

Thèse de Doctorat

Nicolas JOUAND

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

École doctorale : Biologie-Santé UBL

Discipline : Biologie-Santé

Spécialité : Immunologie

Unités de recherche :

Centre de Recherche en Transplantation & Immunologie (CRTI) - UMR 1064 INSERM, Université de Nantes

Institut de Transplantation Urologie Néphrologie (ITUN), CHU de Nantes

Centre de Recherche en Cancérologie & Immunologie Nantes-Angers (CRCINA) - UMR 1232 INSERM, Université de Nantes

Soutenu le 02 Février 2018

Étude de la réponse lymphocytaire T non conventionnelle restreinte par HLA-E lors de l'infection par le cytomégalovirus chez les patients transplantés rénaux

JURY

Président du jury :	Antoine TOUBERT , Professeur des Universités, Praticien Hospitalier, Université Paris-Diderot
Rapporteurs :	Julie DÉCHANET-MERVILLE , Directrice de Recherche, ImmunoConcEpT, Université de Bordeaux Victor APPAY , Directeur de Recherche, CIMI, Université de la Sorbonne
Examinatrice :	Berthe-Marie IMBERT-MARCILLE , Professeur des Universités, Praticien Hospitalier, CHU et Université de Nantes
Directrices de Thèse :	Béatrice CHARREAU , Chercheur, CRTI, CHU de Nantes Nadine GERVOIS , Professeur des Universités, CRCINA, Université de Nantes

SOMMAIRE

SOMMAIRE	- 1 -
ABRÉVIATIONS	- 6 -
PRÉAMBULE	- 10 -
INTRODUCTION	- 15 -
PARTIE 1 : LE CYTOMEGALOVIRUS HUMAIN	- 17 -
<i>Généralités sur les virus de l'herpès</i>	- 17 -
<i>Structure du HCMV</i>	- 19 -
Génome du HCMV	- 19 -
Capside du HCMV	- 20 -
Tégument du HCMV	- 21 -
Enveloppe du HCMV.....	- 22 -
<i>Cycle réplcatif du HCMV</i>	- 22 -
Phase active.....	- 22 -
Phase de latence.....	- 24 -
<i>Tropisme du HCMV</i>	- 25 -
<i>Epidémiologie du HCMV</i>	- 27 -
<i>Physiopathologie de l'infection à HCMV</i>	- 28 -
PARTIE 2 : IMPACT DU HCMV EN TRANSPLANTATION	- 29 -
<i>Incidence et Facteurs de risque</i>	- 29 -
<i>Complications cliniques associées</i>	- 31 -
Effets directs.....	- 31 -
Effets indirects.....	- 33 -
<i>Suivi clinique des patients transplantés</i>	- 34 -
<i>Prise en charge clinique</i>	- 37 -
Stratégies préventives	- 37 -
Traitements curatifs	- 39 -
<i>Développement de traitements alternatifs</i>	- 41 -
Molécules chimiques.....	- 42 -
Immunothérapies	- 42 -
PARTIE 3 : LA REPONSE IMMUNE SPECIFIQUE DU HCMV	- 45 -
<i>Importance des différents éléments de la réponse immune anti-HCMV</i>	- 45 -
<i>Acteurs principaux de la réponse immune dirigée contre le HCMV</i>	- 48 -
Réponse humorale	- 48 -
Fréquence et spécificité.....	- 48 -
Rôle.....	- 48 -
Réponse effectrice.....	- 50 -
Les cellules NK CD94/NKG2C ⁺	- 50 -
Les cellules T $\gamma\delta$ V δ 2 négatives.....	- 53 -
Les cellules T $\alpha\beta$ CD8 ⁺ et CD4 ⁺	- 56 -
<i>Cinétique de développement de la réponse immune anti-HCMV</i>	- 62 -
<i>Inflation mémoire & Immunosénescence</i>	- 64 -
<i>Mécanismes d'immunoévasion du HCMV</i>	- 67 -
Régulation négative de l'expression membranaire des molécules HLA-I et -II.....	- 68 -
Altération du répertoire peptidique présenté en surface aux LT CD8 ⁺	- 70 -
Diminution de l'expression des ligands de récepteurs activateurs	- 71 -
Maintien des interactions avec les récepteurs inhibiteurs KIR2/3DL et HLA-E.....	- 72 -
UL18.....	- 72 -
UL40.....	- 74 -
PARTIE 4 : LES LT CD8 RESTREINTS PAR HLA-E ANTI-HCMV	- 79 -
HLA-E	- 79 -
Organisation génomique et structure protéique.....	- 79 -
Profil d'expression transcriptionnelle et membranaire.....	- 80 -
Évolution & Polymorphisme génétique.....	- 81 -
Peptidome de HLA-E.....	- 83 -
Répertoire peptidique physiologique	- 83 -

Structure cristallographique des complexes HLA-E/peptide	84 -
Répertoire peptidique pathologique	85 -
Dualité fonctionnelle de HLA-E	87 -
Ligand des récepteurs CD94/NKG2	87 -
Ligand de TCR de lymphocytes T	90 -
<i>Implication de réponses T restreintes par HLA-E dans la surveillance immunitaire du Soi et du Non-Soi</i> -	
91 -	
Reconnaissance d'antigènes viraux	91 -
Virus d'EPSTEIN-BARR et de la Grippe	91 -
Virus de l'Hépatite C	92 -
Reconnaissance d'antigènes bactériens	92 -
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	92 -
<i>Salmonella enterica</i>	94 -
Reconnaissance physiopathologique du Soi	94 -
Sclérose en plaque	95 -
Diabète de type 1	96 -
<i>Les lymphocytes T CD8 restreints par HLA-E anti-HCMV</i>	96 -
CONTEXTE ET OBJECTIFS DE L'ÉTUDE	101 -
RÉSULTATS.....	106 -
ARTICLE :	108 -
HCMV TRIGGERS FREQUENT AND PERSISTENT UL40-SPECIFIC UNCONVENTIONAL HLA-E-RESTRICTED CD8 T-CELL RESPONSES -	
108 -	
WITH POTENTIAL AUTOLOGOUS AND ALLOGENEIC PEPTIDE RECOGNITION.....	108 -
<i>Objectifs & Résumé</i>	108 -
<i>Article</i>	110 -
RÉSULTATS COMPLÉMENTAIRES	148 -
<i>Impact du génotype des gènes HLA-I sur l'induction des populations T CD8 restreintes par HLA-E</i>	
<i>spécifiques de UL40₁₅₋₂₃</i>	148 -
Allèles HLA	148 -
Peptides signaux HLA-I ₃₋₁₁	150 -
Corrélation de l'expression des protéines HLA-A*02 et HLA-E	153 -
<i>Caractéristiques des populations T CD8 restreintes par HLA-E spécifiques de UL40₁₅₋₂₃</i>	155 -
Phénotype des populations T CD8 restreintes par HLA-E spécifiques de UL40 ₁₅₋₂₃	155 -
Statut des LT CD8 HLA-E/UL40	155 -
Expression de récepteurs co-activateurs et inhibiteurs	156 -
Fonction des populations T CD8 restreintes par HLA-E spécifiques de UL40 ₁₅₋₂₃	158 -
Potentiel cytotoxique	158 -
Production de cytokines	159 -
<i>Évaluation de l'impact clinique des populations T CD8 restreintes par HLA-E spécifiques de UL40₁₅₋₂₃</i>	
160 -	
DISCUSSION	163 -
MISE EN PLACE DE LA REPONSE T CD8 HLA-E/UL40	165 -
<i>Sélection du répertoire T CD8 HLA-E/UL40 naïf</i>	166 -
<i>Activation de la réponse T CD8 HLA-E/UL40 suite à l'infection à HCMV</i>	169 -
CARACTERISTIQUES ET ROLE DE LA REPONSE T CD8 HLA-E/UL40	175 -
<i>Le répertoire T des LT CD8 HLA-E/UL40</i>	175 -
<i>Phénotype et fonction des LT CD8 HLA-E/UL40</i>	176 -
IMPACT CLINIQUE DE LA REPONSE T CD8 HLA-E/UL40	178 -
<i>Les LT CD8 HLA-E/UL40 : un médiateur du rejet en transplantation ?</i>	178 -
<i>Implications potentielles des LT CD8 HLA-E/UL40 dans d'autres contextes pathologiques</i>	181 -
CONCLUSION & PERSPECTIVES.....	182 -
BIBLIOGRAPHIE	185 -
ANNEXE	218 -

ABRÉVIATIONS

Ac	Anticorps	LBA	Lavage broncho-alvéolaire
ADCC	Antibody-dependant cellular cytotoxicity	LCR	Liquide céphalo-rachidien
ADN	Acide désoxyribonucléique	LT	Lymphocytes T
Ag	Antigène	MAI	Maladies auto-immunes
AG	Acétate de glatiramère	MBL	Mannose-binding lectin
ALT	Alanine aminotransférase	MCP	Major capsid protein
ARN	Acide ribonucléique	miARN	micro-ARN
CD	Cluster de différenciation	MnC-BP	Minor capsid binding-protein
CMH	Complexe majeur d'histocompatibilité	MnCP	Minor capsid protein
CSH	Cellules souches hématopoïétiques	Mtb	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>
D	Donneur	NK	Natural killer
db	Double-brin	NKG2	Natural killer group 2
(i/m)DC	Cellules dendritiques (immatures/matures)	NKT	Natural killer T
DSA	Donor-specific antibodies	OLS	Organes lymphoïdes secondaires
DTI	Diabète de type I	OMS	Organisation mondiale de la santé
E	Early	ORFs	Open reading frames
EBV	Virus de l'Epstein Barr	PAMP	Pathogen-associated molecular patterns
EPCR	Endothelial protein C receptor	PBMC	Peripheral blood mononuclear cell
Golgi	Appareil de Golgi	pp	Protéine phosphorylée
gp	Glycoprotéine	R	Receveur
GVHD	Graft versus host disease	RE	Réticulum endoplasmique
HCMV	Cytomégalovirus humain	SCP	Smallest capsid protein
HHV	Human Herpesvirus	SEP	Sclérose en plaque
HLA	Human leukocyte antigen	Set	<i>Salmonella enterica</i> de sérovar <i>typhi</i>
HSV	Virus <i>Herpes simplex</i>	SIDA	Syndrome d'immunodéficience acquise
IC	Isolat clinique	TCM	LT centraux-mémoires
IE	Immediate Early	TCR	T-cell receptor
IFN	Interféron	TEM	T effecteurs-mémoires
Ig	Immunoglobuline	TEMRA	T effecteurs-mémoires réexprimant CD45RA
IL	Interleukine	TLR	Toll-like receptor
iNKR	Récepteurs inhibiteurs associés aux NK	TNF	Tumor necrosis factor
IRS/L	Internal repeat short/long	TRM	T résidents-mémoires
kb	Kilo-bases	TRS/L	Terminal repeat short/long
KIR	Killer cell Ig-like receptor	UL/US	Unique long/short
KSHV	Virus de l'herpès associé au sarcome de Kaposi	VIH	Virus de l'immunodéficience humaine
L	Late	VZV	Virus Varicelle-Zona
LB	Lymphocytes B		

PRÉAMBULE

Virus spécifique de l'Homme, le Cytomégalovirus Humain, ou HCMV, est ubiquitairement réparti à la surface du globe, pouvant infecter jusqu'à 97% de d'une population régionale de manière durable. En effet, le virus contamine premièrement l'hôte de manière active, pour ensuite persister à vie dans un état de latence, entrecoupé d'épisodes de réactivation sporadiques. Bien que globalement inoffensif chez l'individu immunocompétent, le HCMV est un pathogène opportuniste et demeure une cause majeure mondiale de complication infectieuse, conduisant à la morbidité et la mortalité chez les sujets ayant des déficiences immunes innées (fœtus, nouveau-nés) ou acquises (patients atteints du SIDA, patients greffés/transplantés).

Chez les receveurs de greffe de cellules souches hématopoïétiques (CSH) ou d'organes, l'emploi de traitements immunosuppresseurs favorise la primo-infection et/ou la réactivation du HCMV, qui va alors participer directement ou indirectement au rejet du greffon, voire même au décès du patient. Ainsi, l'infection à HCMV est la complication virale la plus fréquente dans le contexte de la transplantation. L'utilisation de traitements préventifs antiviraux a permis d'améliorer la survie du greffon et du patient à long terme. Cependant, les stratégies cliniques actuelles demeurent partiellement efficaces et favorisent l'émergence de souches résistantes aux molécules anti-HCMV, ainsi que l'apparition d'infections actives tardives.

La persistance du virus à vie dans l'organisme, l'apparition de souches résistantes aux traitements antiviraux et le manque de vaccins efficaces sont autant de raisons de poursuivre la recherche sur le HCMV. L'absence de symptômes apparents associés au virus chez les individus sains et le développement de la maladie chez les sujets immunodéprimés témoignent de la pression exercée par le système immunitaire sur le virus *in vivo*. En effet, de nombreux effecteurs immuns prennent part à la défense contre l'infection virale. Un obstacle majeur pour la conception de vaccins est notre compréhension incomplète de la réponse immune dirigée contre le HCMV. Ainsi, il est nécessaire de nos jours de parfaire notre connaissance des paradigmes de cette réponse, afin d'être capable à l'avenir d'améliorer le diagnostic et la prise en charge des infections à HCMV chez les individus à risque.

Ce projet s'inscrit dans la volonté de mieux comprendre un élément méconnu de la réponse immune dirigée contre le HCMV. En effet, le but de mon

travail de thèse a été d'étudier la fréquence, le développement et la fonction des lymphocytes T (LT) CD8⁺ restreints par la molécule HLA-I non classique HLA-E et spécifiques du HCMV, chez des individus sains et des patients transplantés rénaux.

Ce rapport de thèse est divisé en trois parties principales, à savoir :

- Une INTRODUCTION, constituée de 4 sous chapitres. Un premier chapitre présentera les notions basiques concernant le HCMV (structure, épidémiologie *etc.*), tandis qu'un second chapitre détaillera les répercussions de l'infection par le virus dans le contexte de la transplantation, ainsi que les différents moyens de gestion mis en place pour contrôler son impact délétère en clinique. Un troisième chapitre s'attardera sur la réponse immune spécifique du cytomégalovirus chez l'Homme. Un point tout particulier sur les effecteurs immuns principaux sera réalisé. Un quatrième et dernier chapitre présentera la protéine HLA-E pour finalement faire un état de l'art sur les lymphocytes T restreints par HLA-E chez l'Homme, dont notamment ceux dirigés contre le HCMV, au cœur de ce manuscrit ;
- Une seconde partie RESULTATS. Elle présentera l'article publié issu de ces travaux de thèse, accompagné de résultats complémentaires préliminaires ;
- Une troisième et dernière partie consacrée à la DISCUSSION. Cette dernière élargira l'analyse des données obtenues pendant cette thèse à la lumière du contexte scientifique actuel et ouvrira sur des perspectives de continuité de ce travail.

INTRODUCTION

Généralités sur les virus de l'herpès

Selon la classification de Baltimore, les herpesvirus, dont le Cytomégalovirus Humain, appartiennent au groupe I, ordre des *Herpesvirales*, famille des *Herpesviridae*, et sont notamment retrouvés chez l'ensemble des sous-clades des vertébrés. Ces virus partagent pour caractéristiques communes 1) d'être disséminés mondialement, 2) de chacun posséder une très forte spécificité d'infection pour une espèce animale donnée (*Homo sapiens* pour le HCMV), 3) d'avoir une très faible capacité de virulence morbide suite à la primo-infection, et 4) de s'établir et persister à vie dans leur hôte, en alternant des épisodes de réactivation du cycle réplcatif avec des phases d'absence de production de particules virales, dénommées « état de latence virale » (Davison 2002).

Parmi les herpesvirus, 9 sont propres à l'espèce *Homo sapiens*, et répartis en 3 sous-familles : les *Alphaherpesvirinae*, les *Betaherpesvirinae* et les *Gammaherpesvirinae*, se distinguant par des tropismes cellulaires préférentiels et distincts de primo-infection et de latence au sein de l'hôte, et en conséquence, par un panel de maladies induites d'origine histologique variée (**Tableau 1**) (Crough et Khanna 2009).

Tableau 1: Classification, sites privilégiés et maladies associées aux virus de l'herpès spécifiques à l'Homme. D'après (Crough et Khanna 2009).

Famille	Nom scientifique	Nom usuel	Site(s) privilégié(s) de		Maladies
			Primo-infection	Latence	
α	HHV-1	Virus Herpes simplex de type 1 (HSV-1)	Cellules épithéliales des muqueuses (lymphocytes T pour VZV)	Ganglions des nerfs sensoriel et crânien	Herpès orolabial et génital
	HHV-2	Virus Herpes simplex de type 2 (HSV-2)			Herpès génital
	HHV-3	Virus Varicelle-Zona (VZV)			Varicelle ; Zona
β	HHV-5	Cytoméga-lovirus humain (HCMV)		Cellules souches hématopoïétiques CD34+, monocytes, cellules endothéliales	Syndrome mononucléosique ; rétinite
	HHV-6A HHV-6B	Virus de l'herpès humain de type 6 A ou B (HHV-6-A/B)	Cellules épithéliales, fibroblastes, monocytes	Monocytes, macrophages	Roséole infantile
	HHV-7	Virus de l'herpès humain de type 7 (HHV-7)		Lymphocytes T CD4 ⁺	
γ	HHV-4	Virus d'Epstein-Barr (EBV)	Cellules épithéliales des muqueuses, lymphocytes B	Lymphocytes B	Mononucléose infectieuse ; lymphome de Burkitt ; carcinome nasopharyngé ; lymphome primaire du système nerveux central (= microgliome) et leucoplasie chevelue buccale associée au VIH ; syndrome lymphoprolifératif post-transplantation
	HHV-8	Virus de l'herpès associé au sarcome de Kaposi (KSHV)	Non déterminé		Sarcome de Kaposi ; lymphome effusif primaire ; maladie de Castleman

Structure du HCMV

Le génome à ADN compacté du HCMV est contenu dans une capside icosaédrique pseudo-sphérique, entourée d'une matrice protéique dite tégumentaire. L'ensemble est entouré d'une enveloppe, composée de membrane de la cellule-hôte et ponctuée de glycoprotéines virales, l'intégralité du virion ayant un diamètre compris entre 200 et 300 nm (**Figure 1**).

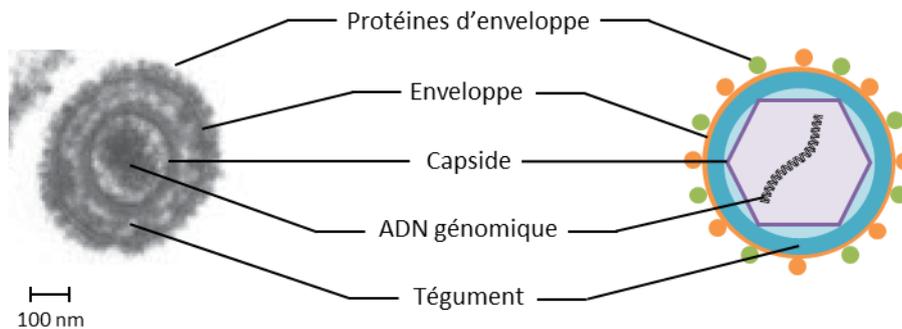


Figure 1 : Section ultrafine d'une particule de HCMV en microscopie électronique et représentation schématique. Tirée de Schottstedt *et al.* 2010.

Génome du HCMV

Le HCMV possède le plus grand génome d'herpesvirus humain, constitué d'ADN double-brin (db) d'une longueur totale d'environ 235 kb. Il est présent sous forme linéaire non fragmentée dans la capside, et épisomale dans le noyau de la cellule-hôte (Dolan *et al.* 2004). Il est composé de 2 régions uniques, dénommées UL (pour Long) et US (pour Short), flanquées de part et d'autre d'extrémités terminales répétées et inversées : IRS/L et TRS/L (Internal et Terminal Repeat Short/Long) (Davison et Bhella 2007). Ces bornes permettent de maintenir une cohésion covalente entre ces 2 régions, ainsi que les processus de circularisation sous forme épisomale de l'ADN viral suite à l'entrée du virion dans la cellule-hôte, le clivage de l'ADN lors de sa réplication par l'ADN polymérase virale pUL54 et son encapsidation lors de la formation de néo-virions.

Il est estimé que le génome du HCMV est composé de 165 à 252 cadres ouverts de lecture (ORF, pour Open Reading Frame). Une étude majeure de profilage ribosomique a démontré par analyses couplées du transcriptome et du traductome que le génome du HCMV comprenait plus de 750 ORFs transcrits et

traduits (Stern-Ginossar *et al.* 2012). Bien qu'une grande majorité de ces produits viraux demeurent inconnus à ce jour, les protéines du HCMV sont impliquées dans de multiples voies afin d'assurer la réplication du virus : facteurs de transcription, composants structuraux, molécules d'échappement à la réponse immunitaire *etc.* (**Figure 2**). Le génome du HCMV ne code pas uniquement des protéines virales ; en effet, 13 ORFs très conservés sont transcrits en micro ARN (miARN) non codants, intervenant favorablement dans les processus de réplication du virus et d'échappement au système immunitaire (Grey *et al.* 2005).

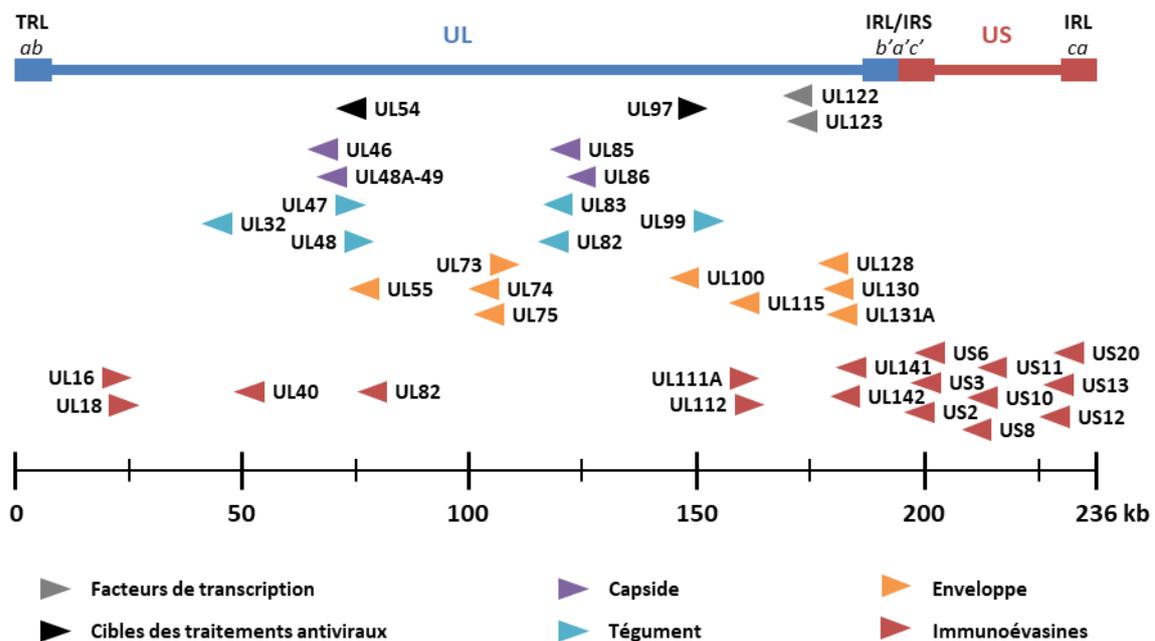


Figure 2 : Schéma de la carte génomique de la souche Merlin. L'ADN est représenté en simple brin, en kb. Chaque gène est illustré par un triangle de taille non proportionnelle et attribué à une catégorie de gènes suivant le code couleur. Adapté de Sijmons *et al.* 2014.

Capside du HCMV

La capside du HCMV est de forme sphérique à symétrie icosaédrique T16 et sa structure atomique a été récemment publiée (Yu *et al.* 2017). Similaire chez tous les herpesvirus, elle est composée de 4 protéines principales conservées réunies en pentons et hexons : pUL86/MCP (Major Capsid Protein), pUL48A-49/SCP (Smallest Capsid Protein), pUL85/MnCP (Minor Capsid Protein) et pUL46/MnC-BP (Minor Capsid Binding-Protein) (Davison et Bhella 2007). La MCP assemblée en hexons forme les parois de la capside, tandis que les 3 autres

protéines réunies en pentons participent au maintien de sa stabilité et de sa rigidité.

Tégument du HCMV

Le tégument (ou matrice) du HCMV est une structure amorphe organisée épousant les contours de la capsid virale et située sous l'enveloppe virale (Chen *et al.* 1999). Compartiment protéique le plus abondant du HCMV, il est composé de plus de 20 protéines différentes qui peuvent être classées en plusieurs catégories en fonction de leur implication dans la structure, à savoir l'assemblage/désassemblage du virion, l'entrée du génome viral dans la cellule-hôte, l'expression génique, le transport de la capsid au noyau, ou encore, la régulation de la réponse immunitaire et de la réplication virale (Kalejta 2008).

Pp65 (UL83), constituant le plus abondant du tégument viral et du protéome du virion, est impliqué dans l'inhibition des composants immuns de la cellule-hôte (Gilbert *et al.* 1996; Odeberg *et al.* 2003; Arnon *et al.* 2005). Pp150 (UL32), 2^{ème} composant majoritaire de la matrice virale, est indispensable à la réplication virale *in vitro*. Il interagit avec la protéine SCP de la capsid virale et sert au maintien de sa structure lors de la formation des néo-virions, tandis que Pp28 (UL99) contrôle le cloisonnement de la capsid et des protéines tégumentaires par l'enveloppe *in vitro*. L'hétérodimère pUL47/pUL48 s'assemble avec la MCP composant la capsid afin de permettre la maturation du virion par acquisition de l'enveloppe, et serait potentiellement impliqué dans le transport de la capsid au noyau pour y délivrer le génome viral. Pp71 (UL82) permet le contrôle de l'expression des gènes du démarrage du cycle répliatif du HCMV. En plus des ARN et protéines virales, le tégument emprisonne dans sa structure plus de 70 protéines et ARN d'origine cellulaire de rôles méconnus, l'intégralité de ces protéines étant transférée à l'intérieur de la cellule-hôte durant l'infection (Terhune *et al.* 2004; Varnum *et al.* 2004).

Enveloppe du HCMV

L'enveloppe du HCMV est une bicouche lipidique acquise par le virus durant les processus de bourgeonnement accompagnant sa maturation. Elle est successivement dérivée des membranes nucléaires puis endosomales précoces de la cellule-hôte (Beltran et Cristea 2014). Composée de plus de 600 glycoprotéines, cette enveloppe se retrouve ponctuée de 6 glycoprotéines majoritaires d'origine virale, relativement conservées au sein des herpesvirus humain : gB (gpUL55), gM (gpUL100), gN (gpUL73), gH (gpUL75), gL (gpUL115) et gO (gpUL74) (Grünewald *et al.* 2003; Davison et Bhella 2007). Elles sont impliquées dans l'entrée du virion dans la cellule-hôte, dans la transmission intercellulaire et dans le tropisme cellulaire du HCMV, au travers de la formation de complexes trimériques (gH/gL/gO) et pentamériques (gH/gL/UL128/UL130/UL131A) responsables de l'attachement du virus sur les cellules-cibles, tandis que gB assure la fusion des membranes virale et cellulaire (Wussow *et al.* 2017).

Cycle répliatif du HCMV

Phase active

Les étapes majeures du cycle de répliation virale du HCMV sont représentées sur la **Figure 3** (Beltran et Cristea 2014). Le cycle répliatif actif du HCMV commence par la fixation d'un ou plusieurs récepteurs viraux sur leur(s) ligand(s) cellulaire(s) respectif(s). Par la suite, l'enveloppe virale fusionne soit directement avec la membrane plasmique, soit avec la membrane endosomale si le virus est endocyté, déversant dans le cytoplasme les protéines tégmentaires et la capsid. Cette dernière est alors acheminée au noyau cellulaire par détournement des réseaux de transport intracellulaire (microtubules de tubuline cellulaire, filaments d'actine du cytosquelette), où l'ADN linéaire db viral est relargué. Il se circularise alors sous forme épisomale, et peut dans cet état, soit induire la phase de latence, soit maintenir la phase de répliation active. Cette dernière se divise en 3 sous-étapes distinctes. La phase très précoce dite « IE » (pour Immediate Early) démarre entre 2 et 4h post-infection et permet la transcription et traduction des gènes *IE*, dont entre

autres *IE1* et *IE2*, codant pour les deux facteurs de transcription viraux *IE72* et *IE86*, primordiaux dans le cycle de réplication virale. Ensuite, *IE72* et *IE86* enclenchent la phase précoce « E » (pour Early) dans les 3 à 8h post-infection. Elle consiste notamment à induire la production de l'ADN polymérase virale *pUL54*, qui va être en charge de la réplication massive du génome viral épisomal sous la forme d'un concaténère hélicoïdal de copies d'ADN. Ce dernier est par la suite clivé en unité de génome viral pour former les molécules d'ADN db linéaires. Enfin, la phase dite tardive « L » (pour Late) prend place entre 24 et 48h post-infection. Les éléments protéiques viraux constituant la capsid, le tégment, et l'enveloppe sont alors synthétisés dans la cellule-hôte. Les protéines composant la capsid sont envoyées partiellement pré-assemblées au noyau, où va alors s'achever leur maturation sous forme d'une capsid dans laquelle une unité de génome est injectée. Les capsides transitent alors du noyau vers le cytoplasme par un processus de bourgeonnement/fusion, leur faisant acquérir transitoirement une enveloppe nucléaire, successivement composée du feuillet interne puis externe. En parallèle, les glycoprotéines virales de l'enveloppe sont synthétisées dans la lumière du réticulum endoplasmique (RE), puis envoyées via l'appareil de Golgi (Golgi) à la surface plasmique durant leur processus de maturation. Elles sont par la suite ré-internalisées dans des endosomes précoces. Les capsides virales dans le cytoplasme acquièrent alors par couches successives les protéines virales composant le tégment, puis leur enveloppe virale définitive par bourgeonnement dans la lumière des endosomes précoces. Les néo-virions sont finalement excrétés dans le milieu extracellulaire par exocytose suite à la fusion des compartiments endosomaux avec la membrane plasmique. La production des virions matures s'accompagne également de celle de particules virales défectueuses dénommées « corps denses », enveloppes criblées de glycoprotéines virales contenant uniquement des protéines tégmentaires. En tout et pour tout, un cycle complet de réplication du HCMV prend de 72 à 96h.

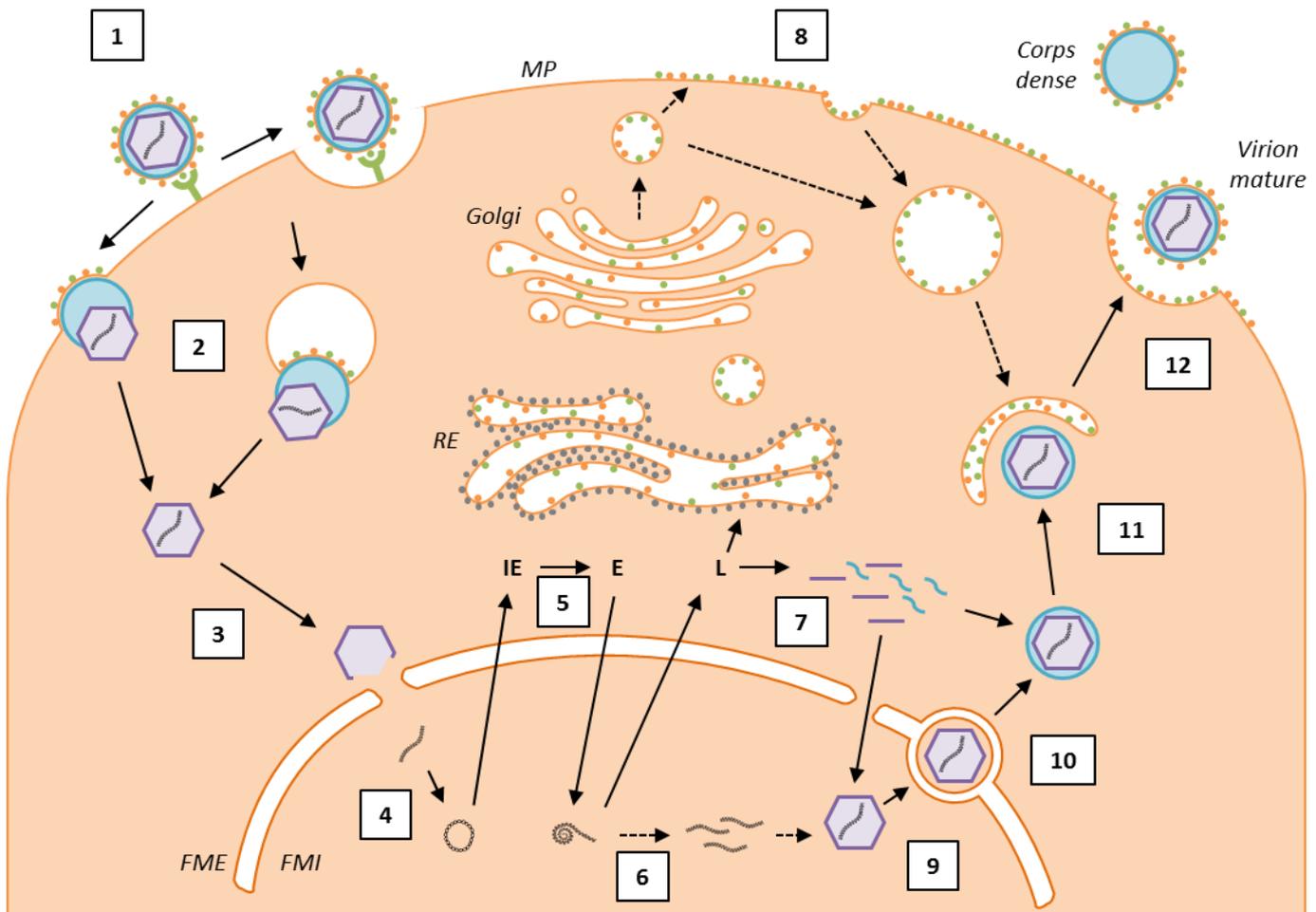


Figure 3: Schéma des étapes clés du cycle réplcatif du HCMV. 1) Attachement du virus. 2) Pénétration & Fusion. 3) Transport de la capside. 4) Relargage et circularisation du génome viral. 5) Expression des gènes très précoces (IE), puis précoces (E). 6) Réplication du génome viral. 7) Expression des gènes tardifs (L). 8) Circuit des protéines virales de l'enveloppe. 9) Assemblage de la capside. 10) Bourgeonnement de la capside. 11) Acquisition du tégument et de l'enveloppe. 12) Exocytose des néo-virions matures et corps denses. Abréviations : E : Early ; FME : Feuillet Membranaire Externe ; FMI : Feuillet Membranaire Interne ; Golgi : Appareil de Golgi ; IE : Immediate Early ; L : Late ; MP : Membrane Plasmique ; RE : Réticulum endoplasmique.

Phase de latence

Les herpesvirus partagent la caractéristique d'alterner des phases de réplcation active, courtes, avec un état de latence plus long dans les cellules infectées, qui consiste en la persistance dans la cellule-hôte du génome viral entier sans qu'il n'y ait de production de nouveaux virions infectieux. L'état de latence est caractérisé par la suppression de la transcription de nombreux gènes viraux lytiques, en parallèle de l'expression concomitante de gènes viraux associés à la latence, impliqués notamment dans des mécanismes d'inhibition de l'apoptose et d'immuno-subversion (Wills *et al.* 2015). L'ADN viral persiste alors sous forme épisomale dans le noyau : entre 1 cellule sur 250 et 1 sur 100

contiennent de 2 à 13 copies de génome viral par cellule dans les sites de latence (moëlle osseuse et monocytes circulants) (Slobedman et Mocarski 1999). Ainsi les phases lytiques permettent d'assurer l'amplification et la dissémination interne et externe du virus tandis que l'état de latence favorise l'échappement au système immunitaire.

Le virus peut établir un état de quiescence dans certains sous-types cellulaires, préférentiellement de la lignée myéloïde : CSH CD34⁺, les progéniteurs communs à la lignée myéloïde, les monocytes, les progéniteurs des cellules dendritiques (DC) myéloïdes, les DC immatures et les cellules endothéliales (**Tableau 2**) (Sinzger *et al.* 2008). La réactivation du HCMV, passant d'un état de latence à celui de réplication lytique, se déroule lors de la différenciation des CSH CD34⁺/monocytes en DC immatures/macrophages, et lors de la maturation des DC, résultant en la production *de novo* de particules virales infectieuses (**Figure 4**) (Reeves *et al.* 2005; Hargett et Shenk 2010). Ceci est notamment dû à l'intervention d'enzymes impliquées dans les processus de différenciation cellulaire, qui vont également acétyler les histones compactant l'ADN viral, conduisant au relâchement de la chromatine et à la reprise de la transcription des gènes *IE1* et *IE2* (Reeves *et al.* 2005). La présence des cellules infectées dans un microenvironnement inflammatoire (Tumor Necrosis Factor-alpha (TNF- α), Interféron-gamma (IFN- γ)) conduit également à la réactivation du HCMV (Stein *et al.* 1993; Söderberg-Nauclér *et al.* 2001).

Tropisme du HCMV

En dépit d'une spécificité d'espèce stringente, le HCMV ne possède pas de tropisme cellulaire strict. En effet, il est capable d'infecter de nombreux sous-types cellulaires (**Tableau 2**) grâce à de multiples approches de fixation et pénétration. En outre, le tropisme du HCMV lors de la phase de réplication active est moins restreint que celui de l'état de latence.

Tableau 2: Sites de tropisme cellulaire du HCMV pour la réplication active et l'établissement de la latence. D'après Sinzger *et al.* 2008.

Sites de réplication active du HCMV	Sites de latence du HCMV
- Cellules épithéliales (rétine, glandes salivaires, poumons, foie, tractus gastro-intestinal, reins)	- Cellules endothéliales
- Fibroblastes (peau, poumons, tractus gastro-intestinal)	- Cellules souches hématopoïétiques CD34+
- Cellules endothéliales	- Monocytes
- Cellules de la lignée hématopoïétique (monocytes, macrophages, DC dérivées des monocytes, neutrophiles)	- DC immatures
- Cellules musculaires lisses (parois vasculaires, tractus gastro-intestinal)	
- Cellules neuronales et gliales	
- Rétinocytes	
- Cardiomyocytes	
- Hépatocytes	
- Cellules trophoblastiques	

Ce large panel de cibles cellulaires permet alors au HCMV de se disséminer rapidement et efficacement au sein et entre les individus (**Figure 4**).

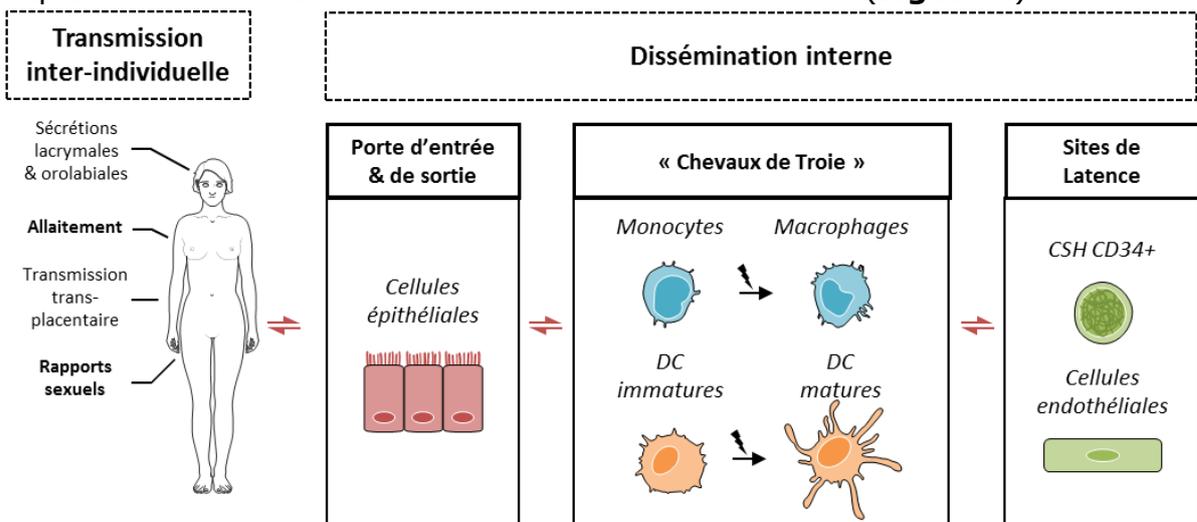


Figure 4: Mécanismes de dissémination interne et transmission inter-individuelle de l'infection à HCMV.

La variété de tropisme cellulaire du HCMV peut s'expliquer par les capacités différentielles d'infection des souches. Par exemple, les souches de laboratoire AD169 et Towne, infectent les fibroblastes mais ont perdu leur pouvoir d'infection des cellules épi- et endo-théliales, du fait d'une délétion de gènes de la région ULb' dans leurs génomes par rapport aux souches isolées en clinique (IC) (Sijmons *et al.* 2014). De manière générale, les souches IC pouvant infecter les cellules endothéliales *in vitro* sont également capables d'infecter les

fibroblastes, mais l'inverse n'est pas nécessairement vrai. Les niveaux d'expression des complexes d'entrée de forme trimérique ou pentamérique influencent le tropisme de la souche virale. En cas de défaut de la protéine virale pUL148, le complexe trimérique gH/gL/gO est immature et peu exprimé, au détriment d'une expression membranaire accentuée du complexe pentamérique gH/gL/UL128/UL130/UL131A. Ce dernier est nécessaire à l'infection des cellules endothéliales (Hahn *et al.* 2004; Macagno *et al.* 2010) et augmente celle des cellules épithéliales (Ryckman *et al.* 2006; Li *et al.* 2015). À l'inverse, la capacité d'une souche à infecter les fibroblastes *in vitro* est corrélée positivement avec le niveau d'expression du complexe trimérique (Zhou *et al.* 2015).

Epidémiologie du HCMV

L'espèce humaine est l'unique réservoir animal connu de réplication et de transmission du HCMV. La prévalence et l'incidence du virus à l'échelle mondiale sont positivement liées à l'âge et inversement corrélées aux conditions socio-économiques, de développement, d'hygiène et de santé entre les régions géographiques des populations, touchant plus fortement en ce sens les pays en voie de développement (Bate *et al.* 2010; Cannon *et al.* 2010). De nos jours, entre 30 et 97% de la population totale est infectée par le HCMV selon le pays, avec une moyenne de 30 à 70% dans les pays développés et de 80 à 100% dans les pays en voie de développement (Bate *et al.* 2010; Cannon *et al.* 2010). En 2010 en France, 41,9% de la population âgée de 15 à 49 ans avait une sérologie positive pour le HCMV, avec des disparités en fonction de l'âge, du sexe et de l'origine des individus (n=2536) (Antona *et al.* 2017).

Étant un virus enveloppé, le HCMV reste extrêmement fragile à l'exposition au milieu extérieur – environ 24h sur une surface *in vitro* - et sa transmission interhumaine ne peut se faire que par contact direct et étroit avec certains fluides biologiques infectés. Ainsi le HCMV peut se transmettre via les voies salivaires, les gouttelettes et projections oropharyngées, la voie sexuelle, la voie sanguine, la transmission iatrogène (greffe de CSH, transplantation d'organes, transfusion sanguine non déleucocytée), voie materno-fœtale (transfert transplacentaire *in utero*) et l'allaitement (**Figure 4**) (Crough et Khanna 2009).

Deux pics majeurs de séroconversion sont observés au sein des différentes strates générationnelles d'une population. Le premier correspond à l'infection durant la petite enfance (entre la naissance et 5 ans), qui se fait par transmission verticale du virus de la mère vers le nouveau-né lors de l'allaitement, mais aussi par propagation depuis des enfants infectés vers les autres par contacts répétés avec la salive et les urines. Le second pic prend place chez la population adolescente âgée de 15 à 20 ans et est corrélé avec le développement de la vie sexuelle active (Crough et Khanna 2009).

Physiopathologie de l'infection à HCMV

Chez l'individu immunocompétent, l'infection à HCMV est soit asymptomatique soit associée à des signes cliniques en général peu spécifiques, rendant le diagnostic clinique de la primo-infection virale difficile. Il est estimé que dans seulement ~10% des cas, la primo-infection à HCMV est symptomatique. Elle se caractérise alors par un syndrome mononucléosique accompagné d'une fièvre prolongée, et parfois une association avec une myalgie, lymphoadénopathie et/ou hépatomégalie. Plus rarement, une atteinte tissulaire est observée : encéphalite, rétinite, pneumonite, myocardite, hépatite, colite ulcéraire, thrombose vasculaire, arthrites et arthralgie (Crough et Khanna 2009). Au contraire, l'infection par le virus peut déclencher une maladie opportuniste à HCMV, de symptômes variables, chez l'individu immunoincompétent natif (fœtus infectés *in utero*, nouveau-nés contaminés *post-partum*) ou acquis (patients atteints du SIDA, receveurs de greffes d'organe ou de CSH, développés dans la partie 2 de cette introduction).

PARTIE 2 : IMPACT DU HCMV EN TRANSPLANTATION

La transplantation d'organe ou la greffe de CSH nécessitent l'emploi de traitements immunosuppresseurs ou conditionnements myéloablatifs, rendant les patients susceptibles aux pathogènes opportunistes, tels que le HCMV. L'immunosuppression d'induction et de maintenance du receveur (R) favorise la réactivation de la souche virale HCMV endogène et/ou la primo-infection/surinfection par la souche virale exogène issue du donneur d'organe (D) (Razonable et Limaye 2016). L'infection à HCMV est une cause majeure de complication clinique chez les patients transplantés car elle est associée avec le rejet et la diminution de la survie à long-terme du greffon, et l'augmentation de la morbidité et la mortalité du receveur (**Figure 5**) (Kaminski et Fishman 2016). L'utilisation de stratégies préventives dirigées contre le HCMV a permis de retarder et/ou diminuer - à défaut d'empêcher - le développement de la maladie chez les receveurs (Martin-Gandul *et al.* 2015).

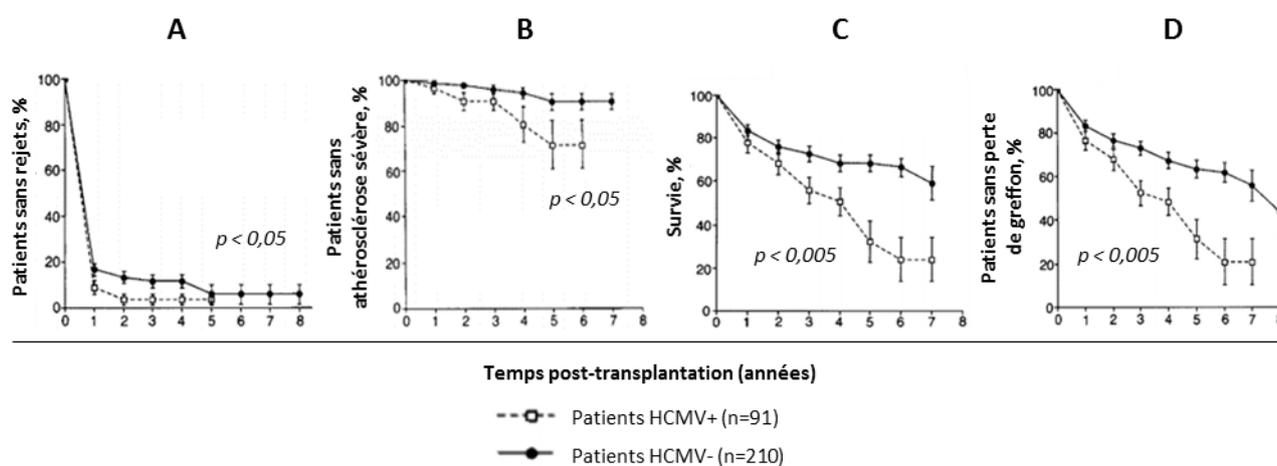


Figure 5: Facteurs de risque associés à l'infection à HCMV dans le contexte de la transplantation : Cas d'une étude clinique sur une cohorte de patients transplantés cardiaques (n=301). L'infection par le HCMV du receveur (primo-infection et/ou réactivation) est associée avec (A) le rejet de l'allogreffe, (B) le développement d'athérosclérose coronarienne, (C) la mortalité des patients et (D) la perte de greffon. D'après Grattan *et al.* 1989.

Incidence et Facteurs de risque

L'incidence de l'infection et la maladie à HCMV varie selon le type d'organe transplanté, les sérostatuts du receveur et du donneur et l'emploi ou non d'une stratégie de prévention antivirale. Ainsi, les incidences de la primo-infection et de la maladie à HCMV chez des patients transplantés sous traitements préventifs

sont respectivement de 50-75% et 40% (poumons), 50% (pancréas ou rein/pancréas), entre 22-29% et 29%(foie), de 9-35% et 29% (cœur) et de 8-32% et 8% (jusqu'à 16% chez les D⁺/R⁻) (reins) (Roman *et al.* 2014; Azevedo *et al.* 2015). Chez les patients receveurs de CSH allogéniques, 30% sont primo-infectés suite à la greffe, et moins de 5% déclenchent une maladie à HCMV par la suite (Ljungman *et al.* 2011).

La mesure des réponses immunes humorales - la sérologie IgG anti-HCMV - chez le receveur et le donneur en amont de la transplantation permet de prédire et stratifier les groupes à risque pour le développement de l'infection et la maladie à HCMV suite à l'acte chirurgical. En transplantation d'organe, le risque de développer la maladie à HCMV est le plus élevé quand l'infection virale se déclenche chez un patient transplanté sans immunité anti-HCMV préexistante (R⁻), exposé à un organe infecté (D⁺) : les receveurs séronégatifs recevant un organe de donneur séropositif (D⁺/R⁻). La surinfection (D⁺/R⁺) et la réactivation (D⁻/R⁺) du HCMV chez le receveur sont également à risque, mais dans une moindre mesure (D⁺/R⁻ >>> D⁺/R⁺ > D⁻/R⁺) (Razonable et Limaye 2016). À l'inverse, l'incidence des infections actives et maladies à HCMV chez les patients greffés de CSH est plus élevée chez les receveurs séropositifs recevant un greffon de donneur séronégatif (D⁻/R⁺ >> D⁺/R⁺ > D⁺/R⁻) (Ljungman *et al.* 2011). Ce constat d'apparence contradictoire, souligne le fait que 1) le virus se réactive à partir des sites de latence même dans le cas de greffes de CSH, et 2) le développement des réponses immunes mémoires antivirales (issues du receveur dans le cas des transplantations d'organe, et du donneur dans le cas des greffes de CSH) est un facteur de bon pronostic contre la maladie à HCMV. En ce sens, l'utilisation d'agents déplétants des lymphocytes comme les anticorps (Ac) anti-CD3 est associée avec la maladie à HCMV (Portela *et al.* 1995) tandis que l'emploi d'antagonistes du récepteur à l'IL-2 (Ac anti-CD25) en tant que stratégie immunosuppressive d'induction non déplétante est statistiquement associé avec de plus faibles taux d'infection à HCMV (Mourad *et al.* 2004; Abou-Ayache *et al.* 2008). Au final, les receveurs séronégatifs recevant un transplant de donneur HCMV⁻ sont les patients ayant le risque le plus faible d'être activement primo-infectés par le virus (Razonable et Limaye 2016).

D'autres facteurs de risque participent également au déclenchement de la maladie dont l'état d'immunosuppression général du receveur (nature du traitement, dose, durée et temps d'administration), les conditions de l'acte opératoire (temps d'ischémie froide, stress et état global de l'organe prélevé) ainsi que les facteurs propres à l'individu-hôte (âge, comorbidité, génotype *HLA*, leucopénie, lymphopénie) et au donneur (âge, génotype et mésappariements *HLA*).

Complications cliniques associées

L'infection à HCMV de cellules-hôtes affecte leurs capacités de prolifération, de survie à l'apoptose ou à enclencher des réponses inflammatoires. En supplément de ces effets directs associés au HCMV, l'infection virale est plus ou moins fortement corrélée dans le contexte de la transplantation à un certain nombre d'effets indirects généraux et spécifiques du type d'organe greffé (**Figure 6**). Cependant, la mesure de la contribution de chaque effet dans les dommages tissulaires demeure incertaine et les mécanismes précis menant au rejet des allogreffes sont encore débattus de nos jours.

Effets directs

Les effets directs de l'infection sur le greffon sont dus à la réplication active du virus dans le transplant. En effet, le stress subi par l'organe greffé lors de l'acte chirurgical provoque l'émergence d'une réponse inflammatoire locale exacerbée, favorable à la réactivation virale (Razonable 2010). Les conséquences directes de la reprise d'un cycle lytique par le HCMV incluent l'activation des voies angiogéniques, prolifératives et pro-coagulantes à partir des cellules infectées. Ils entraînent alors la vasculopathie et la fibrose, conduisant à des dysfonctions chroniques du greffon allogénique suite à l'accumulation de lésions vasculaires (Dzabic *et al.* 2011; Kaminski et Fishman 2016).

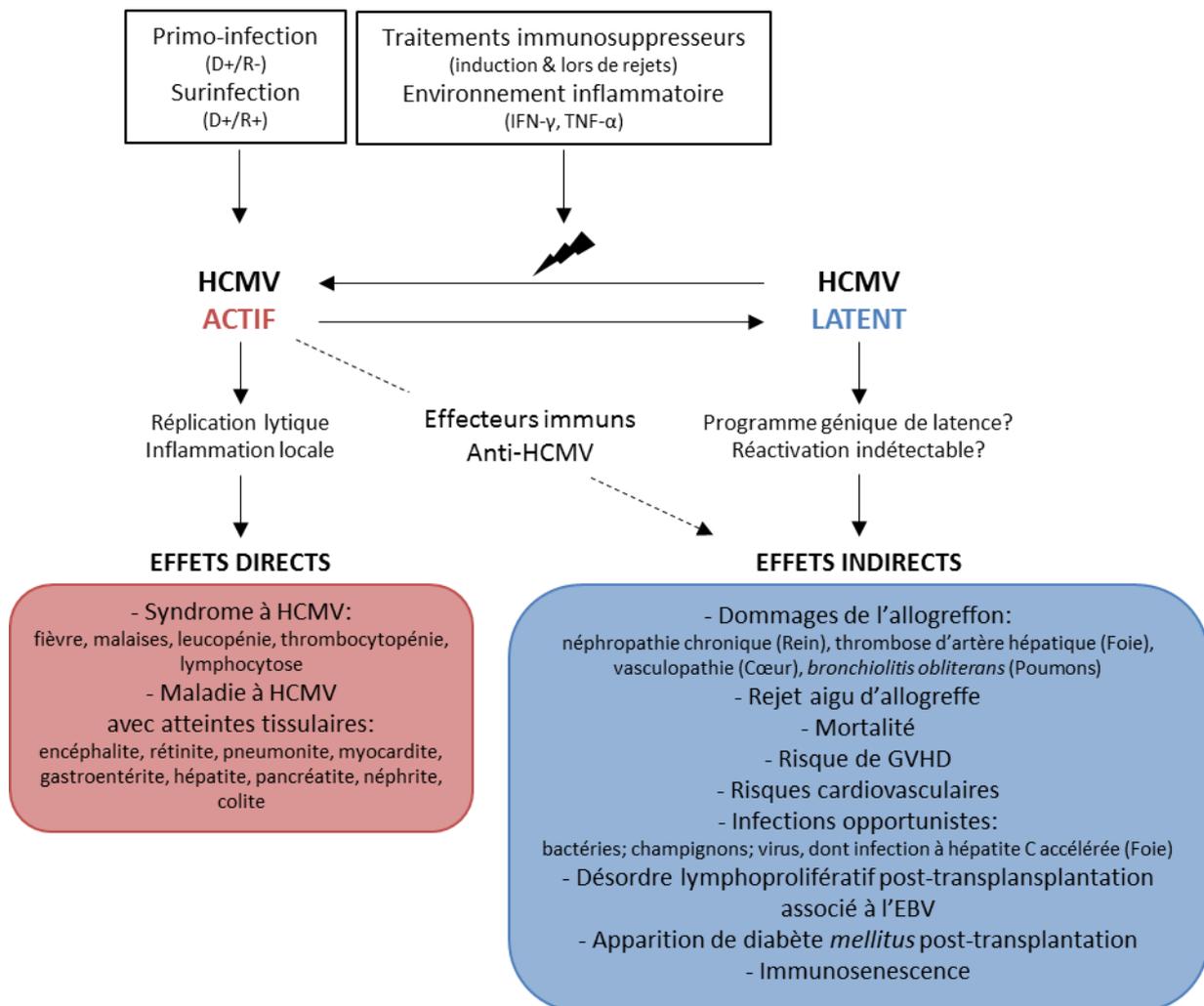


Figure 6 : Complications cliniques directes et indirectes associées au HCMV dans le contexte de la transplantation. La maladie à HCMV se distingue soit en syndrome HCMV, qui se manifeste par la présence d'un ou plusieurs symptômes cliniques, soit en maladie invasive à HCMV, qui se caractérise, en plus du syndrome HCMV, par la dysfonction d'organe associée à la mise en évidence du virus *in situ*. L'infection à HCMV s'accompagne également d'effets indirects généraux ou spécifiques du type d'organe greffé (indiqué entre parenthèses). D'après Boeckh et Geballe 2011; Kotton *et al.* 2013.

Dans le contexte de la transplantation d'organes, l'interface entre le receveur et l'organe du donneur est constituée des cellules endothéliales, cibles majeures du virus *in vivo*. La primo-infection ou la réactivation du HCMV prend surtout place dans les cellules endothéliales allogéniques et conduisent à leur activation, induisant un état inflammatoire locale. Cela est d'autant plus vrai dans les cellules endothéliales dérivées des microvaisseaux, sièges d'infections lytiques à HCMV, au contraire de celles des gros vaisseaux, réservoirs de latence (Fish *et al.* 1998). En effet, les cellules infectées latentes d'origine hématopoïétique sont relativement peu fréquentes dans les greffons et ont une faible durée de vie, et sont en conséquence considérées comme moins

importantes pour la transmission ou la réactivation du HCMV, au contraire des cellules endothéliales vasculaires (Kaminski et Fishman 2016). L'infection des cellules endothéliales et musculaires lisses par le HCMV promeut leur prolifération et l'angiogenèse, mais aussi l'athérosclérose, la sclérose vasculaire post-transplantation et les thromboses responsables de symptômes ischémiques aigus participant aux rejets (Streblow *et al.* 2008; Shimamura et Masako 2013).

Effets indirects

En plus des atteintes cellulaires directes et locales dues à l'infection de l'organe transplanté par le HCMV, l'ensemble des mécanismes de réponse antivirale mis en place peut être à l'origine de dommages et lésions du greffon, regroupés sous le terme d'« effets indirects du HCMV ». Ces réponses sont la conséquence du recrutement actif d'effecteurs immuns des réponses innée et adaptative.

L'activation des cellules endothéliales allogéniques lors de la primo-infection ou la réactivation du HCMV provoque l'augmentation de l'expression membranaire des complexes HLA-I allogéniques/antigènes (Ag) du HCMV, des complexes HLA-I allogéniques/allo-Ag du donneur et des molécules de co-stimulation et d'adhérence, du fait de la sécrétion de molécules pro-inflammatoires : IFN de type I, chimiokines CC (Guetta *et al.* 2001). Divers effecteurs immuns sont alors attirés, recrutés et activés. Parmi eux, les LT du receveur spécifiques du HCMV ou d'allo-Ag du transplant se caractérisent par un profil fonctionnel hautement pro-inflammatoire ainsi que des capacités mémoires à long terme (Sylwester *et al.* 2005; van de Berg *et al.* 2010), promouvant l'activation des réponses cellulaires impliquées dans le rejet et causant des dommages locaux (Bolovan-Fritts *et al.* 2007; Al-Lamki *et al.* 2008; Bolovan-Fritts et Spector 2008; van de Berg *et al.* 2012). En outre, des réactions croisées fonctionnelles de LT dirigés contre des Ag viraux avec des peptides allogéniques ont déjà été décrites (Gamadia *et al.* 2004; Amir *et al.* 2010; Morice *et al.* 2010; Heutinck *et al.* 2016).

De plus, il a été montré que l'infection à HCMV était directement corrélée avec l'apparition d'Ac dirigés contre des Ag du donneur, ou DSA (Donor Specific Antibodies), en plus de la réponse humorale classique anti-HCMV. Ainsi, l'infection à HCMV semble favoriser l'apparition d'Ac polyclonaux dont certains dirigés contre des cellules endothéliales allogéniques (Toyoda *et al.* 1997; Costa *et al.* 2010). Les rejets médiés par la présence de DSA sont la cause la plus courante de perte tardive de greffons rénaux (Sellarés *et al.* 2012), et passent soit par l'activation de la voie classique du complément, soit par des mécanismes d'ADCC (Antibody-Dependant Cellular Cytotoxicity) médiés par les cellules cytotoxiques CD16⁺. À l'appui, une corrélation a été établie entre l'infection à HCMV, la réponse « Natural Killer » (NK), la vasculopathie et les dommages au greffon dans le cadre de rejets de transplants rénaux allogéniques dus à la présence de DSA dans les contextes de mésappariements HLA receveur/donneur (Hidalgo *et al.* 2010; Toyoda *et al.* 2012). De même, il a été montré que les populations T $\gamma\delta^+$ CD16⁺ peuvent lyser *in vitro* des cellules endothéliales ou fibroblastiques opsonisées avec des DSA. En outre, la présence de populations T $\gamma\delta$ infiltrantes a été constatée dans les lésions dues à un rejet humoral aigu et l'augmentation de leur fréquence sanguine est associée à une perte de la fonction rénale à 12 mois chez les patients transplantés rénaux HCMV⁺ DSA⁺ (Bachelet *et al.* 2014).

Suivi clinique des patients transplantés

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

De nombreuses méthodes sont utilisées actuellement en laboratoire et clinique afin de distinguer l'infection active (a-)symptomatique de la maladie à HCMV. La présence du virus est détectée par la quantification significative 1) d'acides nucléiques viraux (ARN ou surtout ADN), 2) d'Ag viraux ou encore 3) d'Ac spécifiques du HCMV, et 4) l'analyse de coupes histologiques de biopsies, dont les avantages et inconvénients sont présentés dans le **Tableau 3**.

Tableau 3 : Techniques cliniques de Suivi & de Diagnostic de l'infection à HCMV.

	Principe	Tissu	Sensibilité	Avantages	Inconvénients	Utilisation	Référence
VIREMIE	Quantification des acides nucléiques - ADN (ARN) - viraux	Plasma, sang total, tissus, LBA, LCR	+++	Distinction état de réplication actif/latent		Diagnostic & suivi (technique de référence)	(Caliendo <i>et al.</i> 2000; Razonable <i>et al.</i> 2002)
ANTIGENEMIE	Semi-quantification de l'antigène viral pp65	PBMC	++		Non utilisable chez les patients leucopéniques ; Fenêtre restreinte dans le temps d'exploitation de l'échantillon	Diagnostic & suivi (peu utilisée)	
SEROLOGIE	Quantification des Ac sériques anti-HCMV	Sang	++	Distinction primo-infecté (IgM) des réactivés (IgG)	Pas de corrélation avec le développement de la maladie à HCMV ; Pas un outil diagnostique de maladie à HCMV	Evaluation des risques en prétransplantation uniquement	(Humar <i>et al.</i> 2005)
HISTOLOGIE	Détection du HCMV <i>in situ</i>	Biopsie de tissu	+	Confirme l'invasion tissulaire	Technique invasive et peu sensible	Suspicion de maladie invasive à HCMV	(Eid <i>et al.</i> 2010)

D'une manière générale, les fortes charges virales sont associées avec la maladie invasive à HCMV, les faibles avec l'infection à HCMV asymptomatique, et les intermédiaires avec un syndrome HCMV, bien que les 3 catégories se chevauchent largement (Humar *et al.* 1999). En ce sens, le taux et la rapidité d'augmentation de la charge virale sont des marqueurs importants de risque de développement de syndrome ou de maladie à HCMV (Humar *et al.* 1999; Emery *et al.* 2000; Emery *et al.* 2002), et sont de bons marqueurs d'intervention dans le suivi des patients transplantés. Récemment un effort d'homogénéisation des rendus de charge virale HCMV a été mis en place avec le développement d'un standard international de quantification OMS (Fryer *et al.* 2016). En revanche,

la détection de la charge virale dans le sang n'est pas toujours performante pour le diagnostic d'une maladie à HCMV. Par exemple, cette technique peut être associée à une charge virale sanguine faible voire indétectable chez certains patients atteints d'une maladie invasive à HCMV dans des cas de rétinite ou de colites, vraisemblablement du fait de la compartimentation de l'infection (Durand *et al.* 2013; Coussement *et al.* 2016).

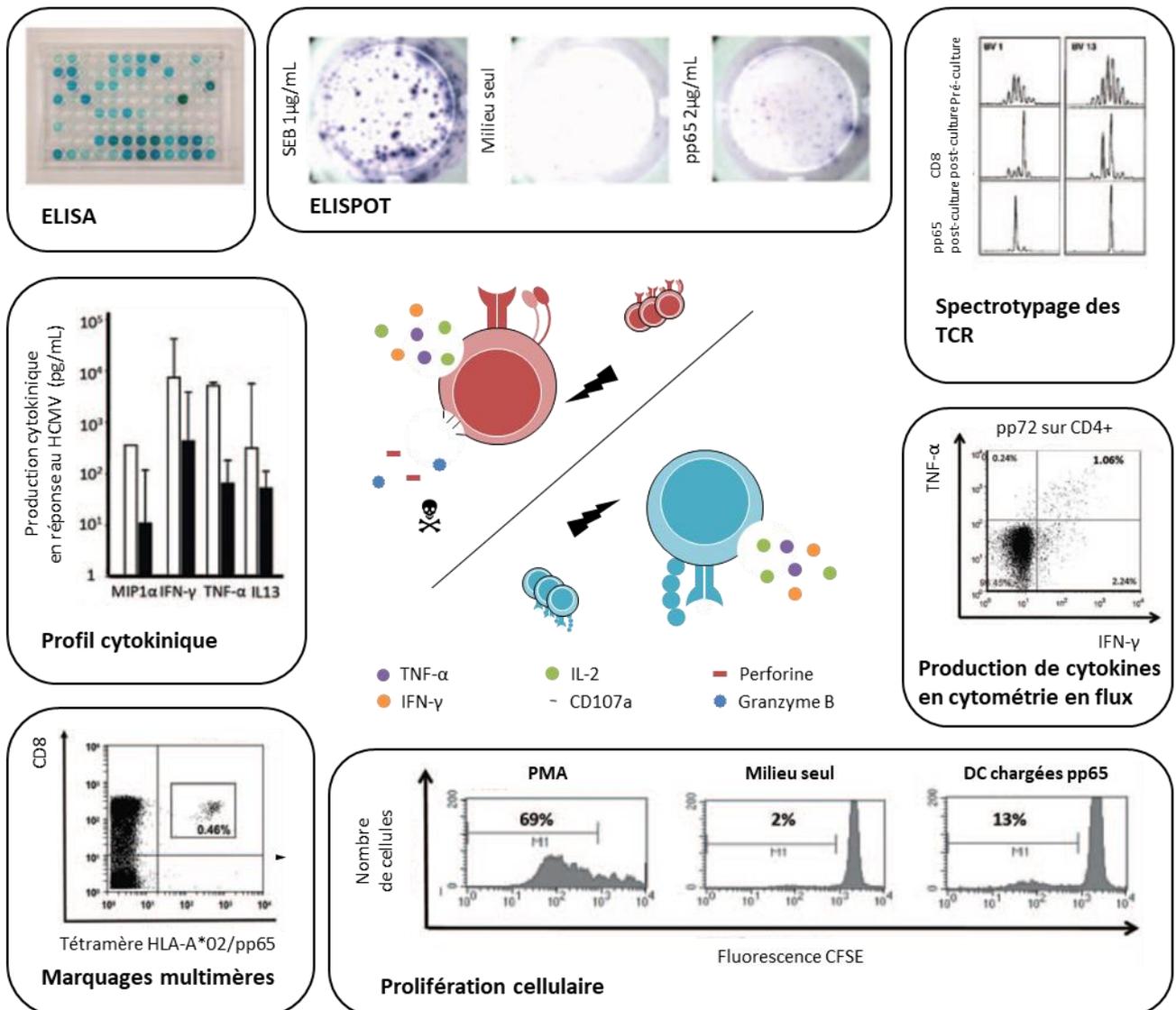


Figure 7 : Méthodes de mesure clinique de la réponse immunitaire T spécifique du HCMV. Les méthodes actuelles de détection des LT spécifiques du HCMV s'appuient sur la mesure de leurs fonctions cytokiniques (IFN-γ, TNF-α, IL-2, par ELISA, ELISPOT, cytométrie en flux), prolifératives (CFSE par cytométrie en flux) et cytotoxique (Perforine, Granzymes, CD107a par cytométrie en flux). Rouge : LT CD8⁺ ; Bleu : LT CD4⁺. D'après Egli *et al.* 2012.

Bien que le statut sérologique des couples receveur/donneur déterminé avant la transplantation est usuellement utilisé pour la prise de décision concernant les stratégies optimales de prévention post-transplantation, la

séroconversion suite à l'acte chirurgicale n'est pas un marqueur prédictif fiable de la maladie à HCMV (Humar *et al.* 2005). Il est à présent clair que l'immunité T spécifique du HCMV joue un rôle critique dans la lutte contre le développement et la sévérité de la maladie à HCMV (voir Partie 3 de cette introduction). Ainsi, l'analyse de la fréquence et/ou la fonction des LT dirigés contre le HCMV peut potentiellement permettre la quantification directe de l'habilité du patient à contrôler le virus. De nombreux tests permettent de mesurer les réponses cellulaires spécifiques du HCMV, *ex vivo* ou *in vitro* après stimulation (**Figure 7**). La majorité de ces tests sont actuellement en cours de développement pour un usage clinique, et ne sont à ce jour pas utilisés en routine. L'absence de fixation d'un seuil positif valide et standardisé en est la cause principale. Malgré tout, le suivi immunologique vient de plus en plus compléter les mesures de charge virale sanguine, et prend de plus en plus d'ampleur en tant que moyen de prédiction de risque de virémie et de maladie à HCMV (Egli *et al.* 2012).

Prise en charge clinique

Stratégies préventives

Afin de limiter les effets nocifs et délétères induits par la maladie à HCMV dans le contexte de la transplantation, des approches de prévention ont été développées et varient selon le type d'organe transplanté et le risque propre à chaque patient (Kotton *et al.* 2013). Elles sont regroupées en 2 catégories majeures : la prophylaxie antivirale universelle et les traitements préemptifs (**Figure 8**).

