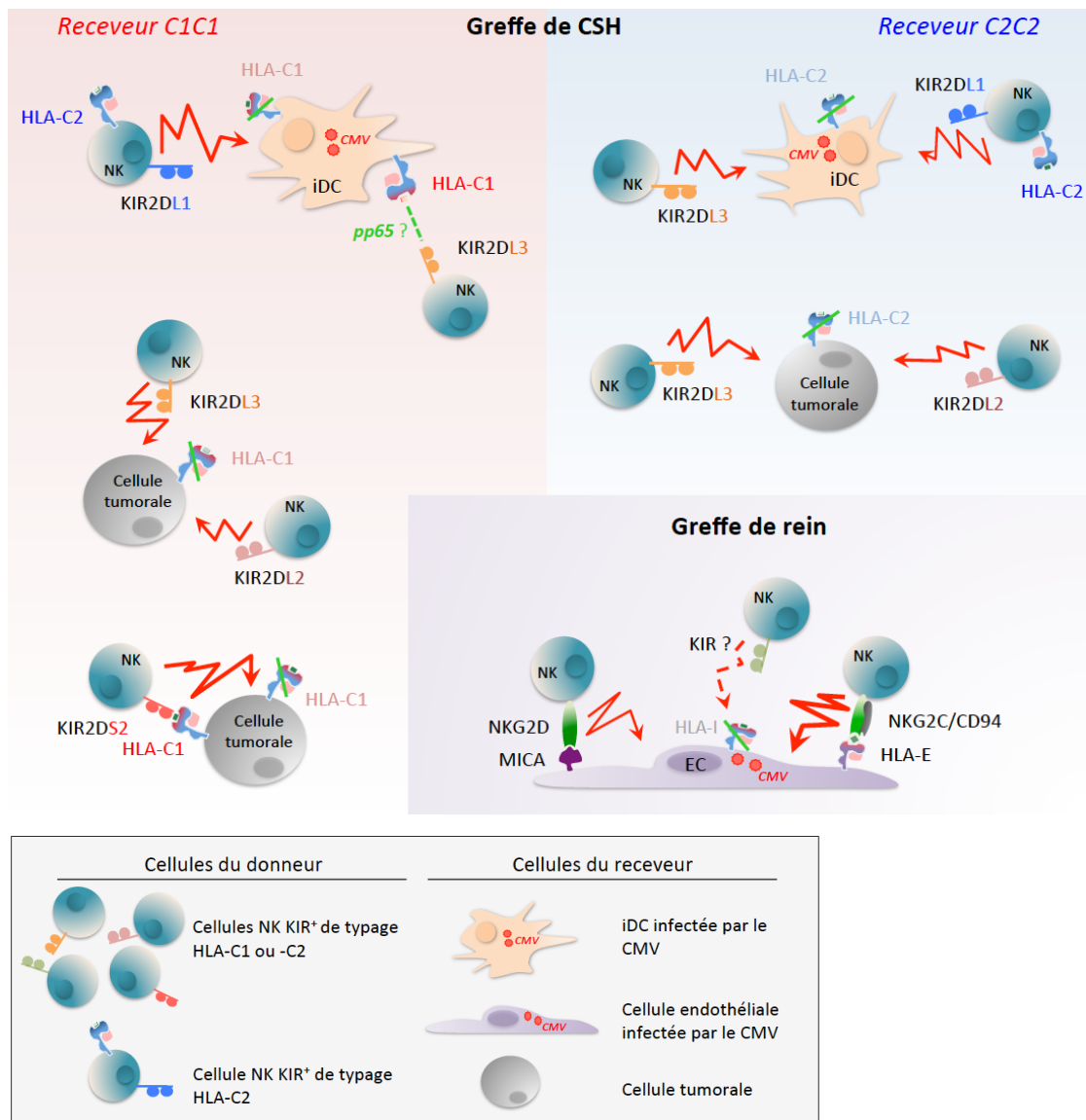


Figure 21 : Alloréactivité des cellules NK en greffes de CSH et de rein, dans l'infection à CMV. Dans la greffe de CSH, les cellules NK KIR2DL3⁺ seraient activées par les iDC infectées par le CMV chez un receveur C2C2, mais ne reconnaîtraient pas les iDC infectées chez un receveur C1C1. L'hypothèse d'un échappement à cette reconnaissance via la protéine pp65 reste à être démontrée. Les cellules NK KIR2DL1⁺ issues d'un donneur C2⁺ seraient activées par les iDC infectées par le CMV chez un receveur C2C2 et leur alloréactivité vis-à-vis des iDC chez un receveur C1C1 ne serait pas modulée par l'infection. Les cellules NK KIR2DL2⁺ et NK KIR2DL3⁺ seraient alloréactives vis-à-vis des cellules tumorales qui présentent une «downrégulation» des molécules HLA-Cw, aussi bien chez un receveur C1C1 que chez un receveur C2C2, et ce indépendamment de l'environnement HLA autologue dans lequel ces cellules ont évolué. L'engagement du récepteur KIR2DS2 avec une molécule HLA-C1 chez un receveur C1C1 pourraient augmenter l'alloréactivité des cellules NK KIR2DS2⁺ KIR2DL2⁻ vis-à-vis des cellules tumorales chez un receveur C1⁺. Dans la greffe de rein, les cellules NK NKG2C⁺ seraient plus alloréactives vis-à-vis de cellules endothéliales infectées par le CMV que les cellules NK NKG2D⁺. L'alloréactivité des cellules NK KIR⁺ dans ce contexte reste à définir.

BIBLIOGRAPHIE

- Ahlenstiel, Golo, Maureen P Martin, Xiaojiang Gao, Mary Carrington, and Barbara Rehermann. 2008. "Distinct KIR/HLA Compound Genotypes Affect the Kinetics of Human Antiviral Natural Killer Cell Responses." *The Journal of Clinical Investigation* 118 (3) (March): 1017–1026. doi:10.1172/JCI32400.
- Ahn, K, A Angulo, P Ghazal, P A Peterson, Y Yang, and K Fröh. 1996. "Human Cytomegalovirus Inhibits Antigen Presentation by a Sequential Multistep Process." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93 (20) (October 1): 10990–10995.
- Aldemir, Hatice, Virginie Prod'homme, Marie-Jeanne Dumaourier, Christelle Retiere, Gwenola Poupon, Julie Cazareth, Franck Bihl, and Veronique M Braud. 2005. "Cutting Edge: Lectin-like Transcript 1 Is a Ligand for the CD161 Receptor." *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 175 (12) (December 15): 7791–7795.
- Aldrich, C J, A DeCloux, A S Woods, R J Cotter, M J Soloski, and J Forman. 1994. "Identification of a Tap-dependent Leader Peptide Recognized by Alloreactive T Cells Specific for a Class Ib Antigen." *Cell* 79 (4) (November 18): 649–658.
- Allan, D S, M Colonna, L L Lanier, T D Churakova, J S Abrams, S A Ellis, A J McMichael, and V M Braud. 1999. "Tetrameric Complexes of Human Histocompatibility Leukocyte Antigen (HLA)-G Bind to Peripheral Blood Myelomonocytic Cells." *The Journal of Experimental Medicine* 189 (7) (April 5): 1149–1156.
- Allard, Mathilde, Romain Oger, Virginie Vignard, Jean-Michel Percier, Giulia Fregni, Aurélie Périer, Anne Caignard, et al. 2011. "Serum Soluble HLA-E in Melanoma: a New Potential Immune-related Marker in Cancer." *PloS One* 6 (6): e21118. doi:10.1371/journal.pone.0021118.
- Alter, Galit, Jessica M Malenfant, and Marcus Altfeld. 2004. "CD107a as a Functional Marker for the Identification of Natural Killer Cell Activity." *Journal of Immunological Methods* 294 (1-2) (November): 15–22. doi:10.1016/j.jim.2004.08.008.
- Alter, Galit, Maureen P Martin, Nickolas Teigen, William H Carr, Todd J Suscovich, Arne Schneidewind, Hendrik Streeck, et al. 2007. "Differential Natural Killer Cell-mediated Inhibition of HIV-1 Replication Based on Distinct KIR/HLA Subtypes." *The Journal of Experimental Medicine* 204 (12) (November 26): 3027–3036. doi:10.1084/jem.20070695.
- Andersson, Sandra, Cyril Fauriat, Jenny-Ann Malmberg, Hans-Gustaf Ljunggren, and Karl-Johan Malmberg. 2009. "KIR Acquisition Probabilities Are Independent of self-HLA Class I Ligands and Increase with Cellular KIR Expression." *Blood* 114 (1) (July 2): 95–104. doi:10.1182/blood-2008-10-184549.
- Anegón, I, M C Cuturi, G Trinchieri, and B Perussia. 1988. "Interaction of Fc Receptor (CD16) Ligands Induces Transcription of Interleukin 2 Receptor (CD25) and Lymphokine Genes and Expression of Their Products in Human Natural Killer Cells." *The Journal of Experimental Medicine* 167 (2) (February 1): 452–472.
- Anfossi, Nicolas, Pascale André, Sophie Guia, Christine S Falk, Sophie Roetynck, C Andrew Stewart, Violette Bresó, et al. 2006. "Human NK Cell Education by

- Inhibitory Receptors for MHC Class I." *Immunity* 25 (2) (August): 331–342. doi:10.1016/j.immuni.2006.06.013.
- Aramburu, J, M A Balboa, A Ramírez, A Silva, A Acevedo, F Sánchez-Madrid, M O De Landázuri, and M López-Botet. 1990. "A Novel Functional Cell Surface Dimer (Kp43) Expressed by Natural Killer Cells and T Cell Receptor-gamma/delta+ T Lymphocytes. I. Inhibition of the IL-2-dependent Proliferation by anti-Kp43 Monoclonal Antibody." *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 144 (8) (April 15): 3238–3247.
- Aranda-Romo, Saray, Christian A Garcia-Sepulveda, Andreu Comas-García, Fernando Lovato-Salas, Mariana Salgado-Bustamante, Alejandro Gómez-Gómez, and Daniel E Noyola. 2012. "Killer-cell Immunoglobulin-like Receptors (KIR) in Severe A (H1N1) 2009 Influenza Infections." *Immunogenetics* 64 (9) (September): 653–662. doi:10.1007/s00251-012-0623-3.
- Arase, Hisashi, Edward S Mocarski, Ann E Campbell, Ann B Hill, and Lewis L Lanier. 2002. "Direct Recognition of Cytomegalovirus by Activating and Inhibitory NK Cell Receptors." *Science (New York, N.Y.)* 296 (5571) (May 17): 1323–1326. doi:10.1126/science.1070884.
- Arnheim, L, J Dillner, and C B Sanjeevi. 2005. "A Population-based Cohort Study of KIR Genes and Genotypes in Relation to Cervical Intraepithelial Neoplasia." *Tissue Antigens* 65 (3) (March): 252–259. doi:10.1111/j.1399-0039.2005.00359.x.
- Arnon, T I, M Lev, G Katz, Y Chernobrov, A Porgador, and O Mandelboim. 2001. "Recognition of Viral Hemagglutinins by NKp44 but Not by NKp30." *European Journal of Immunology* 31 (9) (September): 2680–2689. doi:10.1002/1521-4141(200109)31:9<2680::AID-IMMU2680>3.0.CO;2-A.
- Arnon, Tal I, Hagit Achdout, Ofer Levi, Gal Markel, Nivin Saleh, Gil Katz, Roi Gazit, et al. 2005. "Inhibition of the NKp30 Activating Receptor by Pp65 of Human Cytomegalovirus." *Nature Immunology* 6 (5) (May): 515–523. doi:10.1038/ni1190.
- Artavanis-Tsakonas, Katerina, Konstantina Eleme, Karina L McQueen, Nathalie W Cheng, Peter Parham, Daniel M Davis, and Eleanor M Riley. 2003. "Activation of a Subset of Human NK Cells Upon Contact with Plasmodium Falciparum-infected Erythrocytes." *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 171 (10) (November 15): 5396–5405.
- Ashiru, Omodele, Neil J Bennett, Louise H Boyle, Mair Thomas, John Trowsdale, and Mark R Wills. 2009. "NKG2D Ligand MICA Is Retained in the cis-Golgi Apparatus by Human Cytomegalovirus Protein UL142." *Journal of Virology* 83 (23) (December): 12345–12354. doi:10.1128/JVI.01175-09.
- Askar, Medhat, Robin Avery, Rebecca Corey, Rocio Lopez, Dawn Thomas, Diane Pidwell, Bijan Egtesad, Charles Miller, John Fung, and Nizar N Zein. 2009. "Lack of Killer Immunoglobulin-like Receptor 2DS2 (KIR2DS2) and KIR2DL2 Is Associated with Poor Responses to Therapy of Recurrent Hepatitis C Virus in Liver Transplant Recipients." *Liver Transplantation: Official Publication of the American Association for the Study of Liver Diseases and the International Liver Transplantation Society* 15 (11) (November): 1557–1563. doi:10.1002/lt.21878.

- Back, Jonathan, Emilio L Malchiodi, Sangwoo Cho, Léonardo Scarpellino, Pascal Schneider, Melissa C Kerzic, Roy A Mariuzza, and Werner Held. 2009. "Distinct Conformations of Ly49 Natural Killer Cell Receptors Mediate MHC Class I Recognition in Trans and Cis." *Immunity* 31 (4) (October 16): 598–608. doi:10.1016/j.immuni.2009.07.007.
- Barbour, Jason D, Uma Sriram, Stacy J Caillier, Jay A Levy, Frederick M Hecht, and Jorge R Oksenberg. 2007. "Synergy or Independence? Deciphering the Interaction of HLA Class I and NK Cell KIR Alleles in Early HIV-1 Disease Progression." *PLoS Pathogens* 3 (4) (April): e43. doi:10.1371/journal.ppat.0030043.
- Bauer, S, V Groh, J Wu, A Steinle, J H Phillips, L L Lanier, and T Spies. 1999. "Activation of NK Cells and T Cells by NKG2D, a Receptor for Stress-inducible MICA." *Science (New York, N.Y.)* 285 (5428) (July 30): 727–729.
- Beck, S, and B G Barrell. 1988. "Human Cytomegalovirus Encodes a Glycoprotein Homologous to MHC class-I Antigens." *Nature* 331 (6153) (January 21): 269–272. doi:10.1038/331269a0.
- Becker, Ingeborg, Norma Salaiza, Magdalena Aguirre, José Delgado, Nuria Carrillo-Carrasco, Laila Gutiérrez Kobeh, Adriana Ruiz, et al. 2003. "Leishmania Lipophosphoglycan (LPG) Activates NK Cells through Toll-like Receptor-2." *Molecular and Biochemical Parasitology* 130 (2) (August 31): 65–74.
- Beersma, M F, P M Wertheim-van Dillen, J L Geelen, and T E Feltkamp. 1991. "Expression of HLA Class I Heavy Chains and Beta 2-microglobulin Does Not Affect Human Cytomegalovirus Infectivity." *The Journal of General Virology* 72 (Pt 11) (November): 2757–2764.
- Bennett, I M, O Zatsepina, L Zamai, L Azzoni, T Mikheeva, and B Perussia. 1996. "Definition of a Natural Killer NKR-P1A+/CD56-/CD16- Functionally Immature Human NK Cell Subset That Differentiates in Vitro in the Presence of Interleukin 12." *The Journal of Experimental Medicine* 184 (5) (November 1): 1845–1856.
- Bennett, Neil J, Omodele Ashiru, Fiona J E Morgan, Yin Pang, Georgina Okecha, Rob A Eagle, John Trowsdale, J G Patrick Sissons, and Mark R Wills. 2010. "Intracellular Sequestration of the NKG2D Ligand ULBP3 by Human Cytomegalovirus." *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 185 (2) (July 15): 1093–1102. doi:10.4049/jimmunol.1000789.
- Besson, Caroline, Sophie Roetynck, Fionnuala Williams, Laurent Orsi, Corinne Amiel, Catherine Lependeven, Guillemette Antoni, et al. 2007. "Association of Killer Cell Immunoglobulin-like Receptor Genes with Hodgkin's Lymphoma in a Familial Study." *PloS One* 2 (5): e406. doi:10.1371/journal.pone.0000406.
- Béziat, Vivien, Olav Dalgard, Tarik Asselah, Philippe Halfon, Pierre Bedossa, Ali Boudifa, Baptiste Hervier, et al. 2012. "CMV Drives Clonal Expansion of NKG2C+ NK Cells Expressing Self-specific KIRs in Chronic Hepatitis Patients." *European Journal of Immunology* 42 (2) (February): 447–457. doi:10.1002/eji.201141826.
- Béziat, Vivien, Lisa L Liu, Jenny-Ann Malmberg, Martin A Ivarsson, Ebba Sohlberg, Andreas T Björklund, Christelle Retière, et al. 2013a. "NK Cell Responses to Cytomegalovirus Infection Lead to Stable Imprints in the

- Human KIR Repertoire and Involve Activating KIRs." *Blood* 121 (14) (April 4): 2678–2688. doi:10.1182/blood-2012-10-459545.
- Béziat, Vivien, James A Traherne, Lisa L Liu, Jyothi Jayaraman, Monika Enqvist, Stella Larsson, John Trowsdale, and Karl-Johan Malmberg. 2013b. "Influence of KIR Gene Copy Number on Natural Killer Cell Education." *Blood* (May 1). doi:10.1182/blood-2012-10-461442.
- Bignon, Jean-Denis, and Katia Gagne. 2005. "KIR Matching in Hematopoietic Stem Cell Transplantation." *Current Opinion in Immunology* 17 (5) (October): 553–559. doi:10.1016/j.coi.2005.07.014.
- Binstadt, B A, K M Brumbaugh, C J Dick, A M Scharenberg, B L Williams, M Colonna, L L Lanier, J P Kinet, R T Abraham, and P J Leibson. 1996. "Sequential Involvement of Lck and SHP-1 with MHC-recognizing Receptors on NK Cells Inhibits FcR-initiated Tyrosine Kinase Activation." *Immunity* 5 (6) (December): 629–638.
- Biron, C A, K S Byron, and J L Sullivan. 1989. "Severe Herpesvirus Infections in an Adolescent Without Natural Killer Cells." *The New England Journal of Medicine* 320 (26) (June 29): 1731–1735. doi:10.1056/NEJM198906293202605.
- Bishara, A, D De Santis, C C Witt, C Brautbar, F T Christiansen, R Or, A Nagler, and S Slavin. 2004. "The Beneficial Role of Inhibitory KIR Genes of HLA Class I NK Epitopes in Haploidentically Mismatched Stem Cell Allografts May Be Masked by Residual Donor-alloreactive T Cells Causing GVHD." *Tissue Antigens* 63 (3) (March): 204–211. doi:10.1111/j.0001-2815.2004.00182.x.
- Blankenship, Catherine A, and Thomas Shenk. 2002. "Mutant Human Cytomegalovirus Lacking the Immediate-early TRS1 Coding Region Exhibits a Late Defect." *Journal of Virology* 76 (23) (December): 12290–12299.
- Bloushtain, Noga, Udi Qimron, Ahuva Bar-Ilan, Oren HersHKovitz, Roi Gazit, Eyal Fima, Murray Korc, Israel Vlodavsky, Nicolai V Bovin, and Angel Porgador. 2004. "Membrane-associated Heparan Sulfate Proteoglycans Are Involved in the Recognition of Cellular Targets by NKp30 and NKp46." *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 173 (4) (August 15): 2392–2401.
- Bogner, E, K Radsak, and M F Stinski. 1998. "The Gene Product of Human Cytomegalovirus Open Reading Frame UL56 Binds the Pac Motif and Has Specific Nuclease Activity." *Journal of Virology* 72 (3) (March): 2259–2264.
- Bonagura, Vincent R, Zeying Du, Elham Ashouri, Lihui Luo, Lynda J Hatam, James A DeVoti, David W Rosenthal, et al. 2010. "Activating Killer Cell Immunoglobulin-like Receptors 3DS1 and 2DS1 Protect Against Developing the Severe Form of Recurrent Respiratory Papillomatosis." *Human Immunology* 71 (2) (February): 212–219. doi:10.1016/j.humimm.2009.10.009.
- Borges, L, M L Hsu, N Fanger, M Kubin, and D Cosman. 1997. "A Family of Human Lymphoid and Myeloid Ig-like Receptors, Some of Which Bind to MHC Class I Molecules." *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 159 (11) (December 1): 5192–5196.
- Borrego, F, M Ulbrecht, E H Weiss, J E Coligan, and A G Brooks. 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." *The Journal of Experimental Medicine* 187 (5) (March 2): 813–818.
- Bottino, C, R Biassoni, R Millo, L Moretta, and A Moretta. 2000. "The Human Natural Cytotoxicity Receptors (NCR) That Induce HLA Class I-independent NK Cell Triggering." *Human Immunology* 61 (1) (January): 1–6.
- Bottino, Cristina, Roberta Castriconi, Daniela Pende, Paola Rivera, Marina Nanni, Barbara Carnemolla, Claudia Cantoni, et al. 2003. "Identification of PVR (CD155) and Nectin-2 (CD112) as Cell Surface Ligands for the Human DNAM-1 (CD226) Activating Molecule." *The Journal of Experimental Medicine* 198 (4) (August 18): 557–567. doi:10.1084/jem.20030788.
- Boulet, Salix, Marianna Kleyman, Jenice Yj Kim, Philomena Kamya, Saeid Sharafi, Nancy Simic, Julie Bruneau, Jean-Pierre Routy, Christos M Tsoukas, and Nicole F Bernard. 2008. "A Combined Genotype of KIR3DL1 High Expressing Alleles and HLA-B*57 Is Associated with a Reduced Risk of HIV Infection." *AIDS (London, England)* 22 (12) (July 31): 1487–1491. doi:10.1097/QAD.0b013e3282ffde7e.
- Boulet, Salix, Saeid Sharafi, Nancy Simic, Julie Bruneau, Jean-Pierre Routy, Christos M Tsoukas, and Nicole F Bernard. 2008. "Increased Proportion of KIR3DS1 Homozygotes in HIV-exposed Uninfected Individuals." *AIDS (London, England)* 22 (5) (March 12): 595–599. doi:10.1097/QAD.0b013e3282f56b23.
- Boyington, J C, S A Motyka, P Schuck, A G Brooks, and P D Sun. 2000. "Crystal Structure of an NK Cell Immunoglobulin-like Receptor in Complex with Its Class I MHC Ligand." *Nature* 405 (6786) (June 1): 537–543. doi:10.1038/35014520.
- Brandt, Cameron S, Myriam Baratin, Eugene C Yi, Jacob Kennedy, Zeren Gao, Brian Fox, Betty Haldeman, et al. 2009. "The B7 Family Member B7-H6 Is a Tumor Cell Ligand for the Activating Natural Killer Cell Receptor NKp30 in Humans." *The Journal of Experimental Medicine* 206 (7) (July 6): 1495–1503. doi:10.1084/jem.20090681.
- Braud, V, E Y Jones, and A McMichael. 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) (May): 1164–1169. doi:10.1002/eji.1830270517.
- Braud, V M, D S Allan, C A O'Callaghan, K Söderström, A D'Andrea, G S Ogg, S Lazetic, et al. 1998. "HLA-E Binds to Natural Killer Cell Receptors CD94/NKG2A, B and C." *Nature* 391 (6669) (February 19): 795–799. doi:10.1038/35869.
- Britt, Bill. 2007. "Maturation and Egress." In *Human Herpesviruses: Biology, Therapy, and Immunoprophylaxis*, edited by Ann Arvin, Gabriella Campadelli-Fiume, Edward Mocarski, Patrick S. Moore, Bernard Roizman, Richard Whitley, and Koichi Yamanishi. Cambridge: Cambridge University Press. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK47422/>.
- Brodin, Petter, Klas Kärre, and Petter Höglund. 2009. "NK Cell Education: Not an On-off Switch but a Tunable Rheostat." *Trends in Immunology* 30 (4) (April): 143–149. doi:10.1016/j.it.2009.01.006.

- Brodin, Petter, Tadepally Lakshmikanth, Sofia Johansson, Klas Kärre, and Petter Höglund. 2009. "The Strength of Inhibitory Input During Education Quantitatively Tunes the Functional Responsiveness of Individual Natural Killer Cells." *Blood* 113 (11) (March 12): 2434–2441. doi:10.1182/blood-2008-05-156836.
- Brown, M H, K Boles, P A van der Merwe, V Kumar, P A Mathew, and A N Barclay. 1998. "2B4, the Natural Killer and T Cell Immunoglobulin Superfamily Surface Protein, Is a Ligand for CD48." *The Journal of Experimental Medicine* 188 (11) (December 7): 2083–2090.
- Brune, Mats, Sylvie Castaigne, John Catalano, Kurt Gehlsen, Anthony D Ho, Wolf-Karsten Hofmann, Donna E Hogge, et al. 2006. "Improved Leukemia-free Survival after Postconsolidation Immunotherapy with Histamine Dihydrochloride and Interleukin-2 in Acute Myeloid Leukemia: Results of a Randomized Phase 3 Trial." *Blood* 108 (1) (July 1): 88–96. doi:10.1182/blood-2005-10-4073.
- Bryceson, Yenan T, and Eric O Long. 2008. "Line of Attack: NK Cell Specificity and Integration of Signals." *Current Opinion in Immunology* 20 (3) (June): 344–352. doi:10.1016/j.coi.2008.03.005.
- Bunde, Torsten, Alexander Kirchner, Bodo Hoffmeister, Dirk Habedank, Roland Hetzer, Georgy Cherepnev, Susanna Proesch, et al. 2005. "Protection from Cytomegalovirus after Transplantation Is Correlated with Immediate Early 1-specific CD8 T Cells." *The Journal of Experimental Medicine* 201 (7) (April 4): 1031–1036. doi:10.1084/jem.20042384.
- Burgess, Steven J, Alina I Marusina, Ishani Pathmanathan, Francisco Borrego, and John E Coligan. 2006. "IL-21 Down-regulates NKG2D/DAP10 Expression on Human NK and CD8+ T Cells." *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 176 (3) (February 1): 1490–1497.
- Burshtyn, D N, A M Scharenberg, N Wagtmann, S Rajagopalan, K Berrada, T Yi, J P Kinet, and E O Long. 1996. "Recruitment of Tyrosine Phosphatase HCP by the Killer Cell Inhibitor Receptor." *Immunity* 4 (1) (January): 77–85.
- Cantoni, C, C Bottino, M Vitale, A Pessino, R Augugliaro, A Malaspina, S Parolini, L Moretta, A Moretta, and R Biassoni. 1999. "Nkp44, a Triggering Receptor Involved in Tumor Cell Lysis by Activated Human Natural Killer Cells, Is a Novel Member of the Immunoglobulin Superfamily." *The Journal of Experimental Medicine* 189 (5) (March 1): 787–796.
- Carbone, E, G Ruggiero, G Terrazzano, C Palomba, C Manzo, S Fontana, H Spits, K Kärre, and S Zappacosta. 1997. "A New Mechanism of NK Cell Cytotoxicity Activation: The CD40-CD40 Ligand Interaction." *The Journal of Experimental Medicine* 185 (12) (June 16): 2053–2060.
- Carlsten, Mattias, Niklas K Björkström, Håkan Norell, Yenan Bryceson, Thorbald van Hall, Bettina C Baumann, Mikael Hanson, et al. 2007. "DNAX Accessory Molecule-1 Mediated Recognition of Freshly Isolated Ovarian Carcinoma by Resting Natural Killer Cells." *Cancer Research* 67 (3) (February 1): 1317–1325. doi:10.1158/0008-5472.CAN-06-2264.
- Carlsten, Mattias, Håkan Norell, Yenan T Bryceson, Isabel Poschke, Kjell Schedvins, Hans-Gustaf Ljunggren, Rolf Kiessling, and Karl-Johan Malmberg. 2009. "Primary Human Tumor Cells Expressing CD155 Impair Tumor Targeting by Down-regulating DNAM-1 on NK Cells." *Journal of*

- Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 183 (8) (October 15): 4921–4930. doi:10.4049/jimmunol.0901226.
- Carrega, Paolo, Barbara Morandi, Roberta Costa, Guido Frumento, Giuseppe Forte, Giuseppe Altavilla, Giovanni Battista Ratto, Maria Cristina Mingari, Lorenzo Moretta, and Guido Ferlazzo. 2008. "Natural Killer Cells Infiltrating Human Nonsmall-cell Lung Cancer Are Enriched in CD56 Bright CD16(-) Cells and Display an Impaired Capability to Kill Tumor Cells." *Cancer* 112 (4) (February 15): 863–875. doi:10.1002/cncr.23239.
- Carretero, M, C Cantoni, T Bellón, C Bottino, R Biassoni, A Rodríguez, J J Pérez-Villar, L Moretta, A Moretta, and M López-Botet. 1997. "The CD94 and NKG2-A C-type Lectins Covalently Assemble to Form a Natural Killer Cell Inhibitory Receptor for HLA Class I Molecules." *European Journal of Immunology* 27 (2) (February): 563–567. doi:10.1002/eji.1830270230.
- Casado, Javier G, Graham Pawelec, Sara Morgado, Beatriz Sanchez-Correa, Elena Delgado, Inmaculada Gayoso, Esther Duran, Rafael Solana, and Raquel Tarazona. 2009. "Expression of Adhesion Molecules and Ligands for Activating and Costimulatory Receptors Involved in Cell-mediated Cytotoxicity in a Large Panel of Human Melanoma Cell Lines." *Cancer Immunology, Immunotherapy: CII* 58 (9) (September): 1517–1526. doi:10.1007/s00262-009-0682-y.
- Castriconi, Roberta, Claudia Cantoni, Mariella Della Chiesa, Massimo Vitale, Emanuela Marcenaro, Romana Conte, Roberto Biassoni, Cristina Bottino, Lorenzo Moretta, and Alessandro Moretta. 2003. "Transforming Growth Factor Beta 1 Inhibits Expression of NKp30 and NKG2D Receptors: Consequences for the NK-mediated Killing of Dendritic Cells." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100 (7) (April 1): 4120–4125. doi:10.1073/pnas.0730640100.
- Cecchetti, Serena, Francesca Spadaro, Luana Lugini, Franca Podo, and Carlo Ramoni. 2007. "Functional Role of Phosphatidylcholine-specific Phospholipase C in Regulating CD16 Membrane Expression in Natural Killer Cells." *European Journal of Immunology* 37 (10) (October): 2912–2922. doi:10.1002/eji.200737266.
- Cerboni, Cristina, Francesca Neri, Nicoletta Casartelli, Alessandra Zingoni, David Cosman, Paolo Rossi, Angela Santoni, and Margherita Doria. 2007. "Human Immunodeficiency Virus 1 Nef Protein Downmodulates the Ligands of the Activating Receptor NKG2D and Inhibits Natural Killer Cell-mediated Cytotoxicity." *The Journal of General Virology* 88 (Pt 1) (January): 242–250. doi:10.1099/vir.0.82125-0.
- Cerwenka, A, A B Bakker, T McClanahan, J Wagner, J Wu, J H Phillips, and L L Lanier. 2000. "Retinoic Acid Early Inducible Genes Define a Ligand Family for the Activating NKG2D Receptor in Mice." *Immunity* 12 (6) (June): 721–727.
- Cerwenka, A, J L Baron, and L L Lanier. 2001. "Ectopic Expression of Retinoic Acid Early Inducible-1 Gene (RAE-1) Permits Natural Killer Cell-mediated Rejection of a MHC Class I-bearing Tumor in Vivo." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98 (20) (September 25): 11521–11526. doi:10.1073/pnas.201238598.