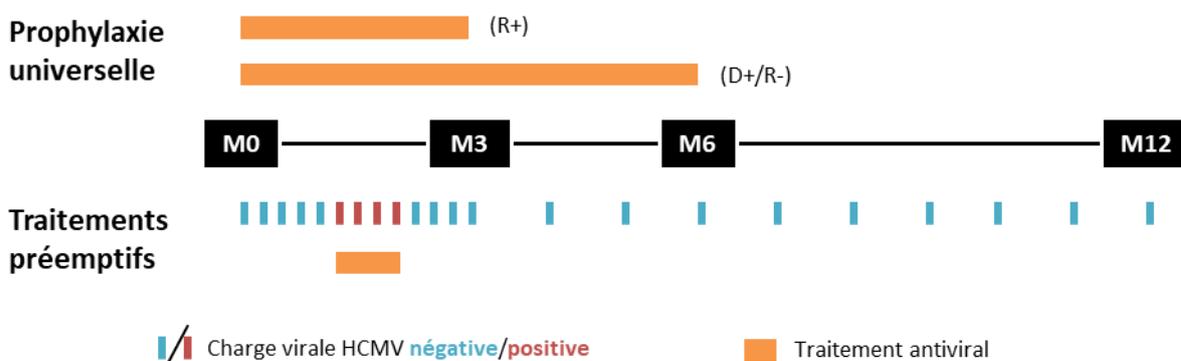


Figure 8 : Stratégies de prévention de développement de la maladie à HCMV. La prophylaxie antivirale consiste en l'administration systématique de traitements antiviraux, à tous les patients « à risque » pendant

une période allant de 3 (D⁺/R⁺ ; D⁻/R⁺) à 6 mois (D⁺/R⁻) post-transplantation. Les traitements préemptifs concernent quant à eux uniquement les patients asymptomatiques qui vont expérimenter une répllication active à HCMV durant les mois post-transplantation, et à qui des traitements antiviraux sont administrés dans le but d'éviter la maladie à HCMV. D'après Humar *et al.* 2010 (a); Kotton *et al.* 2013.

Bien que les thérapies préemptives soient associées en théorie avec de plus faibles coûts en terme de médicaments ou des effets toxiques secondaires moindres par rapport à l'approche prophylactique, leur mise en place impose de multiples contraintes : suivi régulier et constant des patients, augmentation des coûts de dépistage et de la coordination de la logistique interne au laboratoire (**Tableau 4**) (Pang *et al.* 2009; Hayden *et al.* 2012).

Tableau 4 : Comparaison des bénéfices et limitations connus de la prophylaxie universelle versus la prise de traitements préemptifs. D'après Kotton *et al.* 2013.

Effet	Prophylaxie universelle	Traitement préemptif
Détection précoce de charge virale (ADnémie)	Rare (peu effectuée)	Fréquente (couramment effectuée)
Prévention de la maladie à HCMV		Oui
Déclenchement de maladie à HCMV tardive	Fréquente	Rare
Émergence de résistance	Peu fréquente	Peu fréquente (mais plus qu'en prophylaxie)
Prévention des autres infections virales (HSV, VZV)	Oui	Non
Protection contre les infections opportunistes	Bonne efficacité	Pas efficace
Augmentation de la survie du greffon		Oui
Prévention du rejet	Oui	?
Survie du patient améliorée		Oui
Tolérance	Effets secondaires	Peu/Pas de toxicité
Logistique faible	Oui	Non
Optimisation des coûts		
- des traitements	Non	Oui
- du suivi médical	Oui	Non

Des méta-analyses ont démontré que la prophylaxie a quant à elle l'avantage de prévenir la réactivation d'autres virus de l'herpès, et a été associée avec une moindre incidence des effets indirects liés au HCMV (Kalil *et al.* 2005; Small *et al.* 2006). Ainsi, elle est associée avec de plus faibles taux de perte de l'allogreffe et d'infections opportunistes, ainsi qu'à une augmentation

de la survie à long-terme du greffon et du receveur sous traitements immunosuppresseurs (Small *et al.* 2006). Cependant, elle est également associée avec des maladies à HCMV retardées, en particulier chez les patients D⁺/R⁻ (Razonable *et al.* 2001; Paya *et al.* 2004; Humar *et al.* 2010 (b)). Des études cliniques dans le contexte de la transplantation rénale ont permis de comparer directement les 2 méthodes, et de démontrer que bien qu'elles soient toutes deux aussi efficaces dans la prévention de la maladie à HCMV, la survie à long-terme du transplant est plus longue chez les patients recevant une prophylaxie antivirale (Kliem *et al.* 2008; Reischig *et al.* 2008). Dans les 2 cas, le risque de rechute dans la maladie à HCMV est plus faible chez les patients ayant des taux indétectables du virus à la fin de la thérapie antivirale (Sia *et al.* 2000; Humar *et al.* 2002; Åsberg *et al.* 2009). Au final, la prophylaxie universelle est majoritairement utilisée par rapport aux traitements préemptifs.

Traitements curatifs

Les traitements employés pour empêcher et/ou lutter contre les infections virales utilisent des molécules chimiques, inhibant à faible dose spécifiquement les ADN polymérases virales issues des virus de l'herpès HSV-1 et HSV-2, du VZV, de l'EBV et surtout du HCMV. Des analogues de la guanosine, le Ganciclovir et sa pro-forme active le Valganciclovir, sont les traitements de première intention contre l'infection à HCMV en préventif et curatif. Le Valacyclovir est à présent peu utilisé. Des analogues du pyrophosphate (le Foscarnet) de la cytosine (le Cidofovir) sont exclusivement employés en alternatives thérapeutiques de deuxième et troisième intentions dans le cadre du traitement de la maladie à HCMV déclarée avec cas de résistance du virus aux traitements de première ligne. Les mécanismes d'actions de ces médicaments sont présentés sur la **Figure 9**.

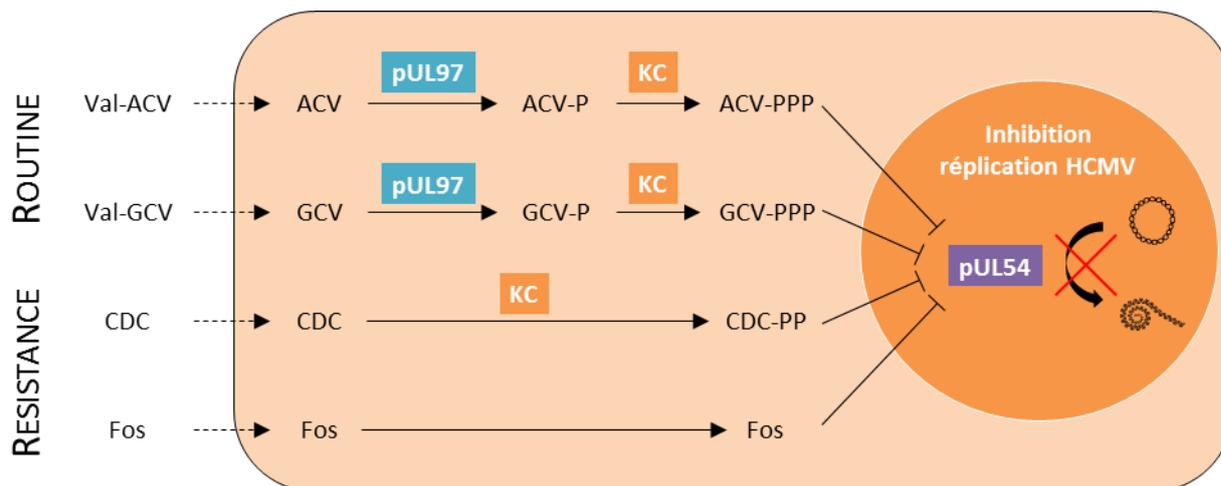


Figure 9 : Mécanismes et conditions d'utilisation des traitements cliniques anti-HCMV. À l'exception du Foscarnet, le mécanisme d'action de ces médicaments est globalement similaire. L'analogue nucléotidique est internalisé dans les cellules de l'organisme et acheminé jusqu'au noyau. La kinase virale pUL97 phosphoryle cet analogue nucléotidique, puis les kinases cellulaires le transforment sous forme active en analogue nucléotidique tri-phosphorylé. Il est alors reconnu et employé par pUL54, l'ADN polymérase du HCMV, lors du processus de répllication de l'ADN viral, où il va alors agir en tant qu'inhibiteur compétitif avec les autres nucléotides triphosphates et en tant qu'agent dépourvu de résidu ribosidique carboné 3' et stoppant en conséquence la synthèse du brin d'ADN viral. Le mécanisme d'action du Foscarnet est d'inhiber spécifiquement le site de liaison du pyrophosphate sur pUL54, conduisant à l'arrêt de la répllication virale. Abréviations : ACV : Acyclovir ; CDC : Cidofovir ; Fos : Foscarnet ; GCV : Ganciclovir ; KC : Kinases Cellulaires ; Val-ACV : Valacyclovir ; Val-GCV : Valganciclovir. Adapté de Lurain et Chou 2010.

De tous ces médicaments, le Valganciclovir est le plus couramment utilisé dans la lutte contre le HCMV (Kotton *et al.* 2013). Généralement préféré à son principe actif seul, le Ganciclovir, il se caractérise par une biodisponibilité augmentée, une meilleure compliance des patients, du fait des plus faibles doses journalières, tout en ayant la même capacité à empêcher après 3 mois de prophylaxie le développement et/ou la progression de la maladie à HCMV jusqu'à l'absence de détection de la charge virale sanguine chez des patients transplantés rénaux, hépatiques, pancréatiques et cardiaques (Paya *et al.* 2004; Åsberg *et al.* 2007; Levitsky *et al.* 2008). L'efficacité du Valganciclovir par voie orale pour le traitement de l'infection à HCMV est comparable à celle du Ganciclovir intraveineux (Åsberg *et al.* 2007; Åsberg *et al.* 2016). Le médicament est également employé en combinaison avec l'administration d'Ac anti-lymphocytes pour l'induction de l'immunosuppression et le traitement de rejets, et est associé dans ces contextes avec une plus faible incidence de maladie à HCMV chez les transplantés rénaux (Conti *et al.* 1995; Hibberd *et al.* 1995). De plus, une durée de prophylaxie prolongée chez les patients les plus à risque (D⁺/R⁻) permet de diminuer l'incidence des infections et maladies à HCMV

chez ces patients (Humar *et al.* 2010 (b); Palmer *et al.* 2010; Copeland *et al.* 2011). Cependant, une utilisation trop prolongée a également été associée avec une myélotoxicité entraînant une leucopénie (Wiita *et al.* 2012).

Des mutants HCMV résistants peuvent être sélectionnés en cas de virémie sanguine forte et/ou persistante lors de l'emploi de traitements antiviraux prolongés, d'autant plus si les doses utilisées sont suboptimales et le patient très fortement immunodéprimé. Elles apparaissent plus fréquemment chez des patients D⁺/R⁻ et/ou dans le contexte de la transplantation pulmonaire (Kotton *et al.* 2013). L'incidence d'apparition de ces souches demeure néanmoins faible (inférieure à 2 et 3%, respectivement) chez les patients transplantés, quelle que soit la nature de la stratégie de prévention anti-HCMV employée (Boivin *et al.* 2004; Myhre *et al.* 2011). Les mutations les plus fréquentes sont celles sur le gène *UL97* (>70% des cas de résistance), qui peuvent impacter la sensibilité au (Val-)ganciclovir (El Chaer *et al.* 2016). En fonction de leur position, les mutations dans le gène *UL54* peuvent entraîner une résistance au Foscarnet seul, au (Val-)ganciclovir/Cidofovir, ou des résistances à toutes les molécules (Lurain et Chou 2010). Dans cette situation, les thérapies actuelles demeurent limitées. Du fait du faible nombre de molécules antivirales, la diminution contrôlée du traitement immunosuppresseur est une option envisageable. L'emploi alternatif d'inhibiteurs de mTOR (analogues de la rapamycine : sirolimus, évérolimus) en lieu et place de l'azathioprine ou le mycophénolate mofetil est associé avec une moindre incidence de la maladie à HCMV sur le long terme chez les patients transplantés (Brennan *et al.* 2011; Eisen *et al.* 2013). Cependant, l'utilisation du Foscarnet reste la première ligne de traitement dans la majorité des cas d'apparition de souches résistantes au Ganciclovir (Lurain et Chou 2010). Le Cidofovir constitue la dernière ligne de traitement en cas de résistance des souches au Ganciclovir et au Foscarnet du fait de sa haute toxicité rénale et de sa pauvre biodisponibilité par voie orale (Komatsu *et al.* 2014).

Développement de traitements alternatifs

Les thérapies antivirales à base de produits de synthèse chimique ont constitué une avancée majeure dans la gestion du HCMV dans les contextes d'immunosuppression. Cependant les méthodes préventives et curatives de la

maladie à HCMV ont pour faiblesse de cibler une unique protéine virale (pUL54) et favorisent l'émergence de souches HCMV résistantes aux traitements antiviraux actuels par mutations de 2 gènes de résistance (*UL97* et *UL54*) (Eid *et al.* 2008; Lurain et Chou 2010). De plus, la biodisponibilité relative, voire médiocre, les effets secondaires toxiques non négligeables (leuco- et neutropénie, neuro- et néphrotoxicité, troubles digestifs) et l'anticipation de risques potentiels carcino- et tératogénique conduisent à la recherche de traitements alternatifs.

Molécules chimiques

Plusieurs molécules sont actuellement en cours de développement. Le Letermovir inhibe la réplication virale du HCMV en ciblant pUL56, responsable du clivage des concatémères d'ADN et de l'étape d'injection du génome dans la capsid (Goldner *et al.* 2011; Marschall *et al.* 2012). Il a été utilisé avec succès chez un patient transplanté pulmonaire résistant aux Ganciclovir, Foscarnet et Cidofovir (Kaul *et al.* 2011), et dans deux cohortes de patients transplantés rénaux (Stoelben *et al.* 2014) ou greffés avec des CSH (Chemaly *et al.* 2014). L'emploi d'une formulation orale du Cidofovir permet la diminution de l'incidence d'infection à HCMV dans le contexte de la greffe de CSH, bien que son emploi soit accompagné d'effets secondaires importants (Marty *et al.* 2013). Le Cyclopropavir, un inhibiteur de l'ADN polymérase virale avec une activité anti-HCMV, est actuellement mis au point *in vitro* (Chou *et al.* 2012).

Immunothérapies

L'immunisation passive par administration d'IgG neutralisantes anti-HCMV en complément d'une prophylaxie virostatique a été employée avec succès dans la transplantation d'organes solides chez des patients D⁺/R⁻ (Rea *et al.* 2016). Une méta-analyse de plusieurs études suggère que la prise concomitante de prophylaxie antivirale et d'Ac anti-HCMV devrait réduire les risques de développement de maladie à HCMV, de lésions du transplant, de rejets aigus et chroniques, ainsi que la mortalité du patient, bien que cela ne soit pas mis en pratique courante de nos jours (Bonaros *et al.* 2008). Récemment deux Ac

monoclonaux neutralisants ciblant les complexes d'attachement gH/gL ou gH/gL/UL128/UL130/UL131A ont été employés dans la prévention de l'infection à HCMV chez des patients transplantés rénaux à haut risque (D⁺/R⁻) et sont associés avec une diminution de l'incidence de l'infection et la maladie à HCMV à 6 mois (Ishida *et al.* 2015, 2017).

Une stratégie dans le contexte de la transplantation d'organe consiste à isoler et amplifier *in vitro* des LT anti-HCMV à partir du sang périphérique du receveur, puis à les lui réinjecter afin de lutter contre l'infection en particulier en cas de résistance au Ganciclovir. Jusqu'ici, ces essais de transfert adoptif de LT ont résulté en une reconstitution à long-terme de l'immunité protectrice anti-HCMV, une absence de réactivation virale et d'émergence de maladie à HCMV, ainsi que celle d'épisodes de rejets de l'allogreffe chez deux patients transplantés, l'un rénal (Macesic *et al.* 2015) et l'autre pulmonaire (Holmes-Liew *et al.* 2015).

À ce jour, il n'existe pas de vaccins contre le HCMV sur le marché. Les multiples pistes de développement de vaccins cliniques contre le HCMV sont présentées dans le **Tableau 5**. Elles se regroupent en 2 catégories majeures ; l'emploi de virus atténués défectueux pour la réplication, ou encore de particules virales non infectieuses, a pour but la mise en place d'une réponse immune large et complète comparable à celle obtenue en cas d'infection naturelle, tandis que l'utilisation d'approches géniques ou de protéines recombinantes a pour objectif d'induire une réponse, certes plus restreinte car dirigée contre quelques Ag uniquement, mais aussi potentiellement plus amplifiée que la réponse immune naturelle et ce, dans un contexte de développement et de fabrication plus sécurisé et maîtrisé.

Tableau 5 : Vaccins expérimentaux anti-HCMV. D'après Luisi *et al.* 2017.

Type	Composants	Phase	Résultats majeurs	Références
DERIVE VIRAL	Virus chimérique Towne/Toledo	I	Cohorte d'hommes HCMV ⁻ (n=9) : vaccin toléré ; non excrété dans les urines ou salives ; 78% de séroconversion ; faible taux d'Ac neutralisants ; réponses T CD8 ⁺ anti-IE72 ; peu de réponses T CD4 ⁺	(Adler <i>et al.</i> 2016)
	V160 (Souche virale AD169 restaurée pour l'expression du pentamère)	Pré clinique	Modèle simien : vaccin toléré ; pas de virémie ; pas de sécrétion en culture par les cellules infectées ; Ac neutralisants anti-gB ; réponses T CD8 ⁺ et CD4 ⁺ anti-pp65, IE72 et IE83	(Wang <i>et al.</i> 2016)
	Corps denses	Pré clinique	Modèle murin : Ac neutralisants anti-gB ; réponse T anti-pp65, gB et pUL48	(Cayatte <i>et al.</i> 2013; Schneider-Ohrum <i>et al.</i> 2016)
SOUS-UNITE RECOMBINANTE	gB soluble/MF59	II	Cohorte de femmes HCMV ⁻ (n=234) : réduit l'infection chez les femmes HCMV ⁻ de 50% ; protection confirmée durant 42 mois	(Pass <i>et al.</i> 2009; Griffiths <i>et al.</i> 2011; Sabbaj <i>et al.</i> 2011)
			Cohorte de patients transplantés rénaux ou hépatiques (n=67) : Ac anti-gB chez les individus HCMV ⁻ et HCMV ⁺ vaccinés ; réduction des durées de virémie et de traitement au Ganciclovir chez les sujets vaccinés ; taux d'Ac anti-gB inversement corrélé avec la durée de la virémie chez les sujets vaccinés	
	Pentamère	Pré clinique	Cohorte de femmes HCMV ⁺ (n=120) ; Augmente le titre Ac anti-gB ; Augmente la réponse T CD4 ⁺ chez les femmes HCMV ⁺ Production en cellules CHO de pentamère purifié reconnu par les Ac sériques anti-HCMV de 76% des individus HCMV ⁺	(Loughney <i>et al.</i> 2015; Hofmann <i>et al.</i> 2015)
GENE	gB ou pp65/IE72 (alphavirus VRP)	I	Cohorte d'individus HCMV ⁻ (n=37) ; vaccin toléré ; réponses T CD4 ⁺ et CD8 ⁺ anti-pp65, IE72 et gB ; titre d'Ac neutralisants plus faible que chez les individus HCMV ⁺	(Bernstein <i>et al.</i> 2009)
	Plasmide codant gB/pp65 (DNA TransVax)	II	Cohorte de patients greffés CSH (n=80) ; vaccin toléré ; faible induction d'Ac anti gB ; réponses T anti-gB et pp65 ; réduction de l'occurrence et récurrence de la virémie	(Kharfan-Dabaja <i>et al.</i> 2012)
	gH/gL (alphavirus VRP) & Pentamère (alphavirus VRP)	Pré clinique	Modèle murin : Ac neutralisants anti-gH, anti-gL et anti-gH/gL ; bloque entrée dans fibroblastes et cellules épithéliales Modèle murin : Ac neutralisants anti-pentamère et anti-gB si adjuvant MF59 ; plus efficace que vaccin gH/gL (alphavirus VRP) ; bloque entrée dans fibroblastes et cellules épithéliales	(Loomis <i>et al.</i> 2013; Wen <i>et al.</i> 2014)
	Pentamère (vecteur MVA)	Pré clinique	Modèle murin et simien : taux d'Ac neutralisants anti-pentamère comparables à l'infection naturelle ; inhibe l'entrée du virus dans fibroblastes et cellules endothéliales	(Wussow <i>et al.</i> 2014)

PARTIE 3 : LA REPONSE IMMUNE SPECIFIQUE DU HCMV

De nombreux modèles animaux ont été étudiés afin d'évaluer et comprendre l'implication du système immunitaire dans la gestion des virus orthologues du HCMV: souris, rats, macaque rhésus *etc.* ... Une certaine conservation des conditions de stimulation du système immunitaire par le CMV dans ces modèles de laboratoire a été mise en évidence ; cependant, l'hétérogénéité génétique entre les différentes espèces et souches de CMV pose une limite de transposition des résultats chez l'Homme. En effet, moins de 50% des ORFs du HCMV ont des homologues identifiables dans le MCMV, et au sein de la population humaine, il a été observé par comparaison du génome de multiples souches IC une hétérogénéité génétique du HCMV, témoin de la pression de sélection du système immunitaire propre à chaque individu exercée sur le HCMV ayant pour finalité la tolérance par chaque hôte (Loewendorf et Benedict 2010). C'est pourquoi la partie suivante ne traitera que des réponses immunes chez l'Homme.

Le système immunitaire emploie, pour assurer la défense de l'organisme contre l'infection à HCMV, des effecteurs immuns multiples, qui se sont diversifiés au cours de l'évolution en parallèle de la mise en place des stratégies d'échappement du HCMV au contrôle immunologique. Le schéma général de mise en place de la réponse immune spécifique du HCMV est illustré sur la **Figure 10**.

Importance des différents éléments de la réponse immune anti-HCMV

Laissant une empreinte caractéristique sur le répertoire immunitaire, le HCMV induit la forte mobilisation et réorganisation de différents effecteurs issus de la réponse immunitaire (NK, LT *etc.*). Cependant, la place, le rôle et l'importance de chacun des effecteurs immuns impliqués dans la protection contre l'infection demeure difficile à évaluer dans les études chez l'Homme. De nombreux contextes pathologiques de déficience partielle innée ou acquise du système immunitaire, ou de thérapie cellulaire par transfert de cellules spécifiques du HCMV dans des contextes de greffe/transplantation, ont permis de mettre en avant l'importance de multiples intervenants de la réponse immune dans la protection contre l'infection à HCMV.

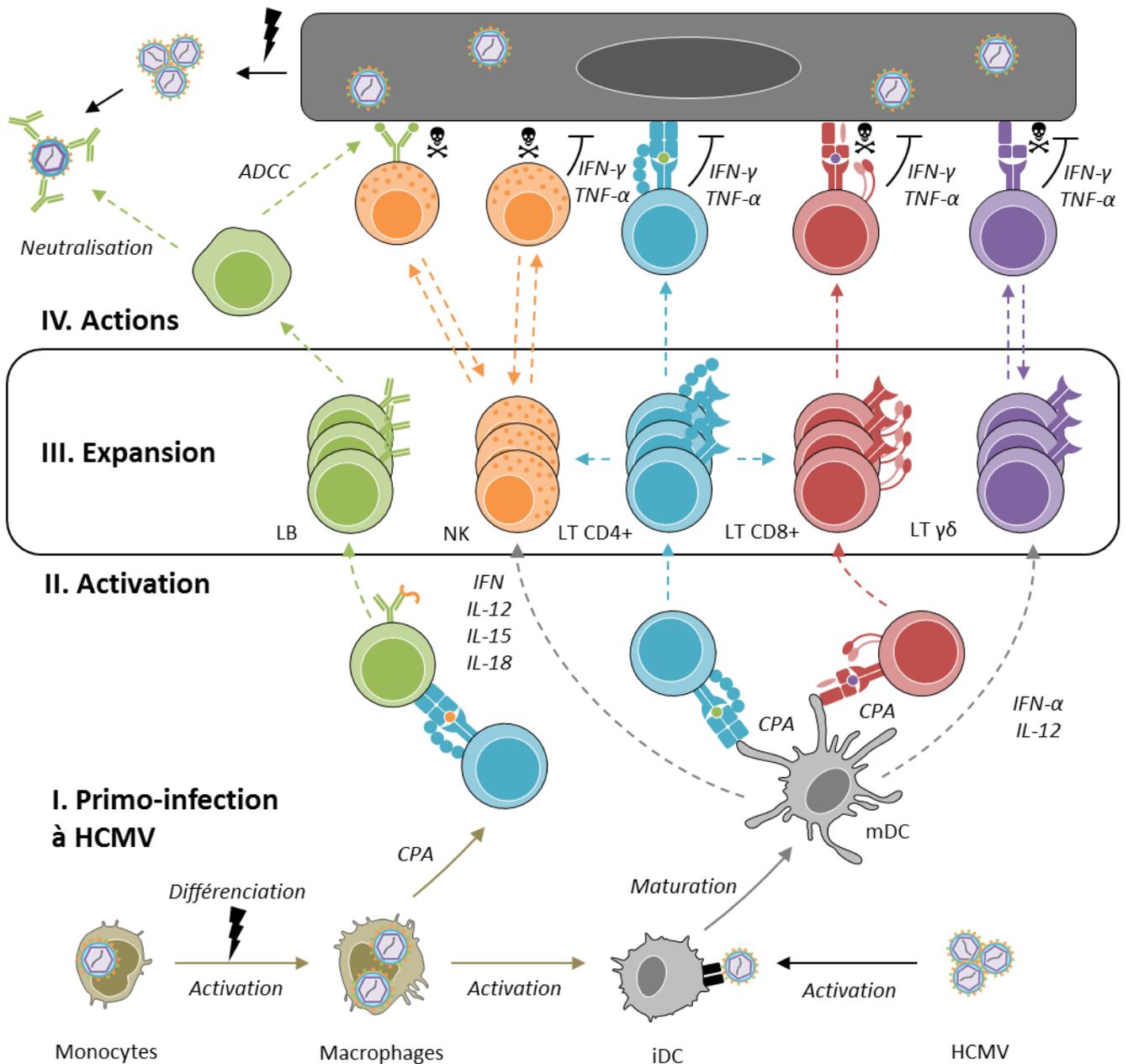


Figure 10 : Schéma global de la mise en place des différents effecteurs de la réponse immunitaire spécifique du HCMV. Suite à la primo-infection à HCMV ou la réactivation (I), les macrophages et les DC sont activés via leur TLR (2 notamment) suite à la reconnaissance de PAMP issus du HCMV. Ils vont alors sécréter des cytokines pro-inflammatoires qui vont induire l'activation des cellules NK et LT à TCR γδ (II). La reconnaissance directe des cellules infectées par le HCMV exprimant HLA-E et/ou des ligands de stress stimulent respectivement les cellules NK et LT γδ. L'activation des iDC conduit à leur différenciation en mDC et migration dans les OLS. La présentation d'épitopes viraux dans des contextes HLA-I et -II aux LT naïfs à TCR αβ CD8⁺ et à TCR αβ CD4⁺ respectivement induit leur activation. La capture et la présentation d'Ag du HCMV par les LB aux LT αβ CD4⁺ permettent leur co-activation. Cela mène à l'expansion (III) des cellules NK CD94/NKG2C⁺, des LT γδ Vδ2 négatives TEMRA, des LT αβ CD8⁺ TEM/TEMRA, des LT αβ TEM/TEMRA CD4⁺ et des LB, qui vont persister à long-terme sous la forme d'un compartiment mémoire. Suite à leur activation, les fonctions effectrices des éléments immuns de la réponse immunitaire anti-HCMV se mettent en place (IV). Les cellules NK, T αβ CD8⁺ et T γδ peuvent lyser et éliminer les cellules infectées par le HCMV. Elles peuvent également contrôler la réplication du HCMV par la sécrétion de cytokines anti-virales (IFN-γ, TNF-α), tout comme les LT αβ CD4⁺. Les LB se différencient en plasmocytes, qui vont sécréter des Ac spécifiques du HCMV. Ces Ac ont pour fonctions soit de lier des éléments de l'enveloppe virale et neutraliser la dissémination du virus au sein de l'organisme, soit d'opsoniser les cellules infectées et favoriser leur élimination par ADCC via des cellules effectrices NK CD16⁺. Adapté de Khairallah *et al.* 2017. Abréviations : ADCC : Antibody-Dependant Cellular Cytotoxicity ;

CPA : Cellules Présentatrices d'Ag ; iDC : Cellules Dendritiques Immatures ; mDC : Cellules Dendritiques Matures ; IFN : Interféron ; IL : Interleukine ; NKG2 : Natural Killer Group 2 ; PAMP : Pathogen-Associated Molecular Patterns ; TCR : T-Cell Receptor ; TLR : Toll-Like Receptors ; TNF- α : Tumor Necrosis Factor-alpha.

Les patients ayant une déficience sélective dans la mise en place de la réponse NK présentent une sensibilité récurrente aux infections par les herpesvirus, dont le HCMV (Biron *et al.* 1989). Les lymphocytes NK constituent le 1^{er} compartiment immun restauré chez des patients greffés avec des CSH, et leur présence est par la suite corrélée avec la protection contre l'infection à HCMV des receveurs (Quinnan *et al.* 1982). Dans le contexte de la greffe/transplantation, les receveurs ont une plus grande incidence d'infection et de maladie à HCMV s'ils échouent à générer à un taux suffisant une réponse T spécifique du HCMV CD8⁺ (Reusser *et al.* 1991) ou CD4⁺ (Sester *et al.* 2001; Sester *et al.* 2005). À l'inverse, ceux ayant une immunité T CD4⁺ et/ou CD8⁺ en quantité suffisante sont protégés de la réplication active du HCMV et de la progression vers la maladie (Bunde *et al.* 2005; Egli *et al.* 2008). De plus, une reconstitution précoce (dans le 1^{er} mois) du répertoire T anti-HCMV après la transplantation est préférentiellement associée avec une virémie asymptomatique ou une maladie peu sévère par rapport à une reconstitution retardée (Gerna *et al.* 2006; Chiereghin *et al.* 2010). Après 6 mois, les patients ayant une réponse T CD4⁺ anti-HCMV importante ne développent pas de symptômes HCMV (Chiereghin *et al.* 2010).

Le transfert adoptif de populations clonales T CD4⁺ et T CD8⁺ effecteurs-mémoires spécifiques du HCMV, préalablement amplifiées *in vitro* grâce à une stimulation par des DC autologues chargées avec des antigènes du HCMV, rétablit l'immunité adaptative antivirale chez des patients greffés de CSH (Riddell *et al.* 1992; Walter *et al.* 1995; Einsele *et al.* 2002; Peggs *et al.* 2003, 2009; Feuchtinger *et al.* 2010; Peggs *et al.* 2011; Blyth *et al.* 2013) et des receveurs de greffe d'organe (Holmes-Liew *et al.* 2015; Macesic *et al.* 2015). De plus, il s'ensuit une instauration et une expansion persistante de cellules T CD4⁺ et CD8⁺, corrélées avec la diminution jusqu'à disparition de la virémie sanguine (Peggs *et al.* 2009). Chez des enfants, la greffe de CSH HLA-haploidentiques déplétées des LB CD19⁺ et des LT $\alpha\beta$ ⁺ permet la mise en place rapide de populations LT $\gamma\delta$ V δ 1⁺ centrale-mémoires protectrices dans le contexte de réactivation du HCMV (Airoldi *et al.* 2015), avant la mise en place de la réponse T $\alpha\beta$ conventionnelle (Park *et al.* 2017).

Acteurs principaux de la réponse immune dirigée contre le HCMV

Réponse humorale

Fréquence et spécificité

L'infection à HCMV induit le développement d'une réponse humorale spécifique chez en moyenne 48,5% des individus sains séropositifs (n=569) (Xu *et al.* 2015). Les Ac anti-HCMV sont majoritairement dirigés contre des éléments de l'enveloppe virale, gB ou le complexe pentamérique gH/gL/UL128/UL130/UL131, ainsi que certains éléments du tégument (pp65, pp150) ou autres (IE72). La spécificité du répertoire B semble se diversifier avec l'âge ; en effet, l'intégralité des individus séropositifs âgés de plus de 10 ans développent des Ac antiviraux dirigés contre plus de 10 épitopes différents du HCMV contre seulement 25% des individus séropositifs âgés de moins de 10 ans (Xu *et al.* 2015). Plus de 30% des individus séropositifs reconnaissent 19 épitopes uniques provenant du HCMV (Xu *et al.* 2015). Un répertoire B « public » semble exister, étant donné que 90% des individus séropositifs pour le HCMV possèdent une réponse dirigée contre un épitope issu de la glycoprotéine d'enveloppe gM (Xu *et al.* 2015). En outre, plus de 85% des Ac neutralisants générés durant l'infection à HCMV sont dirigés contre le complexe pentamérique (Fouts *et al.* 2012; Freed *et al.* 2013).

Rôle

Les Ac anti-HCMV sont impliqués dans la neutralisation des particules virales dans le milieu extracellulaire, ainsi que dans le ciblage des virions libres et des cellules infectées par les cellules effectrices du système immunitaire exprimant CD16. Le complément semble en outre avoir également un rôle dans la gestion du HCMV via les Ac.

La majorité des Ac neutralisants anti-HCMV sont dirigés contre le complexe gH/gL/UL128/UL130/UL131A, et une moindre fraction contre gB ou les complexes gH/gL. Ils empêchent l'attachement - et en conséquence l'entrée - du HCMV dans leur cellule-hôte *in vitro* (Macagno *et al.* 2010; Fouts *et al.* 2012). Les Ac neutralisants dirigés contre le pentamère empêchent l'entrée du virus

dans les cellules épithéliales et la dissémination des particules virales dans l'environnement, au contraire des Ac anti-gB, gH, ou gH/gL (Cui *et al.* 2017). En revanche, aucun Ac neutralisant ne semble empêcher la dissémination virale au sein de fibroblastes *in vitro*, alors qu'ils bloquent l'entrée du virus dans ces cellules, mettant en avant des mécanismes de transmission directe et spécifique de cellule à cellule (Jacob *et al.* 2013; Cui *et al.* 2017). En ce sens, les Ac neutralisants présents dans le sérum d'individus HCMV⁺ ciblent majoritairement les complexes pentamériques et bloquent l'infection et la dissémination du HCMV de 8 à 15 fois plus que dans les fibroblastes (Wang *et al.* 2011). La cinétique d'apparition des Ac neutralisants dans le sérum semble fonction de leur spécificité. En effet, suite à la primo-infection, des Ac sériques anti-HCMV capables de bloquer l'infection et la dissémination virale des cellules endothéliales ou épithéliales apparaissent rapidement dans les 2 premiers mois, au contraire de ceux capables de neutraliser la dissémination au sein d'une culture de fibroblastes, détectés entre 2 et 12 mois post-infection (Gerna *et al.* 2008). Au final, la présence d'Ac maternels spécifiques du pentamère corrèle avec la réduction de la transmission congénitale du HCMV au fœtus chez les femmes enceintes (Lilleri *et al.* 2013).

Les données concernant le rôle du complément dans le contrôle de l'infection à HCMV sont peu nombreuses. Néanmoins, il a été montré que les protéines du complément sont impliquées dans le contrôle de l'infection à HCMV chez les patients ayant développés des Ac neutralisants circulants anti-HCMV (Ohta *et al.* 2009). De plus, un taux sérique faible du composant C3 du système du complément constitue un facteur de risque à une infection à HCMV chez des patients transplantés cardiaques (Sarmiento *et al.* 2014). Le polymorphisme de MBL (Mannose-Binding Lectin) – protéine capable d'enclencher l'activation du système du complément par la voie des lectines - a été associé avec un plus haut risque de développement d'infection à HCMV dans le contexte de la transplantation d'organe solide (Cervera *et al.* 2009). Une plus haute fréquence de réactivation du HCMV est observée chez des receveurs de transplants pulmonaires déficients en MBL sériques (Kwakkel-van Erp *et al.* 2011). En ce sens, dans une cohorte issue de la population à risque de transplantés rénaux D⁺/R⁻ (n=16), 4 patients sur 4 infectés de manière asymptomatique et 5 patients sur 7 ayant subi une maladie à HCMV ont une déficience sérique en MBL, contre aucun parmi les 5 patients sans signe d'infection (Manuel *et al.*

2007). De même, une faible concentration en MBL et la présence de génotypes produisant de la MBL en faible ou moyenne quantité sont des facteurs de risque de développement de l'infection à HCMV chez des receveurs transplantés cardiaques (Carbone *et al.* 2015).

En outre, les IgG anti-HCMV peuvent cibler les cellules infectées *in vitro* et activer les populations NK CD94/NKG2C⁺ CD16⁺ par ADCC (Costa-Garcia *et al.* 2015). Elles permettent également la production de TNF- α par les NK CD94/NKG2C⁺ et d'IFN- γ par les LT $\gamma\delta^+$ après leur activation par le CD16 via la reconnaissance de virions opsonisés par des IgG spécifiques du HCMV, favorisant la diminution de la réplication virale (Couzi *et al.* 2012; Costa-Garcia *et al.* 2015).

Réponse effectrice

Les cellules NK CD94/NKG2C⁺

Préambule. Issues de la lignée lymphoïde, les cellules naturellement tueuses NK sont majoritairement représentées par 2 types de populations : les NK CD56^{bright} CD16^{low} et les NK CD56^{dim} CD16^{high}, cette dernière étant générée par la première durant les processus de maturation. Essentiellement présentes dans les OLS, les NK CD56^{bright} CD16^{low} sont pourvues de fortes capacités de prolifération et production de cytokines inflammatoires, et d'un faible potentiel cytotoxique, à l'inverse des populations CD56^{dim} CD16^{high}, dominantes dans la circulation sanguine. Au cours de leur différenciation, les populations NK voient leur expression du récepteur inhibiteur CD94/NKG2A diminuer au profit de l'acquisition d'autres récepteurs inhibiteurs de type KIR (Killer cell Ig-like Receptor), et même du récepteur activateur CD94/NKG2C dans certains contextes infectieux.

Fréquence et amplitude. L'infection à HCMV provoque l'émergence précoce et l'amplification d'une population NK circulante de phénotype CD94/NKG2C^{high} pouvant représenter jusqu'à 70% des cellules NK totales chez les individus séropositifs pour le HCMV, enfants (33,3%, n=7/21) comme adultes (60,3%, n= 41/68) (Gumá *et al.* 2004; Monsiváis-Urendá *et al.* 2010). L'augmentation de cette population a également été observée dans divers

contextes pathologiques d'infection à HCMV en corrélation avec une protection contre la maladie à HCMV: patients greffés de CSH (Foley *et al.* 2012 (b)), receveurs d'organes (Lopez-Vergès *et al.* 2011; Redondo-Pachón *et al.* 2017), femmes enceintes primo-infectées ou avec une réactivation virale durant leur grossesse, cas d'infection congénitale (Bayard *et al.* 2016).

Phénotype. L'exposition de fibroblastes infectés par le HCMV au répertoire NK de ces individus a démontré *in vitro* l'expansion préférentielle de populations matures NK de phénotype CD3⁻ CD56^{dim} CD16⁺ CD94⁺ NKG2A⁻ NKG2C⁺ CD57⁺ (**Figure 11**) (Gumá *et al.* 2006; Lopez-Vergès *et al.* 2010, 2011; Rölle *et al.* 2014), de façon dépendante de l'interaction de CD94/NKG2C avec son ligand HLA-E sur la cellule infectée (Rölle *et al.* 2014; Djaoud *et al.* 2016). En outre, l'absence d'expression du récepteur inhibiteur NKG2A au profit du récepteur activateur NKG2C est palliée par l'expression membranaire d'un ou plusieurs récepteurs inhibiteurs KIR, capables de reconnaître des protéines HLA-I autologues de classe B ou C (Béziat *et al.* 2012; Foley *et al.* 2012 (b); Béziat *et al.* 2013; Djaoud *et al.* 2013).

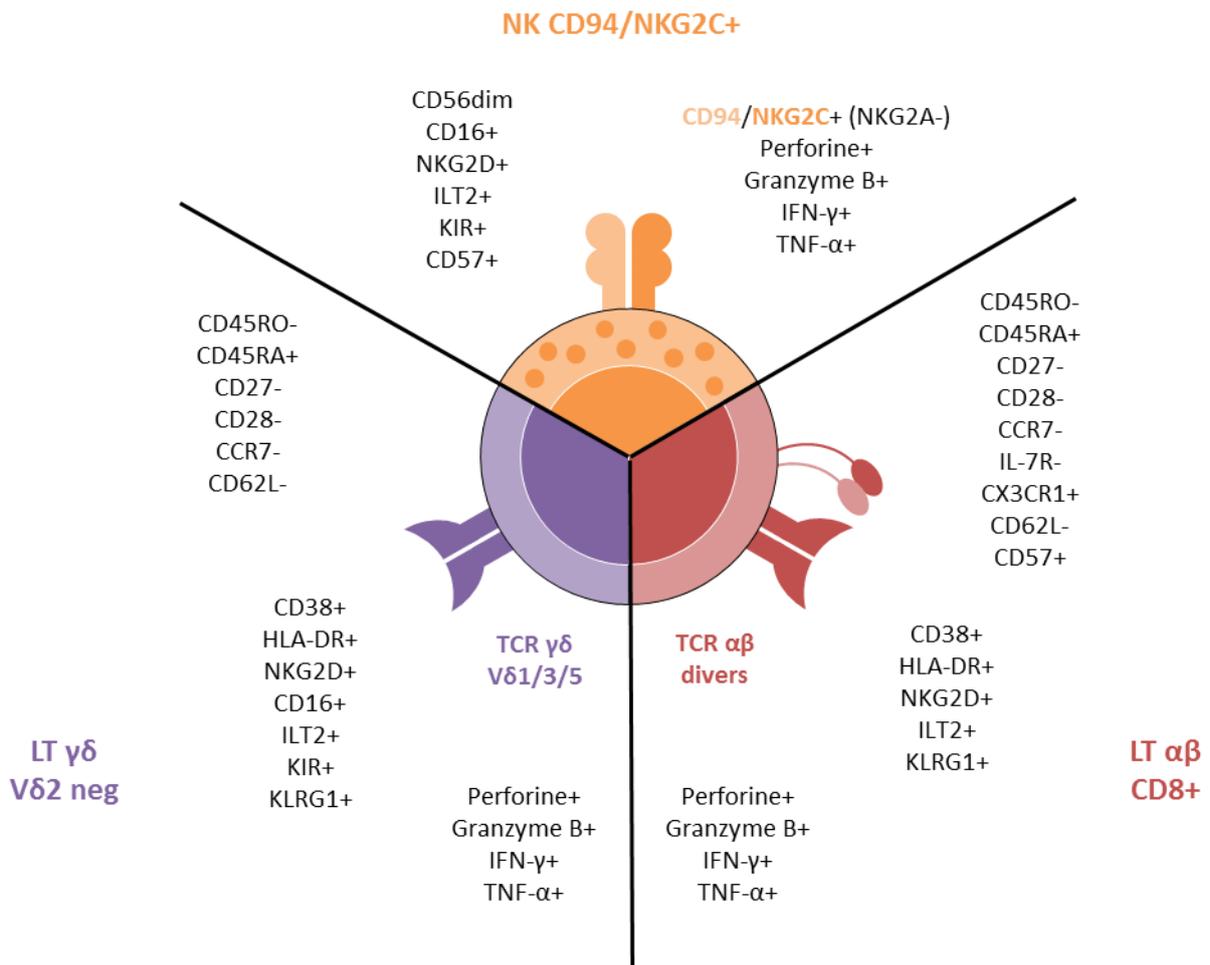


Figure 11 : Phénotype des populations NK, T γδ et T αβ CD8⁺ persistantes spécifiques du HCMV.

Rôle. Ces populations exercent un contrôle du HCMV en induisant la production de cytokines inflammatoires (IFN- γ , TNF- α) ainsi que la lyse directe et indirecte - par ADCC - des cellules infectées suite à leur reconnaissance (Foley *et al.* 2012 (b); Costa-Garcia *et al.* 2015). Elles peuvent également sécréter du TNF- α suite à la reconnaissance de virus libres opsonisés par la voie CD16 (Costa-Garcia *et al.* 2015).

Une réponse NK mémoire ? Les NK CD94/NKG2C⁺ partagent des similarités avec les réponses T adaptatives mémoires (O'Sullivan *et al.* 2015). Ainsi, suite à une surinfection par le virus chez des receveurs HCMV⁺ greffés avec des CSH allogéniques de donneur HCMV⁺, les populations NK CD94/NKG2C⁺ s'amplifient plus rapidement et plus fortement, et se caractérisent par une sécrétion prolongée et exacerbée d'IFN- γ par rapport à leurs homologues chez des patients D⁻/R⁺ (Lopez-Vergès *et al.* 2011; Foley *et al.* 2012 (a)). Cependant, ces propriétés mémoires ne sont pas dépendantes de l'expression membranaire de CD94/NKG2C.

Les populations NK CD94/NKG2C⁻. Des receveurs de CSH présentant une délétion homozygote du gène *NKG2C* développent également des NK « mémoires » en cas d'infection à HCMV (Della Chiesa *et al.* 2014). Ces populations NK NKG2C⁻ partagent les mêmes caractéristiques que les cellules NK CD94/NKG2C⁺, à savoir un phénotype NK mature (CD3⁻ CD56^{dim} NKG2A⁻ CD16⁺ KIR⁺ ILT-2⁺ DNAM-1⁺ CD57⁺), la production d'IFN- γ et TNF- α , la reconnaissance et la lyse de cellules infectées par le HCMV recouvertes par des Ac anti-HCMV (Béziat *et al.* 2013; Liu *et al.* 2016).

Indépendamment de l'expression de CD94/NKG2C, les populations NK peuvent également participer au contrôle de l'infection à HCMV. Des cellules NK activées par l'IL-2 conduisent à l'inhibition de la réplication virale dans des fibroblastes infectés *in vitro* par voie autocrine médiée par l'IFN- β (Iversen *et al.* 2005). Il a également été montré *in vitro* que la reconnaissance des cellules infectées par les NK variait selon le type cellulaire du fait de l'expression hétérogène des ligands activateurs. Ainsi si le récepteur activateur NKG2D est fortement impliqué dans la reconnaissance des fibroblastes par les NK, il ne l'est pas pour les DC du fait de l'absence notable d'expression des ligands de NKG2D suite à des mécanismes d'immunoévasion sur les DC infectées. Ces dernières sont toutefois reconnues par les NK via une interaction impliquant les récepteurs

activateurs NKp46 et/ou DNAM-1 (Magri *et al.* 2011). De façon intéressante, il existe une corrélation inverse entre le nombre de récepteurs activateurs KIR exprimés et le taux d'infection et réactivation du HCMV chez des patients transplantés rénaux (Stern *et al.* 2008). Il a été mis en évidence que la présence d'au moins un haplotype KIR B du receveur était corrélée avec une protection contre l'infection à HCMV, du fait de sa permissivité à l'expression d'un plus grand nombre de gènes de récepteurs KIR activateurs par les cellules NK au contraire du génotype KIR A/A, qui n'en code qu'un seul (KIR 2DS4). Ainsi, les receveurs de génotype KIR A/A ont significativement plus de risque de développer une maladie à HCMV, tandis que l'effet protecteur associé au génotype KIR B/X augmente avec le nombre de KIR activateurs contenus dans l'haplotype B (Stern *et al.* 2008).

Les cellules T $\gamma\delta$ V δ 2 négatives

Préambule. Les LT $\gamma\delta$ sont des cellules CD3⁺ CD4⁻ CD8^{+/-} exprimant un TCR composé des chaînes γ et δ , au contraire des LT conventionnels à TCR $\alpha\beta$. Chez les humains, 2 populations majoritaires sont retrouvées : les LT $\gamma\delta$ V γ 9V δ 2⁺, prédominants dans le sang, et les LT $\gamma\delta$ V δ 2⁻, préférentiellement localisés dans les tissus, dont les épithéliums. Les modalités de reconnaissance des ligands par les TCR des LT $\gamma\delta$ sont variées. Au contraire des LT $\alpha\beta$, ils peuvent reconnaître une très grande diversité d'Ag (peptide, lipide, glyco-lipide *etc.*), et ce, soit directement et indépendamment de leur présentation par une molécule HLA, soit indirectement dans des contextes de restriction non conventionnels (CD1d, EPCR).

Fréquence et amplitude. L'infection à HCMV active, que ce soit en cas de primo-infection ou de réactivation, conduit à l'expansion rapide et élevée, ainsi qu'au maintien au cours du temps des populations T $\gamma\delta$ chez des patients transplantés rénaux (15,1%, n=31/205) (Déchanet *et al.* 1999 (a); Déchanet *et al.* 1999 (b); Lafarge *et al.* 2001). En effet, les LT $\gamma\delta$ ayant une chaîne δ 1, 3 ou 5, dites « δ 2⁻ », prolifèrent *in vitro* au contact de lysats de cellules infectées par le HCMV (Déchanet *et al.* 1999 (b)). L'expansion des populations T $\gamma\delta$ δ 2⁻ a également été observée lors de l'infection à HCMV de patients dans de multiples contextes : patients transplantés ou greffés de CSH (Knight *et al.* 2010; Puig-

Pey *et al.* 2010; Scheper *et al.* 2013), primo-infections lors de grossesse (Fornara *et al.* 2011; Roux *et al.* 2013), infections congénitales du fœtus (Vermijlen *et al.* 2010), enfants ayant une incapacité à monter une réponse T $\alpha\beta$ anti-HCMV (de Villartay *et al.* 2005; Ehl *et al.* 2005), et individus sains immunocompétents (Pitard *et al.* 2008; Knight *et al.* 2010).

Phénotype. Ces lymphocytes expriment majoritairement un phénotype de différenciation TEMRA (pour LT effecteur-mémoires réexprimant CD45RA) (CD45RO⁻ CD45RA⁺ CD27⁻ CD28⁻ CD62L⁻ CCR7⁻), ainsi qu'un profil d'activation HLA-DR⁺ CD69⁺ CD38⁺ *ex vivo* corrélé avec leur capacité à s'amplifier rapidement et fortement après une réactivation du HCMV (Déchanet *et al.* 1999 (b); Pitard *et al.* 2008; Couzi *et al.* 2009; Roux *et al.* 2013) (**Figure 11**). Ainsi, les LT $\gamma\delta$ V δ 2⁻ TEMRA s'amplifient plus rapidement et s'accompagnent d'une meilleure résolution de l'infection à HCMV chez des patients transplantés expérimentant une infection secondaire (D⁺/R⁺) par rapport à ceux ayant une infection primaire (D⁺/R⁻) (Pitard *et al.* 2008; Roux *et al.* 2013). Les populations T $\gamma\delta$ anti-HCMV issues des nouveau-nés et des patients transplantés surexpriment également ILT2 et divers autres récepteurs inhibiteurs de type KIR, au contraire de celles issues des individus sains non infectés ou comparés aux LT $\alpha\beta$ spécifiques du HCMV (Halary *et al.* 2005; Pitard *et al.* 2008; Couzi *et al.* 2009), possiblement dans le but de réguler les LT $\gamma\delta$ prompts à l'auto-réactivité de manière similaire aux NK.

Rôle. Les populations T $\gamma\delta$ 2⁻ semblent impliquées dans la protection contre l'infection et la maladie à HCMV, comme en témoigne l'augmentation de leur fréquence en corrélation avec la résolution de l'infection chez des patients transplantés (Couzi *et al.* 2011). La récurrence d'épisodes de réactivations, les charges virales, ainsi que les symptômes « liés » à la maladie à HCMV, sont plus accrus chez les patients séropositifs pour le HCMV ayant une expansion tardive des LT $\gamma\delta$ δ 2⁻ (supérieure à 45 jours) par rapport à ceux ayant une amplification rapide, capables de résoudre l'infection à HCMV (Lafarge *et al.* 2001). En outre, un taux d'expansion supérieur à 0,06% par jour des populations LT $\gamma\delta$ δ 2⁻ jusqu'au 49^{ème} jour de l'emploi du traitement antiviral est associé avec la résolution de la virémie sanguine HCMV, tandis qu'un retard de développement de ces populations est associé à la récurrence de la virémie, de la maladie et l'apparition de souches résistantes aux traitements antiviraux (Kaminski *et al.*

2016). Les LT $\gamma\delta$ $\delta 2^-$ se caractérisent par la capacité de reconnaître et lyser spécifiquement des cellules infectées *in vitro* en passant par une activité cytotoxique, dépendante de la perforine et du granzyme B, et la sécrétion d'IFN- γ et de TNF- α , limitant ainsi les capacités de réplication virale du HCMV (Déchanet *et al.* 1999 (b); Halary *et al.* 2005; Vermijlen *et al.* 2010).

Répertoire. La diversité clonale du répertoire T demeure restreinte, étant généralement oligoclonale, voire dans certains cas, monoclonale, laissant supposer à une sélection dépendante d'un Ag (Déchanet *et al.* 1999 (b); Pitard *et al.* 2008; Knight *et al.* 2010). En ce sens, la reconnaissance de cellules infectées par le HCMV par des LT $\gamma\delta$ issus d'individus séropositifs implique le TCR (Déchanet *et al.* 1999 (b); Halary *et al.* 2005; Willcox *et al.* 2012; Scheper *et al.* 2013). De plus, l'infection à HCMV ne s'accompagne pas du développement de LT $\gamma\delta$ $V\delta 2^-$ chez des individus séropositifs ayant subi une thymectomie après leur naissance, sous-tendant le besoin de sélection thymique pour le développement de cette population (Roux *et al.* 2013).

Spécificité. Les ligands des TCR des LT $\gamma\delta$ spécifiques du HCMV demeurent peu connus, comme en atteste les deux seules caractérisations de reconnaissance TCR spécifique par deux clones T $\gamma\delta$ V $\gamma 4$ V $\delta 5$ et V $\gamma 8$ V $\delta 3$. Ils reconnaissent respectivement le récepteur EPCR (endothelial protein C receptor), protéine membranaire d'homologie partielle à certaines molécules HLA-I, exprimée par les cellules endothéliales infectées ou non mais vraisemblablement non régulée par l'infection (Willcox *et al.* 2012), et l'annexine 2, dont le HCMV induit la phosphorylation dans la cellule infectée et favorise son expression membranaire (Marlin *et al.* 2017). Cependant, au contraire des LT $\alpha\beta$ conventionnels, les LT $\gamma\delta$ anti-HCMV peuvent aussi s'activer de manière indépendante du TCR. Ainsi, lors de l'infection à HCMV, les LT $\gamma\delta$ $\delta 2^-$ acquièrent *in vivo* l'expression membranaire fonctionnelle du CD16, leur conférant ainsi la capacité de reconnaître les particules virales libres recouvertes d'Ac et les cellules infectées opsonisées et d'induire l'inhibition de la réplication virale par un mécanisme dépendant de l'IFN- γ et du TNF- α *in vitro* (Couzi *et al.* 2012). Ils peuvent également acquérir l'expression de la molécule NKG2D, bien que l'implication de ce récepteur dans la reconnaissance des cellules infectées par le HCMV ait été écartée (Halary *et al.* 2005).

Concernant les populations T $\gamma\delta$ $\delta 2^+$, bien que leur expansion n'ait pas été décrite dans les contextes de primo-infection ou de réactivation à HCMV, il a été montré *in vitro* que l'infection à HCMV entraîne une surproduction d'isopentenyl-pyrophosphate intracellulaire, un des phosphoantigènes naturels reconnu par les LT $\gamma\delta$ $\delta 2^+$, dans les cellules infectées sensibilisées aux aminobisphosphonates, favorisant la reconnaissance des cellules-hôtes par ces populations T et limitant la réplication et production virale par un mécanisme indépendant de la lyse cytotoxique, mais dépendant de la production d'IFN- γ et TNF- α (Daguzan *et al.* 2016).

Les cellules T $\alpha\beta$ CD8⁺ et CD4⁺

Fréquence et amplitude. Les réponses T adaptatives CD8⁺ et CD4⁺ sont communément présentes à de hautes fréquences chez la plupart des individus séropositifs pour le HCMV, bien qu'il y ait une certaine variabilité d'amplitude entre eux. Il a été déterminé que les individus infectés possèdent en moyenne 10% de LT CD8⁺ et 9% de LT CD4⁺ circulants dirigés contre le HCMV, représentant jusqu'à parfois plus de 30% (CD8) et 20% (CD4) du répertoire T correspondant, et que l'âge des sujets était positivement corrélé avec la fréquence des réponses, même en absence de charges virales détectables (Sylwester *et al.* 2005; Pourgheysari *et al.* 2007). La réponse T CD8⁺ anti-HCMV circulante est prédominante durant l'épisode de réplication active du HCMV chez les individus D⁺/R⁻, tandis que la population T CD4⁺ spécifique du virus est majoritaire après l'emploi effectif de thérapies antivirales (Sester *et al.* 2002 (a)). La grande majorité de ces réponses T chez l'Homme ont été caractérisées dans le sang, bien que de récents rapports font état de la présence des réponses T anti-HCMV conventionnelles dans certains tissus, comme les poumons ou le foie, ainsi que dans des compartiments lymphoïdes comme la moëlle osseuse ou les ganglions (Akulian *et al.* 2013; Gordon *et al.* 2017).

Phénotype. Les populations T conventionnelles spécifiques du HCMV possèdent un phénotype typique de réponse immune T dirigée contre un virus persistant à potentiel de réactivation chronique. Les LT CD8⁺ et CD4⁺ anti-HCMV de la circulation sanguine sont majoritairement effecteurs-mémoires, et plus généralement au stade le plus différencié du continuum des réponses T

mémoires (Newell *et al.* 2012). Ainsi, les répertoires sanguins T CD4⁺ et CD8⁺ anti-HCMV appartiennent essentiellement au stade dit TEMRA, réexprimant CD45RA (un marqueur préférentiellement associé aux LT naïfs), ainsi qu'au stade de différenciation plus précoce dit TEM, pour LT effecteurs-mémoires arborant essentiellement le CD45RO (un marqueur des LT mémoires) (Makwana *et al.* 2017).

Leur stade de maturation évolue parallèlement à celui de l'infection virale. Au cours de la phase aiguë de la primo-infection, les LT CD8⁺ sont de type TEM (CD45RO⁺ CD45RA⁻ CD27⁺ CD28^{+/-} CCR7^{+/-} CD62L^{+/-} IL-7R α ^{low/-}). Durant la phase chronique de réactivation du HCMV, ils deviennent majoritairement de type TEMRA (CD45RO⁻ CD45RA⁺ CD27⁻ CD28⁻ CCR7⁻ CD62L⁻ IL7R α ⁻), acquérant au passage l'expression des marqueurs CD57 et KLRG1, perdant leur capacité de prolifération à long-terme, tout en conservant, voire augmentant, leurs propriétés fonctionnelles (**Figure 11**) (Appay *et al.* 2002 (a); Gamadia *et al.* 2003; Kuijpers *et al.* 2003; Boutboul *et al.* 2005; Hertoghs *et al.* 2010). En ce sens, les populations CD8⁺ TEMRA spécifiques du HCMV ne montrent pas de signes d'épuisement d'un point de vue transcriptomique et phénotypique (Hertoghs *et al.* 2010). Par contre, ces populations T CD8⁺ se mettent à exprimer d'autres récepteurs inhibiteurs pouvant intervenir dans la régulation négative de leurs fonctions, comme des récepteurs CD94/NKG2A, KIR2/3DL et ILT-2 (Northfield *et al.* 2005; van Stijn *et al.* 2008; Makwana *et al.* 2017).

L'acquisition de ce phénotype extrêmement différencié de LT matures est supposée en lien avec des expositions répétées aux Ag du HCMV durant les cycles de réactivation brève ponctuant la période de latence. Cependant, des profils transcriptionnels de LT CD8 spécifiques du HCMV hautement différenciés sont détectés à des points précoces après la primo-infection à HCMV chez des humains (Hertoghs *et al.* 2010). Enfin, malgré l'échappement de ces populations T au phénomène d'épuisement, elles se caractérisent par un temps de demi-vie court, compris entre 35 et 60 jours (Snyder *et al.* 2008), alors que la mémoire T CD8 anti-HCMV peut persister jusqu'à au moins 6 ans post-primo-activation (Wallace *et al.* 2011). Une faible fraction de LT CD8⁺ anti-HCMV mémoires subsiste ainsi dans la circulation sanguine. Sur la base de l'expression de CD62L et CCR7, ceux-ci peuvent être divisés en T centraux-mémoires (TCM) et T effecteurs-mémoires (TEM), ces derniers exprimant globalement de plus hauts

niveaux de CD27 et IL-7R α , et un niveau plus faible de KLRG1 que les TEMRA (Sallusto *et al.* 1999). Au contraire des LT CD8⁺ TEMRA, les LT CD8⁺ TCM et TEM subsistent à long-terme et sont capables de division homéostatique indépendante de la stimulation antigénique (Scheinberg *et al.* 2009; Stemberger *et al.* 2014) et permettent une protection virale durable incluant le renouvellement de la réserve de LT TEMRA suite à une réactivation du virus (Scheinberg *et al.* 2009; Peggs *et al.* 2011). Ainsi, un défaut de reconstitution des LT CD8⁺ TCM et TEM chez des receveurs conduit au déclenchement de maladie à HCMV retardée (>3 mois) et très retardée (>1an) post-transplantation (Kumar *et al.* 2009; Manuel *et al.* 2013).

Le dogme actuel est que les LT de type TCM persistent dans les OLS, tandis que les LT TEM et TEMRA circulent dans le sang et dans les tissus non-lymphoïdes pour effectuer une surveillance immune (Andrian et Mempel 2003). Cependant, des études plus récentes montrent que certaines populations T après avoir éliminé un pathogène ne re-circulent que rarement au sein de l'organisme, mais deviennent plutôt des cellules mémoires résidant dans certains tissus non-lymphoïdes (particulièrement les muqueuses), jouant un rôle de sentinelle. En effet, ces populations T mémoires-résidentes (TRM) se maintiennent à long-terme sans recirculation, et sans être approvisionnées par les populations T mémoires circulantes (Masopust *et al.* 2001, 2010). Si ces cellules ont été identifiées dans de nombreux sites dans des modèles murins, très peu de rapports existent chez l'Homme, probablement du fait de la difficulté à obtenir des biopsies et à isoler des quantités suffisantes pour analyse (Mueller et Mackay 2015). Une population T CD8 anti-HCMV de type TRM a néanmoins été décrite chez l'Homme dans les tissus pulmonaires et de rate, bien que n'exprimant qu'un seul des deux marqueurs « spécifiques » des LT TRM (CD69⁺ CD103⁻) (Turner *et al.* 2014). Une étude récente a pu déterminer que la réponse T conventionnelle anti-HCMV de type TEM/TEMRA se localise préférentiellement dans les compartiments sanguins, hématopoïétiques (moelle osseuse), spléniques ou pulmonaires, et non intestinaux ou colorectaux, et que les populations « TRM » spécifiques du virus possèdent un profil CD69⁺ CD28^{low/-} CD57^{high} ainsi que de plus fortes capacités fonctionnelles en comparaison des populations T non spécifiques du HCMV (Gordon *et al.* 2017)

Fonctions. De manière générale, l'infection à HCMV induit une expansion de réponses T anti-HCMV CD8⁺ Tc1 et CD4⁺ Th1 (Appay *et al.* 2002 (a), 2002 (b) ; Hertoghs *et al.* 2010; van de Berg *et al.* 2010).

Les LT CD8⁺ anti-HCMV sont capables *in vitro* de reconnaître et lyser spécifiquement les cellules infectées via le TCR, par la sécrétion de perforine et de granzyme B. Ils peuvent également produire des molécules proinflammatoires (IFN- γ , TNF- α , MIP1 β) (Zhou *et al.* 2009).

Les LT CD4⁺ anti-HCMV répondent au contact de CPA infectées *in vitro* en sécrétant de l'IL-2, de l'IFN- γ , du TNF- α et de l'IL-12, permettant l'inhibition directe des capacités de réplication virale (Davignon *et al.* 1996; Rentenaar *et al.* 2000). Ils participent au dialogue avec les autres effecteurs immuns, en augmentant les capacités prolifératives et cytotoxiques des LT CD8⁺ et NK. En ce sens, le maintien *in vivo* de la réponse T CD8 cytotoxique dirigées contre le HCMV est dépendente de la présence des LT CD4⁺ anti-HCMV (Walter *et al.* 1995).

Cependant, des réponses T CD4⁺ spécifiques d'antigènes viraux de latence (pp71, LUNA, UL111A, UL138, US3, US28) ont également montré des propriétés similaires à celles des LT régulateurs CD4⁺, à savoir l'expression de Foxp3, de forts niveaux de CD25 et la capacité de sécréter des taux élevés d'IL-10, soutenant leur potentielle implication dans la persistance du virus dans l'organisme (Mason *et al.* 2013; Jackson *et al.* 2017).

De plus, des LT CD4⁺ cytotoxiques spécifiques du HCMV, qui ne sont ni des LT CD4⁺ régulateurs, ni des NKT, émergent suite à la primo-infection par le HCMV (van Leeuwen *et al.* 2004). Une étude récente a caractérisé qu'entre 50 et 90% des individus HCMV⁺ peuvent développer une réponse T CD4⁺ cytotoxique contre un épitope donné, qui peut alors représenter jusqu'à 24% des LT CD4⁺ circulants. Ces LT possèdent des capacités similaires à des LT CD8⁺ TEM/TEMRA classiques suite à la reconnaissance spécifique de leur épitope dans un contexte HLA-II : lyse de cibles infectées par la sécrétion de perforine, granzymes A et B et sécrétion de cytokines Tc1 (IFN- γ , TNF- α , IL-2, MIP1 β), mais aucune de type Tc2 (Appay *et al.* 2002 (b); Mason *et al.* 2013; Pachnio *et al.* 2016; Jackson *et al.* 2017).

Répertoire. Il est intéressant de noter que l'entretien d'un répertoire hautement diversifié de TCR $\alpha\beta$ est en corrélation avec un meilleur contrôle du HCMV (Wang *et al.* 2012). Cependant, la diversité du répertoire T anti-HCMV est généralement limitée ou s'amenuise rapidement, au profit de l'accumulation progressive au cours du temps d'un faible nombre de clones T de phénotype TEMRA de haute avidité (Trautmann *et al.* 2005; Day *et al.* 2007). Des analyses longitudinales montrent que la composition relative clonotypique parmi les populations T CD8 anti-HCMV peu ou hautement différenciées est remarquablement stable durant au moins 4 ans (Iancu *et al.* 2009). Ainsi, les répertoires T CD8⁺ et CD4⁺ sont essentiellement oligoclonaux au sein d'un individu : de 1 à 5 clones par épitope pour les LT CD4⁺ (Sester *et al.* 2002 (b)) contre 1 à 9 pour les LT CD8⁺ (Weekes *et al.* 1999; Schwanninger *et al.* 2008; Iancu *et al.* 2009). Cependant, un rapport plus récent met en avant une sous-estimation de la réponse T CD8 dirigée contre un épitope déterminé du HCMV, faisant état d'un nombre médian de clonotypes situé entre 14 et 77 par épitope chez un individu, même si dans la majorité des cas 1 à 2 clones dominent (Miconnet *et al.* 2011).

Des réponses immunes T anti-HCMV à TCR public ont également été décrites (TCR spécifique d'un épitope dans un contexte HLA donné, dominant d'une réponse immune, présent chez la plupart des individus répondeurs). En effet, environ 70% du répertoire T dirigé contre HLA-A*02/pp65 est semipartagé (chaînes α ou β publiques) chez les individus HLA-A*02⁺ HCMV⁺, dont la moitié se caractérise par des TCR à chaînes α et β publiques (Wang *et al.* 2012). Deux épitopes distincts issus de pp65, tous deux présentés dans le contexte de restriction HLA-B*35:08, sont pour l'un reconnu par un TCR public hautement conservé, et pour l'autre, par des TCR privés (TCR spécifique d'un épitope dans un contexte HLA donné, immunodominant, absent chez la majorité des individus répondeurs). Ceci vient probablement du fait que le complexe HLA-B*35 :08/peptide est plus imposant spatialement pour l'épitope public que pour l'épitope privé, plus « plat » et supposément moins accessible sur la surface cellulaire des cellules infectées. Ainsi, le répertoire T à TCR public est plus facilement activé par les cellules infectées et généralement arbore un profil phénotypique plus différencié par rapport aux LT à TCR privés (Wynn *et al.* 2008). Dans le contexte de co-primoinfection par deux souches uniques du HCMV, on constate le co-développement de réponses T distinctes restreintes

par HLA-B*08 spécifiques d'un épitope IE72 variant entre chaque souche en premier lieu, suivi par l'émergence et amplification majoritaire d'une réponse T monoclonale anti-HCMV capable de cibler les 2 souches par réaction croisée (Smith *et al.* 2014). En outre, cette dernière appartient à un répertoire T public hautement conservé, alors que les réponses T spécifiques d'une souche génétique affichent un répertoire oligoclonal propre à chaque individu (Smith *et al.* 2014).

Spécificité. Les réponses adaptatives T CD8⁺ et CD4⁺ se caractérisent par une spécificité de reconnaissance d'épitopes présentés dans des contextes de restriction HLA-I et HLA-II respectivement. Le répertoire antigénique des réponses T anti-HCMV inter-individuel est très diversifié (Jackson *et al.* 2014; A. Sylwester *et al.* 2016). En effet, de nombreuses protéines virales sont immunogènes : dans une étude de Sylwester et collaborateurs faite chez 33 individus séropositifs pour le HCMV, 151 ORFs du HCMV sur les 213 testés fournissent des épitopes immunogènes reconnus spécifiquement par les LT CD4⁺ et CD8⁺ dans de multiples contextes de restriction HLA-I et -II, dont 44 uniquement reconnus par les LT CD4⁺, 26 uniquement par les LT CD8⁺, et 81 par les deux compartiments (Sylwester *et al.* 2005) (**Figure 12**). Il a également été identifié que certaines protéines virales sont plus fréquemment reconnues par les populations T des individus infectés, indépendamment de leur haplotype HLA-I ou HLA-II. Ainsi, plus de 50% des individus séropositifs pour le HCMV développent des réponses T CD4⁺ dirigées contre des épitopes issus des protéines virales UL55 (gB), UL83 (pp65), UL86 (MCP), UL99 (pp28) et UL122 (IE86), ainsi que des réponses T CD8⁺ dirigées contre UL48 (SCP), UL83 (pp65) et UL123 (IE72) (Sylwester *et al.* 2005). Les réponses T CD8⁺ restent majoritairement dirigées contre des épitopes immunodominants issus des protéines virales UL123 (IE72) et UL83 (pp65) dans des contextes HLA-A*02 ou HLA-B*07 (Sylwester *et al.* 2016).

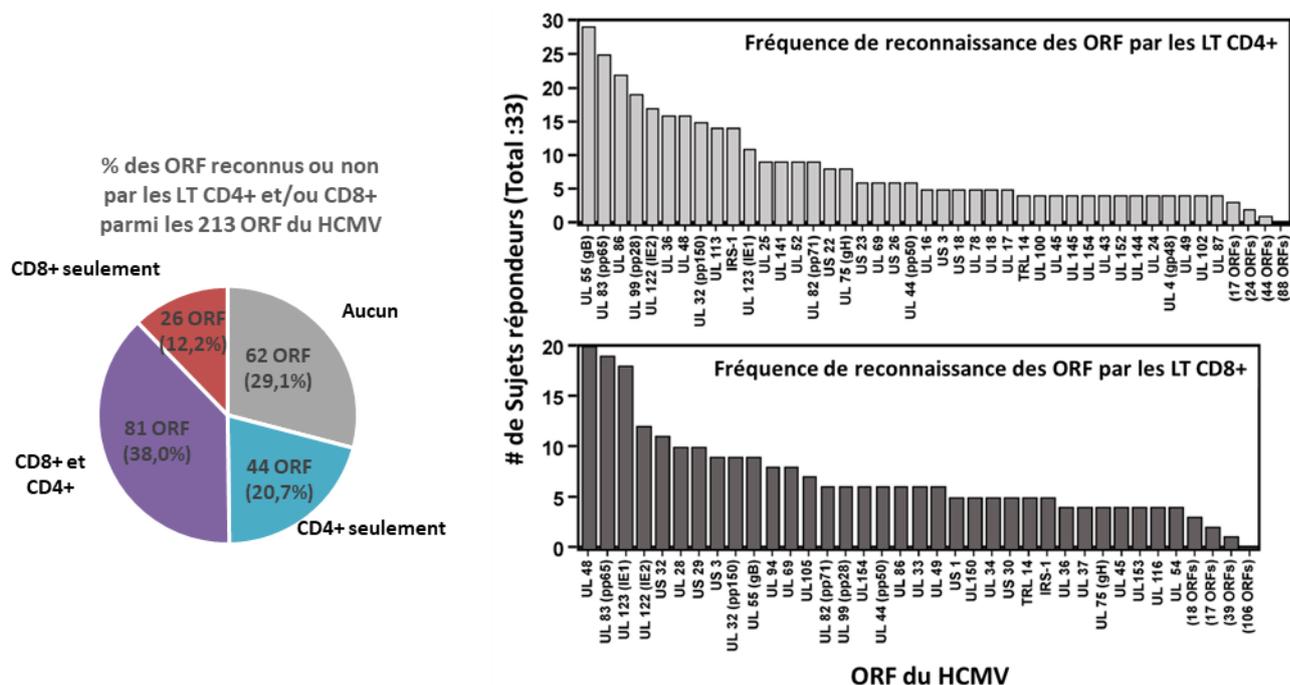


Figure 12: Identification des réponses T CD8⁺ et CD4⁺ spécifiques d'ORF chez des adultes HCMV⁺. D'après Sylwester *et al.* 2005.

D'autres épitopes immunogènes issus de diverses protéines virales sont également présentés dans divers contextes HLA-II : facteurs de transcription (IE72), protéines du tégument, protéines d'enveloppe (gH), de régulation de la réponse immune (US28, UL111a), antigènes de la phase de latence (UL138, LUNA); ou HLA-I : facteurs de transcription viraux (IE86), les protéines tégumentaires (pp28, pp150), les protéines d'enveloppe (gB, gH) et immunoévasines (US2, US3, US6, US11, UL16 et UL18) (Crough et Khanna 2009).

Cinétique de développement de la réponse immune anti-HCMV

Les cinétiques d'apparition et d'expansion des diverses sous-populations immunes lors de la primo-infection à HCMV sont peu connues chez l'Homme, à cause notamment de l'absence de symptômes cliniques importants chez l'individu immunocompétent, rendant leur observation délicate. La plupart des études sur ce sujet ont été faites dans un contexte de transplantation chez des receveurs séronégatifs recevant un greffon d'un donneur séropositif pour le HCMV. Ceci introduit alors 2 biais majeures : 1) l'utilisation de traitements en

induction et maintien de l'immunosuppression induit une lymphopénie temporaire chez les patients, et 2) l'emploi de thérapies antivirales a des répercussions sur le développement et l'expansion du HCMV, et en conséquence l'activation des réponses immunes.

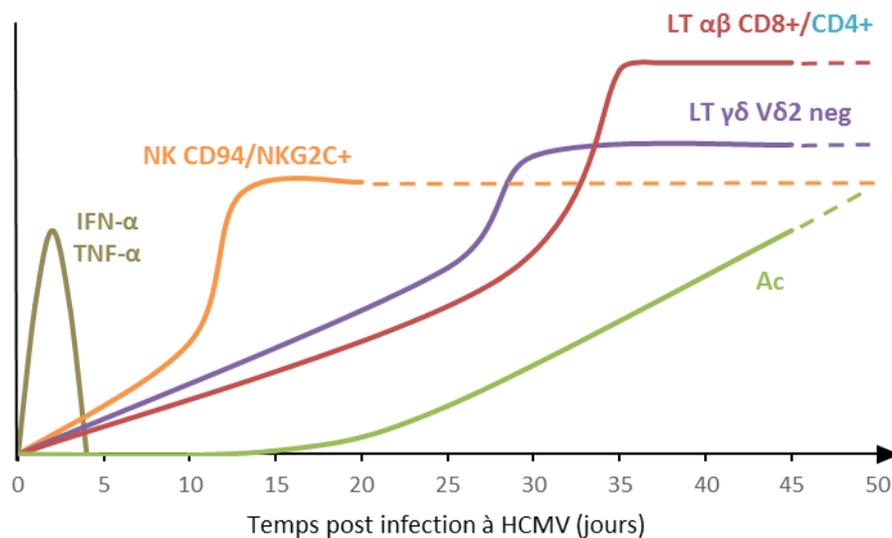


Figure 13 : Cinétique d'apparition et de développement des différents effecteurs de la réponse immune anti-HCMV. Suite à la primo-infection par le HCMV, de fort taux d'IFN- γ et de TNF- α sériques sont dosables dans le sang. S'ensuit alors le développement rapide des populations NK CD94/NKG2C⁺, puis retardé des LT $\gamma\delta^+$ et $\alpha\beta$ CD8⁺ et CD4⁺ dans la circulation sanguine. Ces 4 populations suivent un schéma similaire : une phase d'activation lente, puis une expansion rapide et exponentielle, une légère contraction, pour finalement, persister à un niveau basal élevé dans la circulation (voire s'amplifier, confère sous-partie suivante). Adapté de Kaminski *et al.* 2015.

Selon les patients, les réponses NK CD94/NKG2C⁺ prolifèrent entre 1 et 2 semaines après la détection de la virémie sanguine HCMV, et acquièrent leur profil mature et mémoire, caractérisé entre autres par l'augmentation membranaire de CD57 (Lopez-Vergès *et al.* 2011; Foley *et al.* 2012 (b))(Figure 13). Les populations T $\gamma\delta^+$ et T $\alpha\beta$ CD4⁺ et CD8⁺ spécifiques du HCMV apparaissent quant à elles dans la circulation après le pic de réplication virale, en moyenne entre 4 et 6 semaines après la primo-infection (Sylwester *et al.* 2005), mais avec des cinétiques et amplitudes variables selon les patients et l'environnement immunosuppresseur (Couzi *et al.* 2009). Ces populations suivent alors un schéma classique composé d'une première expansion, suivi d'une contraction, puis finalement de la formation d'une mémoire à long terme. Suspectée similaire chez les LT $\gamma\delta$, cette mémoire est constituée d'effecteurs à long (TCM) et court termes (TEM) pour les réponses conventionnelles T $\alpha\beta$

(Gamadia *et al.* 2001; Rentenaar *et al.* 2001; van Leeuwen *et al.* 2002; Sester *et al.* 2002 (a), 2002 (b); Gamadia *et al.* 2003; Couzi *et al.* 2011; Fornara *et al.* 2011; Roux *et al.* 2013).

La cinétique de la réponse humorale est évaluée par le dosage des Ac sériques anti-HCMV. Les Ac neutralisants apparaissent dans les 2 à 4 semaines suite à la primo-infection de femmes enceintes (Genini *et al.* 2011). Bien que la réponse humorale apparaisse précocement chez l'individu immunocompétent, l'émergence d'Ac spécifiques du HCMV est retardée chez les patients transplantés et n'est détectable qu'entre 6 et 12 mois post-transplantation, probablement du fait des traitements immunosuppresseurs qui affectent le développement des LT anti-HCMV (dont ceux des LT CD4⁺ Tfh) ainsi que de la prévention antivirale (Gerna *et al.* 2015).

Inflation mémoire & Immunosénescence

La détérioration du système immunitaire liée au vieillissement de l'organisme, ou immunosénescence, se caractérise entre autres par la diminution quantitative et qualitative des LT naïfs au profit de l'expansion des LT matures effecteurs, entraînant de ce fait une réponse moindre à la vaccination et à lutter contre de nouveaux pathogènes infectants (Tu et Rao 2016). Les preuves de la participation du HCMV à l'immunosénescence sont nombreuses.

Chez les individus immunocompétents, on constate une corrélation positive entre l'âge d'un individu et la fréquence des LT CD8⁺ anti-HCMV TEMRA, laissant supposer qu'une accumulation progressive se produit au cours du temps dans la circulation sanguine, atteignant jusqu'à plus de 50% du répertoire total (Komatsu *et al.* 2003). Ainsi, certaines sous-populations T CD8⁺ anti-HCMV semblent subir un phénomène dénommé « Inflation mémoire », connu dans les modèles murins d'infection à MCMV, consistant en la présence de T CD8⁺ circulants de phénotype TEMRA, qui au contraire des LT CD8⁺ classiquement décrits dans les réponses immunes, ne se contractent pas après la phase d'expansion suite à la reconnaissance de leur Ag, et continuent de s'amplifier lentement et durablement. De plus, ces populations particulières conservent

leurs fonctions effectrices, et surtout ne semblent pas s'épuiser dans le temps. À ce jour, aucun marqueur connu n'est spécifique de l'inflation, même si certaines molécules, comme CD57, CX3CR1, la perforine et le granzyme B lui sont associées, ainsi qu'une signature génétique dominante caractérisée par l'expression d'un petit nombre de régulateurs transcriptionnels, dont un haut niveau de T-Bet (pour revue Klenerman et Oxenius 2016).

Une théorie propose que l'inflation mémoire serait la conséquence de la persistance à bas niveau d'Ag viraux suite à des épisodes de réactivation sporadique et contrôlée du HCMV (Snyder 2011; Seckert *et al.* 2012). En effet, le virus est prompt à établir de longs cycles de latence et les événements de réactivation virale lytique sont plutôt sporadiques, conduisant à une présentation d'Ag limitée dans le temps (Liu *et al.* 2013). Chez la souris, deux hypothèses non-exclusives ont été formulées quant à l'origine des populations T de type « inflation mémoire ». La première est que ces populations proviennent de la stimulation répétée des LT de phénotype TCM présents dans les ganglions, suite à la présentation successive par des CPA de faibles doses d'Ag issus de cellules non-hématopoïétiques infectées latentes (cellules endothéliales majoritairement). Ceci conduit *in fine* à leur prolifération, différenciation et migration, s'accompagnant alors d'un renouvellement perpétuel des LT TEM en périphérie. La seconde hypothèse propose que le répertoire TEM circulant soit lui-même sans cesse stimulé directement par les cellules non-hématopoïétiques infectées latentes. En effet, afin de créer ce phénomène chez la souris, il n'y a ni besoin de renouvellement du répertoire T CD8⁺ anti-HCMV à partir du thymus, ni nécessité de répllication massive du virus. Par contre, une certaine quantité de cellules infectées latentes non hématopoïétiques doit s'établir suite à la primo-infection pour maintenir l'inflation mémoire (Klenerman et Oxenius 2016).

Chez l'Homme, en accord avec la théorie de l'origine de l'inflation mémoire, seuls quelques épitopes, dérivés des gènes des phases IE et L du HCMV, sont à l'origine du processus, altérant le répertoire T anti-HCMV. Ainsi, chez les enfants primo-infectés, la réponse T dirigée contre IE1 est toujours plus amplifiée que celle visant pp65 au bout d'un an, et ce, quel que soit l'Ag immunodominant lors de l'infection (Gibson *et al.* 2004). Le répertoire des LT CD8⁺ anti-pp65 présent durant l'inflation est oligoclonal mais diversifié, et peut être renouvelé

suite à une réexposition au virus (Miconnet *et al.* 2011). Ceci perturbe l'homéostasie des LT totaux en circulation et contribue à l'encombrement et la baisse de diversité du répertoire T circulant dirigé contre un seul et unique virus au détriment d'un répertoire *de novo* dirigé contre d'autres éléments pathogènes, compromettant l'apparition ou l'expansion de réponses T anti-tumorales et/ou dirigées contre des pathogènes (Appay *et al.* 2011). En ce sens, les sujets âgés immunocompétents et séropositifs pour le HCMV, chez qui le phénomène d'inflation mémoire est extraordinairement prééminent et large, sont plus prompts à développer des cancers (Sansoni *et al.* 2014). De plus, l'incidence de l'infection à HCMV est augmentée avec l'âge des individus, et est associée à une augmentation du répertoire de LT CD8⁺ cytotoxiques dirigés contre le HCMV de différenciation terminale accompagnée d'une inversion du rapport de LT CD4/CD8 circulants (Litjens *et al.* 2011; Arias *et al.* 2013; Strindhall *et al.* 2013).

De façon similaire aux effecteurs immuns adaptatifs, les cellules NK « effectrices-mémoires » CD94/NKG2C⁺ CD57⁺ s'accumulent avec l'âge et le statut séropositif à HCMV, indépendamment l'un de l'autre, et en corrélation positive avec le répertoire T anti-HCMV, mais sans lien avec les épisodes de réactivations du HCMV (Bayard *et al.* 2016). Il en est de même avec l'accentuation de la proportion des LT $\gamma\delta$ anti-HCMV (Roux *et al.* 2013; Wistuba-Hamprecht *et al.* 2013). En outre, le HCMV est responsable de la prévention du déclin des populations T $\gamma\delta$ V δ 2⁻ observé chez les individus sains âgés en temps normal (Roux *et al.* 2013; Alejef *et al.* 2014). Étonnamment les populations T, $\alpha\beta$ et $\gamma\delta$, hautement différenciées ne deviennent pas épuisées, conservent leurs fonctions et se caractérisent par la co-expression de CD57 et KLRG1, des marqueurs respectivement associés à la sénescence et aux stimulations antigéniques persistantes (notamment dans les infections virales chroniques) (Ibegbu *et al.* 2005).

Mécanismes d'immunoévasion du HCMV

Le HCMV est un virus qui, bien que codant de nombreuses protéines immunogènes, arrive avec succès à infecter et persister durant l'intégrité de la vie de son hôte. À l'instar de nombreux autres virus, le HCMV a la capacité de mettre en place de multiples mécanismes afin d'échapper aux nombreux médiateurs de la surveillance immune antivirale. Il est estimé que le HCMV dédie entre 10 et 20% de son génome viral pour coder des protéines d'immunosubversion, de 2 natures distinctes : 1) des protéines virales homologues à des protéines cellulaires humaines, suggérant que l'évolution du HCMV a vu s'intégrer dans le génome viral par transfert horizontal certains gènes de l'hôte donnant un avantage sélectif au virus, et 2) des protéines virales ne possédant pas d'homologie avec des protéines cellulaires. Ces protéines vont avoir des rôles divers et variés dans le but de favoriser l'infection et la réplication du HCMV allant de l'inhibition de la réponse intrinsèque de la cellule infectée (inhibition de l'apoptose et de la production de cytokines type IFN) jusqu'à l'échappement aux différents effecteurs de l'immunité (inhibition des réponses humorales et cytotoxiques médiées par les LB, les NK, les LT CD8⁺ et CD4⁺). Les différents médiateurs viraux décrits dans cette immunoévasion sont schématisés dans la **Figure 14**.

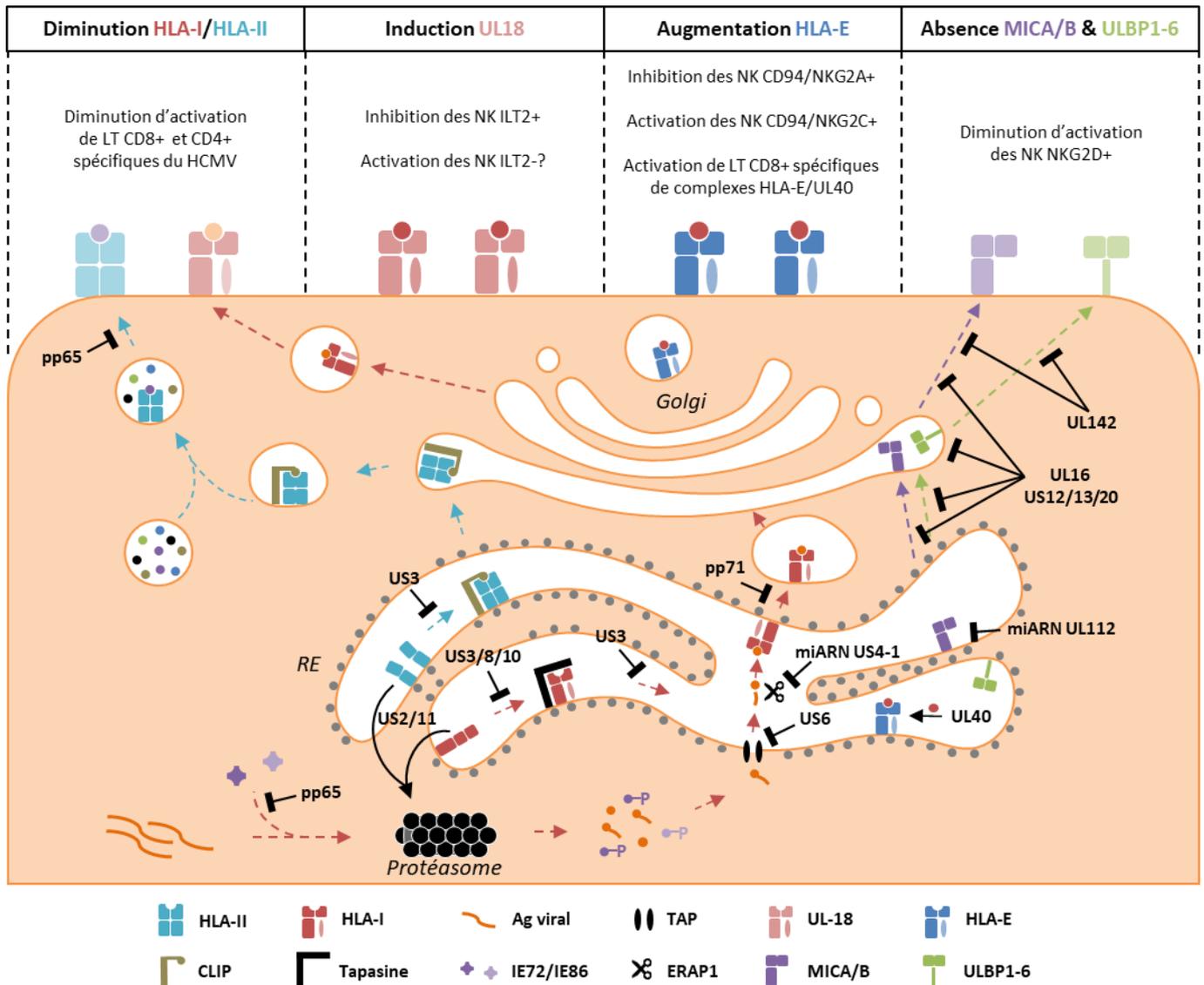


Figure 14 : Mécanismes d'immunosubversion mis en place par le HCMV pour échapper aux différents effecteurs de la réponse immunitaire. Bleu clair : Voie des HLA-II ; Bleu foncé : Voie HLA-E ; Rouge : Voie des HLA-I ; Violet : Voie MICA/B ; Vert : Voie ULBP.

Régulation négative de l'expression membranaire des molécules HLA-I et -II

Afin d'échapper à la reconnaissance spécifique par la réponse immunitaire adaptative au travers des LT CD8⁺ et CD4⁺, le HCMV dispose de nombreuses protéines virales cytoplasmiques (US2/US3/US6/US8/US11) capables de diminuer directement et indirectement - par inhibition de la voie IFN- γ - l'expression membranaire des molécules HLA-I et -II sur les cellules infectées. C'est en premier lieu Jones et collaborateurs qui ont démontré que la région codée par les gènes *US2* à *US11* n'était pas indispensable à la réplication virale, mais étaient impliquées dans la régulation négative des molécules HLA à la membrane (Jones *et al.* 1995). En outre leur extrême conservation (>97%)

laisse supposer à un rôle essentiel dans le cycle de réplication et/ou dissémination du HCMV (Murphy *et al.* 2003; Dolan *et al.* 2004).

Présente dès le relargage du contenu du virion dans la cellule-hôte, la protéine tégumentaire pp71 (UL82) lie et retarde l'export des molécules HLA-I du RE vers le Golgi (Trgovcich *et al.* 2006) tandis que pp65 participe également en liant et accumulant les molécules HLA-DR dans les lysosomes, entraînant leur dégradation (Odeberg *et al.* 2003). La protéine US3, la seule protéine US induite dès la phase IE de l'infection, se lie à la chaîne lourde α des molécules HLA-I et aux chaînes α et β des molécules HLA-II, bloquant la formation des complexes dimériques α/β_2m et trimériques α/β /chaîne invariante Ii, respectivement, et finalement entraînant la rétention des molécules HLA dans le RE de la cellule-hôte (Ahn *et al.* 1996; Jones *et al.* 1996). US8 et US10 fonctionnent de manière identique avec les chaînes HLA-Ia (Furman *et al.* 2002; Tirabassi et Ploegh 2002). Produites précocement, les protéines US2 et US11 vont quant à elle conduire à l'exportation des chaînes des molécules HLA-I et -II du RE vers le cytoplasme, puis les rediriger par ubiquitination vers le protéasome où elles seront dégradées (Wiertz *et al.* 1996 (a), 1996 (b); Jones et Sun 1997; Tomazin *et al.* 1999; Gewurz *et al.* 2001; Shamu *et al.* 2001; Rehm *et al.* 2002).

La production précoce d'IFN- γ par les NK et LT $\gamma\delta$ dans le contexte de l'infection virale va induire la surexpression de protéines HLA-I et -II, permettant potentiellement de contrebalancer les fonctions inhibitrices des immunoévasines virales, et augmenter l'efficacité antivirale des réponses T $\alpha\beta$ conventionnelles (Fink *et al.* 2012). Cependant, le HCMV freine la régulation positive des molécules HLA-I et -II due à la voie de l'IFN- γ en inhibant la transduction du signal par redirection de Jak1 de la voie Jak/Stat vers le protéasome, ainsi que l'expression du coactivateur transcriptionnel CIITA (Class II major histocompatibility complex transactivator) (Le Roy *et al.* 1999; Miller *et al.* 1998).

Le HCMV est également capable de coder par l'ORF UL111a un homologue viral de la cytokine IL-10 : la CmvIL-10 (Kotenko *et al.* 2000). Malgré uniquement 27% d'homologie avec son équivalent humain, la cmvIL-10 peut se lier et rentrer en compétition avec l'IL-10 humaine pour l'interaction avec le récepteur endogène de l'IL-10 (Jones *et al.* 2002). Parmi ses fonctions, elle va

notamment *in vitro* inhiber l'expression membranaire des molécules HLA-I et -II dans l'environnement (Spencer *et al.* 2002; Chang *et al.* 2004), diminuant la reconnaissance des cellules infectées par les LT CD4⁺ et CD8⁺ anti-HCMV.

Altération du répertoire peptidique présenté en surface aux LT CD8⁺

Le HCMV a également à sa disposition des immunoévasines qui vont diminuer voire même empêcher la présentation d'épitopes viraux dans des contextes de restriction HLA-I, altérant le répertoire peptidique membranaire de la cellule infectée.

US3 est également capable de lier la tapasine, inhibant le chargement peptidique de nombreux variants alléliques HLA-Ia (Park *et al.* 2004). La protéine virale tardive US6 empêche le changement de conformation dépendant de l'ATP des protéines de transport antigénique TAP (Transporter associated with antigen processing), bloquant la translocation des peptides antigéniques du cytoplasme dans le RE, empêchant ainsi le chargement et la stabilisation nécessaires à l'expression membranaire normale des HLA-I dans les cellules infectées (Ahn *et al.* 1997; Lehner *et al.* 1997; Hengel *et al.* 1997; Hewitt *et al.* 2001).

Le HCMV code également pour de nombreux miARN, dont certains participent à son immunoévasion. Pour exemple, le miARN viral US4-1 diminue les réponses T CD8⁺ anti-HCMV envers les cellules infectées, en ciblant spécifiquement l'ARNm codant pour la protéine ERAP1 (Endoplasmic reticulum aminopeptidase 1), une aminopeptidase du RE chargée de réduire les peptides antigéniques à leur taille et configuration optimale pour pouvoir être apprêtés et présentés dans les HLA-I, dans le but de diminuer la présentation d'épitopes viraux (Kim *et al.* 2011).

Plus spécifiquement, la protéine pp65 (UL83) conduit à la phosphorylation des protéines IE72 (IE1) et IE86 (IE2). Cette modification post-traductionnelle empêche la génération et l'apprêtement des épitopes IE reconnus normalement dans les contextes de restriction HLA-I, limitant ainsi leur présentation membranaire et leur reconnaissance par les LT CD8⁺ spécifiques (Gilbert *et al.* 1993, 1996). Cependant, ce mécanisme ne semble que partiellement efficace

étant donné l'immunodominance de la réponse dirigée contre IE72 médiée par les LT CD8⁺ et CD4⁺ chez les individus séropositifs.

Si la diminution, voire l'arrêt, de l'expression membranaire des molécules HLA-I enraye la réponse immunitaire T, elle pourrait conduire à la levée de l'inhibition des cellules NK et à la lyse spontanée des cellules défectueuses par reconnaissance de l'absence du Soi. Cependant, l'infection à HCMV induit aussi la production de protéines virales dans la cellule-hôte afin de limiter le contrôle de la réplication virale par les NK, visant à 1) diminuer les capacités d'activation des NK, et 2) inhiber directement les NK - et au passage les LT - par activation de récepteurs inhibiteurs, en mimant l'expression de molécules HLA-I membranaires.

Diminution de l'expression des ligands de récepteurs activateurs

L'infection à HCMV induit l'expression membranaire de molécules du stress : MICA, -B (MHC class I chain-related protein A et B) et les différents membres de la famille ULBP1-4 (UL16-binding protein 1 à 4) (Mazzarino *et al.* 2005). Ces 6 molécules sont les ligands du récepteur activateur - ou coactivateur - NKG2D, exprimé par les cellules NK et les LT CD8.

Néanmoins, les ligands de NKG2D sont aussi la cible de mécanismes d'immunosubversion spécifiques au HCMV. La protéine UL16 a pour fonction de lier et séquestrer les protéines de stress MICB et ULBP-1, -2 et 6 dans le RE et le Golgi, empêchant leur transport intracytoplasmique et leur expression membranaire, diminuant finalement la lyse des cellules infectées par les NK NKG2D⁺ (Cosman *et al.* 1997, 2001; Kubin *et al.* 2001; Dunn *et al.* 2003; Rölle *et al.* 2003). US12, US13 et US20 agissent de concert avec UL16 et permettent la dégradation directe de MICB et ULBP2 (Fielding *et al.* 2017). De plus, le miARN viral UL112 permet d'inhiber la traduction de l'ARNm codant pour MICB (Stern-Ginossar *et al.* 2007). La protéine UL142 permet quant à elle de lier et bloquer l'export membranaire des protéines MICA dans le Golgi et ULBP3 dans le cytoplasme, bien que la protéine tronquée codée par MICA*008 ne soit pas touchée (Chalupny *et al.* 2006; Bennett *et al.* 2010). La protéine virale UL141 est pléiotrope : elle régule négativement l'activité des NK *in vitro* en entraînant

la diminution de l'expression membranaire par rétention intracellulaire dans le RE de MICA (Wills *et al.* 2005), de TRAIL-R (Smith *et al.* 2013), de CD155 et CD112 (ligands des récepteurs activateurs CD226 (DNAM-1) et CD96 (TACTILE) pour CD155 uniquement) (Tomasec *et al.* 2005; Prod'homme *et al.* 2010). UL141 agit en partenariat avec US2 pour rediriger CD112 vers le protéasome où elle sera dégradée (Hsu *et al.* 2015).

La protéine cellulaire de stress B7-H6, ligand naturel du récepteur de lyse naturelle NKp30 exprimé par les cellules NK (Brandt *et al.* 2009), est induit par l'infection à HCMV. Cependant, les protéines virales US18 et US20 agissent ensemble pour inhiber son expression membranaire, diminuant ainsi la reconnaissance des cellules infectées par les NK NKp30⁺ (Fielding *et al.* 2017). En outre, la protéine pp65 (UL83) issue de l'apoptose ou de lysats des cellules infectées par le HCMV, se lie *in vitro* à la partie extracellulaire de NKp30, conduisant à son dysfonctionnement par dissociation de la chaîne CD3 ζ indispensable à la transduction du signal, diminuant ainsi l'activité cytotoxique des cellules NK NKp30⁺ (Arnon *et al.* 2005).

Maintien des interactions avec les récepteurs inhibiteurs KIR2/3DL et HLA-E

En supplément de la diminution de l'expression des ligands de récepteurs activateurs à la surface de la cellule-hôte, le HCMV est capable de détourner des ligands cellulaires de récepteurs inhibiteurs - ou d'en mimer d'autres aux moyens d'homologues fonctionnels viraux - afin de maintenir l'inhibition directe exercée sur les cellules NK et les LT. Deux protéines virales participent ensemble à ce phénomène : UL18 et UL40.

UL18

UL18, homologue structurel à la chaîne α des molécules HLA de classe Ia avec qui il partage 25% d'homologie, est exprimé à la membrane des cellules infectées par le HCMV (Beck et Barrell 1988), sous la forme d'une protéine mature fortement glycosylée (Griffin *et al.* 2005). Sa stabilisation est dépendante de la formation d'un complexe tripartite dans lequel il est associé à

la microglobuline bêta 2 ($\beta 2m$) (Browne *et al.* 1990) et un peptide endogène dérivé de protéines cytoplasmiques similaire à ceux stabilisant les molécules HLA-I classiques (Fahnestock *et al.* 1995). Le répertoire peptidique présenté par UL18 semble restreint du fait de la conservation de la composition et la structure du sillon peptidique au sein de différentes souches IC du HCMV, et il a des caractéristiques communes avec celui présenté par HLA-A*02 ; en effet, les peptides présentés par UL18 possèdent comme résidus d'ancrage en P2 une leucine ou une méthionine et en P9 des petits acides aminés hydrophobes (Yang et Bjorkman 2008).

Étonnamment, son expression est dépendante de TAP : il a été démontré que UL18 est capable d'induire la dissociation de US6 de TAP dans le RE, afin de suffisamment lever l'inhibition exercée par cette dernière sur le système de translocation de peptides pour assurer sa propre expression, le tout sans restaurer l'expression de molécules HLA-I membranaires. En effet, UL18 est également capable d'inhiber l'interaction entre HLA-I, TAP-1 et la tapasine, empêchant ainsi le chargement de peptides optimaux (Kim *et al.* 2008). Transcrit durant la phase L de la réplication active du HCMV (Hassan-Walker *et al.* 1998), l'expression membranaire de UL18 n'est influencée par aucune des immunoévasines du HCMV ciblant les molécules HLA (US2/3/6/11 & UL16) (Park *et al.* 2002; Y. Kim *et al.* 2008; Prod'homme *et al.* 2012), mais peut être contrôlée par un mécanisme inconnu dépendant du HCMV (Maffei *et al.* 2008).

UL18 interagit avec une affinité 1000 fois plus élevée que les ligands HLA-I naturels avec les récepteurs membranaires inhibiteurs ILT-2 exprimés par les cellules NK (et une sous-population de LT) (Chapman *et al.* 1999), et ce par interaction impliquant uniquement le domaine $\alpha 3$ de UL18 et la $\beta 2m$ (Yang et Bjorkman 2008). En ce sens, des protéines UL18 solubles vides de peptide sont capables de lier ILT2 aussi efficacement que leurs contreparties hétérotrimériques (Chapman *et al.* 1999). Bien que faiblement exprimé à la surface cellulaire des cellules infectées, son expression membranaire conduit à l'inhibition *in vitro* des fonctions cytokiniques et cytolytiques des cellules NK ILT-2⁺ face à des cellules infectées par le HCMV (Reyburn *et al.* 1997; Prod'homme *et al.* 2007, 2012). Il permet également d'inhiber la production d'IFN- γ par les LT activés ILT-2⁺ *in vitro* (Wagner *et al.* 2007). En outre, le polymorphisme des domaines extracellulaires de UL18 affecte sa fonction : l'affinité des variants

UL18 pour ILT-2 corrèle avec leur habilité à inhiber les cellules NK ILT2⁺ (Valés-Gómez *et al.* 2005). De manière intéressante, UL18 ne semble pas pouvoir interagir avec des récepteurs (co-) activateurs comme le TCR, le CD8 et les KIR2/3DS, ou inhibiteurs, comme les KIR2/3DL, au contraire de ses homologues humains HLA-I. En effet, des analyses *in silico* montrent que les résidus des domaines $\alpha 1$, $\alpha 2$ et le peptide présenté sont inaccessibles du fait de la présence de carbohydrates associés à de nombreux sites de N-glycosylations extrêmement conservés parmi différentes souches IC de HCMV (Yang et Bjorkman 2008), alors que ces derniers n'influencent pas la liaison à ILT-2 de UL18 (Chapman *et al.* 1999). Cependant, l'expression membranaire de UL18 dans des fibroblastes semble induire l'activation des cellules NK ILT-2⁻ par un mécanisme inconnu (Prod'homme *et al.* 2007).

UL40

Le gène *UL40* encode pour une glycoprotéine de 221 acides aminés, avec une séquence signal de 37 acides aminés, et est transcrit et traduit pendant les phases E et L du cycle de réplication virale (Tomasec *et al.* 2000; Ulbrecht *et al.* 2000). La fonction de la protéine virale UL40 demeure inconnue. Cependant, la séquence signal de UL40 fournit un peptide nonamérique (UL40₁₅₋₂₃) capable de stabiliser la protéine HLA-E (Millo et Damonte 2009) indépendamment de TAP (Tomasec *et al.* 2000; Ulbrecht *et al.* 2000) (**Figure 15**). Cela permet de maintenir voire augmenter son expression membranaire, tout en assurant la reconnaissance et l'inhibition de la lyse des cellules infectées par les cellules NK exprimant le récepteur inhibiteur CD94/NKG2A (Tomasec *et al.* 2000; Ulbrecht *et al.* 2000). En ce sens, les cellules infectées par le HCMV sont protégées à long terme de la lyse médiée par les cellules NK CD94/NKG2A⁺ dépendamment de UL40 et à partir du début de la phase L de réplication du virus *in vitro* (Wang *et al.* 2002). Cette fonction est strictement liée à la capacité de UL40 à fournir ce peptide nonamérique dans sa séquence signal, des expériences de mutagénèse ou de délétion ayant montrée qu'en cas d'absence de ce nonamère, l'expression de la protéine HLA-E est diminuée (Prod'homme *et al.* 2012). En outre, ce peptide peut également s'ancrer dans UL18, favorisant la stabilisation et l'expression membranaire de la forme mature et hautement glycosylée de cette protéine, et *in fine* l'inhibition des cellules immunitaires exprimant ILT2

(Prod'homme *et al.* 2012). De plus, bien que l'expression membranaire de la protéine HLA-E soit régulée négativement par US6 (Prod'homme *et al.* 2012), elle demeure insensible à l'action des immunoévasines US2, US3 et US11 (Tomasec *et al.* 2000; Llano *et al.* 2003), tandis que l'expression d'UL40 n'est pas affectée par UL16 (Prod'homme *et al.* 2012).

Le locus *UL40* est variable au sein des différentes souches du HCMV isolées en clinique ; en effet, près de 10% de variabilité protéique interindividuelle existe entre les gènes *UL40* isolés chez 4 patients receveurs de rein (Garrigue *et al.* 2007). Par contre, le gène *UL40* semble relativement conservé à court-terme chez des patients receveurs de CSH (D⁺/R⁺), soit pendant la 1^{ère} année post-transplantation chez 8 patients ayant subi 2 à 3 réactivations virales. Cependant, 3 profils distincts émergent du suivi de patients transplantés rénaux : chez les individus primo-infectés (D⁺/R⁻), le gène *UL40* est soit complètement conservé, soit significativement variable au cours de la 1^{ère} année post-transplantation, tandis que chez les patients D⁺/R⁺, le gène *UL40* est relativement variable, témoignant d'une potentielle co-infection à HCMV (Garrigue *et al.* 2007, 2008). La plus grande variabilité du gène *UL40* est située en outre dans la séquence codant pour le peptide nonamérique stabilisant HLA-E (Heatley *et al.* 2013). Ainsi, de nombreux variants polymorphiques du peptide nonamérique existent selon les souches virales de laboratoire (Tomasec *et al.* 2000; Cerboni *et al.* 2001) ou cliniques (Garrigue *et al.* 2008; Heatley *et al.* 2013). Ils conservent globalement les caractéristiques des peptides physiologiques stabilisant HLA-E *in vivo* issus des séquences signal HLA classiques (voir Partie 4 de cette introduction) et ne varient généralement que par 0 à 2 acides aminés (**Tableau 6**).

Tableau 6 : Variabilité des peptides nonamériques (n=28) issus de *UL40*₁₅₋₂₃ à partir de patients receveurs de CSH (n=32). Abréviations : IC : Isolat Clinique ; - : acide aminé identique à Merlin/AD169. D'après Heatley *et al.* 2013.

Souche HCMV	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8	P9	Nb d'isolats
Merlin/AD169	V	M	A	P	R	T	L	I	L	15/28
Toledo	-	-	-	-	-	-	-	V	-	2/28
Towne	-	-	-	-	-	-	-	L	-	5/28
109B	-	-	T	-	-	-	-	V	-	4/28
IC	-	-	-	-	-	I	-	-	-	1/28
IC	-	-	-	-	-	S	-	-	-	1/28
AF1	-	-	-	-	-	S	-	L	-	2/28
IC	-	-	-	-	Q	S	-	L	-	1/28
IC	-	-	-	-	-	-	-	F	V	1/28

En conséquence, ces divers peptides permettent la stabilisation de HLA-E à des degrés variables *in vitro* (Heatley *et al.* 2013). Par exemple, la présence d'une thréonine en lieu et place d'une méthionine en P2 du peptide viral annihile également la capacité du peptide nonamérique à stabiliser HLA-E (Tomasec 2000). Par contre, elle n'affecte pas sa capacité à stabiliser UL18, dont les propriétés du sillon peptidique à lier et présenter des peptides issus de la séquence signal de UL40 semblent plus flexibles (Prod'homme *et al.* 2012). En ce sens, la liaison d'un peptide octamérique –tronqué du résidu en P1 – dans le sillon peptidique de UL18 induit son expression membranaire stable, bien que ce peptide soit incapable de lier HLA-E, (Prod'homme *et al.* 2012). Il a été déterminé que 5,5% des souches cliniques du HCMV possèdent une mutation dans le codon « start » de l'ARNm du gène *UL40*, conduisant à un décalage du début de la traduction de 15 codons en aval, ayant pour conséquence de tronquer le peptide nonamérique issu de UL40 de son 1^{er} acide aminé et de fournir ce variant du peptide signal UL40 (Sijmons *et al.* 2015).

Finalement, la séquence du nonamère affecte aussi l'interaction entre HLA-E/UL40 et CD94/NKG2A ou CD94/NKG2C, même si l'affinité de cette interaction avec le récepteur inhibiteur est en moyenne 6 fois plus élevée que celle avec le récepteur activateur à peptide identique (Heatley *et al.* 2013) (**Tableau 7**). De manière globale, la reconnaissance de HLA-E par les récepteurs CD94/NKG2 (A/C) est tolérante aux polymorphismes qui introduisent des substitutions conservatrices aux résidus P1, P4 et P8 (Heatley *et al.* 2013).

Tableau 7: Capacité de stabilisation de HLA-E et de reconnaissance par les récepteurs CD94/NKG2 des peptides signaux issus de UL40. D'après Heatley *et al.* 2013.

Peptide	Liaison à HLA-E	CD94/NKG2A		CD94/NKG2C	
		Interaction (SPR)	Lyse par NK	Interaction (SPR)	Lyse par NK
VMAPRTLIL	+++	+++	+++	++	?
VMAPRTLVL	+++	+++	?	++	?
VMAPRTLLL	+++	+++	+++	++	+++
VMTPTLVL	++	++	++	-	+
VMAPRILIL	++	+	++	-	-
VMAPRSLLL	+++	+++	?	++	?
VMAPRSLIL	+++	+++	?	++	?
VMAPQSLLL	++	+	-	-	-
VMAPRTLFLV	+	++	?	+	?

Le système UL40 semble relativement efficace *in vivo*, comme en témoigne la sélection positive de 8 codons de UL40, dont 4 codant notamment pour les acides aminés en position 3, 6, 7 et 8 du peptide nonamérique, augmentant le « fitness » du HCMV, c.à.d. sa capacité à perdurer et se propager au sein de la population (Sijmons *et al.* 2015). En ce sens, il a été observé *in vitro* que des substitutions aux résidus P3, P5 et P6 avaient un impact marqué sur la reconnaissance des complexes HLA-E/UL40 par les récepteurs CD94/NKG2 (Heatley *et al.* 2013).

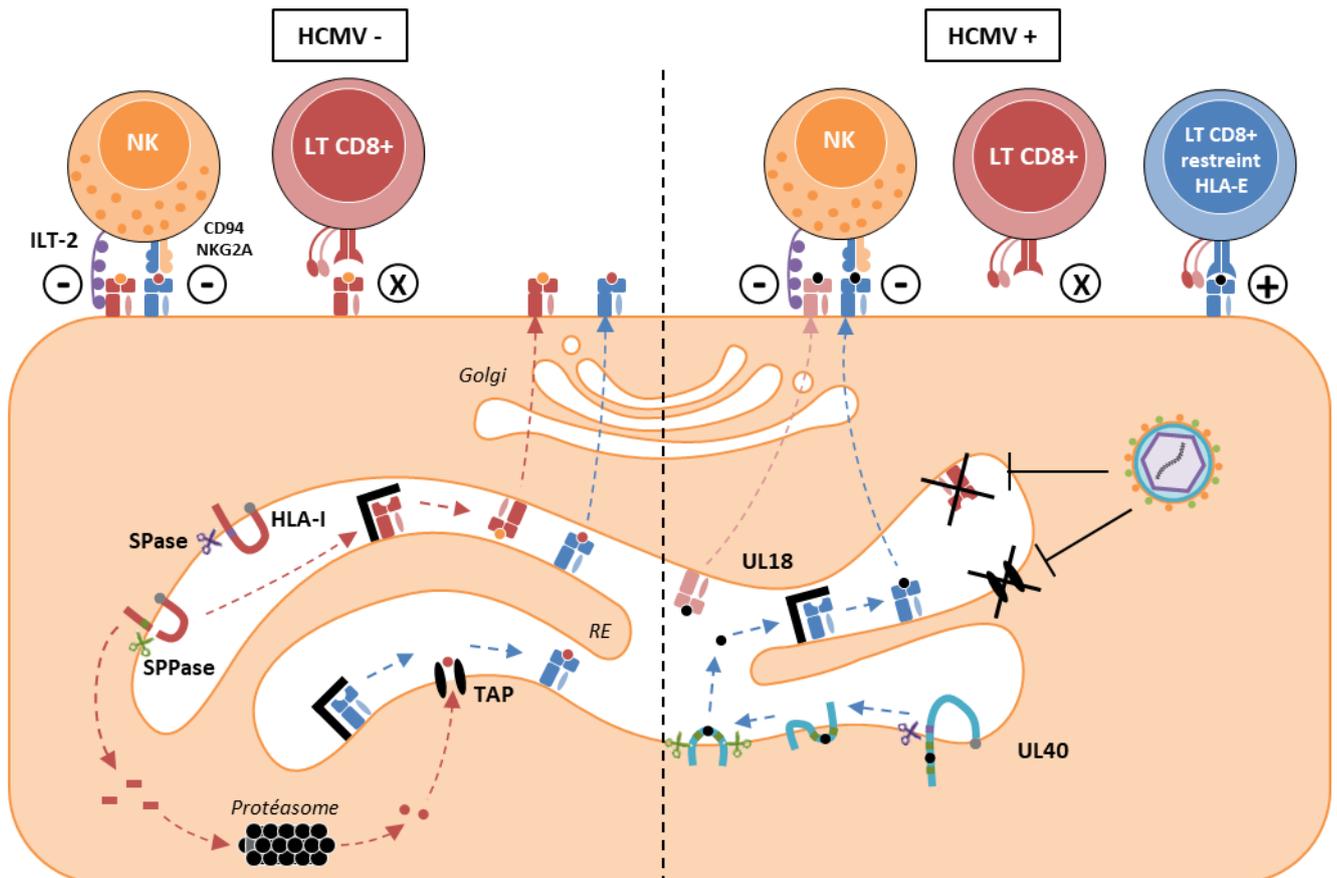


Figure 15 : Principes théoriques de présentation et de fonctionnement des protéines UL18 et UL40 en cas d'infection à HCMV. En condition physiologique (HCMV⁻), la synthèse des protéines classiques HLA-I dans le réticulum endoplasmique (RE) conduit au relargage de la séquence signal dans le cytoplasme suite au clivage successif par les enzymes SPase et SPPase (Signal Peptidase et Signal Peptide Peptidase) (Lemberg *et al.* 2001). La prise en charge de la séquence signal par le protéasome conduit alors à la production de peptides signaux nonamériques (HLA₃₋₁₁), capables de lier HLA-E indépendamment de TAP. Les protéines HLA-I et HLA-E alors stabilisées sont acheminées à la membrane plasmique via l'appareil de Golgi (Golgi). La présence de HLA-I complexé à un peptide du Soi permet la liaison avec le récepteur inhibiteur ILT-2 et l'absence de reconnaissance par les LT CD8⁺ conventionnels, tandis que celle de HLA-E induit la liaison au récepteur inhibiteur CD94/NKG2A. En condition pathologique (HCMV⁺), le virus entraîne l'inhibition de l'expression membranaire des protéines HLA-I classiques et du système TAP, et la production de la protéine virale UL40. La prise en charge successive de UL40 par les enzymes SPase et SPPase permet la production d'un peptide signal nonamérique (UL40₁₅₋₂₃) capable de stabiliser et lier UL18 et HLA-E indépendamment de TAP. L'absence de HLA-I en surface complexé à des peptides viraux empêche la reconnaissance de la cellule infectée par les LT CD8⁺ conventionnels, tandis que l'expression membranaire des protéines UL18 et HLA-E maintient l'inhibition des NK via leurs interactions respectives avec ILT-2 et CD94/NKG2A. Cependant, l'expression membranaire de la protéine virale HLA-E semble participer à l'émergence de NK CD94/NKG2C⁺ (non

représentés) et de lymphocytes T CD8⁺ restreints par HLA-E spécifiques du HCMV. D'après Prod'homme *et al.* 2012.

À ce jour, bien qu'il n'ait pas été décrit – et qu'il est apparemment hautement improbable – que les complexes UL18/UL40₁₅₋₂₃ puissent être un ligand potentiel de LT spécifiques, il a été démontré que la présentation à la membrane du nonamère issu de UL40 pouvait être la cible de réponses T CD8⁺ restreintes par HLA-E, populations non conventionnelles au centre de cette thèse.

PARTIE 4 : LES LT CD8 RESTREINTS PAR HLA-E ANTI-HCMV

HLA-E

Organisation génomique et structure protéique

Découvert à la fin des années 80 par 3 groupes indépendants, le gène *HLA-E* est situé entre les gènes *HLA-C* et *HLA-A* sur le bras court du chromosome 6 (Srivastava *et al.* 1987; Koller *et al.* 1988; Mizuno *et al.* 1988). Il est organisé de manière similaire aux gènes codant les HLA de classe I conventionnels (dit de classe Ia) et est constitué de 8 exons (**Figure 16 A**). Bien que l'homologie du gène *HLA-E* varie entre 50% et 90% (moyenne 82%) avec les gènes *HLA-Ia*, elle reste inférieure à celle existant entre les gènes *HLA-A*, *-B* et *-C*. Plus précisément, l'homologie de la portion codant pour le domaine $\alpha 3$ entre *HLA-E* et les gènes *HLA-Ia* est très importante (92%), mais beaucoup plus divergente pour les portions codant pour les domaines $\alpha 1$ et $\alpha 2$ (Heinrichs et Orr 1990).

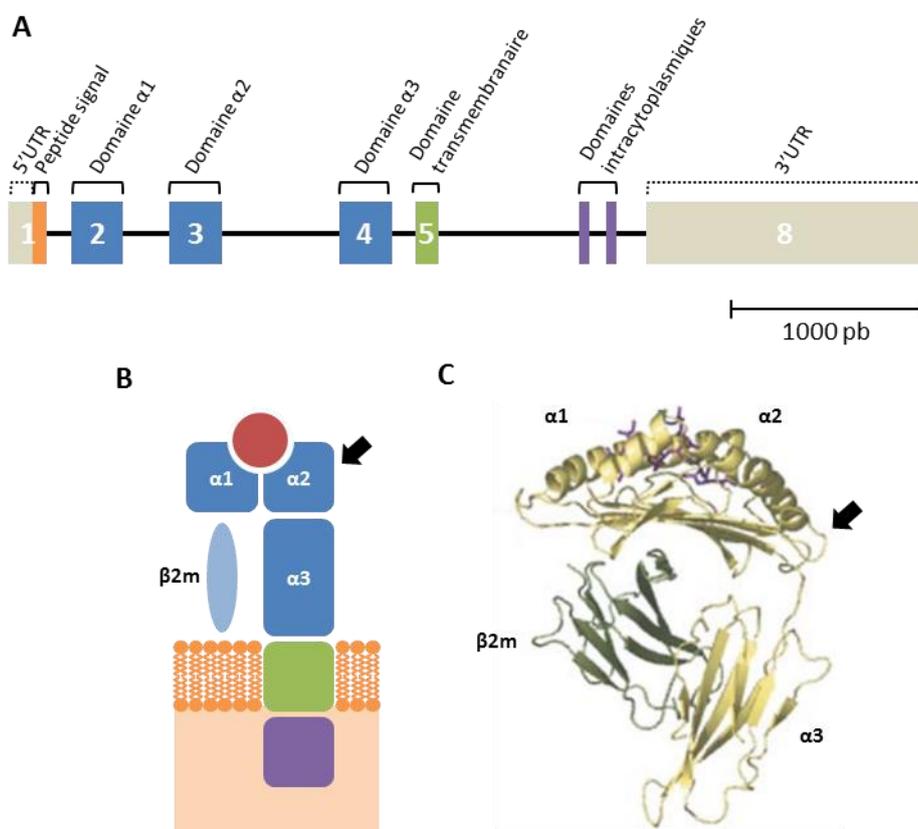


Figure 16 : Structure génique (A) et protéique (B : schéma - C : structure cristallographique) de HLA-E. La flèche en noire indique la position de l'acide aminé 107, unique résidu variable entre les 2 formes protéiques majoritaires de HLA-E. D'après Sullivan *et al.* 2006.

Le gène *HLA-E* code pour la protéine homonyme. HLA-E est une glycoprotéine transmembranaire exprimée à la surface cellulaire sous forme d'un complexe hétérotrimérique stable, similaire à celui des HLA-Ia. En effet, les domaines extracellulaires $\alpha 1$ et $\alpha 2$ forment un sillon permettant l'ancrage et la présentation d'un peptide, tandis que le domaine extracellulaire $\alpha 3$ permet l'interaction avec la chaîne légère invariante $\beta 2m$ stabilisante (**Figure 16 B-C**).

Profil d'expression transcriptionnelle et membranaire

La transcription du gène *HLA-E* est ubiquitaire et constitutive dans toutes les cellules nucléées, avec des niveaux d'expression variables. Cependant, la protéine HLA-E se caractérise par un profil d'expression membranaire plus restreint. Ainsi, les protéines HLA-E sont physiologiquement exprimées à la membrane de toutes les cellules immunitaires des lignées lymphoïde et myéloïde, des cellules endothéliales, des cellules épithéliales, des mélanocytes, des kératinocytes et des cellules du trophoblaste (Derre *et al.* 2006; Coupel *et al.* 2007; Perera *et al.* 2007; Lo Monaco *et al.* 2008). En outre, le niveau d'expression protéique de HLA-E est bien inférieur à celui des molécules HLA-Ia. En effet, tandis que le niveau d'expression évalué par spectrométrie de masse dans des PBL de donneurs sains de HLA-A et -B est similaire et près de 4 à 5 fois supérieur à celui de HLA-C, le niveau d'expression de HLA-E est 25 fois inférieur à ce dernier (Apps *et al.* 2015).

La transcription et la traduction de HLA-E peuvent être régulées positivement ou négativement. Toute situation pro-inflammatoire conduit à l'augmentation des taux de transcription, traduction et expression à la membrane de HLA-E dans de nombreux types cellulaires, quel que soit le variant allélique, via l'activation cellulaire et/ou la présence de cytokines comme l'IFN- γ et/ou le TNF- α (Malmberg *et al.* 2002; Derre *et al.* 2006; Coupel *et al.* 2007; Nguyen *et al.* 2009). À l'inverse, le miARN cellulaire miR-376a(e) est produit en réponse à l'infection à HCMV dans des cellules-hôtes épithéliales ou fibroblastiques, et permet de cibler et diminuer spécifiquement la traduction de l'ARNm codant HLA-E, réduisant l'expression membranaire de la protéine et court-circuitant le mécanisme d'immunoévasion médié par UL40 sur le long-terme (Nachmani *et al.* 2014).

Extrêmement préservé au sein des vertébrés, le gène *HLA-E* demeure le locus CMH le plus conservé au sein des primates de l'Ancien et Nouveau Monde, malgré sa position dans une zone du génome hautement variable (Knapp, Cadavid, et Watkins 1998). En ce sens, le polymorphisme allélique du gène *HLA-E*, et de ses gènes orthologues également, reste très restreint (Boyson *et al.* 1995; Knapp *et al.* 1998; Adams et Parham 2001; Arnaiz-Villena *et al.* 2007). Ainsi, le gène *HLA-E* est un des plus conservés de tout le locus HLA de classe I, et à ce jour, seulement 26 allèles ont été décrits dans la population humaine mondiale - contre plus de 12000 pour les allèles *HLA-Ia* - qui se différencient par 25 SNP, dont 8 en substitutions non-synonymes, 5 en synonymes dans les exons, et 12 dans les introns, conduisant à la production de 9 protéines HLA-E contre plus de 8000 pour les protéines HLA-A, -B et -C (novembre 2017 ; database IMGT/HLA v.3.28.0 : Robinson *et al.* 2015).

Deux allèles uniquement sont retrouvés majoritairement dans la population mondiale, *HLA-E*01:01* et **01:03*, dans plus de 98% des haplotypes (Felício *et al.* 2014). Chacun de ces allèles est retrouvé à près de 50% en fréquence allélique dans la population humaine mondiale, indépendamment de l'ethnie ou de la localisation géographique (Felício *et al.* 2014). L'allèle *HLA-E*01:03* est certainement plus ancien en terme évolutif, du fait de l'absence d'équivalents à l'allèle *HLA-E*01:01* chez les primates non-humains (Grimsley et Ober 1997). En accord avec le modèle de Hardy-Weinberg, la population humaine panmictique à l'échelle mondiale est répartie dans 3 groupes selon le génotype *HLA-E* : 25% d'homozygotes *HLA-E*01:01*, 25% d'homozygotes *HLA-E*01:03* et 50% d'hétérozygotes *HLA-E*01:01/01:03* (Felício *et al.* 2014). La conservation égale de ces 2 allèles ainsi que la maintenance de ces génotypes dans ces proportions dans la population mondiale semblent être due à une sélection naturelle tendant vers l'équilibre, soulignant un avantage évolutif potentiel à être hétérozygote pour le locus *HLA-E* ainsi qu'à une différence fonctionnelle probable entre les 2 protéines (Grimsley et Ober 1997).

De même, la structure protéique de HLA-E est relativement conservée entre les différents orthologues présents dans le règne animal. La structure des poches dans le sillon peptidique, la nature hydrophobe des peptides présentés et l'origine du répertoire peptidique restent similaires entre différentes espèces

(Braud *et al.* 1997; Yeager *et al.* 1997). Sur les 9 protéines, seules 6 sont réellement retrouvées exprimées à la membrane dans la population humaine. En effet, le variant protéique issu de *HLA-E*01:08* est tronqué du fait d'un codon Stop prématuré dans l'exon 2, tandis que l'existence des protéines issues des allèles *HLA-E*01:02* et *01:04* est fortement remise en cause du fait de leur identification parmi la population japonaise publiée dans un seul et unique papier, et plus jamais retrouvées ni dans cette dernière, ni dans la population mondiale (Ohya *et al.* 1990; Grimsley *et al.* 2002).

Cependant, étant donné la représentation majoritaire des allèles *HLA-E*01:01* et *01:03*, ainsi que la relative conservation des domaines $\alpha 1$ et $\alpha 2$ pour les autres allèles minoritaires, seuls leurs produits homonymes de traduction sont essentiellement retrouvés dans la population humaine. Ces deux variants protéiques se distinguent par un seul et unique acide aminé en position 107 : Arginine (R) pour *HLA-E*01:01* et Glycine (G) pour *HLA-E*01:03*. Positionnée dans une boucle entre des feuillets β localisés sur la face externe du domaine extracellulaire $\alpha 2$, soit en dehors du sillon peptidique, cette divergence n'a vraisemblablement pas d'impact direct sur la liaison au peptide de HLA-E, ni sur le répertoire peptidique présenté en conditions physiologiques, bien qu'une incidence indirecte demeure possible en perturbant la structure des acides aminés constituant le sillon peptidique (Strong *et al.* 2003). Le dimorphisme protéique n'introduit aucun changement en termes de structure globale, d'interaction avec la $\beta 2m$ ou de conformation spatiale, mais une différence notable de stabilité d'expression à la membrane existe entre les deux variants du fait d'une stabilité thermique distincte, au profit de *HLA-E*01:03* (Ulbrecht *et al.* 1999; Maier *et al.* 2000; Strong *et al.* 2003). Cette plus grande stabilité thermique influence la demi-vie de la protéine membranaire, avec un impact potentiel sur les temps d'interactions de HLA-E avec divers effecteurs immuns. De plus, de façon générale, le temps de demi-vie des protéines HLA-E à la membrane est relativement court (13 min à 37°C), traduisant soit une stabilité faible, soit un recyclage rapide des (Ulbrecht *et al.* 1999; Kambayashi *et al.* 2004). En ce sens, le variant protéique *HLA-E*01:01* est moins stable physiologiquement que le *HLA-E*01:03*, et semble d'autant moins exprimé à la membrane (Ulbrecht *et al.* 1999).

Répertoire peptidique physiologique

En condition physiologique, la protéine HLA-E lie et présente essentiellement à la membrane un répertoire peptidique restreint constitué de peptides nonamériques conservés et globalement hydrophobes, sans distinction de répertoire entre les deux formes protéiques HLA-E. Ils sont issus des séquences signal d'export au RE de molécules HLA-Ia (HLA-A, -B, -C) et HLA-Ib (HLA-G) (Braud *et al.* 1997; Braud *et al.* 1998 (b); Lee *et al.* 1998 (b); Stevens *et al.* 2001; Miller *et al.* 2003). Par contre, les séquences signal de HLA-E et -F de 21 acides aminés (contre 24 pour les autres HLA-I) génèrent des peptides octomériques incapables de s'apprêter dans HLA-E (Braud *et al.* 1998 (b)) (**Tableau 8**).

Ainsi en temps normal, l'expression membranaire stable de HLA-E nécessite l'expression intracellulaire conjointe d'au minimum un représentant HLA-Ia ou -G, ainsi que d'un système d'apprêtement et de présentation de peptides fonctionnels (Braud *et al.* 1998 (b)). Durant l'initiation de leur traduction, les molécules HLA-I sont exportées et prises en charge par le RE rugueux, afin d'y être pleinement produites dans la lumière du réticulum. Durant cette étape, des enzymes SP et SPPase présentes dans la membrane du RE clivent la séquence signal des molécules HLA-I (Lemberg *et al.* 2001; Weihofen *et al.* 2002). Ceci conduit au relargage de la partie N-terminale qui sera clivée dans le cytosol, avant d'être acheminée et prise en charge par le protéasome, afin de générer le peptide optimal 3-11 (Bland *et al.* 2003). Ces nonamères sont finalement exportés dans la lumière du RE grâce à TAP, puis chargés dans HLA-E à l'aide de protéines chaperonnes du complexe de chargement peptidique (Braud *et al.* 1998 (b); Lee *et al.* 1998 (b); Ulbrecht *et al.* 1998). Les protéines HLA-E stabilisées sont alors transférées alors jusqu'à la membrane plasmique via l'appareil de Golgi (Braud *et al.* 1998 (b)) (mécanisme illustré en **Figure 15**).

Tableau 8 : Répertoire peptidique physiologique de HLA-E : origine, fréquence et capacité de liaison des peptides canoniques. Les fréquences des peptides ont été calculées dans leur classe HLA respective à partir des fréquences alléliques des gènes *HLA-A*, *-B*, *-C*, *-E*, *-F* et *-G* au sein d'une population caucasienne (n=8084, données libres d'accès issues de registres de dons de moelle osseuse établis à partir d'individus caucasiens résidant en France à Nantes, Rennes, Bordeaux, Grenoble, Marseille).

Peptide signal	Origine HLA ₃₋₁₁	Fréquence allélique (pop. Caucasienne)	Liaison à HLA-E
VMAPRTLLL	HLA-A: *01, *03, *11,*29,*30,*31,*32,*33,*36, *74	0.5041 (A)	High ^{a,b}
	HLA-C: *02, *15	0.0696 (C)	
VMAPRTLVL	HLA-A: *02, *10, *23, *24,*25,*26, *28, *34, *43, *66, *68, *69	0.4948 (A)	High ^{a,b}
VMPRTLLL	HLA-A: *80	0.0001 (A)	ND
IMAPRTLVL	HLA-A: *34:01	<0.0001 (A)	High ^a
VMAPRTVLL	HLA-B: *07, *08, *14, *15, *38, *39, *42, *48, *62, *63, *64, *65, *67,*73, *75, *81	0.3282 (B)	High ^{a,b}
	HLA-B: *13, *18, *27, *35:42, *37, *40 (19.6%), *44, *47, *54, *55, *56, *59, *60, *61, *82, *83		
VTAPRTLLL	HLA-B: *5, *07:65, *15, *21, *35, *40 (80.3%), *41, *44:18, *45, *46, *49, *50, *51, *52, *53, *57, *58, *60, *61, *78	0.3110 (B)	Low ^{a,b}
VTAPRTVLL	HLA-B: *5, *07:65, *15, *21, *35, *40 (80.3%), *41, *44:18, *45, *46, *49, *50, *51, *52, *53, *57, *58, *60, *61, *78	0.3596 (B)	Low ^{a,b}
VTEPRTLLL	HLA-B: *27:13	<0.0001 (B)	ND
SRRPEPSSC	HLA-B: *44:19N	<0.0001 (B)	ND
VMAPRTLIL	HLA-C: *01, *03, *04, *05, *06, *08, *12, *14, *15:43, *16, *17:02	0.6043 (C)	Med ^a /High ^b
VMAPRTLTL	HLA-C: *08:09	<0.0001 (C)	ND
VMAPGTLIL	HLA-C: *03:227	<0.0001 (C)	ND
VMAPRALLL	HLA-C: *06:17, *07, *18	0.3170 (C)	Med ^a /High ^b
VMAPQALLL	HLA-C: *17	0.0088 (C)	ND
VMAPRTLFL	HLA-G : *01	1.000 (G)	Med ^a /High ^b
MAPRSLLL*	HLA-F : *01	1.000 (F)	-
MVDGTLLL*	HLA-E : *01	1.000 (E)	-

^a Test de stabilisation peptidique ; (Braud *et al.* 1998 (b); Brooks *et al.* 1999)

^b Test de repliement *in vitro* ; (Strong *et al.* 2003)

*Les protéines HLA-E et -F possèdent des séquences signal tronquées par rapport à leurs autres homologues HLA, fournissant un peptide signal octamérique HLA-I₁₋₈

ND : Non déterminée

Structure cristallographique des complexes HLA-E/peptide

La structure cristallographique de HLA-E stabilisée par un peptide canonique a permis de déterminer la conformation du sillon peptidique et les modalités d'apprêtement des peptides. Par rapport aux peptides nonamériques

de référence, 3 résidus majeurs (2, 7 et 9) et 2 mineurs (3 et 6) sont impliqués dans l'ancrage et l'enfouissement des acides aminés dans les poches peptidiques de HLA-E. De plus, des expériences de mutagénèse ont montré que chacun des 9 acides aminés participe activement dans la liaison du peptide au sillon (Braud *et al.* 1997; O'Callaghan *et al.* 1998; Stevens *et al.* 2001; Miller *et al.* 2003; Strong *et al.* 2003). La taille des peptides, leur conformation spatiale, leur hydrophobicité et leur potentiel à établir des liaisons H sont autant de paramètres d'importance pour le peptidome physiologique présenté par HLA-E (O'Callaghan *et al.* 1998). En ce sens, une étude récente a déterminé que la conservation d'une conformation spatiale similaire entre les peptides canoniques et alternatifs était plus primordiale que celle des nombreux acides aminés d'ancrage ou de la nature globale hydrophobe du peptide, du fait de la rigidité relative du sillon peptidique de HLA-E, capable de rester ouvert même en absence de peptides canoniques, au contraire de celui de HLA-A*02:01 (Hansen *et al.* 2016). L'enfouissement du peptide, ainsi que l'implication et la nature globalement hydrophobe de chaque acide aminé dans le sillon, permettent d'expliquer la nature restreinte et conservée du répertoire peptidique physiologique. En effet, les molécules HLA-Ia sont plus flexibles, du fait de la nécessité de 2 à 3 résidus d'ancrage uniquement - en positions 2 et 9 sur un nonamère pour HLA-A*02 par exemple - conduisant à la présentation de peptides plus diversifiés (Sullivan *et al.* 2006). La liaison d'un peptide à HLA-E semble labile et moins stable que celle d'un peptide à une protéine HLA-I classique (Kambayashi *et al.* 2004).

Répertoire peptidique pathologique

Durant de nombreux processus pathologiques (stress, transformation tumorale, infections d'origine virale ou bactérienne), le système d'apprêtement et présentation des peptides dans les molécules HLA-I est ciblé, par déficience fonctionnelle de TAP, d'ERAP1 ou d'autres éléments du complexe de chargement peptidique, conduisant à l'absence de la génération de peptides signaux issus de HLA-I dans le RE. Étonnamment, les molécules HLA-E sont maintenues à la surface, bien que généralement à un niveau d'expression moindre par rapport à celui de cellules saines, en cas de défaut du système TAP ou d'absence de peptides signaux HLA-I (Furukawa *et al.* 1999; Lo Monaco *et al.* 2008; Kraemer

et al. 2015; Celik *et al.* 2016). Ainsi, il fut montré que les nonamères canoniques présentés par HLA-E laissent place à des néo-peptides d'origine cellulaire ou exogène, constituant au final un répertoire peptidique alternatif plus large et plus diversifié que le répertoire canonique. Une liste non exhaustive de peptides alternatifs est présentée dans le **Tableau 9**.

Tableau 9: Origine et nature du répertoire peptidique alternatif présenté par HLA-E en condition pathologique.

Source	Peptide	Références
Hsp60 ¹⁰⁻¹⁸	QMRPVSRL	(Michaelsson <i>et al.</i> 2002)
ABC MRP7 ⁴⁹⁶⁻⁵⁰⁴	ALALVRMLI	(Wooden <i>et al.</i> 2005)
Prdx5 ⁵²⁻⁶⁰ mutée $\Delta 2$ et $\Delta 2,3$	AMAPIKTHL AMAPIKVRL	(Sensi <i>et al.</i> 2009)
Chaînes V β 1 et 2 du TCR	SLELGDSAI LLLGPGSGL	(Li <i>et al.</i> 2001)
UL40 ¹⁵⁻²³ (HCMV)	VMAPRTLVL VMAPRTLIL VMAPRTLLL	(Tomasec <i>et al.</i> 2000; Ulbrecht <i>et al.</i> 2000)
HCV core ³⁵⁻⁴⁴ (VHC)	YLLPRRGPR	(Nattermann <i>et al.</i> 2005 (a))
HIV p24 ¹⁴⁻²² (VIH)	AISPRTLNA	(Nattermann <i>et al.</i> 2005 (b))
BZLF-1 ³⁹⁻⁴⁷ (EBV)	SQAPLPCVL	(Ulbrecht <i>et al.</i> 1998)
InfIM ⁵⁹⁻⁶⁷ (Influenza)	ILGFVFTLT	(Ulbrecht <i>et al.</i> 1998)
GroEL (Salmonella typhi)	Variés	(Salerno-Gonçalves <i>et al.</i> 2004)
Variés (Mycobacterium Tuberculosis)	Variés	(Heinzel <i>et al.</i> 2002; Grotzke <i>et al.</i> 2009; Harriff <i>et al.</i> 2017)
Gliadine chaîne $\alpha 2$ ⁵²⁻⁶⁰ (Gluten de diverses céréales)	SQQPYLQLQ	(Terrazzano <i>et al.</i> 2007)

Ces peptides alternatifs conservent certaines propriétés du répertoire physiologique HLA-E, dont notamment une nature hydrophobe dominante. Cependant, une étude a démontré que la présentation de peptides canoniques physiologiques dans HLA-E*01:01 est fortement affectée dans un contexte de déficience en TAP, menant à la présentation d'un répertoire peptidique alternatif de plus de 500 peptides uniques, qui se démarquent de leurs contreparties physiologiques par un motif de liaison différent. En effet, seule la présence conservée des acides aminés d'ancrage méthionine et leucine en positions 2 et 9 fût constatée, rapprochant ces peptides de ceux composant le peptidome stabilisant HLA-A*02:01. À l'appui de ces observations, la protéine HLA-A*02:01 est capable de lier et présenter les peptides canoniques et alternatifs élués de HLA-E (Lampen *et al.* 2013).