- Cha, T A, E Tom, G W Kemble, G M Duke, E S Mocarski, and R R Spaete. 1996. "Human Cytomegalovirus Clinical Isolates Carry at Least 19 Genes Not Found in Laboratory Strains." *Journal of Virology* 70 (1) (January): 78–83.
- Chaix, Julie, Marlowe S Tessmer, Kasper Hoebe, Nicolas Fuséri, Bernhard Ryffel, Marc Dalod, Lena Alexopoulou, et al. 2008. "Cutting Edge: Priming of NK Cells by IL-18." *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 181 (3) (August 1): 1627–1631.
- Chalifour, Anick, Pascale Jeannin, Jean-François Gauchat, Aline Blaecke, Martine Malissard, Thien N'Guyen, Nathalie Thieblemont, and Yves Delneste. 2004. "Direct Bacterial Protein PAMP Recognition by Human NK Cells Involves TLRs and Triggers Alpha-defensin Production." *Blood* 104 (6) (September 15): 1778–1783. doi:10.1182/blood-2003-08-2820.
- Chalifour, Anick, Leonardo Scarpellino, Jonathan Back, Petter Brodin, Estelle Devèvre, Frédéric Gros, Frédéric Lévy, et al. 2009. "A Role for Cis Interaction Between the Inhibitory Ly49A Receptor and MHC Class I for Natural Killer Cell Education." *Immunity* 30 (3) (March 20): 337–347. doi:10.1016/j.immuni.2008.12.019.
- Chalupny, N Jan, Annie Rein-Weston, Stephanie Dosch, and David Cosman. 2006. "Down-regulation of the NKG2D Ligand MICA by the Human Cytomegalovirus Glycoprotein UL142." *Biochemical and Biophysical Research Communications* 346 (1) (July 21): 175–181. doi:10.1016/j.bbrc.2006.05.092.
- Chalupny, N Jan, Claire L Sutherland, William A Lawrence, Annie Rein-Weston, and David Cosman. 2003. "ULBP4 Is a Novel Ligand for Human NKG2D." *Biochemical and Biophysical Research Communications* 305 (1) (May 23): 129–135.
- Chan, Huei-Wei, Zoya B Kurago, C Andrew Stewart, Michael J Wilson, Maureen P Martin, Brian E Mace, Mary Carrington, John Trowsdale, and Charles T Lutz. 2003. "DNA Methylation Maintains Allele-specific KIR Gene Expression in Human Natural Killer Cells." *The Journal of Experimental Medicine* 197 (2) (January 20): 245–255.
- Chan, Huei-Wei, Jeffrey S Miller, Mikel B Moore, and Charles T Lutz. 2005. "Epigenetic Control of Highly Homologous Killer Ig-like Receptor Gene Alleles." *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 175 (9) (November 1): 5966–5974.
- Chapman, T L, A P Heikeman, and P J Bjorkman. 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) (November): 603–613.
- Chaushu, Stella, Asaf Wilensky, Chamutal Gur, Lior Shapira, Moran Elboim, Gili Halftek, David Polak, Hagit Achdout, Gilad Bachrach, and Ofer Mandelboim. 2012. "Direct Recognition of *Fusobacterium Nucleatum* by the NK Cell Natural Cytotoxicity Receptor NKp46 Aggravates Periodontal Disease." *PLoS Pathogens* 8 (3): e1002601. doi:10.1371/journal.ppat.1002601.
- Chee, M, S A Rudolph, B Plachter, B Barrell, and G Jahn. 1989. "Identification of the Major Capsid Protein Gene of Human Cytomegalovirus." *Journal of Virology* 63 (3) (March): 1345–1353.

- Chen, C, M Busson, V Rocha, M-L Appert, V Lepage, N Dulphy, P Haas, et al. 2006. "Activating KIR Genes Are Associated with CMV Reactivation and Survival after non-T-cell Depleted HLA-identical Sibling Bone Marrow Transplantation for Malignant Disorders." *Bone Marrow Transplantation* 38 (6) (September): 437–444. doi:10.1038/sj.bmt.1705468.
- Chewning, Joseph H, Charlotte N Gudme, Katharine C Hsu, Annamalai Selvakumar, and Bo Dupont. 2007. "KIR2DS1-positive NK Cells Mediate Alloresponse Against the C2 HLA-KIR Ligand Group in Vitro." *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 179 (2) (July 15): 854–868.
- Chklovskaya, Elena, Pegah Nowbakht, Catherine Nissen, Alois Gratwohl, Mario Bargetzi, and Aleksandra Wodnar-Filipowicz. 2004. "Reconstitution of Dendritic and Natural Killer-cell Subsets after Allogeneic Stem Cell Transplantation: Effects of Endogenous Flt3 Ligand." *Blood* 103 (10) (May 15): 3860–3868. doi:10.1182/blood-2003-04-1200.
- Chlewicki, Lukasz K, C Alejandro Velikovsky, Vamsi Balakrishnan, Roy A Mariuzza, and Vinay Kumar. 2008. "Molecular Basis of the Dual Functions of 2B4 (CD244)." *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 180 (12) (June 15): 8159–8167.
- Ciccone, E, D Pende, O Viale, C Di Donato, G Tripodi, A M Orengo, J Guardiola, A Moretta, and L Moretta. 1992. "Evidence of a Natural Killer (NK) Cell Repertoire for (allo) Antigen Recognition: Definition of Five Distinct NK-determined Allospecificities in Humans." *The Journal of Experimental Medicine* 175 (3) (March 1): 709–718.
- Clémenceau, Béatrice, Géraldine Gallot, Régine Vivien, Joëlle Gaschet, Mario Campone, and Henri Vié. 2006. "Long-term Preservation of Antibody-dependent Cellular Cytotoxicity (ADCC) of Natural Killer Cells Amplified in Vitro from the Peripheral Blood of Breast Cancer Patients after Chemotherapy." *Journal of Immunotherapy (Hagerstown, Md.: 1997)* 29 (1) (February): 53–60.
- Coca, S, J Perez-Piqueras, D Martinez, A Colmenarejo, M A Saez, C Vallejo, J A Martos, and M Moreno. 1997. "The Prognostic Significance of Intratumoral Natural Killer Cells in Patients with Colorectal Carcinoma." *Cancer* 79 (12) (June 15): 2320–2328.
- Cohen, G B, R T Gandhi, D M Davis, O Mandelboim, B K Chen, J L Strominger, and D Baltimore. 1999. "The Selective Downregulation of Class I Major Histocompatibility Complex Proteins by HIV-1 Protects HIV-infected Cells from NK Cells." *Immunity* 10 (6) (June): 661–671.
- Colantonio, Arnaud D, Benjamin N Bimber, William J Neidermyer Jr, R Keith Reeves, Galit Alter, Marcus Altfeld, R Paul Johnson, Mary Carrington, David H O'Connor, and David T Evans. 2011. "KIR Polymorphisms Modulate Peptide-dependent Binding to an MHC Class I Ligand with a Bw6 Motif." *PLoS Pathogens* 7 (3) (March): e1001316. doi:10.1371/journal.ppat.1001316.
- Colonna, M, G Borsellino, M Falco, G B Ferrara, and J L Strominger. 1993. "HLA-C Is the Inhibitory Ligand That Determines Dominant Resistance to Lysis by NK1- and NK2-specific Natural Killer Cells." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 90 (24) (December 15): 12000–12004.

- Colonna, M, F Navarro, T Bellón, M Llano, P García, J Samaridis, L Angman, M Cella, and M López-Botet. 1997. "A Common Inhibitory Receptor for Major Histocompatibility Complex Class I Molecules on Human Lymphoid and Myelomonocytic Cells." *The Journal of Experimental Medicine* 186 (11) (December 1): 1809–1818.
- Colonna, M, and J Samaridis. 1995. "Cloning of Immunoglobulin-superfamily Members Associated with HLA-C and HLA-B Recognition by Human Natural Killer Cells." *Science (New York, N.Y.)* 268 (5209) (April 21): 405–408.
- Compton, T, D M Nowlin, and N R Cooper. 1993. "Initiation of Human Cytomegalovirus Infection Requires Initial Interaction with Cell Surface Heparan Sulfate." *Virology* 193 (2) (April): 834–841. doi:10.1006/viro.1993.1192.
- Cook, Mark A, Donald W Milligan, Christopher D Fegan, Philip J Darbyshire, Premini Mahendra, Charles F Craddock, Paul A H Moss, and David C Briggs. 2004. "The Impact of Donor KIR and Patient HLA-C Genotypes on Outcome Following HLA-identical Sibling Hematopoietic Stem Cell Transplantation for Myeloid Leukemia." *Blood* 103 (4) (February 15): 1521–1526. doi:10.1182/blood-2003-02-0438.
- Cook, Mark, David Briggs, Charles Craddock, Premini Mahendra, Donald Milligan, Christopher Fegan, Philip Darbyshire, Sarah Lawson, Elizabeth Boxall, and Paul Moss. 2006. "Donor KIR Genotype Has a Major Influence on the Rate of Cytomegalovirus Reactivation Following T-cell Replete Stem Cell Transplantation." *Blood* 107 (3) (February 1): 1230–1232. doi:10.1182/blood-2005-03-1039.
- Cooper, M A, T A Fehniger, and M A Caligiuri. 2001. "The Biology of Human Natural Killer-cell Subsets." *Trends in Immunology* 22 (11) (November): 633–640.
- Cooper, M A, T A Fehniger, S C Turner, K S Chen, B A Ghaheri, T Ghayur, W E Carson, and M A Caligiuri. 2001. "Human Natural Killer Cells: a Unique Innate Immunoregulatory Role for the CD56(bright) Subset." *Blood* 97 (10) (May 15): 3146–3151.
- Cooper, Megan A, Julie M Elliott, Peter A Keyel, Liping Yang, Javier A Carrero, and Wayne M Yokoyama. 2009. "Cytokine-induced Memory-like Natural Killer Cells." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106 (6) (February 10): 1915–1919. doi:10.1073/pnas.0813192106.
- Cosman, D, N Fanger, L Borges, M Kubin, W Chin, L Peterson, and M L Hsu. 1997. "A Novel Immunoglobulin Superfamily Receptor for Cellular and Viral MHC Class I Molecules." *Immunity* 7 (2) (August): 273–282.
- Cosman, D, J Müllberg, C L Sutherland, W Chin, R Armitage, W Fanslow, M Kubin, and N J Chalupny. 2001. "ULBPs, Novel MHC Class I-related Molecules, Bind to CMV Glycoprotein UL16 and Stimulate NK Cytotoxicity through the NKG2D Receptor." *Immunity* 14 (2) (February): 123–133.
- Coupel, Stéphanie, Anne Moreau, Mohamed Hamidou, Vaclav Horejsi, Jean-Paul Soulillou, and Béatrice Charreau. 2007. "Expression and Release of Soluble HLA-E Is an Immunoregulatory Feature of Endothelial Cell Activation." *Blood* 109 (7) (April 1): 2806–2814. doi:10.1182/blood-2006-06-030213.

- Crotta, Stefania, Annalisa Stilla, Andreas Wack, Annalisa D'Andrea, Sandra Nuti, Ugo D'Oro, Marta Mosca, et al. 2002. "Inhibition of Natural Killer Cells through Engagement of CD81 by the Major Hepatitis C Virus Envelope Protein." *The Journal of Experimental Medicine* 195 (1) (January 7): 35–41.
- Crough, Tania, and Rajiv Khanna. 2009. "Immunobiology of Human Cytomegalovirus: From Bench to Bedside." *Clinical Microbiology Reviews* 22 (1) (January): 76–98, Table of Contents. doi:10.1128/CMR.00034-08.
- CUDKOWICZ, G, and J H STIMPFLING. 1964. "INDUCTION OF IMMUNITY AND OF UNRESPONSIVENESS TO PARENTAL MARROW GRAFTS IN ADULT F-1 HYBRID MICE." *Nature* 204 (October 31): 450–453.
- Dann, Sara M, Heuy-Ching Wang, Kimberly J Gambarin, Jeffrey K Actor, Prema Robinson, Dorothy E Lewis, Sophie Caillat-Zucman, and A Clinton White Jr. 2005. "Interleukin-15 Activates Human Natural Killer Cells to Clear the Intestinal Protozoan *Cryptosporidium*." *The Journal of Infectious Diseases* 192 (7) (October 1): 1294–1302. doi:10.1086/444393.
- Darmon, A J, D W Nicholson, and R C Bleackley. 1995. "Activation of the Apoptotic Protease CPP32 by Cytotoxic T-cell-derived Granzyme B." *Nature* 377 (6548) (October 5): 446–448. doi:10.1038/377446a0.
- David, Gaëlle, Maelig Morvan, Katia Gagne, Nolwenn Kerdudou, Catherine Willem, Anne Devys, Marc Bonneville, Gilles Folléa, Jean-Denis Bignon, and Christelle Retière. 2009. "Discrimination Between the Main Activating and Inhibitory Killer Cell Immunoglobulin-like Receptor Positive Natural Killer Cell Subsets Using Newly Characterized Monoclonal Antibodies." *Immunology* 128 (2) (October): 172–184. doi:10.1111/j.1365-2567.2009.03085.x.
- De Arias, Alejandro Espadas, Simone Elizabeth Haworth, Luca Saverio Belli, Patrizia Burra, Giovambattista Pinzello, Marcello Vangeli, Ernesto Minola, et al. 2009. "Killer Cell Immunoglobulin-like Receptor Genotype and Killer Cell Immunoglobulin-like Receptor-human Leukocyte Antigen C Ligand Compatibility Affect the Severity of Hepatitis C Virus Recurrence after Liver Transplantation." *Liver Transplantation: Official Publication of the American Association for the Study of Liver Diseases and the International Liver Transplantation Society* 15 (4) (April): 390–399. doi:10.1002/lt.21673.
- Del Val, M, H Hengel, H Häcker, U Hartlaub, T Ruppert, P Lucin, and U H Koszinowski. 1992. "Cytomegalovirus Prevents Antigen Presentation by Blocking the Transport of Peptide-loaded Major Histocompatibility Complex Class I Molecules into the medial-Golgi Compartment." *The Journal of Experimental Medicine* 176 (3) (September 1): 729–738.
- Delahaye, Nicolas F, Sylvie Rusakiewicz, Isabelle Martins, Cédric Ménard, Stephan Roux, Luc Lyonnet, Pascale Paul, et al. 2011. "Alternatively Spliced Nkp30 Isoforms Affect the Prognosis of Gastrointestinal Stromal Tumors." *Nature Medicine* 17 (6) (June): 700–707. doi:10.1038/nm.2366.
- Della Chiesa, Mariella, Michela Falco, Marina Podestà, Franco Locatelli, Lorenzo Moretta, Francesco Frassoni, and Alessandro Moretta. 2012. "Phenotypic and Functional Heterogeneity of Human NK Cells Developing after Umbilical Cord Blood Transplantation: a Role for Human Cytomegalovirus?" *Blood* 119 (2) (January 12): 399–410. doi:10.1182/blood-2011-08-372003.

- DeMeritt, Ian B, Liesl E Milford, and Andrew D Yurochko. 2004. "Activation of the NF-kappaB Pathway in Human Cytomegalovirus-infected Cells Is Necessary for Efficient Transactivation of the Major Immediate-early Promoter." *Journal of Virology* 78 (9) (May): 4498–4507.
- Dennehy, Kevin M, Sascha N Klimosch, and Alexander Steinle. 2011. "Cutting Edge: NKp80 Uses an Atypical hemi-ITAM to Trigger NK Cytotoxicity." *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 186 (2) (January 15): 657–661. doi:10.4049/jimmunol.0904117.
- Derré, Laurent, Murielle Corvaisier, Béatrice Charreau, Anne Moreau, Emmanuelle Godefroy, Agnès Moreau-Aubry, Francine Jotereau, and Nadine Gervois. 2006. "Expression and Release of HLA-E by Melanoma Cells and Melanocytes: Potential Impact on the Response of Cytotoxic Effector Cells." *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 177 (5) (September 1): 3100–3107.
- Dhanji, Salim, and Hung-Sia Teh. 2003. "IL-2-activated CD8+CD44^{high} Cells Express Both Adaptive and Innate Immune System Receptors and Demonstrate Specificity for Syngeneic Tumor Cells." *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 171 (7) (October 1): 3442–3450.
- Diefenbach, A, A M Jamieson, S D Liu, N Shastri, and D H Raulet. 2000. "Ligands for the Murine NKG2D Receptor: Expression by Tumor Cells and Activation of NK Cells and Macrophages." *Nature Immunology* 1 (2) (August): 119–126. doi:10.1038/77793.
- Diefenbach, A, E R Jensen, A M Jamieson, and D H Raulet. 2001. "Rae1 and H60 Ligands of the NKG2D Receptor Stimulate Tumour Immunity." *Nature* 413 (6852) (September 13): 165–171. doi:10.1038/35093109.
- Djaoud, Zakia, Gaëlle David, Céline Bressollette, Catherine Willem, Pauline Rettman, Katia Gagne, Nolwenn Legrand, et al. 2013. "Amplified NKG2C+ NK Cells in Cytomegalovirus (CMV) Infection Preferentially Express Killer Cell Ig-like Receptor 2DL: Functional Impact in Controlling CMV-Infected Dendritic Cells." *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* (August 5). doi:10.4049/jimmunol.1301138.
- Dokun, A O, S Kim, H R Smith, H S Kang, D T Chu, and W M Yokoyama. 2001. "Specific and Nonspecific NK Cell Activation During Virus Infection." *Nature Immunology* 2 (10) (October): 951–956. doi:10.1038/ni714.
- Doucey, Marie-Agnès, Leonardo Scarpellino, Jacques Zimmer, Philippe Guillaume, Immanuel F Luescher, Claude Bron, and Werner Held. 2004. "Cis Association of Ly49A with MHC Class I Restricts Natural Killer Cell Inhibition." *Nature Immunology* 5 (3) (March): 328–336. doi:10.1038/ni1043.
- Draghi, Monia, Achal Pashine, Bharati Sanjanwala, Ketevan Gendzekhadze, Claudia Cantoni, David Cosman, Alessandro Moretta, Nicholas M Valiante, and Peter Parham. 2007. "NKp46 and NKG2D Recognition of Infected Dendritic Cells Is Necessary for NK Cell Activation in the Human Response to Influenza Infection." *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 178 (5) (March 1): 2688–2698.
- Drouet, E., V. Gafa, E. Le Roy, and J.-L. Davignon. 2003. "L'immunosubversion Liée Au CytomégaloVirus Humain." *Virologie* 6 (6) (January 15): 417–30.
- Dunn, Claire, N Jan Chalupny, Claire L Sutherland, Stephanie Dosch, P V Sivakumar, David C Johnson, and David Cosman. 2003. "Human

- Cytomegalovirus Glycoprotein UL16 Causes Intracellular Sequestration of NKG2D Ligands, Protecting Against Natural Killer Cell Cytotoxicity." *The Journal of Experimental Medicine* 197 (11) (June 2): 1427–1439. doi:10.1084/jem.20022059.
- Dunn, Gavin P, Allen T Bruce, Hiroaki Ikeda, Lloyd J Old, and Robert D Schreiber. 2002. "Cancer Immunoediting: From Immunosurveillance to Tumor Escape." *Nature Immunology* 3 (11) (November): 991–998. doi:10.1038/ni1102-991.
- Eagle, Robert A, James A Traherne, James R Hair, Insiya Jafferji, and John Trowsdale. 2009. "ULBP6/RAET1L Is an Additional Human NKG2D Ligand." *European Journal of Immunology* 39 (11) (November): 3207–3216. doi:10.1002/eji.200939502.
- Eidenschenk, Celine, Jean Dunne, Emmanuelle Jouanguy, Claire Fourlinnie, Laure Gineau, Delphine Bacq, Corrina McMahon, et al. 2006. "A Novel Primary Immunodeficiency with Specific Natural-killer Cell Deficiency Maps to the Centromeric Region of Chromosome 8." *American Journal of Human Genetics* 78 (4) (April): 721–727. doi:10.1086/503269.
- Eisele, Günter, Jörg Wischhusen, Michel Mittelbronn, Richard Meyermann, Inja Waldhauer, Alexander Steinle, Michael Weller, and Manuel A Friese. 2006. "TGF-beta and Metalloproteinases Differentially Suppress NKG2D Ligand Surface Expression on Malignant Glioma Cells." *Brain: a Journal of Neurology* 129 (Pt 9) (September): 2416–2425. doi:10.1093/brain/awl205.
- El-Sherbiny, Yasser M, Josephine L Meade, Tim D Holmes, Dennis McGonagle, Sarah L Mackie, Ann W Morgan, Gordon Cook, et al. 2007. "The Requirement for DNAM-1, NKG2D, and NKp46 in the Natural Killer Cell-mediated Killing of Myeloma Cells." *Cancer Research* 67 (18) (September 15): 8444–8449. doi:10.1158/0008-5472.CAN-06-4230.
- Emmons, S L, and S B Pollack. 1985. "Murine NK Cell Heterogeneity: Subpopulations of C57BL/6 Splenic NK Cells Detected by NK-1.1 and NK-2.1 Antisera." *Natural Immunity and Cell Growth Regulation* 4 (4): 169–177.
- Esin, Semih, Giovanna Batoni, Claudio Counoupas, Annarita Stringaro, Franca Lisa Brancatisano, Marisa Colone, Giuseppantonio Maisetta, Walter Florio, Giuseppe Arancia, and Mario Campa. 2008. "Direct Binding of Human NK Cell Natural Cytotoxicity Receptor NKp44 to the Surfaces of Mycobacteria and Other Bacteria." *Infection and Immunity* 76 (4) (April): 1719–1727. doi:10.1128/IAI.00870-07.
- Etzioni, Amos, Celine Eidenschenk, Rina Katz, Rafeal Beck, Jean Laurent Casanova, and Shimon Pollack. 2005. "Fatal Varicella Associated with Selective Natural Killer Cell Deficiency." *The Journal of Pediatrics* 146 (3) (March): 423–425. doi:10.1016/j.jpeds.2004.11.022.
- Fadda, Lena, Christian Körner, Swati Kumar, Nienke H van Teijlingen, Alicja Piechocka-Trocha, Mary Carrington, and Marcus Altfeld. 2012. "HLA-Cw*0102-restricted HIV-1 P24 Epitope Variants Can Modulate the Binding of the Inhibitory KIR2DL2 Receptor and Primary NK Cell Function." *PLoS Pathogens* 8 (7): e1002805. doi:10.1371/journal.ppat.1002805.

- Farber, S, and S B Wolbach. 1932. "Intranuclear and Cytoplasmic Inclusions ('Protozoan-Like Bodies') in the Salivary Glands and Other Organs of Infants." *The American Journal of Pathology* 8 (2) (March): 123–136.3.
- Fauriat, Cyril, Sandra Andersson, Andreas T Björklund, Mattias Carlsten, Marie Schaffer, Niklas K Björkström, Bettina C Baumann, Jakob Michaëlsson, Hans-Gustaf Ljunggren, and Karl-Johan Malmberg. 2008. "Estimation of the Size of the Alloreactive NK Cell Repertoire: Studies in Individuals Homozygous for the Group A KIR Haplotype." *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 181 (9) (November 1): 6010–6019.
- Fauriat, Cyril, Martin A Ivarsson, Hans-Gustaf Ljunggren, Karl-Johan Malmberg, and Jakob Michaëlsson. 2010. "Education of Human Natural Killer Cells by Activating Killer Cell Immunoglobulin-like Receptors." *Blood* 115 (6) (February 11): 1166–1174. doi:10.1182/blood-2009-09-245746.
- Fehniger, Todd A, Megan A Cooper, Gerard J Nuovo, Marina Cella, Fabio Facchetti, Marco Colonna, and Michael A Caligiuri. 2003. "CD56bright Natural Killer Cells Are Present in Human Lymph Nodes and Are Activated by T Cell-derived IL-2: a Potential New Link Between Adaptive and Innate Immunity." *Blood* 101 (8) (April 15): 3052–3057. doi:10.1182/blood-2002-09-2876.
- Ferlazzo, Guido, Dolca Thomas, Shao-Lee Lin, Kiera Goodman, Barbara Morandi, William A Muller, Alessandro Moretta, and Christian Münz. 2004. "The Abundant NK Cells in Human Secondary Lymphoid Tissues Require Activation to Express Killer Cell Ig-like Receptors and Become Cytolytic." *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 172 (3) (February 1): 1455–1462.
- Ferlazzo, Guido, Ming L Tsang, Lorenzo Moretta, Giovanni Melioli, Ralph M Steinman, and Christian Münz. 2002. "Human Dendritic Cells Activate Resting Natural Killer (NK) Cells and Are Recognized via the NKp30 Receptor by Activated NK Cells." *The Journal of Experimental Medicine* 195 (3) (February 4): 343–351.
- Fernandez, Nadine C, Emmanuel Treiner, Russell E Vance, Amanda M Jamieson, Suzanne Lemieux, and David H Raulet. 2005. "A Subset of Natural Killer Cells Achieves Self-tolerance Without Expressing Inhibitory Receptors Specific for self-MHC Molecules." *Blood* 105 (11) (June 1): 4416–4423. doi:10.1182/blood-2004-08-3156.
- Fernández-Messina, Lola, Hugh T Reyburn, and Mar Valés-Gómez. 2012. "Human NKG2D-ligands: Cell Biology Strategies to Ensure Immune Recognition." *Frontiers in Immunology* 3: 299. doi:10.3389/fimmu.2012.00299.
- Ferrini, S, A Cambiaggi, R Meazza, S Sforzini, S Marciano, M C Mingari, and L Moretta. 1994. "T Cell Clones Expressing the Natural Killer Cell-related P58 Receptor Molecule Display Heterogeneity in Phenotypic Properties and P58 Function." *European Journal of Immunology* 24 (10) (October): 2294–2298. doi:10.1002/eji.1830241005.
- Flores-Villanueva, P O, E J Yunis, J C Delgado, E Vittinghoff, S Buchbinder, J Y Leung, A M Ugliarolo, et al. 2001. "Control of HIV-1 Viremia and Protection from AIDS Are Associated with HLA-Bw4 Homozygosity." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98 (9) (April 24): 5140–5145. doi:10.1073/pnas.071548198.

- Foley, Bree, Sarah Cooley, Michael R Verneris, Julie Curtsinger, Xianghua Luo, Edmund K Waller, Claudio Anasetti, Daniel Weisdorf, and Jeffrey S Miller. 2012. "Human Cytomegalovirus (CMV)-induced Memory-like NKG2C(+) NK Cells Are Transplantable and Expand in Vivo in Response to Recipient CMV Antigen." *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 189 (10) (November 15): 5082–5088. doi:10.4049/jimmunol.1201964.
- Foley, Bree, Sarah Cooley, Michael R Verneris, Michelle Pitt, Julie Curtsinger, Xianghua Luo, Sandra Lopez-Vergès, Lewis L Lanier, Daniel Weisdorf, and Jeffrey S Miller. 2012. "Cytomegalovirus Reactivation after Allogeneic Transplantation Promotes a Lasting Increase in Educated NKG2C+ Natural Killer Cells with Potent Function." *Blood* 119 (11) (March 15): 2665–2674. doi:10.1182/blood-2011-10-386995.
- Fraile-Ramos, A, T N Kledal, A Pelchen-Matthews, K Bowers, T W Schwartz, and M Marsh. 2001. "The Human Cytomegalovirus US28 Protein Is Located in Endocytic Vesicles and Undergoes Constitutive Endocytosis and Recycling." *Molecular Biology of the Cell* 12 (6) (June): 1737–1749.
- Fregni, Giulia, Aurélie Perier, Gianfranco Pittari, Simon Jacobelli, Xavier Sastre, Nadine Gervois, Mathilde Allard, Nadège Bercovici, Marie Françoise Avril, and Anne Caignard. 2011. "Unique Functional Status of Natural Killer Cells in Metastatic Stage IV Melanoma Patients and Its Modulation by Chemotherapy." *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research* 17 (9) (May 1): 2628–2637. doi:10.1158/1078-0432.CCR-10-2084.
- Freud, Aharon G, Brian Becknell, Sameek Roychowdhury, Hsiaoyin C Mao, Amy K Ferketich, Gerard J Nuovo, Tiffany L Hughes, et al. 2005. "A Human CD34(+) Subset Resides in Lymph Nodes and Differentiates into CD56bright Natural Killer Cells." *Immunity* 22 (3) (March): 295–304. doi:10.1016/j.immuni.2005.01.013.
- Freud, Aharon G, and Michael A Caligiuri. 2006. "Human Natural Killer Cell Development." *Immunological Reviews* 214 (December): 56–72. doi:10.1111/j.1600-065X.2006.00451.x.
- Freud, Aharon G, Akihiko Yokohama, Brian Becknell, Melissa T Lee, Hsiaoyin C Mao, Amy K Ferketich, and Michael A Caligiuri. 2006. "Evidence for Discrete Stages of Human Natural Killer Cell Differentiation in Vivo." *The Journal of Experimental Medicine* 203 (4) (April 17): 1033–1043. doi:10.1084/jem.20052507.
- Fuchs, Anja, Marina Cella, Emanuele Giurisato, Andrey S Shaw, and Marco Colonna. 2004. "Cutting Edge: CD96 (tactile) Promotes NK Cell-target Cell Adhesion by Interacting with the Poliovirus Receptor (CD155)." *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 172 (7) (April 1): 3994–3998.
- Furman, Margo H, Neelendu Dey, Domenico Tortorella, and Hidde L Ploegh. 2002. "The Human Cytomegalovirus US10 Gene Product Delays Trafficking of Major Histocompatibility Complex Class I Molecules." *Journal of Virology* 76 (22) (November): 11753–11756.
- Gagne, Katia, Catherine Willem, Nolwenn Legrand, Zakia Djaoud, Gaëlle David, Pauline Rettman, Céline Bressollette-Bodin, et al. 2013. "Both the Nature of KIR3DL1 Alleles and the KIR3DL1/S1 Allele Combination Affect the KIR3DL1 NK-cell Repertoire in the French Population." *European Journal of Immunology* 43 (4) (April): 1085–1098. doi:10.1002/eji.201243007.

- Galea-Lauri, J, D Darling, S U Gan, L Krivochchapov, M Kuiper, J Gäken, B Souberbielle, and F Farzaneh. 1999. "Expression of a Variant of CD28 on a Subpopulation of Human NK Cells: Implications for B7-mediated Stimulation of NK Cells." *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 163 (1) (July 1): 62–70.
- Gallina, A, E Percivalle, L Simoncini, M G Revello, G Gerna, and G Milanesi. 1996. "Human Cytomegalovirus Pp65 Lower Matrix Phosphoprotein Harbours Two Transplantable Nuclear Localization Signals." *The Journal of General Virology* 77 (Pt 6) (June): 1151–1157.
- Gandhi, Maher K, and Rajiv Khanna. 2004. "Human Cytomegalovirus: Clinical Aspects, Immune Regulation, and Emerging Treatments." *The Lancet Infectious Diseases* 4 (12) (December): 725–738. doi:10.1016/S1473-3099(04)01202-2.
- Garcia-Iglesias, Trinidad, Alicia Del Toro-Arreola, Benibelks Albarran-Somoza, Susana Del Toro-Arreola, Pedro E Sanchez-Hernandez, Maria Guadalupe Ramirez-Dueñas, Luz Ma Adriana Balderas-Peña, Alejandro Bravo-Cuellar, Pablo C Ortiz-Lazareno, and Adrian Daneri-Navarro. 2009. "Low NKp30, NKp46 and NKG2D Expression and Reduced Cytotoxic Activity on NK Cells in Cervical Cancer and Precursor Lesions." *BMC Cancer* 9: 186. doi:10.1186/1471-2407-9-186.
- Gati, Asma, Sylvie Da Rocha, Nadia Guerra, Bernard Escudier, Alessandro Moretta, Salem Chouaib, Eric Angevin, and Anne Caignard. 2004. "Analysis of the Natural Killer Mediated Immune Response in Metastatic Renal Cell Carcinoma Patients." *International Journal of Cancer. Journal International Du Cancer* 109 (3) (April 10): 393–401. doi:10.1002/ijc.11730.
- Gazit, Roi, Ben-Zion Garty, Yehudith Monselise, Vered Hoffer, Yaron Finkelstein, Gal Markel, Gil Katz, et al. 2004. "Expression of KIR2DL1 on the Entire NK Cell Population: a Possible Novel Immunodeficiency Syndrome." *Blood* 103 (5) (March 1): 1965–1966. doi:10.1182/blood-2003-11-3796.
- Gendzekhadze, Ketevan, Paul J Norman, Laurent Abi-Rached, Thorsten Graef, Achim K Moesta, Zulay Layrisse, and Peter Parham. 2009. "Co-evolution of KIR2DL3 with HLA-C in a Human Population Retaining Minimal Essential Diversity of KIR and HLA Class I Ligands." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106 (44) (November 3): 18692–18697. doi:10.1073/pnas.0906051106.
- Gerosa, Franca, Barbara Baldani-Guerra, Carla Nisii, Viviana Marchesini, Giuseppe Carra, and Giorgio Trinchieri. 2002. "Reciprocal Activating Interaction Between Natural Killer Cells and Dendritic Cells." *The Journal of Experimental Medicine* 195 (3) (February 4): 327–333.
- Ghazal, P, C DeMattei, E Giuliotti, S A Kliewer, K Umesono, and R M Evans. 1992. "Retinoic Acid Receptors Initiate Induction of the Cytomegalovirus Enhancer in Embryonal Cells." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 89 (16) (August 15): 7630–7634.
- Gilfillan, Susan, Christopher J Chan, Marina Cella, Nicole M Haynes, Aaron S Rapaport, Kent S Boles, Daniel M Andrews, Mark J Smyth, and Marco Colonna. 2008. "DNAM-1 Promotes Activation of Cytotoxic Lymphocytes by Nonprofessional Antigen-presenting Cells and Tumors." *The Journal of Experimental Medicine* 205 (13) (December 22): 2965–2973. doi:10.1084/jem.20081752.