Récemment, des rapports font état de la mise en place de répertoires peptidiques alternatifs divers et larges en absence de peptides physiologiques

canoniques, mais surtout distincts entre les 2 protéines majoritaires HLA-E, allant à l'encontre du dogme sur leur absence de différence (Kraemer *et al.* 2015; Celik *et al.* 2016). 56 peptides différents de 9 à 17 acides aminés d'origine cellulaire variée sont présentés par HLA-E*01:03 (Celik *et al.* 2016) contre 36 de longueur allant de 9 à 16 acides aminés par HLA-E*01:01 (Kraemer *et al.* 2015). Aucun chevauchement des répertoires alternatifs entre les 2 variants n'a pu être mis en évidence (Celik *et al.* 2016). De même, aucun acide aminé d'ancrage n'a pu être déterminé avec le répertoire alternatif présenté dans HLA-E*01:01, tandis que l'acide aminé Lysine est préférentiellement présent en dernière position sur les peptides stabilisant HLA-E*01:03.

Dualité fonctionnelle de HLA-E

Ligand des récepteurs CD94/NKG2

Préambule. Le polymorphisme allélique restreint et la conservation du gène *HLA-E* au sein des espèces de vertébrés est caractéristique 1) d'une ou de fonctions primordiales, et 2) d'un système ligand-récepteur, dont aucun des 2 éléments ne varie au cours de l'évolution. En 1998, deux équipes ont démontré que les récepteurs de la famille CD94/NKG2 reconnaissent et lient spécifiquement la protéine HLA-E exprimée à la membrane (Braud *et al.* 1998 (a); Lee *et al.* 1998 (a)).

Évolution et polymorphisme. Extrêmement conservés chez l'homme, les récepteurs CD94/NKG2 sont des complexes hétérodimériques transmembranaires appartenant à la superfamille des récepteurs NK de type lectine-C, formés par l'association de la molécule invariante CD94 à une des glycoprotéines codées par un gène de la famille NKG2 (Chang *et al.* 1995; Lazetic *et al.* 1996; Carretero *et al.* 1997). Les récepteurs CD94/NKG2 sont constitutivement exprimés par les cellules NK et une sous-population de LT (essentiellement LT $\gamma\delta$ et LT $\alpha\beta$ CD8⁺, parfois LT $\alpha\beta$ CD4⁺) (Mingari *et al.* 1996; Braud *et al.* 1998 (a); Lee *et al.* 1998 (a)). Selon la nature de l'isoforme NKG2, les complexes hétérodimériques CD94/NKG2 induisent un signal inhibiteur (variant NKG2A) ou activateur (variant NKG2C). D'autres variants NKG2 ont été décrits, bien que très peu étudiés à ce jour : NKG2B, -E, -F et -H (Lanier 1998).

Structure et interaction. L'interaction entre le récepteur CD94/NKG2 et son ligand dépend de la nature du membre NKG2 ainsi que de la nature du peptide présenté par la molécule HLA-E. La cinétique et l'affinité d'interaction sont caractérisées par des constantes d'association/dissociation de relative faible affinité, et se rapprochent en cela de celles des KIR avec leurs ligands HLA-I classiques (Valés-Gómez *et al.* 1999; Kaiser *et al.* 2005; Sullivan *et al.* 2007). Par contre, l'affinité de l'interaction entre le récepteur et son ligand ne semble pas variée en fonction du variant protéique HLA-E (Kaiser *et al.* 2005). L'analyse de la structure cristallographique a permis de déterminer que la relation entre le récepteur hétérodimériques CD94/NKG2 et le complexe tripartite HLA-E/ β 2m/peptide canonique était de type « clé/serrure » (**Figure 17**).

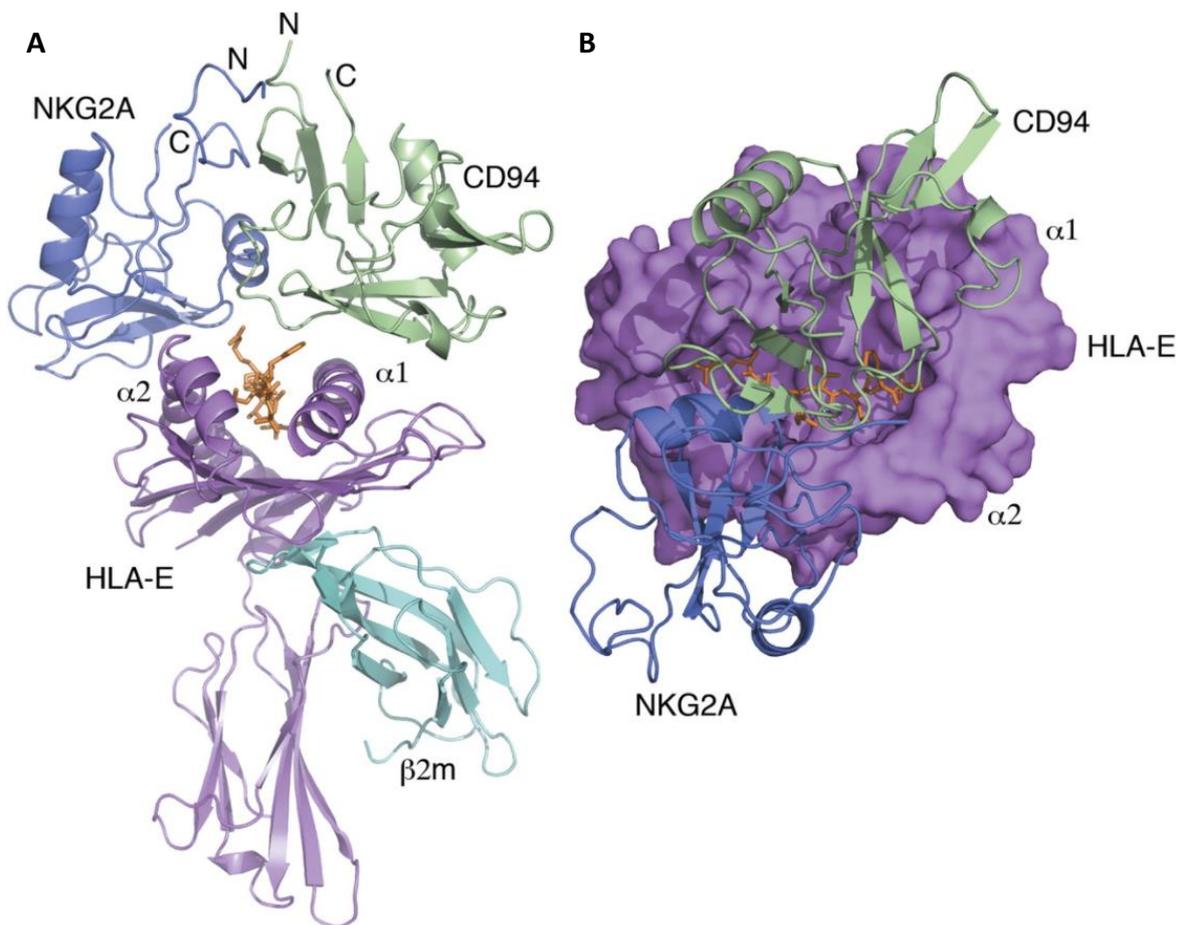


Figure 17 : Structure cristallographique de l'interaction entre CD94/NKG2A et HLA-E/VMAPRTLFL. NKG2A et CD94 sont représentés respectivement par les éléments bleu et vert pâle. La chaîne lourde de HLA-E est représentée en violet, β 2m en cyan, et le peptide VMAPRTLFL en orange. (A) Vue latérale de l'interaction CD94/NKG2A sur HLA-E/VMAPRTLFL. (B) Vue de dessus des contacts de CD94/NKG2A sur la surface de HLA-E/VMAPRTLFL. D'après Petrie *et al.* 2008.

Cette interaction implique d'une part des résidus des hélices $\alpha 1$ et $\alpha 2$ de HLA-E ainsi que de l'extrémité C terminale du peptide présenté, et d'autre part, des résidus des complexes hétérodimériques CD94/NKG2. La molécule CD94 est prédominante dans l'interaction, en occupant près de 69% de la surface de contact contre 31% pour le membre NKG2 (A ou C), et ce quel que soit le peptide présenté par HLA-E. De plus, la protéine invariante CD94 interagit essentiellement avec les résidus du peptide liant HLA-E, à savoir la chaîne carbonée du 6^{ème} acide aminé et les chaînes latérales des résidus 5 et surtout 8. Ainsi, tous les récepteurs CD94/NKG2 semblent avoir la même spécificité peptidique, indépendamment de la nature des membres NKG2 (Kaiser *et al.* 2005; Kaiser *et al.* 2008; Petrie *et al.* 2008).

Cependant, l'affinité des récepteurs est directement liée au variant NKG2. Ainsi, malgré leur forte homologie de séquence, l'interaction de la forme inhibitrice NKG2A avec un complexe HLA-E/peptide est en moyenne 6 fois supérieure à celle de sa contrepartie activatrice NKG2C (Llano *et al.* 1998; Valés-Gómez *et al.* 1999; Miller *et al.* 2003; Wada *et al.* 2004; Kaiser *et al.* 2005; Petrie *et al.* 2008). L'affinité des récepteurs CD94/NKG2 dépend également du peptide présenté dans HLA-E. Ainsi, les chaînes latérales des résidus 5 et 8 des nonamères présentés ont une importance significative dans les interactions entre CD94/NKG2 et HLA-E (Miller *et al.* 2003; Kaiser *et al.* 2005). L'analyse de cette structure a démontré l'impact du changement d'un seul et unique acide aminé sur la capacité de reconnaissance des complexes HLA-E/peptide par les récepteurs hétérodimériques CD94/NKG2A, sans toutefois qu'il n'y ait de modifications perceptibles de la conformation spatiale de HLA-E ou de l'orientation dans l'espace des chaînes latérales des résidus 5 ou 8 (Hoare *et al.* 2008). En effet, si la quasi-totalité du répertoire physiologique canonique de HLA-E est reconnu, les peptides issus de contexte pathologique capables de stabiliser HLA-E n'induisent pas obligatoirement une interaction avec les récepteurs hétérodimériques. Finalement, la stabilité d'interaction entre CD94/NKG2 et le complexe HLA-E/peptide peut également être renforcée par la capacité de l'homodimère CD8 $\alpha\alpha$ à s'associer avec une faible affinité à la molécule HLA-Ib (Gao *et al.* 2000).

Rôle. D'un point de vue fonctionnel, la présentation de peptides issus des séquences signal des molécules HLA-Ia et -G par HLA-E permet la

reconnaissance et l'inhibition de la lyse médiée par les cellules NK CD94/NKG2A⁺ (Braud *et al.* 1997). Les différentes altérations des séquences peptidiques canoniques liés à HLA-E, qui varient de 1 à 3 acides aminés entre eux, ont un impact significatif sur la reconnaissance par les récepteurs CD94/NKG2A ou CD94/NKG2C, et en conséquence, sur la cytotoxicité médiée par les NK (Heatley *et al.* 2013). Chez un individu sain, les peptides VTAPRTL^{LL} et VTAPRTV^{LL} fournis par environ les 2/3 des allèles *HLA-B* dans une population caucasienne, et le peptide VMAPR^{ALLL} par 1/3 des *HLA-C*, peuvent stabiliser plus ou moins efficacement HLA-E ; ils sont très peu voire non reconnus par les complexes hétérodimériques CD94/NKG2 et n'empêchent pas de ce fait la lyse des cellules chargées avec ces peptides *in vitro* par des NK CD94/NKG2A⁺ (Valés-Gómez *et al.* 1999; Heatley *et al.* 2013). Étant donné qu'un individu peut posséder jusqu'à 6 allèles *HLA-Ia* différents, il est peu envisageable qu'aucun d'entre eux ne puisse fournir une fois traduit en protéines de peptides capables de stabiliser HLA-E à la membrane afin de protéger les cellules saines du Soi contre la lyse médiée par les cellules NK CD94/NKG2A⁺.

À l'inverse, la présentation à la membrane par HLA-E de peptides alternatifs rend généralement les cellules sensibles à la lyse médiée par les NK par absence de reconnaissance par les récepteurs CD94/NKG2A⁺ dans de multiples contextes pathologiques : stress (Michaelsson *et al.* 2002), transformation tumorale (Sensi *et al.* 2009), infection par l'EBV (Brooks *et al.* 1999; García *et al.* 2002). Elle peut également rendre les cellules affectées sensibles à la lyse médiée par les NK CD94/NKG2C⁺, comme dans le contexte de l'infection à HCMV. Cependant, d'autres peptides présentés par HLA-E dans ces mêmes contextes permettent aux cellules stressées/transformées/infectées d'échapper à la lyse médiée par les cellules NK CD94/NKG2A⁺ : stress (Wooden *et al.* 2005), infection à HCMV (Tomasec *et al.* 2000; Ulbrecht *et al.* 2000; Heatley *et al.* 2013), infection à VIH (Nattermann *et al.* 2005 (b)), infection à virus de l'hépatite C (VHC) (Nattermann *et al.* 2005 (a); Schulte *et al.* 2009).

Ligand de TCR de lymphocytes T

D'ordinaire, les récepteurs CD94/NKG2 permettent la reconnaissance du Soi physiologique présenté par HLA-E, et l'absence de reconnaissance du Non-

Soi, du fait de leur incapacité à interagir avec les molécules de CMH-Ib complexées avec un répertoire peptidique d'origine pathologique. Au contraire, les LT $\alpha\beta$ restreints par HLA-E permettent la reconnaissance spécifique des peptides alternatifs produits dans divers contextes pathologiques (Stress, Transformation, Infection), et semblent participer, à l'instar des LT $\alpha\beta$ conventionnels, à la surveillance de l'intégrité du Soi dans les cellules autologues.

Implication de réponses T restreintes par HLA-E dans la surveillance immunitaire du Soi et du Non-Soi

Reconnaissance d'antigènes viraux

En plus de UL40 dans le contexte d'infection au HCMV, des peptides issus des virus EBV, de la grippe (*Influenza*) et du VHC ont été décrits comme présentés et reconnus dans le contexte de restriction HLA-E par des LT CD8⁺. Alors que les peptides issus de UL40 du HCMV sont hautement similaires à ceux issus des séquences signal des molécules HLA-Ia et -G stabilisant physiologiquement HLA-E, les peptides dérivés des protéines virales BZLF1 de l'EBV, InfIM d'*Influenza* et HCV Core du VHC en sont très différents.

Virus d'EPSTEIN-BARR et de la Grippe

La reconnaissance d'épitopes présentés dans HLA-E et fournis par les virus de l'EBV ou *Influenza* par des LT CD8⁺ restreints par HLA-E est pauvrement documentée chez l'Homme. García et collaborateurs ont isolé un clone T de phénotype CD3⁺ TCR $\alpha\beta$ ⁺ CD8⁺ CD56⁺ ILT2⁺ KIR⁻ chez un individu sain de statut sérologique inconnu (García *et al.* 2002). Cette population monoclonale se caractérise par un TCR dit « dégénéré » capable dans le contexte de restriction HLA-E de reconnaître spécifiquement les peptides SQAPLPCVL et ILGKVFTLT issus respectivement des protéines virales BZLF-1₃₉₋₄₇ de l'EBV et InfIm₅₉₋₆₇ d'*Influenza* ainsi que de nombreux peptides tels VMAPRTLIL, VMAPRTLLL fournis par la protéine UL40 de souches HCMV variées. De plus, ces LT se différencient par l'expression fonctionnelle de CD94/NKG2C membranaire, participant à la reconnaissance et la lyse de la cellule cible *in vitro* (García *et al.* 2002).

Virus de l'Hépatite C

40% des patients infectés par le VHC (n= 77) développent des réponses T $\alpha\beta$ CD8⁺ reconnaissant dans un contexte HLA-E l'épitope viral HCV Core₃₅₋₄₄ très conservé et auparavant décrit pour son immunogénicité dans le contexte de restriction HLA-A*02:01 (Nattermann *et al.* 2005 (a); Schulte *et al.* 2009). La présence de ces populations T non conventionnelles, concomitante ou non à celle de la réponse T CD8⁺ classique restreinte par HLA-A*02, est associée à une charge virale plus faible et à une augmentation du taux de l'alanine aminotransférase (ALT), enzyme hépatique dans le sang, signe des dommages hépatiques induits par la réponse immune dans la lutte contre le virus.

Reconnaissance d'antigènes bactériens

Les bactéries comme *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb) ou *Salmonella enterica* de sérovar *typhi* (Set) sont des pathogènes intracellulaires qui détournent de nombreuses fonctions cellulaires afin de promouvoir leurs propres survies.

Mycobacterium tuberculosis

Lewinsohn et collaborateurs ont été les premiers en 1998 à décrire des clones T CD8⁺ spécifiques d'épitopes indéterminés de Mtb restreints par une molécule HLA-Ib (Lewinsohn *et al.* 1998), qui s'avéra par la suite être HLA-E (Lewinsohn *et al.* 2000). Récemment, ils ont décrit qu'une population monoclonale de LT CD8⁺ restreints par HLA-E reconnaissait spécifiquement un peptide issu de l'extrémité N-terminale de la protéine Mpt32 issue de Mtb et uniquement après sa O-mannosylation par un enzyme bactérienne (Heinzel *et al.* 2002; Harriff *et al.* 2017). De façon surprenante, ces populations T détectées chez les individus infectés latents sont clonales et représentent la fraction dominante à plus de 95% des LT CD8⁺ cytotoxiques anti-Mtb. En outre, la présentation du peptide dans HLA-E est dépendante du protéasome et du phagosome, mais indépendante de TAP et de la voie de transport du RE au Golgi. Il a été proposé que le développement quasi-exhaustif de ces populations

lymphocytaires au détriment des LT CD8⁺ conventionnels anti-Mtb soit lié à la capacité directe des molécules HLA-E, et non des HLA-Ia classiques, à charger stablement les peptides bactériens dans les phagosomes des cellules infectées (Grotzke *et al.* 2009).

Par la suite, une autre équipe a identifié des LT restreints par HLA-E dirigés contre 55 épitopes bactériens Mtb issus d'une banque de 69 peptides prédits *in silico* comme potentiellement présentés par HLA-E. La plupart d'entre eux sont par ailleurs reconnus par des LT issus de patients adultes préalablement exposés à Mtb (n=10/10) ou enfants vaccinés par le BCG (n=6/12), suggérant une primo-activation et l'établissement de réponses T mémoires pour de nombreux épitopes HLA-E *in vivo*. Chez les patients infectés par Mtb, l'emploi de tétramères HLA-E permet de détecter et d'évaluer *ex vivo* la fréquence des réponses T CD8⁺ anti-Mtb non conventionnelles à en moyenne 0,2% des LT CD8⁺ circulants des patients latents, 0,5% de ceux des patients actifs et 1,2% de ceux des patients avec une co-infection VIH (Caccamo *et al.* 2015 ; Prezzemolo, 2016). Ces fréquences déterminées au moment de la pose du diagnostic diminuent en corrélation avec la prise efficace de traitements par le patient. Le répertoire T de ces populations T non conventionnelles est « hautement diversifié » et très hétérogène entre les individus, avec néanmoins 11 peptides, dont RMPPLGHEL et VLRPGGHFL, reconnus par plus de 30% des patients (Joosten *et al.* 2010). Ce sont tous des LT CD8⁺ à TCR αβ de profil TEM capables de reconnaître des cellules infectées par le Mtb *in vitro* dépendamment de leur TCR et de HLA-E (Caccamo *et al.* 2015; van Meijgaarden *et al.* 2015 ; Prezzemolo, 2016). Remarquablement, ces populations T sont de nature soit cytolytique, soit suppressive. En effet, des LT CD8⁺ reconnaissant le même épitope ne possèdent pas nécessairement les mêmes fonctions, démontrant que la polarité fonctionnelle d'un LT n'est pas déterminée par le peptide reconnu. D'une part, les LT capables d'activité cytolytique envers les cellules infectées par la bactérie *in vitro* sont aussi capables d'inhiber la croissance intracellulaire de Mtb. D'autre part, une portion des LT anti-Mtb restreints par HLA-E, majoritaire *ex vivo*, ne sécrète après activation ni cytokines pro-inflammatoires classiquement associées aux LT CD8⁺ cytotoxiques Tc1 (TNF-α, IFN-γ, IL-2), ni molécules cytotoxiques comme la perforine, les granzymes et granulysine. Cependant, cette population conserve une fonction cytotoxique envers les cellules infectées par Mtb via la voie TRAIL et produit des cytokines de type Th2

comme l'IL-5, l'IL-13 et l'IL-4, induisant la production d'IgM et IgG par les LB (Joosten *et al.* 2010; Caccamo *et al.* 2015; van Meijgaarden *et al.* 2015). Enfin, ces cellules produisent du TGF- β membranaire, et sont ainsi capables d'inhiber la prolifération de LT par contact cellulaire (Joosten *et al.* 2010).

Salmonella enterica

L'infection par Set de cellules-hôtes permet leur reconnaissance par des LT CD8⁺ à TCR $\alpha\beta$ restreints par HLA-E spécifiques d'au moins 4 épitopes bactériens. Ces populations non conventionnelles, capables *in vitro* de reconnaître et lyser spécifiquement des cellules infectées par Set par la sécrétion de granzyme B, sont retrouvées *ex vivo* chez des individus sains vaccinés avec une souche atténuée de Set (Salerno-Gonçalves *et al.* 2004). Ces LT de phénotype TEM se développe précocement dans la circulation sanguine dès 2 jours post-vaccination, et persiste jusqu'à deux ans après la vaccination en se différenciant majoritairement en cellules T TEMRA. Ceux-ci conservent leurs capacités cytotoxiques et sécrétrices, suggérant la mise en place d'une réponse mémoire (Salerno-Goncalves *et al.* 2010). De plus, la présence de populations T cytotoxiques TEM/TEMRA spécifiques de complexes « HLA-E/peptide de Set » est également détectée chez des volontaires sains non vaccinés directement exposés à une souche Set sauvage et est corrélée avec la protection contre le développement de la fièvre typhoïde (Fresnay *et al.* 2016).

Reconnaissance physiopathologique du Soi

Le développement d'une réponse immune efficace face aux pathogènes tout en évitant les dommages aux tissus environnants est un principe fondamental du système immunitaire. Depuis une quarantaine d'années, de nombreux rapports - majoritairement chez la souris - tendent à montrer qu'une sous-population de LT CD8⁺ suppresseurs est impliquée dans la tolérance périphérique au Soi. En effet, la reconnaissance spécifique par ces populations de Qa-1^b/HLA-E complexés à divers peptides exprimés à la surface de LT CD4⁺ autologues activés permet le contrôle des réponses auto-réactives et la prévention de maladies auto-immunes (MAI). À l'inverse, des défauts de

répertoire T CD8⁺ supprimeur restreint par Qa-1^b/HLA-E ont été mis en évidence dans des contextes de sclérose en plaque (SEP) ou de diabète de type I (DTI).

Sclérose en plaque

L'administration d'acétate de glatiramère (AG) - un polymère aléatoire d'acide glutamique, lysine, alanine et tyrosine - est prescrit chez les patients atteints de SEP sous forme rémittente et est associée avec une diminution significative du nombre de poussées, bien qu'il ne permette ni de restreindre la durée ou gravité de ces dernières, ni de limiter la progression de la maladie. Les mécanismes d'action de l'AG ne sont toujours pas élucidés à ce jour.

Il a été montré que les patients atteints de SEP avaient un déficit global en LT CD8⁺ supprimeurs par rapport à des individus sains et que la vaccination par l'AG rétablissait cette population (Tennakoon *et al.* 2006). Les réponses T CD8⁺ induites après vaccination sont *ex vivo* préférentiellement restreintes par HLA-E et possèdent un phénotype TEM, signe d'une activation *in vivo*. Présentes dans le sang et les fluides cérébrospinaux, elles sont associées avec une amélioration de la maladie. Ces LT possèdent des capacités cytotoxiques suppressives, permettant notamment l'inhibition de prolifération et la lyse des LT CD4⁺ autologues activés et chargés avec de l'AG *in vitro*, indépendamment de leur spécificité (Tennakoon *et al.* 2006; Correale et Villa 2008). De plus, par rapport aux patients atteints de SEP sous forme rémittente et aux donneurs sains, les patients touchés d'une forme progressive de SEP ont statistiquement moins de LT CD8⁺ restreints par HLA-E circulants dans le sang et dans les fluides cérébrospinaux, et ceux-ci expriment plus de CD94/NKG2A membranaire fonctionnel, suggérant une corrélation inverse entre l'activité de ces LT CD8⁺ supprimeurs et l'avancée de la maladie (Correale et Villa 2008). L'hypothèse actuelle est que ces populations T CD8 non conventionnelles spécifiques de l'AG peuvent éliminer *in vivo* les réponses T CD4⁺ activées et chargées, dont celles spécifiques de l'AG ou de la protéine basique de la myéline. En ce sens, il a été constaté que la domination persistante et stable *ex vivo* de quelques clones T CD8⁺ anti-AG se faisait au dépend du répertoire T CD4⁺ spécifique de AG, instable, qui ne cesse de se renouveler en terme de clonalité, tout comme chez la souris avec les LT

CD8 suppresseurs contre le répertoire T CD4⁺ spécifique de la MBP (Jiang *et al.* 2003; Tennakoon *et al.* 2006).

Enfin, de nombreuses études font état de l'implication de l'EBV dans le développement de la SEP. Une fréquence élevée des LT CD8⁺ circulants restreints par HLA-E et spécifiques de l'EBV est statistiquement associée avec la forme de rémission récurrente de la maladie plutôt que la forme progressive, suggérant un effet protecteur de cette population contre les poussées (Jørgensen *et al.* 2012).

Diabète de type 1

Chez les patients atteints de DTI, un défaut de répertoire T CD8⁺ suppresseur spécifique de complexes « HLA-E/Hsp60 » a été mis en évidence *ex vivo* par rapport à des individus sains. En effet, chez ces derniers, ces populations T y sont moins fréquentes et possèdent une moins bonne compétence à détecter et éliminer le répertoire T périphérique de moyenne avidité réactif au Soi. Cependant, il est possible de restaurer ces cellules suppressives par sensibilisation de PBMC circulants avec des DC autologues immatures chargées avec le peptide Hsp60, faisant de cette population T non conventionnelle un candidat potentiel pour l'immunothérapie du DTI (Jiang *et al.* 2010).

Les lymphocytes T CD8 restreints par HLA-E anti-HCMV

Préambule. L'équipe de M.C. MINGARI et L. MORETTA a initialement décrit les LT CD8⁺ à TCR αβ restreints par HLA-E anti-HCMV chez des individus sains (Pietra *et al.* 2001). Ces populations ont tout d'abord été dénommées « NK-CTL », du fait du partage de caractéristiques communes aux NK - expression de marqueurs préférentiellement associés aux cellules NK (CD56, iNKR), capacité à reconnaître et lyser spontanément de multiples lignées cellulaires allogéniques indépendamment de leur génotype HLA-Ia - et aux LT - expression de marqueurs T (CD3, TCR αβ), activation dépendante du TCR (Pietra *et al.* 2001; Romagnani *et al.* 2002). Par la suite, l'apparition de ces populations T fut associée au statut séropositif pour le HCMV des individus et leur spécificité pour

le peptide signal 15-23 de la protéine UL40 dans le contexte de restriction HLA-E fut identifiée (Pietra *et al.* 2003).

Fréquence. À l'époque, l'emploi émergent des tétramères en cytométrie en flux - à savoir un complexe de 4 monomères HLA-E biotynilés en C-ter stabilisés par un nonamère issu du peptide UL40₁₅₋₂₃, l'ensemble étant tétramérisé par une streptavidine couplée à un fluorochrome - a permis de déterminer la proportion sanguine de cette population chez quelques individus, bien que leur fréquence de développement au sein d'une population séropositive pour le HCMV demeurerait encore inconnue. Ainsi, pour exemple, ces populations T représentent *ex vivo* entre 0,4 et 3,4% des PBL, et 0,05 et 14% des LT CD8⁺ circulants au sein d'un individu (Romagnani *et al.* 2002; Mazzarino *et al.* 2005; Hoare *et al.* 2006; Allard *et al.* 2012; Sullivan *et al.* 2015). Ces fréquences sont similaires à celles des réponses T conventionnelles, soulignant un potentiel rôle significatif dans l'immunité contre le HCMV (Sullivan *et al.* 2008).

Phénotype. Similairement aux réponses T anti-virales conventionnelles, ces LT persistent dans la circulation sanguine, puisque l'on peut les retrouver jusqu'à 7 an suite à la primo-détection (Sullivan *et al.* 2015). En accord avec une propriété mémoire supposée, ces populations T possèdent un phénotype de différenciation avancée TEM (CD45RO⁺ CD45RA⁻) / TEMRA (CD45RO⁻ CD45RA⁺) (CD27⁻ CD28⁻ CCR7⁻ CD62L⁻ CD57⁻) (Mazzarino *et al.* 2005; Allard *et al.* 2012).

Rôle. Leur degré d'implication dans l'immunité anti-HCMV *in vivo* est inconnu, même si la capacité de lyser spécifiquement des fibroblastes autologues ou cellules endothéliales allogéniques infectées *in vitro* laisse suspecter un rôle protecteur contre l'infection virale (Mazzarino *et al.* 2005; Allard *et al.* 2012). Les LT CD8⁺ anti-HCMV restreints par HLA-E ont uniquement été observés *ex vivo* chez des individus HCMV⁺ pour lesquels l'épitope viral issu de UL40 déterminant la spécificité nominale des LT était différent des nonamères fournis par les séquences signal des HLA-Ia et -G autologues. Cependant, il a également été décrit pour 3 populations monoclonales que ces LT possèdent un TCR dégénérescent, permettant la reconnaissance spécifique d'une part du peptide viral, et d'autre part, de peptides variant par 1 ou 2 acides aminés (Romagnani *et al.* 2002; Allard *et al.* 2012).

Plus précisément, notre équipe a décrit chez un patient transplanté rénal une population monoclonale T CD8⁺ dénommée « Mart.22 », représentant 14% des LT CD8⁺ circulants, capable de reconnaître des complexes « HLA-E/peptide du Soi » et de lyser des cellules cibles chargées *in vitro* quasiment aussi efficacement que celles chargées avec le peptide viral. Nos résultats ont également montré que l'activation de ce clone était finement régulée par l'interaction du récepteur inhibiteur KIR2DL2 qu'il exprime fortement, avec ses ligands, des molécules HLA-Cw du Soi (Allard *et al.* 2012). Ce récepteur ainsi que d'autres récepteurs inhibiteurs, dont les ligands sont essentiellement des molécules HLA-I du Soi, sont retrouvés fréquemment exprimés par ces LT : KIR2/3DL, ILT2, CD94 (associé ou non au NKG2A), bien que ces deux derniers semblent n'avoir qu'un impact mineur sur la régulation négative de l'activité de ces LT (Pietra *et al.* 2001; Romagnani *et al.* 2002, 2004; Allard *et al.* 2012). Les premières données bibliographiques semblent indiquer que ces populations T ne reconnaissent pas les cellules autologues (Romagnani *et al.* 2002) du fait 1) de l'expression de nombreux récepteurs inhibiteurs ayant pour ligands des molécules HLA-I du Soi, et 2) probablement de la délétion du répertoire T auto-réactif de forte avidité lors de la sélection thymique.

Par ailleurs, étant donné que les peptides viraux UL40 reconnus sont identiques à ceux fournis physiologiquement par certains allèles *HLA-Ia*, la question de l'implication de ces LT restreints HLA-E anti-HCMV dans le rejet en transplantation se pose. Ainsi participent en ce sens : 1) le faible polymorphisme de HLA-E, 2) l'absence d'impact de l'acide aminé 107 de HLA-E dans sa capacité à interagir avec le TCR (Hoare *et al.* 2006), 3) la capacité du TCR à reconnaître de manière dégénérée plusieurs variants peptidiques présentés, 4) la prolifération préférentielle lors de stimulations allogéniques *in vitro* (Romagnani *et al.* 2002), et enfin, 5) la capacité à reconnaître et lyser des cellules allogéniques indépendamment de leur statut d'infection à HCMV et de leur génotype HLA-E *in vitro*, dont notamment des cellules endothéliales, première interface d'interaction entre les cellules du receveur et de l'organe du donneur *in vivo* (Allard *et al.* 2012). Afin d'évaluer leur rôle dans le cadre de la transplantation pulmonaire, une cohorte constituée de 15 patients ne possédant aucun allèle *HLA* capable de fournir le peptide VMAPRTLIL, et transplantés à partir d'un donneur fournissant le dit peptide, fut étudiée. De manière intéressante, l'amplification de LT CD8⁺ cytotoxiques dirigés contre « HLA-

E/UL40 » est statistiquement corrélée avec le rejet chronique ($p=0,007$), mais pas avec le rejet aigu ($p=0,11$), et ce, indépendamment de la réactivation du HCMV, chez 5 patients sur 7 ayant développé ces réponses (Sullivan *et al.* 2015).

Du fait de l'absence d'homologue à UL40 chez le MCMV, aucun équivalent murin n'a été identifié à ce jour. Par contre, suite à l'infection à RhCMV du macaque Rhésus, des LT CD8⁺ spécifiques de complexes « Mamu-E/Rh67 », Mamu-E étant l'équivalent de HLA-E chez le macaque, ont été caractérisées, témoignant une fois de plus de la forte spécificité des différents types de CMV pour leurs espèces-hôtes (Hansen *et al.* 2016). Étonnamment, bien que Rh67 ne soit pas un homologue de UL40, il fournit le peptide VMAPRTLIL via son peptide signal également.

CONTEXTE ET OBJECTIFS DE L'ETUDE

Ce projet est le fruit d'une collaboration de longue date entre le Dr Béatrice CHARREAU et le Pr Nadine GERVOIS, visant à analyser et comprendre les répercussions de l'expression de la protéine HLA-E dans des contextes de transplantation rénale, de mélanomes et de cancers colorectaux.

Leurs travaux ont notamment permis la caractérisation phénotypique et fonctionnelle d'une population lymphocytaire T circulante non conventionnelle chez un patient transplanté rénal suite à sa séroconversion à HCMV (Allard *et al.* 2012). Dénommée Mart.22, cette population T correspondait à l'amplification clonale *in vivo* de lymphocytes T de profil effecteur-mémoire exprimant le TCR V β 22. Ces lymphocytes T sont capables de reconnaître spécifiquement la protéine membranaire HLA-E liant des peptides issus des séquences signal de plusieurs variants viraux UL40₁₅₋₂₃. De façon intéressante, les peptides reconnus peuvent également dériver de la séquence signal de molécules HLA-I et être présenter physiologiquement. Notamment, dans un contexte de transplantation d'organe, l'expression de HLA-E dans le greffon est principalement conscrute aux cellules endothéliales. Leur étude a mise en évidence la reconnaissance par cette population T non conventionnelle de peptides issus de HLA-I allogéniques, et en conséquence, la lyse de cellules endothéliales allogéniques *in vitro*, indépendamment de leur génotype HLA-E ou de leur statut d'infection à HCMV. Dans cette étude, il a été montré que l'activité de ce clone T *in vitro* était finement régulée par le récepteur inhibiteur KIR2DL2, ayant pour ligand certaines protéines HLA-C (type C1). Ainsi, ceci suggère que les génotypes *HLA-B* et *-C*, ligands des multiples récepteurs KIR, pourraient permettre le contrôle des capacités lytiques de ces LT.

Cette étude suggérait que les réponses T CD8 restreintes par HLA-E et spécifiques de UL40₁₅₋₂₃ induites suite à l'infection à HCMV pourraient avoir un impact délétère sur l'organe transplanté chez les receveurs par réaction croisée avec les cellules endothéliales allogéniques, principales cellules non hématopoïétiques à exprimer HLA-E dans le greffon (Coupel *et al.* 2007) – et pourraient, par conséquent, participer ainsi aux mécanismes de rejets (**Figure 18**).

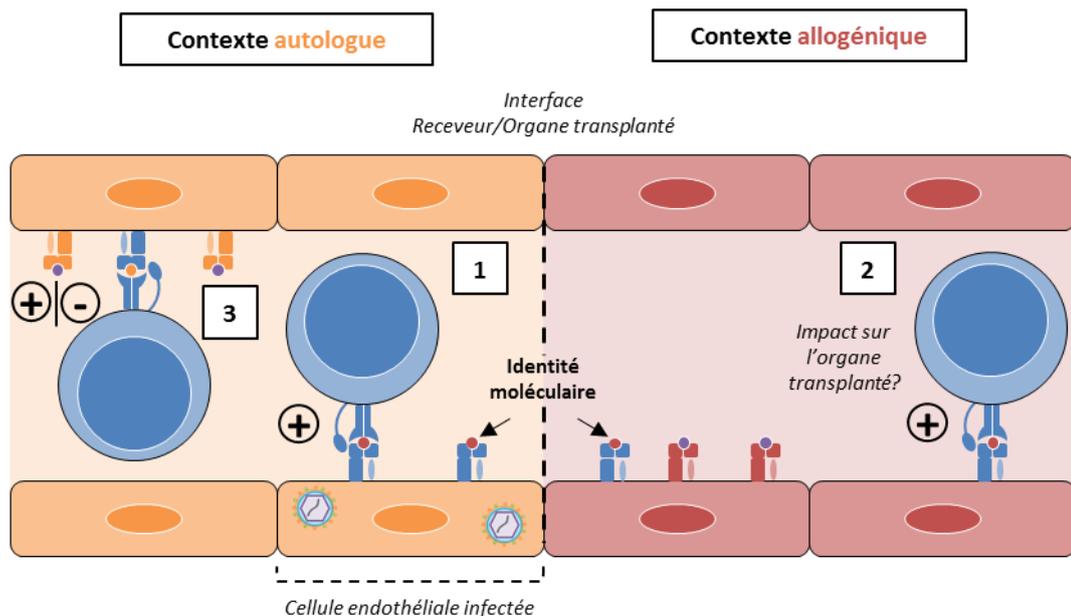


Figure 18 : Hypothèses sur l'impact des LT spécifiques des complexes HLA-E/UL40₁₅₋₂₃ *in vivo*. (1) L'induction de cette population T non conventionnelle semble être liée à l'infection à HCMV de l'individu. La capacité de ces LT à reconnaître des peptides issus soit de la protéine virale UL40₁₅₋₂₃, soit des protéines HLA-I₃₋₁₁, pourrait alors avoir un impact délétère dans un contexte de transplantation allogénique (rouge) (2), mais également sur le Soi (orange) (3). Cependant, la sélection négative du répertoire T autologue et/ou l'expression native de récepteurs inhibiteurs pourraient limiter ces phénomènes. Code couleur : HLA-Ia autologues : orange ; HLA-Ia allogéniques : rouge ; HLA-E : bleu.

Le cœur de mon projet de thèse s'est inscrit dans la compréhension de la place de cette réponse non conventionnelle dans la réponse anti-HCMV, à travers l'étude qualitative et quantitative à plus grande échelle de ces LT dans une cohorte de patients transplantés rénaux et d'individus sains. Les résultats majeurs qui en découlent sont présentés dans une première partie et font l'objet d'un article publié dans *PLOS Pathogens* le 30 avril 2018 (DOI : <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1007041>). La seconde partie des résultats porte plus particulièrement sur une étude préliminaire des fonctions de ces populations T et des résultats complémentaires quant à l'influence des allèles *HLA* de l'individu infecté sur la génération de la réponse T restreinte par HLA-E anti-HCMV, ainsi que sur l'impact de cette dernière sur la fonction du greffon dans notre cohorte de patients transplantés rénaux. Ma présence dans l'équipe m'a également permis de participer au projet du Dr Tiphaine PARROT sous la direction du Pr N. GERVOIS portant sur l'étude de la fonction des LT double-positifs CD4⁺ CD8⁺ infiltrant les mélanomes, et ayant fait l'objet d'un article disponible en ANNEXE publié dans *Oncoimmunology* en octobre 2016.

RÉSULTATS

ARTICLE :
**HCMV TRIGGERS FREQUENT AND PERSISTENT UL40-SPECIFIC
UNCONVENTIONAL HLA-E-RESTRICTED CD8 T-CELL RESPONSES
WITH POTENTIAL AUTOLOGOUS AND ALLOGENEIC PEPTIDE RECOGNITION**

Objectifs & Résumé

Le but de cette étude était d'approfondir les connaissances portant sur les lymphocytes T CD8 restreints par HLA-E et spécifiques de UL40₁₅₋₂₃, en évaluant notamment 1) leurs fréquences et amplitudes d'amplification *ex vivo*, 2) les facteurs associés à leur développement, 3) leurs cinétiques d'apparition et 4) leurs caractéristiques phénotypiques et fonctionnelles *in vitro*.

Ce projet a essentiellement porté sur l'étude rétrospective d'échantillons sanguins d'une cohorte de patients transplantés rénaux (n=119). À l'aide d'un test sensible et spécifique en cytométrie en flux, nous avons déterminé que la présence de LT CD8 restreints par HLA-E spécifiques de UL40₁₅₋₂₃ est strictement liée à l'infection à HCMV du receveur. À l'inverse, l'apport de peptides liant HLA-E par les protéines HLA-I allogéniques du transplant ne permet pas la mise en place de cette réponse atypique. L'analyse d'un groupe d'individus sains séropositifs pour le HCMV (n=25) montre que le développement de cette population T est similaire entre individus immunodéprimés ou non. Ainsi, 1 individu infecté par le HCMV sur 3 développe des LT restreints par HLA-E, qui peuvent représenter jusqu'à près de 40% des LT CD8⁺ circulants. En parallèle, l'analyse de la réponse conventionnelle anti-HCMV dirigée contre le complexe HLA-A*02/pp65 montre une similitude en termes de fréquence et d'amplitude chez les individus HCMV⁺ par rapport aux LT spécifiques de HLA-E/UL40.

Étonnement, nous avons identifié que l'allèle *HLA-A*02* et l'hétérozygotie *HLA-E*01:01/01:03* de l'individu infecté sont des facteurs préférentiellement associés au développement de réponses T restreintes par HLA-E. À l'instar d'autres équipes de recherche, nous avons montré que la portion de la protéine UL40 codant le peptide capable de stabiliser HLA-E est sujette à un fort polymorphisme. Une conservation toute particulière des résidus d'ancrage a été observée (P2, P7 et P9) tandis que l'acide aminé 8, décrit comme fortement impliqué dans la capacité de reconnaissance des complexes HLA-E/peptides par des TCR, est hautement variable. De plus, nous avons déterminé que ces

populations T reconnaissent de manière nominative le peptide issu de la souche virale infectante.

Le suivi longitudinal de 16 receveurs de greffes rénales au cours des 12 mois post-transplantation a permis de montrer que l'induction et l'évolution des réponses T anti-HCMV restreintes par HLA-E ou HLA-A*02 sont similaires non seulement en termes de fréquence mais également de temps d'apparition. Cependant, l'analyse comparative de marqueurs d'activation (CD69/PD-1/CD25) révèle que les populations T spécifiques de HLA-E/UL40 semblent exprimer peu voire même pas de PD-1 à la membrane *ex vivo* par rapport à leurs contreparties conventionnelles, laissant supposer à un profil d'activation et/ou d'épuisement distinct.

L'isolement de populations T restreintes par HLA-E à partir de PBMC de patients transplantés rénaux (n=5) nous a permis d'étudier les caractéristiques phénotypiques et fonctionnelles de ces populations. Ces populations T s'avèrent *in vitro* être essentiellement quasi-clonales et de phénotype effecteur-mémoire (CD45RO^{high} CD27⁻ CD28⁻ CCR7⁻ CD62L⁻). En accord avec notre étude précédente portant sur le clone Mart.22, ces populations T possèdent la capacité d'être activées spécifiquement *in vitro* par des peptides nonamériques ayant 1 ou 2 acides aminés de différents par rapport au peptide nominal. En outre, il s'est avéré que certains de ces peptides reconnus correspondent à des peptides autologues et/ou allogéniques fournis par les protéines HLA-I du Soi ou du transplant.

Finalement, au regard des données portant sur la dégénérescence du TCR de ces LT *in vitro*, nous avons cherché à estimer dans la cohorte si parmi les individus HCMV⁺ ayant développé des réponses T restreintes par HLA-E (n=31), certains avaient un potentiel de reconnaissance de peptides autologues ou allogéniques issus du greffon. Ainsi, chez la quasi-intégralité des individus (n=29/31), un potentiel de reconnaissance autologue est détecté contre au moins 1 peptide signal HLA-I. De plus, 16 patients transplantés rénaux sur 23 ont des LT capables potentiellement de reconnaître au moins 1 peptide signal HLA-Ia allogénique présenté par HLA-E sur le greffon *in vivo*.

RESEARCH ARTICLE

HCMV triggers frequent and persistent UL40-specific unconventional HLA-E-restricted CD8 T-cell responses with potential autologous and allogeneic peptide recognition

Nicolas Jouand^{1,2,3,4}, Céline Bressollette-Bodin^{1,5}, Nathalie Gérard^{1,2}, Magali Giral^{1,2}, Pierrick Guérif², Audrey Rodallec⁵, Romain Oger³, Tiphaine Parrot^{3na}, Mathilde Allard^{3nb}, Anne Cesbron-Gautier⁶, Nadine Gervois^{3,4}*, Béatrice Charreau^{1,2,4,7}*

1 Centre de Recherche en Transplantation et Immunologie (CRTI), UMR1064, INSERM, Université de Nantes, Nantes, France, **2** Institut de Transplantation Urologie Néphrologie (ITUN), CHU Nantes, Nantes, France, **3** CRCINA, UMR1232, INSERM, Université d'Angers, Université de Nantes, Nantes, France, **4** LabEx Immunology-Graft-Oncology (IGO), Nantes, France, **5** Laboratoire de Virologie, CHU Nantes, Nantes, France, **6** Etablissement Français du Sang (EFS), Région des Pays de la Loire, Nantes, France, **7** Institut Hospitalo-Universitaire European Center for Science in Transplantation and Immunology, Nantes, France


 OPEN ACCESS

Citation: Jouand N, Bressollette-Bodin C, Gérard N, Giral M, Guérif P, Rodallec A, et al. (2018) HCMV triggers frequent and persistent UL40-specific unconventional HLA-E-restricted CD8 T-cell responses with potential autologous and allogeneic peptide recognition. *PLoS Pathog* 14(4): e1007041. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1007041>

Editor: Ann B. Hill, Oregon Health Sciences University, UNITED STATES

Received: December 6, 2017

Accepted: April 17, 2018

Published: April 30, 2018

Copyright: © 2018 Jouand et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Data Availability Statement: All relevant data are within the paper and its Supporting Information files.

Funding: This study was funded by: Thesis fellowship from the Ministère de l'enseignement supérieur, de la Recherche et de l'Innovation to NJ (<http://www.enseignementsup-recherche.gouv.fr/>); Agence Nationale de la Recherche (<http://www.agence-nationale-recherche.fr/>) to NG and BC

☞ These authors contributed equally to this work.

^{na} Current address: Karolinska Institute, Department of Medicine, Stockholm, Sweden

^{nb} Current address: Laboratoire d'Immunologie des Tumeurs, Faculté de Médecine, Université de Genève/Hôpitaux Universitaires de Genève, Geneva, Switzerland

* Nadine.Gervois@univ-nantes.fr (NG); Beatrice.Charreau@univ-nantes.fr (BC)

Abstract

Immune response against human cytomegalovirus (HCMV) includes a set of persistent cytotoxic NK and CD8 T cells devoted to eliminate infected cells and to prevent reactivation. CD8 T cells against HCMV antigens (pp65, IE1) presented by HLA class-I molecules are well characterized and they associate with efficient virus control. HLA-E-restricted CD8 T cells targeting HCMV UL40 signal peptides (HLA-E_{UL40}) have recently emerged as a non-conventional T-cell response also observed in some hosts. The occurrence, specificity and features of HLA-E_{UL40} CD8 T-cell responses remain mostly unknown. Here, we detected and quantified these responses in blood samples from healthy blood donors (n = 25) and kidney transplant recipients (n = 121) and we investigated the biological determinants involved in their occurrence. Longitudinal and phenotype *ex vivo* analyses were performed in comparison to HLA-A*02/pp65-specific CD8 T cells. Using a set of 11 HLA-E/UL40 peptide tetramers we demonstrated the presence of HLA-E_{UL40} CD8 αβT cells in up to 32% of seropositive HCMV⁺ hosts that may represent up to 38% of total circulating CD8 T-cells at a time point suggesting a strong expansion post-infection. Host's *HLA-A*02* allele, *HLA-E*01:01*01:03* genotype and sequence of the UL40 peptide from the infecting strain are major factors affecting the incidence of HLA-E_{UL40} CD8 T cells. These cells are effector memory CD8 (CD45RA^{high}RO^{low}, CCR7⁻, CD27⁻, CD28⁻) characterized by a low level of PD-1 expression. HLA-E_{UL40} responses appear early post-infection and display a broad, unbiased, Vβ repertoire. Although induced in HCMV strain-dependent, UL40₁₅₋₂₃-specific manner, HLA-E_{UL40} CD8 T cells are reactive toward a broader set of nonapeptides varying

(Award number: ANR-11-LABX-016-01) and BC (Award number: ANR-RC12-0465-16); Agence de la Biomédecine (<https://www.agence-biomedecine.fr/>) to BC (Appel d'offre Recherche et Greffe 2013); and Région Pays de la Loire (<http://www.paysdelaloire.fr/>) to BC (Award name: Pari Scientifique HYPROTEC RN14044). The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing interests: The authors have declared that no competing interests exist.

in 1–3 residues including most HLA-I signal peptides. Thus, HCMV induces strong and life-long lasting HLA-E_{UL40} CD8 T cells with potential allogeneic or/and autologous reactivity that take place selectively in at least a third of infections according to virus strain and host HLA concordance.

Author summary

Understanding the mechanisms of immune control of viral infection is crucial to improve diagnosis and to design efficient immunotherapies. CD8 T lymphocytes are key components of the cellular immunity against human cytomegalovirus (HCMV), a widespread pathogen that cause severe illness and poor outcome in immunocompromised hosts such as transplant recipients and HIV-infected patients. In this study we characterized a population of non-conventional CD8 T lymphocytes directed against the viral protein UL40 and presented by the non-classical HLA-E molecules in blood samples from HCMV seropositive hosts. This immune response was detectable in around 30% of hosts, may represent up to 38% of total blood CD8 T lymphocytes, persists for life and thus seems to belong to the common immune arsenal against HCMV. Genetic factors related to the host and to the different strains of HCMV are critical parameters for the existence of this immune subset. Although specifically induced in response to HCMV infection, a key feature of these cells is their potential ability to be also responsive against multiple HLA molecules. In conclusion, HCMV infection frequently leads to the long-term persistence of a large subset of lymphocytes with potential side effect requiring attention in contexts such as autoimmunity and transplantation.

Introduction

Human cytomegalovirus (HCMV; human herpesvirus 5) is the prototype member of β -herpesvirus and a widespread opportunistic pathogen. In healthy individuals, primary infection is asymptomatic and is followed by a life-long, persistent, infection that is controlled by host immune system [1]. Nevertheless, HCMV is a major cause of morbidity and mortality in immunocompromised individuals such as transplant recipients or HIV-infected patients. HCMV is the most common cause of congenital infection in the world that can result in neurodevelopmental delay and sensorineural hearing loss. HCMV disease can manifest in many forms, including infectious mononucleosis, hepatitis, post-transplant arteriosclerosis, pneumonia, colitis, immune senescence, and alteration to the immune repertoire [1]. The impact of HCMV on the outcome of solid organ transplantation (SOT) is substantial. HCMV not only causes a highly morbid and potentially fatal illness but also indirectly influences other relevant outcomes, such as allograft acute and chronic rejection, other opportunistic infections, post-transplant lymphoproliferative disorders, vascular disease, and overall patient and allograft survival [2, 3]. Because of the magnitude of its direct and indirect impacts, there have been extraordinary efforts to define strategies for its prevention, monitoring and treatment [1, 4].

Cellular immune response is the major mechanism by which HCMV replication is controlled [5, 6]. Large human HCMV-specific T-cell responses have been described in numerous published reports, particularly in the transplantation setting and in ageing [7, 8]. HCMV-specific T cells in healthy adults can constitute as much as 10% of the total memory CD4 and CD8 T cells that recognize multiple viral proteins, notably, pp65, IE1, IE2 and gB [9, 10]. Suppression of the

number and function of HCMV-specific CD4 and CD8 T cells allows reactivation of the virus from latency, leading to uncontrolled viral replication and clinical disease in immunocompromised hosts, including SOT recipients [5].

The CD8 T-cell response appears as the most important component of the anti-HCMV immune response [7], although CD4 T cells and natural killer (NK) cells also play a significant role [11, 12]. Expanded HCMV-specific responses are often thought to be a requirement for protection and could result from the life-long latency of HCMV in specific cells, interspaced with episodic reactivations that gradually increase response size in a process called inflation [13, 14]. HCMV-specific T cells were first described as those able to recognize the immunodominant antigen immediate early 1 (IE1) [15], but later studies emphasized the importance of T cells that target a tegument phosphoprotein of 65kDa (pp65/UL83) [16]. The original epitope identification studies focused on NLVPMVATV, a HLA-A*02 restricted epitope within pp65 that was defined as a “typical” epitope because of its common detection in HLA-A*02-positive individuals. The identification of other less common epitopes targeted by HCMV-specific T cells has extended the panel of HCMV-reactive T cells in humans [9, 10]. In murine models, subdominant epitopes have been shown to be protective [17]. Despite technical advances in terms of HCMV-specific T-cell response monitoring [18], a correlation between T-cell responses and clinical protection has not been established to date. This underlines a need for a global analysis of anti-HCMV T cell responses at both qualitative and quantitative levels investigating response numbers, sizes, hierarchy levels, peptide specificities, time course and duration.

HCMV-specific CD8 T cells directed against UL40 epitopes presented by HLA-E have more recently emerged as an additive piece in the complexity of anti-HCMV immune response [19]. HLA-E is a poorly polymorphic non-classical (MHC-Ib) HLA molecule. Although more than 20 *HLA-E* alleles have been registered, only two nonsynonymous *HLA-E* alleles: HLA-E*01:01 (HLA-E^{107R}) and HLA-E*01:03 (HLA-E^{107G}) that differ by a single amino acid (R107G) have been found in most populations [20]. Cell surface expression of HLA-E depends on binding of a conserved 9-mer peptide naturally provided by the N-terminal signal peptide of classical HLA-I or HLA-G molecules. HCMV UL40 signal peptide contains a 9-mer sequence with an exact sequence identity to endogenous HLA-E-binding peptides. The prototype of UL40 peptide loaded on HLA-E molecules is VMAPRTLIL provided by the AD169 HCMV strain [21]. As a consequence, HCMV UL40 promotes efficient cell surface expression and stabilization of HLA-E independently of TAP function [21, 22]. HLA-E containing peptides engage two types of receptors. HLA-E binds the NK cell inhibitory receptor CD94/NKG2A [23, 24] and, thereby, promotes efficient protection against lysis by CD94/NKG2A⁺ NK cells [22, 23, 25, 26]. In addition to CD94/NKG2A, HLA-E interacts with CD94/NKG2C, albeit with lower affinity. CD94/NKG2C is an activating receptor predominantly expressed on a relatively small population of NK cells. Interestingly, the frequency of this CD94/NKG2C⁺ NK subset increases in HCMV-infected individuals [27] [6]. HLA-E/UL40 (HLA-E_{UL40}) complexes also trigger TCR-dependent activation of a subset of CD8 αβ T cells [28–30]. UL40-specific/anti-HCMV HLA-E-restricted CD8 cytotoxic T-cell responses have been reported in healthy donors and in kidney and lung transplant recipients and associated with a possible harmful impact on graft endothelial cells [30] and allograft survival [31]. Characterization of these CD8 T-cell subsets in healthy and transplanted population remains sparse and no longitudinal study is available. In healthy hosts, the beginning and duration of HCMV infection are usually unknown, thus monitoring the development of T-cell responses starting at the time of infection is not possible except in the setting of organ transplantation where post-graft primary HCMV infections are frequent and require a specific follow-up.

Our study investigated the presence of circulating HLA-E-restricted CD8 T cells in a cohort of kidney transplant recipients (KTR, $n = 121$) during either an active HCMV infection (at primary infection or at reactivation) or at latency and in HCMV seropositive (HCMV⁺) healthy volunteers (HV, $n = 25$). Using a set of HLA-E tetramers refolded with 11 different UL40 epitopes to cover the diversity of HCMV clinical strains, we provide here a quantitative analysis of HLA-E_{UL40}-restricted anti-HCMV T-cell response in hosts. The frequency, the magnitude, the time course of HLA-E_{UL40}-restricted anti-HCMV CD8 T-cell responses, as well as the phenotype and the specificity of peptide recognition of these subsets, were documented *ex vivo* in comparison to the conventional HLA-A*02_{pp65} CD8 T-cell responses. Altogether our findings reveal that HCMV induces early long-lasting HLA-E-restricted, UL40-specific unconventional CD8 T-cell responses that often parallels HLA-I-restricted CD8 T cells. Although their induction seems initially restricted by both the viral infecting strain and host's HLA-I, extended peptide recognition may occur allowing these effector responses to potentially target self and allogeneic, donor-specific, HLA-I peptides.

Results

HCMV infection induces frequent and long lasting HLA-E_{UL40}-restricted T-cell responses

Although UL40-specific HLA-E-restricted CD8 T-cells have been described in a few HCMV seropositive (HCMV⁺) individuals [28–30, 32], only sparse data are available concerning their characteristics and post-infection occurrence. To address this point, we performed a retrospective detection and quantification of circulating HLA-E_{UL40}-restricted CD8 T-cell responses in a cohort of kidney transplant recipients (KTR, $n = 121$) and in HCMV⁺ healthy volunteers (HV, $n = 25$). Our study cohort included transplanted patients segregated into 4 groups according to recipient's HCMV serology (HCMV⁻ and HCMV⁺) and, for HCMV⁺ patients, the status of infection (primary, latent, active) at 12 months post-transplantation. Demographic and clinical characteristics of the cohort are presented in Table 1. UL40-specific HLA-E-restricted CD8 T cells were analysed *ex vivo* in blood samples after PBMC isolation using a multi-parameter (CD3⁺CD8 α ⁺TCR $\gamma\delta$) flow cytometry assay subsequent to the blockade of the CD94 receptor using a specific blocking mAb. Our protocol was adapted from Pietra *et al.* [29] and allows a sensitive (threshold of detection: 0.1% of total CD8 TCR $\alpha\beta$ T cells) and peptide-specific analysis of HLA-E_{UL40} CD8 T-cell populations (S1 Fig). Detection of HLA-A*02:01/pp65 CD8 T (HLA-A*02_{pp65}) cells was carried out in parallel for a comprehensive analysis of unconventional (HLA-E-restricted) *versus* conventional (HLA-A*02:01-restricted) anti-HCMV responses. Banked blood samples, harvested at M12 post-transplantation, were investigated using a set of HLA-E tetramers loaded with 8 different UL40₁₅₋₂₃ peptides to encompass the usual UL40₁₅₋₂₃ variability among common HCMV strains [33, 34]. The 8 HLA-E tetramer/peptide complexes were tested individually. Fig 1 shows the distribution of HLA-E_{UL40} CD8 T-cell responses (detected for at least 1 tetramer HLA-E/UL40 peptide complex) *versus* HLA-A*02_{pp65} CD8 T-cell responses in the various groups. In HCMV⁻ transplanted patients no HLA-E_{UL40} nor HLA-A*02_{pp65} T-cell response was detected, consistent with the concept that these responses are induced by and specific to HCMV infection. HLA-E_{UL40} CD8 T cells were detectable in all HCMV⁺ subgroups (primary, latency, reactivation) and were present in an overall of 28.7% of HCMV⁺ transplanted recipients and 32.0% in HCMV⁺ blood donors. By comparison the overall incidence of HLA-A*02_{pp65} T-cell responses in HLA-A*02 patients and healthy hosts was 65.0% and 46.1%, respectively. HLA-A*02_{pp65} T-cell responses were roughly similar in frequency upon primary (58.3%), latent (68.4%) and active (66.7%) infection while HLA-E_{UL40} CD8 T-cell responses were lower upon primary infection compared to other groups. Interestingly, HLA-E_{UL40} CD8 T-cell responses was more frequent in HLA-A*02 as compared to non HLA-A*02 hosts (37.5% *versus* 20.0% for transplant recipients and 46.1% *versus*

Table 1. Patient's characteristics.

	HCMV ⁺ n = 39	Primary-infection ⁺ n = 27	HCMV ⁺ Absence of HCMV infection n = 36	Reinfection/ Reactivation ⁺ n = 19	p-value
HCMV SEROLOGIC STATUS (M12 POST TRANSPLANTATION)					
D-/R-; R-	28	/	/	/	
D+/R-; R-	11	/	/	/	
D-R- or D-/R+; R+	/	1	16	10	
D+/R- or D+/R+; R+	/	26	20	9	
DONORS					
Age [years; median (Q1-Q3)]	44.8 (36.3–55.5)	56.7 (45.6–64.6)	49.7 (41.0–58.5)	57.7 (44.0–64.5)	0.0102¹
Gender [Male/Female; (% of Male)]	26/13 (66.7%)	12/15 (44.4%)	18/18 (50.0%)	11/8 (57.9%)	0.2874 ²
Donor status [Deceased/Living; (% of deceased donors)]	39/0 (100.0%)	26/1 (96.3%)	36/0 (100.0%)	18/1 (94.7%)	0.1426 ²
RECIPIENTS					
Age [years; median (Q1-Q3)]	45.0 (35.4–54.8)	49.2 (43.3–66.8)	56.0 (40.9–63.2)	57.2 (45.7–61.9)	0.0960 ¹
Gender [Male/Female; (% of Male)]	24/15 (61.5%)	21/6 (77.8%)	24/12 (66.7%)	10/9 (52.6%)	0.3275 ²
Transplant [Kidney/Pancreas-Kidney; (% of Kidney only)]	29/10 (74.3%)	27/0 (100.0%)	33/3 (91.7%)	16/3 (84.2%)	0.0100²
Cold ischemia [minutes; median (Q1-Q3)]	1086 (813–1463)	1068 (852–1412)	1140 (901–1503)	974 (869–1256)	0.6536 ¹
Serum Creatinine at M12 [μmol/L; median (Q1-Q3)]	121 (105–140)	137 (121–170)	136 (106–171)	152 (121–175)	0.1395 ¹
Proteinuria at M12 [g/24h; median (Q1-Q3)]	0.14 (0.11–0.26)	0.28 (0.12–0.47)	0.26 (0.11–0.40)	0.26 (0.16–0.48)	0.1190 ¹
Immunosuppressive regimen [n;(%)]					
Unknown	6 (15.4%)	19 (70.4%)	6 (16.7%)	18 (94.7%)	< 0.0001³
None	2 (5.1%)	0 (0.0%)	1 (2.8%)	0 (0.0%)	
Basiliximab/Simulect	18 (46.1%)	6 (22.2%)	19 (52.8%)	0 (0.0%)	
(ATG)/Thymoglobulin	13 (33.3%)	2 (7.4%)	10 (27.8%)	1 (5.3%)	
HLA-A*02 recipients [‡] [n;(%)]	27 (69.2%)	12 (44.4%)	19 (52.8%)	9 (47.4%)	0.1743 ²
Total HLA-I mismatches [n; median (Q1-Q3)]	3 (2–3.5)	3 (2.5–4)	3 (2–3)	3 (2.5–4)	0.0652 ¹
Total HLA-II mismatches [n; median (Q1-Q3)]	3 (3–4)	3 (2–3)	3 (2–3)	3 (1–3)	0.1381 ¹
Donor Specific Antibodies (DSA) [n;(%)]	0 (0.0%)	1 (3.7%)	1 (2.8%)	4 (21.1%)	0.0079²
Post-Tx HCMV infection [n;(%)]	0 (0.0%)	27 (100.0%)	/	/	< 0.0001²
HCMV infection time post-Tx [months; median (Q1-Q3)]	/	7 (3–9)	/	7 (5–10)	0.8536 ¹
Post-Tx HCMV reactivation [n;(% of the HCMV ⁺ recipients)]	/	22 (81.5%)	/	19 (100%)	0.0674 ²
HCMV anti-viral prophylaxis [n;(%)]					
None	27 (69.2%)	3 (11.1%)	2 (5.5%)	0 (0.0%)	<0.0001³
Ganciclovir	0 (0.0%)	1 (3.7%)	0 (0.0%)	2 (10.5%)	
Valganciclovir/Roalcyte	12 (30.8%)	23 (85.2%)	34 (94.4%)	17 (89.5%)	

D: Donor; R: Recipient

¹ Kruskal-Wallis test

² Fisher's exact test

³ Pearson's chi-squared test

⁴ Mann Whitney test

[‡] transplant recipients carrying at least one HLA-A*02 allele

*Definitions of Cytomegalovirus infection [35]

<https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1007041.t001>

16.7% for HV; $p = 0.0318$). In HLA-A*02 recipients, HLA-E_{UL40} CD8 T-cell responses were found either associated with (32.2%) or independent (16.1%) of a HLA-A*02_{pp65} T-cell response. Coexistence of HLA-E_{UL40} and HLA-A*02_{pp65} CD8 T-cell responses also occurs in 33.3% of healthy hosts. Together these results reveal a very high incidence (up to 46%) of HLA-E_{UL40} CD8 T-cell responses in HCMV⁺ hosts with no significant difference between transplanted patients and healthy individuals suggesting that antiviral and immunosuppressive regimens have no impact of these cell subsets at M12. These cells are detected more frequently in hosts carrying an HLA-A*02 allele. Unconventional CD8 T cells can be detected independently of detectable conventional HLA-A*02_{pp65} T-cell response. Presence of HLA-E_{UL40} CD8 T cells early post-infection (primary or reactivation) as well as at latency suggests long lived cell subsets consistent with memory anti-HCMV response. Of interest, the lack of HLA-E_{UL40} CD8 T cells in HCMV⁻ transplant recipients may also indicate that, although a full sequence homology between common UL40₁₅₋₂₃ peptides and signal peptides from most HLA-A, -B and -C molecules, presentation of allogeneic (i.e. donor) HLA-I signal peptides (HLA_{sp}) by HLA-E-expressing uninfected cells in the graft doesn't drive the generation of consequent anti-donor HLA-E_{HLA_{sp}} CD8 T-cell response.

HLA-A*02 and HLA-E genotypes are major determinants associated with HLA-E_{UL40} CD8 T-cell responses

Detection of HLA-E_{UL40} CD8 T cells suggested that these unconventional responses occur more frequently in HLA-A*02 carriers. Genotyping of HLA-A was then performed to decipher this association. Firstly, HLA-A*02 allele frequency was 28% in the HCMV⁺ hosts in our study, a value similar to those found in the HCMV⁻ counterpart (36%, $p = 0.1982$) (Fig 2A). Our findings indicate that HLA-A*02 allele frequency was significantly higher in HCMV⁺ hosts with HLA-E_{UL40} responses than in non-responders (44% versus 22%, $p = 0.0026$, Fig 2A). Next, distribution of HLA-A*02 genotypes were compared between HCMV⁺ and HCMV⁻ individuals. A similar distribution of HLA-A*02 genotypes was observed in both groups (Fig 2B). However, HCMV⁺ hosts that display HLA-E_{UL40} responses were more frequently hosts carrying two HLA-A*02 alleles than hosts without response (19% versus 0%, $p = 0.0002$). Similar analysis was performed for HLA-E alleles and genotypes. HLA-E sequencing allowed us to discriminate the two major HLA-E*01:01 and HLA-E*01:03 alleles. These variants differ in a single amino acid at position 107 when an arginine (R) in HLA-E*01:01 is replaced by a glycine (G) in HLA-E*01:03 resulting in different thermal stabilities and lengths of interaction with cognate receptors [33]. HLA-E allele distribution was found equal for HCMV⁻ and HCMV⁺ hosts (Fig 2C, left panel) and no difference in HLA-E allele frequency was observed among HCMV⁺ individuals with or without HLA-E_{UL40} responses (57.0% versus 53.0%, and 43.0% versus 47.0%, for HLA-E*01:01 and *01:03 respectively, $p = 0.7541$, Fig 2C, right panel). An equal distribution of HLA-E genotypes was calculated for HCMV⁺ and HCMV⁻ hosts ($p = 0.1661$) (Fig 2D, left panel). However, a significant change occurs in HLA-E genotypes for hosts that display or not HLA-E_{UL40} responses ($p = 0.0323$) with a higher prevalence of heterozygous HLA-E*01:01/HLA-E*01:03 in hosts with HLA-E_{UL40} responses (Fig 2D, right panel). No impact of donor HLA was found. These findings support a role for immunogenetic factors in the occurrence of HLA-E_{UL40} responses upon HCMV infection and associate HLA-A*02/A*02 and HLA-E*01:01/HLA-E*01:03 genotypes as independent ($p = 0.85$) positive factors promoting HLA-E_{UL40} responses.