- Graef, Thorsten, Achim K Moesta, Paul J Norman, Laurent Abi-Rached, Luca Vago, Anastazia M Older Aguilar, Michael Gleimer, et al. 2009. "KIR2DS4 Is a Product of Gene Conversion with KIR3DL2 That Introduced Specificity for HLA-A*11 While Diminishing Avidity for HLA-C." *The Journal of Experimental Medicine* 206 (11) (October 26): 2557–2572. doi:10.1084/jem.20091010.
- Grundy, J E, J A McKeating, and P D Griffiths. 1987. "Cytomegalovirus Strain AD169 Binds Beta 2 Microglobulin in Vitro after Release from Cells." *The Journal of General Virology* 68 (Pt 3) (March): 777–784.
- Grundy, J E, J A McKeating, P J Ward, A R Sanderson, and P D Griffiths. 1987. "Beta 2 Microglobulin Enhances the Infectivity of Cytomegalovirus and When Bound to the Virus Enables Class I HLA Molecules to Be Used as a Virus Receptor." *The Journal of General Virology* 68 (Pt 3) (March): 793–803.
- Grzywacz, Bartosz, Nandini Kataria, Niketa Kataria, Bruce R Blazar, Jeffrey S Miller, and Michael R Verneris. 2011. "Natural Killer-cell Differentiation by Myeloid Progenitors." *Blood* 117 (13) (March 31): 3548–3558. doi:10.1182/blood-2010-04-281394.
- Guimond, Martin, Aharon G Freud, Hsiaoyin C Mao, Jianhua Yu, Bradley W Blaser, Jeffrey W Leong, Jeffrey B Vandeusen, et al. 2010. "In Vivo Role of Flt3 Ligand and Dendritic Cells in NK Cell Homeostasis." *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 184 (6) (March 15): 2769–2775. doi:10.4049/jimmunol.0900685.
- Gumá, Mónica, Ana Angulo, Carlos Vilches, Natalia Gómez-Lozano, Núria Malats, and Miguel López-Botet. 2004. "Imprint of Human Cytomegalovirus Infection on the NK Cell Receptor Repertoire." *Blood* 104 (12) (December 1): 3664–3671. doi:10.1182/blood-2004-05-2058.
- Gumperz, J E, V Litwin, J H Phillips, L L Lanier, and P Parham. 1995. "The Bw4 Public Epitope of HLA-B Molecules Confers Reactivity with Natural Killer Cell Clones That Express NKB1, a Putative HLA Receptor." *The Journal of Experimental Medicine* 181 (3) (March 1): 1133–1144.
- Hackett, J, Jr, G C Bosma, M J Bosma, M Bennett, and V Kumar. 1986. "Transplantable Progenitors of Natural Killer Cells Are Distinct from Those of T and B Lymphocytes." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 83 (10) (May): 3427–3431.
- Hadaya, K, C de Rham, C Bandelier, C Bandelier, S Ferrari-Lacraz, S Jendly, T Berney, et al. 2008. "Natural Killer Cell Receptor Repertoire and Their Ligands, and the Risk of CMV Infection after Kidney Transplantation." *American Journal of Transplantation: Official Journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons* 8 (12) (December): 2674–2683. doi:10.1111/j.1600-6143.2008.02431.x.
- Halary, Franck, Ali Amara, Hugues Lortat-Jacob, Martin Messerle, Thierry Delaunay, Corinne Houlès, Franck Fieschi, Fernando Arenzana-Seisdedos, Jean François Moreau, and Julie Déchanet-Merville. 2002. "Human Cytomegalovirus Binding to DC-SIGN Is Required for Dendritic Cell Infection and Target Cell Trans-infection." *Immunity* 17 (5) (November): 653–664.
- Halfteck, Gili G, Moran Elboim, Chamutal Gur, Hagit Achdout, Hormas Ghadially, and Ofer Mandelboim. 2009. "Enhanced in Vivo Growth of Lymphoma

- Tumors in the Absence of the NK-activating Receptor NKp46/NCR1." *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 182 (4) (February 15): 2221–2230. doi:10.4049/jimmunol.0801878.
- Haller, O, and H Wigzell. 1977. "Suppression of Natural Killer Cell Activity with Radioactive Strontium: Effector Cells Are Marrow Dependent." *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 118 (4) (April): 1503–1506.
- Hansasuta, Pokrath, Tao Dong, Hathairat Thananchai, Michael Weekes, Christian Willberg, Hatice Aldemir, Sarah Rowland-Jones, and Veronique M Braud. 2004. "Recognition of HLA-A3 and HLA-A11 by KIR3DL2 Is Peptide-specific." *European Journal of Immunology* 34 (6) (June): 1673–1679. doi:10.1002/eji.200425089.
- Hanvesakul, R, N Spencer, M Cook, B Gunson, M Hathaway, R Brown, P Nightingale, et al. 2008. "Donor HLA-C Genotype Has a Profound Impact on the Clinical Outcome Following Liver Transplantation." *American Journal of Transplantation: Official Journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons* 8 (9) (September): 1931–1941. doi:10.1111/j.1600-6143.2008.02341.x.
- Hayashi, Tomonori, Kazue Imai, Yukari Morishita, Ikue Hayashi, Yoichiro Kusunoki, and Kei Nakachi. 2006. "Identification of the NKG2D Haplotypes Associated with Natural Cytotoxic Activity of Peripheral Blood Lymphocytes and Cancer Immunosurveillance." *Cancer Research* 66 (1) (January 1): 563–570. doi:10.1158/0008-5472.CAN-05-2776.
- Hegde, Nagendra R, and David C Johnson. 2003. "Human Cytomegalovirus US2 Causes Similar Effects on Both Major Histocompatibility Complex Class I and II Proteins in Epithelial and Glial Cells." *Journal of Virology* 77 (17) (September): 9287–9294.
- Hegde, Nagendra R, Roman A Tomazin, Todd W Wisner, Claire Dunn, Jessica M Boname, David M Lewinsohn, and David C Johnson. 2002. "Inhibition of HLA-DR Assembly, Transport, and Loading by Human Cytomegalovirus Glycoprotein US3: a Novel Mechanism for Evading Major Histocompatibility Complex Class II Antigen Presentation." *Journal of Virology* 76 (21) (November): 10929–10941.
- Hensel, G, H Meyer, S Gärtner, G Brand, and H F Kern. 1995. "Nuclear Localization of the Human Cytomegalovirus Tegument Protein Pp150 (ppUL32)." *The Journal of General Virology* 76 (Pt 7) (July): 1591–1601.
- Herberman, R B, M E Nunn, and D H Lavrin. 1975. "Natural Cytotoxic Reactivity of Mouse Lymphoid Cells Against Syngeneic Acid Allogeneic Tumors. I. Distribution of Reactivity and Specificity." *International Journal of Cancer. Journal International Du Cancer* 16 (2) (August 15): 216–229.
- Hewitt, E W, S S Gupta, and P J Lehner. 2001. "The Human Cytomegalovirus Gene Product US6 Inhibits ATP Binding by TAP." *The EMBO Journal* 20 (3) (February 1): 387–396. doi:10.1093/emboj/20.3.387.
- Ho, Joanna W, Oren HersHKovitz, Malik Peiris, Alon Zilka, Ahuva Bar-Ilan, Beatrice Nal, Kid Chu, et al. 2008. "H5-type Influenza Virus Hemagglutinin Is Functionally Recognized by the Natural Killer-activating Receptor NKp44." *Journal of Virology* 82 (4) (February): 2028–2032. doi:10.1128/JVI.02065-07.
- Höglund, P, C Ohlén, E Carbone, L Franksson, H G Ljunggren, A Latour, B Koller, and K Kärre. 1991. "Recognition of Beta 2-microglobulin-negative (beta

- 2m-) T-cell Blasts by Natural Killer Cells from Normal but Not from Beta 2m- Mice: Nonresponsiveness Controlled by Beta 2m- Bone Marrow in Chimeric Mice." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 88 (22) (November 15): 10332–10336.
- Höglund, Petter, and Petter Brodin. 2010. "Current Perspectives of Natural Killer Cell Education by MHC Class I Molecules." *Nature Reviews. Immunology* 10 (10) (October): 724–734. doi:10.1038/nri2835.
- Hornung, Veit, Simon Rothenfusser, Stefanie Britsch, Anne Krug, Bernd Jahrsdörfer, Thomas Giese, Stefan Endres, and Gunther Hartmann. 2002. "Quantitative Expression of Toll-like Receptor 1-10 mRNA in Cellular Subsets of Human Peripheral Blood Mononuclear Cells and Sensitivity to CpG Oligodeoxynucleotides." *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 168 (9) (May 1): 4531–4537.
- Horwitz, D A, J D Gray, and K Ohtsuka. 1999. "Role of NK Cells and TGF-beta in the Regulation of T-cell-dependent Antibody Production in Health and Autoimmune Disease." *Microbes and Infection / Institut Pasteur* 1 (15) (December): 1305–1311.
- Houchins, J P, T Yabe, C McSherry, and F H Bach. 1991. "DNA Sequence Analysis of NKG2, a Family of Related cDNA Clones Encoding Type II Integral Membrane Proteins on Human Natural Killer Cells." *The Journal of Experimental Medicine* 173 (4) (April 1): 1017–1020.
- Hsu, Katharine C, Carolyn A Keever-Taylor, Andrew Wilton, Clara Pinto, Glenn Heller, Knarik Arkun, Richard J O'Reilly, Mary M Horowitz, and Bo Dupont. 2005. "Improved Outcome in HLA-identical Sibling Hematopoietic Stem-cell Transplantation for Acute Myelogenous Leukemia Predicted by KIR and HLA Genotypes." *Blood* 105 (12) (June 15): 4878–4884. doi:10.1182/blood-2004-12-4825.
- Huang, DeRen, Fu-Dong Shi, Steffen Jung, Gary C Pien, Jintang Wang, Thais P Salazar-Mather, Toby T He, et al. 2006. "The Neuronal Chemokine CX3CL1/fractalkine Selectively Recruits NK Cells That Modify Experimental Autoimmune Encephalomyelitis Within the Central Nervous System." *FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 20 (7) (May): 896–905. doi:10.1096/fj.05-5465com.
- Iguchi-Manaka, Akiko, Hirayasu Kai, Yumi Yamashita, Kai Shibata, Satoko Tahara-Hanaoka, Shin-ichiro Honda, Teruhito Yasui, Hitoshi Kikutani, Kazuko Shibuya, and Akira Shibuya. 2008. "Accelerated Tumor Growth in Mice Deficient in DNAM-1 Receptor." *The Journal of Experimental Medicine* 205 (13) (December 22): 2959–2964. doi:10.1084/jem.20081611.
- Ikeda, Hiroaki, Lloyd J Old, and Robert D Schreiber. 2002. "The Roles of IFN Gamma in Protection Against Tumor Development and Cancer Immunoediting." *Cytokine & Growth Factor Reviews* 13 (2) (April): 95–109.
- Ishigami, S, S Natsugoe, K Tokuda, A Nakajo, X Che, H Iwashige, K Aridome, S Hokita, and T Aikou. 2000. "Prognostic Value of Intratumoral Natural Killer Cells in Gastric Carcinoma." *Cancer* 88 (3) (February 1): 577–583.
- Jamieson, Amanda M, Andreas Diefenbach, Christopher W McMahon, Na Xiong, James R Carlyle, and David H Raulet. 2002. "The Role of the NKG2D

- Immunoreceptor in Immune Cell Activation and Natural Killing." *Immunity* 17 (1) (July): 19–29.
- Jamieson, Amanda M, Patricia Isnard, Jeffrey R Dorfman, Mark C Coles, and David H Raulet. 2004. "Turnover and Proliferation of NK Cells in Steady State and Lymphopenic Conditions." *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 172 (2) (January 15): 864–870.
- Jarahian, Mostafa, Manuela Fiedler, André Cohnen, Dominik Djandji, Günter J Hämmerling, Cornelius Gati, Adelheid Cerwenka, et al. 2011. "Modulation of NKp30- and NKp46-mediated Natural Killer Cell Responses by Poxviral Hemagglutinin." *PLoS Pathogens* 7 (8) (August): e1002195. doi:10.1371/journal.ppat.1002195.
- Jarahian, Mostafa, Carsten Watzl, Philippe Fournier, Annette Arnold, Dominik Djandji, Sarah Zahedi, Adelheid Cerwenka, Annette Paschen, Volker Schirmacher, and Frank Momburg. 2009. "Activation of Natural Killer Cells by Newcastle Disease Virus Hemagglutinin-neuraminidase." *Journal of Virology* 83 (16) (August): 8108–8121. doi:10.1128/JVI.00211-09.
- Jenkins, C, W Garcia, M J Godwin, J V Spencer, J Lewis Stern, A Abendroth, and B Slobedman. 2008. "Immunomodulatory Properties of a Viral Homolog of Human Interleukin-10 Expressed by Human Cytomegalovirus During the Latent Phase of Infection." *Journal of Virology* 82 (7) (April): 3736–3750. doi:10.1128/JVI.02173-07.
- Johansson, Sofia, Maria Johansson, Eleftheria Rosmaraki, Gustaf Vahlne, Ramit Mehr, Mali Salmon-Divon, François Lemonnier, Klas Kärre, and Petter Höglund. 2005. "Natural Killer Cell Education in Mice with Single or Multiple Major Histocompatibility Complex Class I Molecules." *The Journal of Experimental Medicine* 201 (7) (April 4): 1145–1155. doi:10.1084/jem.20050167.
- Joncker, Nathalie T, Nadine C Fernandez, Emmanuel Treiner, Eric Vivier, and David H Raulet. 2009. "NK Cell Responsiveness Is Tuned Commensurate with the Number of Inhibitory Receptors for self-MHC Class I: The Rheostat Model." *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 182 (8) (April 15): 4572–4580. doi:10.4049/jimmunol.0803900.
- Jones, D C, R S Edgar, T Ahmad, J R F Cummings, D P Jewell, J Trowsdale, and N T Young. 2006. "Killer Ig-like Receptor (KIR) Genotype and HLA Ligand Combinations in Ulcerative Colitis Susceptibility." *Genes and Immunity* 7 (7) (October): 576–582. doi:10.1038/sj.gene.6364333.
- Jones, T R, E J Wiertz, L Sun, K N Fish, J A Nelson, and H L Ploegh. 1996. "Human Cytomegalovirus US3 Impairs Transport and Maturation of Major Histocompatibility Complex Class I Heavy Chains." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93 (21) (October 15): 11327–11333.
- Juelke, Kerstin, Monica Killig, Andreas Thiel, Jun Dong, and Chiara Romagnani. 2009. "Education of Hyporesponsive NK Cells by Cytokines." *European Journal of Immunology* 39 (9) (September): 2548–2555. doi:10.1002/eji.200939307.
- Karlhofer, F M, R K Ribaldo, and W M Yokoyama. 1992. "MHC Class I Alloantigen Specificity of Ly-49+ IL-2-activated Natural Killer Cells." *Nature* 358 (6381) (July 2): 66–70. doi:10.1038/358066a0.

- Kärre, K, H G Ljunggren, G Piontek, and R Kiessling. 1986. "Selective Rejection of H-2-deficient Lymphoma Variants Suggests Alternative Immune Defence Strategy." *Nature* 319 (6055) (February 20): 675–678. doi:10.1038/319675a0.
- Katz, G, G Markel, S Mizrahi, T I Arnon, and O Mandelboim. 2001. "Recognition of HLA-Cw4 but Not HLA-Cw6 by the NK Cell Receptor Killer Cell Ig-like Receptor Two-domain Short Tail Number 4." *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 166 (12) (June 15): 7260–7267.
- Kemble, G W, and E S Mocarski. 1989. "A Host Cell Protein Binds to a Highly Conserved Sequence Element (pac-2) Within the Cytomegalovirus a Sequence." *Journal of Virology* 63 (11) (November): 4715–4728.
- Kennedy, M K, M Glaccum, S N Brown, E A Butz, J L Viney, M Embers, N Matsuki, et al. 2000. "Reversible Defects in Natural Killer and Memory CD8 T Cell Lineages in Interleukin 15-deficient Mice." *The Journal of Experimental Medicine* 191 (5) (March 6): 771–780.
- Khakoo, Salim I, Chloe L Thio, Maureen P Martin, Collin R Brooks, Xiaojiang Gao, Jacquie Astemborski, Jie Cheng, et al. 2004. "HLA and NK Cell Inhibitory Receptor Genes in Resolving Hepatitis C Virus Infection." *Science (New York, N.Y.)* 305 (5685) (August 6): 872–874. doi:10.1126/science.1097670.
- Kiessling, R, E Klein, and H Wigzell. 1975. "'Natural' Killer Cells in the Mouse. I. Cytotoxic Cells with Specificity for Mouse Moloney Leukemia Cells. Specificity and Distribution According to Genotype." *European Journal of Immunology* 5 (2) (February): 112–117. doi:10.1002/eji.1830050208.
- Kikuchi-Maki, Akiko, Tracey L Catina, and Kerry S Campbell. 2005. "Cutting Edge: KIR2DL4 Transduces Signals into Human NK Cells through Association with the Fc Receptor Gamma Protein." *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 174 (7) (April 1): 3859–3863.
- Kim, S, K Iizuka, H L Aguila, I L Weissman, and W M Yokoyama. 2000. "In Vivo Natural Killer Cell Activities Revealed by Natural Killer Cell-deficient Mice." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97 (6) (March 14): 2731–2736. doi:10.1073/pnas.050588297.
- Kim, Sungjin, Koho Iizuka, Hyun-Seok P Kang, Ayotunde Dokun, Anthony R French, Suellen Greco, and Wayne M Yokoyama. 2002. "In Vivo Developmental Stages in Murine Natural Killer Cell Maturation." *Nature Immunology* 3 (6) (June): 523–528. doi:10.1038/ni796.
- Kim, Sungjin, Jennifer Poursine-Laurent, Steven M Truscott, Lonnie Lybarger, Yun-Jeong Song, Liping Yang, Anthony R French, et al. 2005. "Licensing of Natural Killer Cells by Host Major Histocompatibility Complex Class I Molecules." *Nature* 436 (7051) (August 4): 709–713. doi:10.1038/nature03847.
- Kohrt, Holbrook E, Roch Houot, Aurélien Marabelle, Hearn Jay Cho, Keren Osman, Matthew Goldstein, Ronald Levy, and Joshua Brody. 2012. "Combination Strategies to Enhance Antitumor ADCC." *Immunotherapy* 4 (5) (May): 511–527. doi:10.2217/imt.12.38.
- Korbel, Daniel S, Olivia C Finney, and Eleanor M Riley. 2004. "Natural Killer Cells and Innate Immunity to Protozoan Pathogens." *International Journal for Parasitology* 34 (13-14) (December): 1517–1528. doi:10.1016/j.ijpara.2004.10.006.

- Kornstein, M J, R Stewart, and D E Elder. 1987. "Natural Killer Cells in the Host Response to Melanoma." *Cancer Research* 47 (5) (March 1): 1411–1412.
- Kotenko, S V, S Saccani, L S Izotova, O V Mirochnitchenko, and S Pestka. 2000. "Human Cytomegalovirus Harbors Its Own Unique IL-10 Homolog (cmvIL-10)." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97 (4) (February 15): 1695–1700.
- Kumar, Vinay, and Megan E McNerney. 2005. "A New Self: MHC-class-I-independent Natural-killer-cell Self-tolerance." *Nature Reviews. Immunology* 5 (5) (May): 363–374. doi:10.1038/nri1603.
- Kunert, Kristina, Marleen Seiler, Mir Farzin Mashregi, Katrin Klippert, Constanze Schönemann, Konrad Neumann, Johann Pratschke, Petra Reinke, Hans-Dieter Volk, and Katja Kotsch. 2007. "KIR/HLA Ligand Incompatibility in Kidney Transplantation." *Transplantation* 84 (11) (December 15): 1527–1533. doi:10.1097/01.tp.0000290681.41859.41.
- Lanier, L L, C Chang, and J H Phillips. 1994. "Human NKR-P1A. A Disulfide-linked Homodimer of the C-type Lectin Superfamily Expressed by a Subset of NK and T Lymphocytes." *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 153 (6) (September 15): 2417–2428.
- Lanier, L L, B C Corliss, J Wu, C Leong, and J H Phillips. 1998. "Immunoreceptor DAP12 Bearing a Tyrosine-based Activation Motif Is Involved in Activating NK Cells." *Nature* 391 (6668) (February 12): 703–707. doi:10.1038/35642.
- Lanier, L L, B Corliss, J Wu, and J H Phillips. 1998. "Association of DAP12 with Activating CD94/NKG2C NK Cell Receptors." *Immunity* 8 (6) (June): 693–701.
- Lanier, L L, S Cwirla, G Yu, R Testi, and J H Phillips. 1989. "Membrane Anchoring of a Human IgG Fc Receptor (CD16) Determined by a Single Amino Acid." *Science (New York, N.Y.)* 246 (4937) (December 22): 1611–1613.
- Lanier, L L, T J Kipps, and J H Phillips. 1985. "Functional Properties of a Unique Subset of Cytotoxic CD3+ T Lymphocytes That Express Fc Receptors for IgG (CD16/Leu-11 Antigen)." *The Journal of Experimental Medicine* 162 (6) (December 1): 2089–2106.
- Lanier, L L, G Yu, and J H Phillips. 1989. "Co-association of CD3 Zeta with a Receptor (CD16) for IgG Fc on Human Natural Killer Cells." *Nature* 342 (6251) (December 14): 803–805. doi:10.1038/342803a0.
- . 1991. "Analysis of Fc Gamma RIII (CD16) Membrane Expression and Association with CD3 Zeta and Fc Epsilon RI-gamma by Site-directed Mutation." *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 146 (5) (March 1): 1571–1576.
- Lazetic, S, C Chang, J P Houchins, L L Lanier, and J H Phillips. 1996. "Human Natural Killer Cell Receptors Involved in MHC Class I Recognition Are Disulfide-linked Heterodimers of CD94 and NKG2 Subunits." *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 157 (11) (December 1): 4741–4745.
- Lee, Kyung-Mi, Megan E McNerney, Susan E Stepp, Porunelloor A Mathew, John D Schatzle, Michael Bennett, and Vinay Kumar. 2004. "2B4 Acts as a Non-major Histocompatibility Complex Binding Inhibitory Receptor on Mouse Natural Killer Cells." *The Journal of Experimental Medicine* 199 (9) (May 3): 1245–1254. doi:10.1084/jem.20031989.

- Lee, N, M Llano, M Carretero, A Ishitani, F Navarro, M López-Botet, and D E Geraghty. 1998. "HLA-E Is a Major Ligand for the Natural Killer Inhibitory Receptor CD94/NKG2A." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95 (9) (April 28): 5199–5204.
- Lehner, P J, J T Karttunen, G W Wilkinson, and P Cresswell. 1997. "The Human Cytomegalovirus US6 Glycoprotein Inhibits Transporter Associated with Antigen Processing-dependent Peptide Translocation." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94 (13) (June 24): 6904–6909.
- Liao, N S, M Bix, M Zijlstra, R Jaenisch, and D Raulet. 1991. "MHC Class I Deficiency: Susceptibility to Natural Killer (NK) Cells and Impaired NK Activity." *Science (New York, N.Y.)* 253 (5016) (July 12): 199–202.
- Litwin, V, J Gumperz, P Parham, J H Phillips, and L L Lanier. 1994. "NKB1: a Natural Killer Cell Receptor Involved in the Recognition of Polymorphic HLA-B Molecules." *The Journal of Experimental Medicine* 180 (2) (August 1): 537–543.
- Liu, C C, B Perussia, Z A Cohn, and J D Young. 1986. "Identification and Characterization of a Pore-forming Protein of Human Peripheral Blood Natural Killer Cells." *The Journal of Experimental Medicine* 164 (6) (December 1): 2061–2076.
- Llano, M, N Lee, F Navarro, P García, J P Albar, D E Geraghty, and M López-Botet. 1998. "HLA-E-bound Peptides Influence Recognition by Inhibitory and Triggering CD94/NKG2 Receptors: Preferential Response to an HLA-G-derived Nonamer." *European Journal of Immunology* 28 (9) (September): 2854–2863. doi:10.1002/(SICI)1521-4141(199809)28:09<2854::AID-IMMU2854>3.0.CO;2-W.
- Lodolce, J P, D L Boone, S Chai, R E Swain, T Dassopoulos, S Trettin, and A Ma. 1998. "IL-15 Receptor Maintains Lymphoid Homeostasis by Supporting Lymphocyte Homing and Proliferation." *Immunity* 9 (5) (November): 669–676.
- López-Vázquez, A, A Miña-Blanco, J Martínez-Borra, P D Njobvu, B Suárez-Alvarez, M A Blanco-Gelaz, S González, L Rodrigo, and C López-Larrea. 2005. "Interaction Between KIR3DL1 and HLA-B*57 Supertype Alleles Influences the Progression of HIV-1 Infection in a Zambian Population." *Human Immunology* 66 (3) (March): 285–289. doi:10.1016/j.humimm.2005.01.001.
- López-Vázquez, Antonio, Luis Rodrigo, Jesus Martínez-Borra, Ramón Pérez, Manuel Rodríguez, Juan L Fdez-Morera, Dolores Fuentes, Sandra Rodríguez-Rodero, Segundo González, and Carlos López-Larrea. 2005. "Protective Effect of the HLA-Bw4I80 Epitope and the Killer Cell Immunoglobulin-like Receptor 3DS1 Gene Against the Development of Hepatocellular Carcinoma in Patients with Hepatitis C Virus Infection." *The Journal of Infectious Diseases* 192 (1) (July 1): 162–165. doi:10.1086/430351.
- Lucas, Mathias, William Schachterle, Karin Oberle, Peter Aichele, and Andreas Diefenbach. 2007. "Dendritic Cells Prime Natural Killer Cells by Trans-presenting Interleukin 15." *Immunity* 26 (4) (April): 503–517. doi:10.1016/j.immuni.2007.03.006.

- Luhm, Jürgen, Jörg-Matthias Brand, Petra Koritke, Maike Höppner, Holger Kirchner, and Christoph Frohn. 2002. "Large-scale Generation of Natural Killer Lymphocytes for Clinical Application." *Journal of Hematotherapy & Stem Cell Research* 11 (4) (August): 651–657. doi:10.1089/15258160260194794.
- Luo, Min Hua, Philip H Schwartz, and Elizabeth A Fortunato. 2008. "Neonatal Neural Progenitor Cells and Their Neuronal and Glial Cell Derivatives Are Fully Permissive for Human Cytomegalovirus Infection." *Journal of Virology* 82 (20) (October): 9994–10007. doi:10.1128/JVI.00943-08.
- Łuszczek, Wioleta, Maria Mańczak, Maria Cisko, Piotr Nockowski, Andrzej Wiśniewski, Monika Jasek, and Piotr Kuśnierczyk. 2004. "Gene for the Activating Natural Killer Cell Receptor, KIR2DS1, Is Associated with Susceptibility to Psoriasis Vulgaris." *Human Immunology* 65 (7) (July): 758–766. doi:10.1016/j.humimm.2004.05.008.
- Maenaka, K, T Juji, D I Stuart, and E Y Jones. 1999. "Crystal Structure of the Human P58 Killer Cell Inhibitory Receptor (KIR2DL3) Specific for HLA-Cw3-related MHC Class I." *Structure (London, England: 1993)* 7 (4) (April 15): 391–398.
- Maertzdorf, J, D Reipsilber, S K Parida, K Stanley, T Roberts, G Black, G Walzl, and S H E Kaufmann. 2011. "Human Gene Expression Profiles of Susceptibility and Resistance in Tuberculosis." *Genes and Immunity* 12 (1) (January): 15–22. doi:10.1038/gene.2010.51.
- Malnati, M S, M Peruzzi, K C Parker, W E Biddison, E Ciccone, A Moretta, and E O Long. 1995. "Peptide Specificity in the Recognition of MHC Class I by Natural Killer Cell Clones." *Science (New York, N.Y.)* 267 (5200) (February 17): 1016–1018.
- Mamessier, Emilie, Aude Sylvain, Marie-Laure Thibault, Gilles Houvenaeghel, Jocelyne Jacquemier, Rémy Castellano, Anthony Gonçalves, et al. 2011. "Human Breast Cancer Cells Enhance Self Tolerance by Promoting Evasion from NK Cell Antitumor Immunity." *The Journal of Clinical Investigation* 121 (9) (September): 3609–3622. doi:10.1172/JCI45816.
- Mandelboim, O, N Lieberman, M Lev, L Paul, T I Arnon, Y Bushkin, D M Davis, J L Strominger, J W Yewdell, and A Porgador. 2001. "Recognition of Haemagglutinins on Virus-infected Cells by NKp46 Activates Lysis by Human NK Cells." *Nature* 409 (6823) (February 22): 1055–1060. doi:10.1038/35059110.
- Marsh, Steven G E, Peter Parham, Bo Dupont, Daniel E Geraghty, John Trowsdale, Derek Middleton, Carlos Vilches, et al. 2003. "Killer-cell Immunoglobulin-like Receptor (KIR) Nomenclature Report, 2002." *Human Immunology* 64 (6) (June): 648–654.
- Martin, Maureen P, Xiaojiang Gao, Jeong-Hee Lee, George W Nelson, Roger Detels, James J Goedert, Susan Buchbinder, et al. 2002. "Epistatic Interaction Between KIR3DS1 and HLA-B Delays the Progression to AIDS." *Nature Genetics* 31 (4) (August): 429–434. doi:10.1038/ng934.
- Martin, Maureen P, Ying Qi, Xiaojiang Gao, Eriko Yamada, Jeffrey N Martin, Florencia Pereyra, Sara Colombo, et al. 2007. "Innate Partnership of HLA-B and KIR3DL1 Subtypes Against HIV-1." *Nature Genetics* 39 (6) (June): 733–740. doi:10.1038/ng2035.