HLA-E_{UL40} CD8 T cells target the highly polymorphic UL40₁₅₋₂₃ sequence in a strain-specific manner

Next, we sought to determine the specificity of HLA-E_{UL40} CD8 T-cell responses toward UL40 peptide provided by the host's HCMV infecting strain. To this aim, DNAs isolated from whole

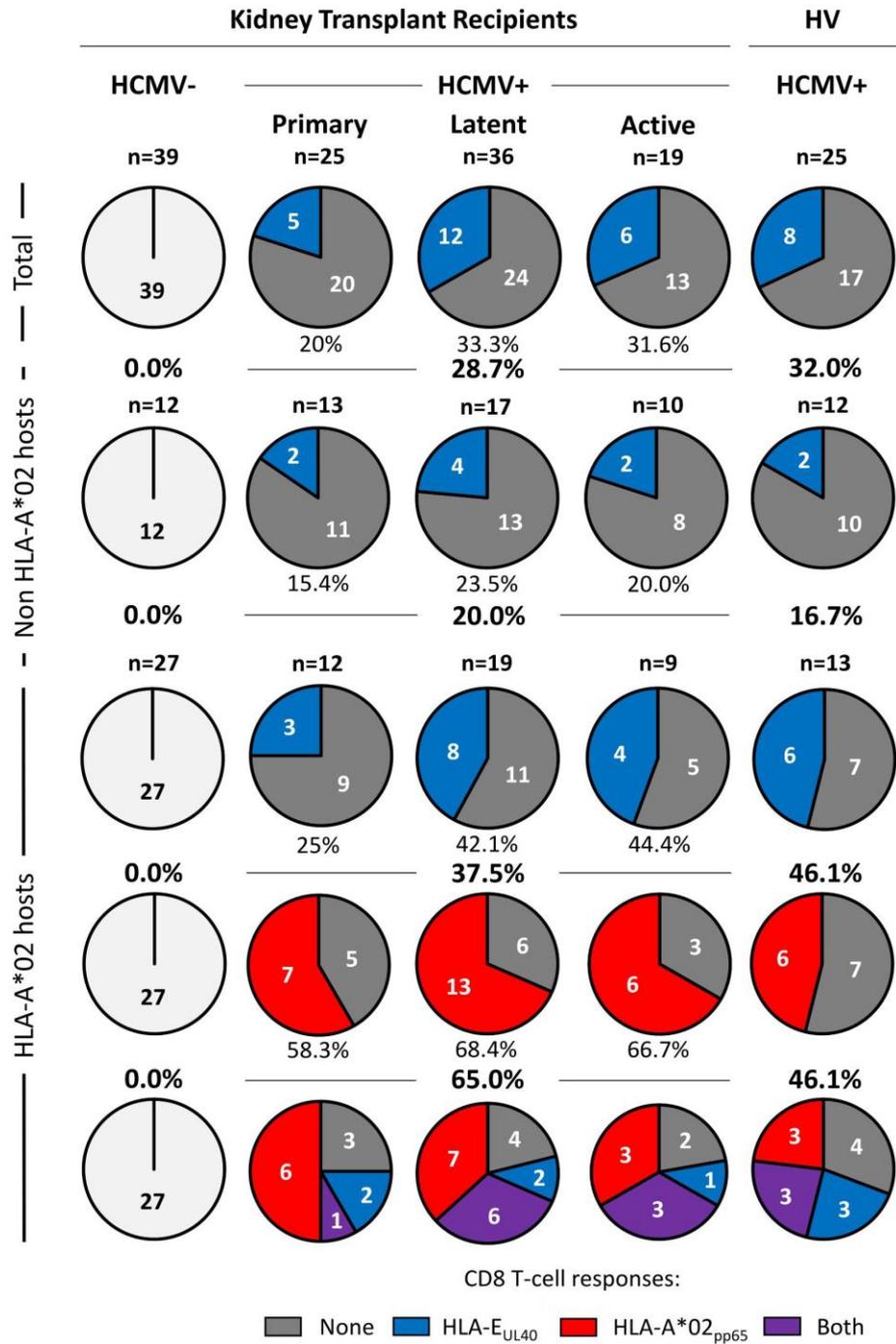


Fig 1. Frequency of unconventional HLA-E_{UL40} CD8 T-cell responses compared to conventional HLA-A*02_{pp65} CD8 T-cell responses in HCMV⁺ kidney transplant recipients and healthy volunteers. PBMCs were isolated from freshly or prospectively harvested at M12 post-transplantation blood samples issued from healthy donors (HV) or from kidney transplant recipients (KTR), respectively. *Ex vivo* detection of HLA-E_{UL40} CD8 T and HLA-A*02_{pp65} CD8 T cells was performed using flow cytometry by selecting CD3⁺ CD8 α ⁺ TCR $\gamma\delta$ ⁻ tetramer⁺ cells on PBMCs. Detection threshold was 0.1% of total CD8 $\alpha\beta$ T cells and kidney transplant recipients and healthy volunteers bearing $\geq 0.1\%$ of HLA-E_{UL40} CD8 T cells (in blue) or $\geq 0.1\%$ HLA-A*02_{pp65} CD8 T cells (in red) were considered as positive. Detection of both types of CD8 T-cell responses are indicated in violet. Absence of detection is shown in light grey in HCMV⁻ recipients and dark grey for HCMV⁺ hosts. Data shown are the number of individuals that display anti-HCMV CD8 T-cell responses. Frequencies of the CD8 T-cell subsets were calculated among subgroups for all (total), non HLA-A*02 and HLA-A*02 individuals and expressed as percentages (%).

<https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1007041.g001>

blood samples from transplant recipients undergoing either a primary infection (n = 18) of a reactivation (n = 7) of HCMV during the 12 months post-transplantation were used for UL40 protein (AA 1–221) sequencing. Sequencing identified a total 32 UL40 sequences for the 25 infected patients, some patients carrying more than one infecting strain (Table 2). Overall variability of full UL40 protein among strains is reported in S2 Fig and was consistent with a previous report [34]. UL40 variability affects 38 AA along the sequence but mostly concentrates within the region encoding the signal peptide (UL40₁₋₃₇) and in particular inside UL40₁₅₋₂₃, the HLA-E binding epitope (Fig 3A). Notably, AA22 and to a lesser extent AA20 that correspond to the peptide position P8 and P6, respectively, two critical residues for the interaction with the CD94/NKG2-A or -C or with the TCR of specific T cells [32] [36], were the most variable, with respectively 48.2% and 19.6% of AA variability and up to 5 and 3 different AA (Fig 3A and 3B). In contrast, residues 16 (P2), 21 (P7) and 23 (P9) that correspond to the 3 major anchor AA for the peptide binding pockets of HLA-E, were highly conserved [37]. Three major UL40₁₅₋₂₃ sequences (VMAPRTLIL, VMAPRTLLL, VMAPRSLLL) accounted for 62.5% of the HCMV strains detected in patients (15 out of 25) while 10 other UL40 sequences were found only in a single patient (Table 2). These data confirmed that consensus UL40₁₅₋₂₃ sequences such as VMAPRTLIL and VMAPRTLLL are highly predominant in clinical strains. Interestingly, VMAPRTLIL and VMAPRTLLL UL40 sequences are fully homologous to signal peptide sequence for the majority of HLA-A and HLA-C alleles excluding the most common HLA-A*02 and HLA-C*07. Since banked blood samples were available for 23 of these patients, we next assessed the presence of HLA-E_{UL40} CD8 T-cell responses using dedicated HLA-E/UL40 tetramers. HLA-E_{UL40} CD8 T cells were detected in 6 out of the 23 patients (26.1%) and illustrated for 4 out of the 6 in the Fig 3C. As shown in Fig 3C, when HLA-E_{UL40} CD8 T-cell responses were investigated using HLA-E tetramers loaded with the UL40 peptide that we identified in their own infecting strain, HCMV strain-specific HLA-E-restricted T cells were detected in patients. Importantly, percentages of HLA-E_{UL40} CD8 T cells vary from 2.9% up to 38.6% of total CD8 $\alpha\beta$ T cells in the blood sample at the time of detection. Fig 3C also illustrates the complexity of the patterns of HLA-E_{UL40} CD8 T responses. Indeed, while in a large majority of hosts, homogenous CD8 α bright populations were observed exemplified in patients #108 and #109, in few hosts, such as #026, multiple populations that display various levels of CD8 α expression (low and high) were observed. This may reflect either the detection of concomitant subsets of HLA-E_{UL40} CD8 T at a particular time point or different stage of activation for a single population or both. Thus, our data sustain previous report showing the UL40₁₅₋₂₃ nonapeptide as a highly polymorphic region inside the viral UL40 protein [34]. Our data show that UL40 polymorphism also drives (strain-specific) antigen-specific HLA-E-restricted T cells. However, in our study only a limited set of canonical UL40 peptides were found in the majority of clinical infecting strains (such as VMAPRTLIL, VMAPRTLLL and VMAPRSLLL identified in 20 out of 32 strains) and allowed strain-specific HLA-E_{UL40} CD8 T cells. Interestingly, about a third of patients were infected by an HCMV strain carrying a non-canonical UL40₁₅₋₂₃

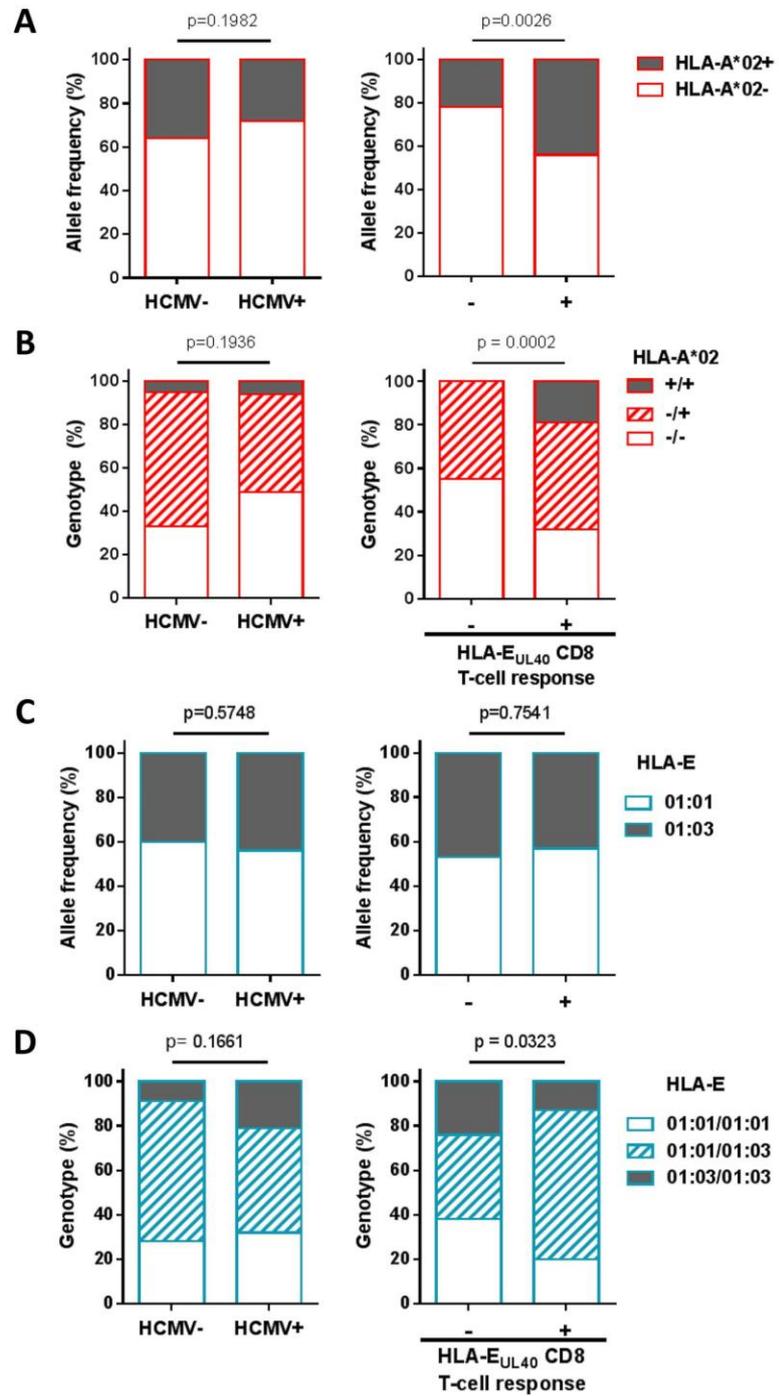


Fig 2. HLA-A*02 allele and HLA-E genotype influence the development of HLA-E_{UL40}-specific CD8 T cells in HCMV⁺ individuals. (A) HLA-A*02 allele frequency and (B) genotype distribution were investigated in HCMV⁻ (n = 39) versus HCMV⁺ (n = 105) individuals including a total of 144 healthy volunteers and kidney transplant recipients (left panels) and in HCMV⁺ host with (+, n = 31) or without (-, n = 74) HLA-E_{UL40} CD8 T-cell response (right panels). (C) HLA-E*01:01 and HLA-E*01:03 allele frequency and (D) HLA-E genotype distribution were investigated in HCMV⁻ (n = 35) versus HCMV⁺ (n = 96) individuals of the cohort (left panels) and in HCMV⁺ host with (+, n = 30) or without (-, n = 66) HLA-E_{UL40} CD8 T-cell response (right panels). P values were calculated using appropriate statistical tests: Fisher's exact test for allele frequencies and Chi-square test for genotype distribution analysis.

<https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1007041.g002>

sequence that display variant amino acid on the residues P1, P3, P4, P5, P6 and P8. Thus we speculate that such HCMV strains for which no HLA-E_{UL40} CD8 T-cell response was detected in our assays may hold UL40_{Sp} probably not able to bind HLA-E. Nevertheless, we cannot rule out the possibility that detection of HLA-E_{UL40} CD8 T cells was underestimated in our study due to the lack of tetramers loaded with the full set of UL40 sequences identified in clinical isolates.

Time course and magnitude of HLA-E_{UL40} and conventional HLA-A*02_{pp65} CD8 T-cell responses are parallel

To further characterize the HLA-E-restricted anti-HCMV T-cell responses, time course of these responses during the acute phase of infection and beyond, and T-cell activation markers were monitored post-infection in patients (n = 16) with either a primate infection or a reactivation of the virus. Results from 3 patients are illustrated in the Fig 4A that summarizes the most frequent profiles that we observed. Upon primary infection (exemplified by patient #109), HLA-E_{UL40} CD8 T cells develop early and most often concomitantly to HLA-A*02_{pp65} T-cell response. HLA-E_{UL40} CD8 T cells are detected in blood 1 month post-infection (patient #107 and #109) and may even precede detection of HLA-A*02_{pp65} T-cell response (patient #109). HLA-E_{UL40} CD8 T-cell response can be either predominant (patient #109) or lower in frequency among total CD8 αβT cells compared to conventional HLA-A*02_{pp65} response (patients #107 and #108). Patient #108 illustrates a HCMV reactivation with a pre-existing

Table 2. Sequences of UL40₁₅₋₂₃ peptide in the infecting HCMV strains.

UL40 ₁₅₋₂₃ signal Peptide*	HCMV strains n/32	HLA-E _{UL40} CD8 T-cell responders n/6
VMAPRTLIL	9	1
VMAPRTLIL	7	2
VMAPRSLLL	4	1
VMA---L	2	0
VMAPRILIL	1	1
VMAPRTLAL	1	1
VMAPRTLFL	1	0
VMAPRTLVL	1	0
VMGPRTLIL	1	0
VMALRTLIL	1	0
VMTPRTLVL	1	0
VMAPWSLIL	1	0
AMAPRTLIL	1	0
LMAPRTLFL	1	0

*Variant amino acids compared to canonical VMAPRTLIL UL40₁₅₋₂₃ sequence are shown in bold.

<https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1007041.t002>

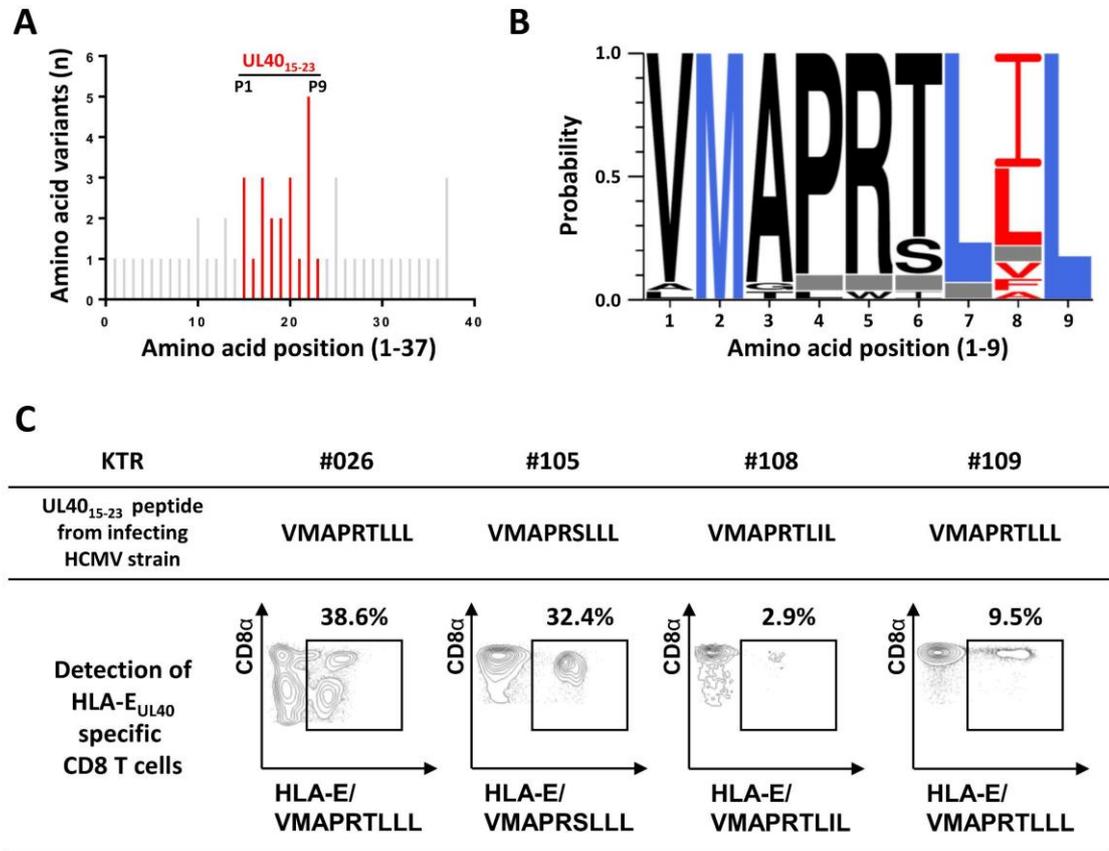


Fig 3. HCMV strain-dependent variability of UL40₁₅₋₂₃ sequences and HCMV strain-specific HLA-E_{UL40} T-cell response in hosts. (A, B) Genomic DNAs isolated from HCMV positive blood samples in HCMV⁺ transplant recipients (n = 25) were sequenced for the identification of UL40 protein (amino acids 1–221) provided by the circulating HCMV strains. (A) Amino acid variability, expressed as a number of amino acid variants, within the HLA-E-binding peptide (UL40₁₅₋₂₃, shown in red) among the sequence for HCMV UL40 signal peptide (UL40₁₋₃₇, shown in grey). A total of 32 UL40 sequences from 25 hosts were analysed. UL40 protein sequence from the Merlin HCMV clinical strain was used as reference. Positions 1 to 9 of residues in the HLA-E-binding peptide (UL40₁₅₋₂₃) are indicated. (B) Sequence LOGO of the UL40₁₅₋₂₃ HLA-E-binding peptide from 25 transplanted hosts. The height of the letter is proportional to the frequency of each amino acid in a given position (P1 to P9). Major anchor residues for binding in the HLA-E peptide groove are indicated in blue. Red letters highlight the important variability observed in position 8 of the HLA-E-binding peptide. Grey boxes correspond to a constitutive deletion of the corresponding amino acid in the UL40 sequence from the infecting viral strain. (C) Representative dot plot analyses showing the detection of strain-specific anti-UL40 HLA-E-restricted CD8 T-cell responses in 4 KTRs (KTR#026, #105, #108 and #109). Frequencies (%) of the HLA-E_{UL40}-specific T cells among total circulating αβ CD8 T cells are indicated.

<https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1007041.g003>

HLA-A*02_{pp65} population leading to a clear increase in the percentage of HLA-A*02_{pp65} CD8 T cells at the time of reactivation and a *de novo* induction of HLA-E_{UL40} CD8 T cells. For the 3 patients, consistent long term (M9-12 post-infection) responses were observed ranging from 1.2 to 15.6% for HLA-E_{UL40} CD8 T cells and 0.4 to 47.7% HLA-A*02_{pp65} CD8 T cells. Activation markers (CD69 and PD-1) were analysed by flow cytometry for both anti-HCMV CD8 T-cell subsets at each time point. Fig 4B reports on the relative expression of CD69 and PD-1 investigated *ex vivo* at M6 post-transplantation for the 3 recipients. Overall, we found that both subsets display similar rate of CD69⁺ cells. In contrast, there were striking differences in

the programmed death-1 (PD-1) expression between the 2 subsets with a lower percentage of expression for PD-1 on HLA-E_{UL40} CD8 T cells as compared to HLA-A*02_{pp65} CD8 T cells (Fig 4C). These discrepancies were found at all time points post-induction (S3 Fig). More than 45% of HLA-A*02_{pp65} CD8 T-cell subsets express sustained levels of PD-1⁺ after a primary infection (patients #107 and #109) and up to 100% upon reactivation (patient #108). These investigations that shape the temporal occurrence of HLA-E_{UL40} CD8 T cells post-infection reveal that both responses, conventional and unconventional, may be very close in kinetic, persistence and in percentage of total CD8 T cells in blood. However, although similarly activated early post-infection, low expression of PD-1 could be a feature of HLA-E restricted anti-HCMV T-cell responses.

UL40₁₅₋₂₃-specific HLA-E-restricted CD8 T cells are effector memory T cells with broad TCR Vβ repertoire and peptide recognition

The functional and phenotype description of HLA-E_{UL40} CD8 T cells is rather limited. Our phenotypic analyses by flow cytometry, performed *ex vivo* for 3 patients (#107, #108 and #109) confirmed that HLA-E_{UL40} T cells belong to the CD3⁺CD4⁻CD8αβ⁺TCRαβ⁺ T cell subset. HLA-E_{UL40} T cells exhibited a phenotype (CR45RA^{high}CD45RO^{low}CD27⁻CD28⁻CD57^{+/-}CCR7⁻, S4 Fig) consistent with effector memory T-cell response as previously reported [38]. Furthermore, in our study, to better characterize anti-HCMV HLA-E-restricted responses, HLA-E_{UL40} CD8 T-cell lines were generated by cell sorting using for each patient an HLA-E tetramer loaded with the UL40 peptide identified in their own HCMV circulating strain. (Fig 3C). PBMCs from 5 HCMV⁺ patients with a primary infection or a reactivation (KTR #104, #105, #107, #108, #109) were sorted and then amplified *in vitro* to reach a purity >95% (defined by tetramer staining using the HLA-E/UL40 complexes employed for sorting).

Amplified HLA-E_{UL40} T cells were used for the analysis of T-cell receptor β chain variable region (TCR-Vβ) expression by flow cytometry using 24 antibodies reactive to 70% of the human TCR-Vβ repertoire. Given the fact that *HLA-E* is a poorly polymorphic gene and that HLA-E_{UL40} CD8 T cells recognize a restricted number of UL40₁₅₋₂₃ peptides, the question of the existence of a public T-cell repertoire between individuals was raised. Consistently, only few analysis of TCR sequences from UL40-specific T-cell clones have been reported yet and display a limited number of TCR including Vβ3, 5.1, 9, 16, 22 [29]. HLA-E_{UL40} CD8 T-cell population expressing a dominant Vβ chain sub-family was obtained for 3 patients while another one gives rise to oligoclonal populations (from 2 to 6 subsets detected) with variable distribution (Fig 5A). This suggests the sorting of multiple, coexisting, HLA-E_{UL40} CD8 T-cell populations in this patient. Interestingly, a broad TCR-Vβ repertoire was found with 16 Vβ identified (Vβ1, 2, 3, 5.1, 7.1, 8, 9, 12, 13.1, 13.2, 13.6, 14, 16, 17, 22 and 23) thus enlarging the Vβ repertoire previously described for these cells. For patient #104 that exhibits oligoclonal T-cell populations only 19% of Vβ repertoire was identified suggesting that this patient carry a dominant Vβ not detectable in our assay. No dominant Vβ was identified for patient #109 with oligoclonal HLA-E-restricted subsets covering 82% of its repertoire.

Next, amplified HLA-E_{UL40} CD8 T-cell populations were investigated for their capacity to produce TNF in response to TCR engagement in a peptide-specific manner. To this aim, the 5 enriched populations were stimulated with 11 HLA-E/UL40 peptide tetramers, used individually, for 5h before intracellular TNF staining. The set-up of experimental conditions are depicted in S5 Fig. In most cases, T cells were highly stimulated (up to 50% of cells expressing TNF) by the HLA-E tetramers loaded with the peptide corresponding to UL40₁₅₋₂₃ identified in their own infecting strain (Fig 5B). However, consistent stimulations (10 to 50%) were also obtained for HLA-E tetramers loaded with other peptides. Interestingly, T-cell activation can

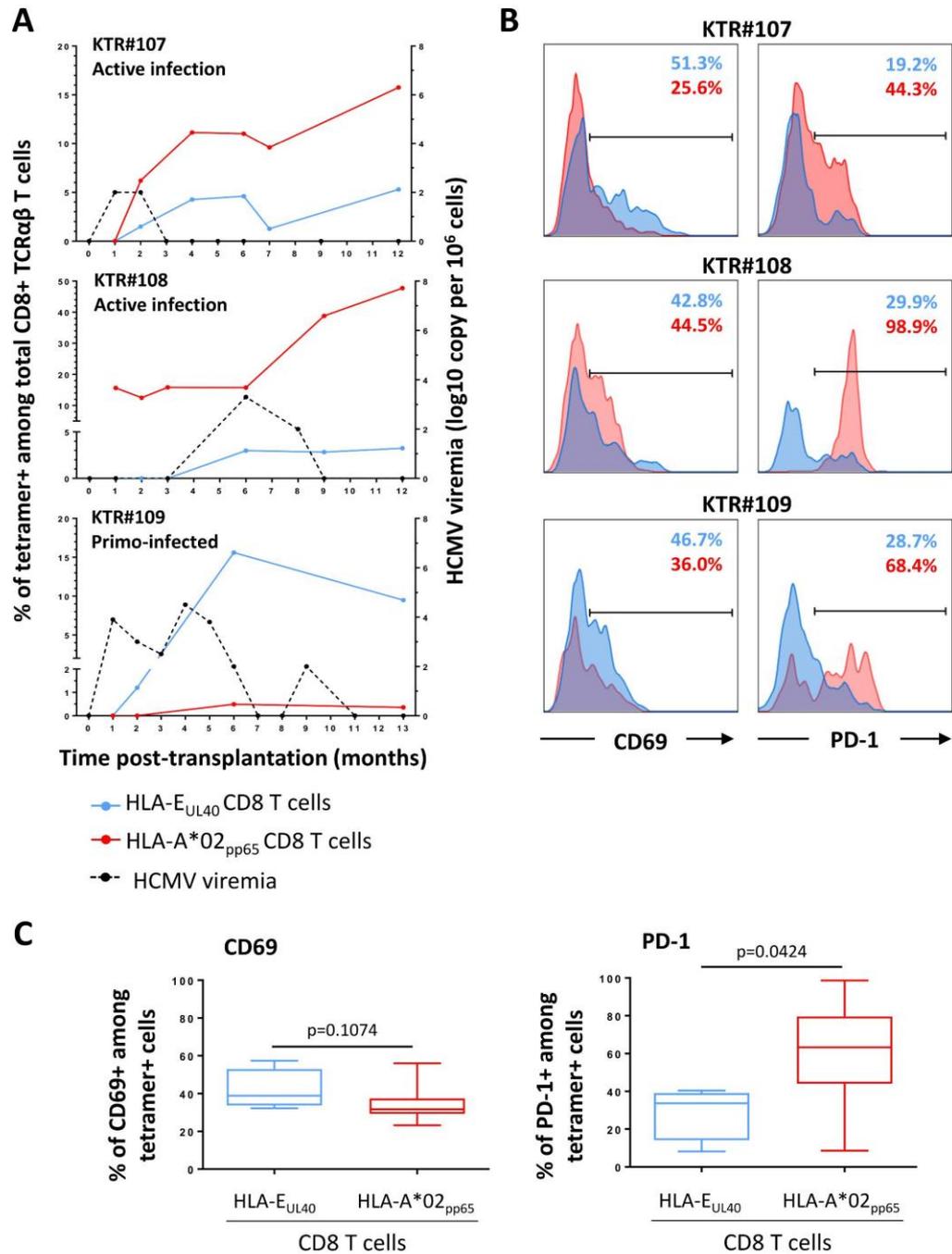


Fig 4. Time course analysis of the HLA-E_{UL40} and HLA-A*02_{pp65} CD8 T-cell anti-HCMV responses upon infection and patterns of activation markers. (A) Time course analysis of the HLA-E_{UL40} and HLA-A*02_{pp65} CD8 T-cell responses according to the HCMV viremia.

PBMCs prospectively collected from M0 and M13 (#109) post-transplantation were retrospectively processed for the concomitant detection and quantification of anti-HCMV HLA-E_{UL40} and HLA-A*02:01_{pp65} CD8 T-cell responses upon infection. Three representative patterns of anti-HCMV CD8 T cell responses in 3 KTR (KTR#107, #108 and #109) are represented. (B) Analysis of T-cell activation. Expression of CD69 (left panel) and PD-1 (right panel) analysed on blood samples from KTR#107, #108 and #109. Facs histogram overlays represent the % of expression for the activation markers CD69 and PD-1 among CD3⁺ CD8 α ⁺ TCR γ δ ⁺ tetramers⁺ cells, for HLA-E_{UL40} (in blue) and HLA-A*02:01_{pp65} (in red) anti-HCMV CD8 T-cell responses at M6 post-transplantation. (C) Comparative analysis of CD69 (left panel) and PD-1 (right panel) expression on HLA-E_{UL40} (n = 4 hosts) and HLA-A*02:01_{pp65} (n = 8 hosts) CD8 T cells investigated at M6 post-transplantation. P values were calculated using a Mann Whitney test.

<https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1007041.g004>

be induced by peptides that correspond to self and donor-specific allogeneic HLA_{Sp} supporting the idea that these T cells may be auto- and/or alloreactive (Fig 5B). In most of cases, changing in P8 or P6 residues of UL40₁₅₋₂₃ peptides diminished or abolished the reactivity of T cells, showing the relative importance of these two amino acids for the interaction of the HLA-E complexes with the TCR. Such cross-stimulation was observed similarly for T-cell populations containing a single dominant V β subset or oligoclonal subsets. Magnitude of the stimulation was peptide-dependent and differs for each T-cell subpopulation. In most cases the dominant peptide issued from the infecting strain and used for sorting, gives the highest score of T-cell activation. Together, these data may suggest that a single dominant V β subset of HLA-E_{UL40} CD8 T cells induced in a UL40 peptide-dependent manner could be activated by HLA-E molecules presenting UL40 peptides with a degree of homology including a panel of HLA_{Sp}.

HLA-E_{UL40} CD8 T-cell responses display potential recognition of self and allogeneic HLA peptides

The use of 8 different HLA-E/UL40 peptide tetramers allowed us to decipher the spectrum of HLA-E_{UL40} responses generated post HCMV infection. This assay provided a qualitative and quantitative analysis of HLA-E-restricted responses for the 31 HCMV⁺ transplanted patients and HV initially found to carry at least one HLA-E_{UL40} CD8 T-cell response. Responses were analyzed to define, for each individual, both peptide specificity and relative strength of the responses (percentage of subset among total circulating CD8 T cells). As a result, consistent responses were observed for the 8 tetramers tested. VMAPRTLLL, VMAPRTLIL, VMAPRTLVL, VMAPRTVLL, VMAPRSLLL and VMAPRSLIL are the most frequently recognized peptides by HLA-E_{UL40} responses in terms of both occurrence and magnitude. The number of circulating HLA-E-restricted CD8 T cells varies in the range of 0.1% (detection threshold) up to around 40% of total TCR α β CD8 T cells. These percentages were similar or even higher than those we obtained for HLA-A*02:01-restricted responses (Fig 6A).

An overview of the panel of HLA-E_{UL40} T-cell responses detected in patients and HV is provided in the Fig 6B. This analysis shows that HCMV⁺ subjects usually display HLA-E_{UL40} T-cell responses against more than a single HLA-E/peptide complex. The total number of responses (from 1 to 8) detected as well as the nature of UL40 peptide recognition (specificity and magnitude) is variable among the hosts. Similar variability is observed for HV and transplant recipient populations. These *ex vivo* findings sustained our results above obtained with cell lines and showing that a monoclonal HLA-E_{UL40} CD8 T-cell subset can be activated by a set of UL40 peptides. Nevertheless, we cannot exclude that a multiplicity of responses can also coexist in hosts resulting from coinfection.

Considering the ability of HCMV to generate HLA-E_{UL40} T-cell responses that recognize multiple peptides we next sought to determine whether the detected HLA-E_{UL40} CD8 T cells may target autologous or allogeneic (i.e. provided by the transplant donor) HLA-I signal peptide in the KTR. To this aim, sequence of HLA-I (-A, -B, -C) signal peptide carried by the host

individuals. Moreover, in most cases (70% of responders) HLA-E_{UL40} responses may also potentially target transplant HLA-I signal peptide presented by HLA-E molecules on the graft.

Discussion

Ex vivo HLA-E_{UL40} tetramer staining allowed us to provide a qualitative and quantitative assessment of unconventional CD8 T cells directed against HCMV. This unconventional T-cell subset is restricted by the MHC-Ib, HLA-E molecule, and targets UL40 signal peptide (UL40₁₅₋₂₃). A number of conclusions can be drawn from this study. First, a major finding was the high prevalence of this CD8 T-cell population investigated in HCMV⁺ transplant recipients and healthy volunteers. HLA-E_{UL40} CD8 T cells were detected in 31 out of 105 (29.5%) HCMV⁺ hosts. About half (46.1%) of HCMV⁺ healthy HLA-A*02 blood donors possess detectable HLA-E_{UL40} CD8 T cells. An equal proportion of HLA-A*02 blood donors (46.1%) possess HLA-A*02_{pp65} CD8 T cells and 1/3 of these individuals display both anti-HCMV CD8 T cells. Although, in our cohort of transplant recipients, HLA-A*02_{pp65} specific T cells were more frequently detected than HLA-E_{UL40} CD8 T cells, the latter were found in over 35% of kidney transplant recipients. Nevertheless, we cannot exclude that these values were underestimated since ideally, a broader panel of HLA-E_{UL40} complexes would be used for an exhaustive detection. Moreover, T-cell populations below 0.1% (our threshold of detection) were not considered. Together these results support the idea that HLA-E-restricted T-cell response belongs to the usual T-cell response against HCMV UL40.

Conventional T-cell responses to HCMV peptides, such as dominant responses to the pp65 and IE epitopes presented by HLA-A*02 and HLA-B*07, can regularly reach 5–10% of total CD8 T cells in the blood of healthy adults and even greater with up to 30% of total CD8 T cells are reported in some studies [9, 10, 39]. However, there is extensive variability in the size of T-cell responses between individuals. The reasons for this variability are not fully understood but may include the dose and timing of infection, as well as the HLA restriction element. Here we show that similar disparity also occurs for HLA-E-restricted anti-UL40 CD8 T cells with frequencies varying from 0.1% to over 38% of total CD8 T cells according to the hosts (median value: 2.2%). These values are the highest reported for this unconventional subset *ex vivo*. Previous studies established *ex vivo* percentages of HLA-E-restricted anti-UL40 CD8 T cells from 0.05% [31] to 14% [30, 32]. Thus, HLA-E-restricted responses mirror HLA-Ia-restricted responses in both frequency and magnitude. Our longitudinal analysis demonstrated that these T-cell populations develop early post-infection and expand quickly to reach maximal rate between 2 to 11 months post primary infection and within 1 month post reactivation. Tetramer staining of HLA-E_{UL40} CD8 T cells showed continued expansion post-infection and stabilization at high frequencies. In our cohort study, anti-HCMV HLA-E-restricted, and to a lesser extent HLA-A*02-restricted T-cell responses appear more frequent during latent and reactivations/secondary infections than during primary infections. Although this difference may be due to variations in the time interval between infection and the time point selected for detection assay (M12) among individuals or an effect of immunosuppressive regimen, this could also reflect a delay in HLA-E_{UL40} CD8 T-cell induction.

A key point of this study is to provide evidence for a positive correlation between HLA-A*02 allele and the occurrence of HLA-E-restricted anti-HCMV CD8 T cells. Firstly, using HLA-E_{UL40} tetramer staining, anti-HCMV HLA-E-restricted were detected more often in HLA-A*02 hosts. Next, HLA sequencing further confirmed a significantly higher rate of hosts carrying at least one HLA-A*02 allele among HLA-E_{UL40} CD8 T-cell responders compared to non-responders. Moreover, all HLA-A*02^{+/+} HCMV⁺ individuals (n = 6) developed an HLA-E_{UL40} CD8 T-cell response. The positive correlation between HLA-A*02 allele and

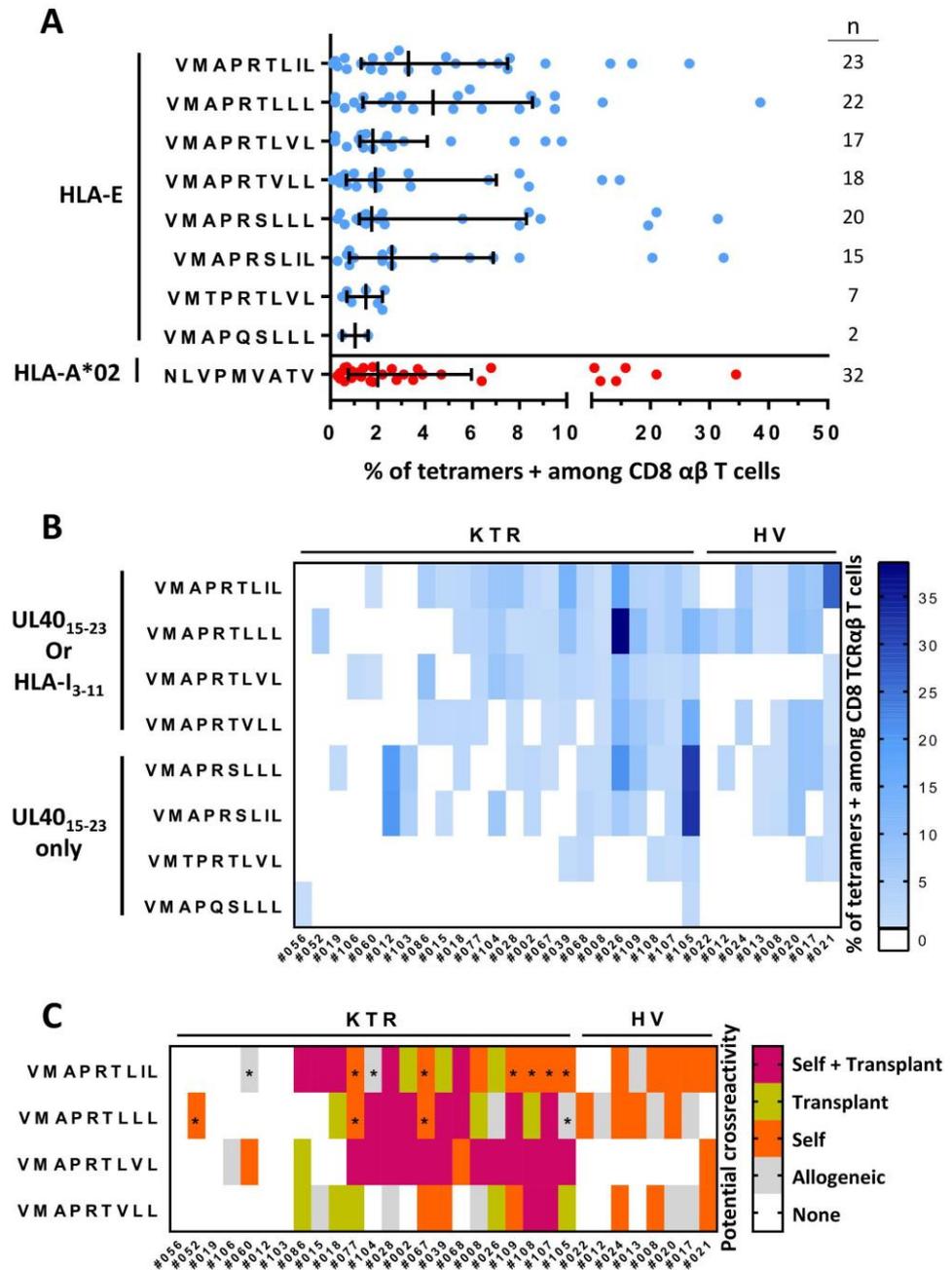


Fig 6. Potential cross-recognition of autologous and allogeneic HLA-I signal peptides by HLA-E_{UL40} CD8 T cells. PBMCs were isolated from freshly or prospectively collected blood samples at M12 post-transplantation issued from healthy donors (HV, n = 25) or from kidney transplant recipients (KTR, n = 119), respectively. *Ex vivo* detection of HLA-E_{UL40} CD8 T and HLA-A*02_{pp65}-specific CD8 T cells was performed using flow cytometry by selecting CD3⁺ CD8⁺ TCRγδ⁺ tetramer⁺ cells on PBMCs. Eight different

HLA-E_{UL40} tetramers were used independently. (A) Percentage of circulating anti-HCMV CD8 T cells in blood detected using the various HLA-E_{UL40} (blue) and HLA-A*02_{pp65} (in red) tetramers in HV and KTR. For each tetramer/peptide, the number of individuals with a given CD8 T-cell response is indicated. (B) Diversity and magnitude of the HLA-E_{UL40} CD8 T-cell responses in KTR and HV. HLA-E_{UL40} CD8 T-cell responses appear in blue and colour intensity is proportional to the percentage of HLA-E_{UL40} CD8 T cells. (C) Classification of the HLA-E_{UL40} CD8 T-cell responses in HCMV⁺ hosts according to possible recognition of self (orange), donor-specific allogeneic (green) or both (violet) (n = 31, 23 KTR and 8 HV). Grey boxes show HLA-I signal peptides which are not derived from the recipient, nor from the donor. Asterisks indicate peptides with underestimated information due to a lack of HLA-C genotyping.

<https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1007041.g006>

HLA-E_{UL40} CD8 T-cell response could be related to the sequence of HLA-A*02 signal peptide (VMAPRTLVL). Indeed, HLA-E_{UL40} CD8 T-cell responses that have been identified in HCMV infection typically involved epitopes that are structurally related to canonical HLA-I leader sequences but foreign to the hosts [19, 40, 41]. Consistent with the paucity of the VMAPRTLVL sequence among viral strains, UL40 sequencing of host's circulating strains allowed us to identify the VMAPRTLVL sequence only in a single clinical strain out of 32. Thus, it could be suspected that the presence of HLA-A*02 decreases the chances that a host will present a signal peptide derived from a different HLA-I allele, one that could cause negative selection of HLA-E_{UL40} reactive TCR. In that respect, when HLA-A*02 is present, deletion of HLA-E_{UL40}-responsive T cells is less likely.

HLA-E*01:01 (HLA-E^{107R}) and HLA-E*01:03 (HLA-E^{107G}) alleles only differ in a single amino acid at position 107 and the frequencies of these two variants are equal in most populations [20]. It has been shown that the HLA-E*01:03 variant is usually expressed at higher levels than HLA-E*01:01 [33]. Although located outside the peptide-binding groove, the mutant AA at position 107 may also possibly affect the conformation of HLA-E or its association with β2-microglobulin resulting in the presentation of different peptide repertoires [42]. We found no HLA-E allele preference associated with the establishment of an HLA-E_{UL40} CD8 T-cell response. Instead, we report a higher prevalence of HLA-E*01:01/*01:03 heterozygous among individuals carrying an HLA-E_{UL40} CD8 T-cell response. Interestingly, it has been demonstrated for HLA-E and for the non-human primate HLA-E ortholog that a large panel of identified peptides can be presented by all allotypes [43]. Both alleles present a limited set of peptides derived from class I leader sequences physiologically [42]. In stress conditions (viral infections, tumors), HLA-E can present peptides from other sources than the signal sequences of classical HLA-I molecules [38, 44]. Recent studies demonstrated that the HLA-E alternative peptide repertoire observed in pathophysiological conditions seems not to be shared equally by the two HLA-E alleles [42, 45]. Comparing the HLA-E*01:03-restricted peptides to those of HLA-E*01:01, Celik et al. demonstrated that the peptide repertoire of both alleles greatly differs in the absence of HLA class I molecules leading to functional disparity between both alleles [45]. Consistent with these observations, it is likely that bearing both *01:01/*01:03 alleles may improve HLA-E stability and the diversity of peptide presentation and thus increase HLA-E_{UL40} T-cell responses as suggested by our findings. In transplant recipients, the impact of donor HLA was investigated in parallel to the impact of recipient of donor HLA. We found no significant impact neither for HLA-A,-B,-C or HLA-E alleles nor for a mismatch between donor and recipient for HLA-A,-B,-C or HLA-E.

An elegant study from Wang *et al.* suggested that HCMV-specific CD8 TCR repertoire diversity is more important than CD8 T-cell response magnitude for the control of persistent HCMV infection [46]. Using a single-cell based approach for the clonotype analysis of human CD8 TCRαβ repertoires they demonstrate a high prevalence of both TCRα and TCRβ public motif usage. Our analysis of TCR Vβ usage by HLA-E_{UL40}-specific T cells investigated after *in vitro* expansion showed no predominating TCR Vβ usage for HLA-E_{UL40}-specific T cells,

indicative of an unbiased T cell response. A donor-specific focus revealed diverse and unique TCR V β chain repertoire in each host. Analysis of TCR V α repertoire remains to be performed to fully define T-cell repertoire diversity.

Ex vivo phenotype analysis at distance from the infection revealed that HLA-E_{UL40} CD8 T cells belong to effector memory cells, most probably TEMRA, that display CD45RA^{high}/CD45RO^{low}. Chronic viral infections result in decreased function of virus-specific cellular and humoral immunity that occurs via upregulation of specific inhibitory receptors expressed on the immune cells. Our data showed that HLA-E_{UL40}-restricted CD8 T cells express lower level of PD-1 as compared to HLA-A*02_{pp65}-restricted CD8 T cells. It has been reported that CD8 T cells expressing high levels of co-inhibitory molecule PD-1 during the chronic infection are characterized by lower proliferation, cytokine production, and cytotoxic abilities [47]. PD-1 plays a significant role in establishment of virus-specific CD8 T-cell exhaustion and has been identified as a major regulator of T-cell exhaustion during chronic HIV/SIV infection [47]. Markedly upregulated on the surface of exhausted virus-specific CD8 T cells, PD-1 expression correlates with impaired virus-specific CD8 T-cell function and with elevated plasma viral load in chronic viral infections [48]. In our study, low levels of PD-1 expression compared to conventional HLA-A*02-restricted CD8 T cells appear as a feature of HLA-E-restricted CD8 T cells. The functional significance of the low PD-1 expression still requires investigations. It could be speculated that low PD-1 level on HLA-E_{UL40} CD8 T cells may reflect low TCR affinity as recently reported for antigen-specific CD8 T cells targeting melanoma peptides [49]. This feature could be important for homeostatic survival and proliferation to ensure long-term T cell survival [50].

It is interesting to notice that elected tropism of HCMV for endothelial cells also coincides with elevated basal level of HLA-E on this cell type as well as on hematopoietic cells as we previously reported [51]. Basal HLA-E expression can increase upon cellular stress caused by viral infection or heat shock and in inflammatory and cancer cells [41]. It can be speculated that HLA-E-expressing infected ECs play a role as both a trigger and a target of HLA-E-restricted CD8 T cells. We previously demonstrated *in vitro* the capacity of HLA-E_{UL40} CD8 T cells to efficiently kill primary allogeneic endothelial cell cultures presenting a homologous HLA signal peptide through HLA-E [30]. Consequently, HLA-E_{UL40} CD8 T cells could be involved in vascular injury and transplant rejection. The presence of UL40-specific CD8 T cells in the blood of lung transplant recipients was significantly associated with allograft dysfunction, which manifested as Bronchiolitis Obliterans Syndrome [31]. Although deciphering the clinical impact of HLA-E_{UL40} CD8 T cells was not the focus of the present study, clinical data indicated no significant impact on graft function (serum creatinine and proteinuria) at M12 post-transplantation (Table 1 and S1 Table). This could suggest that although we detected (by tetramer staining or TNF production) a multiplicity of HLA-E_{UL40} CD8 T-cell responses induced by HCMV and potentially cross-reactive toward a broad set of peptides including self and allogeneic HLA_{sp}, their activation may be either controlled by co-inhibitory receptors or functionally impaired. Another important finding in the setting of organ transplantation also emerges from our work. No HLA-E-restricted CD8 T cells were detected in HCMV⁺ transplant recipients suggesting that allograft does not induce *per se* consistent HLA-E-restricted CD8 T-cell response against allogeneic (i.e. donor) HLA-E_{HLA_{sp}} complexes as speculated in earlier studies [19].

The function(s) of HLA-E_{UL40} CD8 T cells still remain to be established in regard to the control of HCMV infection. Efficient lysis of infected cells expressing high levels of HLA-E (i.e. endothelial cells, monocytes) could be a primary function expected for this effector CD8 T-cell subset. Regulatory functions for some HLA-E/Qa-1-restricted CD8 T-cell populations have been well established in mice [52] and more recently in humans [53]. Considering the

high expression of HLA-E on CD4 T and B cells [54], a regulatory role for HLA-E_{UL40} CD8 T cells in the homeostasis of anti-HCMV cellular immune response cannot be excluded beyond an action on the elimination of infected cells. Moreover, our findings provide evidence for self and allogeneic HLA peptides as potential targets and triggers (for their maintenance) of HLA-E_{UL40} CD8 T cells supporting effector and regulatory functions for these unconventional CD8 T cells beyond HCMV infection.

To conclude, HCMV UL40 induces specific HLA-E-restricted CD8 T-cell response with similar occurrence, magnitude, time course and long term persistence that pp65 viral protein. *HLA-A*02* allele and *HLA-E* genotype are key determinants positively associated with HLA-E_{UL40} CD8 T cell response. HLA-E_{UL40} CD8 T cells are effector cells induced by HCMV in a strain-dependent manner that may specifically target and eliminate infected cells. We demonstrated that HLA-E_{UL40} CD8 T cells also display a potential reactivity toward self and allogeneic HLA peptides that may also contribute to the pathogenicity of HCMV, especially in immunocompromised patients.

Materials and methods

Ethics statement

Banked biological samples (PBMCs and DNAs) were issued from the DIVAT biocollection (CNIL agreement n°891735, French Health Minister Project n°02G55). This retrospective study was performed according to the guidelines of the local and national ethics committees (CCPRB, CHU de Nantes, France). Blood samples collected from anonymous healthy volunteers (n = 25) were obtained from the Etablissement Français du Sang (EFS Pays de la Loire, Nantes) and collected with donor's specific and written informed consent for research use.

Clinical and demographic characteristics of the cohort

A total of 121 patients who underwent kidney (105/121) or kidney-pancreas (16/121) transplantation in our center (Institut de Transplantation/Urologie/Néphrologie, ITUN, CHU de Nantes, France) between 2006 and 2013 were retrospectively enrolled in our cohort study. The cohort includes 4 groups of transplant recipients defined by their HCMV status (Table 1). The groups were defined according to the HCMV serology of the recipient (HCMV⁻ or HCMV⁺) and for HCMV⁺ the status of infection (primary, latent, reactivation) at M12 post-transplantation: HCMV active infection (AI) was defined by having at least two consecutive PCR with a viral load (VL) > 3 log₁₀, expressed as number of viral DNA copies (log₁₀cop) per 10⁶ cells. No statistical difference (p > 0.05) between the groups was found related to the age of the recipients at the day of transplantation, gender ratio, frequency of HLA-A*02 genotype, and the post-transplant time for the blood samples. There is also no statistical difference between the groups concerning the gender ratio of transplant donors, the rank of the transplantation and the duration of cold ischemia. Mismatches of total HLA-I and/or HLA-II for each donor/recipient pairs were equal in the groups. Finally, expected statistical differences between the groups only appeared related to HCMV primary infection status at 12 months post-transplantation. Healthy HCMV⁺ seropositive blood donors (n = 25) were also recruited in this study. No statistical differences were founded between HV and KTR patients related to age or gender ratio.

Blood samples and PBMC isolation

Frozen PBMCs isolated from blood samples issued from kidney transplant recipients were prospectively stored at the Centre de Ressources Biologiques (CRB, Nantes, France). Cells were thawed 24 hours before use in RPMI-1640 medium (Gibco, Saint Aubin, France)

supplemented with 8% human serum, 2 mM L-glutamine (Gibco), 100 U/mL penicillin (Gibco), 0.1 mg/mL streptomycin (Gibco) and 50 U/mL human recombinant IL-2 (Proleukin, Novartis Pharma, Rueil-Malmaison, France). Blood samples from HCMV⁺ HV's were provided by the Clinical Development and Transfer Facility (DTC Facility, INSERM/SFR Federative Structure Research Francois Bonamy, Nantes, France). PBMC were isolated by Ficoll density gradient (Eurobio, Les Ulis, France) and used immediately.

HCMV monitoring and HCMV UL40 sequencing

For HCMV monitoring, EDTA blood samples were collected for blood donation from healthy volunteers, patient's follow up or during the acute phase of HCMV infection. HCMV serology was performed using the LIAISON CMV IgG; LIAISON CMV IgM and LIAISON CMV IgG Avidity tests (Diasorin, Saluggia, Italy). Additional evidence of active HCMV replication was examined using an in-house real time HCMV PCR in whole blood, adapted from [55]. The combination of positive CMV IgG, positive IgM, and positive PCR was used for confirmation of primary HCMV infection. For UL40 sequencing, DNA were extracted using QIAasympyphony system (Qiagen, Courtaboeuf, France) from 200µL of whole blood samples with the QIAamp DSP DNA Mini Kit (Qiagen). The HCMV UL40 region (858bp) was amplified by PCR using a protocol adapted from [56]. Briefly, the following specific forward and reverse primers were used for a long PCR: forward 5'-TCCTCCCTGGTACCCGATAACAG-3' and reverse 5'-CGG GCCAGGACTTTTAAATGGCC-3'. Standard reaction mixtures were realized using SYBR-Premix Ex Taq kit (Takara Bio Europe, Saint-Germain-en-Laye, France), with the following PCR parameters: one cycle of 94°C for 12 min, then 50 cycles of 94°C 30 sec, 63°C 30 sec and 72°C for 1 min 30, and finally one cycle of 72°C 7 min. PCR products were analyzed by electrophoresis through a 9% non-denaturing acrylamide-bisacrylamide 37.5–1 gel stained with ethidium bromide. PCR products were purified using the enzymatic method ExoSAP-IT USB (Affymetrix, Thermo Fisher Scientific, Villebon-sur-Yvette, France). Bidirectional sequence was performed using the fluorescent BigDye terminator method (Big Dye version 1.1 Cycle Sequencing Kit, Applied Biosystems, Courtaboeuf, France) and sequencing reactions were run on Applied Biosystems ABI Prism 3130 XL. Nucleotide and amino acid sequences analyses were performed using Seqscape software (version 2.5, Applied Biosystems). All sequences were imported and aligned in MEGA5 software using the UL40 sequence from Human Herpesvirus 5 (Merlin strain) as reference sequence (NCBI Reference Sequence: NC_006273.2). Sequence LOGO were created using the Los Alamos HIV Database tool Analyse Align (http://www.hiv.lanl.gov/content/sequence/ANALYZEALIGN/analyze_align.html), which was based on WebLOGO3.

HLA-E and HLA-A, -B, -C genotyping

Banked genomic DNAs (gDNAs) from the transplant donor/recipient pairs (n = 121) analysed in this study and available in the DIVAT biocollection (62 donors and 106 recipients) were harvested. Genomic DNA was extracted from blood samples issued from the HCMV⁺ HV (n = 25) using usual proteinase K/phenol-chloroform method and subsequently used for genotyping. For HLA-E*01:01 and HLA-E*01:03 determination, a first PCR product was generated from gDNA encompassing exon1 to 3 coding for the alpha domains and using the following primers: forward 5'-TCCTGGATACTCATGACGCAGACTC-3' and reverse 5'-CCTCTACCAGGTGAAGCAGCG-3'. Next, a second run of amplification was performed into two separated nested PCR targeting exons 1–2 and exon 3, respectively with the primer pairs: 5'-TCC TGGATACTCATGACGCAGACTC-3' and 5'-ATCTGGGACCCGAAGATTTCGA-3', 5'-TCG AATCTTCGGGTCCAGAT-3' and 5'-CCTCTTACCCAGGTGAAGCAGCG-3'. DNA

sequencing was performed with BigDye Terminator v3.1 kit (Applied Biosystems) according to the manufacturer's instructions on the DNA Sequencing Core Facility (INSERM/SFR François Bonamy, Nantes, France), using a 48-capillary Applied Biosystems 3730 automatic system (Applied Biosystems). Sequences were analyzed using Chromas 2.33 software (Digital River GmbH, Shannon, Ireland) using a SNP at AA position 107 to discriminate between *01:01 and *01:03 alleles. HLA-A,-B,-C genotypes of transplant donors/recipients pairs and HV were performed by either the EFS (Nantes, Pays de la Loire) or Histogenetics (Ossining, NY, USA), by using PCR-SSO (and completed by PCR-SSP if necessary) and based on the IMGT/HLA database nomenclature (www.ebi.ac.uk/ipd/imgt/hla/).

Production of HLA-E/UL40₁₅₋₂₃ and HLA-A*02:01/pp65₄₉₅₋₅₀₃ tetramer complexes

Nine-mers UL40₁₅₋₂₃ peptides from 11 different HCMV strains (VMAPRTLIL, VMAPRTLLL, VMAPRTLVL, VMAPRTVLL, VMAPRSLIL, VMAPRSLLL, VMTPTLVL, VMAPQSLLL, VTAPRTLLL, VTAPRTVLL, VMAPRALLL) and the UL83 pp65₄₉₅₋₅₀₃ peptide (NLVPMV ATV) were synthesized (purity >95%) and purchased from Proteogenix SAS (Schiltigheim, France). HLA-E*01:01/UL40₁₅₋₂₃ (HLA-E_{UL40}) and HLA-A*02:01/pp65₄₉₅₋₅₀₃ (HLA-A*02_{pp65}) complexes were generated as described previously [57]. Recombinant HLA proteins were produced in *E.coli* and refolded with 15 µg/mL of each UL40₁₅₋₂₃ peptide for HLA-E-monomers or pp65₄₉₅₋₅₀₃ peptide for HLA-A*02-monomers. Next, HLA-monomers were biotinylated for 4h at 30°C with 6 µg/mL BirA (Immunotech, Marseille, France), purified and tetramerized with BV421- or APC-labelled streptavidin (BD Biosciences, Le Pont de Claix, France). Tetramerization was confirmed by gel filtration chromatography (Superdex 200 column, Sigma-Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France).

Ex vivo detection and quantification of HLA-E_{UL40} and HLA-A*02_{pp65} T cells by flow cytometry

To investigate the frequency of the anti-HCMV CD8 T-cell responses in individuals, PBMC (3×10^5 per condition) were pre-incubated with a blocking anti-CD94 mAb (clone HP-3D9, 5 µg/mL, BD Biosciences) for 20 min at 4°C to completely abrogate the non-specific staining of CD94/NKG2⁺ T cells by HLA-E-tetramers (S1 Fig). PBMCs were then incubated with one of the different BV421-labelled HLA-E- or HLA-A*02-tetramers (10 µg/mL, 30min, 4°C), before costaining (30min, 4°C) with the following antibodies: anti-CD3 (clone SK7/Leu4, BV786, 2 µg/mL, BD Biosciences), anti-CD8α (clone RPA-T8, BV650, 0.1 µg/mL, BD Biosciences) and anti-TCR γδ (clone 11F2, APC-Vio770, 3 µg/mL, Miltenyi Biotec, Paris, France). Dead cells were excluded using NucRed Dead 647 ready probes reagent (Life technologies). As a control of tetramer staining, a FMO condition (Fluorescence Minus One; all labelled-markers except one) without tetramers was performed for each sample. Acquisition was performed on a BD LSR II and analyses were performed using BD DIVA Software v6.0 as described below. Compensations were performed by using anti-mouse κ chain Ab-coated beads (anti-mouse Ig, κ chain/negative control compensation particles set, BD Biosciences) incubated with corresponding Ab at the same concentration during 15 min at room temperature. Data acquisition for the 121 KTR and 25 HV was normalized with application settings based on the KTR#001 patient. Gating analysis strategy was identical for all samples (S1 Fig).

***Ex vivo* analysis of time course and activation of anti-HCMV CD8 T-cell responses post-infection**

To follow-up the development of HCMV-specific T-cell subpopulations in KTR, banked PBMCs from 16 KTR prospectively collected at 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 9, 10, 12 and 13 months post-transplantation were used. For each time point tested, UL40-specific HLA-E-restricted (HLA-E_{UL40}) and pp65-specific HLA-A*02:01-restricted (HLA-A*02_{pp65}) T cells were concomitantly stained and quantified as described above with the complementary mAbs: anti-CD69 (clone FN50, BUV395, 2 µg/mL, BD Biosciences) and anti-PD1 (clone EH12 (.1), PE, 2 µg/mL, BD Biosciences). Acquisition and analysis was performed on a BD LSR Fortessa X-20 with BD DIVA Software v8.0. Longitudinal samples for each patient were all stained and acquired in the same experiment.

***In vitro* expansion of UL40-specific HLA-E-restricted T cells**

HLA-E_{UL40} T cells were sorted for 5 transplant recipients (#104, #105, #107, #108 and #109) from PBMCs harvested at 12 months post-transplantation as previously described [58]. Briefly, streptavidin-coated beads (Dynabeads M-280 Streptavidin, Invitrogen, Villebon sur Yvette, France) were saturated with HLA-E/UL40₁₅₋₂₃ monomers before incubation with PBMCs (5×10^6) for 4h. The UL40₁₅₋₂₃ peptide corresponding to the own HCMV infecting strain was selected for each patient. HLA-E_{UL40} T cells were isolated by immunomagnetic sorting and then expanded for 21–30 days as follows: cells were seeded in 96-well plates (3×10^3 /well) and stimulated with phytohemagglutinin (1 µg/mL, PHA-L; Sigma-Aldrich) in the presence of irradiated EBV-transformed B-cell lines and allogeneic PBMC from healthy donors (EFS, Nantes) as feeder. Cells were grown in RPMI-1640 medium supplemented with 8% human serum, 2 mM L-glutamine, 100 U/mL penicillin and 0.1 mg/mL streptomycin and human recombinant IL-2 (150 U/mL). Purity (>95%) of each T cell population was defined after 14 days of culture by tetramer staining.

***In vitro* functional analysis of UL40-specific HLA-E-restricted T-cell activity and peptide-specificity**

The use of tetramers to activate T cells has been extensively reviewed by Wooldridge and colleagues [59]. T-cell activation by soluble peptide–MHC-I tetramers is very sensitive for inducing a full range of effector functions. In addition to inducing a normal pattern of T-cell signaling [60] tetramer activation results in lytic granule release, a full profile of cytokine and chemokine release and the production of a wide range of cell surface activation markers [61]. In the present study, a series of preliminary experiments were performed to set up the assay measuring T-cell activation in response to HLA-E/UL40 peptide tetramers. Representative results from these preliminary assays are illustrated in the S4 Fig. To determine the peptide specificity of HLA-E_{UL40}-restricted T cells, purified cell lines (1×10^5 cells /condition) were stimulated for 5h at 37°C in 96-wells plates with one of the 11 HLA-E/UL40-tetramers at 20 µg/mL in RPMI 1640 medium in the presence of Brefeldin A (10 µg/mL, Sigma). Next, cells were incubated with an anti-CD8α mAb (clone RPA-T8, 1 µg/mL, BioLegend) for 30 min at 4°C before fixation with 4% paraformaldehyde. After permeabilization with 0.1% (w/v) saponin (Sigma-Aldrich), cells were stained for 30 min at room temperature with an anti-TNFα mAb (clone cA2, Miltenyi). Cells were finally washed twice in PBS-0.1% (v/v) BSA and 0.1% (w/v) saponin before sample acquisition on BD FACS Canto II.

Phenotype analysis of UL40-specific HLA-E-restricted T cells

Phenotypic analyses were performed on PBMCs from 3 patients. Analysis of T cells before activation was performed *ex vivo* using the following mAbs: anti-CD3 (clone UCHT1), anti-TCR $\alpha\beta$ (clone T10B9.1A-31/T10B9), anti-TCR $\gamma\delta$ (clone B1), anti-CD45RA (clone HI100), anti-CD45RO (clone UCHL1), anti-CD28 (clone CD28.2), anti-CD27 (clone M-T271), anti-CD57 (clone NK-1) from BD Biosciences; anti-CD8 β (clone SIDI8BEE) from eBioscience (ThermoFisher); anti-CD4 (clone RPA-T4), anti-CD8 α (clone RPA-T8) from Miltenyi and anti-CCR7 (clone 150503) from R&D Systems. For V β TCR repertoire analysis, purified HLA-E_{UL40} T cells (2×10^5) were incubated 30 min at 4°C in PBS-0.1% (v/v) BSA with the TCR V β Repertoire Kit (IO Test Beta Mark-TCR V β Repertoire Kit, Beckman Coulter, Villepinte, France). This kit allows detection of the following V β TCR: 1, 2, 3, 4, 5.1, 5.2, 5.3, 7.1, 7.2, 8, 9, 11, 12, 13.1, 13.2, 13.6, 14, 16, 17, 18, 20, 21.3, 22 and 23. All Abs were used at saturating concentration conforming to the manufacturer's recommendation.

Statistical analyses

Data are expressed as medians + interquartile range between Q1 and Q3, or percentages. Appropriate non-parametric statistical analysis (Kruskall-Wallis test, Mann-Whitney, Fischer's exact test or Pearson's chi-squared test with adequate post-tests) was performed using GraphPad Prism (GraphPad, San Diego, CA) and R softwares. The type I error rate α (probability threshold of rejecting the null hypothesis given that it is true) was set to 0.05. A *p*-value <0.05 was considered to represent a statistically significant difference.

Supporting information

S1 Table. Kidney graft function in HCMV⁺ recipients with or without HLA-E_{UL40} CD8 T cell responses.
(PDF)

S1 Fig. HLA-E_{UL40} T-cell detection assay. (A-B-C) CD94 blockade using an anti-CD94 monoclonal antibody to avoid HLA-E tetramer binding to CD94/NKG2A and CD94/NKG2C receptors. (A) CD94/NKG2A (left, upper panel) and CD94/NKG2C (left, lower panel) expression on lymphocyte-gated PBMCs from an HCMV⁺ HV (representative data from a single donor are shown) that display both CD94/NKG2A⁺ and high CD94/NKG2C⁺ NK responses (left panel) but no HLA-E-restricted T-cell response. (B) HLA-E_{VMAPRTLIL} tetramer staining was performed either in the absence (left panel) or in the presence (right panel) of anti-CD94 monoclonal antibody on PBMCs from the same HCMV⁺ HV. CD3⁺ cells—including NK cells—were represented on top panel and T cells (CD3⁺ cells) on bottom panel. These data show that incubation with blocking anti-CD94 mAb totally abrogates binding of tetramer to CD3⁺ and CD3⁺ T cells. Since we used a fluorochrome-labeled blocking anti-CD94, in the absence (-) of antibody, CD94 is not detected. In this sample no HLA-E_{UL40} T cells were detected. Similar results were obtained for each of the eleven different HLA-E_{UL40} tetramers used in this study and confirmed with PBMCs from two other HV. (C) Detection of HLA-E_{UL40}-specific CD8 T cells after blocking CD94. Representative examples of HLA-E/peptide tetramer staining before and after blocking CD94, with specific anti-CD94 mAb, on PBMCs either without (HCMV⁻ healthy volunteer, upper panel) or with a HLA-E_{UL40} CD8 T-cell response (HCMV⁺ individuals, lower panel) are shown. HLA-E/peptide tetramer staining was analyzed after gating on CD3⁺ cells, to investigate NK cells, on $\gamma\delta$ T cells and on $\alpha\beta$ CD8⁺ T cells. In PBMC from HCMV⁻ donor, HLA-E/peptide tetramers bind to a fraction of CD3⁺ and $\gamma\delta$ T cells through interaction with CD94/NKG2A or CD94/NKG2C receptors usually expressed on these subsets.

HLA-E/peptide tetramers staining on CD3⁻ and $\gamma\delta$ T cells was abrogated after blocking CD94 with anti-CD94 mAb. Similar inhibition of HLA-E/peptide tetramers staining on CD3⁻ cells and $\gamma\delta$ T cells was observed for HCMV⁺ hosts. However, blockade of CD94 preserves the specific binding of HLA-E/peptide tetramers to $\alpha\beta$ TCR and thus allows the detection of HLA-E_{UL40} CD8 T cells. (D) Sensitivity of the detection assay. Two monoclonal T-cell populations were used: one specific of the HLA-E/VMAPRTLIL (UL40₁₅₋₂₃ viral peptide) and the other specific of the HLA-A*02/NLVPMVATV (pp65₄₉₅₋₅₀₃ viral peptide). These T cells were diluted in PBMCs from healthy donor at different ratios (0, 0.1, 1 and 10%). For detection assay, cells were preincubated with a blocking anti-CD94 mAb before co-staining with the relevant tetramer/peptide in combination with anti-CD3, -TCR $\gamma\delta$; and -CD8 mAbs. Tetramers⁺ CD8 cells were gated on live CD3⁺TCR $\gamma\delta$ ⁻ cells. (E) Gating strategy for the *ex vivo* analysis of HLA-E_{UL40}⁻ or HLA-A*02_{pp65}-specific CD8 T cells on PBMCs. Lymphocytes were gated on the basis of their morphology in FSC-A/SSC-A (1), and doublets of cells were excluded using FSC-A/FSC-H (2) and SSC-A/SSC-H (3) dot plots. Dead cells were excluded (4) and after gating on the CD3⁺ TCR $\gamma\delta$ ⁻ cells (5), frequency of tetramers⁺ CD8 α ⁺ T-cell subpopulations was determined (6).

(PDF)

S2 Fig. Analysis of HCMV UL40 sequence polymorphism in HCMV⁺ kidney transplant recipients. Genomic DNAs isolated from HCMV positive blood samples of HCMV⁺ transplant recipients (n = 25) were sequenced for the identification of UL40 protein (amino acids 1–221) provided by the circulating HCMV strains. Amino acid variability, expressed as a number of amino acid variants (A) and in percentages (B), within the HLA-E-binding peptide (UL40₁₅₋₂₃, shown in red) among the sequence for HCMV UL40 signal peptide (UL40₁₋₃₇, shown in grey) and the coding sequence (UL40₃₇₋₂₂₁, shown in black). A total of 32 UL40 sequences from 25 hosts were analysed. UL40 protein sequence from the Merlin HCMV strain (NCBI Reference Sequence: NC_006273.2) was used as reference.

(PDF)

S3 Fig. Longitudinal analysis of PD-1 and CD69. Expression of PD-1 (A) and CD69 (B) analysed on blood samples from KTR#008, #107 and #108 at different time points post-transplantation. Data represent the % of CD69⁺/tetramer⁺ and PD-1⁺/tetramer⁺ cells among CD3⁺ CD8 α ⁺ TCR $\gamma\delta$ ⁻ tetramers⁺ cells, for HLA-E_{UL40} (in blue) and HLA-A*02_{pp65} (in red) anti-HCMV CD8 T-cell responses post-transplantation.