- Martini, F, C Agrati, G D'Offizi, and F Poccia. 2005. "HLA-E Up-regulation Induced by HIV Infection May Directly Contribute to CD94-mediated Impairment of NK Cells." *International Journal of Immunopathology and Pharmacology* 18 (2) (June): 269–276.
- Matsumoto, M, S Mariathasan, M H Nahm, F Baranyay, J J Peschon, and D D Chaplin. 1996. "Role of Lymphotoxin and the Type I TNF Receptor in the Formation of Germinal Centers." *Science (New York, N.Y.)* 271 (5253) (March 1): 1289–1291.
- Matta, Jessica, Myriam Baratin, Laurent Chiche, Jean-Marie Forel, Céline Cognet, Guillemette Thomas, Catherine Farnarier, et al. 2013. "Induction of B7-H6, a Ligand for the Natural Killer Cell-activating Receptor Nkp30, in Inflammatory Conditions." *Blood* 122 (3) (July 18): 394–404. doi:10.1182/blood-2013-01-481705.
- Mavoungou, Elie, Adrian J F Luty, and Peter G Kremsner. 2003. "Natural Killer (NK) Cell-mediated Cytolysis of Plasmodium Falciparum-infected Human Red Blood Cells in Vitro." *European Cytokine Network* 14 (3) (September): 134–142.
- Mayol, Katia, Vincent Biajoux, Jacqueline Marvel, Karl Balabanian, and Thierry Walzer. 2011. "Sequential Desensitization of CXCR4 and S1P5 Controls Natural Killer Cell Trafficking." *Blood* 118 (18) (November 3): 4863–4871. doi:10.1182/blood-2011-06-362574.
- MCGAVRAN, M H, and M G SMITH. 1965. "ULTRASTRUCTURAL, CYTOCHEMICAL, AND MICROCHEMICAL OBSERVATIONS ON CYTOMEGALOVIRUS (SALIVARY GLAND VIRUS) INFECTION OF HUMAN CELLS IN TISSUE CULTURE." *Experimental and Molecular Pathology* 76 (February): 1–10.
- McNerney, Megan E, Kyung-Mi Lee, and Vinay Kumar. 2005. "2B4 (CD244) Is a non-MHC Binding Receptor with Multiple Functions on Natural Killer Cells and CD8+ T Cells." *Molecular Immunology* 42 (4) (February): 489–494. doi:10.1016/j.molimm.2004.07.032.
- Medzhitov, R, and C A Janeway Jr. 1997. "Innate Immunity: Impact on the Adaptive Immune Response." *Current Opinion in Immunology* 9 (1) (February): 4–9.
- Mehrotra, P T, R P Donnelly, S Wong, H Kanegane, A Geremew, H S Mostowski, K Furuke, J P Siegel, and E T Bloom. 1998. "Production of IL-10 by Human Natural Killer Cells Stimulated with IL-2 And/or IL-12." *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 160 (6) (March 15): 2637–2644.
- Meresse, Bertrand, Shane A Curran, Cezary Ciszewski, Gerasim Orbelyan, Mala Setty, Govind Bhagat, Leanne Lee, et al. 2006. "Reprogramming of CTLs into Natural Killer-like Cells in Celiac Disease." *The Journal of Experimental Medicine* 203 (5) (May 15): 1343–1355. doi:10.1084/jem.20060028.
- Michaëlsson, Jakob, Cristina Teixeira de Matos, Adnane Achour, Lewis L Lanier, Klas Kärre, and Kalle Söderström. 2002. "A Signal Peptide Derived from Hsp60 Binds HLA-E and Interferes with CD94/NKG2A Recognition." *The Journal of Experimental Medicine* 196 (11) (December 2): 1403–1414.
- Miller, J S, K A Alley, and P McGlave. 1994. "Differentiation of Natural Killer (NK) Cells from Human Primitive Marrow Progenitors in a Stroma-based Long-term Culture System: Identification of a CD34+7+ NK Progenitor." *Blood* 83 (9) (May 1): 2594–2601.

- Miller, J S, and V McCullar. 2001. "Human Natural Killer Cells with Polyclonal Lectin and Immunoglobulinlike Receptors Develop from Single Hematopoietic Stem Cells with Preferential Expression of NKG2A and KIR2DL2/L3/S2." *Blood* 98 (3) (August 1): 705–713.
- Miller, J S, C Verfaillie, and P McGlave. 1992. "The Generation of Human Natural Killer Cells from CD34+/DR- Primitive Progenitors in Long-term Bone Marrow Culture." *Blood* 80 (9) (November 1): 2182–2187.
- Miller, Jeffrey S, Yvette Soignier, Angela Panoskaltsis-Mortari, Sarah A McNearney, Gong H Yun, Susan K Fautsch, David McKenna, et al. 2005. "Successful Adoptive Transfer and in Vivo Expansion of Human Haploidentical NK Cells in Patients with Cancer." *Blood* 105 (8) (April 15): 3051–3057. doi:10.1182/blood-2004-07-2974.
- Moesta, Achim K, Paul J Norman, Makoto Yawata, Nobuyo Yawata, Michael Gleimer, and Peter Parham. 2008. "Synergistic Polymorphism at Two Positions Distal to the Ligand-binding Site Makes KIR2DL2 a Stronger Receptor for HLA-C Than KIR2DL3." *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 180 (6) (March 15): 3969–3979.
- Moesta, Achim K, and Peter Parham. 2012. "Diverse Functionality Among Human NK Cell Receptors for the C1 Epitope of HLA-C: KIR2DS2, KIR2DL2, and KIR2DL3." *Frontiers in Immunology* 3: 336. doi:10.3389/fimmu.2012.00336.
- Momot, T, S Koch, N Hunzelmann, T Krieg, K Ulbricht, R E Schmidt, and T Witte. 2004. "Association of Killer Cell Immunoglobulin-like Receptors with Scleroderma." *Arthritis and Rheumatism* 50 (5) (May): 1561–1565. doi:10.1002/art.20216.
- Moretta, A, C Bottino, D Pende, G Tripodi, G Tambussi, O Viale, A Orengo, M Barbaresi, A Merli, and E Ciccone. 1990. "Identification of Four Subsets of Human CD3-CD16+ Natural Killer (NK) Cells by the Expression of Clonally Distributed Functional Surface Molecules: Correlation Between Subset Assignment of NK Clones and Ability to Mediate Specific Alloantigen Recognition." *The Journal of Experimental Medicine* 172 (6) (December 1): 1589–1598.
- Moretta, A, G Tambussi, C Bottino, G Tripodi, A Merli, E Ciccone, G Pantaleo, and L Moretta. 1990. "A Novel Surface Antigen Expressed by a Subset of Human CD3- CD16+ Natural Killer Cells. Role in Cell Activation and Regulation of Cytolytic Function." *The Journal of Experimental Medicine* 171 (3) (March 1): 695–714.
- Morisaki, Takashi, Hideya Onishi, and Mitsuo Katano. 2012. "Cancer Immunotherapy Using NKG2D and DNAM-1 Systems." *Anticancer Research* 32 (6) (June): 2241–2247.
- Morvan, Maelig, Gaëlle David, Véronique Sébille, Aurore Perrin, Katia Gagne, Catherine Willem, Nolwenn Kerdudou, et al. 2008. "Autologous and Allogeneic HLA KIR Ligand Environments and Activating KIR Control KIR NK-cell Functions." *European Journal of Immunology* 38 (12) (December): 3474–3486. doi:10.1002/eji.200838407.
- Morvan, Maelig, Catherine Willem, Katia Gagne, Nolwenn Kerdudou, Gaele David, Véronique Sébille, Gilles Folléa, Jean-Denis Bignon, and Christelle Retière. 2009. "Phenotypic and Functional Analyses of KIR3DL1+ and KIR3DS1+ NK Cell Subsets Demonstrate Differential Regulation by Bw4

- Molecules and Induced KIR3DS1 Expression on Stimulated NK Cells." *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 182 (11) (June 1): 6727–6735. doi:10.4049/jimmunol.0900212.
- Motyka, B, G Korbitt, M J Pinkoski, J A Heibin, A Caputo, M Hobman, M Barry, et al. 2000. "Mannose 6-phosphate/insulin-like Growth Factor II Receptor Is a Death Receptor for Granzyme B During Cytotoxic T Cell-induced Apoptosis." *Cell* 103 (3) (October 27): 491–500.
- Moutaftsi, Magdalena, Anja M Mehl, Leszek K Borysiewicz, and Zsuzsanna Tabi. 2002. "Human Cytomegalovirus Inhibits Maturation and Impairs Function of Monocyte-derived Dendritic Cells." *Blood* 99 (8) (April 15): 2913–2921.
- Murphy, W J, V Kumar, and M Bennett. 1987. "Rejection of Bone Marrow Allografts by Mice with Severe Combined Immune Deficiency (SCID). Evidence That Natural Killer Cells Can Mediate the Specificity of Marrow Graft Rejection." *The Journal of Experimental Medicine* 165 (4) (April 1): 1212–1217.
- Narni-Mancinelli, Emilie, Baptiste N Jaeger, Claire Bernat, Aurore Fenis, Sam Kung, Aude De Gassart, Sajid Mahmood, et al. 2012. "Tuning of Natural Killer Cell Reactivity by Nkp46 and Helios Calibrates T Cell Responses." *Science (New York, N.Y.)* 335 (6066) (January 20): 344–348. doi:10.1126/science.1215621.
- Nattermann, Jacob, Hans Dieter Nischalke, Valesko Hofmeister, Bernd Kupfer, Golo Ahlenstiel, Georg Feldmann, Jiirgen Rockstroh, Elisabeth H Weiss, Tilman Sauerbruch, and Ulrich Spengler. 2005. "HIV-1 Infection Leads to Increased HLA-E Expression Resulting in Impaired Function of Natural Killer Cells." *Antiviral Therapy* 10 (1): 95–107.
- Naumova, Elissaveta, Anastassia Mihaylova, Milena Ivanova, and Snejina Mihailova. 2007. "Impact of KIR/HLA Ligand Combinations on Immune Responses in Malignant Melanoma." *Cancer Immunology, Immunotherapy: CII* 56 (1) (January): 95–100. doi:10.1007/s00262-006-0151-9.
- Nelson, George W, Maureen P Martin, Dafna Gladman, Judith Wade, John Trowsdale, and Mary Carrington. 2004. "Cutting Edge: Heterozygote Advantage in Autoimmune Disease: Hierarchy of Protection/susceptibility Conferred by HLA and Killer Ig-like Receptor Combinations in Psoriatic Arthritis." *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 173 (7) (October 1): 4273–4276.
- Nguyen, Khuong B, Thais P Salazar-Mather, Marc Y Dalod, Jeffrey B Van Deusen, Xiao-qing Wei, Foo Y Liew, Michael A Caligiuri, Joan E Durbin, and Christine A Biron. 2002. "Coordinated and Distinct Roles for IFN-alpha Beta, IL-12, and IL-15 Regulation of NK Cell Responses to Viral Infection." *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 169 (8) (October 15): 4279–4287.
- O'Leary, Jacqueline G, Mahmoud Goodarzi, Danielle L Drayton, and Ulrich H von Andrian. 2006. "T Cell- and B Cell-independent Adaptive Immunity Mediated by Natural Killer Cells." *Nature Immunology* 7 (5) (May): 507–516. doi:10.1038/ni1332.
- Odeberg, Jenny, Bodo Plachter, Lars Brandén, and Cecilia Söderberg-Nauclér. 2003. "Human Cytomegalovirus Protein Pp65 Mediates Accumulation of HLA-DR in Lysosomes and Destruction of the HLA-DR Alpha-chain." *Blood* 101 (12) (June 15): 4870–4877. doi:10.1182/blood-2002-05-1504.

- Orange, Jordan S. 2002. "Human Natural Killer Cell Deficiencies and Susceptibility to Infection." *Microbes and Infection / Institut Pasteur* 4 (15) (December): 1545–1558.
- Orr, Mark T, William J Murphy, and Lewis L Lanier. 2010. "'Unlicensed' Natural Killer Cells Dominate the Response to Cytomegalovirus Infection." *Nature Immunology* 11 (4) (April): 321–327. doi:10.1038/ni.1849.
- Pallandre, Jean R, Konrad Krzewski, Romain Bedel, Bernhard Ryffel, Anne Caignard, Pierre Simon Rohrlich, Xavier Pivot, et al. 2008. "Dendritic Cell and Natural Killer Cell Cross-talk: a Pivotal Role of CX3CL1 in NK Cytoskeleton Organization and Activation." *Blood* 112 (12) (December 1): 4420–4424. doi:10.1182/blood-2007-12-126888.
- Pando, Marcelo J, Clair M Gardiner, Michael Gleimer, Karina L McQueen, and Peter Parham. 2003. "The Protein Made from a Common Allele of KIR3DL1 (3DL1*004) Is Poorly Expressed at Cell Surfaces Due to Substitution at Positions 86 in Ig Domain 0 and 182 in Ig Domain 1." *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 171 (12) (December 15): 6640–6649.
- Pappworth, Isabel Y, Eddie C Wang, and Martin Rowe. 2007. "The Switch from Latent to Productive Infection in Epstein-barr Virus-infected B Cells Is Associated with Sensitization to NK Cell Killing." *Journal of Virology* 81 (2) (January): 474–482. doi:10.1128/JVI.01777-06.
- Parham, Peter. 2005. "MHC Class I Molecules and KIRs in Human History, Health and Survival." *Nature Reviews. Immunology* 5 (3) (March): 201–214. doi:10.1038/nri1570.
- Park, Boyoun, Youngkyun Kim, Jinwook Shin, Sunray Lee, Kwangmin Cho, Klaus Früh, Sungwook Lee, and Kwangseog Ahn. 2004. "Human Cytomegalovirus Inhibits Tapasin-dependent Peptide Loading and Optimization of the MHC Class I Peptide Cargo for Immune Evasion." *Immunity* 20 (1) (January): 71–85.
- Parolini, S, C Bottino, M Falco, R Augugliaro, S Giliani, R Franceschini, H D Ochs, et al. 2000. "X-linked Lymphoproliferative Disease. 2B4 Molecules Displaying Inhibitory Rather Than Activating Function Are Responsible for the Inability of Natural Killer Cells to Kill Epstein-Barr Virus-infected Cells." *The Journal of Experimental Medicine* 192 (3) (August 7): 337–346.
- Pasternack, M S, C R Verret, M A Liu, and H N Eisen. 1986. "Serine Esterase in Cytolytic T Lymphocytes." *Nature* 322 (6081) (August 21): 740–743. doi:10.1038/322740a0.
- Paust, Silke, Harvinder S Gill, Bao-Zhong Wang, Michael P Flynn, E Ashley Moseman, Balimkiz Senman, Marian Szczepanik, et al. 2010. "Critical Role for the Chemokine Receptor CXCR6 in NK Cell-mediated Antigen-specific Memory of Haptens and Viruses." *Nature Immunology* 11 (12) (December): 1127–1135. doi:10.1038/ni.1953.
- Pende, D, R Biassoni, C Cantoni, S Verdiani, M Falco, C di Donato, L Accame, C Bottino, A Moretta, and L Moretta. 1996. "The Natural Killer Cell Receptor Specific for HLA-A Allotypes: a Novel Member of the P58/p70 Family of Inhibitory Receptors That Is Characterized by Three Immunoglobulin-like Domains and Is Expressed as a 140-kD Disulphide-linked Dimer." *The Journal of Experimental Medicine* 184 (2) (August 1): 505–518.

- Pende, D, C Cantoni, P Rivera, M Vitale, R Castriconi, S Marcenaro, M Nanni, et al. 2001. "Role of NKG2D in Tumor Cell Lysis Mediated by Human NK Cells: Cooperation with Natural Cytotoxicity Receptors and Capability of Recognizing Tumors of Nonepithelial Origin." *European Journal of Immunology* 31 (4) (April): 1076–1086. doi:10.1002/1521-4141(200104)31:4<1076::AID-IMMU1076>3.0.CO;2-Y.
- Pende, D, S Parolini, A Pessino, S Sivori, R Augugliaro, L Morelli, E Marcenaro, et al. 1999. "Identification and Molecular Characterization of NKp30, a Novel Triggering Receptor Involved in Natural Cytotoxicity Mediated by Human Natural Killer Cells." *The Journal of Experimental Medicine* 190 (10) (November 15): 1505–1516.
- Pende, Daniela, Roberta Castriconi, Paola Romagnani, Grazia Maria Spaggiari, Stefania Marcenaro, Alessandra Dondero, Elena Lazzeri, et al. 2006. "Expression of the DNAM-1 Ligands, Nectin-2 (CD112) and Poliovirus Receptor (CD155), on Dendritic Cells: Relevance for Natural Killer-dendritic Cell Interaction." *Blood* 107 (5) (March 1): 2030–2036. doi:10.1182/blood-2005-07-2696.
- Pessino, A, S Sivori, C Bottino, A Malaspina, L Morelli, L Moretta, R Biassoni, and A Moretta. 1998. "Molecular Cloning of NKp46: a Novel Member of the Immunoglobulin Superfamily Involved in Triggering of Natural Cytotoxicity." *The Journal of Experimental Medicine* 188 (5) (September 7): 953–960.
- Phillips, J H, C W Chang, and L L Lanier. 1991. "Platelet-induced Expression of Fc Gamma RIII (CD16) on Human Monocytes." *European Journal of Immunology* 21 (4) (April): 895–899. doi:10.1002/eji.1830210406.
- Phillips, J H, J E Gumperz, P Parham, and L L Lanier. 1995. "Superantigen-dependent, Cell-mediated Cytotoxicity Inhibited by MHC Class I Receptors on T Lymphocytes." *Science (New York, N.Y.)* 268 (5209) (April 21): 403–405.
- Pietra, Gabriella, Claudia Manzini, Silvia Rivara, Massimo Vitale, Claudia Cantoni, Andrea Petretto, Mirna Balsamo, et al. 2012. "Melanoma Cells Inhibit Natural Killer Cell Function by Modulating the Expression of Activating Receptors and Cytolytic Activity." *Cancer Research* 72 (6) (March 15): 1407–1415. doi:10.1158/0008-5472.CAN-11-2544.
- Pileri, P, Y Uematsu, S Campagnoli, G Galli, F Falugi, R Petracca, A J Weiner, et al. 1998. "Binding of Hepatitis C Virus to CD81." *Science (New York, N.Y.)* 282 (5390) (October 30): 938–941.
- Plachter, B, C Sinzger, and G Jahn. 1996. "Cell Types Involved in Replication and Distribution of Human Cytomegalovirus." *Advances in Virus Research* 46: 195–261.
- Plougastel, B, K Matsumoto, C Dubbelde, and W M Yokoyama. 2001. "Analysis of a 1-Mb BAC Contig Overlapping the Mouse Nkrp1 Cluster of Genes: Cloning of Three New Nkrp1 Members, Nkrp1d, Nkrp1e, and Nkrp1f." *Immunogenetics* 53 (7) (September): 592–598. doi:10.1007/s002510100367.
- Plougastel, B, and J Trowsdale. 1997. "Cloning of NKG2-F, a New Member of the NKG2 Family of Human Natural Killer Cell Receptor Genes." *European Journal of Immunology* 27 (11) (November): 2835–2839. doi:10.1002/eji.1830271114.

- Pogge von Strandmann, Elke, Venkateswara Rao Simhadri, Bastian von Tresckow, Stephanie Sasse, Katrin S Reiners, Hinrich P Hansen, Achim Rothe, et al. 2007. "Human Leukocyte antigen-B-associated Transcript 3 Is Released from Tumor Cells and Engages the NKp30 Receptor on Natural Killer Cells." *Immunity* 27 (6) (December): 965–974. doi:10.1016/j.immuni.2007.10.010.
- Poggi, A, P Costa, L Morelli, C Cantoni, N Pella, F Spada, R Biassoni, et al. 1996. "Expression of Human NKRP1A by CD34+ Immature Thymocytes: NKRP1A-mediated Regulation of Proliferation and Cytolytic Activity." *European Journal of Immunology* 26 (6) (June): 1266–1272. doi:10.1002/eji.1830260613.
- Poli, Aurélie, Tatiana Michel, Maud Thérésine, Emmanuel Andrès, François Hentges, and Jacques Zimmer. 2009. "CD56bright Natural Killer (NK) Cells: An Important NK Cell Subset." *Immunology* 126 (4) (April): 458–465. doi:10.1111/j.1365-2567.2008.03027.x.
- Polić, B, S Jonjić, I Pavić, I Crnković, I Zorica, H Hengel, P Lucin, and U H Koszinowski. 1996. "Lack of MHC Class I Complex Expression Has No Effect on Spread and Control of Cytomegalovirus Infection in Vivo." *The Journal of General Virology* 77 (Pt 2) (February): 217–225.
- Prichard, Mark N, William J Britt, Shannon L Daily, Carroll B Hartline, and Earl R Kern. 2005. "Human Cytomegalovirus UL97 Kinase Is Required for the Normal Intranuclear Distribution of Pp65 and Virion Morphogenesis." *Journal of Virology* 79 (24) (December): 15494–15502. doi:10.1128/JVI.79.24.15494-15502.2005.
- Prod'homme, Virginie, Cora Griffin, Rebecca J Aicheler, Eddie C Y Wang, Brian P McSharry, Carole R Rickards, Richard J Stanton, et al. 2007. "The Human Cytomegalovirus MHC Class I Homolog UL18 Inhibits LIR-1+ but Activates LIR-1- NK Cells." *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 178 (7) (April 1): 4473–4481.
- Prod'homme, Virginie, Daniel M Sugrue, Richard J Stanton, Akio Nomoto, James Davies, Carole R Rickards, Daniel Cochrane, Melanie Moore, Gavin W G Wilkinson, and Peter Tomasec. 2010. "Human Cytomegalovirus UL141 Promotes Efficient Downregulation of the Natural Killer Cell Activating Ligand CD112." *The Journal of General Virology* 91 (Pt 8) (August): 2034–2039. doi:10.1099/vir.0.021931-0.
- Puzanov, I J, M Bennett, and V Kumar. 1996. "IL-15 Can Substitute for the Marrow Microenvironment in the Differentiation of Natural Killer Cells." *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 157 (10) (November 15): 4282–4285.
- Pyzik, Michal, Eve-Marie Gendron-Pontbriand, and Silvia M Vidal. 2011. "The Impact of Ly49-NK Cell-dependent Recognition of MCMV Infection on Innate and Adaptive Immune Responses." *Journal of Biomedicine & Biotechnology* 2011: 641702. doi:10.1155/2011/641702.
- Rajagopalan, S, J Fu, and E O Long. 2001. "Cutting Edge: Induction of IFN-gamma Production but Not Cytotoxicity by the Killer Cell Ig-like Receptor KIR2DL4 (CD158d) in Resting NK Cells." *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 167 (4) (August 15): 1877–1881.

- Rajagopalan, S, and E O Long. 1999. "A Human Histocompatibility Leukocyte Antigen (HLA)-G-specific Receptor Expressed on All Natural Killer Cells." *The Journal of Experimental Medicine* 189 (7) (April 5): 1093–1100.
- Raulet, David H, and Russell E Vance. 2006. "Self-tolerance of Natural Killer Cells." *Nature Reviews. Immunology* 6 (7) (July): 520–531. doi:10.1038/nri1863.
- Ravetch, J V, and B Perussia. 1989. "Alternative Membrane Forms of Fc Gamma RIII(CD16) on Human Natural Killer Cells and Neutrophils. Cell Type-specific Expression of Two Genes That Differ in Single Nucleotide Substitutions." *The Journal of Experimental Medicine* 170 (2) (August 1): 481–497.
- Reid, G Gordon, Victoria Ellsmore, and Nigel D Stow. 2003. "An Analysis of the Requirements for Human Cytomegalovirus oriLyt-dependent DNA Synthesis in the Presence of the Herpes Simplex Virus Type 1 Replication Fork Proteins." *Virology* 308 (2) (April 10): 303–316.
- Reinhardt, Jens, Geoffrey B Smith, Christopher T Himmelheber, Jane Azizkhan-Clifford, and Edward S Mocarski. 2005. "The Carboxyl-terminal Region of Human Cytomegalovirus IE1491aa Contains an Acidic Domain That Plays a Regulatory Role and a Chromatin-tethering Domain That Is Dispensable During Viral Replication." *Journal of Virology* 79 (1) (January): 225–233. doi:10.1128/JVI.79.1.225-233.2005.
- Renedo, M, I Arce, A Rodríguez, M Carretero, L L Lanier, M López-Botet, and E Fernández-Ruiz. 1997. "The Human Natural Killer Gene Complex Is Located on Chromosome 12p12-p13." *Immunogenetics* 46 (4): 307–311.
- Retière, C, V Prod'homme, B M Imbert-Marcille, M Bonneville, H Vié, and M M Hallet. 2000. "Generation of Cytomegalovirus-specific Human T-lymphocyte Clones by Using Autologous B-lymphoblastoid Cells with Stable Expression of Pp65 or IE1 Proteins: a Tool to Study the Fine Specificity of the Antiviral Response." *Journal of Virology* 74 (9) (May): 3948–3952.
- Riegler, S, H Hebart, H Einsele, P Brossart, G Jahn, and C Sinzger. 2000. "Monocyte-derived Dendritic Cells Are Permissive to the Complete Replicative Cycle of Human Cytomegalovirus." *The Journal of General Virology* 81 (Pt 2) (February): 393–399.
- Robertson, M J, and J Ritz. 1990. "Biology and Clinical Relevance of Human Natural Killer Cells." *Blood* 76 (12) (December 15): 2421–2438.
- Robinson, James, Matthew J Waller, Peter Stoehr, and Steven G E Marsh. 2005. "IPD--the Immuno Polymorphism Database." *Nucleic Acids Research* 33 (Database issue) (January 1): D523–526. doi:10.1093/nar/gki032.
- Rölle, Alexander, Mehrdad Mousavi-Jazi, Mikael Eriksson, Jenny Odeberg, Cecilia Söderberg-Nauclér, David Cosman, Klas Kärre, and Cristina Cerboni. 2003. "Effects of Human Cytomegalovirus Infection on Ligands for the Activating NKG2D Receptor of NK Cells: Up-regulation of UL16-binding Protein (ULBP)1 and ULBP2 Is Counteracted by the Viral UL16 Protein." *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 171 (2) (July 15): 902–908.
- Romagné, Francois, Pascale André, Pieter Spee, Stefan Zahn, Nicolas Anfossi, Laurent Gauthier, Marusca Capanni, et al. 2009. "Preclinical Characterization of 1-7F9, a Novel Human anti-KIR Receptor Therapeutic Antibody That Augments Natural Killer-mediated Killing of Tumor Cells."

- Blood* 114 (13) (September 24): 2667–2677. doi:10.1182/blood-2009-02-206532.
- Romero, A I, F B Thorén, J Aurelius, G Askarieh, M Brune, and K Hellstrand. 2009. “Post-consolidation Immunotherapy with Histamine Dihydrochloride and Interleukin-2 in AML.” *Scandinavian Journal of Immunology* 70 (3) (September): 194–205. doi:10.1111/j.1365-3083.2009.02303.x.
- Rosen, David B, Jayaram Bettadapura, Mohammed Alsharifi, Porunelloor A Mathew, Hilary S Warren, and Lewis L Lanier. 2005. “Cutting Edge: Lectin-like Transcript-1 Is a Ligand for the Inhibitory Human NKR-P1A Receptor.” *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 175 (12) (December 15): 7796–7799.
- Rosen, David B, Wei Cao, Danielle T Avery, Stuart G Tangye, Yong-Jun Liu, J P Houchins, and Lewis L Lanier. 2008. “Functional Consequences of Interactions Between Human NKR-P1A and Its Ligand LIT1 Expressed on Activated Dendritic Cells and B Cells.” *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 180 (10) (May 15): 6508–6517.
- ROWE, W P, J W HARTLEY, S WATERMAN, H C TURNER, and R J HUEBNER. 1956. “Cytopathogenic Agent Resembling Human Salivary Gland Virus Recovered from Tissue Cultures of Human Adenoids.” *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine. Society for Experimental Biology and Medicine (New York, N.Y.)* 92 (2) (June): 418–424.
- Ruggeri, L, M Capanni, M Casucci, I Volpi, A Tosti, K Perruccio, E Urbani, R S Negrin, M F Martelli, and A Velardi. 1999. “Role of Natural Killer Cell Alloreactivity in HLA-mismatched Hematopoietic Stem Cell Transplantation.” *Blood* 94 (1) (July 1): 333–339.
- Ruggeri, Loredana, Franco Aversa, Massimo F Martelli, and Andrea Velardi. 2006. “Allogeneic Hematopoietic Transplantation and Natural Killer Cell Recognition of Missing Self.” *Immunological Reviews* 214 (December): 202–218. doi:10.1111/j.1600-065X.2006.00455.x.
- Ruggeri, Loredana, Marusca Capanni, Elena Urbani, Katia Perruccio, Warren D Shlomchik, Antonella Tosti, Sabrina Posati, et al. 2002. “Effectiveness of Donor Natural Killer Cell Alloreactivity in Mismatched Hematopoietic Transplants.” *Science (New York, N.Y.)* 295 (5562) (March 15): 2097–2100. doi:10.1126/science.1068440.
- Samaridis, J, and M Colonna. 1997. “Cloning of Novel Immunoglobulin Superfamily Receptors Expressed on Human Myeloid and Lymphoid Cells: Structural Evidence for New Stimulatory and Inhibitory Pathways.” *European Journal of Immunology* 27 (3) (March): 660–665. doi:10.1002/eji.1830270313.
- Sanchez, V, K D Greis, E Sztul, and W J Britt. 2000. “Accumulation of Virion Tegument and Envelope Proteins in a Stable Cytoplasmic Compartment During Human Cytomegalovirus Replication: Characterization of a Potential Site of Virus Assembly.” *Journal of Virology* 74 (2) (January): 975–986.
- Sanchez-Correa, Beatriz, Inmaculada Gayoso, Juan M Bergua, Javier G Casado, Sara Morgado, Rafael Solana, and Raquel Tarazona. 2012. “Decreased Expression of DNAM-1 on NK Cells from Acute Myeloid Leukemia Patients.” *Immunology and Cell Biology* 90 (1) (January): 109–115. doi:10.1038/icb.2011.15.

- Santourlidis, Simeon, Hans-Ingo Trompeter, Sandra Weinhold, Britta Eisermann, Klaus L Meyer, Peter Wernet, and Markus Uhrberg. 2002. "Crucial Role of DNA Methylation in Determination of Clonally Distributed Killer Cell Ig-like Receptor Expression Patterns in NK Cells." *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 169 (8) (October 15): 4253–4261.
- Sarisky, R T, and G S Hayward. 1996. "Evidence That the UL84 Gene Product of Human Cytomegalovirus Is Essential for Promoting oriLyt-dependent DNA Replication and Formation of Replication Compartments in Cotransfection Assays." *Journal of Virology* 70 (11) (November): 7398–7413.
- Scheffczik, Hanno, Christos G W Savva, Andreas Holzenburg, Larissa Kolesnikova, and Elke Bogner. 2002. "The Terminase Subunits pUL56 and pUL89 of Human Cytomegalovirus Are DNA-metabolizing Proteins with Toroidal Structure." *Nucleic Acids Research* 30 (7) (April 1): 1695–1703.
- Schleypen, Julia S, Nicole Baur, Robert Kammerer, Peter J Nelson, Karl Rohrmann, Elisabeth F Gröne, Markus Hohenfellner, et al. 2006. "Cytotoxic Markers and Frequency Predict Functional Capacity of Natural Killer Cells Infiltrating Renal Cell Carcinoma." *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research* 12 (3 Pt 1) (February 1): 718–725. doi:10.1158/1078-0432.CCR-05-0857.
- Schleypen, Julia S, Marion Von Geldern, Elisabeth H Weiss, Nicole Kotzias, Karl Rohrmann, Dolores J Schendel, Christine S Falk, and Heike Pohla. 2003. "Renal Cell Carcinoma-infiltrating Natural Killer Cells Express Differential Repertoires of Activating and Inhibitory Receptors and Are Inhibited by Specific HLA Class I Allotypes." *International Journal of Cancer. Journal International Du Cancer* 106 (6) (October 10): 905–912. doi:10.1002/ijc.11321.
- Schönberg, Kathrin, Martina Sriabar, Jürgen Enczmann, Johannes C Fischer, and Markus Uhrberg. 2011. "Analyses of HLA-C-specific KIR Repertoires in Donors with Group A and B Haplotypes Suggest a Ligand-instructed Model of NK Cell Receptor Acquisition." *Blood* 117 (1) (January 6): 98–107. doi:10.1182/blood-2010-03-273656.
- Shi, Fu-Dong, Hans-Gustaf Ljunggren, Antonio La Cava, and Luc Van Kaer. 2011. "Organ-specific Features of Natural Killer Cells." *Nature Reviews. Immunology* 11 (10) (October): 658–671. doi:10.1038/nri3065.
- Shibuya, A, D Campbell, C Hannum, H Yssel, K Franz-Bacon, T McClanahan, T Kitamura, et al. 1996. "DNAM-1, a Novel Adhesion Molecule Involved in the Cytolytic Function of T Lymphocytes." *Immunity* 4 (6) (June): 573–581.
- Shum, Benny P, Laura R Flodin, David G Muir, Raja Rajalingam, Salim I Khakoo, Sophia Cleland, Lisbeth A Guethlein, Markus Uhrberg, and Peter Parham. 2002. "Conservation and Variation in Human and Common Chimpanzee CD94 and NKG2 Genes." *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 168 (1) (January 1): 240–252.
- Sinclair, John. 2008. "Human Cytomegalovirus: Latency and Reactivation in the Myeloid Lineage." *Journal of Clinical Virology: The Official Publication of the Pan American Society for Clinical Virology* 41 (3) (March): 180–185. doi:10.1016/j.jcv.2007.11.014.

- Sinzger, C, and G Jahn. 1996. "Human Cytomegalovirus Cell Tropism and Pathogenesis." *Intervirology* 39 (5-6): 302–319.
- Sinzger, C, B Plachter, A Grefte, T H The, and G Jahn. 1996. "Tissue Macrophages Are Infected by Human Cytomegalovirus in Vivo." *The Journal of Infectious Diseases* 173 (1) (January): 240–245.
- Sirén, Jukka, Timo Sareneva, Jaana Pirhonen, Mari Strengell, Ville Veckman, Ilkka Julkunen, and Sampsa Matikainen. 2004. "Cytokine and Contact-dependent Activation of Natural Killer Cells by Influenza A or Sendai Virus-infected Macrophages." *The Journal of General Virology* 85 (Pt 8) (August): 2357–2364. doi:10.1099/vir.0.80105-0.
- Sivori, S, M Vitale, L Morelli, L Sanseverino, R Augugliaro, C Bottino, L Moretta, and A Moretta. 1997. "P46, a Novel Natural Killer Cell-specific Surface Molecule That Mediates Cell Activation." *The Journal of Experimental Medicine* 186 (7) (October 6): 1129–1136.
- Sivori, Simona, Claudia Cantoni, Silvia Parolini, Emanuela Marcenaro, Romana Conte, Lorenzo Moretta, and Alessandro Moretta. 2003. "IL-21 Induces Both Rapid Maturation of Human CD34+ Cell Precursors Towards NK Cells and Acquisition of Surface Killer Ig-like Receptors." *European Journal of Immunology* 33 (12) (December): 3439–3447. doi:10.1002/eji.200324533.
- Sivori, Simona, Michela Falco, Mariella Della Chiesa, Simona Carlomagno, Massimo Vitale, Lorenzo Moretta, and Alessandro Moretta. 2004. "CpG and Double-stranded RNA Trigger Human NK Cells by Toll-like Receptors: Induction of Cytokine Release and Cytotoxicity Against Tumors and Dendritic Cells." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101 (27) (July 6): 10116–10121. doi:10.1073/pnas.0403744101.
- Sivori, Simona, Michela Falco, Emanuela Marcenaro, Silvia Parolini, Roberto Biassoni, Cristina Bottino, Lorenzo Moretta, and Alessandro Moretta. 2002. "Early Expression of Triggering Receptors and Regulatory Role of 2B4 in Human Natural Killer Cell Precursors Undergoing in Vitro Differentiation." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99 (7) (April 2): 4526–4531. doi:10.1073/pnas.072065999.
- Smith, Hamish R C, Jonathan W Heusel, Indira K Mehta, Sungjin Kim, Brigitte G Dorner, Olga V Naidenko, Koho Iizuka, et al. 2002. "Recognition of a Virus-encoded Ligand by a Natural Killer Cell Activation Receptor." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99 (13) (June 25): 8826–8831. doi:10.1073/pnas.092258599.
- SMITH, M G. 1956. "Propagation in Tissue Cultures of a Cytopathogenic Virus from Human Salivary Gland Virus (SGV) Disease." *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine. Society for Experimental Biology and Medicine (New York, N.Y.)* 92 (2) (June): 424–430.
- Smyth, M J, N Y Crowe, and D I Godfrey. 2001. "NK Cells and NKT Cells Collaborate in Host Protection from Methylcholanthrene-induced Fibrosarcoma." *International Immunology* 13 (4) (April): 459–463.
- Smyth, Mark J, Kazuyoshi Takeda, Yoshihiro Hayakawa, Jacques J Peschon, Marcel R M van den Brink, and Hideo Yagita. 2003. "Nature's TRAIL--on a Path to Cancer Immunotherapy." *Immunity* 18 (1) (January): 1–6.

- Soroceanu, Liliana, Armin Akhavan, and Charles S Cobbs. 2008. "Platelet-derived Growth Factor-alpha Receptor Activation Is Required for Human Cytomegalovirus Infection." *Nature* 455 (7211) (September 18): 391–395. doi:10.1038/nature07209.
- Spaete, R R, and E S Mocarski. 1985. "The Alpha Sequence of the Cytomegalovirus Genome Functions as a Cleavage/packaging Signal for Herpes Simplex Virus Defective Genomes." *Journal of Virology* 54 (3) (June): 817–824.
- Spits, H, L L Lanier, and J H Phillips. 1995. "Development of Human T and Natural Killer Cells." *Blood* 85 (10) (May 15): 2654–2670.
- Stamminger, T, H Fickenscher, and B Fleckenstein. 1990. "Cell Type-specific Induction of the Major Immediate Early Enhancer of Human Cytomegalovirus by Cyclic AMP." *The Journal of General Virology* 71 (Pt 1) (January): 105–113.
- Stenger, S, D A Hanson, R Teitelbaum, P Dewan, K R Niazi, C J Froelich, T Ganz, et al. 1998. "An Antimicrobial Activity of Cytolytic T Cells Mediated by Granulysin." *Science (New York, N.Y.)* 282 (5386) (October 2): 121–125.
- Stern, M, H Elsässer, G Hönger, J Steiger, S Schaub, and C Hess. 2008. "The Number of Activating KIR Genes Inversely Correlates with the Rate of CMV Infection/reactivation in Kidney Transplant Recipients." *American Journal of Transplantation: Official Journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons* 8 (6) (June): 1312–1317. doi:10.1111/j.1600-6143.2008.02242.x.
- Stern-Ginossar, Noam, Naama Elefant, Albert Zimmermann, Dana G Wolf, Nivin Saleh, Moshe Biton, Elad Horwitz, et al. 2007. "Host Immune System Gene Targeting by a Viral miRNA." *Science (New York, N.Y.)* 317 (5836) (July 20): 376–381. doi:10.1126/science.1140956.
- Stewart, C Andrew, Fanny Laugier-Anfossi, Frédéric Vély, Xavier Saulquin, Jenifer Riedmuller, Agnès Tisserant, Laurent Gauthier, et al. 2005. "Recognition of peptide-MHC Class I Complexes by Activating Killer Immunoglobulin-like Receptors." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102 (37) (September 13): 13224–13229. doi:10.1073/pnas.0503594102.
- Stewart-Jones, Guillaume B E, Kati di Gleria, Simon Kollnberger, Andrew J McMichael, E Yvonne Jones, and Paul Bowness. 2005. "Crystal Structures and KIR3DL1 Recognition of Three Immunodominant Viral Peptides Complexed to HLA-B*2705." *European Journal of Immunology* 35 (2) (February): 341–351. doi:10.1002/eji.200425724.
- Sugita, K, M J Robertson, Y Torimoto, J Ritz, S F Schlossman, and C Morimoto. 1992. "Participation of the CD27 Antigen in the Regulation of IL-2-activated Human Natural Killer Cells." *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 149 (4) (August 15): 1199–1203.
- Sun, J Y, L Gaidulis, A Daggis, J Palmer, R Rodriguez, M M Miller, S J Forman, and D Senitzer. 2005. "Killer Ig-like Receptor (KIR) Compatibility Plays a Role in the Prevalence of Acute GVHD in Unrelated Hematopoietic Cell Transplants for AML." *Bone Marrow Transplantation* 36 (6) (September): 525–530. doi:10.1038/sj.bmt.1705089.
- Sun, Joseph C, Joshua N Beilke, and Lewis L Lanier. 2009. "Adaptive Immune Features of Natural Killer Cells." *Nature* 457 (7229) (January 29): 557–561. doi:10.1038/nature07665.

- Sun, Joseph C, Averil Ma, and Lewis L Lanier. 2009. "Cutting Edge: IL-15-independent NK Cell Response to Mouse Cytomegalovirus Infection." *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 183 (5) (September 1): 2911–2914. doi:10.4049/jimmunol.0901872.
- Suzuki, Yu, Yoshiaki Hamamoto, Yumie Ogasawara, Kimi Ishikawa, Yoshiaki Yoshikawa, Takehiko Sasazuki, and Masahiko Muto. 2004. "Genetic Polymorphisms of Killer Cell Immunoglobulin-like Receptors Are Associated with Susceptibility to Psoriasis Vulgaris." *The Journal of Investigative Dermatology* 122 (5) (May): 1133–1136. doi:10.1111/j.0022-202X.2004.22517.x.
- Swann, Jeremy B, Matthew D Vesely, Anabel Silva, Janelle Sharkey, Shizuo Akira, Robert D Schreiber, and Mark J Smyth. 2008. "Demonstration of Inflammation-induced Cancer and Cancer Immunoediting During Primary Tumorigenesis." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105 (2) (January 15): 652–656. doi:10.1073/pnas.0708594105.
- Sylwester, Andrew W, Bridget L Mitchell, John B Edgar, Cara Taormina, Christian Pelte, Franziska Ruchti, Paul R Sleath, et al. 2005. "Broadly Targeted Human Cytomegalovirus-specific CD4+ and CD8+ T Cells Dominate the Memory Compartments of Exposed Subjects." *The Journal of Experimental Medicine* 202 (5) (September 5): 673–685. doi:10.1084/jem.20050882.
- Takanami, I, K Takeuchi, and M Giga. 2001. "The Prognostic Value of Natural Killer Cell Infiltration in Resected Pulmonary Adenocarcinoma." *The Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery* 121 (6) (June): 1058–1063. doi:10.1067/mtc.2001.113026.
- Takeda, K, Y Hayakawa, M J Smyth, N Kayagaki, N Yamaguchi, S Kakuta, Y Iwakura, H Yagita, and K Okumura. 2001. "Involvement of Tumor Necrosis Factor-related Apoptosis-inducing Ligand in Surveillance of Tumor Metastasis by Liver Natural Killer Cells." *Nature Medicine* 7 (1) (January): 94–100. doi:10.1038/83416.
- Tangye, S G, H Cherwinski, L L Lanier, and J H Phillips. 2000. "2B4-mediated Activation of Human Natural Killer Cells." *Molecular Immunology* 37 (9) (June): 493–501.
- Tangye, S G, J H Phillips, and L L Lanier. 2000. "The CD2-subset of the Ig Superfamily of Cell Surface Molecules: Receptor-ligand Pairs Expressed by NK Cells and Other Immune Cells." *Seminars in Immunology* 12 (2) (April): 149–157. doi:10.1006/smim.2000.0217.
- Tarr, P E. 1996. "Granulocyte-macrophage Colony-stimulating Factor and the Immune System." *Medical Oncology (Northwood, London, England)* 13 (3) (September): 133–140.
- Tay, C H, E Szomolanyi-Tsuda, and R M Welsh. 1998. "Control of Infections by NK Cells." *Current Topics in Microbiology and Immunology* 230: 193–220.
- Taylor-Wiedeman, J, J G Sissons, L K Borysiewicz, and J H Sinclair. 1991. "Monocytes Are a Major Site of Persistence of Human Cytomegalovirus in Peripheral Blood Mononuclear Cells." *The Journal of General Virology* 72 (Pt 9) (September): 2059–2064.
- Thielens, Ariane, Eric Vivier, and François Romagné. 2012. "NK Cell MHC Class I Specific Receptors (KIR): From Biology to Clinical Intervention." *Current*

- Opinion in Immunology* 24 (2) (April): 239–245. doi:10.1016/j.coi.2012.01.001.
- Thorén, Fredrik B, Rebecca E Riise, Jenny Ousbäck, Mariella Della Chiesa, Mikael Alsterholm, Emanuela Marcenaro, Silvia Pesce, et al. 2012. “Human NK Cells Induce Neutrophil Apoptosis via an NKp46- and Fas-dependent Mechanism.” *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 188 (4) (February 15): 1668–1674. doi:10.4049/jimmunol.1102002.
- Tirabassi, Rebecca S, and Hidde L Ploegh. 2002. “The Human Cytomegalovirus US8 Glycoprotein Binds to Major Histocompatibility Complex Class I Products.” *Journal of Virology* 76 (13) (July): 6832–6835.
- Tissot, C, C Rebouissou, B Klein, and N Mechti. 1997. “Both Human Alpha/beta and Gamma Interferons Upregulate the Expression of CD48 Cell Surface Molecules.” *Journal of Interferon & Cytokine Research: The Official Journal of the International Society for Interferon and Cytokine Research* 17 (1) (January): 17–26.
- Tomasec, P, V M Braud, C Rickards, M B Powell, B P McSharry, S Gadola, V Cerundolo, L K Borysiewicz, A J McMichael, and G W Wilkinson. 2000. “Surface Expression of HLA-E, an Inhibitor of Natural Killer Cells, Enhanced by Human Cytomegalovirus gpUL40.” *Science (New York, N.Y.)* 287 (5455) (February 11): 1031.
- Tomasec, Peter, Eddie C Y Wang, Andrew J Davison, Borivoj Vojtesek, Melanie Armstrong, Cora Griffin, Brian P McSharry, et al. 2005. “Downregulation of Natural Killer Cell-activating Ligand CD155 by Human Cytomegalovirus UL141.” *Nature Immunology* 6 (2) (February): 181–188. doi:10.1038/ni1156.
- Tomazin, R, J Boname, N R Hegde, D M Lewinsohn, Y Altschuler, T R Jones, P Cresswell, J A Nelson, S R Riddell, and D C Johnson. 1999. “Cytomegalovirus US2 Destroys Two Components of the MHC Class II Pathway, Preventing Recognition by CD4+ T Cells.” *Nature Medicine* 5 (9) (September): 1039–1043. doi:10.1038/12478.
- Tooze, J, M Hollinshead, B Reis, K Radsak, and H Kern. 1993. “Progeny Vaccinia and Human Cytomegalovirus Particles Utilize Early Endosomal Cisternae for Their Envelopes.” *European Journal of Cell Biology* 60 (1) (February): 163–178.
- Tran, T H, D Middleton, B Döhler, S Scherer, A Meenagh, C Sleator, and G Opelz. 2009. “Reassessing the Impact of Donor HLA-C Genotype on Long-term Liver Transplant Survival.” *American Journal of Transplantation: Official Journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons* 9 (7) (July): 1674–1678. doi:10.1111/j.1600-6143.2009.02609.x.
- Tran, T Hien, Joannis Mytilineos, Sabine Scherer, Gunter Laux, Derek Middleton, and Gerhard Opelz. 2005. “Analysis of KIR Ligand Incompatibility in Human Renal Transplantation.” *Transplantation* 80 (8) (October 27): 1121–1123.
- Trowsdale, J, R Barten, A Haude, C A Stewart, S Beck, and M J Wilson. 2001. “The Genomic Context of Natural Killer Receptor Extended Gene Families.” *Immunological Reviews* 181 (June): 20–38.
- Uhrberg, M, N M Valiante, B P Shum, H G Shilling, K Lienert-Weidenbach, B Corliss, D Tyan, L L Lanier, and P Parham. 1997. “Human Diversity in

- Killer Cell Inhibitory Receptor Genes." *Immunity* 7 (6) (December): 753–763.
- Ulbrecht, M, S Martinozzi, M Grzeschik, H Hengel, J W Ellwart, M Pla, and E H Weiss. 2000. "Cutting Edge: The Human Cytomegalovirus UL40 Gene Product Contains a Ligand for HLA-E and Prevents NK Cell-mediated Lysis." *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 164 (10) (May 15): 5019–5022.
- Vaidya, Swapnil V, Susan E Stepp, Megan E McNerney, Jae-Kyung Lee, Michael Bennett, Kyung-Mi Lee, Colin L Stewart, Vinay Kumar, and Porunelloor A Mathew. 2005. "Targeted Disruption of the 2B4 Gene in Mice Reveals an in Vivo Role of 2B4 (CD244) in the Rejection of B16 Melanoma Cells." *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 174 (2) (January 15): 800–807.
- Valés-Gómez, M, H T Reyburn, R A Erskine, M López-Botet, and J L Strominger. 1999. "Kinetics and Peptide Dependency of the Binding of the Inhibitory NK Receptor CD94/NKG2-A and the Activating Receptor CD94/NKG2-C to HLA-E." *The EMBO Journal* 18 (15) (August 2): 4250–4260. doi:10.1093/emboj/18.15.4250.
- Van Bergen, Jeroen, Allan Thompson, Christelle Retière, John Trowsdale, and Frits Koning. 2009. "Cutting Edge: Killer Ig-like Receptors Mediate 'Missing Self' Recognition in Vivo." *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 182 (5) (March 1): 2569–2572. doi:10.4049/jimmunol.0804042.
- Van den Broek, M E, D Kägi, F Ossendorp, R Toes, S Vamvakas, W K Lutz, C J Melief, R M Zinkernagel, and H Hengartner. 1996. "Decreased Tumor Surveillance in Perforin-deficient Mice." *The Journal of Experimental Medicine* 184 (5) (November 1): 1781–1790.
- Van der Slik, Arno R, Bobby P C Koeleman, Willem Verduijn, G Jan Bruining, Bart O Roep, and Marius J Giphart. 2003. "KIR in Type 1 Diabetes: Disparate Distribution of Activating and Inhibitory Natural Killer Cell Receptors in Patients Versus HLA-matched Control Subjects." *Diabetes* 52 (10) (October): 2639–2642.
- Vance, R E, A M Jamieson, and D H Raulet. 1999. "Recognition of the Class Ib Molecule Qa-1(b) by Putative Activating Receptors CD94/NKG2C and CD94/NKG2E on Mouse Natural Killer Cells." *The Journal of Experimental Medicine* 190 (12) (December 20): 1801–1812.
- Vance, R E, J R Kraft, J D Altman, P E Jensen, and D H Raulet. 1998. "Mouse CD94/NKG2A Is a Natural Killer Cell Receptor for the Nonclassical Major Histocompatibility Complex (MHC) Class I Molecule Qa-1(b)." *The Journal of Experimental Medicine* 188 (10) (November 16): 1841–1848.
- VandenBussche, C J, T J Mulrooney, W R Frazier, S Dakshanamurthy, and C K Hurley. 2009. "Dramatically Reduced Surface Expression of NK Cell Receptor KIR2DS3 Is Attributed to Multiple Residues Throughout the Molecule." *Genes and Immunity* 10 (2) (March): 162–173. doi:10.1038/gene.2008.91.
- Vankayalapati, Ramakrishna, Ankita Garg, Angel Porgador, David E Griffith, Peter Klucar, Hassan Safi, William M Girard, David Cosman, Thomas Spies, and Peter F Barnes. 2005. "Role of NK Cell-activating Receptors and Their Ligands in the Lysis of Mononuclear Phagocytes Infected with an

- Intracellular Bacterium." *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 175 (7) (October 1): 4611–4617.
- Vankayalapati, Ramakrishna, Benjamin Wizel, Stephen E Weis, Hassan Safi, David L Lakey, Ofer Mandelboim, Buka Samten, Angel Porgador, and Peter F Barnes. 2002. "The NKp46 Receptor Contributes to NK Cell Lysis of Mononuclear Phagocytes Infected with an Intracellular Bacterium." *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 168 (7) (April 1): 3451–3457.
- Verheyden, S, R Schots, W Duquet, and C Demanet. 2005. "A Defined Donor Activating Natural Killer Cell Receptor Genotype Protects Against Leukemic Relapse after Related HLA-identical Hematopoietic Stem Cell Transplantation." *Leukemia* 19 (8) (August): 1446–1451. doi:10.1038/sj.leu.2403839.
- Vieillard, Vincent, Jack L Strominger, and Patrice Debré. 2005. "NK Cytotoxicity Against CD4+ T Cells During HIV-1 Infection: a Gp41 Peptide Induces the Expression of an NKp44 Ligand." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102 (31) (August 2): 10981–10986. doi:10.1073/pnas.0504315102.
- Vilches, C, R Rajalingam, M Uhrberg, C M Gardiner, N T Young, and P Parham. 2000. "KIR2DL5, a Novel Killer-cell Receptor with a D0-D2 Configuration of Ig-like Domains." *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 164 (11) (June 1): 5797–5804.
- Villegas, Francisco R, Santiago Coca, Vicente G Villarrubia, Rodrigo Jiménez, María Jesús Chillón, Javier Jareño, Marcos Zuñil, and Luis Callol. 2002. "Prognostic Significance of Tumor Infiltrating Natural Killer Cells Subset CD57 in Patients with Squamous Cell Lung Cancer." *Lung Cancer (Amsterdam, Netherlands)* 35 (1) (January): 23–28.
- Vitale, M, C Bottino, S Sivori, L Sanseverino, R Castriconi, E Marcenaro, R Augugliaro, L Moretta, and A Moretta. 1998. "NKp44, a Novel Triggering Surface Molecule Specifically Expressed by Activated Natural Killer Cells, Is Involved in Non-major Histocompatibility Complex-restricted Tumor Cell Lysis." *The Journal of Experimental Medicine* 187 (12) (June 15): 2065–2072.
- Vitale, M, M Falco, R Castriconi, S Parolini, R Zambello, G Semenzato, R Biassoni, C Bottino, L Moretta, and A Moretta. 2001. "Identification of NKp80, a Novel Triggering Molecule Expressed by Human NK Cells." *European Journal of Immunology* 31 (1) (January): 233–242. doi:10.1002/1521-4141(200101)31:1<233::AID-IMMU233>3.0.CO;2-4.
- Vitale, Massimo, Mariella Della Chiesa, Simona Carlomagno, Daniela Pende, Maurizio Aricò, Lorenzo Moretta, and Alessandro Moretta. 2005. "NK-dependent DC Maturation Is Mediated by TNFalpha and IFNgamma Released Upon Engagement of the NKp30 Triggering Receptor." *Blood* 106 (2) (July 15): 566–571. doi:10.1182/blood-2004-10-4035.
- Vivier, E, P Morin, C O'Brien, B Druker, S F Schlossman, and P Anderson. 1991. "Tyrosine Phosphorylation of the Fc Gamma RIII(CD16): Zeta Complex in Human Natural Killer Cells. Induction by Antibody-dependent Cytotoxicity but Not by Natural Killing." *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 146 (1) (January 1): 206–210.

- Vosshenrich, Christian A J, Marcos E García-Ojeda, Sandrine I Samson-Villéger, Valerie Pasqualetto, Laurence Enault, Odile Richard-Le Goff, Erwan Corcuff, et al. 2006. "A Thymic Pathway of Mouse Natural Killer Cell Development Characterized by Expression of GATA-3 and CD127." *Nature Immunology* 7 (11) (November): 1217–1224. doi:10.1038/ni1395.
- Wagner, Claudia S, Hans-Gustaf Ljunggren, and Adnane Achour. 2008. "Immune Modulation by the Human Cytomegalovirus-encoded Molecule UL18, a Mystery yet to Be Solved." *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 180 (1) (January 1): 19–24.
- Wagtmann, N, S Rajagopalan, C C Winter, M Peruzzi, and E O Long. 1995. "Killer Cell Inhibitory Receptors Specific for HLA-C and HLA-B Identified by Direct Binding and by Functional Transfer." *Immunity* 3 (6) (December): 801–809.
- Walzer, Thierry, Mathieu Bléry, Julie Chaix, Nicolas Fuseri, Lionel Chasson, Scott H Robbins, Sébastien Jaeger, et al. 2007. "Identification, Activation, and Selective in Vivo Ablation of Mouse NK Cells via NKp46." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104 (9) (February 27): 3384–3389. doi:10.1073/pnas.0609692104.
- Walzer, Thierry, and Eric Vivier. 2011. "G-protein-coupled Receptors in Control of Natural Killer Cell Migration." *Trends in Immunology* 32 (10) (October): 486–492. doi:10.1016/j.it.2011.05.002.
- Wang, Eddie C Y, Brian McSharry, Christelle Retiere, Peter Tomasec, Sheila Williams, Leszek K Borysiewicz, Veronique M Braud, and Gavin W G Wilkinson. 2002. "UL40-mediated NK Evasion During Productive Infection with Human Cytomegalovirus." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99 (11) (May 28): 7570–7575. doi:10.1073/pnas.112680099.
- Wang, Xin, Shu-Mei Huong, Marie L Chiu, Nancy Raab-Traub, and Eng-Shang Huang. 2003. "Epidermal Growth Factor Receptor Is a Cellular Receptor for Human Cytomegalovirus." *Nature* 424 (6947) (July 24): 456–461. doi:10.1038/nature01818.
- WELLER, T H, J B HANSHAW, and D E SCOTT. 1960. "Serologic Differentiation of Viruses Responsible for Cytomegalic Inclusion Disease." *Virology* 12 (September): 130–132.
- Welsh, R M, J O Brubaker, M Vargas-Cortes, and C L O'Donnell. 1991. "Natural Killer (NK) Cell Response to Virus Infections in Mice with Severe Combined Immunodeficiency. The Stimulation of NK Cells and the NK Cell-dependent Control of Virus Infections Occur Independently of T and B Cell Function." *The Journal of Experimental Medicine* 173 (5) (May 1): 1053–1063.
- Welte, Stefan, Sabrina Kuttruff, Inja Waldhauer, and Alexander Steinle. 2006. "Mutual Activation of Natural Killer Cells and Monocytes Mediated by NKp80-AICL Interaction." *Nature Immunology* 7 (12) (December): 1334–1342. doi:10.1038/ni1402.
- Westgaard, Ingunn H, Siri F Berg, John T Vaage, Lawrence L Wang, Wayne M Yokoyama, Erik Dissen, and Sigbjørn Fossum. 2004. "Rat NKp46 Activates Natural Killer Cell Cytotoxicity and Is Associated with FcepsilonRIgamma and CD3zeta." *Journal of Leukocyte Biology* 76 (6) (December): 1200–1206. doi:10.1189/jlb.0903428.

- White, Elizabeth A, Charles L Clark, Veronica Sanchez, and Deborah H Spector. 2004. "Small Internal Deletions in the Human Cytomegalovirus IE2 Gene Result in Nonviable Recombinant Viruses with Differential Defects in Viral Gene Expression." *Journal of Virology* 78 (4) (February): 1817–1830.
- Wiertz, E J, T R Jones, L Sun, M Bogyo, H J Geuze, and H L Ploegh. 1996. "The Human Cytomegalovirus US11 Gene Product Dislocates MHC Class I Heavy Chains from the Endoplasmic Reticulum to the Cytosol." *Cell* 84 (5) (March 8): 769–779.
- Wiertz, E J, D Tortorella, M Bogyo, J Yu, W Mothes, T R Jones, T A Rapoport, and H L Ploegh. 1996. "Sec61-mediated Transfer of a Membrane Protein from the Endoplasmic Reticulum to the Proteasome for Destruction." *Nature* 384 (6608) (December 5): 432–438. doi:10.1038/384432a0.
- Wills, Mark R, Omodele Ashiru, Matthew B Reeves, Georgina Okecha, John Trowsdale, Peter Tomasec, Gavin W G Wilkinson, John Sinclair, and J G Patrick Sissons. 2005. "Human Cytomegalovirus Encodes an MHC Class I-like Molecule (UL142) That Functions to Inhibit NK Cell Lysis." *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 175 (11) (December 1): 7457–7465.
- Wilson, J L, J Charo, A Martín-Fontecha, P Dellabona, G Casorati, B J Chambers, R Kiessling, M T Bejarano, and H G Ljunggren. 1999. "NK Cell Triggering by the Human Costimulatory Molecules CD80 and CD86." *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 163 (8) (October 15): 4207–4212.
- Wilson, M J, M Torkar, A Haude, S Milne, T Jones, D Sheer, S Beck, and J Trowsdale. 2000. "Plasticity in the Organization and Sequences of Human KIR/ILT Gene Families." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97 (9) (April 25): 4778–4783. doi:10.1073/pnas.080588597.
- Wilson, M J, M Torkar, and J Trowsdale. 1997. "Genomic Organization of a Human Killer Cell Inhibitory Receptor Gene." *Tissue Antigens* 49 (6) (June): 574–579.
- Winter, C C, J E Gumperz, P Parham, E O Long, and N Wagtmann. 1998. "Direct Binding and Functional Transfer of NK Cell Inhibitory Receptors Reveal Novel Patterns of HLA-C Allotype Recognition." *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 161 (2) (July 15): 571–577.
- Wu, J, Y Song, A B Bakker, S Bauer, T Spies, L L Lanier, and J H Phillips. 1999. "An Activating Immunoreceptor Complex Formed by NKG2D and DAP10." *Science (New York, N.Y.)* 285 (5428) (July 30): 730–732.
- Wu, Q H, W Trymbulak, R J Tataka, S J Forman, R A Zeff, and J D Shanley. 1994. "Replication of Human Cytomegalovirus in Cells Deficient in Beta 2-microglobulin Gene Expression." *The Journal of General Virology* 75 (Pt 10) (October): 2755–2759.
- Yen, J H, B E Moore, T Nakajima, D Scholl, D J Schaid, C M Weyand, and J J Goronzy. 2001. "Major Histocompatibility Complex Class I-recognizing Receptors Are Disease Risk Genes in Rheumatoid Arthritis." *The Journal of Experimental Medicine* 193 (10) (May 21): 1159–1167.
- Yokoyama, S, D Staunton, R Fisher, M Amiot, J J Fortin, and D A Thorley-Lawson. 1991. "Expression of the Blast-1 Activation/adhesion Molecule and Its Identification as CD48." *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 146 (7) (April 1): 2192–2200.

- Yokoyama, Wayne M, and Sungjin Kim. 2006. "Licensing of Natural Killer Cells by Self-major Histocompatibility Complex Class I." *Immunological Reviews* 214 (December): 143–154. doi:10.1111/j.1600-065X.2006.00458.x.
- Yu, Jianhua, Hsiaoyin C Mao, Min Wei, Tiffany Hughes, Jianying Zhang, Il-kyoo Park, Shujun Liu, et al. 2010. "CD94 Surface Density Identifies a Functional Intermediary Between the CD56bright and CD56dim Human NK-cell Subsets." *Blood* 115 (2) (January 14): 274–281. doi:10.1182/blood-2009-04-215491.
- Yu, Jianhua, Takeki Mitsui, Min Wei, Hsiaoyin Mao, Jonathan P Butchar, Mithun Vinod Shah, Jianying Zhang, et al. 2011. "NKp46 Identifies an NKT Cell Subset Susceptible to Leukemic Transformation in Mouse and Human." *The Journal of Clinical Investigation* 121 (4) (April): 1456–1470. doi:10.1172/JCI43242.
- Yu, Junli, Glenn Heller, Joseph Chewning, Sungjin Kim, Wayne M Yokoyama, and Katharine C Hsu. 2007. "Hierarchy of the Human Natural Killer Cell Response Is Determined by Class and Quantity of Inhibitory Receptors for self-HLA-B and HLA-C Ligands." *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 179 (9) (November 1): 5977–5989.
- Yu, Y Y, V Kumar, and M Bennett. 1992. "Murine Natural Killer Cells and Marrow Graft Rejection." *Annual Review of Immunology* 10: 189–213. doi:10.1146/annurev.iy.10.040192.001201.
- Zingoni, Alessandra, Thierry Sornasse, Benjamin G Cocks, Yuetsu Tanaka, Angela Santoni, and Lewis L Lanier. 2004. "Cross-talk Between Activated Human NK Cells and CD4+ T Cells via OX40-OX40 Ligand Interactions." *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 173 (6) (September 15): 3716–3724.
- Zou, Yizhou, Wade Bresnahan, R Travis Taylor, and Peter Stastny. 2005. "Effect of Human Cytomegalovirus on Expression of MHC Class I-related Chains A." *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 174 (5) (March 1): 3098–3104.
- Zwirner, Norberto W, and Carolina I Domaica. 2010. "Cytokine Regulation of Natural Killer Cell Effector Functions." *BioFactors (Oxford, England)* 36 (4) (August): 274–288. doi:10.1002/biof.107.