(PDF)

S4 Fig. Representative phenotypes of HLA-E_{UL40} CD8 T cells. Immunostaining for CD45RO, CD45RA, CD27, CD28, CCR7 and CD57 were performed *ex vivo* on PBMCs by co-staining with HLA-E_{UL40} tetramers and after gating on tetramer⁺ CD3⁺, $\gamma\delta$ ⁻ T, CD8⁺ T cells. HLA-E_{UL40} CD8 T cells detected in PBMCs, harvested at M12 post-graft, from 2 HCMV⁺ kidney transplant recipients (KTR #107 and KTR#109) and representative from 3 KTRs are shown.

(PDF)

S5 Fig. Antigen-specific CD8 T-cell activation using HLA-E/peptide tetramer complexes. TNF production (% of positive cells) detected by intracellular staining on CD8 T cells gated from PBMCs either unstimulated or stimulated with soluble HLA-E monomers, HLA-E monomers coated on M280 Dynabeads or HLA-E tetramers for 5h. HLA-E molecules were loaded with either an irrelevant peptide (upper panel) or with the specific peptide target (lower panel). This figure shows that an irrelevant peptide gives no response indicating the specificity of the method. When the ability of tetramers *versus* monomers loaded with specific peptide

target to stimulate HLA-E_{UL40} CD8 T cells was compared we found a higher percentage of TNF-producing CD8 T cells with HLA-E tetramer/peptides (52.4%) compared to HLA-E monomer/peptides (22.6% and 10.2% for uncoated and bead-coated, respectively).
(PDF)

Acknowledgments

We thank Karine Bernardeau and Klara Echasserieau from the Recombinant Protein Facility (P²R, Structure Fédérative de Recherche “Francois Bonamy”, Nantes) for excellent assistance in the production of HLA-E- and HLA-A*02-tetramers. The authors also thank the Clinical Development and Transfer DTC Facility for providing blood samples from HCMV⁺ HV donors and Juliette Desfrancois-Noel and Nadège Marec from the CytoCell Cytometry Facility for expert technical assistance (both facilities belong to the Structure Fédérative de Recherche “Francois Bonamy”, Nantes). We also thank the Centre de Ressources Biologiques (CRB, CHU de Nantes) for sample collection and harvesting.

Author Contributions

Conceptualization: Nicolas Jouand, Céline Bressollette-Bodin, Magali Giral, Mathilde Allard, Nadine Gervois, Béatrice Charreau.

Data curation: Nicolas Jouand, Nathalie Gérard.

Formal analysis: Nicolas Jouand, Céline Bressollette-Bodin, Magali Giral, Nadine Gervois, Béatrice Charreau.

Funding acquisition: Nadine Gervois, Béatrice Charreau.

Investigation: Nicolas Jouand, Céline Bressollette-Bodin, Nathalie Gérard, Magali Giral, Audrey Rodallec, Tiphaine Parrot, Mathilde Allard, Nadine Gervois, Béatrice Charreau.

Methodology: Nicolas Jouand, Nathalie Gérard, Magali Giral, Audrey Rodallec, Romain Oger, Tiphaine Parrot, Mathilde Allard, Nadine Gervois, Béatrice Charreau.

Resources: Céline Bressollette-Bodin, Magali Giral, Pierrick Guérif, Anne Cesbron-Gautier.

Supervision: Nadine Gervois, Béatrice Charreau.

Validation: Nicolas Jouand.

Writing – original draft: Nicolas Jouand, Nadine Gervois, Béatrice Charreau.

References

1. Boeckh M. Complications, diagnosis, management, and prevention of CMV infections: current and future. *Hematology American Society of Hematology Education Program*. 2011; 2011:305–9. <https://doi.org/10.1182/asheducation-2011.1.305> PMID: 22160050.
2. Kotton CN. CMV: Prevention, Diagnosis and Therapy. *American journal of transplantation: official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons*. 2013; 13 Suppl 3:24–40; quiz <https://doi.org/10.1111/ajt.12006> PMID: 23347212.
3. Razonable RR, Humar A, Practice ASTIDCo. Cytomegalovirus in solid organ transplantation. *American journal of transplantation: official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons*. 2013; 13 Suppl 4:93–106. <https://doi.org/10.1111/ajt.12103> PubMed PMID: 23465003.
4. Ramanan P, Razonable RR. Cytomegalovirus infections in solid organ transplantation: a review. *Infection & chemotherapy*. 2013; 45(3):260–71. <https://doi.org/10.3947/ic.2013.45.3.260> PMID: 24396627; PubMed Central PMCID: PMC3848521.

5. Egli A, Humar A, Kumar D. State-of-the-art monitoring of cytomegalovirus-specific cell-mediated immunity after organ transplant: a primer for the clinician. *Clinical infectious diseases: an official publication of the Infectious Diseases Society of America*. 2012; 55(12):1678–89. <https://doi.org/10.1093/cid/cis818> PMID: 22990848.
6. Vieira Braga FA, Hertoghs KM, van Lier RA, van Gisbergen KP. Molecular characterization of HCMV-specific immune responses: Parallels between CD8(+) T cells, CD4(+) T cells, and NK cells. *European journal of immunology*. 2015; 45(9):2433–45. <https://doi.org/10.1002/eji.201545495> PMID: 26228786.
7. Moss P, Khan N. CD8(+) T-cell immunity to cytomegalovirus. *Human immunology*. 2004; 65(5):456–64. <https://doi.org/10.1016/j.humimm.2004.02.014> PMID: 15172445.
8. Carney EF. Transplantation: The impact of donor CMV infection on kidney graft outcome. *Nature reviews Nephrology*. 2013; 9(8):434. <https://doi.org/10.1038/nrneph.2013.123> PMID: 23774813.
9. Sylwester AW, Mitchell BL, Edgar JB, Taormina C, Pelte C, Ruchti F, et al. Broadly targeted human cytomegalovirus-specific CD4+ and CD8+ T cells dominate the memory compartments of exposed subjects. *The Journal of experimental medicine*. 2005; 202(5):673–85. <https://doi.org/10.1084/jem.20050882> PMID: 16147978; PubMed Central PMCID: PMC2212883.
10. Sylwester A, Nambiar KZ, Caserta S, Klenerman P, Picker LJ, Kern F. A new perspective of the structural complexity of HCMV-specific T-cell responses. *Mechanisms of ageing and development*. 2016; 158:14–22. <https://doi.org/10.1016/j.mad.2016.03.002> PMID: 26957355.
11. Guma M, Angulo A, Vilches C, Gomez-Lozano N, Malats N, Lopez-Botet M. Imprint of human cytomegalovirus infection on the NK cell receptor repertoire. *Blood*. 2004; 104(12):3664–71. <https://doi.org/10.1182/blood-2004-05-2058> PMID: 15304389.
12. Kuijpers TW, Baars PA, Dantin C, van den Burg M, van Lier RA, Roosnek E. Human NK cells can control CMV infection in the absence of T cells. *Blood*. 2008; 112(3):914–5. <https://doi.org/10.1182/blood-2008-05-157354> PMID: 18650467.
13. Fletcher JM, Vukmanovic-Stejic M, Dunne PJ, Birch KE, Cook JE, Jackson SE, et al. Cytomegalovirus-specific CD4+ T cells in healthy carriers are continuously driven to replicative exhaustion. *Journal of immunology*. 2005; 175(12):8218–25. PMID: 16339561.
14. Moss P. The emerging role of cytomegalovirus in driving immune senescence: a novel therapeutic opportunity for improving health in the elderly. *Current opinion in immunology*. 2010; 22(4):529–34. <https://doi.org/10.1016/j.coi.2010.07.001> PMID: 20685099.
15. Borysiewicz LK, Hickling JK, Graham S, Sinclair J, Cranage MP, Smith GL, et al. Human cytomegalovirus-specific cytotoxic T cells. Relative frequency of stage-specific CTL recognizing the 72-kD immediate early protein and glycoprotein B expressed by recombinant vaccinia viruses. *The Journal of experimental medicine*. 1988; 168(3):919–31. PMID: 2844952; PubMed Central PMCID: PMC2189029.
16. Wills MR, Carmichael AJ, Mynard K, Jin X, Weekes MP, Plachter B, et al. The human cytotoxic T-lymphocyte (CTL) response to cytomegalovirus is dominated by structural protein pp65: frequency, specificity, and T-cell receptor usage of pp65-specific CTL. *Journal of virology*. 1996; 70(11):7569–79. PMID: 8892876; PubMed Central PMCID: PMC190825.
17. Holtappels R, Bohm V, Podlech J, Reddehase MJ. CD8 T-cell-based immunotherapy of cytomegalovirus infection: "proof of concept" provided by the murine model. *Medical microbiology and immunology*. 2008; 197(2):125–34. <https://doi.org/10.1007/s00430-008-0093-2> PMID: 18343947.
18. Borchers S, Ogonek J, Varanasi PR, Tischer S, Bremm M, Eiz-Vesper B, et al. Multimer monitoring of CMV-specific T cells in research and in clinical applications. *Diagnostic microbiology and infectious disease*. 2014; 78(3):201–12. <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2013.11.007> PMID: 24331953.
19. Pietra G, Romagnani C, Manzini C, Moretta L, Mingari MC. The emerging role of HLA-E-restricted CD8+ T lymphocytes in the adaptive immune response to pathogens and tumors. *Journal of biomedicine & biotechnology*. 2010; 2010:907092. <https://doi.org/10.1155/2010/907092> PMID: 20634877; PubMed Central PMCID: PMC2896910.
20. Grimsley C, Kawasaki A, Gassner C, Sageshima N, Nose Y, Hatake K, et al. Definitive high resolution typing of HLA-E allelic polymorphisms: Identifying potential errors in existing allele data. *Tissue antigens*. 2002; 60(3):206–12. PMID: 12445303.
21. Prod'homme V, Tomasec P, Cunningham C, Lemberg MK, Stanton RJ, McSharry BP, et al. Human cytomegalovirus UL40 signal peptide regulates cell surface expression of the NK cell ligands HLA-E and gpUL18. *Journal of immunology*. 2012; 188(6):2794–804. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1102068> PMID: 22345649; PubMed Central PMCID: PMC3303119.
22. Tomasec P, Braud VM, Rickards C, Powell MB, McSharry BP, Gadola S, et al. Surface expression of HLA-E, an inhibitor of natural killer cells, enhanced by human cytomegalovirus gpUL40. *Science*. 2000; 287(5455):1031. PMID: 10669413.

23. Braud VM, Allan DS, O'Callaghan CA, Soderstrom K, D'Andrea A, Ogg GS, et al. HLA-E binds to natural killer cell receptors CD94/NKG2A, B and C. *Nature*. 1998; 391(6669):795–9. <https://doi.org/10.1038/35869> PMID: 9486650.
24. Lee N, Goodlett DR, Ishitani A, Marquardt H, Geraghty DE. HLA-E surface expression depends on binding of TAP-dependent peptides derived from certain HLA class I signal sequences. *Journal of immunology*. 1998; 160(10):4951–60. PMID: 9590243.
25. Ulbrecht M, Martinuzzi S, Grzeschik M, Hengel H, Ellwart JW, Pla M, et al. Cutting edge: the human cytomegalovirus UL40 gene product contains a ligand for HLA-E and prevents NK cell-mediated lysis. *Journal of immunology*. 2000; 164(10):5019–22. PMID: 10799855.
26. Wang EC, McSharry B, Retiere C, Tomasec P, Williams S, Borysiewicz LK, et al. UL40-mediated NK evasion during productive infection with human cytomegalovirus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2002; 99(11):7570–5. <https://doi.org/10.1073/pnas.112680099> PMID: 12032324; PubMed Central PMCID: PMC124287.
27. Rolle A, Pollmann J, Ewen EM, Le VT, Halenius A, Hengel H, et al. IL-12-producing monocytes and HLA-E control HCMV-driven NKG2C+ NK cell expansion. *The Journal of clinical investigation*. 2014; 124(12):5305–16. <https://doi.org/10.1172/JCI177440> PMID: 25384219; PubMed Central PMCID: PMC4348979.
28. Romagnani C, Pietra G, Falco M, Millo E, Mazzarino P, Biassoni R, et al. Identification of HLA-E-specific alloreactive T lymphocytes: a cell subset that undergoes preferential expansion in mixed lymphocyte culture and displays a broad cytolytic activity against allogeneic cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2002; 99(17):11328–33. <https://doi.org/10.1073/pnas.172369799> PMID: 12167676; PubMed Central PMCID: PMC123256.
29. Pietra G, Romagnani C, Mazzarino P, Falco M, Millo E, Moretta A, et al. HLA-E-restricted recognition of cytomegalovirus-derived peptides by human CD8+ cytolytic T lymphocytes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2003; 100(19):10896–901. <https://doi.org/10.1073/pnas.1834449100> PMID: 12960383; PubMed Central PMCID: PMC196899.
30. Allard M, Tonnerre P, Nedellec S, Oger R, Morice A, Guilloux Y, et al. HLA-E-restricted cross-recognition of allogeneic endothelial cells by CMV-associated CD8 T cells: a potential risk factor following transplantation. *PloS one*. 2012; 7(11):e50951. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0050951> PMID: 23226431; PubMed Central PMCID: PMC3511380.
31. Sullivan LC, Westall GP, Widjaja JM, Mifsud NA, Nguyen TH, Meehan AC, et al. The Presence of HLA-E-Restricted, CMV-Specific CD8+ T Cells in the Blood of Lung Transplant Recipients Correlates with Chronic Allograft Rejection. *PloS one*. 2015; 10(8):e0135972. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0135972> PMID: 26302084; PubMed Central PMCID: PMC4547726.
32. Hoare HL, Sullivan LC, Pietra G, Clements CS, Lee EJ, Ely LK, et al. Structural basis for a major histocompatibility complex class Ib-restricted T cell response. *Nature immunology*. 2006; 7(3):256–64. <https://doi.org/10.1038/ni1312> PMID: 16474394.
33. Strong RK, Holmes MA, Li P, Braun L, Lee N, Geraghty DE. HLA-E allelic variants. Correlating differential expression, peptide affinities, crystal structures, and thermal stabilities. *The Journal of biological chemistry*. 2003; 278(7):5082–90. <https://doi.org/10.1074/jbc.M208268200> PMID: 12411439.
34. Heatley SL, Pietra G, Lin J, Widjaja JM, Harpur CM, Lester S, et al. Polymorphism in human cytomegalovirus UL40 impacts on recognition of human leukocyte antigen-E (HLA-E) by natural killer cells. *The Journal of biological chemistry*. 2013; 288(12):8679–90. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.409672> PMID: 23335510; PubMed Central PMCID: PMC3605686.
35. Ljungman P, Boeckh M, Hirsch HH, Josephson F, Lundgren J, Nichols G, et al. Definitions of Cytomegalovirus Infection and Disease in Transplant Patients for Use in Clinical Trials. *Clinical infectious diseases: an official publication of the Infectious Diseases Society of America*. 2017; 64(1):87–91. <https://doi.org/10.1093/cid/ciw668> PMID: 27682069.
36. Petrie EJ, Clements CS, Lin J, Sullivan LC, Johnson D, Huyton T, et al. CD94-NKG2A recognition of human leukocyte antigen (HLA)-E bound to an HLA class I leader sequence. *The Journal of experimental medicine*. 2008; 205(3):725–35. <https://doi.org/10.1084/jem.20072525> PMID: 18332182; PubMed Central PMCID: PMC2275392.
37. Braud V, Jones EY, McMichael A. 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*. 1997; 27(5):1164–9. <https://doi.org/10.1002/eji.1830270517> PMID: 9174606.
38. Mazzarino P, Pietra G, Vacca P, Falco M, Colau D, Coulie P, et al. Identification of effector-memory CMV-specific T lymphocytes that kill CMV-infected target cells in an HLA-E-restricted fashion. *European journal of immunology*. 2005; 35(11):3240–7. <https://doi.org/10.1002/eji.200535343> PMID: 16224817.

39. Klenerman P, Oxenius A. T cell responses to cytomegalovirus. *Nature reviews Immunology*. 2016; 16(6):367–77. <https://doi.org/10.1038/nri.2016.38> PMID: 27108521.
40. Sullivan LC, Clements CS, Rossjohn J, Brooks AG. The major histocompatibility complex class Ib molecule HLA-E at the interface between innate and adaptive immunity. *Tissue antigens*. 2008; 72(5):415–24. <https://doi.org/10.1111/j.1399-0039.2008.01138.x> PMID: 18946929.
41. van Hall T, Oliveira CC, Joosten SA, Ottenhoff TH. The other Janus face of Qa-1 and HLA-E: diverse peptide repertoires in times of stress. *Microbes and infection*. 2010; 12(12–13):910–8. <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2010.07.011> PMID: 20670688.
42. Kraemer T, Celik AA, Huyton T, Kunze-Schumacher H, Blasczyk R, Bade-Doding C. HLA-E: Presentation of a Broader Peptide Repertoire Impacts the Cellular Immune Response—Implications on HSCT Outcome. *Stem cells international*. 2015; 2015:346714. <https://doi.org/10.1155/2015/346714> PMID: 26366178; PubMed Central PMCID: PMC4549550.
43. Hansen SG, Wu HL, Burwitz BJ, Hughes CM, Hammond KB, Ventura AB, et al. Broadly targeted CD8 (+) T cell responses restricted by major histocompatibility complex E. *Science*. 2016; 351(6274):714–20. <https://doi.org/10.1126/science.aac9475> PMID: 26797147; PubMed Central PMCID: PMC4769032.
44. Michaelsson J, Teixeira de Matos C, Achour A, Lanier LL, Karre K, Soderstrom K. A signal peptide derived from hsp60 binds HLA-E and interferes with CD94/NKG2A recognition. *The Journal of experimental medicine*. 2002; 196(11):1403–14. <https://doi.org/10.1084/jem.20020797> PMID: 12461076; PubMed Central PMCID: PMC2194258.
45. Celik AA, Kraemer T, Huyton T, Blasczyk R, Bade-Doding C. The diversity of the HLA-E-restricted peptide repertoire explains the immunological impact of the Arg107Gly mismatch. *Immunogenetics*. 2016; 68(1):29–41. <https://doi.org/10.1007/s00251-015-0880-z> PMID: 26552660; PubMed Central PMCID: PMC4701785.
46. Wang GC, Dash P, McCullers JA, Doherty PC, Thomas PG. T cell receptor alphabeta diversity inversely correlates with pathogen-specific antibody levels in human cytomegalovirus infection. *Science translational medicine*. 2012; 4(128):128ra42. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3003647> PMID: 22491952; PubMed Central PMCID: PMC3593633.
47. Velu V, Shetty RD, Larsson M, Shankar EM. Role of PD-1 co-inhibitory pathway in HIV infection and potential therapeutic options. *Retrovirology*. 2015; 12:14. <https://doi.org/10.1186/s12977-015-0144-x> PMID: 25756928; PubMed Central PMCID: PMC4340294.
48. Barber DL, Wherry EJ, Masopust D, Zhu B, Allison JP, Sharpe AH, et al. Restoring function in exhausted CD8 T cells during chronic viral infection. *Nature*. 2006; 439(7077):682–7. <https://doi.org/10.1038/nature04444> PMID: 16382236.
49. Simon S, Vignard V, Florenceau L, Dreno B, Khammari A, Lang F, et al. PD-1 expression conditions T cell avidity within an antigen-specific repertoire. *Oncoimmunology*. 2016; 5(1):e1104448. <https://doi.org/10.1080/2162402X.2015.1104448> PMID: 26942093; PubMed Central PMCID: PMC4760290.
50. Martinez RJ, Evavold BD. Lower Affinity T Cells are Critical Components and Active Participants of the Immune Response. *Frontiers in immunology*. 2015; 6:468. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2015.00468> PMID: 26441973; PubMed Central PMCID: PMC4564719.
51. Coupel S, Moreau A, Hamidou M, Horejsi V, Souillou JP, Charreau B. Expression and release of soluble HLA-E is an immunoregulatory feature of endothelial cell activation. *Blood*. 2007; 109(7):2806–14. <https://doi.org/10.1182/blood-2006-06-030213> PMID: 17179229.
52. Kim HJ, Cantor H. Regulation of self-tolerance by Qa-1-restricted CD8(+) regulatory T cells. *Seminars in immunology*. 2011; 23(6):446–52. <https://doi.org/10.1016/j.smim.2011.06.001> PMID: 22136694; PubMed Central PMCID: PMC4631408.
53. van Meijgaarden KE, Haks MC, Caccamo N, Dieli F, Ottenhoff TH, Joosten SA. Human CD8+ T-cells recognizing peptides from *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb) presented by HLA-E have an unorthodox Th2-like, multifunctional, Mtb inhibitory phenotype and represent a novel human T-cell subset. *PLoS pathogens*. 2015; 11(3):e1004671. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1004671> PMID: 25803478; PubMed Central PMCID: PMC4372528.
54. Takao S, Ishikawa T, Yamashita K, Uchiyama T. The rapid induction of HLA-E is essential for the survival of antigen-activated naive CD4 T cells from attack by NK cells. *Journal of immunology*. 2010; 185(10):6031–40. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1000176> PMID: 20952676.
55. Bressollette-Bodin C, Coste-Burel M, Besse B, Andre-Garnier E, Ferre V, Imbert-Marcille BM. Cellular normalization of viral DNA loads on whole blood improves the clinical management of cytomegalovirus or Epstein Barr virus infections in the setting of pre-emptive therapy. *Journal of medical virology*. 2009; 81(1):90–8. <https://doi.org/10.1002/jmv.21334> PMID: 19031462.
56. Garrigue I, Corte MF, Magnin N, Couzi L, Capdepont S, Rio C, et al. Variability of UL18, UL40, UL111a and US3 immunomodulatory genes among human cytomegalovirus clinical isolates from renal

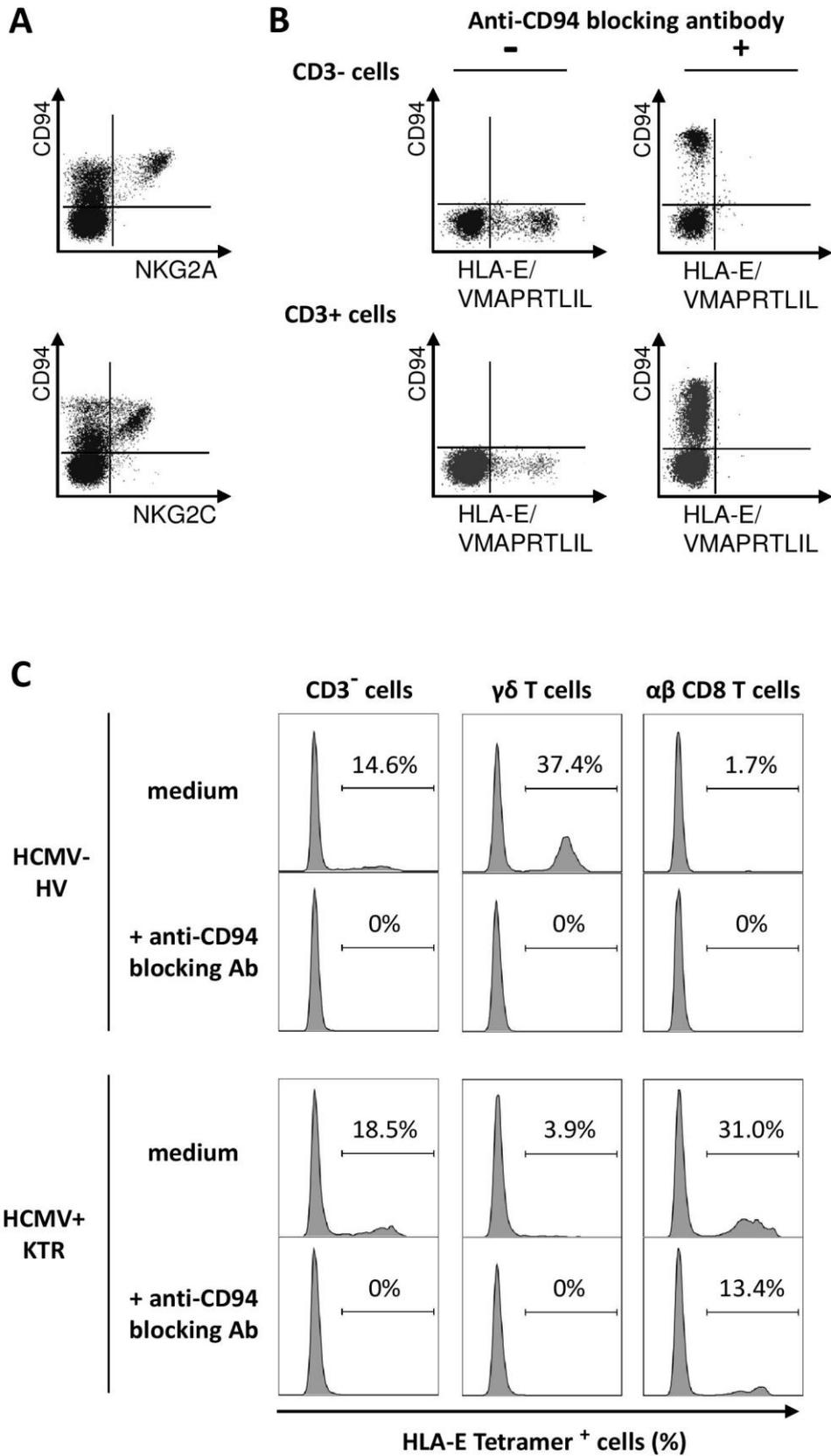
- transplant recipients. *Journal of clinical virology: the official publication of the Pan American Society for Clinical Virology*. 2007; 40(2):120–8. <https://doi.org/10.1016/j.jcv.2007.06.015> PMID: 17827058.
57. Garbczi DN, Hung DT, Wiley DC. HLA-A2-peptide complexes: refolding and crystallization of molecules expressed in *Escherichia coli* and complexed with single antigenic peptides. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1992; 89(8):3429–33. PMID: 1565634; PubMed Central PMCID: PMC48881.
 58. Bodinier M, Peyrat MA, Tournay C, Davodeau F, Romagne F, Bonneville M, et al. Efficient detection and immunomagnetic sorting of specific T cells using multimers of MHC class I and peptide with reduced CD8 binding. *Nature medicine*. 2000; 6(6):707–10. <https://doi.org/10.1038/76292> PMID: 10835691.
 59. Wooldridge L, Lissina A, Cole DK, van den Berg HA, Price DA, Sewell AK. Tricks with tetramers: how to get the most from multimeric peptide-MHC. *Immunology*. 2009; 126(2):147–64. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2567.2008.02848.x> PMID: 19125886; PubMed Central PMCID: PMC2632693.
 60. Purbhoo MA, Boulter JM, Price DA, Vuidepot AL, Hourigan CS, Dunbar PR, et al. The human CD8 coreceptor effects cytotoxic T cell activation and antigen sensitivity primarily by mediating complete phosphorylation of the T cell receptor zeta chain. *The Journal of biological chemistry*. 2001; 276(35):32786–92. <https://doi.org/10.1074/jbc.M102498200> PMID: 11438524.
 61. Wooldridge L, Lissina A, Vernazza J, Gostick E, Laugel B, Hutchinson SL, et al. Enhanced immunogenicity of CTL antigens through mutation of the CD8 binding MHC class I invariant region. *European journal of immunology*. 2007; 37(5):1323–33. <https://doi.org/10.1002/eji.200636765> PMID: 17429845; PubMed Central PMCID: PMC2699427.

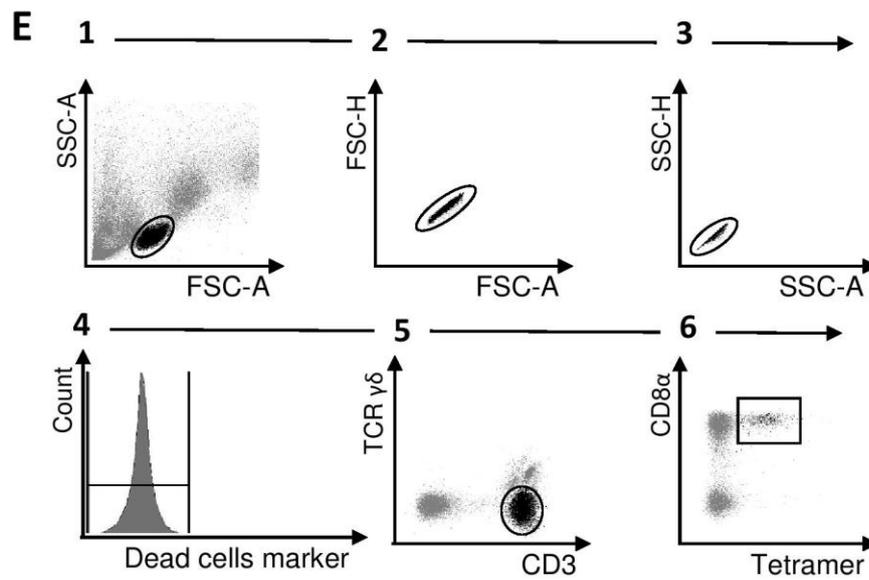
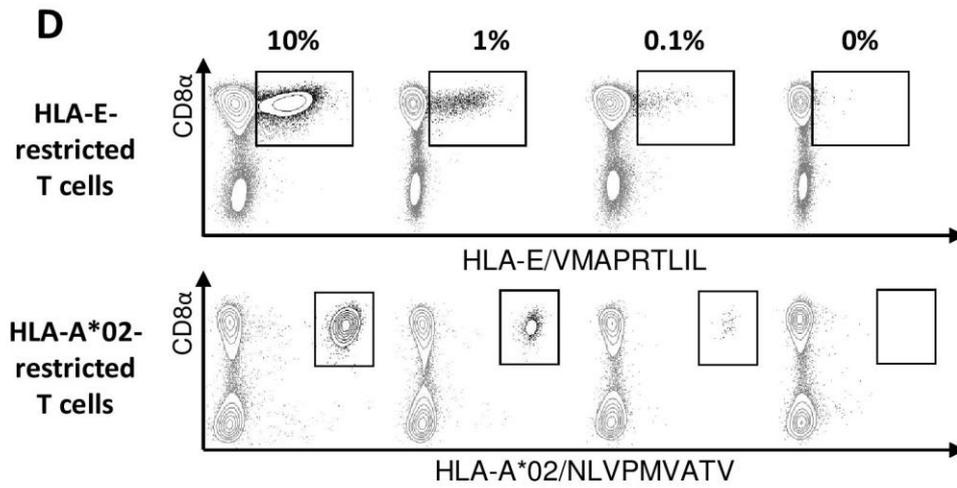
S1 Table

	HLA-E_{UL40} CD8 T-cell response		
	-	+	p-value
	(n=57)	(n=23)	
Serum Creatinine at M12 [μmol/L; median (Q1-Q3)]	137 (118-175)	134 (96-166)	0.3371 ¹
Proteinuria at M12 [g/24h; median (Q1-Q3)]	0.23 (0.11-0.46)	0.28 (0.12-0.44)	0.7133 ¹

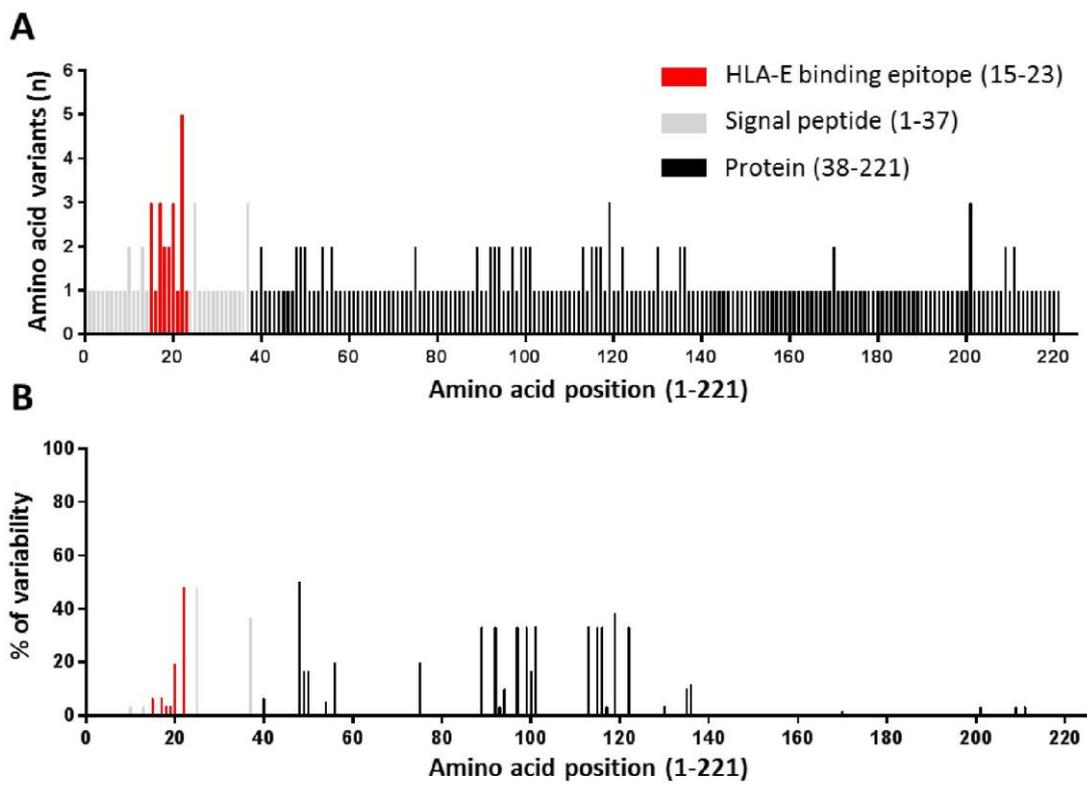
¹ Mann Whitney test

S1 Fig

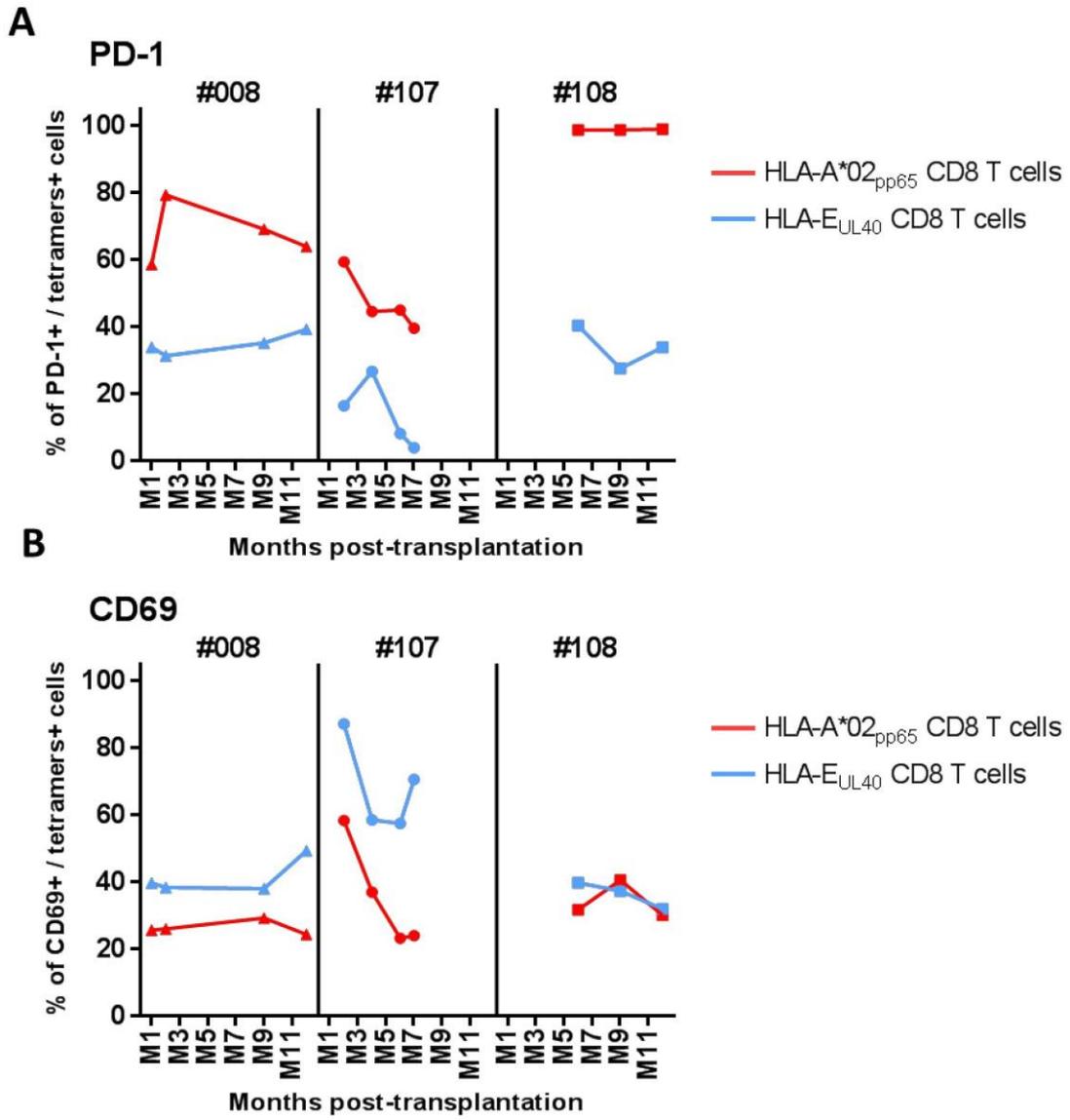




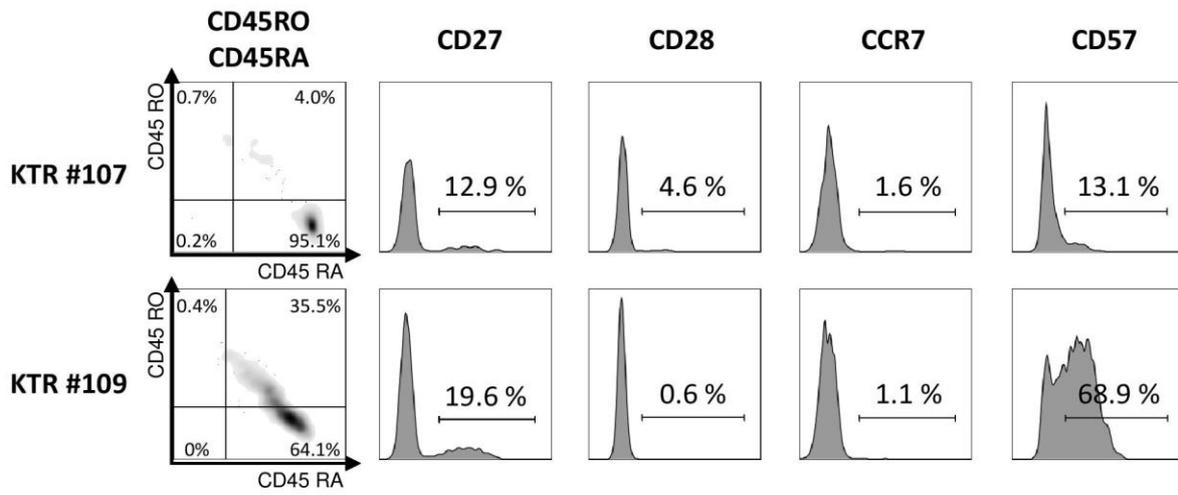
S2 Fig



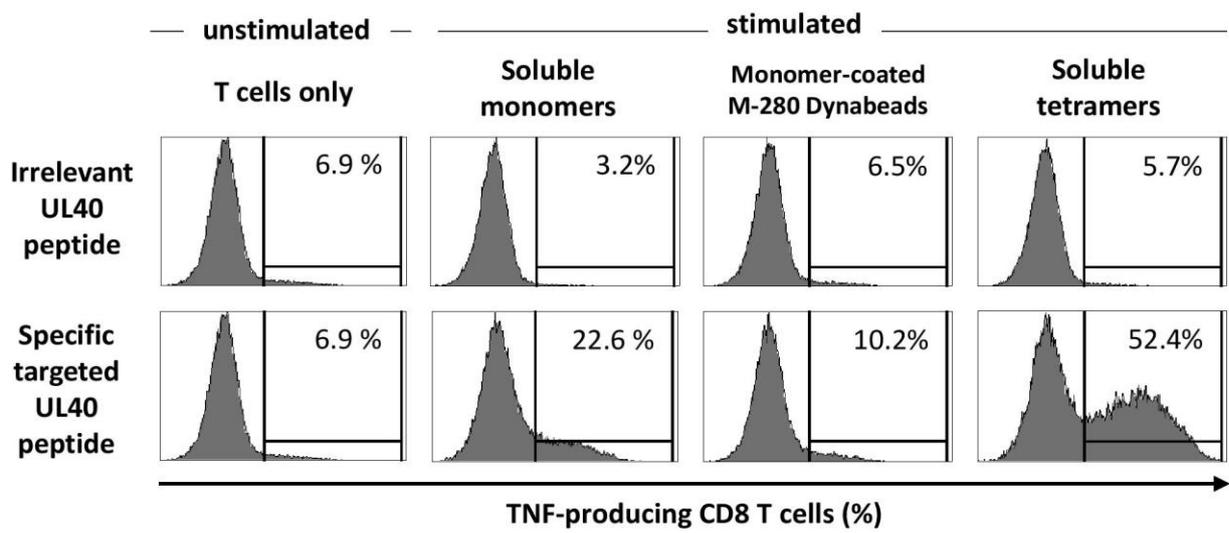
S3 Fig



S4 Fig



S5 Fig



RESULTATS COMPLEMENTAIRES

Impact du génotype des gènes *HLA-I* sur l'induction des populations T CD8 restreintes par HLA-E spécifiques de UL40₁₅₋₂₃

Allèles *HLA*

Nous avons observé au cours de cette étude que le développement de lymphocytes T CD8 spécifiques de complexes HLA-E/UL40 est plus fréquent chez les individus HCMV⁺ *HLA-A*02*⁺. Du fait de notre accès aux typages complets pour les allèles *HLA-A* et *HLA-B*, et partiels pour les allèles *HLA-C* des individus, nous avons cherché à évaluer si la présence de LT HLA-E/UL40 était associée à d'autres allèles *HLA*. Nous n'avons observé aucune autre association statistique entre la présence de cette population T non conventionnelle et un allèle *HLA-A*, *-B* ou *-C*, excepté en ce qui concerne les allèles *HLA-B*51* et *HLA-C*15* (**Figure 19**).

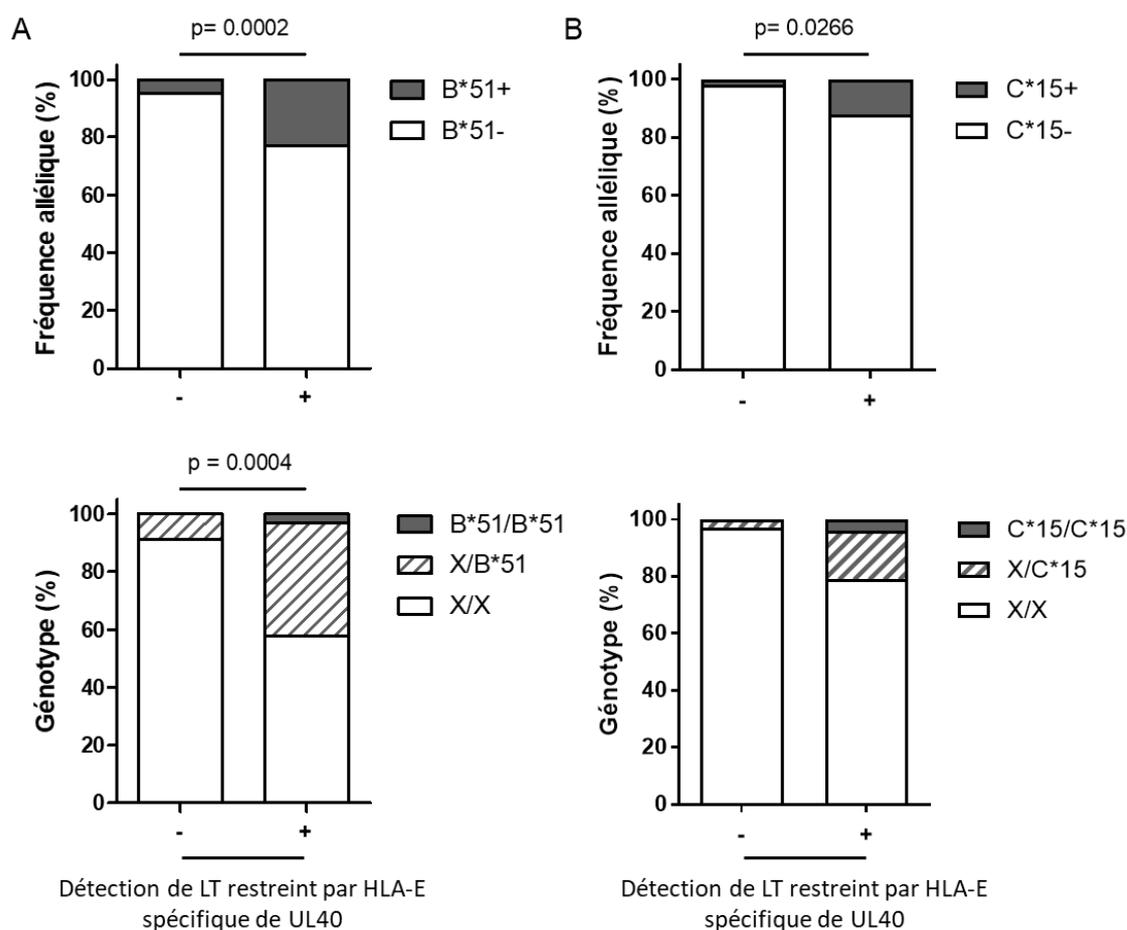


Figure 19 : Comparaison de la fréquence des allèles *HLA-B*51* et *HLA-C*15* au sein de la cohorte. (A) Comparaison des fréquences alléliques (haut) ou génotypiques (bas) de l'allèle *HLA-B*51* chez les individus HCMV⁺ ayant développé une réponse T spécifique de complexes HLA-E/UL40 (+, n=31) ou non (-, n=74). (B) Comparaison des fréquences alléliques (haut) ou génotypiques (bas) de l'allèle *HLA-C*15* chez les individus HCMV⁺ ayant développé une réponse T spécifique de complexes HLA-E/UL40 (+, n=29) ou non (-, n=32). Les

valeurs p ont été calculées en utilisant le test exact de Fisher (fréquence allélique) et le test du Chi² (fréquence génotypique).

En premier lieu, nous avons vérifié que les individus HCMV⁻ ou HCMV⁺ possèdent une fréquence allélique pour *HLA-B*51* similaire (respectivement, 9% et 10%, $p=0,9999$), en accord avec la fréquence décrite dans une cohorte française composée d'individus caucasiens (7,7%, $n=8094$) (données libres d'accès sur <http://www.allelefrequencies.net> du registre des donneurs de moelle osseuse). Nous avons observé que l'allèle *HLA-B*51* était statistiquement plus souvent retrouvé chez les individus HCMV⁺ ayant développé une réponse T CD8 anti-HCMV restreinte par HLA-E que chez les autres (23% vs 5%, $p=0,0002$). Ensuite, tout comme pour la comparaison des fréquences alléliques, la répartition des différents génotypes *HLA-B*51* (aucun allèle, hétéro- ou homozygotes) est similaire entre les individus infectés ou non ($p=0,8286$). Cependant, le développement de LT CD8 spécifiques de HLA-E/UL40 chez les individus HCMV⁺ semble être lié à la présence d'au moins un allèle *HLA-B*51* ($p=0,0004$).

Nous n'avons pas pu analyser de façon complète les répartitions d'allèles et génotypes *HLA-C* entre les individus HCMV⁻ et HCMV⁺ de la cohorte, du fait de l'absence du génotypage *HLA-C* intégral pour ces individus. Nous ne pouvons donc pas conclure formellement à propos de l'association éventuelle d'allèles *HLA-C* et le statut HCMV d'un individu. Cependant, nous avons observé que l'allèle *HLA-C*15* était statistiquement plus associé aux individus HCMV⁺ ayant développé une réponse T CD8 anti-HCMV restreinte par HLA-E qu'aux autres (12,1% vs 1,6%, $p=0,0266$). De même, nous pouvons apprécier une tendance à une différence de répartition entre individus HCMV⁺ avec des LT HLA-E/UL40 et les autres individus HCMV⁺, au profit d'individus majoritairement hétérozygotes pour l'allèle *HLA-C*15*, bien que la présence d'un unique individu homozygote *HLA-C*15* et le faible nombre total d'individus porteurs d'allèle *HLA-C*15* empêchent une évaluation statistique de cette différence de répartition.

Toutefois, il convient de souligner que la valeur de ces comparaisons est limitée par la faible représentativité des allèles *HLA-B*51* et *HLA-C*15* au sein

de la cohorte comparée à celle de l'allèle *HLA-A*02* et reste à confirmer dans une plus grande cohorte.

Peptides signaux HLA-I₃₋₁₁

Nous avons cherché à comprendre en quoi le statut homozygote pour *HLA-A*02* ou hétérozygote pour *HLA-B*51* ou *HLA-C*15* d'un individu favorise le développement d'une réponse T anti-HCMV restreinte par HLA-E. Une autre manière d'analyser ce résultat est de porter notre regard sur les peptides signaux fournis par les protéines HLA-Ia (HLA-I₃₋₁₁), du fait de la moindre diversité de ces derniers par rapport à l'immense variété des allèles *HLA* (**Tableau 10**). Étant donné que la protéine HLA-A*02 peut fournir un peptide nonamérique de séquence VMAPRTLVL issu de sa séquence signal pour stabiliser la molécule HLA-E à la membrane, nous avons voulu estimer si la présence de ce dernier est associée avec la capacité à répondre au HCMV par l'amplification de LT restreints par HLA-E. Nous avons cherché à faire de même avec le peptide VTAPRTVLL fourni par la protéine HLA-B*51. Pour cela, nous avons déterminé la répartition - individuelle ou associée par classe - des peptides issus des multiples allèles *HLA-A* - VMAPRTLLL (MLLL) et VMAPRTLVL (MLVL) - et *-B* - VTAPRTLLL (TLLL), VTAPRTVLL (TVLL) et VMAPRTVLL (MVLL) - à partir des génotypes des individus de la cohorte (n=146). L'absence du génotype *HLA-C* pour tous les individus de la cohorte ne nous a pas permis d'évaluer formellement ce point sur les peptides VMAPRTLIL (MLIL), VMAPRALLL (ALLL) et MLLL dérivés des séquences signal de ces HLA, entre les individus HCMV⁺ et HCMV⁻. Cependant, nous avons pu estimer ces différences de répartition entre les individus HCMV⁺ répondeurs ou non (n=61).

Tableau 10 : Origine et nature des peptides signaux majoritaires fournis par les protéines HLA-I classiques – A, -B et -C.

Classe HLA	Peptide signal HLA-I ₃₋₁₁	Allèles	Fréquence allélique (population Caucasienne)	Fréquence allélique (cohorte)	Liaison à HLA-E
B	VMAPRTVLL	HLA-B*07, *08, *14, *15, *38, *39, *42, *48, *62, *63, *64, *65, *67, *73, *75, *81	0,3282	0,3100	+
	VTAPRTLLL	HLA-B*13, *18, *27, *35:42, *37, *40 (19.6%), *44, *47, *54, *55, *56, *59, *60, *61, *82, *83	0,3110	0,3300	+/-
	VTAPRTVLL	HLA-B*05, *07:65, *15, *21, *35, *40 (80.3%), *41, *44:18, *45, *46, *49, *50, *51, *52, *53, *57, *58, *60, *61, *78	0,3596	0,3600	+/-
C	VMAPRTLIL	HLA-C*01, *03, *04, *05, *06, *08, *12, *14, *15:43, *16, *17:02	0,6043	0,6070	+
	VMAPRALLL	HLA-C: *06:17, *07, *18	0,3170	0,2700	+
A & C	VMAPRTLLL	HLA-C*02, *15 HLA-A*01, *03, *11, *29, *30, *31, *32, *33, *36, *74	0,0696 (C) 0,5041 (A)	0,1230 (C) 0,4965 (A)	+
A	VMAPRTLVL	HLA-A: *02, *10, *23, *24, *25, *26, *28, *34, *43, *66, *68, *69	0,4948	0,5035	+

Ainsi, du fait de l'existence de 2 peptides signaux différents pour HLA-A et de 3 pour HLA-B et pour HLA-C, ainsi que de la présence de 2 allèles par individu, cela porte à 3 le nombre de combinaisons de peptides issus de HLA-A contre 6 pour ceux issus de HLA-B ou HLA-C. (**Figure 20**).

En ce qui concerne la proportion des peptides signaux issus des protéines HLA-A au sein de la cohorte, la répartition des 3 groupes (MLLL/MLLL, MLVL/MLVL, MLLL/MLVL) est similaire entre les individus HCMV⁺ et HCMV⁻ ($p=0,9460$). Néanmoins, nous avons observé une différence significative de cette répartition entre les individus HCMV⁺ ayant développé une réponse T restreinte par HLA-E spécifique de UL40 et les autres ($p=0,0096$). Tout d'abord, près de 95% des individus ayant une réponse T restreinte par HLA-E possède au moins une copie du peptide VMAPRTLVL. De plus, il semblerait que le fait de posséder deux copies du peptide VMAPRTLVL est positivement associé à la présence de ces LT non conventionnels, tandis que celui d'avoir deux copies du peptide VMAPRTLLL lui y est négativement associé.

Aucune différence statistique de répartition n'a été observée concernant les proportions des peptides signaux issus des protéines HLA-B, que ce soit entre individus infectés ou non ($p=0,4063$), ou entre individus HCMV⁺ avec ou sans réponses T restreintes par HLA-E ($p=0,2714$). Il en est de même à propos de la répartition des peptides signaux HLA-C entre les individus HCMV⁺

répondeurs ou non ($p=0,5733$). Ces résultats restent à manier avec précaution, de part le faible nombre d'individus dans certains sous-groupes.

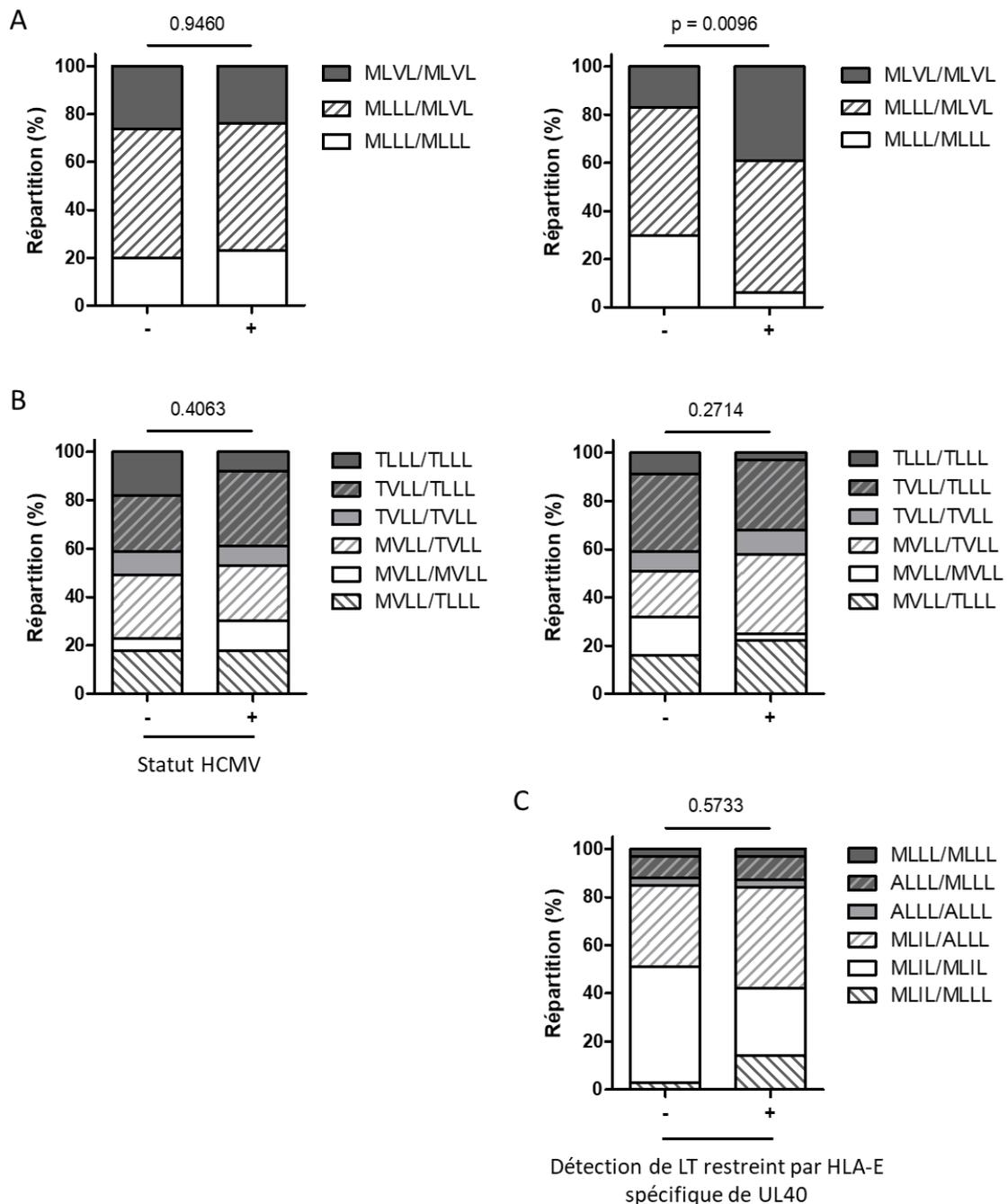


Figure 20: Comparaison de la répartition des peptides signaux issus des protéines (A) HLA-A, (B) -B et (C) -C au sein de la cohorte. (A-B) Le panel de gauche compare les individus non infectés (-, n = 39) aux infectés (+, n=105), tandis que le panel de droite compare les individus HCMV⁺ ayant développé une réponse T spécifique de complexes HLA-E/UL40 (+, n=31) ou non (-, n=74). (C) L'absence de séquençage complet HLA-C permet uniquement de comparer les individus HCMV⁺ ayant développé une réponse T spécifique de complexes HLA-E/UL40 (+, n=29) ou non (-, n=32). La population globale se divise en sous-groupes dans chaque classe de HLA selon la distribution des différents peptides issus des séquences signal: 3 groupes pour HLA-A, 6 groupes pour HLA-B et 6 groupes pour HLA-C. Les valeurs p ont été calculées en utilisant le test du Chi². Abréviations : VMAPRTL⁺ : MLLL ; VMAPRTL⁻ : MLVL ; VTAPRTL⁺ : TLLL ; VTAPRTL⁻ : TVLL ; VMAPRTV⁺ : MVLL ; VMAPRALL : ALLL ; VMAPRTL⁻ : MLIL.

Plusieurs études ont montré que le niveau d'expression protéique de HLA-E variait selon l'allèle exprimé. En effet, la protéine HLA-E*01:01 est décrite comme moins stable à la surface cellulaire que la protéine HLA-E*01:03, et en conséquence moins exprimée (Ulbrecht *et al.* 1999; Maier *et al.* 2000; Strong *et al.* 2003). Nous avons cherché à évaluer si l'expression protéique membranaire de HLA-E est influencée par son génotype dans les PBMCs de notre étude. Pour cela, nous avons examiné la fréquence et le niveau d'expression membranaire de HLA-E par cytométrie en flux sur des PBMCs en culture issus des 25 individus sains HCMV⁺ de la cohorte (**Figure 21**).

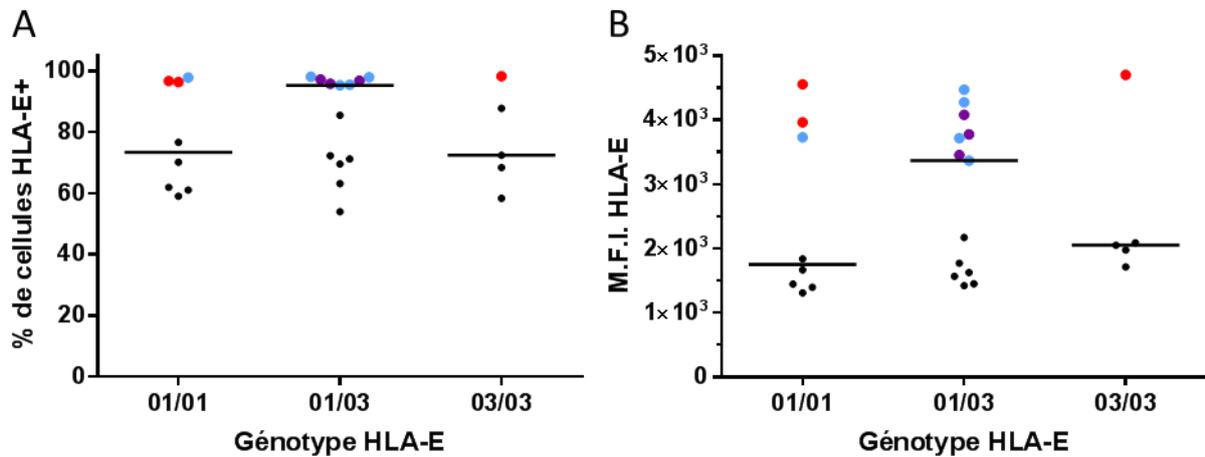


Figure 21 : Expression membranaire (A) et niveau d'expression (B) de la protéine HLA-E en fonction du génotype *HLA-E* chez 25 individus sains HCMV⁺. Les médianes sont représentées. Les individus ayant développé une réponse T CD8 anti-HCMV sont représentés en bleu (réponse spécifique de HLA-E/UL40), rouge (réponse spécifique de HLA-A*02/pp65) et violet (2 types de réponses). Abréviations : M.F.I. : Intensité Moyenne de Fluorescence

Nous pouvons observer que dans chaque groupe génotypique, 2 sous-groupes de PBMCs (PBMCs^{low}/PBMCs^{high}) se distinguent aussi bien au niveau de la fréquence (%) de cellules HLA-E⁺ que de l'intensité d'expression (M.F.I.) de HLA-E. De plus, nous avons remarqué que la fréquence d'expression de HLA-E parmi des PBMCs était positivement corrélée à son niveau d'intensité d'expression (donnée non montrée, $p < 0,0001$, $r = 0,9097$). Aucune différence statistique n'est apparue entre les groupes concernant la fréquence de cellules exprimant la protéine HLA-E ou son intensité d'expression sur les cellules positives. Ainsi, le génotype *HLA-E* ne semble pas avoir d'impact sur son expression protéique à la membrane plasmique.

De plus, nous avons observé que chez les individus sains HLA-A*02⁺ HCMV⁺, le niveau d'expression de HLA-E est positivement corrélé à celui de HLA-A*02 ($p=0,0093$; $r=0,6659$) (**Figure 22**). De manière intéressante, nous avons également remarqué que les individus développant des réponses T anti-HCMV restreinte par HLA-E et/ou HLA-A*02 correspondent aux sujets exprimant respectivement les protéines HLA-E et/ou HLA-A*02 à de forts niveaux d'intensité d'expression, et ayant une forte fréquence de cellules HLA-E⁺.

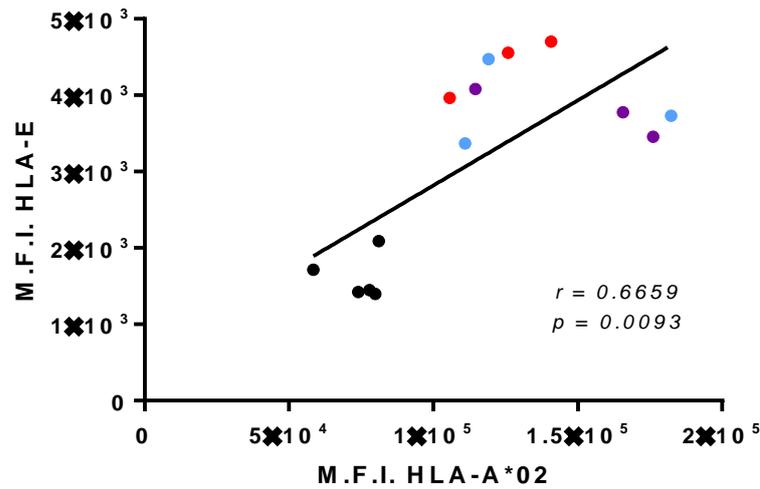


Figure 22 : Niveau d'expression de la protéine HLA-E en fonction du niveau d'expression de la protéine HLA-A*02 chez 14 individus sains HCMV⁺ HLA-A*02⁺. Les individus ayant développé une réponse T CD8 anti-HCMV sont représentés en bleu (réponse spécifique de HLA-E/UL40), rouge (réponse spécifique de HLA-A*02/pp65) et violet (2 types de réponses). Abréviations : M.F.I. : Intensité Moyenne de Fluorescence

Caractéristiques des populations T CD8 restreintes par HLA-E spécifiques de UL40₁₅₋₂₃

Phénotype des populations T CD8 restreintes par HLA-E spécifiques de UL40₁₅₋₂₃

Statut des LT CD8 HLA-E/UL40

Dans le but de mieux caractériser les populations lymphocytaires T CD8 restreintes par HLA-E spécifiques de UL40₁₅₋₂₃, nous avons évalué le phénotype en cytométrie en flux de 5 populations quasiclones (KTR#105, #107 et #108) et pauciclones (KTR#104 et #109), contenant de 2 à 6 V β différents, et de 2 populations monoclonales (Mart.22, exprimant un TCR V β 22, et Bio1.14, exprimant un TCR V β 14) isolées à partir de PBMCs de KTR HCMV⁺ (**Tableau 11**).

Nous avons confirmé le phénotype CD3⁺ TCR $\alpha\beta$ ⁺ TCR $\gamma\delta$ ⁻ CD8⁺ CD4⁻ de l'ensemble de ces populations. Toutes ces cellules expriment de manière homogène et équivalente le co-récepteur CD8 sous forme hétérodimérique $\alpha\beta$, à l'exception de la population polyclonale KTR#105 exprimant majoritairement la forme homodimérique $\alpha\alpha$ du CD8 (70% contre 30%). Elles se caractérisent également par un ensemble commun de marqueurs de surface suggérant leur appartenance au compartiment effecteur-mémoire : CD45RA^{low} CD45RO^{high} CD27⁻ CD28⁻ CCR7⁻ CD62L⁻.

Tableau 11 : Caractéristiques phénotypiques des cellules T CD8 spécifiques de HLA-E/UL40.

Clonalité	Quasiclonales			Pauciclonales		Monoclonales	
	#105	#107	#108	#104	#109	Mart.22	Bio1.14
Populations							
MARQUEURS T							
CD3	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
CD8	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
CD4	-	-	-	-	-	-	-
TCR $\alpha\beta$	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
TCR $\gamma\delta$	-	-	-	-	-	-	-
MARQUEURS EFFECTEUR/MEMOIRE							
CD45RA	Low	Low	Low	Low	Low	Low	Low
CD45RO	High	High	High	High	High	High	High
CD27	-	-	-	-	-	-	-
CD28	-	-	-	-	-	-	-
CCR7	-	-	-	-	-	-	-
CD62L	-	-	-	-	++	-	-
CD57	+	-	+	-	+	-	+++
MARQUEURS NK							
CD16	-	-	++	-	++	-	+++
CD56	++	+	+	++	+	+++	+++
RECEPTEURS CD94							
CD94 seul	-	+	-	-	-	+++	+++
CD94/NKG2A	+++	-	-	+++	++	-	-
CD94/NKG2C	-	-	+++	-	+	-	-
RECEPTEURS ACTIVATEURS/INHIBITEURS							
NKG2D	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
KIR2DS1/KIR2DL1+	-	-	+++	-	+	-	-
KIR2DS2/2DL2/2DL3+	-	+++	++	+	+++	+++	-
KIR3DS1/3DL1+	-	-	+++	-	++	-	-
ILT-2	+++	+	+	++	+++	+++	+++
PD-1	+	-	+	+	-	-	-
MARQUEURS DE CYTOTOXICITE							
Perforine	+++	+++	+++	+++	+++	+++	?
Granzyme A	+++	+++	+++	+++	+++	+++	?
Granzyme B	+++	+++	+++	+++	+++	+++	?

-: <10%; +: entre 10 et 25%; ++: entre 26 et 50%; +++: >50%

Expression de récepteurs co-activateurs et inhibiteurs

Ces populations T se démarquent par l'expression de marqueurs associés classiquement aux populations NK. En effet, elles expriment toutes le marqueur CD56 et la moitié d'entre elles le récepteur activateur au fragment Fc γ CD16. Elles peuvent en outre exprimer un ensemble de récepteurs membranaires co-

activateurs (NKG2D) ou inhibiteurs (ILT-2, KIR2/3DL). Étonnamment ces cellules expriment toutes le récepteur CD94, sous forme libre (populations monoclonales) ou associée (populations quasi/pauciclones) avec NKG2A (inhibiteur) ou NKG2C (activateur).

Durant cette étude, nous avons remarqué que les populations T HLA-E/UL40 semblent exprimer moins de PD-1 *ex vivo* que les cellules T CD8 HLA-A*02/pp65 ($p=0,0424$). De plus, nous avons constaté que cette différence était maintenue au cours du temps (**Figure 23**).

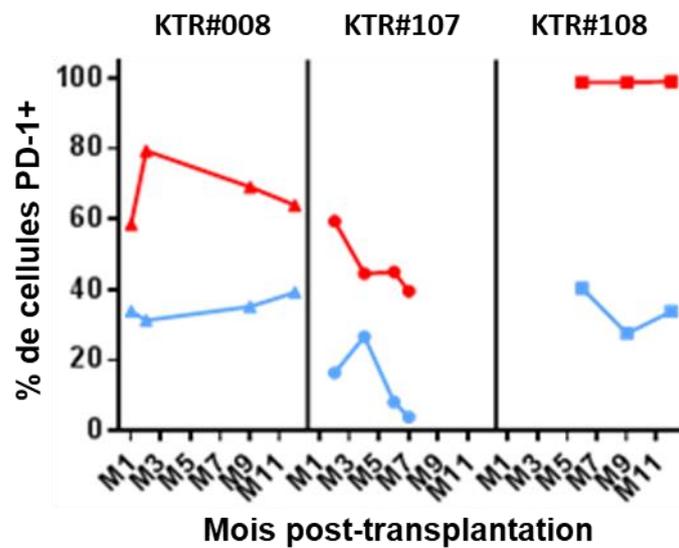


Figure 23: Profil cinétique d'expression membranaire de PD-1 *ex vivo* par les populations T CD8 anti-HCMV dirigées contre HLA-A*02/pp65 (Ligne rouge) ou HLA-E/UL40 (Ligne bleue) durant les 12 mois post-transplantation. La fréquence de cellules positives pour PD-1 est calculée parmi les populations T CD8⁺ tétramères⁺.