ANNEXE

Both the nature of KIR3DL1 alleles and the KIR3DL1/S1 allele combination affect the KIR3DL1 NK-cell repertoire in the French population

Katia Gagne^{1,2}, Catherine Willem¹, Nolwenn Legrand¹, Zakia Djaoud¹, Gaëlle David¹, Pauline Rettman¹, Céline Bressollette-Bodin¹, David Senitzer³, Julie Esbelin⁴, Anne Cesbron-Gautier², Thierry Schneider¹ and Christelle Retière¹

¹ Etablissement Français du Sang and Université de Nantes, EA4271 Immunovirologie et Polymorphisme Génétique, Nantes, France

² Laboratoire d'Histocompatibilité et d'Immunogénétique, EFS Nantes, France

³ Division of Hematology and Bone Marrow Transplantation, City of Hope, National Medical Center, Duarte, CA, USA

⁴ Hôpital Mère-Enfant, CHU Hôtel Dieu, Nantes, France

NK-cell functions are regulated by many activating and inhibitory receptors including KIR3DL1. Extensive allelic polymorphism and variability in expression can directly alter NK-cell phenotype and functions. Here we investigated the KIR3DL1⁺ NK-cell repertoire, taking into account the allelic KIR3DL1/S1 polymorphism, KIR3DL1 phenotype, and function. All 109 studied individuals possessed at least one KIR3DL1 allele, with weak KIR3DL1*054, or null alleles being frequently present. In KIR3DL1^{high/null} individuals, we observed a bimodal distribution of KIR3DL1⁺ NK cells identified by a different KIR3DL1 expression level and cell frequency regardless of a similar amount of both KIR3DL1 transcripts, HLA background, or KIR2D expression. However, this bimodal distribution can be explained by a functional selection following a hierarchy of KIR3DL1 receptors. The higher expression of KIR3DL1 observed on cord blood NK cells suggests the expression of the functional KIR3DL1*004 receptors. Thus, the low amplification of KIR3DL1^{high}, KIR3DL1*004 NK-cell subsets during development may be due to extensive signaling via these two receptors. Albeit in a nonexclusive manner, individual immunological experience may contribute to shaping the KIR3DL1 NK-cell repertoire. Together, this study provides new insight into the mechanisms regulating the KIR3DL1 NK-cell repertoire.

Keywords: Allelic polymorphism · French population · KIR3DL1 · KIR3DL1/S1 allele combinations · NK-cell repertoire



Additional supporting information may be found in the online version of this article at the publisher's web-site

Introduction

The effector functions of NK cells are regulated by inhibitory and activating receptors, e.g. killer cell immunoglobulin-like receptors (KIR), which are specific for allotypic determinants shared by different HLA-class I molecules [1]. In particular, HLA-Cw allotypes with Asn⁸⁰ (C1 ligands) or Lys⁸⁰ (C2 ligands) are, respectively, recognized by KIR2DL2/2DL3 and KIR2DL1. HLA-A and HLA-B allotypes with a Bw4 motif are recognized by KIR3DL1 whereas HLA-A3/A11 are recognized by KIR3DL2 [2, 3]. Lack of inhibitory KIR engagement can trigger alloreactive KIR NK-cell cytotoxicity only within functionally competent NK cells [4]. Although the ligands and functions of inhibitory KIR receptors are well documented, this is not the case for activating KIR receptors and their ligands, except for KIR2DS1 which recognizes C2 ligands only in C2-adult individuals [5]. Moreover, the activating receptor KIR3DS1, which segregates as an allele of KIR3DL1 [6], shares more than 97% sequence homology in its extracellular domain with the KIR3DL1 receptor. However, a functional interaction with HLA-A or HLA-B allotypes sharing the Bw4 public epitope has not been demonstrated *in vitro* [7, 8] despite a significantly higher frequency of KIR3DS1⁺ NK cells observed in Bw4⁺ than in Bw4⁻ individuals [9].

KIR genes are located on chromosome 19q13.4. To date, 14 functional KIR genes have been characterized [10]. Within the human population, genomic diversity of the KIR region is achieved on several levels. KIR gene content varies between individuals who can exhibit 7–14 inhibitory and activating KIR genes [11]. Population studies have demonstrated two major KIR haplotypes: A and B [12]. The A haplotypes correspond to 7 KIR genes, including KIR2DS4 as the only activating KIR gene. In contrast, B haplotypes are more diverse and are characterized by the presence of more than one activating KIR gene and the absence of the KIR2DS4 gene [13, 14]. KIR gene polymorphism is the largest contributor to KIR region diversity, with multiple alleles defined [15]. While polymorphism is limited in the KIR2DL1 and KIR2DL2/L3 genes, it is much broader for KIR3DL1 and can even alter NK-cell functions [16, 17]. Indeed, depending on the KIR3DL1 allele present in a given individual, the level of KIR3DL1 expression differs on the NK-cell surface, i.e. null for KIR3DL1*004, low for KIR3DL1*005 and *007, and high for KIR3DL1*001, *002, *01502, and *008 alleles [18–20]. Two KIR3DL1 alleles can be transcribed in one NK-cell clone, and the proportion of clones expressing both alleles is high in comparison to clones expressing only one KIR3DL1 allele. However, based on the phenotypic pattern on all NK cells, only the nature of each allele is marked [19].

In addition to allelic polymorphism, the variability in expression levels of KIR3DL1 molecules on the NK-cell surface also varies depending on the presence or absence of autologous Bw4 molecules, promoter polymorphism, and DNA methylation [21–23]. Functional interaction between KIR3DL1 receptors and their HLA-Bw4 ligands are modulated by KIR3DL1 allotypes [24, 25] and the peptide content of HLA class I molecules [26]. Moreover, KIR3DL1⁺ NK-cell cytotoxicity differs depending on KIR3DL1 allotypes and/or HLA-A, HLA-B Bw4⁺ targets [3, 27, 28].

From a clinical standpoint, KIR3DL1 allelic polymorphism has been correlated with HIV progression and viral load [29]. We have previously shown that KIR3DL1/3DS1 gene disparities of donor/recipient pairs in hematopoietic stem cell transplantation have a significant impact on hematopoietic stem cell transplantation outcome [30].

Until now, the impact of KIR3DL1/3DS1 allele combinations on NK-cell phenotype and function has only been studied in one Japanese cohort not representative of Caucasians [31]. However, the mechanisms shaping the KIR3DL1 repertoire remain ill-defined. The link between KIR3DL1 allelic polymorphism, levels of KIR3DL1 expression at the NK-cell surface, and frequency of KIR3DL1⁺ NK-cell subsets has yet to be clarified. This is necessary in order to better understand the mechanisms that shape the KIR3DL1⁺ NK-cell repertoire. In this study, we hypothesize that the high KIR3DL1 allelic polymorphism, including frequent null alleles observed in Caucasians, might impact the formation of the KIR3DL1 NK-cell repertoire. We therefore analyzed the KIR3DL1 NK-cell repertoire taking into account the KIR3DL1 allelic polymorphism, KIR3DL1/KIR3DS1 allele combinations, and phenotypic patterns such as frequency, the mean level of all KIR3DL1⁺ NK-cell subsets, the Bw4 environment, and the functional potential of these KIR3DL1⁺ NK-cell subsets.

Results

High proportion of KIR3DL1^{high} and KIR3DL1^{null} alleles in French individuals

KIR3DL1/3DS1 allele combinations were investigated in AA (*n* = 34), AB (*n* = 67), or BB (*n* = 8) KIR genotyped individuals. Overall, 33 different KIR3DL1/3DS1 allele combinations were observed (Fig. 1A, central panel). AA and AB KIR genotyped individuals exhibited a higher KIR3DL1 allelic variability compared with BB KIR genotyped individuals. The KIR3DL1*001, *004 allele combination was the most frequent in AA KIR genotyped individuals (Fig. 1A). KIR3DL1*001, *002, *004, *005, *007, *008, *015 known alleles were the most frequent (Fig. 1A, right panel). In AA KIR genotyped individuals, the frequencies of KIR3DL1 alleles ranged from 1.61 (KIR3DL1*008, *015, *005, *009, *019) to 32.26% (KIR3DL1*004; Fig. 1A, right panel). In AB KIR genotyped individuals, the frequencies of KIR3DL1 alleles ranged from 0.71 (KIR3DL1*017, *009) to 17.73% (KIR3DL1*001; Fig. 1A, right panel). In our cohort, the highly expressed KIR3DL1*001 and null KIR3DL1*004 alleles were the most frequent, being observed at one or two doses in 39 (35%) and 32 (29%) KIR genotyped individuals, respectively (Fig. 1A, right panel). The presence of autologous HLA-A and/or HLA-B Bw4⁺ molecules did not affect both the KIR3DL1 allele and KIR3DL1/3DS1 allele combination frequencies (data not shown).

The frequency of KIR3DL1⁺ NK-cell populations and the KIR3DL1 expression level were further assessed using the KIR3DL1- and KIR3DS1-specific Z27 specific monoclonal antibody in 109 KIR3DL1 allele-typed individuals (Fig. 1B).

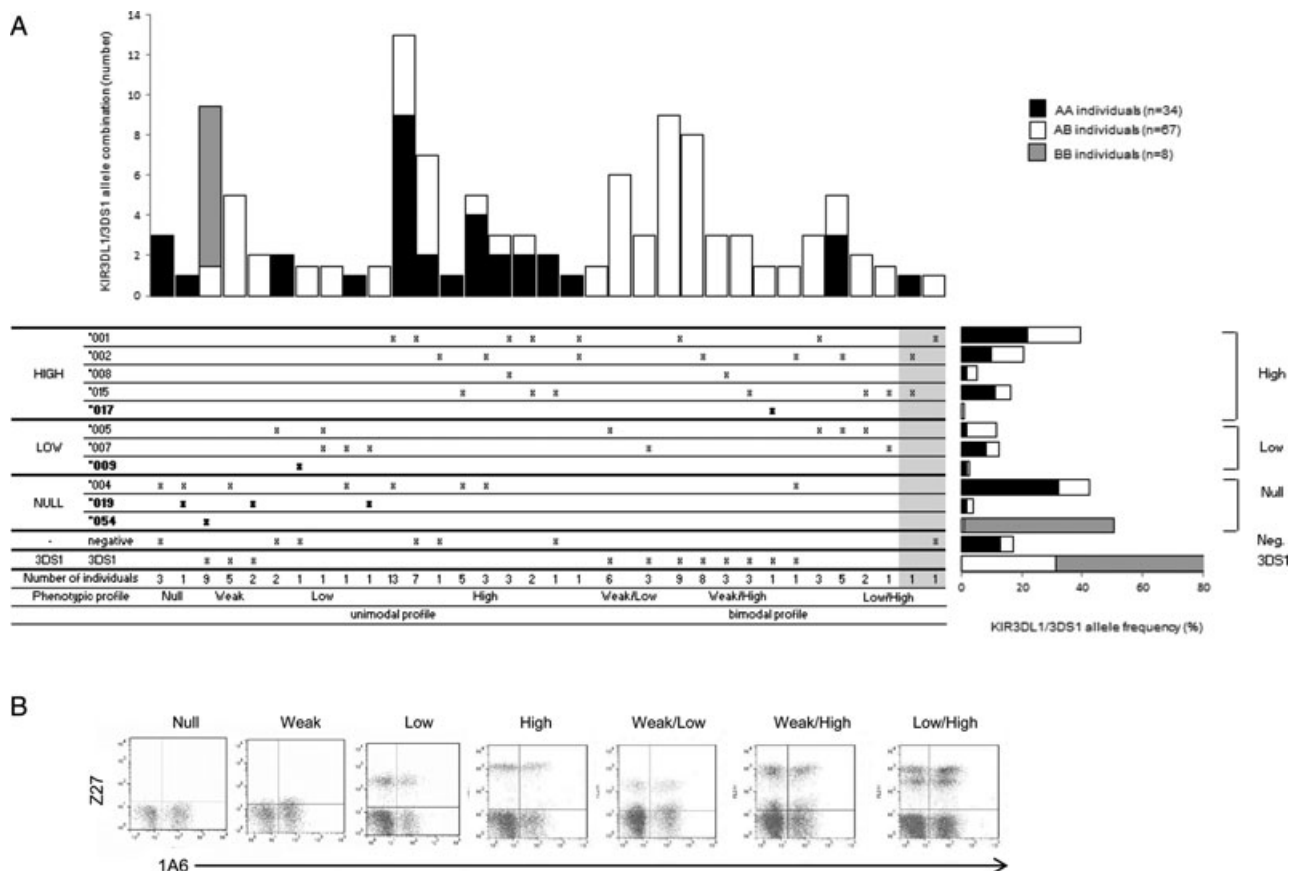


Figure 1. High proportion of KIR3DL1^{high} and KIR3DL1^{null} alleles in French individuals. (A) The number of KIR3DL1/3DS1 allele combinations and corresponding KIR3DL1/3DS1 allele frequency were established combining both allele-group-specific PCR-SSP and sequencing of polymorphic exons in AA (*n* = 34), AB (*n* = 67), and BB (*n* = 8) KIR genotyped individuals as described in the Materials and Methods (top). Distribution of KIR3DL1/3DS1 allele combinations and corresponding number of individuals are shown for each allele according to level of expression intensity on the NK-cell surface (i.e. null, low, high) and KIR3DS1 (weak) using the KIR3DL1/3DS1-specific Z27 mAb (bottom). New KIR3DL1 phenotypes are indicated in bold type and unexpected KIR3DL1 profiles are highlighted with gray shading. (B) Representative flow cytometry density plots of KIR3DL1⁺ and KIR3DS1⁺ NK cells for different KIR3DL1/S1 allele combinations identified from 109 studied individuals are shown. The staining was done using the NKp46-specific mAb to target NK cells, KIR2D-specific 1A6 mAb, and KIR3DL1/3DS1-specific Z27 mAb to evaluate KIR3DL1/3DS1⁺ NK cells with or without KIR2D receptor expression. Data shown are representative of 109 individuals.

To examine the potential effect of KIR3DL1/3DS1 allele combinations on NK KIR3DL1⁺ phenotype, individuals were divided into different groups based on null, low, and high KIR3DL1 expression, and weak expression of KIR3DS1. Seven different phenotypic patterns were identified: no binding pattern (KIR3DL1^{null}, null/null genotypes), a unimodal pattern with weak intensity (KIR3DL1^{null}/KIR3DS1), a unimodal pattern with low intensity (KIR3DL1^{low/low} or KIR3DL1^{low/null}), a unimodal pattern with high intensity (KIR3DL1^{high/high} or KIR3DL1^{high/null}), a bimodal pattern with weak and low intensities (KIR3DS1/KIR3DL1^{low}), a bimodal pattern with weak and high intensities (KIR3DS1/KIR3DL1^{high}), and a bimodal pattern with low and high intensities (KIR3DL1^{low/high}). The bimodal expression patterns observed in KIR3DL1^{low/high} and KIR3DS1/KIR3DL1^{high} individuals indicates the presence of NK-cell subsets expressing each of the expected KIR3DL1 alleles, and are in agreement with the reported mutually exclusive expression of KIR3DL1 and KIR3DS1 [6]. All combinations includ-

ing KIR3DL1^{high}, KIR3DL1^{low}, KIR3DL1^{null}, or KIR3DS1 were observed. The in-depth analysis of KIR3DL1 alleles and NK-cell phenotypes revealed the KIR3DL1 phenotypic profile for KIR3DL1*009 and KIR3DL1*01702 alleles which are, respectively, expressed at low and high levels on the NK-cell surface and highlight unusual KIR3DL1 phenotypic profiles in a low proportion of individuals (Fig. 1A). The distribution of all KIR3DL1/3DS1 allele combinations shows that KIR3DL1^{high} alleles were abundant, and mainly associated with KIR3DL1^{null} or KIR3DS1 (Fig. 1A and B).

The KIR3DL1*054 allele is frequently present and mainly associated with KIR3DS1

All KIR3DS1⁺ individuals for whom no KIR3DL1 allele was identified at the genotypic level had the KIR3DL1*054 allele [32], as illustrated in Figure 2A for two individuals and two well-characterized cell lines (13th International Workshop; WT51 and

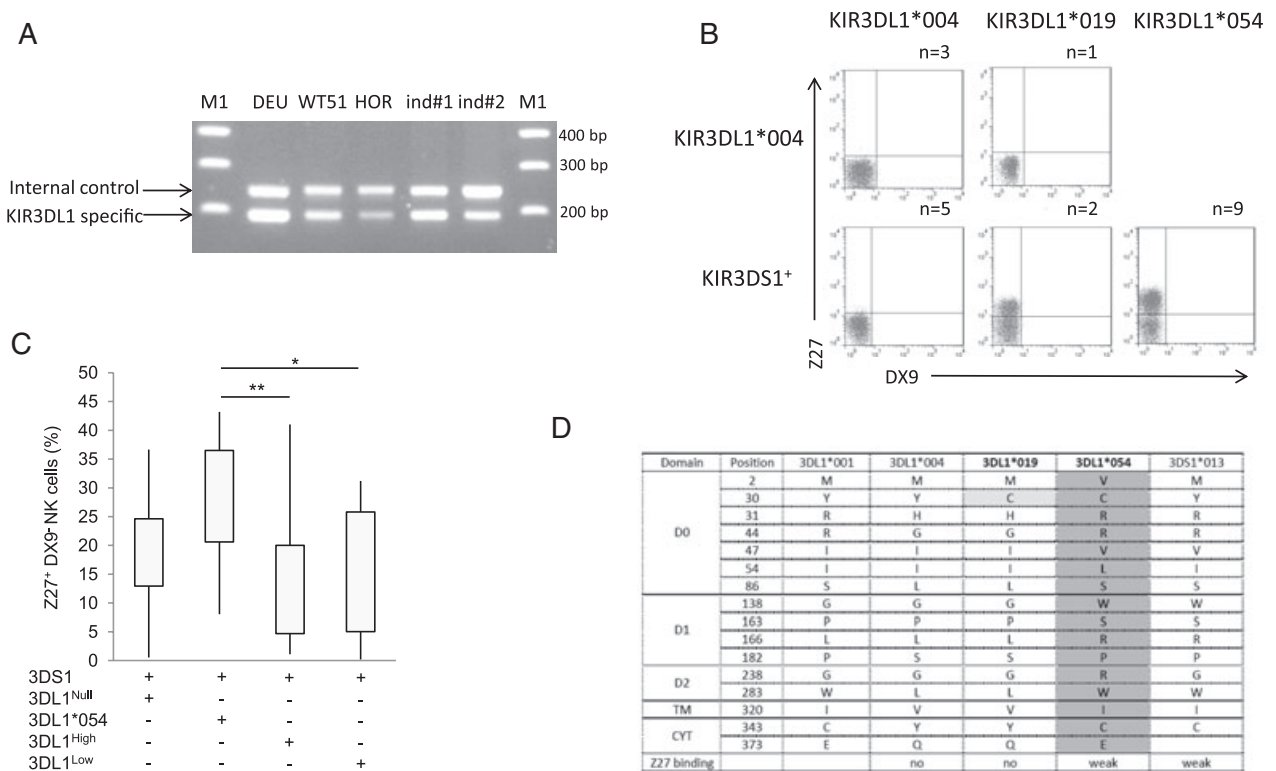


Figure 2. The KIR3DL1*054 allele is frequently present and mainly associated to KIR3DS1. (A) Visualization of KIR3DL1 PCR amplification products in a 2% Seakem® (Lonza) agarose gel in 0.5X TBE buffer with a 100 bp Ext. ladder marker (Lonza, M1). The figure shows one KIR3DL1⁺ control Workshop DNA (DEU), two KIR3DL1⁻ control Workshop DNAs (WT51, HOR) and two individuals previously determined as KIR3DL1⁻ using the KIR genotyping SSP kit from Invitrogen. Both an internal control band at 256 bp and a specific PCR product amplifying exon 3 at 197 bp using homemade KIR3DL1 primers [53] can be observed. (B) Representative flow cytometry density plots of KIR3DL1⁺ and KIR3DS1⁺ NK cells for different KIR3DL1/S1 allele combinations integrating KIR3DL1*004, KIR3DL1*019, or KIR3DL1*054 with the KIR3DS1 or KIR3DL1*004 allele are shown. Density plots are gated on CD3⁺ CD56⁺ NK cells. KIR3DL1⁺ and KIR3DS1⁺ cells are, respectively, targeted as DX9⁺ Z27⁺ and DX9⁻ Z27⁺ cells. The number of individuals displaying each KIR3DL1/S1 allele combination is indicated above the density plot. (C) Box and whisker plot summarizing the frequency of Z27⁺ DX9⁻ NK cells in KIR3DS1⁺ individuals as a function of the nature of the KIR3DL1 allele: null ($n = 7$), KIR3DL1*054 ($n = 7$), high ($n = 19$) and low ($n = 8$). Top and bottom whiskers represent values of the top and bottom 25% of cases respectively; boxed area, interquartile range. Statistical significance ($*p < 0.05$; $**p < 0.01$) between different groups was determined using the one-way ANOVA test. (D) Amino acid substitutions and level of Z27 binding for the KIR3DL1*004 allotype compared with the KIR3DL1*001 (reference), KIR3DL1*019 and KIR3DL1*054 (in bold), and KIR3DS1*013 allotypes are shown. Different amino acid substitutions between KIR3DL1*004 and KIR3DL1*019 on the one hand and KIR3DL1*004 and KIR3DL1*054 on the other hand are highlighted in light gray and dark gray shading respectively.

HOR) previously defined as KIR3DL1⁻ [33]. The KIR3DL1*001, *005 genotyped and characterized DEU cell line (13th International Workshop) was used as a positive control. Sequencing of all amplified products in nine 3DL1⁻, 3DS1⁺ genotyped individuals showed that the KIR3DL1*054 allele was unique, with specific T⁴⁷⁵, T⁵⁵⁰ and G⁵⁶⁰ nucleotides in exon 4 (data not shown). As described for KIR3DL1*004 [34, 35], no KIR3DL1 receptor was detected on the NK-cell surface for the only KIR3DL1*019, *004 individual studied (Fig. 2B). Alignment of amino acid substitutions of KIR3DL1*019 and KIR3DL1*054 compared with that of the KIR3DL1*004 allotype showed that the expected mature KIR3DL1*019 protein possesses the same amino acids involved in the intracellular retention of the null KIR3DL1*004 allotype, i.e. L⁸⁶ and S¹⁸² (Fig. 2D). Only one amino acid in the D0 domain differed between KIR3DL1*019 and KIR3DL1*004. All KIR3DL1*054⁺ individuals identified in our cohort presented the KIR3DS1 allele (Fig. 1A). In KIR3DS1⁺ individuals, stain-

ing using the combination of Z27 and DX9 mAbs did not identify a DX9⁺ Z27⁺ population potentially corresponding to KIR3DL1*004, *019, or *054 allele products. Because KIR3DS1 and KIR3DL1*054 [32, 36] were recognized by Z27 (a weak intensity staining pattern was observed Fig. 2B), it was difficult to selectively evaluate the expression of KIR3DL1*054 at the NK-cell surface. Interestingly, the frequency of Z27⁺ DX9⁻ expression was significantly higher for KIR3DS1⁺, 3DL1*054⁺ (28%, $n = 7$) than for KIR3DS1⁺, 3DL1^{high} (13.26%, $n = 19$), or KIR3DS1⁺, KIR3DL1^{low} (13.03%, $n = 8$) genotyped individuals with a p value of 0.01 and 0.03, respectively (Fig. 2C). This suggested either a cellular expression of the KIR3DL1*054 allotype, like KIR3DS1, recognized by the Z27 mAb, or a higher expression of KIR3DS1 in association with the KIR3DL1*054 allele (Fig. 2C). Different amino acid substitutions were detected between KIR3DL1*054 and KIR3DL1*004 (Fig. 2D), suggesting that KIR3DL1*054 is more similar to KIR3DS1 than to KIR3DL1. These amino acid

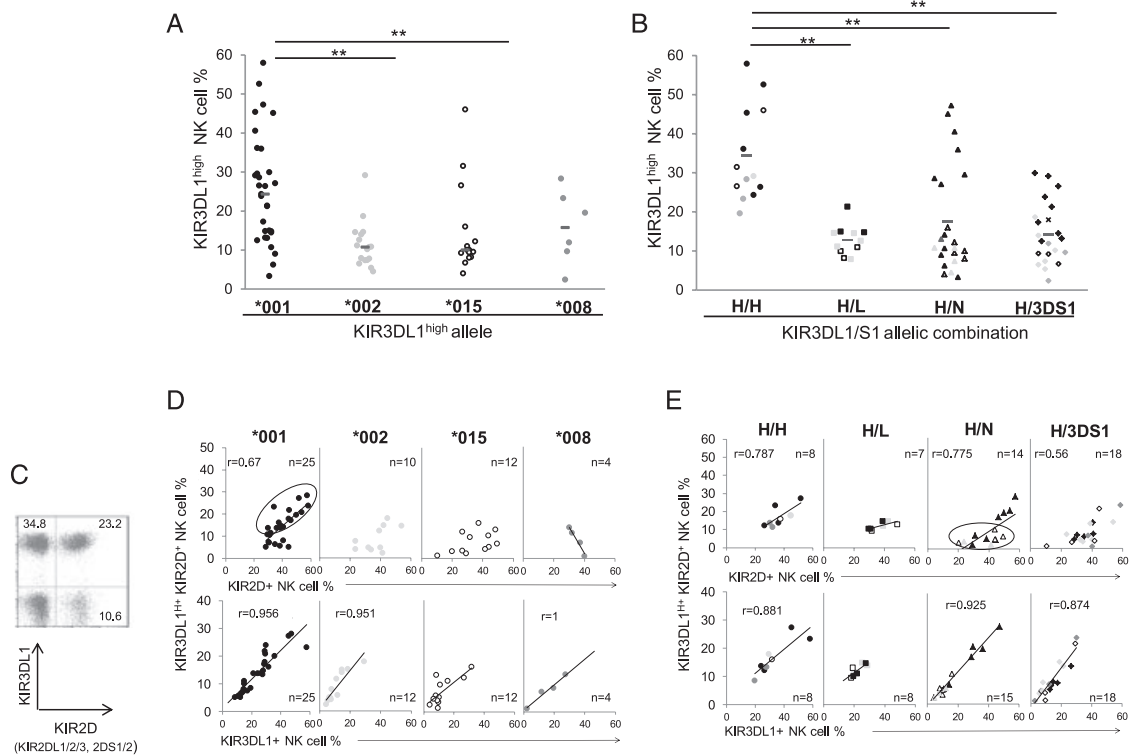


Figure 3. KIR3DL1^{high} NK-cell frequencies are determined by the number and nature of KIR3DL1^{high} alleles. (A) The KIR3DL1^{high} NK-cell frequencies out of all NK cells for 70 studied individuals as a function of the nature of the KIR3DL1^{high} allele: KIR3DL1*001 (filled black circle), KIR3DL1*002 (filled light gray circle), KIR3DL1*015 (open circle), and KIR3DL1*008 (filled dark gray circle) are shown. (B) All KIR3DL1^{high} NK-cell frequencies out of all NK cells for 70 studied individuals as a function of the second KIR3DL1 allele (high/high, high/low, and high/null) or KIR3DS1 (high/3DS1): KIR3DL1^{high} (circle), KIR3DL1^{low} (square), KIR3DL1^{null} (triangle), or KIR3DS1 (diamond). For all dots, the nature of each allele is determined by the color code used previously: KIR3DL1*001 (filled black symbols), KIR3DL1*002 (filled light gray symbol), KIR3DL1*015 (open symbol), KIR3DL1*008 (filled dark gray symbol), and KIR3DL1*017 (black cross). Statistical significance (** $p < 0.01$) between both groups was determined using the one-way ANOVA test. (C) Representative density plot of flow cytometry analysis of NK-cell (CD3⁺ CD56⁺) phenotype using KIR3DL1-specific Z27 and KIR2DL1/2/3- and KIR2DS1/2-specific 1A6 mAbs. (D, E) KIR3DL1^{high} KIR2D⁺ NK-cell frequencies are compared with KIR3DL1^{high} NK-cell frequencies and KIR2D⁺ NK-cell frequencies as a function of (D) the nature of the KIR3DL1^{high} allele (*001, *002, *015, and *008), or of (E) the KIR3DL1/3DS1 allelic combinations (high/high, high/low, high/null, and high/3DS1). For all dots, the nature of each allele is determined by the color code used in (A, B). Spearman's rank correlation coefficients were calculated and indicated only when a significant p -value was obtained ($p < 0.05$). The number of studied individuals is indicated on each plot graph.

changes, especially in the extracellular domains, could potentially interfere with Z27/DX9 epitope recognition.

KIR3DL1^{high} NK-cell frequencies are determined by the number and nature of KIR3DL1^{high} alleles

Taking into account the nature of KIR3DL1^{high} alleles, we identified from all studied KIR3DL1^{high} individuals ($n = 70$), a higher frequency of KIR3DL1^{high} NK cells with the KIR3DL1*001 allele (24.3%, $n = 31$) than the KIR3DL1*002 allele (10.7%, $n = 17$, $p < 0.0003$), the KIR3DL1*015 allele (10%, $n = 15$, $p = 0.01$), or the KIR3DL1*008 (15.5%, $n = 6$, $p > 0.05$) (Fig. 3A). The frequency of KIR3DL1^{high} NK cells was further compared in four groups of individuals based on the nature of the second allele: KIR3DL1^{high}, KIR3DL1^{low}, KIR3DL1^{null}, and KIR3DS1. Interestingly the overall frequency of KIR3DL1^{high} NK cells in KIR3DL1^{high/high} individuals was about twice that found in het-

erozygous individuals (29.2%, $n = 13$ versus 12.2%, $n = 57$, $p = 3 \times 10^{-7}$) (Fig. 3B). The distribution of KIR3DL1^{high} NK-cell frequencies was heterogeneous in KIR3DL1^{high/null} and KIR3DL1^{high/3DS1} individuals, and clearly bimodal for the KIR3DL1^{high/null} group. However, on average the KIR3DL1^{high} NK-cell frequencies in KIR3DL1^{high/null} and KIR3DL1^{high/3DS1} individuals were much lower than in KIR3DL1^{high/high} individuals (10.8 versus 29.2%, $p = 0.0015$ and 12.5 versus 29.2%, $p = 6.2 \times 10^{-7}$, respectively). Such differences are in accordance with KIR3DL1 allelic exclusion, suggesting independent and additive generation of NK-cell subsets with the KIR3DL1 alleles being expressed in a mutually exclusive fashion. Within KIR3DL1^{high/high} individuals ($n = 13$), higher KIR3DL1⁺ NK-cell frequencies were observed for homozygous KIR3DL1*001 individuals than for those with a single or no KIR3DL1*001 allele (Fig. 3B). A similarly higher percentage of KIR3DL1^{high} NK cells was observed in individuals carrying KIR3DL1*001 versus other KIR3DL1^{high} alleles in KIR3DL1^{high/null}, KIR3DL1^{high/low}, and KIR3DL1^{high/3DS1}

individuals (Fig. 3B). Strikingly, the frequency of KIR3DL1^{high} NK cells expressing the KIR3DL1*001 allele increases to around 50% with only one copy of the KIR3DL1*001 allele, notably for KIR3DL1*001,*004 genotyped individuals (Fig. 3B). Since the KIR3DL1 NK-cell frequency can be influenced by the Bw4 environment [21], we investigated the frequency and nature of the KIR3DL1 ligand in this French population. Overall, the frequency of HLA-B Bw4⁺ individuals was high (59%) and increased above 70% when both HLA-A and HLA-B Bw4⁺ molecules were taken into account. Fourteen out of 18 described Bw4 ligands were observed, with a predominance of A24 (27.4%) and B44 (30.2%; Supporting Information Fig. 1A). The presence of autologous HLA-A and/or HLA-B Bw4⁺ molecules did not affect the frequency of KIR3DL1^{high} NK cells taking into account not only all KIR3DL1^{high} individuals but also the number of KIR3DL1^{high} allele copies (2X or 1X) or KIR3DL1/3DS1 allele combinations (3DL1^{high/low}, 3DL1^{high/null}, or 3DL1^{high}/3DS1; Supporting Information Fig. 1B). Moreover, the higher frequency of KIR3DL1^{high} NK cells observed with the KIR3DL1*001 allele was independent of the Bw4 ligand number (Supporting Information Fig. 1B). Thus, the heterogeneous distribution of KIR3DL1^{high} NK-cell frequencies, especially within KIR3DL1^{high/null} individuals, suggests the contribution of factors other than copy number and Bw4 environment. We observed that the KIR3DL1/S1 allele combinations were associated not only with KIR genotypes (Fig. 1A) but also with the presence of a particular KIR gene. For example, 21 out of 22 KIR3DL1^{high}/3DS1 genotyped individuals displayed the KIR2DS1 gene compared with only 2 out of 12 KIR3DL1^{high/high} individuals, none out of 23 KIR3DL1^{high/null} and none out of 11 KIR3DL1^{high/low} individuals (data not shown). To address whether KIR2D (KIR2DL1/2/3 and KIR2DS1/2) acquisition affects the KIR3DL1 NK-cell repertoire, we determined the phenotype of NK cells by flow cytometry using KIR3DL1-specific Z27 and KIR2DL1/2/3- and KIR2DS1/2DS2-specific 1A6 mAbs (Fig. 3C). We then analyzed the proportion of KIR3DL1^{high} NK cells expressing KIR2D as a function of the nature of KIR3DL1^{high} alleles (Fig. 3D, lower panel) and as a function of the KIR3DL1/S1 allele combination (Fig. 3E, lower panel). Interestingly, a proportionate fraction of KIR3DL1^{high} KIR2D of around 50% of KIR3DL1^{high} NK cells⁺ was observed regardless of the KIR3DL1^{high} alleles and KIR3DL1/S1 allele combinations. Indeed, a positive correlation was observed mainly for KIR3DL1*001 ($r = 0.956$), KIR3DL1*002 ($r = 0.951$), and KIR3DL1*008 ($r = 1$) alleles with a p -value < 0.05 . In contrast, the Spearman's rank test showed a low correlation between the frequency of KIR2D⁺ KIR3DL1^{high} NK cells and KIR2D⁺ NK-cell frequencies, with a significant p -value (< 0.05) only for the KIR3DL1*001 allele ($r = 0.67$; Fig. 3C, upper panel) and the KIR3DL1/3DS1 allele combinations (KIR3DL1^{high/high}, $r = 0.787$, KIR3DL1^{high/null}, $r = 0.775$ and KIR3DL1/3DS1, $r = 0.56$; Fig. 3D, upper panel). These data suggest a consecutive expression of KIR2D (2DL1/2/3, 2DS1/2) on KIR3DL1^{high} NK cells.