Nous avons voulu vérifier *in vitro* quel était le potentiel d'expression de PD-1 par ces populations T non conventionnelles au repos et après stimulation non spécifique (**Figure 24**).

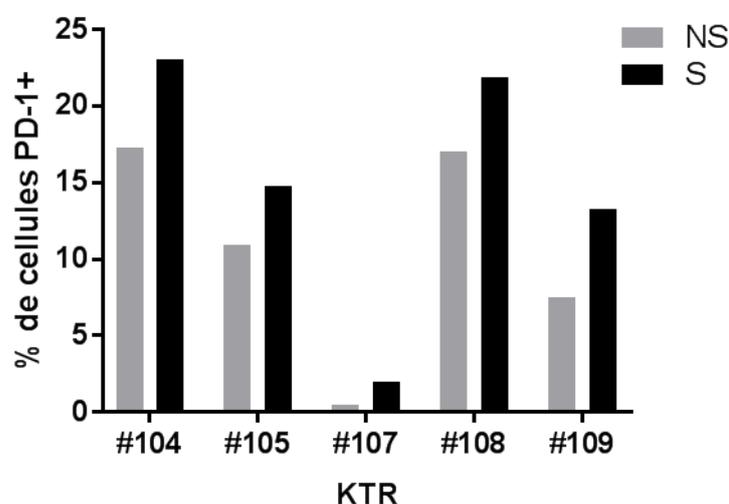


Figure 24 : Expression du récepteur inhibiteur PD-1 par les LT HLA-E/UL40 (n=5) avant (non stimulée, NS) et après stimulation non spécifique par OKT3 (stimulée, S). La fréquence de cellules PD-1⁺ est calculée parmi les LT CD8⁺.

Nos résultats montrent que les LT CD8 HLA-E/UL40 expriment partiellement au repos le marqueur PD-1 (<20% des LT CD8⁺). De plus, la stimulation non spécifique de ces populations T n'enclenche qu'une surexpression minimale de PD-1 à la surface cellulaire. Ces données semblent exclure la voie PD-1 des processus d'inhibition des LT HLA-E/UL40.

Fonction des populations T CD8 restreintes par HLA-E spécifiques de UL40₁₅₋₂₃

Potentiel cytotoxique

Ces populations possèdent un potentiel cytotoxique, comme en témoigne leur capacité à produire de la perforine, des granzymes A et B (**Tableau 11**), ainsi qu'à exprimer à la membrane la molécule CD107a - un marqueur de dégranulation - après stimulation non spécifique de la voie CD3 (**Figure 25**).

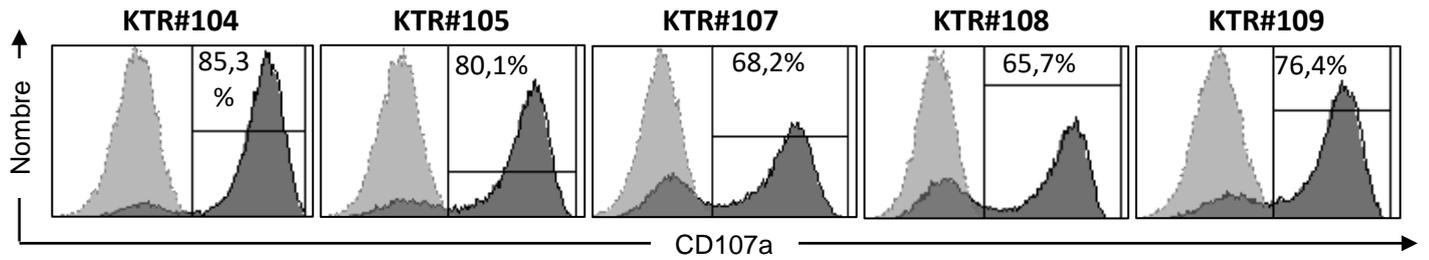


Figure 25 : Expression du marqueur de dégranulation CD107a par les populations amplifiées de LT HLA-E/UL40 issus de 5 KTR (#104, 105, 107, 108 et 109) après stimulation non spécifique de la voie CD3. Les résultats sont exprimés sous forme d'histogramme montrant le niveau d'expression de CD107a sur les LT non stimulés (Gris clair) *versus* stimulés (Gris foncé). La fréquence de cellules CD107a⁺ parmi les LT CD8⁺ est indiquée.

Production de cytokines

Suite à une stimulation non spécifique de ces populations polyclonales et monoclonales, nous avons analysé par cytométrie en flux le profil de production et de sécrétion de cytokines par les LT restreints par HLA-E spécifiques de UL40₁₅₋₂₃ (**Figure 26**).

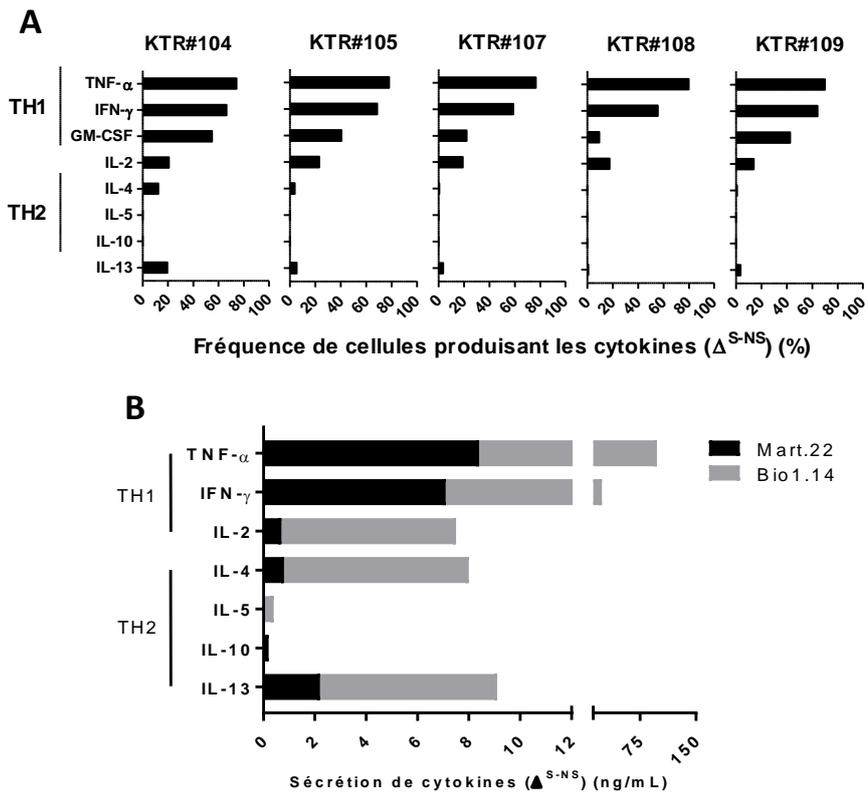


Figure 26 : Capacité cytokinique des LT HLA-E/UL40 après stimulation non spécifique (OKT3) de populations T quasi/pauciclonales (A) ou monoclonales (B). La production (A, marquage intracellulaire) ou sécrétion (B, technologie Flowcytomix) de cytokines ont été évaluées en cytométrie en flux, et sont évaluées par un delta entre les cellules stimulées *versus* non stimulées.

Les populations T restreintes par HLA-E ont toutes un profil cytokinique de type Th1, comme en atteste leur forte capacité de production de TNF- α , d'IFN- γ , et dans une moindre mesure, de GM-CSF et d'IL-2 après stimulation. Nous avons également pu détecter que les populations T activées sont capables de produire des cytokines de type Th2 comme l'IL-4 et l'IL-13. Néanmoins, les productions de cytokine de type Th1 demeurent beaucoup plus élevées que celles de type Th2.

Évaluation de l'impact clinique des populations T CD8 restreintes par HLA-E spécifiques de UL40₁₅₋₂₃

Un objectif secondaire autour de ce projet était de définir si la présence de populations T CD8 restreintes par HLA-E dirigées contre le peptide signal de la protéine virale UL40 chez des individus transplantés pourrait avoir un impact sur la fonction du greffon. En effet, leur potentiel fonctionnel contre des peptides allogéniques *in vitro* pose question sur leur éventuelle cytotoxicité envers des cellules endothéliales exprimant HLA-E complexée avec des peptides HLA-I₃₋₁₁ allogéniques *in vivo*. Nous avons donc évalué si l'infection à HCMV du patient ou la présence de LT HLA-E/UL40 étaient associées à un risque accru de rejet à médiation cellulaire chez les patients transplantés rénaux à 1 an post-transplantation (**Figure 27**).

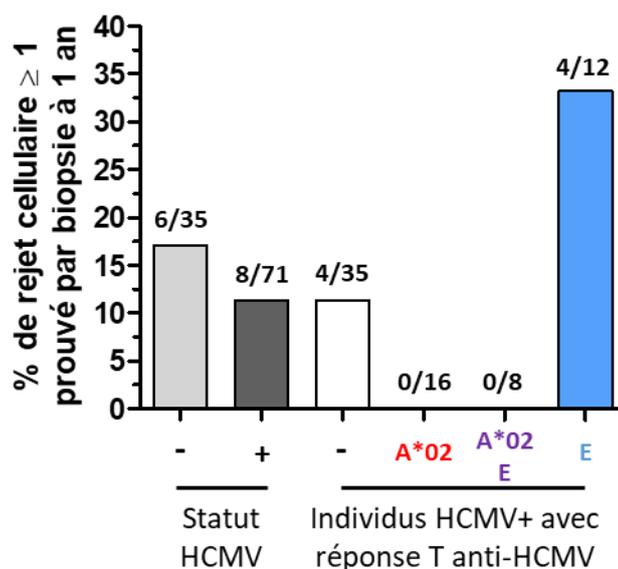


Figure 27: Comparaison de la proportion à 12 mois post-transplantation de rejet cellulaire (≥ 1) prouvé par analyse de biopsie entre les patients HCMV⁻ (n=35) et HCMV⁺ (n=71), et au sein de ces derniers, entre les patients ayant développé une réponse T anti-HCMV restreinte par HLA-A*02 (n=16), HLA-E (n=12) ou les deux (n=8), ou aucune réponse (n=35).

Nos résultats ne montrent aucune différence statistique concernant la survenue de rejets à médiation cellulaire prouvés par biopsie à 1 an post-transplantation entre patients transplantés rénaux en fonction de leur statut d'infection à HCMV ($p=0,5426$). En revanche, nous pouvons observer au sein des patients HCMV⁺ que seuls les individus sans réponse immune anti-HCMV (restreinte par HLA-A*02 ou HLA-E), ainsi que ceux ayant développé une réponse T anti-HCMV restreinte par HLA-E, ont eu un rejet aigu cellulaire durant les 12 mois post-transplantation, contre aucun parmi les individus avec une réponse restreinte par HLA-A*02. Cependant, le faible nombre de patients dans chaque groupe ne nous permet pas de conclure formellement.

DISCUSSION

Dans cette étude, nous avons déterminé que près d'un individu HCMV⁺ sur trois (31/105, 29,5%) développe une réponse immune T CD8 restreinte par HLA-E détectable contre au moins un épitope parmi 8 issu de UL40, et jusqu'à 1 individu sur 5 contre un épitope donné (VMAPRTLIL, 23/105, 21,9%). Ces résultats demeurent identiques entre les patients transplantés et les individus sains HCMV⁺. L'emploi de traitements immunosuppresseurs ou antiviraux ne semble pas avoir de répercussions sur la présence (fréquence de développement et amplitude de réponse) de cette population non conventionnelle chez les patients transplantés rénaux par rapport aux individus sains.

Si notre étude est la première à évaluer la fréquence de développement de cette population non conventionnelle au sein d'une cohorte d'individus séropositifs pour le HCMV, la mise en place de réponses T restreintes par HLA-E spécifiques d'un épitope donné concerne 40% des individus dans le contexte d'infection par le VHC (n=31/77) (Schulte *et al.* 2009) ou d'exposition au Mtb (n=4/10) (Joosten *et al.* 2010). En outre, la totalité (n=10/10) des adultes positifs au test PPD (test de dépistage de la tuberculose) ainsi que la moitié des enfants vaccinés par le BCG (n=6/12) répondent contre au moins 1 des 69 épitopes testés, avec une hétérogénéité significative de la spécificité de reconnaissance du répertoire T restreint par HLA-E anti-Mtb inter-individuel (Joosten *et al.* 2010). Cependant, il est important de noter que ces 2 équipes ont déterminé la proportion d'individus avec des LT restreints par HLA-E par l'usage d'ELISPOT, alors que nous avons utilisé la cytométrie en flux avec le marquage tétramère *ex vivo*. L'emploi d'outils tétramériques introduit un double biais d'estimation à travers la non-exhaustivité des peptides viraux détectés ainsi que la définition d'un seuil de détection relativement élevé des populations T restreintes par HLA-E (0,1% parmi les LT CD8⁺ αβ circulants). Plus récemment, l'analyse de la réponse T anti-Mtb restreinte par HLA-E à l'aide d'outils tétramériques a permis de déterminer qu'entre 20% et 70% des patients atteints de tuberculose (n=10) possèdent des LT CD8⁺ circulants contre un épitope donné (5 épitopes différents testés) (Caccamo *et al.* 2015).

Au vu de la conservation de la structure protéique de la protéine HLA-E entre les 2 variants, il est légitime de supposer que tout individu infecté par le HCMV possède le potentiel théorique de générer cette réponse T restreinte par

HLA-E contre un épitope donné. Ainsi, l'ensemble de ces observations semblent indiquer que d'autres facteurs interviennent dans la mise en place et le développement de réponses T restreintes par HLA-E.

Sélection du répertoire T CD8 HLA-E/UL40 naïf

Les mécanismes de tolérance centrale et/ou périphérique permettent en théorie la conservation d'un répertoire T CD8 cytotoxique de haute avidité fonctionnelle contre un épitope exogène et d'avidité faible voire nulle contre un épitope du Soi. Aucune étude ne s'est intéressée aux mécanismes permettant la sélection thymique du répertoire T restreint par HLA-E chez l'Homme. L'expression de la protéine HLA-E est inconnue dans le thymus humain. Néanmoins, l'expression d'ARNm codant pour la protéine HLA-E est détectée dans des tissus thymiques fœtaux, bien qu'à un niveau moindre par rapport à celui dans des cellules d'origine lymphoïde (Wei et Orr 1990), ainsi que dans des cellules épithéliales isolées à partir de thymus d'enfants âgés de 1 à 12 ans (Crisa *et al.* 1997). Chez les souris, la sélection du répertoire T restreint par Qa-1b (orthologue murin de HLA-E) se déroule dans le thymus et peut être médiée par les cellules d'origine épithéliale et/ou hématopoïétique (Sullivan *et al.* 2002). De plus, elle dépend de TAP, laissant supposer que le répertoire peptidique physiologique présenté par Qa-1b est nécessaire.

La faible envergure du répertoire peptidique physiologique naturellement présenté dans HLA-E – composé de 3 à 6 peptides différant par 1 à 3 acides aminés parmi les 7 fournis majoritairement par les multiples allèles *HLA-A*, *-B* ou *-C* – ainsi que l'absence d'impact du dimorphisme protéique de HLA-E sur sa capacité à présenter ce répertoire laissent supposer que la nature des complexes HLA-E/peptide du Soi exprimés au thymus est peu diverse. Il est donc légitime de supposer que la tolérance centrale dans le thymus reposant sur les mécanismes de sélections positive et négative favorise la conservation du répertoire T restreint par HLA-E de faible avidité fonctionnelle face aux complexes HLA-E/peptide du Soi et la délétion de celui de forte avidité fonctionnelle. En ce sens, la présence d'un répertoire T restreint par HLA-E spécifique du peptide viral et exogène VMAPRTLIL n'a été documenté à présent que chez des individus dont les protéines HLA-C autologues ne fournissaient pas

le-dit peptide (n=19) (n=4 ; Pietra *et al.* 2003; Mazzarino *et al.* 2005 ; n=15 ; Sullivan *et al.* 2015), démontrant une forme de sélection de ce répertoire T. Il en est de même pour les réponses dirigées contre les peptides issus de HLA-A : VMAPRTLLL, (n=1 individu) (Allard *et al.* 2012) et VMAPRTLVL (n=2 individus) (Pietra *et al.* 2003; Mazzarino *et al.* 2005). Cependant, il est également à noter qu'il n'a pas été vérifié jusqu'ici qu'un individu ayant un allèle *HLA* fournissant un de ces peptides ne va pas posséder de répertoire T restreint par HLA-E spécifique du-dit peptide, à l'exception du peptide VMAPRTLVL, dont la présence chez 2 individus HCMV⁺ ne permet pas la mise en place d'une réponse anti-HCMV dirigée contre lui, tandis que son absence chez 2 autres individus HCMV⁺ le permet (Mazzarino *et al.* 2005).

Il a été montré que tous les peptides issus des protéines HLA-Ia et HLA-G (n=8) permettaient la liaison et la stabilisation de la protéine HLA-E à la surface cellulaire *in vitro* indépendamment de l'allèle *HLA-E*, à l'exception de 2 peptides issus de HLA-B ayant une Thr en P2 (VTAPRTLLL et VTAPRTVLL (Braud *et al.* 1997 ; Heatley *et al.* 2013). Ainsi, le peptide VMAPRTLVL issu de la séquence signal HLA-I₃₋₁₁ de la protéine HLA-A*02 appartient au répertoire peptidique physiologique présenté par HLA-E (Braud *et al.* 1998). Nos résultats apportent l'existence d'une corrélation positive entre le niveau d'expression des protéines HLA-A*02 et HLA-E chez les individus HLA-A*02 (p=0,0093 ; r=0,6659). Si aucune différence n'a été observée concernant la distribution des peptides signaux issus de HLA-A ou -B entre les individus HCMV⁻ et HCMV⁺ (valeurs *p* respectives de 0,9460 et 0,4063), nous avons clairement observé que les individus développant une réponse non conventionnelle restreinte par HLA-E avaient une distribution des peptides signaux HLA-A autologues statistiquement différente par rapport aux individus sans réponse (p=0,0096). Plus précisément, ils semblent posséder une aptitude préférentielle à coder 2 copies du peptide VMAPRTLVL par leurs allèles *HLA-A*, et de ce fait, aucune du peptide VMAPRTLLL. À l'inverse, aucune différence n'a été observée entre les individus avec ou sans réponse LT HLA-E/UL40 concernant la distribution des peptides issus de HLA-B (p=0,2714) ou HLA-C (p=0,5733). Toutefois, ces résultats sont à prendre avec précaution du fait l'absence de séquençage complet de HLA-C dans notre cohorte, ainsi que du faible nombre d'individus dans certains groupes d'analyse concernant les différentes répartitions des peptides HLA-B ou HLA-C au sein des individus.

Une hypothèse quant au rôle favorable du peptide VMAPRTLVL dans le développement de réponses T restreintes par HLA-E et spécifiques de UL40 est que ce peptide pourrait tout particulièrement être impliqué dans la sélection thymique de ce répertoire T. Bien qu'aucune différence n'ait été observée entre les peptides HLA-I₃₋₁₁ pour leur capacité à stabiliser HLA-E, des différences alléliques entre les *HLA-A*, *-B* ou *-C* dans leur capacité à fournir le peptide signal (impact du protéasome, niveau de transcription et/ou traduction des HLA) pourraient avoir un impact sur la nature du répertoire présenté par HLA-E *in vivo*. En ce sens, le niveau d'expression des protéines HLA est variable dans une cellule. En effet, à l'appui du rôle du peptide VMAPRTLVL et de façon plus générale des protéines HLA-A, celles-ci sont retrouvées surexprimées par rapport aux protéines HLA-C sur des cellules d'origine lymphoïde chez des individus sains, que ce soit à la membrane cellulaire ou dans le cytoplasme des cellules (Apps *et al.* 2015). Ainsi, le répertoire physiologique présenté par HLA-E *in vivo* pourrait essentiellement être constitué des peptides issus des protéines HLA-A propres à chaque individu (VMAPRTLLL et/ou VMAPRTLVL) ainsi que du peptide VMAPRTVLL issu de certaines protéines HLA-B. De plus, il a été montré que le chargement exogène *in vitro* du peptide VMAPRTLVL sur des cellules homozygotes HLA-E*01:01 ou homozygotes HLA-E*01:03 favorisait une expression de la protéine HLA-E membranaire de 2 à 3 fois plus élevée que le peptide VMAPRTLLL (Lauterbach *et al.* 2015). Ceci suggère que le peptide VMAPRTLVL est majoritairement présenté par HLA-E *in vivo* chez les individus ayant au moins une protéine HLA-A codant ce peptide. L'expression de complexes HLA-E/VMAPRTLVL sur les cellules thymiques d'origine épithéliale et/ou hématopoïétique permettrait alors la sélection positive du répertoire T restreint par HLA-E au thymus.

Le développement préférentiel de LT restreints HLA-E/peptide HLA-I₃₋₁₁ chez les individus ayant deux copies de VMAPRTLVL impliquerait ensuite une sélection négative peu drastique. Celle-ci pourrait résulter d'une affinité d'interaction faible entre les TCR et les complexes HLA-E/VMAPRTLVL. Une étude cristallographique de l'interaction entre le TCR d'un clone T isolé chez un individu séropositif pour le HCMV et un complexe HLA-E/peptide issu de UL40 est en faveur de cette hypothèse (Hoare *et al.* 2006). En effet, ces travaux ont montré que l'absence d'un groupement méthyl de la chaîne latérale de la valine en position 8 du peptide VMAPRTLVL (autologue chez cet individu HLA-A*02^{+/+})

diminuait très fortement sa reconnaissance par le TCR comparé aux peptides exogènes VMAPRTLIL et VMAPRTLLL ($K_d \sim 100 \mu\text{M}$ versus $\sim 30 \mu\text{M}$) (**Figure 28**). Ainsi, les individus possédant 2 copies du peptide VMAPRTLVL sélectionneraient un répertoire de LT restreints HLA-E plus diversifié, de faible affinité pour le peptide VMAPRTLVL et potentiellement de plus forte affinité pour les autres peptides HLA-I signal. Cette hypothèse sous-entend que le peptide VMAPRTLVL ne correspondrait jamais au peptide nominal chez les individus possédant ce peptide, ce que nos résultats et la littérature semblent confirmer (Mazzarino *et al.* 2005). À l'inverse, les deux seules populations restreintes HLA-E de notre étude, pour lesquelles le peptide nominal reconnu est VMAPRTLVL, proviennent d'individus ne possédant pas ce peptide signal.

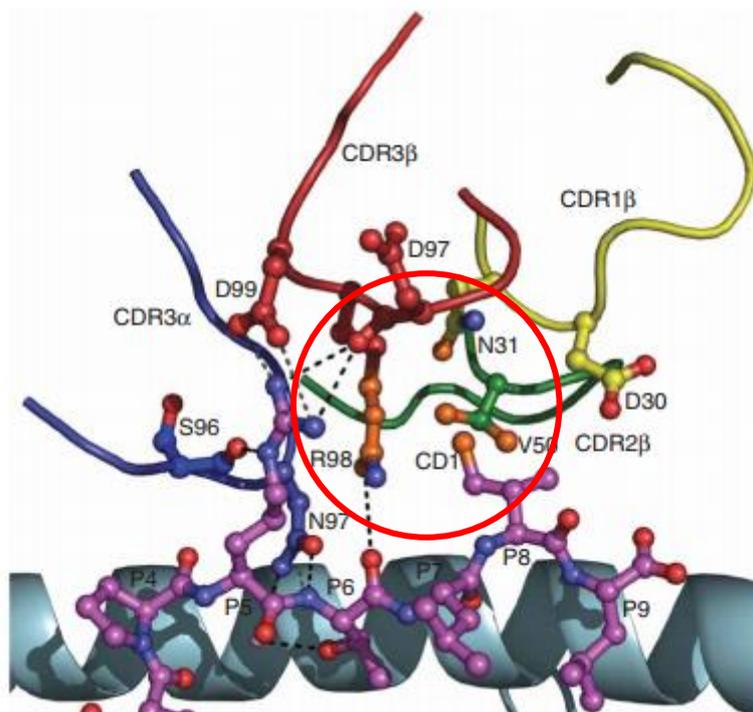


Figure 28 : Cas d'étude de l'interaction entre un TCR (KK50.4) spécifique de la protéine HLA-E complexée avec le peptide VMAPRTLIL. Les 3 boucles CDR β du TCR convergent vers la chaîne latérale du P8, assurant 11 contacts du TCR avec le complexe sur 77 (14,3%). En outre, 64% (7/11) de ces contacts sont assurés par les interactions VdW entre certains atomes du TCR et le groupe méthyl CD1 présent sur l'Isoleucine (en orange). L'absence de ce groupement méthyl sur la Valine dans le peptide VMAPRTLVL augmente la K_D de plus de trois fois, passant de $30 \mu\text{M}$ à $100 \mu\text{M}$. D'après Hoare *et al.* 2006.

Activation de la réponse T CD8 HLA-E/UL40 suite à l'infection à HCMV

Plusieurs études ont déjà mis en évidence une association préférentielle d'un contexte pathologique avec un génotype HLA-E particulier. L'incidence de

GVHD sévère et de mortalité liée à la greffe est diminuée chez les patients receveurs de CSH homozygotes pour HLA-E*01:03 et recevant une greffe de donneur homozygote pour HLA-E*01:03 (Tamouza *et al.* 2006; Danzer *et al.* 2009). L'allèle HLA-E*01:01 quant à lui a été associé à la protection contre le lymphome d'Hodgkin associé à l'EBV dans 2 cohortes distinctes ($p=0,001$) (Martín *et al.* 2015). Bien que nous n'ayons observé aucune différence entre individus HCMV⁻ et HCMV⁺ concernant les distributions alléliques ($p=0,5748$) ou génotypiques ($p=0,1661$) de *HLA-E*, nous avons observé que la présence de LT CD8 HLA-E/UL40 était préférentiellement associée au statut hétérozygote pour le gène *HLA-E* de l'individu HCMV⁺ ($p=0,0323$), sans toutefois observer de différence concernant les fréquences alléliques entre les gènes *HLA-E*01:01* et *01:03* ($p=0,7541$) entre individus HCMV⁺ répondeurs ou non. Les seules données de la littérature concernant le développement de LT restreints par HLA-E rapportent dans le contexte VHC une association positive avec le génotype homozygote *HLA-E*01:01* des individus infectés ($p=0,005$, $n=67$ individus) (Schulte *et al.* 2009). Ainsi, la conservation équivalente des 2 allèles *HLA-E* dans la population ainsi que l'association préférentielle d'un allèle sur un autre dans certains contextes pathologiques semblent mettre en avant des différences fonctionnelles entre les protéines HLA-E*01:01 et *01:03.

De manière générale, les différences entre les allèles *HLA* (niveau d'expression membranaire, stabilité en surface, répertoire peptidique présenté) ont un impact sur leur capacité à induire un répertoire T spécifique d'un antigène donné. Il a été montré que le micropolymorphisme observé entre deux variants de l'allèle *HLA-B*35*, qui se différencie par un unique acide aminé en position 156 (Leucine pour HLA-B*35:01 contre Arginine pour HLA-B*35:08) avait une incidence sur la hiérarchie d'immunodominance de 4 épitopes différents issus de la protéine virale pp65 présenté dans le contexte HLA-B*35, et donc en conséquence, sur la mise en place d'une réponse T anti-HCMV restreinte à ces variants protéiques (Burrows *et al.* 2007). En outre, cette étude démontre qu'un seul acide aminé situé en dehors des poches primaires d'ancrage du peptide peut malgré tout avoir un impact sur le répertoire peptidique présenté *in vivo* entre 2 variants protéiques d'un gène *HLA* donné. En ce sens, la distinction entre les 2 protéines HLA-E retrouvées mondialement réparties de façon équivalente dans la population concerne également un unique acide aminé (position 107). Localisé en dehors du sillon peptidique et situé sur la face externe du domaine

$\alpha 2$, celui-ci a été décrit comme n'ayant aucune conséquence sur la conformation spatiale de la protéine, sa capacité à lier la $\beta 2m$ ou la structure du sillon peptidique (Strong *et al.* 2003), ainsi que sur ses capacités d'interactions avec le TCR de LT restreints par HLA-E (Hoare *et al.* 2006) ou les récepteurs CD94/NKG2 (Petrie *et al.* 2008). Cependant, ce micropolymorphisme impacte la stabilité et en conséquence la durée d'interaction avec le récepteur CD94/NKG2 des protéines HLA-E (Strong *et al.* 2003). À ce jour, le répertoire peptidique présenté par HLA-E reste largement inexploré. Ainsi, bien qu'il ait été déterminé *in vitro* que les 2 variants protéiques partageaient le même répertoire peptidique physiologique (peptides signaux HLA-I₃₋₁₁), des rapports récents montrent qu'en cas d'absence des peptides canoniques, deux répertoires peptidiques non partagés sont présentés *in vitro* par les protéines HLA-E*01:01 (36 peptides) et HLA-E*01:03 (56 peptides) (Kraemer *et al.* 2015; Celik *et al.* 2016).

En cas d'infection à HCMV, les protéines virales US6 et UL18 provoquent l'inhibition des protéines TAP *in vitro* (Ahn *et al.* 1997; Kim *et al.* 2008), et les orthologues des immunoévasines US2, 3, 6 et 11 dans le RhCMV promeuvent *in vivo* l'évasion du virus aux LT CD8⁺, en étant indispensable à la réplication et la dissémination virale durant les sur-infections (Hansen *et al.* 2010). La présentation des peptides signaux classiques étant dépendante du système TAP, au contraire de celle des peptides issus d'UL40, l'infection à HCMV pourrait favoriser *in vivo* la présentation d'un répertoire peptidique HLA-E quasiment intégralement constitué du peptide UL40₁₅₋₂₃. Étant donné que les protéines HLA-E*01:01 et 01:03 pourraient avoir des propriétés différentes en terme de présentation de répertoire peptidique alternatif, et que nous avons montré que près de 1/3 des souches virales HCMV codent pour un peptide viral non canonique, être hétérozygote *HLA-E*01:01/01:03* serait un avantage pour la mise en place d'un large répertoire T restreint par HLA-E.

Nous avons caractérisé le polymorphisme du gène viral *UL40* dans cette étude. En accord avec des études précédentes, nous avons identifié que le gène *UL40* possède un fort polymorphisme au niveau de sa séquence signal, et tout particulièrement au niveau du peptide liant HLA-E. Nous avons ainsi pu apprécier une variabilité importante du peptide UL40₁₅₋₂₃, menant à l'identification de 14 nonamères, issus de 32 séquençages uniques du gène *UL40*

à partir d'échantillons d'ADN prélevés chez 25 patients transplantés rénaux HCMV⁺. Nous avons en parallèle détecté une réponse T restreinte par HLA-E anti-HCMV chez 6 individus sur 23 testés, permettant de tirer quelques observations quant à l'impact des peptides viraux sur l'activation des LT HLA-E/UL40 en cas d'infection à HCMV. La moitié des séquences codent pour les peptides VMAPRTLIL et VMAPRTLLL et sont retrouvés chez 13 KTR sur 23. Ils correspondent aux homologues parfaits de peptides signaux HLA-I₃₋₁₁ codés par certains allèles *HLA-A* et *-C*. La surreprésentation de ces 2 peptides au sein des variants de UL40₁₅₋₂₃ laisse supposer qu'ils favorisent la mise en place d'une réponse immunitaire anti-HCMV et restreinte par HLA-E chez les individus infectés par une souche virale codant l'un d'entre eux. À l'appui, les 2 protéines HLA-E lient et présentent efficacement les peptides VMAPRTLIL et VMAPRTLLL à la surface cellulaire (Braud *et al.* 1998 (b); Strong *et al.* 2003). En outre, les complexes formés HLA-E/HLA-I₃₋₁₁ sont reconnus par les récepteurs CD94/NKG2, au profit de l'isoforme inhibitrice (CD94/NKG2A), qui possède une affinité de 5 à 7 fois supérieure avec ces complexes par rapport à l'isoforme activatrice (CD94/NKG2C) (Heatley *et al.* 2013). Ainsi, la présentation de ces 2 peptides par HLA-E permet l'échappement à la lyse médiée par les cellules NK CD94/NKG2A⁺ contre les cellules infectées par le HCMV *in vitro* (Heatley *et al.* 2013). Enfin, le développement de réponses T CD8 spécifiques de HLA-E/VMAPRTLIL ou HLA-E/VMAPRTLLL a été décrit chez des individus HCMV⁺ ne codant pas les peptides homonymes avec leurs HLA autologues, conséquence probable de la tolérance centrale impactant ce répertoire T. Ainsi, l'échappement du virus codant soit UL40_{VMAPRTLIL} soit UL40_{VMAPRTLLL} aux réponses NK CD94/NKG2A⁺ chez l'intégralité des individus HCMV⁺ constituerait un avantage sélectif, par rapport à l'échappement aux réponses T chez uniquement les individus infectés ayant des HLA autologues codant l'un et/ou l'autre de ces peptides.

Nous avons également décrit qu'une souche HCMV infectante codait pour un peptide UL40₁₅₋₂₃ tronqué constitutivement de 5 acides aminés consécutifs (P4 à P8), sans perturbation du cadre de lecture en aval (Tableau 2 de l'article en page 119). Ceci peut être le reflet de la pression de sélection exercée par le système immunitaire de l'hôte sur le HCMV *in vivo*. Chez 2 KTR, les souches HCMV infectantes codaient respectivement pour les peptides VMAPRILIL et VMAPRTLAL, 2 variants quasi-parfaits des peptides VMAPRTLIL et VMAPRTLLL.

Ces peptides viraux ont été précédemment décrits comme capable de lier et stabiliser à la membrane HLA-E, et ainsi de permettre l'interaction avec le récepteur CD94/NKG2A, mais pas son homonyme activateur CD94/NKG2C (Heatley *et al.* 2013). Ainsi, la présentation à la surface de cellules infectées de l'un ou l'autre de ces peptides par HLA-E pourrait protéger la cellule infectée de la lyse médiée par les cellules NK CD94/NKG2A⁺ et/ou CD94/NKG2C⁺. Nous avons aussi identifié des peptides issus de UL40₁₅₋₂₃ non caractérisés à ce jour (VMAPWSLIL et LMAPRTLFL). Du fait que nous n'ayons pas détecté de réponses T restreintes par HLA-E chez ces deux individus, il est possible que ces peptides ne soient pas présentés *in vivo*, bien qu'ils aient tous deux conservés les acides aminés nécessaires à l'ancrage et à la présentation dans HLA-E (P2, P7 et P9). Dans un modèle de vaccination contre le SIV chez les macaques rhésus, un rapport récent a permis de montrer que la protéine HLA-E*01:03 pouvait lier et présenter efficacement 12 peptides différents issus de la protéine virale Gag, sans toutefois qu'ils ne possèdent de résidus d'ancrage majeurs ou mineurs favorables à la stabilisation de la protéine HLA-Ib (Hansen *et al.* 2016). L'étude *in silico* de la structure tridimensionnelle de ces complexes HLA-E/peptide de Gag a démontré que la structure spatiale et conformationnelle adoptée par ces 12 épitopes dans le sillon peptidique de HLA-E était superposable et similaire. Ainsi, des variations spatiales divergentes de peptides viraux par rapport aux peptides canoniques pourraient empêcher la présentation de ces derniers dans HLA-E.

Nous avons également étudié si le polymorphisme en amont et en aval du peptide signal UL40₁₅₋₂₃ pouvait avoir un impact indirect sur la capacité du nonamère à être présenté dans HLA-E. Nous avons étendu l'analyse de la variabilité des séquences UL40 à l'ensemble de la protéine (AA 1-221), à la recherche d'éventuels variants qui pourraient influencer l'expression ou la disponibilité du peptide UL40₁₅₋₂₃ se liant à HLA-E. En partant du principe que les KTR HCMV⁺ répondeurs ont vu le peptide signal UL40₁₅₋₂₃ de leur souche infectante être clivé et présenté efficacement dans HLA-E, nous avons comparé dans une analyse préliminaire leurs séquences UL40₁₋₂₂₁ à celles issues des individus HCMV⁺ non répondeurs. Notre étude met particulièrement en évidence 2 résidus hautement variables en position 25 et 37 (jusqu'à 3 acides aminés différents par position ; 48,3 et 36,7% de variabilité par rapport à la séquence consensus respectivement). L'acide aminé 25 appartient à la région *h* (AA 21-

30), une portion de la séquence signal UL40 exclusivement constituée d'acides aminés hydrophobes et favorisant l'insertion de cette dernière dans la membrane du RE, tandis que le résidu 37 correspond à l'acide aminé terminal de la séquence signal UL40₁₋₃₇ et constitue le site de clivage de UL40 par l'enzyme SPase (Prod'homme *et al.* 2012). Ainsi, les mutations détectées sur ces 2 résidus pourraient avoir un impact sur la prise en charge de la séquence signal UL40₁₋₃₇ par les éléments du RE responsables du relargage du peptide UL40₁₅₋₂₃. Cependant, l'analyse position par position n'a pu mettre en avant de différences entre ces multiples variants UL40 ($p > 0,5$) et la présence de LT restreints par HLA-E chez ces individus.

Nous avons montré que la présence de LT restreints par HLA-E est statistiquement associée à la présence de l'allèle HLA-A*02 chez les répondeurs HCMV⁺ ($p = 0,0026$). Une hypothèse possible est que les LT spécifiques de HLA-E/UL40 soient capables de réaction croisée envers les protéines HLA-A*02 complexées avec des peptides signaux UL40₁₅₋₂₃, bien qu'aucune étude n'ait décrit un phénomène semblable à ce jour. Bien que les protéines HLA-E et HLA-A*02 ne partagent que 76% d'identité dans les domaines extracellulaires, la superposition des structures spatiales de HLA-A*02/peptide et HLA-E/peptide déterminées par cristallographie ne montre pas de différence entre les deux ; de même la taille, la largeur et la profondeur du sillon peptidique demeurent similaires (O'Callaghan *et al.* 1998)(**Figure 29**).

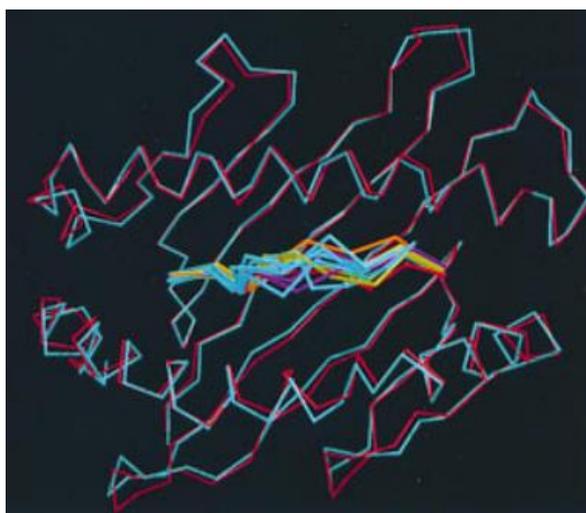


Figure 29 : Vue du dessus d'une superposition des sillons peptidiques des molécules HLA-E (en rouge) et HLA-A*02 (en bleu), stabilisées par de multiples nonapeptides propres à chaque protéine (multiples couleurs). D'après O'Callaghan *et al.* 1998.

D'autre part, la protéine HLA-A*02 peut lier et présenter des peptides signaux HLA₃₋₁₁ *in vitro*, du fait que les résidus d'ancrage pour les protéines HLA-

A*02 et -E sont similaires pour P2 et P9 (Lampen *et al.* 2013). En ce sens, nous avons observé une augmentation de l'expression membranaire de la protéine HLA-A*02 sur une lignée cellulaire déficiente pour TAP après chargement exogène de plusieurs peptides signaux HLA₃₋₁₁. Dans un contexte d'infection à HCMV, l'absence d'un système TAP fonctionnel couplé à la présence de peptide UL40₁₅₋₂₃ délivré indépendamment de TAP conduiraient à la présentation membranaire de complexes HLA-E/UL40 et HLA-A*02/UL40.

L'absence de développement de réponses T anti-HCMV restreinte par HLA-E chez tous les individus HCMV⁺ peut être due aux propriétés de tropisme cellulaire des souches infectantes. En effet, Hansen et collaborateurs ont récemment décrit que la vaccination de macaque rhésus contre le SIV par un vecteur recombinant RhCMV codant la protéine virale Gag et ayant un tropisme préférentiel pour les fibroblastes induisait des réponses T CD8 restreintes par le CMH-E élevées et fréquentes de type TEM, dirigées contre plus de 20 épitopes Gag chez l'intégralité des macaques rhésus vaccinés (n=42) (Hansen *et al.* 2016). De manière plus étonnante, chez ces macaques, aucune réponse T CD8 n'était restreinte par des CMH-I conventionnels, tandis que la vaccination par le vecteur recombinant codant Gag mais non modifié pour son tropisme induisait une réponse T CD8 classique.

CARACTERISTIQUES ET ROLE DE LA REPONSE T CD8 HLA-E/UL40

Le répertoire T des LT CD8 HLA-E/UL40

Les propriétés physiologiques globalement similaires des 2 formes protéiques HLA-E au sein de la population mondiale (séquence, conformation, liaison à la β 2m et répertoire physiologique identiques), ainsi que la relative conservation doublée d'un mimétisme parfait des divers peptides UL40₁₅₋₂₃ décrits par rapport aux peptides physiologiques HLA-I₃₋₁₁, soulèvent la question d'un répertoire de LT HLA-E/UL40 à TCR public.

Des études précédentes ont identifié que les lymphocytes T restreints par HLA-E spécifiques du HCMV se caractérisaient par l'amplification monoclonale de cellules exprimant les chaînes V β 3, 5.1, 9, 16 ou 22 chez 6 individus HCMV⁺ différents (Pietra *et al.* 2001; Romagnani *et al.* 2002; Pietra *et al.* 2003). Notre

étude du répertoire T V β quasi/pauciclinal chez 5 KTR HCMV⁺ a permis d'élargir cette liste à de nouvelles chaînes non décrites à ce jour : V β 1, 2, 7.1, 8, 12, 13.1, 13.2, 13.6, 14, 17 et 23. En conséquence, l'existence d'un répertoire T à TCR public avec une chaîne V β partagée semble compromise. Cependant, à l'instar des iNKT qui partagent l'expression d'un TCR public semi-invariant, l'existence chez les individus d'un répertoire T restreint par HLA-E partageant une chaîne commune Va demeure possible. La caractérisation de l'interaction entre complexes HLA-E/UL40₁₅₋₂₃ et TCR a permis l'identification de la chaîne Va26 à partir d'une population monoclonale isolée chez un individu HCMV⁺ (Hoare *et al.* 2006). De plus, il est apparu que cette chaîne Va était responsable de 46% de l'interaction du TCR avec la protéine HLA-E compléxée, en contactant notamment les domaines α 1 et α 2 de HLA-E et les résidus P4, P5, et dans une moindre mesure P6, du peptide UL40₁₅₋₂₃/HLA-I₃₋₁₁ présenté. Les acides aminés P4, P5 et P6 sont extrêmement conservés au sein des peptides signaux HLA-Ia et ne présentent aucune variabilité entre les 7 peptides HLA-Isp physiologiques (à l'exception de la variation de Thr vers Ala en P6 sur 1 peptide parmi les 7). Ainsi le partage d'une chaîne commune Va au sein de ce répertoire T pourrait constituer les bases de la reconnaissance de la protéine HLA-E par les TCR de LT HLA-E/UL40.

Phénotype et fonction des LT CD8 HLA-E/UL40

Quelques rares études se sont focalisées sur la caractérisation du phénotype et de la fonction des LT restreints par HLA-E chez l'Homme (voir Partie 4 de l'introduction). De manière globale, les populations T restreintes par HLA-E sont des LT $\alpha\beta$ simple positive CD8, dont on connaît uniquement leur capacité à produire de l'IFN- γ suite à la stimulation spécifique ou non de la voie TCR-CD3. Nous avons montré que ces populations arborent dans un contexte d'infection à HCMV un phénotype typique de cellules T CD8⁺ effectrice-mémoires (CD3⁺ CD8⁺ CD4⁻ TCR $\alpha\beta$ ⁺ CD45RO^{high} CD45RA^{low} CD27⁻ CD28⁻ CCR7⁻ CD62L⁻), similaire en ce sens au profil décrit par notre équipe pour une population monoclonale Mart.22 issue de PBMCs d'un patient transplanté rénal HCMV⁺ (Allard *et al.* 2012).

D'un point de vue fonctionnel, ces populations T se caractérisent majoritairement par un profil cytokinique Th1 après stimulation non spécifique de la voie TCR-CD3, en produisant notamment du TNF- α , de l'IFN- γ et de l'IL-2, confirmant nos résultats préliminaires sur le clone Mart.22 (Allard *et al.* 2012). Nous avons également observé que la population dérivée de KTR#104 et les deux populations clonales (Mart.22 et Bio1.14) produisaient de l'IL-4 et de l'IL-13 suite à une stimulation OKT3, bien qu'en de moindre mesure par rapport aux cytokines Th1, montrant néanmoins que ces populations T peuvent potentiellement avoir des propriétés conjointes de type Th2. Auparavant, les LT spécifiques de complexes HLA-E/UL40 ont été décrits chez 4 individus HCMV⁺ comme des LT CD8⁺ TEMRA, à savoir CD45RO⁻ CD45RA⁺, capables de sécréter de l'IFN- γ mais pas d'IL-2 (Mazzarino *et al.* 2005), laissant supposer que ces lymphocytes T étaient dans un stade de maturation plus différencié. Dans le contexte de l'infection à Mtb, les LT HLA-E/Mtb arborent un phénotype TEM et se distinguent *ex vivo* des LT HLA-E/UL40 en ayant essentiellement un profil cytokinique de type Th2 (TNF- α ^{+/-} IFN- γ ⁻ IL-4⁺ IL-5^{+/-} IL-10^{+/-} IL-13⁺) (Caccamo *et al.* 2015; van Meijgaarden *et al.* 2015). Ils peuvent ainsi enclencher *in vitro* l'activation de LB induisant les sécrétions d'IL-6 (van Meijgaarden *et al.* 2015), d'IgM et d'IgG (Caccamo *et al.* 2015).

Nous avons observé que les populations T spécifiques de complexes HLA-E/UL40 isolées de 5 individus HCMV⁺ présentent un phénotype cytotoxique caractérisé par la production de granzymes A et B, de perforine et par l'exposition de molécules CD107a à leur surface suite à une stimulation non spécifique. Ces résultats sont en accord avec la capacité *in vitro* de ces cellules à lyser des cellules infectées par le HCMV par reconnaissance spécifique du peptide signal fourni par UL40 (Pietra *et al.* 2003; Mazzarino *et al.* 2005). Cette fonction cytotoxique des LT restreints par HLA-E, médiée par la sécrétion de perforine et de granzymes, a également été décrite dans de multiples contextes : l'infection à Mtb (Lewinsohn *et al.* 1998; Lewinsohn *et al.* 2000; Heinzl *et al.* 2002; Joosten *et al.* 2010), l'infection à Set (Salerno-Gonçalves *et al.* 2004), ainsi que la reconnaissance autologue du Soi stressé (Li *et al.* 2001; Jiang *et al.* 2010) ou autoréactif (Sep) (Correale et Villa 2008).

De façon intéressante, nous avons observé dans cette étude que le marqueur PD-1 était plus exprimé *ex vivo* par les LT CD8 HLA-A*02/pp65 que

par les LT HLA-E/UL40 ($p=0,0424$). En outre, cette différence d'expression est maintenue durant les mois post-infection. Le récepteur PD-1 est généralement associé à un état d'exhaustion des populations T, notamment dans les contextes de stimulation chronique des réponses immunes (infection virale et réponse anti-tumorale) (Simon et Labarriere 2017). L'absence d'expression membranaire de PD-1 *ex vivo* par les LT HLA-E/UL40 pourrait être le reflet d'une incapacité de ces cellules à exprimer le gène codant PD-1 par rapport à la réponse T HLA-A*02/pp65. Dans le contexte du mélanome, une portion des lymphocytes T spécifiques de HLA-A*02/Melan-A (un épitope du Soi exprimé par les melanocytes et surexprimé dans les mélanomes) s'avère incapable d'exprimer le récepteur PD-1 que ce soit au repos ou après stimulation spécifique, du fait d'un état de méthylation constitutif du promoteur du gène codant PD-1. De plus, il a été observé que l'expression de PD-1 par les HLA-A*02/Melan-A est corrélée à l'avidité fonctionnelle des LT ; ainsi, le répertoire PD-1^{neg} correspond à des LT de faible avidité fonctionnelle (Simon *et al.* 2016). Les LT HLA-E/UL40 étant essentiellement PD-1^{neg} posséderaient donc des TCR de faible affinité. À l'appui de cette hypothèse, le TCR d'un clone LT spécifique d'un complexe HLA-E/UL40 présente une affinité basse contre son épitope viral nominal exogène ($K_d=30\mu\text{M}$) et très faible ($K_d=100\mu\text{M}$) contre un peptide autologue (Hoare *et al.* 2006). Les capacités de reconnaissance nominale de ces populations T sont probablement limitées au thymus par la conservation d'un répertoire de faible affinité envers des épitopes du Soi du fait du risque de réactivité croisée de ces populations envers le peptidome physiologique de HLA-E. L'incapacité de ces LT à exprimer le récepteur inhibiteur après stimulation pourrait être lié à la sélection thymique d'un répertoire de faible avidité envers des épitopes du Soi.

IMPACT CLINIQUE DE LA REPONSE T CD8 HLA-E/UL40

Les LT CD8 HLA-E/UL40 : un médiateur du rejet en transplantation ?

Les TCR des LT CD8 HLA-E/UL40 possèdent un potentiel de reconnaissance de multiples épitopes, à la fois partagés par UL40 et HLA-I, qui diffèrent les uns des autres par 1 ou 2 acides aminés, soulevant une fonction cytolytique

potentielle envers des cellules non infectées autologues ou allogéniques dans un contexte de transplantation.

De manière surprenante, nous avons observé que les populations T restreintes par HLA-E de 4 individus sur les 5 testés sont capables de reconnaître spécifiquement des complexes HLA-E/HLA-I₃₋₁₁ autologues. Chez deux KTR, le peptide viral UL40₁₅₋₂₃ nominal (fourni par la souche infectante) correspond à un peptide HLA-I autologue (VMAPRTLIL pour KTR #108 et VMAPRTLLL pour KTR#109 respectivement fournis par HLA-C et HLA-A). Cependant la détection de production de TNF- α suite à une stimulation spécifique *in vitro* ne signifie pas pour autant que ces LT ont nécessairement un potentiel cytolytique, à l'instar de certains clones T restreints par HLA-E de type Th2 dans l'infection à Mtb (van Meijgaarden *et al.* 2015). De même, l'équipe de MINGARI et MORETTA a montré que les LT CD8 HLA-E/UL40 ne sont pas capables *in vitro* de lyser spontanément des cellules autologues (Pietra *et al.* 2001) et le peuvent uniquement après chargement du peptide viral (Pietra *et al.* 2003). Nous n'avons pas non plus observé de potentiel de reconnaissance autologue spontanée parmi les populations T triées, malgré l'expression de HLA-E à leur membrane. Notre équipe a précédemment décrit que le clone Mart.22 est capable de reconnaissance croisée envers un épitope du Soi (VMAPRTLIL), mais que cette capacité autolytique est finement contrôlée par l'engagement du récepteur inhibiteur KIR2DL2 avec les HLA-C autologues (Allard *et al.* 2012). En ce sens, seul l'ajout d'un Ac bloquant anti-KIR2DL2 enclenche la lyse fratricide de cette population monoclonale *in vitro* (Allard *et al.* 2012).

L'expression de récepteurs inhibiteurs de type iNKR (KIR2/3DL, ILT-2, CD94/NKG2A) est un marqueur spécifique de ces LT CD8 HLA-E/UL40 (Pietra *et al.* 2001; Romagnani *et al.* 2002, 2004; Allard *et al.* 2012) bien que les récepteurs ILT-2 et CD94/NKG2A ne diminuent que peu ou pas l'activation des LT au contraire des KIR inhibiteurs (Romagnani *et al.* 2002; Mazzarino *et al.* 2005; Allard *et al.* 2012). L'expression de récepteurs inhibiteurs de type KIR2/3DL participent à l'éducation du répertoire NK et à la tolérance au Soi physiologique des cellules NK envers des cellules autologues (pour revue Nash *et al.* 2014). De façon similaire, l'expression native de récepteurs inhibiteurs KIR2/3DL ainsi que la délétion du répertoire de haute avidité envers des peptides HLA-I₃₋₁₁ autologues pourraient conduire à la conservation d'un

répertoire T restreint HLA-E de moyenne à faible avidité fonctionnelle envers des peptides du Soi. En ce sens, nous avons observé que sur les 7 populations testées, les trois populations de LT HLA-E/UL40 ne reconnaissant pas un peptide à la fois viral et à la fois autologue, n'expriment peu voire pas de récepteurs membranaires KIR, au contraire des quatre autres. Ceci permettrait une absence de réactivité de ces populations contre des cellules autologues saines tout en favorisant l'élimination des cellules infectées par le HCMV du fait de la diminution de leur expression membranaire de HLA-Ia.

Dans un contexte de transplantation d'organe, l'interface entre les tissus du receveur et ceux du donneur est essentiellement constituée de cellules endothéliales allogéniques. Les cellules endothéliales sont les principales sources d'expression de HLA-E *in vivo* en dehors du compartiment lymphoïde dans un greffon (Coupel *et al.* 2007). Nous supposons que les lymphocytes T restreints par HLA-E spécifiques de UL40₁₅₋₂₃ peuvent potentiellement reconnaître et lyser des cellules endothéliales allogéniques dans un contexte de transplantation d'organe allogénique, pouvant engendrer des lésions vasculaires et participer ainsi aux mécanismes de rejet. En effet, nous avons observé une production de TNF- α par les populations T polyclonales HLA-E/UL40 suite à la reconnaissance de peptides issus de HLA-I allogéniques se différenciant du peptide nominal par 1 à 2 acides aminés, préférentiellement en positions P6, P7 et P8. Nous avons montré *in vitro* que la population monoclonale Mart.22 était capable spontanément de reconnaître et lyser des cellules endothéliales allogéniques non infectées par le HCMV. Cependant, la présence d'allèles HLA, ligands de KIR inhibiteurs, couplée à celle des peptides signaux reconnus par le TCR, limitent la réactivité des LT restreints par HLA-E envers les cellules allogéniques *in vitro* (Allard *et al.* 2012).

Une légère corrélation négative a été observée entre l'évolution de la créatinine (M12-M3) et le nombre de désappariements des peptides signaux HLA-Ia dans une cohorte de KTR (n=139) ($p < 0,05$) (Battle *et al.* 2013). Dans une petite cohorte de 15 patients transplantés pulmonaires HCMV⁺, la présence de LT spécifiques de HLA-E/UL40 est associée au développement de syndrome de bronchiolite oblitérants à 5 ans post-greffe ($p = 0,007$), mais pas au rejet aigu cellulaire ($p = 0,11$) (Sullivan *et al.* 2015). Il est important de noter que ces 15 patients analysés ont été pré-sectionnés sur la base de leur incapacité à fournir

le peptide VMAPRTLIL – un des peptides viraux UL40₁₅₋₂₃ des plus fréquents - par leurs propres protéines HLA-C, et sur la capacité du greffon à présenter des complexes natifs HLA-E_{VMAPRTLIL}, au contraire de notre étude. À l'issue de notre analyse préliminaire, nous n'avons pas observé de dégradation de la fonction rénale liée à la présence de LT HLA-E/UL40 chez les individus HCMV⁺ suite à l'étude de l'évolution des rapports de créatinine et protéinurie au cours du temps. Cependant, nous avons observé que 4 patients HCMV⁺ sur 12 ayant développé uniquement une réponse T restreinte par HLA-E ont subis une crise de rejet cellulaire prouvée par biopsie durant leur première année post-transplantation contre aucun des patients HCMV⁺ ayant développé une réponse T restreinte par HLA-A*02.

Implications potentielles des LT CD8 HLA-E/UL40 dans d'autres contextes pathologiques

La capacité de reconnaissance croisée de ces populations T peut laisser suspecter de multiples rôles *in vivo*. En effet, les LT restreints par HLA-E spécifique de UL40₁₅₋₂₃ sont également capables de reconnaissance croisée envers des peptides issus de l'EBV (SQAPLPCVL) et du virus Influenza (ILGKVFTLT) (García *et al.* 2002; Romagnani *et al.* 2002), et pourraient participer dans la lutte contre ces 2 infections virales.

En outre, ces populations T peuvent également lyser des cellules de mélanome par reconnaissance spécifique même si avec une faible avidité des complexes HLA-E/AMAPIKTHL ou HLA-E/AMAPIKVRL, 2 peptides issus de l'épissage alternatif de l'ARNm codant Prdx5 (Sensi *et al.* 2009). Les LT CD8 HLA-E/UL40 peuvent éliminer *in vitro* des cellules tumorales d'origine allogénique (Romagnani *et al.* 2002). De manière générale, l'expression de protéines HLA-Ia par les cellules tumorales joue un rôle primordial dans la capacité des effecteurs immuns cytotoxiques à reconnaître des cellules tumorales. La pression exercée par le système immunitaire couplée à l'instabilité génétique des cancers mènent à la sélection de cellules tumorales résistantes ayant une expression diminuée des protéines du CMH, constituant ainsi un des mécanismes majeurs d'échappement tumoral (Campoli et Ferrone 2008). Du fait que l'expression de la protéine HLA-E est induite ou augmentée dans de nombreux cancers, la présence des populations T restreintes par HLA-E

pourraient participer positivement *in vivo* à la surveillance immunitaire antitumorale des variants tumoraux déficients pour l'expression des HLA-Ia, tout comme le répertoire T restreint par Qa-1 participe à la surveillance des tumeurs déficientes pour TAP *in vivo* chez la souris (Oliveira *et al.* 2010).

CONCLUSION & PERSPECTIVES

À travers cette étude, nous avons déterminé que le développement de lymphocytes T restreints par HLA-E spécifiques de UL40₁₅₋₂₃ est déclenché par l'infection à HCMV chez au moins 30% des individus. L'évaluation de cette fréquence est potentiellement sous-estimée, et en conséquence, il serait intéressant de réévaluer la proportion de développement de LT HLA-E/UL40 parmi la population HCMV⁺ obtenue dans notre étude par ELISPOT.

La génération de cette population non conventionnelle dépend de multiples facteurs propres au virus (séquence UL40₁₅₋₂₃ infectante) et à l'hôte (allèle *HLA-A*02*, hétérozygotie pour *HLA-E*). Nous avons également observé une tendance à l'association des allèles *HLA-B*51* et *HLA-C*15* avec le développement de cette réponse T. L'inclusion de plus de patients dans notre cohorte pourra permettre d'éclaircir ce point.

Ces populations T possèdent *in vitro* un profil de LT de type TEM/TEMRA ainsi qu'un potentiel cytolytique et cytokinique de type Tc1. L'emploi de technologies de séquençage devrait nous permettre de caractériser plus finement le phénotype de ces populations, en comparaison de la réponse T anti-HCMV conventionnelle. Nous avons pour projet actuellement de déterminer le rôle de ces populations T dans le contexte de l'infection à HCMV, en étudiant notamment leurs capacités fonctionnelles envers des cellules infectées par le HCMV (fonction cytotoxique), mais également envers des cellules du système immunitaire (LT $\alpha\beta$ CD4⁺, LT $\alpha\beta$ CD8⁺, LT $\gamma\delta$, DC) suite à leur activation (fonction suppressive).

Ces LT HLA-E/UL40 possèdent la capacité *in vitro* de reconnaître de manière croisée des peptides allogéniques présentés *in vivo* par les cellules du greffon dans un contexte de transplantation, et tout particulièrement par les cellules endothéliales. Nous avons fait l'observation que les patients

développant uniquement la réponse T restreinte par HLA-E anti-HCMV ont tendance à développer plus de rejets cellulaires précoces (< 1 an). Nous avons pour objectif d'étudier ce potentiel délétère dans le contexte de la transplantation rénale à l'aide d'une cohorte constituée sur la base de l'infection à HCMV du patient et le statut de rejet du greffon, par analyses d'échantillons sanguins et de biopsies.

De manière plus générale, nos résultats soulignent l'importance d'étudier ces populations T CD8 restreintes par HLA-E dans de multiples contextes pathologiques. En effet, le polymorphisme mineur de la protéine HLA-E au sein de la population mondiale permettrait le développement d'outils universels de détection de réponse immune et de vaccination applicables à tous dans les contextes d'infections à Mtb, VIH et HCMV.

BIBLIOGRAPHIE

- Abou-Ayache, Ramzi, Mathias Büchler, Patrick Lepogamp, Pierre-François Westeel, Yannick Le Meur, Isabelle Etienne, Thierry Lobbedez, *et al.* 2008. « CMV Infections after Two Doses of Daclizumab versus Thymoglobulin in Renal Transplant Patients Receiving Mycophenolate Mofetil, Steroids and Delayed Cyclosporine A ». *Nephrology, Dialysis, Transplantation: Official Publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association* 23 (6):2024-32. <https://doi.org/10.1093/ndt/gfm873>.
- Adams, E. J., et P. Parham. 2001. « Genomic Analysis of Common Chimpanzee Major Histocompatibility Complex Class I Genes ». *Immunogenetics* 53 (3):200-208.
- Adler, Stuart P., Anne-Marie Manganello, Ronzo Lee, Michael A. McVoy, Daniel E. Nixon, Stanley Plotkin, Edward Mocarski, *et al.* 2016. « A Phase 1 Study of 4 Live, Recombinant Human Cytomegalovirus Towne/Toledo Chimera Vaccines in Cytomegalovirus-Seronegative Men ». *The Journal of Infectious Diseases* 214 (9):1341-48. <https://doi.org/10.1093/infdis/jiw365>.
- Ahn, K, A Angulo, P Ghazal, P A Peterson, Y Yang, et K Früh. 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):10990-95.
- Ahn, K., A. Gruhler, B. Galocha, T. R. Jones, E. J. Wiertz, H. L. Ploegh, P. A. Peterson, Y. Yang, et K. Früh. 1997. « The ER-Luminal Domain of the HCMV Glycoprotein US6 Inhibits Peptide Translocation by TAP ». *Immunity* 6 (5):613-21.
- Airoldi, Irma, Alice Bertaina, Ignazia Prigione, Alessia Zorzoli, Daria Pagliara, Claudia Cocco, Raffaella Meazza, *et al.* 2015. « $\gamma\delta$ T-Cell Reconstitution after HLA-Haploidentical Hematopoietic Transplantation Depleted of TCR- $\text{A}\beta$ + /CD19+ Lymphocytes ». *Blood* 125 (15):2349-58. <https://doi.org/10.1182/blood-2014-09-599423>.
- Akulian, J. A., M. R. Pipeling, E. R. John, J. B. Orens, N. Lechtzin, et J. F. McDyer. 2013. « High-Quality CMV-Specific CD4+ Memory Is Enriched in the Lung Allograft and Is Associated with Mucosal Viral Control ». *American Journal of Transplantation: Official Journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons* 13 (1):146-56. <https://doi.org/10.1111/j.1600-6143.2012.04282.x>.
- Alejnef, A., A. Pachnio, M. Halawi, S. E. Christmas, P. a. H. Moss, et N. Khan. 2014. « Cytomegalovirus Drives $\text{V}\delta 2^{\text{neg}}$ $\gamma\delta$ T Cell Inflation in Many Healthy Virus Carriers with Increasing Age ». *Clinical and Experimental Immunology* 176 (3):418-28. <https://doi.org/10.1111/cei.12297>.
- Al-Lamki, Rafia S., John R. Bradley, et Jordan S. Pober. 2008. « Endothelial Cells in Allograft Rejection ». *Transplantation* 86 (10):1340-48. <https://doi.org/10.1097/TP.0b013e3181891d8b>.
- Allard, Mathilde, Pierre Tonnerre, Steven Nedellec, Romain Oger, Alexis Morice, Yannick Guilloux, Elisabeth Houssaint, Béatrice Charreau, et Nadine Gervois. 2012. « HLA-E-Restricted Cross-Recognition of Allogeneic Endothelial Cells by CMV-Associated CD8 T Cells: A Potential Risk Factor Following Transplantation ». Édité par Vassiliki A. Boussiotis. *PLoS ONE* 7 (11):e50951. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0050951>.
- Alonso Arias, R., M. A. Moro-García, A. Echeverría, J. J. Solano-Jaurrieta, F. M. Suárez-García, et C. López-Larrea. 2013. « Intensity of the Humoral Response to Cytomegalovirus Is Associated with the Phenotypic and Functional Status of the Immune System ». *Journal of Virology* 87 (8):4486-95. <https://doi.org/10.1128/JVI.02425-12>.
- Amir, Avital L., Lloyd J. A. D'Orsogna, Dave L. Roelen, Marleen M. van Loenen, Renate S. Hagedoorn, Renate de Boer, Menno A. W. G. van der Hoorn, *et al.* 2010. « Allo-HLA Reactivity of Virus-Specific Memory T Cells Is Common ». *Blood* 115 (15):3146-57. <https://doi.org/10.1182/blood-2009-07-234906>.
- Andrian, Ulrich H. von, et Thorsten R. Mempel. 2003. « Homing and Cellular Traffic in Lymph Nodes ». *Nature Reviews Immunology* 3 (11):867. <https://doi.org/10.1038/nri1222>.
- Antona, D., A. Lepoutre, L. Fonteneau, C. Baudon, F. Halftermeyer-Zhou, Y. Le Strat, et D. Lévy-Bruhl. 2017. « Seroprevalence of cytomegalovirus infection in France in 2010 ». *Epidemiology & Infection* 145 (7):1471-78. <https://doi.org/10.1017/S0950268817000103>.
- Appay, Victor, P. Rod Dunbar, Margaret Callan, Paul Klenerman, Geraldine M. A. Gillespie, Laura Papagno, Graham S. Ogg, *et al.* 2002. « Memory CD8+ T Cells Vary in Differentiation Phenotype in Different Persistent Virus Infections ». *Nature Medicine* 8 (4):379-85. <https://doi.org/10.1038/nm0402-379>. (a)
- Appay, Victor, Solène Fastenackels, Christine Katlama, Hocine Ait-Mohand, Luminita Schneider, Amélie Guihot, Michael Keller, *et al.* 2011. « Old Age and Anti-Cytomegalovirus Immunity Are Associated with Altered T-Cell Reconstitution in HIV-1-Infected Patients ». *AIDS (London, England)* 25 (15):1813-22. <https://doi.org/10.1097/QAD.0b013e32834640e6>.

- Appay, Victor, John J. Zaunders, Laura Papagno, Julian Sutton, Angel Jaramillo, Anele Waters, Philippa Easterbrook, et al. 2002. « Characterization of CD4(+) CTLs Ex Vivo ». *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 168 (11):5954-58. (b)
- Apps, Richard, Zhaojing Meng, Gregory Q. Del Prete, Jeffrey D. Lifson, Ming Zhou, et Mary Carrington. 2015. « Relative Expression Levels of the HLA Class-I Proteins in Normal and HIV-Infected Cells ». *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 194 (8):3594-3600. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1403234>.
- Arnaiz-Villena, A., G. Vargas-Alarcon, J. I. Serrano-Vela, R. Reguera, J. Martinez-Laso, C. Silvera-Redondo, J. Granados, et J. Moscoso. 2007. « HLA-E Polymorphism in Amerindians from Mexico (Mazatecans), Colombia (Wayu) and Chile (Mapuches): Evolution of MHC-E Gene ». *Tissue Antigens* 69 Suppl 1 (avril):132-35. https://doi.org/10.1111/j.1399-0039.2006.763_2.x.
- 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):515-23. <https://doi.org/10.1038/ni1190>.
- Åsberg, A., A. Humar, A. G. Jardine, H. Rollag, M. D. Pescovitz, H. Mouas, A. Bignamini, et al. 2009. « Long-Term Outcomes of CMV Disease Treatment with Valganciclovir versus IV Ganciclovir in Solid Organ Transplant Recipients ». *American Journal of Transplantation: Official Journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons* 9 (5):1205-13. <https://doi.org/10.1111/j.1600-6143.2009.02617.x>.
- Åsberg, A., A. Humar, H. Rollag, A. G. Jardine, H. Mouas, M. D. Pescovitz, D. Sgarabotto, et al. 2007. « Oral Valganciclovir Is Noninferior to Intravenous Ganciclovir for the Treatment of Cytomegalovirus Disease in Solid Organ Transplant Recipients ». *American Journal of Transplantation: Official Journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons* 7 (9):2106-13. <https://doi.org/10.1111/j.1600-6143.2007.01910.x>.
- Åsberg, Anders, Atul Humar, Halvor Rollag, Alan G. Jardine, Deepali Kumar, Pål Aukrust, Thor Ueland, Angelo A. Bignamini, et Anders Hartmann. 2016. « Lessons Learned From a Randomized Study of Oral Valganciclovir Versus Parenteral Ganciclovir Treatment of Cytomegalovirus Disease in Solid Organ Transplant Recipients: The VICTOR Trial ». *Clinical Infectious Diseases: An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America* 62 (9):1154-60. <https://doi.org/10.1093/cid/ciw084>.
- Azevedo, Luiz Sergio, Lígia Camera Pierrotti, Edson Abdala, Silvia Figueiredo Costa, Tânia Mara Varejão Strabelli, Silvia Vidal Campos, Jéssica Fernandes Ramos, et al. 2015. « Cytomegalovirus infection in transplant recipients ». *Clinics* 70 (7):515-23. [https://doi.org/10.6061/clinics/2015\(07\)09](https://doi.org/10.6061/clinics/2015(07)09).
- Bachelet, Thomas, Lionel Couzi, Vincent Pitard, Xavier Sicard, Claire Rigother, Sébastien Lepreux, Jean-François Moreau, Jean-Luc Taupin, Pierre Merville, et Julie Déchanet-Merville. 2014. « Cytomegalovirus-Responsive $\Gamma\delta$ T Cells: Novel Effector Cells in Antibody-Mediated Kidney Allograft Microcirculation Lesions ». *Journal of the American Society of Nephrology: JASN* 25 (11):2471-82. <https://doi.org/10.1681/ASN.2013101052>.
- Bate, Sheri Lewis, Sheila C. Dollard, et Michael J. Cannon. 2010. « Cytomegalovirus Seroprevalence in the United States: The National Health and Nutrition Examination Surveys, 1988-2004 ». *Clinical Infectious Diseases: An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America* 50 (11):1439-47. <https://doi.org/10.1086/652438>.
- Battle, R., N. Woodroffe, M. Clench, et B. Clark. 2013. « The Relationship of HLA-Class I Derived Leader Peptide Mismatch and Renal Function within the First 12 Months Post-Renal Transplant ». *Tissue Antigens* 82 (4):291-92. <https://doi.org/10.1111/tan.12191>.
- Bayard, Charles, Hélène Lepetitcorps, Antoine Roux, Martin Larsen, Solène Fastenackels, Virginie Salle, Vincent Vieillard, et al. 2016. « Coordinated Expansion of Both Memory T Cells and NK Cells in Response to CMV Infection in Humans ». *European Journal of Immunology* 46 (5):1168-79. <https://doi.org/10.1002/eji.201546179>.
- Beck, S., et B. G. Barrell. 1988. « Human Cytomegalovirus Encodes a Glycoprotein Homologous to MHC Class-I Antigens ». *Nature* 331 (6153):269-72. <https://doi.org/10.1038/331269a0>.
- Beltran, Pierre M. Jean, et Ileana M. Cristea. 2014. « The life cycle and pathogenesis of human cytomegalovirus infection: lessons from proteomics ». *Expert review of proteomics* 11 (6):697-711. <https://doi.org/10.1586/14789450.2014.971116>.
- Bennett, Neil J., Omodele Ashiru, Fiona J. E. Morgan, Yin Pang, Georgina Okecha, Rob A. Eagle, John Trowsdale, J. G. Patrick Sissons, et Mark R. Wills. 2010. « Intracellular Sequestration of the NKG2D Ligand ULBP3 by Human Cytomegalovirus ». *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 185 (2):1093-1102. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1000789>.