Bimodal distribution of KIR3DL1^{high} NK cells in KIR3DL1^{high/null} individuals

In KIR3DL1^{high}/3DL1^{null} individuals for whom a bimodal distribution of KIR3DL1⁺ NK cells was observed as previously mentioned, we compared the frequency and the mean fluorescence intensity of KIR3DL1^{high} NK cells (Fig. 4A). Interestingly, among the three KIR3DL1^{high} alleles identified (*001, *002, and *015), a positive correlation was noted between the frequency of KIR3DL1^{high} NK cells and membrane expression level of the KIR3DL1*001 allele ($r = 0.7033$, $p = 0.009$). KIR3DL1*004 was the unique null allele associated with KIR3DL1*001, KIR3DL1*002, and KIR3DL1*015 in our cohort. Surprisingly, the KIR3DL1*001, *004 allele combination led to both a low-frequency and mean-expression level of the KIR3DL1 receptor in 5 out of 13 individuals (Fig. 4A). Representative density plots are shown in Fig. 4B, illustrating the high and low MFI of KIR3DL1⁺ NK cells, respectively, with high (47.3%) and low frequency (3.3%) in two representative KIR3DL1*001,*004 individuals. For comparison, a representative density plot with the expected MFI for low KIR3DL1^{high} NK-cell frequency observed for one representative KIR3DL1*002,*004 genotyped individual is also provided in Fig. 4B. The bimodal effect observed in KIR3DL1^{high,null} individuals was not influenced by the Bw4 ligand number (Supporting Information Fig. 1B). We explored KIR2DL1/S1, KIR2DS4, KIR2DL2, and KIR2DL3/2DS2 NK-cell subset frequencies as a function of KIR3DL1^{high} NK-cell frequency for these KIR3DL1^{high,null} individuals (Fig. 4C) in order to determine whether other KIR NK-cell subsets may balance the low KIR3DL1^{high} NK-cell frequency. Individuals with high KIR3DL1^{high} NK-cell frequencies presented a consistent KIR2DL1 NK-cell subset, however, the frequency of KIR2DL1 NK cells did not correlate with the frequency of KIR3DL1^{high} NK cells. Interestingly, KIR2DS4 was expressed only in individuals who displayed the KIR3DL1*015 and KIR3DL1*002 alleles (Fig. 4C). Moreover, the KIR2DS2 gene, which is in linkage disequilibrium with the KIR2DL2 gene, was present in 8 out of 23 KIR3DL1^{high,null} genotyped individuals and interestingly, KIR2DS2 was present only in KIR3DL1*001,*004 genotyped individuals who exhibited a high frequency of KIR3DL1^{high} NK cells (data not shown). The frequency of KIR2DL2⁺ NK cells did not correlate with the frequency of KIR3DL1^{high} NK cells; however, the KIR2DL3/S2 NK-cell frequency was higher in individuals who presented a high frequency of KIR3DL1^{high} NK cells (Fig. 4C).

Because neither DX9 nor Z27 monoclonal antibodies recognize KIR3DL1 in permeabilized/fixed cells, as previously reported by Thomas et al. [32], any potential increased/decreased internalization of KIR3DL1 receptor could not have been evaluated in KIR3DL1*001,*004 genotyped individuals. However, Z27⁺ NK cells were sorted from individuals of each group and KIR3DL1 transcripts were analyzed using primers specific for KIR3DL1*001, KIR3DL1*002, or KIR3DL1*004 (Fig. 4D). We detected not only KIR3DL1*001 or KIR3DL1*002 transcripts but also KIR3DL1*004 transcripts in all studied KIR3DL1^{high}

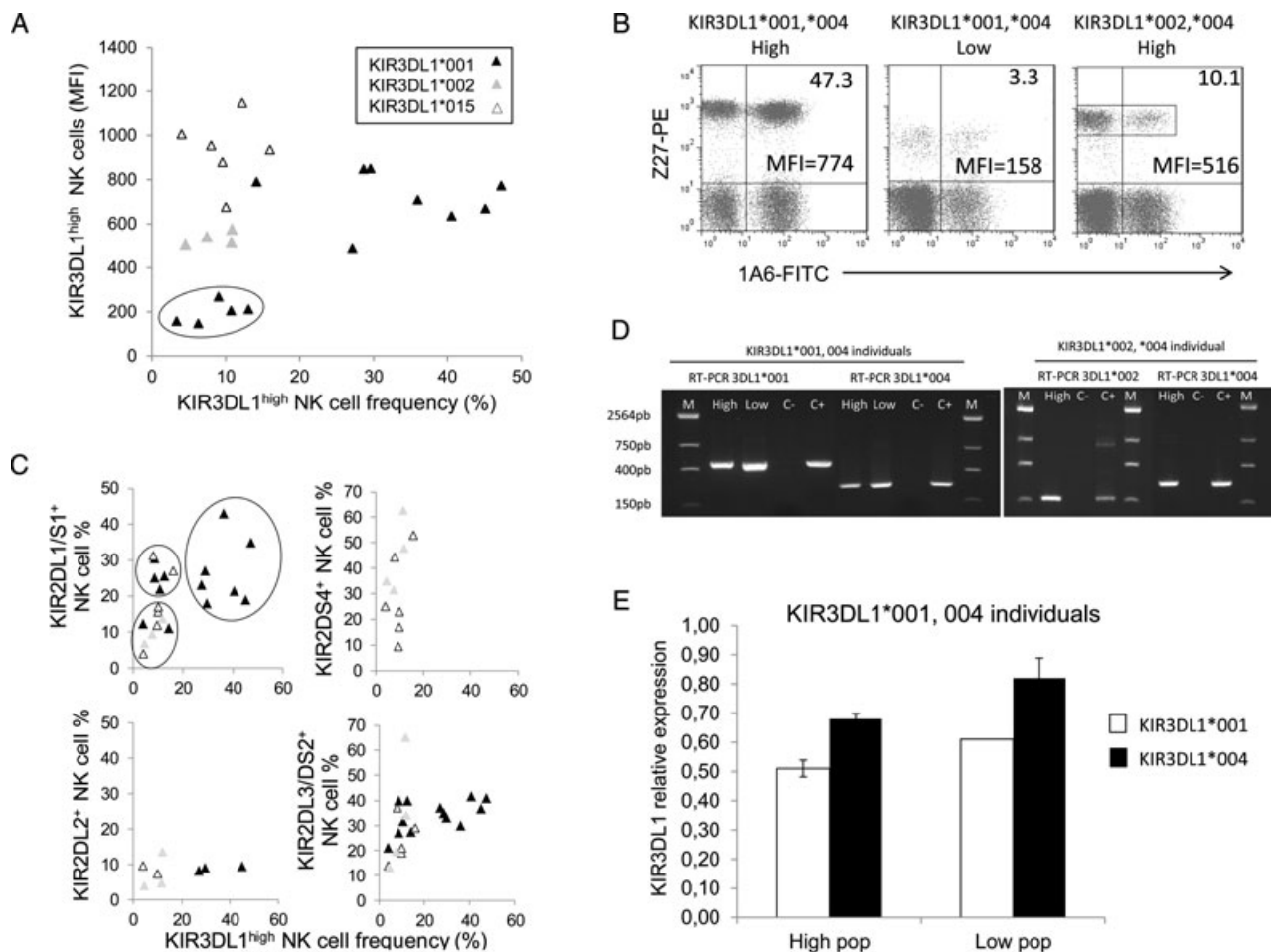


Figure 4. Detection of a similar amount of KIR3DL1^{high} and KIR3DL1^{null} transcripts in KIR3DL1⁺ NK cells regardless of the membrane expression level of KIR3DL1. (A) The KIR3DL1^{high} NK-cell frequency as a function of the KIR3DL1^{high} NK-cell MFI for KIR3DL1^{high/null} individuals ($n = 23$) is shown. The nature of the KIR3DL1^{high} allele is indicated by a color code. KIR3DL1*004 is the unique null allele associated with KIR3DL1^{high} alleles in our cohort. Dots corresponding to KIR3DL1*001, *004 genotyped NK cells with a low frequency and a low mean level intensity are circled. (B) Representative flow cytometry density plots showing KIR3DL1⁺ (Z27⁺) NK cells for two KIR3DL1*001,*004 and one KIR3DL1*002,*004 genotyped individuals. MFI and percentage of KIR3DL1^{high} NK cells is indicated in each density plot. (C) Dot representation of KIR3DL1^{high} KIR2D⁺ NK-cell frequencies as a function of KIR2DL1/S1⁺ NK-cell ($n = 22$), KIR2DS4⁺ NK-cell ($n = 10$), KIR2DL2⁺ NK-cell ($n = 8$), and KIR2DL3/2DS2⁺ NK-cell ($n = 22$) frequencies for KIR3DL1^{high/null} individuals. For all dots, the nature of each allele is determined by the color code used previously. (D) Visualization of specific RT-PCR products in a 2% agarose gel in 0.5X TBE buffer with SSP-SM marker (One Lambda) for two KIR3DL1*001, 004 genotyped individuals showing different mean level intensity of the KIR3DL1^{high} NK-cell population and contrasted frequencies, and for one 3DL1*002, *004 (KIR3DL1^{high}) genotyped individual with a low KIR3DL1^{high} NK-cell frequency. RNA was extracted from sorted Z27⁺ NK cells of interest and specific RT-PCR was then performed using KIR3DL1 allele-group-specific PCR-SSP primers adapted from Gardiner et al. [19] showing a specific RT-PCR product at 456 pb for KIR3DL1*001, 277 pb for KIR3DL1*004, and 163 pb for KIR3DL1*002. Negative (C-) and positive (C+) controls were used corresponding respectively to RNA extracted from individuals with different and identical KIR3DL1 allelic typing. (E) Relative quantification of KIR3DL1*001 and KIR3DL1*004 transcripts normalized to the GAPDH reference gene in sorted NK-cell subpopulations from KIR3DL1*001, *004 genotyped individuals with KIR3DL1^{high} ($n = 4$) or KIR3DL1^{low} ($n = 2$). NK-cell populations showing a similar amount of both KIR3DL1*001 and KIR3DL1*004 transcripts whatever the membrane expression level of KIR3DL1. Data are shown as means + SD of six samples pooled from at least three independent experiments.

populations. Because the amount of KIR3DL1*001 and KIR3DL1*004 transcripts might explain the different level of expression in high and low KIR3DL1 NK-cell populations, we evaluated the expression level of KIR3DL1 transcripts by real-time RT-PCR using GAPDH transcripts as an endogenous control. We observed a similar amount of both KIR3DL1*001 and KIR3DL1*004 transcripts in high and low KIR3DL1 populations from different individuals (Fig. 4E).

The nature of the KIR3DL1^{high} allele influences KIR3DL1^{high} NK-cell responsiveness

Among the three KIR3DL1^{high} alleles identified (*001, *002, and *015) in KIR3DL1^{high/null} individuals, consistent expansion of KIR3DL1^{high} NK cells was associated only with the KIR3DL1*001 allele, as mentioned earlier. Thus, we hypothesized that these three KIR3DL1^{high} receptors do not interact with the same affinity

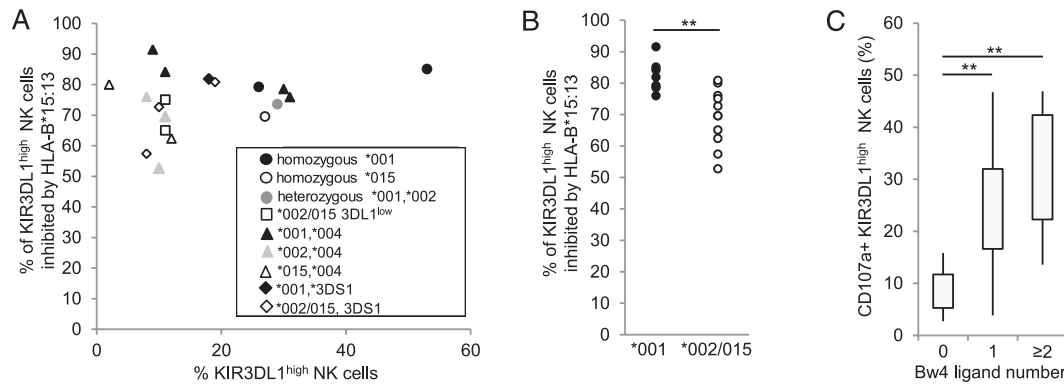


Figure 5. The nature of the KIR3DL1^{high} allele influences KIR3DL1^{high} NK-cell responsiveness. (A) A degranulation test on KIR3DL1^{high} NK cells was done only for Bw4⁺ individuals ($n = 19$) against 221 and 221-B*15:13 (Bw4 motif) cell lines. The percentage of KIR3DL1^{high} NK cells inhibited by HLA-B*15:13 (Bw4 motif) was calculated from the frequencies of KIR3DL1^{high} NK cells expressing CD107a observed following culture with 221 cells (considered as maximum) compared with those observed following culture with the 221-B*15:13 cell line. The percentage of KIR3DL1^{high} NK cells inhibited by 221-B*15:13 for low and high frequencies of KIR3DL1^{high} NK cells depending on KIR3DL1*001 (black), KIR3DL1*002 (filled light gray symbols), and KIR3DL1*015 (open symbols) alleles associated with different KIR3DL1/3DS1 alleles: KIR3DL1^{high} (circle), KIR3DL1^{low} (square), KIR3DL1^{null} (triangle), and KIR3DS1 (diamond) are shown. (B) The percentages of KIR3DL1^{high} NK cells inhibited by HLA-B*15:13 (Bw4 motif) were compared between KIR3DL1*001⁺ ($n = 7$) and KIR3DL1*002/015⁺ individuals ($n = 11$). Statistical significance (** $p < 0.001$) between both groups was determined using the one-way analysis of variance (ANOVA) test. (C) Box and whisker plot summarizing the frequency of CD107a⁺ KIR3DL1^{high} NK cells observed after 5 h of stimulation with standard HLA class I-deficient 221 cell targets as a function of Bw4 ligand number. CD107a⁺ KIR3DL1^{high} NK-cell percentage was compared between 0 and 1 Bw4 ligands and between 1 and ≥ 2 Bw4 ligands using the one-way ANOVA test. Top and bottom whiskers represent values of the top and bottom 25% of cases, respectively; boxed area, interquartile range, and the significant p values between groups is indicated (** $p < 0.001$, ANOVA test). PBMCs were incubated with 221 cells for 4 h with brefeldin A. To detect the frequency of KIR3DL1^{high} CD107a⁺ NK cells, NK cells were stained with anti-NKp46-allophycocyanin, Z27-PE, and CD107a-PerCP. NKG2A-FITC and 1A6-FITC were added to focus the analysis on KIR3DL1^{high} KIR2D⁻ NKG2A⁻ NK cells. The cells were analyzed by flow cytometry. Data shown are representative of 27 experiments performed.

with the Bw4 ligand and only the KIR3DL1*001 allele product constitutes a strong inhibitory receptor capable of engaging the KIR3DL1^{high} NK-cell subset toward cellular expansion. To test this hypothesis, we determined the degranulation potential (CD107a expression) of NK cells expressing one of these three KIR3DL1^{high} receptors and evaluated the capacity of these three KIR3DL1^{high} receptors to inhibit degranulation of NK cells incubated with 221-HLA-B*15:13 (Bw4 motif) target cells from 19 KIR3DL1^{high} individuals. We observed a higher frequency of KIR3DL1*001⁺ NK-cell inhibition than KIR3DL1*002⁺ or *01502⁺ NK-cell inhibition upon engagement with Bw4 ligand, regardless of the frequency of KIR3DL1^{high} NK cells or the KIR3DL1/3DS1 allele combinations (Fig. 5A). Accordingly, the percentages of KIR3DL1^{high} NK cells inhibited by HLA-B*15:13 (Bw4 motif) were higher in KIR3DL1*001⁺ than in KIR3DL1*002/015⁺ individuals (82.3%, $n = 7$ versus 69.2%, $n = 11$, $p = 0.003$, Fig. 5B). Moreover, we confirmed that the spontaneous degranulation of adult KIR3DL1^{high} NK cells against standard HLA class I-deficient 221 cells increases with the number of autologous Bw4 ligands (9.9% $n = 7$ versus 25.1%, $n = 14$, $p = 0.003$ between 0 and 1 Bw4 ligand and 25.1% $n = 14$ versus 34% $n = 6$, $p = 0.001$ between 1 and ≥ 2 Bw4 ligands) (Fig. 5C).

Different phenotypic profile of KIR3DL1^{high} NK cells in early life compared with that in adulthood

Because our results suggest either a selection and specific expansion of KIR3DL1^{high} NK-cell subsets or a deletion of

KIR3DL1*001,*004 NK subsets, we investigated the KIR3DL1^{high} NK-cell repertoire in cord blood to gain insights into KIR3DL1 NK-cell repertoire formation during development. To this end, we evaluated the frequency of this population and the expression level of the KIR3DL1^{high} receptor taking into account the nature of the second KIR3DL1 allele (high, low, and null). Interestingly, although the KIR3DL1^{high} NK-cell frequency was significantly lower in umbilical PBMCs (9.27%, $n = 18$) than adult PBMCs (19.33%, $n = 68$, $p = 0.001$) (Fig. 6A), whatever the KIR3DL1/3DS1 allele combination analyzed (Fig. 6B), the expression level was significantly higher in cord blood NK cells (umbilical MFI = 1088, $n = 15$ versus adult MFI = 686, $n = 61$, $p = 3.5 \times 10^{-7}$) (Fig. 6C), especially for KIR3DL1^{high/high} (umbilical MFI = 1258, $n = 4$ versus adult MFI = 735, $n = 11$, $p = 0.006$) and KIR3DL1^{high}/3DS1 allele combinations (umbilical MFI = 1268, $n = 6$ versus adult MFI = 689, $n = 19$, $p = 1.5 \times 10^{-5}$) reaching a MFI of 2000 (Fig. 6D). These results show that KIR3DL1^{high} is expressed at a high intensity on the NK-cell membrane in a small proportion of NK cells during early life, probably contributing to the selection or deletion of KIR3DL1 NK-cell subsets, depending on the signaling intensity received by the cells.

The Bw4 environment impacts on KIR3DL1 NK-cell frequency in cord blood samples

Considering that a functional signal via KIR3DL1 may contribute to shaping the KIR3DL1 NK-cell repertoire, we investigated the

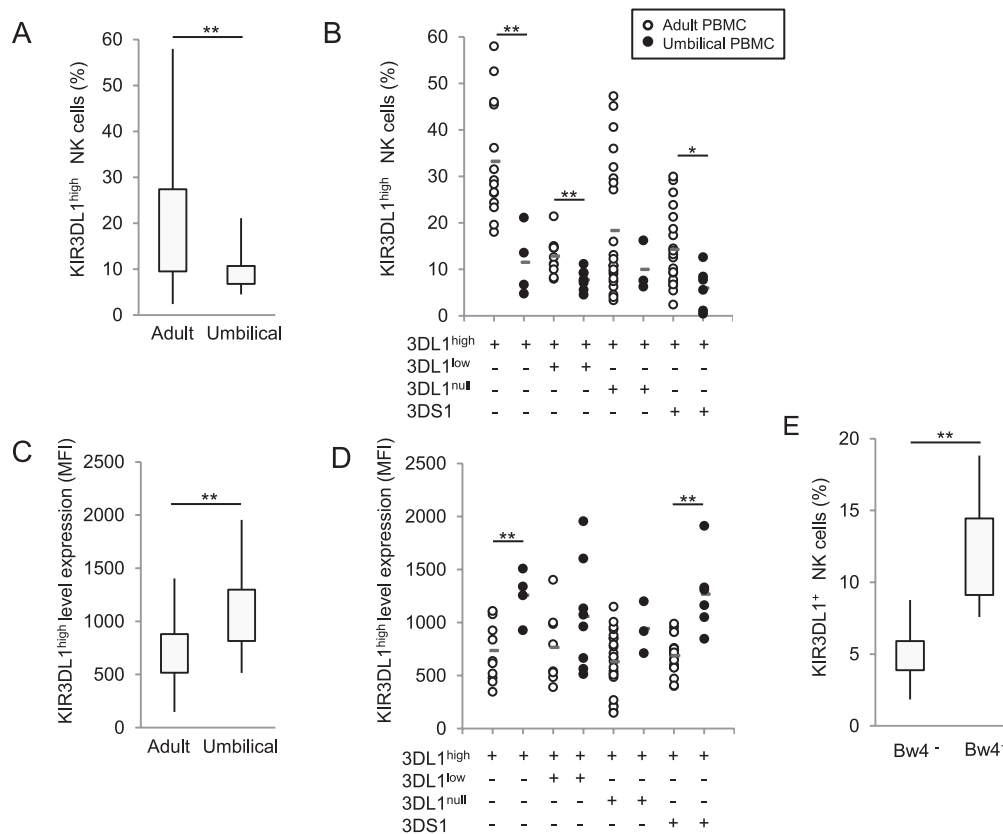


Figure 6. Phenotypic characterization of the KIR3DL1^{high} NK-cell repertoire in cord blood samples. (A) Box and whisker plot summarizing the frequency of KIR3DL1^{high} NK cells in adult ($n = 68$) and umbilical ($n = 18$) PBMCs. Top and bottom whiskers represent values of the top and bottom 25% of cases respectively; boxed area, interquartile range. (B) All KIR3DL1^{high} NK-cell frequencies as a function of the second KIR3DL1 allele or KIR3DS1: KIR3DL1^{high/high} (14 adult and 4 cord blood samples), KIR3DL1^{high/low} (11 adult and 8 cord blood samples), KIR3DL1^{high/null} (23 adult and 3 cord blood samples), or KIR3DL1^{high/3DS1} (20 adult and 6 cord blood samples) are shown. (C) Box and whisker plot summarizing the mean expression level of KIR3DL1 on NK cells in adult ($n = 61$) and umbilical ($n = 15$) PBMCs. (D) Dot representation of mean expression level of KIR3DL1 on NK cells as a function of the second KIR3DL1 allele or KIR3DS1: KIR3DL1^{high/high} (11 adult and 4 cord blood samples), KIR3DL1^{high/low} (8 adult and 8 cord blood samples), KIR3DL1^{high/null} (23 adult and 3 cord blood samples), or KIR3DL1^{high/3DS1} (19 adult and 6 cord blood samples). (E) Box and whisker plot summarizing the frequency of KIR3DL1⁺ NK cells in umbilical PBMCs as a function of Bw4⁻ ($n = 7$) or Bw4⁺ cord blood samples ($n = 10$) is shown. Statistical significance ($*p < 0.05$; $**p < 0.01$) between different groups was determined using the one-way ANOVA test. Data shown are representative of 17 experiments performed.

frequency of KIR3DL1 NK cells in early life with regards to the expression or not of autologous Bw4 ligands (Fig. 6E). Interestingly, the KIR3DL1⁺ NK-cell frequency was significantly higher in Bw4⁺ cord blood (12.33%, $n = 10$) than in the Bw4⁻ counterparts (4.97%, $n = 7$, $p = 0.0003$). These results suggest that an engagement toward one KIR3DL1 allele product expression during NK-cell development, possibly depending on functional interaction with Bw4 ligand, contributes to molding the KIR3DL1 NK-cell repertoire. Interestingly, although we confirmed that the spontaneous degranulation of adult KIR3DL1^{high} NK cells increases with the number of autologous Bw4 ligands (Fig. 5C), we did not observe a significant correlation between adult KIR3DL1^{high} NK-cell frequency and Bw4 ligand number (Supporting Information Fig. 1). This result can be partly explained by the plausible deletion of KIR3DL1 NK-cell subsets receiving excessive signals during their development, as observed for KIR3DL1^{high/null} NK-cell subsets in the adult repertoire.

Discussion

In this study, we investigated the impact of allelic KIR3DL1 polymorphism on the KIR3DL1 NK-cell repertoire. In this large cohort of healthy individuals we considered possible contributing factors, including KIR3DL1/S1 allele combinations, mean expression level, Bw4 environment, and functional potential. The French population is characterized by a large KIR3DL1 allelic polymorphism with different predominant KIR3DL1 alleles such as KIR3DL1*001, *002, *004, and *054. The frequency of KIR3DL1^{high} (*001, *002) and KIR3DL1^{null} (*004, *054) alleles ranges from 20 to 50% and this contrasts with the Japanese population which is characterized by (i) only one KIR3DL1^{high} allele (*01502) overexpressed at a very high frequency (45%) compared with the next most frequent allele and (ii) the absence of the KIR3DL1*004 null allele [31]. Surprisingly, the frequency of the null KIR3DL1*004 allele was particularly high in our cohort (29%) compared with

other European or African population studies where it usually ranged from 8 to 16% [17]. Because the Bw4 ligand could differ between populations [37], we have also investigated the frequency and nature of the Bw4 ligand in the French population compared with the Japanese population [31]. The frequency of HLA-B Bw4⁺ was higher in the French population compared with the Japanese population (59 versus 36%) and was higher than 70% if both HLA-A and HLA-B Bw4⁺ were taken into account. Although the frequency of HLA-B51 (I^{B0}) was similar in both populations (13%), HLA-B44 (T^{B0}) was overrepresented in the French population (30.2 versus 7%) whereas A24 (T^{B0}) was underrepresented (27.4 versus 41%). However, in both populations, the frequency of KIR3DL1^{high} NK cells was higher than that of the KIR3DL1^{low} NK-cell population and the frequency of KIR3DL1^{high} NK cells increased with gene dose. In the French population, the presence of Bw4 ligand (both HLA-A and HLA-B) or the presence of a specific HLA-Bw4 molecule such as A24, B51, B44 did not significantly increase the frequency of KIR3DL1^{high} NK cells, while in the Japanese population, the presence of HLA-Bw4⁺ molecules significantly increased the frequency of NK cells expressing KIR3DL1 for donors with two high-binding 3DL1 allotypes, and the increase in frequency of KIR3DL1^{high} NK cells was greater in Bw4 heterozygotes than in homozygotes. The fact that the Bw4 environment did not significantly affect the KIR3DL1 NK-cell frequency in our French cohort may be due to the sample size. Overall, our study confirms that French individuals are characterized by a broad KIR3DL1 allelic polymorphism in accordance with previous studies in other European populations [17] and that the KIR3DL1 NK-cell repertoire is mainly determined by KIR3DL1 polymorphism and KIR3DL1/3DS1 allele combinations. The extensive KIR3DL1 allelic polymorphism and diversity of KIR3DL1 ligands observed in the French population suggest a coevolution of KIR3DL1 and HLA-A, HLA-B Bw4 genes as reported in other populations [37].

The phenotypic study of KIR3DL1 allelic polymorphism in healthy individuals enabled us to show that all individuals hitherto described as negative for the KIR3DL1 gene actually possess an KIR3DL1*054 allele that is not detected with the current standard typing techniques, and a substantial proportion of individuals have at least one KIR3DL1 allele that is not, or only weakly, expressed on the NK-cell surface. The association of the KIR3DL1*054 allotype with KIR3DS1 in our cohort did not enable us to evaluate NK-cell surface expression of KIR3DL1*054 since both receptors seemed to be recognized similarly by the Z27 mAb [36]. Interestingly, in our cohort, the KIR3DL1*054 allele was mainly observed in individuals with the BB KIR genotype (*n* = 9). While the expression and function of the KIR3DL1*004 allele is well understood, [34] that of the KIR3DL1*019, KIR3DL1*054 alleles remain to be elucidated. The expected mature KIR3DL1*019 protein contains the same amino acids involved in the intracellular retention of the null KIR3DL1*004 allotype, i.e. L⁸⁶ and S¹⁸², and only one amino acid in the D0 domain differs between KIR3DL1*019 and KIR3DL1*004. Thus, we believe that the KIR3DL1*019 allele is also a null allele. However, different amino acid substitutions occur between KIR3DL1*054 and KIR3DL1*004 suggesting that KIR3DL1*054 is closer to KIR3DS1 than KIR3DL1. These amino

acid changes in the extracellular domains could potentially interfere with Z27/DX9 epitope recognition. These results should shed light on the functional contribution of the frequent KIR3DL1*054 and KIR3DL1*004 receptors to different pathologies. Indeed, a high frequency of KIR3DL1-negative individuals has been reported in an autoimmune disease [38], which probably corresponded to the KIR3DL1*054 allele. Moreover, in the presence of Bw4, KIR3DL1*004 showed the most significant protection relative to all other KIR3DL1 alleles in HIV infection [29] and its functional expression at the cell surface has been recently demonstrated [35].

Our data underline the impact of KIR3DL1 allele polymorphism on its NK-cell expression pattern and on the hierarchy between all KIR3DL1 alleles, highlighting the predominance of the KIR3DL1*001 allele regardless of the presence or absence of the second allele (KIR3DL1^{low}, KIR3DL1^{null}, or KIR3DS1). In the KIR3DL1^{high,null} individuals with only one copy of the KIR3DL1*001 allele, the frequency of KIR3DL1^{high} NK cells increases up to 50% of NK cells, indicating that factors other than copy number contribute to this dominant expression. The high number of KIR3DL1*001,*004 individuals in our cohort led us to detect a bimodal distribution of KIR3DL1^{high} NK cells: A first group with a high frequency of KIR3DL1^{high} NK cells and high level of expression, and a second group with a low frequency of KIR3DL1^{high} NK cells and a low level expression. Of note, we detected the same amount of KIR3DL1*001 and KIR3DL1*004 transcripts in the low and high frequency of KIR3DL1^{high} NK cells, demonstrating that the KIR3DL1 transcript level is not linked to its protein expression at the NK-cell surface. This finding is in accordance with data demonstrating the frequent detection of KIR transcripts in T-cell clones and NK92 in the absence of the corresponding protein at the cell surface [39]. Thus, the predominance of the KIR3DL1*001 allele in our study could not be explained by its promoter properties [40]. Nonetheless, we cannot exclude the possibility of a differential internalization of KIR3DL1 receptor in both populations. Among other factors able to influence the frequency of KIR3DL1^{high} NK cells, we looked at the expression of other KIR in different groups of KIR3DL1^{high,null} individuals. Interestingly, all KIR3DL1^{high,null} individuals with KIR3DL1*002 and KIR3DL1*015 alleles showing a low frequency and high mean level expression of the KIR3DL1 receptor expressed KIR2DS4. However, all KIR3DL1*001,*004 individuals bore only nonexpressed KIR2DS4*003 as activating KIR genes (AA genotypes) and other activating KIR genes, such as KIR2DS2, were observed in four out of eight others KIR3DL1*001,*004 genotyped individuals with a high frequency and mean level expression of KIR3DL1. Thus, since the acquisition of KIR on NK cells is sequential [41], it is possible that the nature of the other KIR expressed before KIR3DL1 and probably the transduction signals received by the cells, influence the posttranscriptional regulation of the KIR3DL1*001 and KIR3DL1*004 alleles. However, the bimodal distribution cannot be entirely explained by a differential expression of activating KIR.

Another explanation of the bimodal distribution could be due to a functional selection of KIR3DL1 NK cells. Indeed, we also underlined a hierarchy between KIR3DL1^{high} alleles in their capacity to inhibit NK-cell degranulation via Bw4 engagement, and possibly

to promote *in vivo* maintenance or expansion of peripheral NK cells carrying the corresponding allele. As such, the frequency of KIR3DL1*001⁺ NK-cell inhibition is higher than the frequency of KIR3DL1*002 or *015 NK-cell inhibition upon engagement with HLA-B*15:13 (Bw4 motif) expressed on transfected 221 target cells regardless of the frequency of KIR3DL1^{high} NK cells. This last point is in agreement with a previous report indicating that highly expressed KIR3DL1*002 is a better inhibitor than poorly expressed KIR3DL1*007 [27]. Based on recent data published by Taner et al. [35] and on the higher level expression of KIR3DL1 observed in cord blood, we speculate that KIR3DL1*004 can be functional, and may constitute a better signaling receptor than the KIR3DL1*002, *015, and *008 allele products, favoring its phenotypic selection during early life. Thus, for all 10 studied KIR3DL1*002/*01502, *004 genotyped individuals, we suggest that a phenotypic selection in favor of the KIR3DL1*004 receptor, which was not detected by KIR3DL1 specific Z27 and DX9 antibodies may explain the frequency of KIR3DL1^{high} observed around 10% of NK cells. For 5 KIR3DL1*001,*004 genotyped individuals, the frequency of KIR3DL1^{high} was low (around 10%) as was the mean fluorescent intensity, suggesting low expression of the KIR3DL1*001 receptor on NK cells. This low frequency seems to be due to a negative selection of this subset as previously described for T-lymphocyte selection. Selection and amplification of KIR3DL1^{high} NK cells seem to be dependent on the nature of the KIR3DL1 allele and the KIR3DL1 allele combination, which is expressed with a hierarchy favoring KIR3DL1*001, followed by KIR3DL1*004, and then the other KIR3DL1^{high} alleles (*002, *015, and *008). The engagement of two receptors such as KIR3DL1*001 and *004, thereby inducing increased signals, might lead to a negative selection of NK cells.

In this study, we did not observe any increased frequency of KIR (KIR2DL1/S1, KIR2DL2/3/S2, or KIR2DS4) NK-cell subsets balancing a low frequency of KIR3DL1^{high} NK-cell subsets in different individuals grouped by KIR3DL1 alleles or KIR3DL1/3DS1 allele combinations (data not shown). However, we observed a constant proportion of KIR3DL1^{high} NK cells expressing KIR2DL1/2/3, 2DS1/2 receptors, which suggests a subsequent acquisition of KIR2D by KIR3DL1^{high} NK cells. Previous *in vitro* investigations of NK-cell differentiation have been performed suggesting a sequential acquisition of KIR with the expression of KIR2DL3 before KIR2DL1 [42]. Although KIR3DL1 acquisition was observed regardless of HLA background [43], its acquisition in this sequential model has not been investigated. Even though it is now clear that KIR ligands contribute to the functional education of NK cells [4], HLA class I molecules, as KIR ligands, should partially affect the formation of the KIR NK-cell repertoire at the neonatal stage [31, 44], as observed in our study. As previously described [9], in our study we did not observe an impact of the Bw4 environment on the adult KIR3DL1 NK-cell repertoire. Other factors, and particularly individual immunological experience, seem to contribute to shaping the KIR NK-cell repertoire throughout life. The finding of amplified KIR⁺ NKG2C⁺ NK cells in CMV [45–47], HSV-2 [48], and HIV infections [49, 50] reinforces this hypothesis. In the case of KIR3DL1, it is conceivable that viral infec-

tions, particularly those involving viruses that negatively modulate HLA class I molecule expression such as CMV and HIV, trigger KIR3DL1 NK-cell subsets via KIR3DL1 or an undetermined coexpressed receptor. Further investigations in KIR3DL1^{high/null} individuals taking into account viral status and a broader phenotype of KIR3DL1^{high} NK cells, notably including NKG2C, should help to determine the impact of viral infection on the KIR3DL1 NK-cell repertoire. Finally, this study provides new insight into the mechanisms potentially involved in shaping the KIR3DL1 NK-cell repertoire.

Materials and methods

Cells (PBMCs, cord blood samples, and cell lines)

PBMCs were isolated from citrate-phosphate-dextrose blood, collected from healthy adult volunteers by gradient centrifugation on Ficoll-Hypaque (Lymphoprep, Axis-Shield, PoC AS, Oslo, Norway). All blood donors ($n = 109$) were recruited at the Blood Transfusion Center (Etablissement Français du Sang, Nantes, France) and informed consent was obtained from all individuals. Umbilical cord blood samples ($n = 23$) were obtained at the Nantes CHU maternity unit. Informed consent was obtained from all mothers. HLA class-I-deficient 721.221 lymphoblastoid EBV-B cells (referred to as 221 cells) and Bw4 (B*15:13) transfected 221 cells (referred to as 221-Bw4⁺) were used as controls to assess natural NK-cell cytotoxicity in functional assays. Cells were cultured in RPMI 1640 medium (Gibco, Paisley, Scotland, UK) containing glutamine (Gibco) and penicillin-streptomycin (Gibco) and supplemented with 10% fetal bovine serum (Gibco). Mycoplasma tests performed by PCR were negative for all cell lines.

HLA and KIR genotyping

Genomic DNA was extracted from PBMC and from cord blood samples using either a classical salting-out method [51] or by GenoM-6 (Qiagen, Courtaboeuf, France) using magnetic beads. Intermediate or high-resolution typing for HLA-A, HLA-B, and HLA-C was performed on all healthy donors ($n = 109$) and cord blood samples ($n = 23$) using a Sequence Based Typing kit (Abbott Molecular Park, IL, USA). All individuals were typed for the presence or absence of KIR2DL1, 2DL2, 2DL3, 2DL4, 2DL5, 3DL1, 3DL2, 3DL3, 2DS1, 2DS2, 2DS3, 2DS4, 2DS5, and 3DS1 using the KIR genotyping SSP kit from Invitrogen (Compiègne, France), lot#003, under the conditions recommended by the manufacturer. Cord blood samples were typed using a multiplex PCR-SSP method as previously described [52]. In order to detect all KIR3DL1 alleles, especially the KIR3DL1*054 allele not amplified by the PCR-SSP Invitrogen kit lot#003, individuals negative for KIR3DL1 at the genotypic level were further typed using homemade KIR3DL1 generic primers specific for exon 3 [53], which amplified all KIR3DL1

alleles except KIR3DL1*027, *028, *030, *039, *042, *053, *057, *073 (all of which were amplified by the Invitrogen KIR PCR-SSP kit). For KIR3DL1 allelic typing, KIR3DL1 allele-group-specific PCR-SSP and sequencing of polymorphic exons were combined in order to resolve most of the remaining KIR3DL1 allele ambiguities arising as a result of the large KIR3DL1 allelic polymorphism described to date. For the subtyping of KIR3DL1 PCR-SSP coding sequences, primers designed to discriminate allele-group-specific polymorphisms were paired with KIR3DL1 locus-specific primers adapted from Gardiner et al. [19]. Depending on the allele-group-specific amplification products obtained, KIR3DL1 exons 1, 2, 3, 4, 5, or 7–9 were further sequenced to resolve remaining ambiguities as previously described [17, 24]. Sequence data files were analyzed using Assign-SBT software (Conexio Genomics, Applecross, Australia) with IPD-KIR Database version 2.3.0 (August 2010).

Identification and quantification of KIR3DL1 transcripts in the KIR3DL1⁺ NK-cell population

For individuals genotyped as KIR3DL1*001,*004, KIR3DL1*002,*004, and KIR3DL1*002,*005, Z27⁺ NK cells were positively selected using KIR3DL1-specific antibody Z27 (Beckman Coulter, Immunotech) and murine IgG-coupled magnetic Dynabeads according to the manufacturer's instructions (Dyna, Oslo, Norway). Beads and KIR3DL1-specific antibody were removed using goat anti-mouse IgG antiserum (EFS) as described previously [54]. Selected cells were stimulated using an in vitro model of NK-cell expansion [5]. After 2 weeks of amplification, Z27⁺ NK-cell populations were sorted and total RNA was purified using NucleoSpin RNAXS (Macherey-Nagel). Qualitative RT-PCR was performed using a One-Step PrimeScriptTM RT-PCR kit (TaKaRa, Japan) with KIR3DL1 allele-group-specific PCR-SSP primers adapted from Gardiner et al. [19]. For relative quantification, KIR3DL1*001 and KIR3DL1*004 transcript levels were normalized to the GAPDH reference gene using the same primers and the One-Step SYBR[®] PrimeScriptTM RT-PCR kit (TaKaRa, Japan). For each sample, qRT-PCR was performed in triplicate on a RotorGene RG6000[®] RT-PCR system (Corbett Research). Amplification programs were as follows: reverse transcription at 42°C for 5 min, initial denaturation at 95°C for 5 min, 5 cycles at 97°C for 20 s, 55°C (GAPDH, KIR3DL1*004) or 62°C (KIR3DL1*001) for 30 s, 72°C for 1 min, and 30 cycles at 95°C for 15 s, 57°C (GAPDH, KIR3DL1*004) or 64°C (KIR3DL1*001) for 30 s, 72°C for 1 min. A melting curve analysis was performed after each run, with one degree increments from 72 to 95°C. The relative levels of KIR3DL1 allele transcripts were compared using unpaired *t*-tests in different sorted NK-cell subsets.

Phenotypic analysis by flow cytometry

NK-cell surface phenotype was determined by four-color flow cytometry using the following mouse antihuman mAbs: anti-KIR3DL1/S1-PE (Z27), anti-KIR3DL1-FITC (DX9) (Beckman Coul-

ter, Immunotech), anti-KIR2DL1/2/3/2DS1/2 (1A6) [55], anti-KIR2DL3/2DS2-FITC (1F12) [55], anti-KIR2DS4-PE (FES175), anti-KIR2DL1/S1-PE (EB6), anti-KIR2DL2/3/2DS2-PE (GL183) (Beckman Coulter, Immunotech), anti-CD3-PerCP (SK7), and anti-CD56-allophycocyanin (B159) (BD Biosciences). Cells were also stained with the corresponding isotype-matched control mAb. Data were collected using a FACSCalibur (BD Biosciences) and analyzed using Flowjo 6.2 software (TreeStar).

CD107a mobilization detected by flow cytometry

KIR3DL1^{high} NK cells were tested for their cytolytic potential with the CD107a mobilization assay after stimulation with 221 or 221-Bw4⁺ (HLA-B*15:13) transfected cell lines. Preincubated NK cells with CD107-PECy5 (H4A3, BD Biosciences) were incubated with the target cells for 5 h at an effector:target ratio of 1:1, with brefeldin A (Sigma) at 10 µg/mL for the last 4 h. The cells were surface stained with Z27-PE, NKG2A-FITC and NKp46-allophycocyanin (9E2, BD Biosciences). Data were collected using a FACSCalibur (BD Biosciences) and analyzed using Flowjo 6.2 software (TreeStar).

Statistical analyses

Comparisons of KIR3DL1⁺ NK-cell frequencies in two different series of individuals were performed using the Student's *t*-test. Association between CD107a⁺ KIR3DL1^{high} NK-cell frequencies and autologous Bw4 ligand number in two different series of individuals was tested using the one-way ANOVA test. *p*-values <0.05 were considered as statistically significant. Spearman's rank correlation coefficients were calculated and indicated only when a significant *p*-value was obtained (*p* < 0.05).

Acknowledgments: We thank Dr. Marc Bonneville (UMRS892, Nantes, France) for advice, Dr. Damian Goodridge (Conexio Genomics, Western Australia) for his help in building and optimizing the KIR3DL1 libraries for use in Assign software and Britt House (Nantes, France) for editing the manuscript. This work was financially supported by the EFS Pays de la Loire and by grants from the "Nantes University", "Association Recherche et Transfusion", "IRGHET", "Agence de la BioMédecine", "Etablissement Français du Sang 2011–06", and NAGMO. ZD is a PhD student supported by a CIFRE grant (N°447/2011) and PR is a PhD student supported by an EFS P.L./Region Pays de la Loire grant.

Conflict of interest: The authors declare no financial or commercial conflict of interest.

References

- 1 Vivier, E., Raulet, D. H., Moretta, A., Caligiuri, M. A., Zitvogel, L., Lanier, L. L., Yokoyama, W. M. et al., Innate or adaptive immunity? The example of natural killer cells. *Science*. 2011. 331: 44–49.
- 2 Parham, P., MHC class I molecules and KIRs in human history, health and survival. *Nat. Rev. Immunol.* 2005. 5: 201–214.
- 3 Stern, M., Ruggeri, L., Capanni, M., Mancusi, A. and Velardi, A., Human leukocyte antigens A23, A24, and A32 but not A25 are ligands for KIR3DL1. *Blood*. 2008. 112: 708–710.
- 4 Anfossi, N., André, P., Guia, S., Falk, C. S., Roeytynck, S., Stewart, C. A., Breso, V. et al., Human NK cell education by inhibitory receptors for MHC class I. *Immunity*. 2006. 25: 331–342.
- 5 Morvan, M., David, G., Seville, V., Perrin, A., Gagne, K., Willem, C., Kerdudou, N. et al., Autologous and allogeneic HLA KIR ligand environments and activating KIR control KIR NK-cell functions. *Eur. J. Immunol.* 2008. 38: 3474–3486.
- 6 Trundley, A., Frebel, H., Jones, D., Chang, C. and Trowsdale, J., Allelic expression patterns of KIR3DS1 and 3DL1 using the Z27 and DX9 antibodies. *Eur. J. Immunol.* 2007. 37: 780–787.
- 7 O'Connor, G. M., Guinan, K. J., Cunningham, R. T., Middleton, D., Parham, P. and Gardiner, C. M., Functional polymorphism of the KIR3DL1/S1 receptor on human NK cells. *J. Immunol.* 2007. 178: 235–241.
- 8 Gillespie, G. M., Bashirova, A., Dong, T., McVicar, D. W., Rowland-Jones, S. L. and Carrington, M., Lack of KIR3DS1 binding to MHC class I Bw4 tetramers in complex with CD8+ T cell epitopes. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* 2007. 23: 451–455.
- 9 Morvan, M., Willem, C., Gagne, K., Kerdudou, N., David, G., Seville, V., Folle, G. et al., Phenotypic and functional analyses of KIR3DL1+ and KIR3DS1 +NK cell subsets demonstrate differential regulation by Bw4 molecules and induced KIR3DS1 expression on stimulated NK cells. *J. Immunol.* 2009. 182: 6727–6735.
- 10 Single, R. M., Martin, M. P., Meyer, D., Gao, X. and Carrington, M., Methods for assessing gene content diversity of KIR with examples from a global set of populations. *Immunogenetics* 2008. 60: 711–725.
- 11 Middleton D, Williams, F. and Halfpenny, I. A., KIR genes. *Transpl. Immunol.* 2005. 14 135–142.
- 12 Denis, L., Sivula, J., Gourraud, P. A., Kerdudou, N., Chout, R., Ricard, C., Moisan, J. P. et al., Genetic diversity of KIR natural killer cell markers in populations from France, Guadeloupe, Finland, Senegal and Reunion. *Tissue Antigens* 2005. 66: 267–276.
- 13 Uhrberg, M., Valiante, N. M., Shum, B. P., Shilling, H. G., Lienert-Weidenbach, K., Corliss, B., Tyan, D. et al., Human diversity in killer cell inhibitory receptor genes. *Immunity* 1997. 7: 753–763.
- 14 Uhrberg, M., The KIR gene family: life in the fast lane of evolution. *Eur. J. Immunol.* 2005. 35: 10–15.
- 15 Robinson, J., Mistry, K., McWilliam, H., Lopez, R. and Marsh, S. G., IPD—the Immuno Polymorphism Database. *Nucleic Acids Res.* 2010. 38(Database issue): D863–869.
- 16 Parham, P., Norman, P. J., Abi-Rached, L. and Guethlein, L. A., Variable NK cell receptors exemplified by human KIR3DL1/S1. *J. Immunol.* 2011. 187: 11–19.
- 17 Norman, P. J., Abi-Rached, L., Gendzekhadze, K., Korbel, D., Gleimer, M., Rowley, D., Bruno, D. et al., Unusual selection on the KIR3DL1/S1 natural killer cell receptor in Africans. *Nat. Genet.* 2007. 39: 1092–1099.
- 18 Gumperz, J. E., Valiante, N. M., Parham, P., Lanier, L. L. and Tyan, D., Heterogeneous phenotypes of expression of the NKB1 natural killer cell class I receptor among individuals of different human histocompatibility leukocyte antigens types appear genetically regulated, but not linked to major histocompatibility complex haplotype. *J. Exp. Med.* 1996. 183: 1817–1827.
- 19 Gardiner, C. M., Guethlein, L. A., Shilling, H. G., Pando, M., Carr, W. H., Rajalingam, R., Vilches, C. et al., Different NK cell surface phenotypes defined by the DX9 antibody are due to KIR3DL1 gene polymorphism. *J. Immunol.* 2001. 166: 2992–3001.
- 20 Gardiner, C. M., Killer cell immunoglobulin-like receptors on NK cells: the how, where and why. *Int. J. Immunogenet.* 2008. 35: 1–8.
- 21 Kim, S., Sunwoo, J. B., Yang, L., Choi, T., Song, Y. J., French, A. R., Vlahiotis, A. et al., HLA alleles determine differences in human natural killer cell responsiveness and potency. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2008. 105: 3053–3058.
- 22 Stewart, C. A., Van Bergen, J. and Trowsdale, J., Different and divergent regulation of the KIR2DL4 and KIR3DL1 promoters. *J. Immunol.* 2003. 170: 6073–6081.
- 23 Chan, H. W., Kurago, Z. B., Stewart, C. A., Wilson, M. J., Martin, M. P., Mace, B. E., Carrington, M. et al., DNA methylation maintains allele-specific KIR gene expression in human natural killer cells. *J. Exp. Med.* 2003. 197: 245–255.
- 24 Thananchai, H., Gillespie, G., Martin, M. P., Bashirova, A., Yawata, N., Yawata, M., Easterbrook, P. et al., Cutting Edge: Allele-specific and peptide-dependent interactions between KIR3DL1 and HLA-A and HLA-B. *J. Immunol.* 2007. 178: 33–37.
- 25 Boulet, S., Song, R., Kamya, P., Bruneau, J., Shoukry, N. H., Tsoukas, C. M. and Bernard, N. F., HIV protective KIR3DL1 and HLA-B genotypes influence NK cell function following stimulation with HLA-devoid cells. *J. Immunol.* 2010. 184: 2057–2064.
- 26 Stewart-Jones, G. B., di Gleria, K., Kollnberger, S., McMichael, A. J., Jones, E. Y. and Bowness, P., Crystal structures and KIR3DL1 recognition of three immunodominant viral peptides complexed to HLA-B*2705. *Eur. J. Immunol.* 2005. 35: 341–351.
- 27 Carr, W. H., Pando, M. J. and Parham, P., KIR3DL1 polymorphisms that affect NK cell inhibition by HLA-Bw4 ligand. *J. Immunol.* 2005. 175: 5222–5229.
- 28 Foley, B. A., De Santis, D., Van Beelen, E., Lathbury, L. J., Christiansen, F. T. and Witt, C. S., The reactivity of Bw4+ HLA-B and HLA-A alleles with KIR3DL1: implications for patient and donor suitability for haploidentical stem cell transplantations. *Blood*. 2008. 112: 435–443.
- 29 Martin, M. P., Qi, Y., Gao, X., Yamada, E., Martin, J. N., Pereyra, F., Colombo, S. et al., Innate partnership of HLA-B and KIR3DL1 subtypes against HIV-1. *Nat. Genet.* 2007. 39: 733–740.
- 30 Gagne, K., Busson, M., Bignon, J. D., Balère-Appert, M. L., Loiseau, P., Dormoy, A., Dubois, V. et al., Donor KIR3DL1/3DS1 gene and recipient Bw4 KIR ligand as prognostic markers for outcome in unrelated hematopoietic stem cell transplantation. *Biol. Blood Marrow Transplant.* 2009. 15: 1366–1375.
- 31 Yawata, M., Yawata, N., Draghi, M., Little, A. M., Partheniou, F. and Parham, P., Roles for HLA and KIR polymorphisms in natural killer cell repertoire selection and modulation of effector function. *J. Exp. Med.* 2006. 203: 633–645.
- 32 Thomas, R., Yamada, E., Alter, G., Martin, M. P., Bashirova, A. A., Norman, P. J., Altfeld, M. et al., Novel KIR3DL1 alleles and their expression levels on NK cells: convergent evolution of KIR3DL1 phenotype variation? *J. Immunol.* 2008. 180: 6743–6750.
- 33 Halfpenny, I. A., Middleton, D., Barnett, Y. A. and Williams, F., Investigation of killer cell immunoglobulin-like receptor gene diversity: IV. KIR3DL1/S1. *Hum. Immunol.* 2004. 65: 602–612.

- 34 Pando, M. J., Gardiner, C. M., Gleimer, M., McQueen, K. L. and Parham, P., The protein made from a common allele of KIR3DL1 (3DL1*004) is poorly expressed at cell surfaces due to substitution at positions 86 in Ig domain 0 and 182 in Ig domain 1. *J. Immunol.* 2003. **171**: 6640–6649.
- 35 Taner, S. B., Pando, M. J., Roberts, A., Schellekens, J., Marsh, S. G., Malmberg, K. J., Parham, P. et al., Interactions of NK cell receptor KIR3DL1*004 with chaperones and conformation-specific antibody reveal a functional folded state as well as predominant intracellular retention. *J. Immunol.* 2011. **186**: 62–72.
- 36 O'Connor, G. M., Yamada, E., Rampersaud, A., Thomas, R., Carrington, M. and McVicar, D. W., Analysis of binding of KIR3DS1*014 to HLA suggests distinct evolutionary history of KIR3DS1. *J. Immunol.* 2011. **187**: 2162–2171.
- 37 Single, R. M., Martin, M. P., Gao, X., Meyer, D., Yeager, M., Kidd, J. R., Kidd, K. K. et al., Global diversity and evidence for coevolution of KIR and HLA. *Nat. Genet.* 2007. **39**: 1114–1119.
- 38 Diaz-Pena, R., Vidal-Castineira, J. R., Alonso-Arias, R., Suarez-Alvarez, B., Vicario, J. L., Solana, R., Collantes, E. C. et al., Association of the KIR3DS1*013 and KIR3DL1*004 alleles with susceptibility to ankylosing spondylitis. *Arthritis Rheum.* 2010. **62**: 1000–1006.
- 39 Vely, F., Peyrat, M., Couedel, C., Morcet, J., Halary, F., Davodeau, F., Romagne, F. et al., Regulation of inhibitory and activating killer-cell Ig-like receptor expression occurs in T cells after termination of TCR rearrangements. *J. Immunol.* 2001. **166**: 2487–2494.
- 40 Li, H., Pascal, V., Martin, M. P., Carrington, M. and Anderson, S. K., Genetic control of variegated KIR gene expression: polymorphisms of the bi-directional KIR3DL1 promoter are associated with distinct frequencies of gene expression. *PLoS Genet.* 2008. **4**: e1000254.
- 41 Schonberg, K., Sribar, M., Enczmann, J., Fischer, J. C. and Uhrberg, M., Analyses of HLA-C-specific KIR repertoires in donors with group A and B haplotypes suggest a ligand-instructed model of NK cell receptor acquisition. *Blood* 2011. **117**: 98–107.
- 42 Fischer, J. C., Ottinger, H., Ferencik, S., Sribar, M., Punzel, M., Beelen, D. W., Schwan, M. A. et al., Relevance of C1 and C2 epitopes for hemopoietic stem cell transplantation: role for sequential acquisition of HLA-C-specific inhibitory killer Ig-like receptor. *J. Immunol.* 2007. **178**: 3918–3923.
- 43 Miller, J. S. and McCullar, V., Human natural killer cells with polyclonal lectin and immunoglobulinlike receptors develop from single hematopoietic stem cells with preferential expression of NKG2A and KIR2DL2/L3/S2. *Blood* 2001. **98**: 705–713.
- 44 Schönberg, K., Fischer, J. C., Kögler, G. and Uhrberg, M., Neonatal NK-cell repertoires are functionally, but not structurally, biased toward recognition of self HLA class I. *Blood* 2011. **117**: 5152–5156.
- 45 Béziat, V., Dalgard, O., Asselah, T., Halfon, P., Bedossa, P., Boudifa, A., Hervier, B. et al., CMV drives clonal expansion of NKG2C+ NK cells: expressing self-specific KIRs in chronic hepatitis patients. *Eur. J. Immunol.* 2012. **42**: 447–457.
- 46 Charoudeh, H. N., Terszowski, G., Czaja, K., Gonzalez, A., Schmitter, K. and Stern, M., Modulation of the natural killer cell KIR repertoire by cytomegalovirus infection. *Eur. J. Immunol.* 2012. **43**: 1–8.
- 47 Foley, B., Cooley, S., Verneris, M. R., Pitt, M., Curtsinger, J., Luo, X., Lopez-Vergès, S. et al., Cytomegalovirus reactivation after allogeneic transplantation promotes a lasting increase in educated NKG2C+ natural killer cells with potent function. *Blood* 2012. **119**: 2665–2674.
- 48 Björkström, N. K., Svensson, A., Malmberg, K. J., Eriksson, K. and Ljunggren, H. G., Characterization of natural killer cell phenotype and function during recurrent human HSV-2 infection. *PLoS One* 2011. **6**: 1–5.
- 49 Ballan, W. M., Vu, B. A., Long, B. R., Loo, C. P., Michaëlsson, J., Barbour, J. D., Lanier, L. L. et al., Natural killer cells in perinatally HIV-1-infected children exhibit less degranulation compared to HIV-1-exposed uninfected children and their expression of KIR2DL3, NKG2C, and Nkp46 correlates with disease severity. *J. Immunol.* 2007. **179**: 3362–3370.
- 50 Ravet, S., Scott-Algara, D., Bonnet, E., Tran, H. K., Tran, T., Nguyen, N., Truong, L. X. et al., Distinctive NK-cell receptor repertoires sustain high-level constitutive NK-cell activation in HIV-exposed uninfected individuals. *Blood* 2007. **109**: 4296–4305.
- 51 Miller SA, D. D. and Polesky, H. F., A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res.* 1988. **16**: 1215.
- 52 Sun, J., Gaidulis, L., Miller, M., Goto, R., Rodriguez, R., Forman, S. and Senitzer, D., Development of a multiplex PCR-SSP method for killer-cell immunoglobulin-like receptor genotyping. *Tissue Antigens* 2004. **64**: 462–468.
- 53 Gagne, K., Brizard, G., Gueglio, B., Milpied, N., Herry, P., Bonneville, F., Cheneau, M. L. et al., Relevance of KIR gene polymorphisms in bone marrow transplantation outcome. *Hum. Immunol.* 2002. **63**: 271–280.
- 54 Rasmussen, A. M., Smeland, E. B., Erikstein, B. K., Caignault, L. and Funderud, S., A new method for detachment of Dynabeads from positively selected B lymphocytes. *J. Immunol. Methods* 1992. **146**: 195–202.
- 55 David, G., Morvan, M., Gagne, K., Kerdudou, N., Willem, C., Devys, A., Bonneville, M. et al., Discrimination between the main activating and inhibitory killer cell immunoglobulin-like receptor positive natural killer cell subsets using newly characterized monoclonal antibodies. *Immunology* 2009. **128**: 172–184.

Abbreviations: KIR: Killer Immunoglobulin-like Receptor

Full correspondence: Dr. Christelle Retiere, Etablissement Français du Sang Pays de la Loire, EA4271 “Immunovirologie et Polymorphisme Génétique”, 34 boulevard Jean Monnet, 44011 Nantes cedex 01, France
Fax: +33-2-40-12-33-33
e-mail: christelle.retiere@efs.sante.fr

Additional correspondence: Dr. Katia Gagne, Etablissement Français du Sang Pays de la Loire, EA4271 “Immunovirologie et Polymorphisme Génétique”, 34 boulevard Jean Monnet, 44011 Nantes cedex 01, France.
e-mail: katia.gagne@efs.sante.fr

Received: 20/9/2012
Revised: 11/12/2012
Accepted: 25/1/2013

Contribution des cellules NK KIR⁺ au contrôle de l'infection à cytomégalo virus : implication en greffes allogéniques

L'alloréactivité des cellules NK joue un rôle clé dans l'immunité antivirale et antitumorale après une allogreffe de CSH. La réactivation du CMV après la greffe induit une expansion clonale des cellules NK NKG2C⁺ KIR⁺. Ce phénomène est également observé chez les individus sains, CMV⁺. Cependant, la contribution des récepteurs KIR au contrôle cellulaire NK de l'infection à CMV n'a pas encore été explorée. Dans ce travail, nous avons observé une expression préférentielle des KIR2DL sur les cellules NK NKG2C⁺ amplifiées chez les individus CMV⁺. Dans un modèle in vitro d'infection d'iDC allogéniques, nous avons montré que les récepteurs KIR2D sont requis pour un meilleur contrôle de l'infection à CMV par les cellules NK. Nos résultats indiquent une contribution fonctionnelle des récepteurs KIR2DL1 et KIR2DL3 au contrôle des iDC C2C2 infectées par le CMV et suggèrent un échappement de celui-ci à la reconnaissance par les cellules NK KIR2DL3⁺, dans un environnement HLA-C1. Dans un modèle d'amplification des cellules NK in vitro, après stimulation avec des B-EBV exprimant la phosphoprotéine pp65, nous avons montré que cette dernière inhibe la prolifération des cellules NK KIR2DL3⁺. Le rôle des cellules NK dans le contrôle de l'infection à CMV dans la transplantation rénale a aussi été exploré dans un modèle de HAEC infectées par le virus, suggérant un rôle privilégié des cellules NK NKG2C⁺. Dans ce travail de thèse, nous avons également revisité les spécificités des récepteurs KIR2D, montré que le KIR2DS2 peut reconnaître les molécules HLA-C du groupe C1 et déterminé l'impact fonctionnel des KIR2D sur l'alloréactivité des cellules NK et la formation du répertoire cellulaire NK KIR2D. Ces données contribuent à mieux identifier les populations NK impliquées dans le contrôle de l'infection à CMV qui dépend fortement de la nature de la cible cellulaire infectée par le virus, soulevant l'importance du contexte de la greffe allogénique.

Mots clés : cellules NK, KIR, CMV, DC, greffe de CSH

KIR⁺ NK cell contribution in controlling cytomegalovirus infection : implication in allogeneic transplants

NK cell alloreactivity plays a key role in anti-viral and anti-tumor immunity, particularly in the absence of T cells after allogeneic HSCT. CMV reactivation after transplantation induces clonal expansion of NKG2C⁺ KIR⁺ NK cells. This phenomenon is also observed in healthy CMV seropositive individuals. However, KIR contribution in controlling CMV infection is not documented. In this study, we observed that NKG2C⁺ NK cells amplified in CMV seropositive individuals mainly express KIR2DL receptors. In an in vitro model of allogeneic CMV infected-iDC, we showed that KIR2D receptors are required for a better control of CMV infection by NK cells. Our results indicate a functional contribution of KIR2DL1⁺ and KIR2DL3⁺ NK cells in controlling CMV-infected C2C2⁺ iDC and suggest a CMV evasion for KIR2DL3⁺ NK cell recognition in HLA-C1 environment. Moreover, in an in vitro model of NK cell amplification after stimulation with EBV-B cells expressing pp65 phosphoprotein, we showed that the latter inhibits KIR2DL3⁺ NK cell proliferation. NK cell role in controlling CMV infection in kidney transplantation has also been explored in a model of HAEC infected by the virus, suggesting a key role of NKG2C⁺ NK subsets. In this study, we have revisited KIR2D specificities. We showed that KIR2DS2 can recognize HLA-C molecules belonging to C1 group and determined the functional impact of KIR2D engagement with cognate HLA-C ligands on NK cell alloreactivity and KIR2D repertoire formation. Taken together, these data contribute to better identify NK cell subsets involved in controlling CMV infection that is highly dependent on the nature of CMV-infected target cells, raising the importance of allogeneic transplant setting.

Keywords : NK cells, KIR, CMV, DC, HSCT