- Berg, Pablo J. E. J. van de, Si-La Yong, Ester B. M. Remmerswaal, René A. W. van Lier, et Ineke J. M. ten Berge. 2012. « Cytomegalovirus-Induced Effector T Cells Cause Endothelial Cell Damage ». *Clinical and Vaccine Immunology* : CVI 19 (5):772-79. <https://doi.org/10.1128/CVI.00011-12>.
- Berg, Pablo J. van de, Kirstin M. Heutinck, Robin Raabe, Robert C. Minnee, Si La Young, Karlijn A. van Donselaar-van der Pant, Frederike J. Bemelman, Rene A. van Lier, et Ineke J. ten Berge. 2010. « Human Cytomegalovirus Induces Systemic Immune Activation Characterized by a Type 1 Cytokine Signature ». *The Journal of Infectious Diseases* 202 (5):690-99. <https://doi.org/10.1086/655472>.
- Bernstein, David I., Elizabeth A. Reap, Kevin Katen, Aubrey Watson, Kaitlin Smith, Pamela Norberg, Robert A. Olmsted, et al. 2009. « Randomized, double-blind, Phase 1 trial of an alphavirus replicon vaccine for cytomegalovirus in CMV seronegative adult volunteers ». *Vaccine* 28 (2):484-93. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2009.09.135>.
- 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):447-57. <https://doi.org/10.1002/eji.201141826>.
- Béziat, Vivien, Lisa L. Liu, Jenny-Ann Malmberg, Martin A. Ivarsson, Ebba Sohlberg, Andreas T. Björklund, Christelle Retière, et al. 2013. « NK Cell Responses to Cytomegalovirus Infection Lead to Stable Imprints in the Human KIR Repertoire and Involve Activating KIRs ». *Blood* 121 (14):2678-88. <https://doi.org/10.1182/blood-2012-10-459545>.
- Biron, C. A., K. S. Byron, et J. L. Sullivan. 1989. « Severe Herpesvirus Infections in an Adolescent without Natural Killer Cells ». *The New England Journal of Medicine* 320 (26):1731-35. <https://doi.org/10.1056/NEJM198906293202605>.
- Bland, Felicity A., Marius K. Lemberg, Andrew J. McMichael, Bruno Martoglio, et Veronique M. Braud. 2003. « Requirement of the Proteasome for the Trimming of Signal Peptide-Derived Epitopes Presented by the Nonclassical Major Histocompatibility Complex Class I Molecule HLA-E ». *The Journal of Biological Chemistry* 278 (36):33747-52. <https://doi.org/10.1074/jbc.M305593200>.
- Blyth, Emily, Leighton Clancy, Renee Simms, Chun K. K. Ma, Jane Burgess, Shivashni Deo, Karen Byth, et al. 2013. « Donor-Derived CMV-Specific T Cells Reduce the Requirement for CMV-Directed Pharmacotherapy after Allogeneic Stem Cell Transplantation ». *Blood* 121 (18):3745-58. <https://doi.org/10.1182/blood-2012-08-448977>.
- Boeckh, Michael, et Adam P. Geballe. 2011. « Cytomegalovirus: Pathogen, Paradigm, and Puzzle ». *Journal of Clinical Investigation* 121 (5):1673-80. <https://doi.org/10.1172/JCI45449>.
- Boivin, Guy, Nathalie Goyette, Christian Gilbert, Noel Roberts, Katherine Macey, Carlos Paya, Mark D. Pescovitz, et al. 2004. « Absence of Cytomegalovirus-Resistance Mutations after Valganciclovir Prophylaxis, in a Prospective Multicenter Study of Solid-Organ Transplant Recipients ». *The Journal of Infectious Diseases* 189 (9):1615-18. <https://doi.org/10.1086/382753>.
- Bolovan-Fritts, Cynthia A., et Stephen A. Spector. 2008. « Endothelial Damage from Cytomegalovirus-Specific Host Immune Response Can Be Prevented by Targeted Disruption of Fractalkine-CX3CR1 Interaction ». *Blood* 111 (1):175-82. <https://doi.org/10.1182/blood-2007-08-107730>.
- Bolovan-Fritts, Cynthia A., Rodney N. Trout, et Stephen A. Spector. 2007. « High T-Cell Response to Human Cytomegalovirus Induces Chemokine-Mediated Endothelial Cell Damage ». *Blood* 110 (6):1857-63. <https://doi.org/10.1182/blood-2007-03-078881>.
- Bonaros, Nikolaos, Bernd Mayer, Thomas Schachner, Günther Laufer, et Alfred Kocher. 2008. « CMV-Hyperimmune Globulin for Preventing Cytomegalovirus Infection and Disease in Solid Organ Transplant Recipients: A Meta-Analysis ». *Clinical Transplantation* 22 (1):89-97. <https://doi.org/10.1111/j.1399-0012.2007.00750.x>.
- Boutboul, François, Denis Puthier, Victor Appay, Olivier Pellé, Hocine Ait-Mohand, Béhazine Combadière, Ghislaine Carcelain, et al. 2005. « Modulation of Interleukin-7 Receptor Expression Characterizes Differentiation of CD8 T Cells Specific for HIV, EBV and CMV ». *AIDS (London, England)* 19 (17):1981-86.
- Boyson, J. E., S. N. McAdam, A. Gallimore, T. G. Golos, X. Liu, F. M. Gotch, A. L. Hughes, et D. I. Watkins. 1995. « The MHC E Locus in Macaques Is Polymorphic and Is Conserved between Macaques and Humans ». *Immunogenetics* 41 (2-3):59-68.
- 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 ». *Journal of Experimental Medicine* 206 (7):1495-1503. <https://doi.org/10.1084/jem.20090681>.

- Braud, V., E. Y. Jones, et 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):1164-69. <https://doi.org/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):795-99. <https://doi.org/10.1038/35869>. (a)
- Braud, V. M., D. S. Allan, D. Wilson, et A. J. McMichael. 1998. « TAP- and Tapasin-Dependent HLA-E Surface Expression Correlates with the Binding of an MHC Class I Leader Peptide ». *Current Biology: CB* 8 (1):1-10. (b)
- Brennan, D. C., C. Legendre, D. Patel, K. Mange, A. Wiland, K. McCague, et F. S. Shihab. 2011. « Cytomegalovirus Incidence between Everolimus versus Mycophenolate in de Novo Renal Transplants: Pooled Analysis of Three Clinical Trials ». *American Journal of Transplantation: Official Journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons* 11 (11):2453-62. <https://doi.org/10.1111/j.1600-6143.2011.03674.x>.
- Brooks, A. G., F. Borrego, P. E. Posch, A. Patamawenu, C. J. Scorzelli, M. Ulbrecht, E. H. Weiss, et J. E. Coligan. 1999. « Specific Recognition of HLA-E, but Not Classical, HLA Class I Molecules by Soluble CD94/NKG2A and NK Cells ». *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 162 (1):305-13.
- Browne, H., G. Smith, S. Beck, et T. Minson. 1990. « A Complex between the MHC Class I Homologue Encoded by Human Cytomegalovirus and Beta 2 Microglobulin ». *Nature* 347 (6295):770-72. <https://doi.org/10.1038/347770a0>.
- 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):1031-36. <https://doi.org/10.1084/jem.20042384>.
- Burrows, Jacqueline M., Katherine K. Wynn, Fleur E. Tynan, Julia Archbold, John J. Miles, Melissa J. Bell, Rebekah M. Brennan, et al. 2007. « The Impact of HLA-B Micropolymorphism Outside Primary Peptide Anchor Pockets on the CTL Response to CMV ». *European Journal of Immunology* 37 (4):946-53. <https://doi.org/10.1002/eji.200636588>.
- Caccamo, Nadia, Gabriella Pietra, Lucy C. Sullivan, Andrew G. Brooks, Teresa Prezzemolo, Marco P. La Manna, Diana Di Liberto, et al. 2015. « Human CD8 T Lymphocytes Recognize Mycobacterium Tuberculosis Antigens Presented by HLA-E during Active Tuberculosis and Express Type 2 Cytokines ». *European Journal of Immunology* 45 (4):1069-81. <https://doi.org/10.1002/eji.201445193>.
- Caliendo, A. M., K. St George, S. Y. Kao, J. Allega, B. H. Tan, R. LaFontaine, L. Bui, et C. R. Rinaldo. 2000. « Comparison of Quantitative Cytomegalovirus (CMV) PCR in Plasma and CMV Antigenemia Assay: Clinical Utility of the Prototype AMPLICOR CMV MONITOR Test in Transplant Recipients ». *Journal of Clinical Microbiology* 38 (6):2122-27.
- Campoli, M., et S. Ferrone. 2008. « HLA Antigen Changes in Malignant Cells: Epigenetic Mechanisms and Biologic Significance ». *Oncogene* 27 (45):5869-85. <https://doi.org/10.1038/onc.2008.273>.
- Cannon, Michael J., D. Scott Schmid, et Terri B. Hyde. 2010. « Review of Cytomegalovirus Seroprevalence and Demographic Characteristics Associated with Infection ». *Reviews in Medical Virology* 20 (4):202-13. <https://doi.org/10.1002/rmv.655>.
- Carbone, J., M. Arraya, F. Lozano, J. Palomo, et E. Sarmiento. 2015. « Mannose-Binding Lectin Serum Levels and Pre-Transplant Genotypes for Personalized Anti-CMV Prophylaxis in Heart Recipients ». *The Journal of Heart and Lung Transplantation* 34 (4):S125. <https://doi.org/10.1016/j.healun.2015.01.332>.
- Carretero, Marta, Claudia Cantoni, Teresa Bellón, Cristina Bottino, Roberto Biassoni, Antonio Rodríguez, Juan J. Pérez-Villar, Lorenzo Moretta, Alessandro Moretta, et Miguel 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):563-67. <https://doi.org/10.1002/eji.1830270230>.
- Cayatte, Corinne, Kirsten Schneider-Ohrum, Zhaoti Wang, Aivelu Irrinki, Nga Nguyen, Janine Lu, Christine Nelson, et al. 2013. « Cytomegalovirus Vaccine Strain Towne-Derived Dense Bodies Induce Broad Cellular Immune Responses and Neutralizing Antibodies That Prevent Infection of Fibroblasts and Epithelial Cells ». *Journal of Virology* 87 (20):11107-20. <https://doi.org/10.1128/JVI.01554-13>.

- Celik, Alexander A., Thomas Kraemer, Trevor Huyton, Rainer Blasczyk, et Christina Bade-Döding. 2016. « The Diversity of the HLA-E-Restricted Peptide Repertoire Explains the Immunological Impact of the Arg107Gly Mismatch ». *Immunogenetics* 68 (1):29-41. <https://doi.org/10.1007/s00251-015-0880-z>.
- Carboni, Cristina, Mehrdad Mousavi-Jazi, Hiroshi Wakiguchi, Ennio Carbone, Klas Kärre, et Kalle Söderström. 2001. « Synergistic effect of IFN- γ and human cytomegalovirus protein UL40 in the HLA-E-dependent protection from NK cell-mediated cytotoxicity ». *European journal of immunology* 31 (10):2926-2935.
- Cervera, C., F. Lozano, L. Linares, A. Antón, D. Balderramo, B. Suárez, M. Pascal, et al. 2009. « Influence of Mannose-Binding Lectin Gene Polymorphisms on the Invasiveness of Cytomegalovirus Disease after Solid Organ Transplantation ». *Transplantation Proceedings* 41 (6):2259-61. <https://doi.org/10.1016/j.transproceed.2009.06.056>.
- Chalupny, N. Jan, Annie Rein-Weston, Stephanie Dosch, et David Cosman. 2006. « Down-Regulation of the NKG2D Ligand MICA by the Human Cytomegalovirus Glycoprotein UL142 ». *Biochemical and Biophysical Research Communications* 346 (1):175-81. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2006.05.092>.
- Chang, C., A. Rodríguez, M. Carretero, M. López-Botet, J. H. Phillips, et L. L. Lanier. 1995. « Molecular Characterization of Human CD94: A Type II Membrane Glycoprotein Related to the C-Type Lectin Superfamily ». *European Journal of Immunology* 25 (9):2433-37. <https://doi.org/10.1002/eji.1830250904>.
- Chang, W. L. William, Nicole Baumgarth, Dong Yu, et Peter A. Barry. 2004. « Human Cytomegalovirus-Encoded Interleukin-10 Homolog Inhibits Maturation of Dendritic Cells and Alters Their Functionality ». *Journal of Virology* 78 (16):8720-31. <https://doi.org/10.1128/JVI.78.16.8720-8731.2004>.
- Chapman, T. L., A. P. Heikeman, et 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):603-13.
- Chemaly, Roy F., Andrew J. Ullmann, Susanne Stoelben, Marie Paule Richard, Martin Bornhäuser, Christoph Groth, Hermann Einsele, et al. 2014. « Letermovir for Cytomegalovirus Prophylaxis in Hematopoietic-Cell Transplantation ». *The New England Journal of Medicine* 370 (19):1781-89. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1309533>.
- Chen, Dong H., Hong Jiang, Manfred Lee, Fenyong Liu, et Z. Hong Zhou. 1999. « Three-Dimensional Visualization of Tegument/Capsid Interactions in the Intact Human Cytomegalovirus ». *Virology* 260 (1):10-16. <https://doi.org/10.1006/viro.1999.9791>.
- Chierighin, A., L. Gabrielli, C. Zanfi, E. Petrisli, A. Lauro, G. Piccirilli, F. Baccolini, et al. 2010. « Monitoring Cytomegalovirus T-Cell Immunity in Small Bowel/Multivisceral Transplant Recipients ». *Transplantation Proceedings* 42 (1):69-73. <https://doi.org/10.1016/j.transproceed.2009.12.030>.
- Chou, Sunwen, Gail Marousek, et Terry L. Bowlin. 2012. « Cyclopropavir Susceptibility of Cytomegalovirus DNA Polymerase Mutants Selected after Antiviral Drug Exposure ». *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 56 (1):197-201. <https://doi.org/10.1128/AAC.05559-11>.
- Conti, David J., Brian M. Freed, T. Paul Singh, Michael Gallichio, Scott A. Gruber, et Neil Lempert. 1995. « Preemptive Ganciclovir Therapy in Cytomegalovirus-Seropositive Renal Transplants Recipients ». *Archives of Surgery* 130 (11):1217-22. <https://doi.org/10.1001/archsurg.1995.01430110075014>.
- Correale, Jorge, et Andrés Villa. 2008. « Isolation and Characterization of CD8+ Regulatory T Cells in Multiple Sclerosis ». *Journal of Neuroimmunology* 195 (1-2):121-34. <https://doi.org/10.1016/j.jneuroim.2007.12.004>.
- Cosman, David, Neil Fanger, Luis Borges, Marek Kubin, Wilson Chin, Lori Peterson, et Mei-Ling Hsu. 1997. « A Novel Immunoglobulin Superfamily Receptor for Cellular and Viral MHC Class I Molecules ». *Immunity* 7 (2):273-82. [https://doi.org/10.1016/S1074-7613\(00\)80529-4](https://doi.org/10.1016/S1074-7613(00)80529-4).
- Cosman, David, Jürgen Müllberg, Claire L. Sutherland, Wilson Chin, Richard Armitage, William Fanslow, Marek Kubin, et N. Jan 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):123-33. [https://doi.org/10.1016/S1074-7613\(01\)00095-4](https://doi.org/10.1016/S1074-7613(01)00095-4).
- Costa, Cristina, Giovanni Antonio Touscoz, Massimiliano Bergallo, Maria Elena Terlizzi, Sara Astegiano, Francesca Sidoti, Franca Sinesi, Giuseppe P. Segoloni, et Rossana Cavallo. 2010. « Non-Organ-Specific and Anti-Endothelial Antibodies in Relation to CMV Infection and Acute Rejection in Renal Transplant Recipients ». *Clinical Transplantation* 24 (4):488-92. <https://doi.org/10.1111/j.1399-0012.2009.01092.x>.
- Costa-Garcia, Marcel, Andrea Vera, Manuela Moraru, Carlos Vilches, Miguel López-Botet, et Aura Muntasell. 2015. « Antibody-Mediated Response of NKG2Cbright NK Cells against Human Cytomegalovirus ». *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 194 (6):2715-24. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1402281>.

- Coupel, Stéphanie, Anne Moreau, Mohamed Hamidou, Vaclav Horejsi, Jean-Paul Soulillou, et Béatrice Charreau. 2007. « Expression and release of soluble HLA-E is an immunoregulatory feature of endothelial cell activation ». *Blood* 109 (7):2806–2814.
- Coussement, J., D. Steensels, M.-C. Nollevaux, P. Bogaerts, M. Dumonceaux, B. Delaere, et A. Froidure. 2016. « When Polymerase Chain Reaction Does Not Help: Cytomegalovirus Pneumonitis Associated with Very Low or Undetectable Viral Load in Both Blood and Bronchoalveolar Lavage Samples after Lung Transplantation ». *Transplant Infectious Disease* 18 (2):284-87. <https://doi.org/10.1111/tid.12515>.
- Couzi, Lionel, Xavier Lafarge, Vincent Pitard, Martine Neau-Cransac, Claire Dromer, Marc-Alain Billes, Florence Lacaille, Jean-François Moreau, Pierre Merville, et Julie Déchanet-Merville. 2011. « Gamma-Delta T Cell Expansion Is Closely Associated with Cytomegalovirus Infection in All Solid Organ Transplant Recipients ». *Transplant International* 24 (5):e40-42. <https://doi.org/10.1111/j.1432-2277.2010.01181.x>.
- Couzi, Lionel, Vincent Pitard, Sonia Netzer, Isabelle Garrigue, Marie-Edith Lafon, Jean-François Moreau, Jean-Luc Taupin, Pierre Merville, et Julie Déchanet-Merville. 2009. « Common Features of Gammadelta T Cells and CD8(+) Alphabeta T Cells Responding to Human Cytomegalovirus Infection in Kidney Transplant Recipients ». *The Journal of Infectious Diseases* 200 (9):1415-24. <https://doi.org/10.1086/644509>.
- Couzi, Lionel, Vincent Pitard, Xavier Sicard, Isabelle Garrigue, Omar Hawchar, Pierre Merville, Jean-François Moreau, et Julie Déchanet-Merville. 2012. « Antibody-Dependent Anti-Cytomegalovirus Activity of Human $\Gamma\delta$ T Cells Expressing CD16 (Fc γ RIIIa) ». *Blood* 119 (6):1418-27. <https://doi.org/10.1182/blood-2011-06-363655>.
- Crisa, L., M. T. McMaster, J. K. Ishii, S. J. Fisher, et D. R. Salomon. 1997. « Identification of a Thymic Epithelial Cell Subset Sharing Expression of the Class Ib HLA-G Molecule with Fetal Trophoblasts ». *The Journal of Experimental Medicine* 186 (2):289-98.
- Crough, Tania, et Rajiv Khanna. 2009. « Immunobiology of Human Cytomegalovirus: from Bench to Bedside ». *Clinical Microbiology Reviews* 22 (1):76-98. <https://doi.org/10.1128/CMR.00034-08>.
- Cui, Xiaohong, Daniel C. Freed, Dai Wang, Ping Qiu, Fengsheng Li, Tong-Ming Fu, Lawrence M. Kauvar, et Michael A. McVoy. 2017. « Impact of Antibodies and Strain Polymorphisms on Cytomegalovirus Entry and Spread in Fibroblasts and Epithelial Cells ». *Journal of Virology* 91 (13). <https://doi.org/10.1128/JVI.01650-16>.
- Daguzan, Charline, Morgane Moulin, Hanna Kulyk-Barbier, Christian Davrinche, Suzanne Peyrottes, et Eric Champagne. 2016. « Aminobisphosphonates Synergize with Human Cytomegalovirus To Activate the Antiviral Activity of V γ 9V δ 2 Cells ». *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 196 (5):2219-29. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1501661>.
- Danzer, Martin, Helene Polin, Johannes Pröll, Reinhard Haunschmid, Katja Hofer, Stephanie Stabentheiner, Christa Hackl, et al. 2009. « Clinical Significance of HLA-E*0103 Homozygosity on Survival after Allogeneic Hematopoietic Stem-Cell Transplantation ». *Transplantation* 88 (4):528-32. <https://doi.org/10.1097/TP.0b013e3181b0e79e>.
- Davignon, J. L., P. Castanié, J. A. Yorke, N. Gautier, D. Clément, et C. Davrinche. 1996. « Anti-Human Cytomegalovirus Activity of Cytokines Produced by CD4+ T-Cell Clones Specifically Activated by IE1 Peptides in Vitro ». *Journal of Virology* 70 (4):2162-69.
- Davison, Andrew J. 2002. « Evolution of the Herpesviruses ». *Veterinary Microbiology* 86 (1-2):69-88.
- Davison, Andrew J., et David Bhella. 2007. « Comparative Genome and Virion Structure ». In *Human Herpesviruses: Biology, Therapy, and Immunoprophylaxis*, édité par Ann Arvin, Gabriella Campadelli-Fiume, Edward Mocarski, Patrick S. Moore, Bernard Roizman, Richard Whitley, et Koichi Yamanishi. Cambridge: Cambridge University Press. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK47392/>.
- Day, Elizabeth K., Andrew J. Carmichael, Ineke J. M. ten Berge, Edward C. P. Waller, J. G. Patrick Sissons, et Mark R. Wills. 2007. « Rapid CD8+ T Cell Repertoire Focusing and Selection of High-Affinity Clones into Memory Following Primary Infection with a Persistent Human Virus: Human Cytomegalovirus ». *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 179 (5):3203-13.
- Déchanet, J., P. Merville, F. Bergé, G. Bone-Mane, J. L. Taupin, P. Michel, P. Joly, M. Bonneville, L. Potaux, et J. F. Moreau. 1999. « Major Expansion of Gammadelta T Lymphocytes Following Cytomegalovirus Infection in Kidney Allograft Recipients ». *The Journal of Infectious Diseases* 179 (1):1-8. <https://doi.org/10.1086/314568>. (a)
- Déchanet, J., P. Merville, A. Lim, C. Retière, V. Pitard, X. Lafarge, S. Michelson, et al. 1999. « Implication of Gammadelta T Cells in the Human Immune Response to Cytomegalovirus ». *The Journal of Clinical Investigation* 103 (10):1437-49. <https://doi.org/10.1172/JCI5409>. (b)

- Della Chiesa, Mariella, Michela Falco, Alice Bertaina, Letizia Muccio, Claudia Alicata, Francesco Frassoni, Franco Locatelli, Lorenzo Moretta, et Alessandro Moretta. 2014. « Human Cytomegalovirus Infection Promotes Rapid Maturation of NK Cells Expressing Activating Killer Ig-like Receptor in Patients Transplanted with NKG2C-/- Umbilical Cord Blood ». *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 192 (4):1471-79. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1302053>.
- Derre, L., M. Corvaisier, B. Charreau, A. Moreau, E. Godefroy, A. Moreau-Aubry, F. Jotereau, et N. Gervois. 2006. « Expression and Release of HLA-E by Melanoma Cells and Melanocytes: Potential Impact on the Response of Cytotoxic Effector Cells ». *The Journal of Immunology* 177 (5):3100-3107. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.177.5.3100>.
- 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)* 191 (5):2708-16. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1301138>.
- Djaoud, Zakia, Raphaëlle Riou, Pierre-Jean Gavlovsky, Souad Mehlal, Céline Bressollette, Nathalie Gérard, Katia Gagne, Béatrice Charreau, et Christelle Retière. 2016. « Cytomegalovirus-Infected Primary Endothelial Cells Trigger NKG2C+ Natural Killer Cells ». *Journal of Innate Immunity* 8 (4):374-85. <https://doi.org/10.1159/000445320>.
- Dolan, Aidan, Charles Cunningham, Ralph D. Hector, Aycan F. Hassan-Walker, Lydia Lee, Clare Addison, Derrick J. Dargan, et al. 2004. « Genetic Content of Wild-Type Human Cytomegalovirus ». *The Journal of General Virology* 85 (Pt 5):1301-12. <https://doi.org/10.1099/vir.0.79888-0>.
- Dunn, Claire, N. Jan Chalupny, Claire L. Sutherland, Stephanie Dosch, P.V. Sivakumar, David C. Johnson, et 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):1427-39. <https://doi.org/10.1084/jem.20022059>.
- Durand, Christine M., Kieren A. Marr, Christina A. Arnold, Lydia Tang, Daniel J. Durand, Robin K. Avery, Alexandra Valsamakis, et Dionissios Neofytos. 2013. « Detection of Cytomegalovirus DNA in Plasma as an Adjunct Diagnostic for Gastrointestinal Tract Disease in Kidney and Liver Transplant Recipients ». *Clinical Infectious Diseases: An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America* 57 (11):1550-59. <https://doi.org/10.1093/cid/cit521>.
- Dzabic, Mensur, Afsar Rahbar, Koon-Chu Yaiw, Mansour Naghibi, Piotr Religa, Bengt Fellström, Erik Larsson, et Cecilia Söderberg-Nauclér. 2011. « Intra-graft Cytomegalovirus Protein Expression Is Associated with Reduced Renal Allograft Survival ». *Clinical Infectious Diseases: An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America* 53 (10):969-76. <https://doi.org/10.1093/cid/cir619>.
- Egli, A., A. Humar, et D. Kumar. 2012. « State-of-the-Art Monitoring of Cytomegalovirus-Specific Cell-Mediated Immunity After Organ Transplant: A Primer for the Clinician ». *Clinical Infectious Diseases* 55 (12):1678-89. <https://doi.org/10.1093/cid/cis818>.
- Egli, Adrian, Isabelle Binet, Simone Binggeli, Clemens Jäger, Alexis Dumoulin, Stefan Schaub, Juerg Steiger, Urban Sester, Martina Sester, et Hans H. Hirsch. 2008. « Cytomegalovirus-Specific T-Cell Responses and Viral Replication in Kidney Transplant Recipients ». *Journal of Translational Medicine* 6 (juin):29. <https://doi.org/10.1186/1479-5876-6-29>.
- Ehl, Stephan, Klaus Schwarz, Anselm Enders, Ulrich Duffner, Ulrich Pannicke, Joachim Kühr, Françoise Mascart, Annette Schmitt-Graeff, Charlotte Niemeyer, et Paul Fisch. 2005. « A Variant of SCID with Specific Immune Responses and Predominance of Gamma Delta T Cells ». *The Journal of Clinical Investigation* 115 (11):3140-48. <https://doi.org/10.1172/JCI25221>.
- Eid, A. J., S. K. Arthurs, P. J. Deziel, M. P. Wilhelm, et R. R. Razonable. 2010. « Clinical Predictors of Relapse after Treatment of Primary Gastrointestinal Cytomegalovirus Disease in Solid Organ Transplant Recipients ». *American Journal of Transplantation: Official Journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons* 10 (1):157-61. <https://doi.org/10.1111/j.1600-6143.2009.02861.x>.
- Eid, Albert J., Supha K. Arthurs, Paul J. Deziel, Mark P. Wilhelm, et Raymund R. Razonable. 2008. « Emergence of Drug-Resistant Cytomegalovirus in the Era of Valganciclovir Prophylaxis: Therapeutic Implications and Outcomes ». *Clinical Transplantation* 22 (2):162-70. <https://doi.org/10.1111/j.1399-0012.2007.00761.x>.
- Einsele, Hermann, Eddy Roosnek, Nathalie Rufer, Christian Sinzger, Susanne Riegler, Jürgen Löffler, Ulrich Grigoleit, et al. 2002. « Infusion of Cytomegalovirus (CMV)-specific T Cells for the Treatment of CMV Infection Not Responding to Antiviral Chemotherapy ». *Blood* 99 (11):3916-22. <https://doi.org/10.1182/blood.V99.11.3916>.

- Eisen, H. J., J. Kobashigawa, R. C. Starling, D. F. Pauly, A. Kfoury, H. Ross, S.-S. Wang, *et al.* 2013. « Everolimus versus Mycophenolate Mofetil in Heart Transplantation: A Randomized, Multicenter Trial ». *American Journal of Transplantation: Official Journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons* 13 (5):1203-16. <https://doi.org/10.1111/ajt.12181>.
- El Chaer, Firas, Dimpy P. Shah, et Roy F. Chemaly. 2016. « How I Treat Resistant Cytomegalovirus Infection in Hematopoietic Cell Transplantation Recipients ». *Blood* 128 (23):2624-36. <https://doi.org/10.1182/blood-2016-06-688432>.
- Emery, V. C., C. A. Sabin, A. V. Cope, D. Gor, A. F. Hassan-Walker, et P. D. Griffiths. 2000. « Application of Viral-Load Kinetics to Identify Patients Who Develop Cytomegalovirus Disease after Transplantation ». *Lancet (London, England)* 355 (9220):2032-36. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(00\)02350-3](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(00)02350-3).
- Emery, Vincent C., Aycan F. Hassan-Walker, Andrew K. Burroughs, et Paul D. Griffiths. 2002. « Human cytomegalovirus (HCMV) replication dynamics in HCMV-naïve and -experienced immunocompromised hosts ». *The Journal of Infectious Diseases* 185 (12):1723-28. <https://doi.org/10.1086/340653>.
- Fahnestock, M. L., J. L. Johnson, R. M. Feldman, J. M. Neveu, W. S. Lane, et P. J. Bjorkman. 1995. « The MHC Class I Homolog Encoded by Human Cytomegalovirus Binds Endogenous Peptides ». *Immunity* 3 (5):583-90.
- Felício, L. P., I. O. P. Porto, C. T. Mendes-Junior, L. C. Veiga-Castelli, K. E. Santos, R. P. Vianello-Brondani, A. Sabbagh, P. Moreau, E. A. Donadi, et E. C. Castelli. 2014. « Worldwide HLA-E Nucleotide and Haplotype Variability Reveals a Conserved Gene for Coding and 3' Untranslated Regions ». *Tissue Antigens* 83 (2):82-93. <https://doi.org/10.1111/tan.12283>.
- Feuchtinger, Tobias, Kathrin Opherck, Wolfgang A. Bethge, Max S. Topp, Friedhelm R. Schuster, Eva M. Weissinger, Mohamad Mohty, *et al.* 2010. « Adoptive Transfer of Pp65-Specific T Cells for the Treatment of Chemorefractory Cytomegalovirus Disease or Reactivation after Haploidentical and Matched Unrelated Stem Cell Transplantation ». *Blood* 116 (20):4360-67. <https://doi.org/10.1182/blood-2010-01-262089>.
- Fielding, Ceri A., Michael P. Weekes, Luis V. Nobre, Eva Ruckova, Gavin S. Wilkie, Joao A. Paulo, Chiwen Chang, *et al.* 2017. « Control of immune ligands by members of a cytomegalovirus gene expansion suppresses natural killer cell activation ». *Elife* 6:e22206.
- Fink, Annette, Niels A. W. Lemmermann, Dorothea Gillert-Marién, Doris Thomas, Kirsten Freitag, Verena Böhm, Vanessa Wilhelmi, Kurt Reifenberg, Matthias J. Reddehase, et Rafaela Holtappels. 2012. « Antigen Presentation under the Influence of "immune Evasion" Proteins and Its Modulation by Interferon-Gamma: Implications for Immunotherapy of Cytomegalovirus Infection with Antiviral CD8 T Cells ». *Medical Microbiology and Immunology* 201 (4):513-25. <https://doi.org/10.1007/s00430-012-0256-z>.
- Finlen Copeland, C. Ashley, W. Austin Davis, Laurie D. Snyder, Missy Banks, Robin Avery, R. Duane Davis, et Scott M. Palmer. 2011. « Long-Term Efficacy and Safety of 12 Months of Valganciclovir Prophylaxis Compared with 3 Months after Lung Transplantation: A Single-Center, Long-Term Follow-up Analysis from a Randomized, Controlled Cytomegalovirus Prevention Trial ». *The Journal of Heart and Lung Transplantation: The Official Publication of the International Society for Heart Transplantation* 30 (9):990-96. <https://doi.org/10.1016/j.healun.2011.02.017>.
- Fish, Kenneth N., Cecilia Soderberg-Naucler, Lisa K. Mills, Stephan Stenglein, et Jay A. Nelson. 1998. « Human Cytomegalovirus Persistently Infects Aortic Endothelial Cells ». *Journal of Virology* 72 (7):5661-68.
- Foley, Bree, Sarah Cooley, Michael R. Verneris, Julie Curtsinger, Xianghua Luo, Edmund K. Waller, Claudio Anasetti, Daniel Weisdorf, et 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 ». *The Journal of Immunology* 189 (10):5082-88. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1201964>. (a)
- Foley, Bree, Sarah Cooley, Michael R. Verneris, Michelle Pitt, Julie Curtsinger, Xianghua Luo, Sandra Lopez-Vergès, Lewis L. Lanier, Daniel Weisdorf, et 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):2665-74. <https://doi.org/10.1182/blood-2011-10-386995>. (b)
- Fornara, Chiara, Daniele Lilleri, M. Grazia Revello, Milena Furione, Maurizio Zavattoni, Elisa Lenta, et Giuseppe Gerna. 2011. « Kinetics of Effector Functions and Phenotype of Virus-Specific and $\gamma\delta$ T Lymphocytes in Primary Human Cytomegalovirus Infection during Pregnancy ». *Journal of Clinical Immunology* 31 (6):1054-64. <https://doi.org/10.1007/s10875-011-9577-8>.
- Fouts, Ashley E., Pamela Chan, Jean-Philippe Stephan, Richard Vandlen, et Becket Feierbach. 2012. « Antibodies against the gH/gL/UL128/UL130/UL131 Complex Comprise the Majority of the Anti-Cytomegalovirus (Anti-CMV) Neutralizing Antibody Response in CMV Hyperimmune Globulin ». *Journal of Virology* 86 (13):7444-47. <https://doi.org/10.1128/JVI.00467-12>.

- Freed, Daniel C., Qi Tang, Aimin Tang, Fengsheng Li, Xi He, Zhao Huang, Weixu Meng, *et al.* 2013. « Pentameric Complex of Viral Glycoprotein H Is the Primary Target for Potent Neutralization by a Human Cytomegalovirus Vaccine ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 110 (51):E4997-5005. <https://doi.org/10.1073/pnas.1316517110>.
- Fresnay, Stephanie, Monica A. McArthur, Laurence Magder, Thomas C. Darton, Claire Jones, Claire S. Waddington, Christoph J. Blohmke, *et al.* 2016. « Salmonella Typhi-specific multifunctional CD8+ T cells play a dominant role in protection from typhoid fever in humans ». *Journal of Translational Medicine* 14 (mars). <https://doi.org/10.1186/s12967-016-0819-7>.
- Fryer, Jacqueline F., Alan B. Heath, Philip D. Minor, et Collaborative Study Group. 2016. « A Collaborative Study to Establish the 1st WHO International Standard for Human Cytomegalovirus for Nucleic Acid Amplification Technology ». *Biologicals: Journal of the International Association of Biological Standardization* 44 (4):242-51. <https://doi.org/10.1016/j.biologicals.2016.04.005>.
- Furman, Margo H., Neelendu Dey, Domenico Tortorella, et Hidde L. Ploegh. 2002. « The Human Cytomegalovirus US10 Gene Product Delays Trafficking of Major Histocompatibility Complex Class I Molecules ». *Journal of Virology* 76 (22):11753-56.
- Furukawa, H., T. Yabe, T. Akaza, K. Tadokoro, S. Tohma, T. Inoue, K. Tokunaga, K. Yamamoto, D. E. Geraghty, et T. Juji. 1999. « Cell Surface Expression of HLA-E Molecules on PBMC from a TAP1-Deficient Patient ». *Tissue Antigens* 53 (3):292-95.
- Gamadia, Laila E., Ester B. M. Remmerswaal, Jan F. Weel, Frederieke Bemelman, René A. W. van Lier, et Ineke J. M. Ten Berge. 2003. « Primary Immune Responses to Human CMV: A Critical Role for IFN-Gamma-Producing CD4+ T Cells in Protection against CMV Disease ». *Blood* 101 (7):2686-92. <https://doi.org/10.1182/blood-2002-08-2502>.
- Gamadia, Laila E., Ester B. Remmerswaal, Sugianto Surachno, Neubury M. Lardy, Pauline M. Wertheim-van Dillen, René A. W. van Lier, et Ineke J. M. ten Berge. 2004. « CROSS-REACTIVITY OF CYTOMEGALOVIRUS-SPECIFIC CD8+ T CELLS TO ALLO-MAJOR HISTOCOMPATIBILITY COMPLEX CLASS I MOLECULES ». *Transplantation* 77 (12):1879. <https://doi.org/10.1097/01.TP.0000131158.81346.64>.
- Gamadia, Laila E., Rob J. Rentenaar, Paul A. Baars, Ester B. M. Remmerswaal, Sugianto Surachno, Jan F. L. Weel, Mireille Toebes, Ton N. M. Schumacher, Ineke J. M. ten Berge, et René A. W. van Lier. 2001. « Differentiation of Cytomegalovirus-Specific CD8+ T Cells in Healthy and Immunosuppressed Virus Carriers ». *Blood* 98 (3):754-61. <https://doi.org/10.1182/blood.V98.3.754>.
- Gao, G. F., B. E. Willcox, J. R. Wyer, J. M. Boulter, C. A. O'Callaghan, K. Maenaka, D. I. Stuart, *et al.* 2000. « Classical and Nonclassical Class I Major Histocompatibility Complex Molecules Exhibit Subtle Conformational Differences That Affect Binding to CD8alphaalpha ». *The Journal of Biological Chemistry* 275 (20):15232-38.
- García, Pilar, Manuel Llano, Agustín B. de Heredia, Christian B. Willberg, Esther Caparrós, Pedro Aparicio, Véronique M. Braud, et Miguel López-Botet. 2002. « Human T Cell Receptor-Mediated Recognition of HLA-E ». *European Journal of Immunology* 32 (4):936-44. [https://doi.org/10.1002/1521-4141\(200204\)32:4<#60;936::AID-IMMU936>3.0.CO;2-M](https://doi.org/10.1002/1521-4141(200204)32:4<#60;936::AID-IMMU936>3.0.CO;2-M).
- Garrigue, Isabelle, Muriel Faure-Della Corte, Noël Magnin, Lionel Couzi, Sophie Capdepon, Catherine Rio, Pierre Merville, Julie Dechanet-Merville, Hervé Fleury, et Marie-Edith Lafon. 2007. « Variability of UL18, UL40, UL111a and US3 Immunomodulatory Genes among Human Cytomegalovirus Clinical Isolates from Renal Transplant Recipients ». *Journal of Clinical Virology* 40 (2):120-28. <https://doi.org/10.1016/j.jcv.2007.06.015>.
- Garrigue, Isabelle, Muriel Faure-Della Corte, Noël Magnin, Patricia Recordon-Pinson, Lionel Couzi, Marie-Elise Lebrette, Marie-Hélène Schrive, *et al.* 2008. « UL40 Human Cytomegalovirus Variability Evolution Patterns Over Time in Renal Transplant Recipients ». *Transplantation* 86 (6):826-35. <https://doi.org/10.1097/TP.0b013e3181859edd>.
- Genini, Emilia, Elena Percivalle, Antonella Sarasini, M. Grazia Revello, Fausto Baldanti, et Giuseppe Gerna. 2011. « Serum Antibody Response to the GH/GL/PUL128-131 Five-Protein Complex of Human Cytomegalovirus (HCMV) in Primary and Reactivated HCMV Infections ». *Journal of Clinical Virology: The Official Publication of the Pan American Society for Clinical Virology* 52 (2):113-18. <https://doi.org/10.1016/j.jcv.2011.06.018>.
- Gerna, G., D. Lilleri, C. Fornara, G. Comolli, L. Lozza, C. Campana, C. Pellegrini, F. Meloni, et T. Rampino. 2006. « Monitoring of Human Cytomegalovirus-Specific CD4 and CD8 T-Cell Immunity in Patients Receiving Solid Organ Transplantation ». *American Journal of Transplantation: Official Journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons* 6 (10):2356-64. <https://doi.org/10.1111/j.1600-6143.2006.01488.x>.

- Gerna, Giuseppe, Daniele Lilleri, Chiara Fornara, Francesca Bruno, Elisa Gabanti, Ilaria Cane, Milena Furione, et M. Grazia Revello. 2015. « Differential Kinetics of Human Cytomegalovirus Load and Antibody Responses in Primary Infection of the Immunocompetent and Immunocompromised Host ». *The Journal of General Virology* 96 (Pt 2):360-69. <https://doi.org/10.1099/vir.0.070441-0>.
- Gerna, Giuseppe, Antonella Sarasini, Marco Patrone, Elena Percivalle, Loretta Fiorina, Giulia Campanini, Andrea Gallina, Fausto Baldanti, et M. Grazia Revello. 2008. « Human Cytomegalovirus Serum Neutralizing Antibodies Block Virus Infection of Endothelial/Epithelial Cells, but Not Fibroblasts, Early during Primary Infection ». *The Journal of General Virology* 89 (Pt 4):853-65. <https://doi.org/10.1099/vir.0.83523-0>.
- Gewurz, B. E., E. W. Wang, D. Tortorella, D. J. Schust, et H. L. Ploegh. 2001. « Human Cytomegalovirus US2 Endoplasmic Reticulum-Lumenal Domain Dictates Association with Major Histocompatibility Complex Class I in a Locus-Specific Manner ». *Journal of Virology* 75 (11):5197-5204. <https://doi.org/10.1128/JVI.75.11.5197-5204.2001>.
- Gibson, Laura, Giampiero Piccinini, Daniele Lilleri, Maria Grazia Revello, Zhongde Wang, Susan F. Markel, Don Diamond, et Katherine Luzuriaga. 2004. *Human Cytomegalovirus Proteins pp65 and Immediate Early Protein 1 Are Common Targets for CD8+ T Cell Responses in Children with Congenital or Postnatal Human Cytomegalovirus Infection*. Vol. 172. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.172.4.2256>.
- Gilbert, M. J., S. R. Riddell, C. R. Li, et P. D. Greenberg. 1993. « Selective Interference with Class I Major Histocompatibility Complex Presentation of the Major Immediate-Early Protein Following Infection with Human Cytomegalovirus ». *Journal of Virology* 67 (6):3461-69.
- Gilbert, M. J., S. R. Riddell, B. Plachter, et P. D. Greenberg. 1996. « Cytomegalovirus Selectively Blocks Antigen Processing and Presentation of Its Immediate-Early Gene Product ». *Nature* 383 (6602):720-22. <https://doi.org/10.1038/383720a0>.
- Goldner, Thomas, Guy Hewlett, Nicole Ettischer, Helga Ruebsamen-Schaeff, Holger Zimmermann, et Peter Lischka. 2011. « The Novel Anticytomegalovirus Compound AIC246 (Letermovir) Inhibits Human Cytomegalovirus Replication through a Specific Antiviral Mechanism That Involves the Viral Terminase ». *Journal of Virology* 85 (20):10884-93. <https://doi.org/10.1128/JVI.05265-11>.
- Gordon, Claire L., Michelle Miron, Joseph J. C. Thome, Nobuhide Matsuoka, Joshua Weiner, Michael A. Rak, Suzu Igarashi, et al. 2017. « Tissue Reservoirs of Antiviral T Cell Immunity in Persistent Human CMV Infection ». *Journal of Experimental Medicine*, janvier, jem.20160758. <https://doi.org/10.1084/jem.20160758>.
- Grattan, Mark T., Carlos E. Moreno-Cabral, Vaughn A. Starnes, Phillip E. Oyer, Edward B. Stinson, et Norman E. Shumway. 1989. « Cytomegalovirus Infection Is Associated With Cardiac Allograft Rejection and Atherosclerosis ». *JAMA* 261 (24):3561-66. <https://doi.org/10.1001/jama.1989.03420240075030>.
- Grey, Finn, Andy Antoniewicz, Edwards Allen, Julie Saugstad, Andy McShea, James C. Carrington, et Jay Nelson. 2005. « Identification and Characterization of Human Cytomegalovirus-Encoded MicroRNAs ». *Journal of Virology* 79 (18):12095-99. <https://doi.org/10.1128/JVI.79.18.12095-12099.2005>.
- Griffin, Cora, Eddie C. Y. Wang, Brian P. McSharry, Carole Rickards, Helena Browne, Gavin W. G. Wilkinson, et Peter Tomasec. 2005. « Characterization of a highly glycosylated form of the human cytomegalovirus HLA class I homologue gpUL18 ». *The Journal of general virology* 86 (Pt 11):2999-3008. <https://doi.org/10.1099/vir.0.81126-0>.
- Griffiths, Paul D., Anna Stanton, Erin McCarrell, Colette Smith, Mohamed Osman, Mark Harber, Andrew Davenport, et al. 2011. « Cytomegalovirus Glycoprotein-B Vaccine with MF59 Adjuvant in Transplant Recipients: A Phase 2 Randomised Placebo-Controlled Trial ». *Lancet (London, England)* 377 (9773):1256-63. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(11\)60136-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(11)60136-0).
- Grimsley, C., A. Kawasaki, C. Gassner, N. Sageshima, Y. Nose, K. Hatake, D. E. Geraghty, et A. Ishitani. 2002. « Definitive High Resolution Typing of HLA-E Allelic Polymorphisms: Identifying Potential Errors in Existing Allele Data ». *Tissue Antigens* 60 (3):206-12.
- Grimsley, C., et C. Ober. 1997. « Population Genetic Studies of HLA-E: Evidence for Selection ». *Human Immunology* 52 (1):33-40. [https://doi.org/10.1016/S0198-8859\(96\)00241-8](https://doi.org/10.1016/S0198-8859(96)00241-8).
- Grotzke, Jeff E., Melanie J. Harriff, Anne C. Siler, Dawn Nolt, Jacob Delepine, Deborah A. Lewinsohn, et David M. Lewinsohn. 2009. « The Mycobacterium Tuberculosis Phagosome Is a HLA-I Processing Competent Organelle ». Édité par JoAnne L. Flynn. *PLoS Pathogens* 5 (4):e1000374. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000374>.

- Grünewald, Kay, Prashant Desai, Dennis C. Winkler, J. Bernard Heymann, David M. Belnap, Wolfgang Baumeister, et Alasdair C. Steven. 2003. « Three-Dimensional Structure of Herpes Simplex Virus from Cryo-Electron Tomography ». *Science* 302 (5649):1396-98. <https://doi.org/10.1126/science.1090284>.
- Guetta, E., E. M. Scarpato, et P. E. DiCorleto. 2001. « Effect of Cytomegalovirus Immediate Early Gene Products on Endothelial Cell Gene Activity ». *Cardiovascular Research* 50 (3):538-46.
- Gumá, Mónica, Ana Angulo, Carlos Vilches, Natalia Gómez-Lozano, Núria Malats, et Miguel López-Botet. 2004. « Imprint of Human Cytomegalovirus Infection on the NK Cell Receptor Repertoire ». *Blood* 104 (12):3664-71. <https://doi.org/10.1182/blood-2004-05-2058>.
- Gumá, Mónica, Matthias Budt, Andrea Sáez, Tamara Brckalo, Hartmut Hengel, Ana Angulo, et Miguel López-Botet. 2006. « Expansion of CD94/NKG2C+ NK Cells in Response to Human Cytomegalovirus-Infected Fibroblasts ». *Blood* 107 (9):3624-31. <https://doi.org/10.1182/blood-2005-09-3682>.
- Hahn, Gabriele, Maria Grazia Revello, Marco Patrone, Elena Percivalle, Giulia Campanini, Antonella Sarasini, Markus Wagner, et al. 2004. « Human Cytomegalovirus UL131-128 Genes Are Indispensable for Virus Growth in Endothelial Cells and Virus Transfer to Leukocytes ». *Journal of Virology* 78 (18):10023-33. <https://doi.org/10.1128/JVI.78.18.10023-10033.2004>.
- Halary, Franck, Vincent Pitard, Dorota Dlubek, Roman Krzysiek, Henri de la Salle, Pierre Merville, Claire Dromer, Dominique Emilie, Jean-François Moreau, et Julie Déchanet-Merville. 2005. « Shared Reactivity of V δ 2(Neg) $\gamma\delta$ T Cells against Cytomegalovirus-Infected Cells and Tumor Intestinal Epithelial Cells ». *The Journal of Experimental Medicine* 201 (10):1567-78. <https://doi.org/10.1084/jem.20041851>.
- Hansen, S. G., H. L. Wu, B. J. Burwitz, C. M. Hughes, K. B. Hammond, A. B. Ventura, J. S. Reed, et al. 2016. « Broadly Targeted CD8+ T Cell Responses Restricted by Major Histocompatibility Complex E ». *Science* 351 (6274):714-20. <https://doi.org/10.1126/science.aac9475>.
- Hansen, Scott G., Colin J. Powers, Rebecca Richards, Abigail B. Ventura, Julia C. Ford, Don Siess, Michael K. Axthelm, et al. 2010. « Evasion of CD8+ T Cells Is Critical for Superinfection by Cytomegalovirus ». *Science* 328 (5974):102-6. <https://doi.org/10.1126/science.1185350>.
- Hargett, Danna, et Thomas E. Shenk. 2010. « Experimental Human Cytomegalovirus Latency in CD14+ Monocytes ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107 (46):20039-44. <https://doi.org/10.1073/pnas.1014509107>.
- Harriff, Melanie J., Lisa M. Wolfe, Gwendolyn Swarbrick, Megan Null, Meghan E. Cansler, Elizabeth T. Canfield, Todd Vogt, et al. 2017. « HLA-E Presents Glycopeptides from the Mycobacterium Tuberculosis Protein MPT32 to Human CD8 + T Cells ». *Scientific Reports* 7 (1):4622. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-04894-0>.
- Hassan-Walker, A. F., A. V. Cope, P. D. Griffiths, et V. C. Emery. 1998. « Transcription of the Human Cytomegalovirus Natural Killer Decoy Gene, UL18, in Vitro and in Vivo ». *The Journal of General Virology* 79 (Pt 9) (septembre):2113-16. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-79-9-2113>.
- Hayden, R. T., X. Yan, M. T. Wick, A. B. Rodriguez, X. Xiong, C. C. Ginocchio, M. J. Mitchell, A. M. Caliendo, et College of American Pathologists Microbiology Resource Committee. 2012. « Factors Contributing to Variability of Quantitative Viral PCR Results in Proficiency Testing Samples: A Multivariate Analysis ». *Journal of Clinical Microbiology* 50 (2):337-45. <https://doi.org/10.1128/JCM.01287-11>.
- Heatley, S. L., G. Pietra, J. Lin, J. M. L. Widjaja, C. M. Harpur, S. Lester, J. Rossjohn, et al. 2013. « Polymorphism in Human Cytomegalovirus UL40 Impacts on Recognition of Human Leukocyte Antigen-E (HLA-E) by Natural Killer Cells ». *Journal of Biological Chemistry* 288 (12):8679-90. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.409672>.
- Heinrichs, H., et H. T. Orr. 1990. « HLA Non-A,B,C Class I Genes: Their Structure and Expression ». *Immunologic Research* 9 (4):265-74.
- Heinzel, Amy S., Jeff E. Grotzke, Rebecca A. Lines, Deborah A. Lewinsohn, Andria L. McNabb, Daniel N. Streblov, Veronique M. Braud, Heather J. Grieser, John T. Belisle, et David M. Lewinsohn. 2002. « HLA-E-Dependent Presentation of Mtb-Derived Antigen to Human CD8+ T Cells ». *The Journal of Experimental Medicine* 196 (11):1473-81.
- Hengel, H., J. O. Koopmann, T. Flohr, W. Muranyi, E. Goulmy, G. J. Hämmerling, U. H. Koszinowski, et F. Momburg. 1997. « A Viral ER-Resident Glycoprotein Inactivates the MHC-Encoded Peptide Transporter ». *Immunity* 6 (5):623-32.
- Hertoghs, Kirsten M.L., Perry D. Moerland, Amber van Stijn, Ester B.M. Remmerswaal, Sila L. Yong, Pablo J.E.J. van de Berg, S. Marieke van Ham, Frank Baas, Ineke J.M. ten Berge, et René A.W. van Lier. 2010. « Molecular

profiling of cytomegalovirus-induced human CD8+ T cell differentiation ». *The Journal of Clinical Investigation* 120 (11):4077-90. <https://doi.org/10.1172/JCI42758>.

- Heutinck, K. M., S. L. Yong, L. Tonneijck, H. van den Heuvel, N. C. van der Weerd, K. a. M. I. van der Pant, F. J. Bemelman, F. H. J. Claas, et I. J. M. Ten Berge. 2016. « Virus-Specific CD8(+) T Cells Cross-Reactive to Donor-Alloantigen Are Transiently Present in the Circulation of Kidney Transplant Recipients Infected With CMV and/or EBV ». *American Journal of Transplantation: Official Journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons* 16 (5):1480-91. <https://doi.org/10.1111/ajt.13618>.
- Hewitt, Eric W., Soma Sen Gupta, et Paul J. Lehner. 2001. « The human cytomegalovirus gene product US6 inhibits ATP binding by TAP ». *The EMBO Journal* 20 (3):387-96. <https://doi.org/10.1093/emboj/20.3.387>.
- Hibberd, P. L., N. E. Tolkoff-Rubin, D. Conti, F. Stuart, J. R. Thistlethwaite, J. F. Neylan, D. R. Snydman, R. Freeman, M. I. Lorber, et R. H. Rubin. 1995. « Preemptive Ganciclovir Therapy to Prevent Cytomegalovirus Disease in Cytomegalovirus Antibody-Positive Renal Transplant Recipients. A Randomized Controlled Trial ». *Annals of Internal Medicine* 123 (1):18-26.
- Hidalgo, L. G., B. Sis, J. Sellares, P. M. Campbell, M. Mengel, G. Einecke, J. Chang, et P. F. Halloran. 2010. « NK Cell Transcripts and NK Cells in Kidney Biopsies from Patients with Donor-Specific Antibodies: Evidence for NK Cell Involvement in Antibody-Mediated Rejection ». *American Journal of Transplantation: Official Journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons* 10 (8):1812-22. <https://doi.org/10.1111/j.1600-6143.2010.03201.x>.
- Hoare, Hilary L., Lucy C. Sullivan, Craig S. Clements, Lauren K. Ely, Travis Beddoe, Kate N. Henderson, Jie Lin, Hugh H. Reid, Andrew G. Brooks, et Jamie Rossjohn. 2008. « Subtle Changes in Peptide Conformation Profoundly Affect Recognition of the Non-Classical MHC Class I Molecule HLA-E by the CD94-NGG2 Natural Killer Cell Receptors ». *Journal of Molecular Biology* 377 (5):1297-1303. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2008.01.098>.
- Hoare, Hilary L., Lucy C. Sullivan, Gabriella Pietra, Craig S. Clements, Eleanor J. Lee, Lauren K. Ely, Travis Beddoe, et al. 2006. « Structural Basis for a Major Histocompatibility Complex Class Ib-Restricted T Cell Response ». *Nature Immunology* 7 (3):256-64. <https://doi.org/10.1038/ni1312>.
- Hofmann, Irmgard, Yingxia Wen, Claudio Ciferri, Axel Schulze, Viola Fühner, Megan Leong, Andrea Gerber, et al. 2015. « Expression of the Human Cytomegalovirus Pentamer Complex for Vaccine Use in a CHO System ». *Biotechnology and Bioengineering* 112 (12):2505-15. <https://doi.org/10.1002/bit.25670>.
- Holmes-Liew, Chien-Li, Mark Holmes, Leone Beagley, Peter Hopkins, Daniel Chambers, Corey Smith, et Rajiv Khanna. 2015. « Adoptive T-Cell Immunotherapy for Ganciclovir-Resistant CMV Disease after Lung Transplantation ». *Clinical & Translational Immunology* 4 (3):e35. <https://doi.org/10.1038/cti.2015.5>.
- Hsu, Jye-Lin, Dick J. H. van den Boemen, Peter Tomasec, Michael P. Weekes, Robin Antrobus, Richard J. Stanton, Eva Ruckova, et al. 2015. « Plasma Membrane Profiling Defines an Expanded Class of Cell Surface Proteins Selectively Targeted for Degradation by HCMV US2 in Cooperation with UL141 ». *PLOS Pathogens* 11 (4):e1004811. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1004811>.
- Humar, A., D. Gregson, A. M. Caliendo, A. McGeer, G. Malkan, M. Krajden, P. Corey, et al. 1999. « Clinical Utility of Quantitative Cytomegalovirus Viral Load Determination for Predicting Cytomegalovirus Disease in Liver Transplant Recipients ». *Transplantation* 68 (9):1305-11.
- Humar, A., Y. Lebranchu, F. Vincenti, E. A. Blumberg, J. D. Punch, A. P. Limaye, D. Abramowicz, et al. 2010. « The Efficacy and Safety of 200 Days Valganciclovir Cytomegalovirus Prophylaxis in High-Risk Kidney Transplant Recipients ». *American Journal of Transplantation: Official Journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons* 10 (5):1228-37. <https://doi.org/10.1111/j.1600-6143.2010.03074.x>. (a)
- Humar, Atul, Deepali Kumar, Guy Boivin, et Angela M. Caliendo. 2002. « Cytomegalovirus (CMV) Virus Load Kinetics to Predict Recurrent Disease in Solid-Organ Transplant Patients with CMV Disease ». *The Journal of Infectious Diseases* 186 (6):829-33. <https://doi.org/10.1086/342601>.
- Humar, Atul, Ajit P. Limaye, Emily A. Blumberg, Ingeborg A. Hauser, Flavio Vincenti, Alan G. Jardine, Daniel Abramowicz, Jane A. L. Ives, Mahdi Farhan, et Patrick Peeters. 2010. « Extended Valganciclovir Prophylaxis in D+/R- Kidney Transplant Recipients Is Associated with Long-Term Reduction in Cytomegalovirus Disease: Two-Year Results of the IMPACT Study ». *Transplantation* 90 (12):1427-31. (b)
- Humar, Atul, Tony Mazzulli, George Moussa, Raymund R. Razonable, Carlos V. Paya, Mark D. Pescovitz, Emma Covington, Emma Alecock, et Valganciclovir Solid Organ Transplant Study Group. 2005. « Clinical Utility of Cytomegalovirus (CMV) Serology Testing in High-Risk CMV D+/R- Transplant Recipients ». *American Journal*

- Iancu, Emanuela M., Patricia Corthesy, Petra Baumgaertner, Estelle Devevre, Verena Voelter, Pedro Romero, Daniel E. Speiser, et Nathalie Rufer. 2009. « Clonotype Selection and Composition of Human CD8 T Cells Specific for Persistent Herpes Viruses Varies with Differentiation but Is Stable over Time ». *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 183 (1):319-31. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.0803647>.
- Ibegbu, Chris C., Yong-Xian Xu, Wayne Harris, David Maggio, Joseph D. Miller, et Athena P. Kourtis. 2005. « Expression of Killer Cell Lectin-Like Receptor G1 on Antigen-Specific Human CD8+ T Lymphocytes during Active, Latent, and Resolved Infection and Its Relation with CD57 ». *The Journal of Immunology* 174 (10):6088-94. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.174.10.6088>.
- Ishida, Julie H., Tracy Burgess, Michael A. Derby, Pearline A. Brown, Mauricio Maia, Rong Deng, Brinda Emu, et al. 2015. « Phase 1 Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Study of RG7667, an Anticytomegalovirus Combination Monoclonal Antibody Therapy, in Healthy Adults ». *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 59 (8):4919-29. <https://doi.org/10.1128/AAC.00523-15>.
- Ishida, Julie H., Anita Patel, Aneesh K. Mehta, Philippe Gatault, Jacqueline M. McBride, Tracy Burgess, Michael A. Derby, et al. 2017. « Phase 2 Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Trial of RG7667, a Combination Monoclonal Antibody, for Prevention of Cytomegalovirus Infection in High-Risk Kidney Transplant Recipients ». *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 61 (2):e01794-16. <https://doi.org/10.1128/AAC.01794-16>.
- Iversen, Ann-Charlotte, Paula S. Norris, Carl F. Ware, et Chris A. Benedict. 2005. « Human NK Cells Inhibit Cytomegalovirus Replication through a Noncytolytic Mechanism Involving Lymphotoxin-Dependent Induction of IFN-Beta ». *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 175 (11):7568-74.
- Jackson, S. E., G. M. Mason, G. Okecha, J. G. P. Sissons, et M. R. Wills. 2014. « Diverse Specificities, Phenotypes, and Antiviral Activities of Cytomegalovirus-Specific CD8+ T Cells ». *Journal of Virology* 88 (18):10894-908. <https://doi.org/10.1128/JVI.01477-14>.
- Jackson, Sarah E., George X. Sedikides, Gavin M. Mason, Georgina Okecha, et Mark R. Wills. 2017. « Human Cytomegalovirus (HCMV)-Specific CD4(+) T Cells Are Polyfunctional and Can Respond to HCMV-Infected Dendritic Cells In Vitro ». *Journal of Virology* 91 (6). <https://doi.org/10.1128/JVI.02128-16>.
- Jacob, Christian L., Louie Lamorte, Eliud Sepulveda, Ivo C. Lorenz, Annick Gauthier, et Michael Franti. 2013. « Neutralizing antibodies are unable to inhibit direct viral cell-to-cell spread of human cytomegalovirus ». *Virology* 444 (1):140-47. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2013.06.002>.
- Jiang, H., S. Curran, E. Ruiz-Vazquez, B. Liang, R. Winchester, et L. Chess. 2003. « Regulatory CD8+ T cells fine-tune the myelin basic protein-reactive T cell receptor V β repertoire during experimental autoimmune encephalomyelitis ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100 (14):8378-83. <https://doi.org/10.1073/pnas.1432871100>.
- Jiang, Hong, Steve M. Canfield, Mary P. Gallagher, Hong H. Jiang, Yihua Jiang, Zongyu Zheng, et Leonard Chess. 2010. « HLA-E-restricted Regulatory CD8+ T Cells Are Involved in Development and Control of Human Autoimmune Type 1 Diabetes ». *Journal of Clinical Investigation* 120 (10):3641-50. <https://doi.org/10.1172/JCI43522>.
- Jones, Brandi C., Naomi J. Logsdon, Kristopher Josephson, Jennifer Cook, Peter A. Barry, et Mark R. Walter. 2002. « Crystal Structure of Human Cytomegalovirus IL-10 Bound to Soluble Human IL-10R1 ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99 (14):9404-9. <https://doi.org/10.1073/pnas.152147499>.
- Jones, T. R., L. K. Hanson, L. Sun, J. S. Slater, R. M. Stenberg, et A. E. Campbell. 1995. « Multiple Independent Loci within the Human Cytomegalovirus Unique Short Region Down-Regulate Expression of Major Histocompatibility Complex Class I Heavy Chains ». *Journal of Virology* 69 (8):4830-41.
- Jones, T. R., et L. Sun. 1997. « Human Cytomegalovirus US2 Destabilizes Major Histocompatibility Complex Class I Heavy Chains. » *Journal of Virology* 71 (4):2970-79.
- Jones, T R, E J Wiertz, L Sun, K N Fish, J A Nelson, et 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):11327-33.
- Joosten, Simone A., Krista E. van Meijgaarden, Pascale C. van Weeren, Fatima Kazi, Annemieke Geluk, Nigel D. L. Savage, Jan W. Drijfhout, et al. 2010. « Mycobacterium Tuberculosis Peptides Presented by HLA-E Molecules Are Targets for Human CD8+ T-Cells with Cytotoxic as Well as Regulatory Activity ». Édité par William Bishai. *PLoS Pathogens* 6 (2):e1000782. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000782>.

- Jørgensen, Pernille B., Astrid H. Livbjerg, Hans J. Hansen, Thor Petersen, et Per Höllsberg. 2012. « Epstein-Barr Virus Peptide Presented by HLA-E Is Predominantly Recognized by CD8bright Cells in Multiple Sclerosis Patients ». Édité par Steven Jacobson. *PLoS ONE* 7 (9):e46120. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0046120>.
- Kaiser, Brett, Fariba Barahmand-Pour, Wendy Paulsene, Scott Medley, Daniel E Geraghty, et Roland Strong. 2005. *Interactions between NKG2x Immunoreceptors and HLA-E Ligands Display Overlapping Affinities and Thermodynamics*. Vol. 174. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.174.5.2878>.
- Kaiser, Brett K., Juan Carlos Pizarro, Julie Kerns, et Roland K. Strong. 2008. « Structural Basis for NKG2A/CD94 Recognition of HLA-E ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105 (18):6696-6701. <https://doi.org/10.1073/pnas.0802736105>.
- Kalejta, Robert F. 2008. « Tegument Proteins of Human Cytomegalovirus ». *Microbiology and Molecular Biology Reviews: MMBR* 72 (2):249-65. <https://doi.org/10.1128/MMBR.00040-07>.
- Kalil, Andre C., Josh Levitsky, Elizabeth Lyden, Julie Stoner, et Alison G. Freifeld. 2005. « Meta-Analysis: The Efficacy of Strategies to Prevent Organ Disease by Cytomegalovirus in Solid Organ Transplant Recipients ». *Annals of Internal Medicine* 143 (12):870-80.
- Kambayashi, Taku, Jennifer R. Kraft-Leavy, Joseph G. Dauner, Barbara A. Sullivan, Oskar Laur, et Peter E. Jensen. 2004. « The Nonclassical MHC Class I Molecule Qa-1 Forms Unstable Peptide Complexes ». *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 172 (3):1661-69.
- Kaminski, H., et J. A. Fishman. 2016. « The Cell Biology of Cytomegalovirus: Implications for Transplantation ». *American Journal of Transplantation* 16 (8):2254-69. <https://doi.org/10.1111/ajt.13791>.
- Kaminski, Hannah, Lionel Couzi, Julie Déchanet-Merville, et Pierre Merville. 2015. « Intérêt de l'immuno-surveillance dans l'infection à cytomégalovirus en transplantation rénale : mise au point et perspectives ». *Néphrologie & Thérapeutique* 11 (6):465-73. <https://doi.org/10.1016/j.nephro.2015.03.005>.
- Kaminski, Hannah, Isabelle Garrigue, Lionel Couzi, Benjamin Taton, Thomas Bachelet, Jean-François Moreau, Julie Déchanet-Merville, Rodolphe Thiébaud, et Pierre Merville. 2016. « Surveillance of $\Gamma\delta$ T Cells Predicts Cytomegalovirus Infection Resolution in Kidney Transplants ». *Journal of the American Society of Nephrology* 27 (2):637-45. <https://doi.org/10.1681/ASN.2014100985>.
- Kaul, D. R., S. Stoelben, E. Cober, T. Ojo, E. Sandusky, P. Lischka, H. Zimmermann, et H. Rubsamen-Schaeff. 2011. « First Report of Successful Treatment of Multidrug-Resistant Cytomegalovirus Disease with the Novel Anti-CMV Compound AIC246 ». *American Journal of Transplantation: Official Journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons* 11 (5):1079-84. <https://doi.org/10.1111/j.1600-6143.2011.03530.x>.
- Khairallah, Camille, Julie Déchanet-Merville, et Myriam Capone. 2017. « $\gamma\delta$ T Cell-Mediated Immunity to Cytomegalovirus Infection ». *Frontiers in Immunology* 8 (février). <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.00105>.
- Kharfan-Dabaja, Mohamed A., Michael Boeckh, Marissa B. Wilck, Amelia A. Langston, Alice H. Chu, Mary K. Wloch, Don F. Guterwill, Larry R. Smith, Alain P. Rolland, et Richard T. Kenney. 2012. « A Novel Therapeutic Cytomegalovirus DNA Vaccine in Allogeneic Haemopoietic Stem-Cell Transplantation: A Randomised, Double-Blind, Placebo-Controlled, Phase 2 Trial ». *The Lancet. Infectious Diseases* 12 (4):290-99. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(11\)70344-9](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(11)70344-9).
- Kim, Sungchul, Sanghyun Lee, Jinwook Shin, Youngkyun Kim, Irini Evnouchidou, Donghyun Kim, Young-Kook Kim, et al. 2011. « Human Cytomegalovirus MicroRNA MiR-US4-1 Inhibits CD8(+) T Cell Responses by Targeting the Aminopeptidase ERAP1 ». *Nature Immunology* 12 (10):984-91. <https://doi.org/10.1038/ni.2097>.
- Kim, Youngkyun, Boyoun Park, Sunglim Cho, Jinwook Shin, Kwangmin Cho, Youngsoo Jun, et Kwangseog Ahn. 2008. « Human Cytomegalovirus UL18 Utilizes US6 for Evading the NK and T-Cell Responses ». *PLoS Pathogens* 4 (8):e1000123. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000123>.
- Klenerman, Paul, et Annette Oxenius. 2016. « T Cell Responses to Cytomegalovirus ». *Nature Reviews Immunology* 16 (6):367-77. <https://doi.org/10.1038/nri.2016.38>.
- Kliem, V., L. Fricke, T. Wollbrink, M. Burg, J. Radermacher, et F. Rohde. 2008. « Improvement in Long-Term Renal Graft Survival Due to CMV Prophylaxis with Oral Ganciclovir: Results of a Randomized Clinical Trial ». *American Journal of Transplantation: Official Journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons* 8 (5):975-83. <https://doi.org/10.1111/j.1600-6143.2007.02133.x>.

- Knapp, L. A., L. F. Cadavid, et D. I. Watkins. 1998. « The MHC-E Locus Is the Most Well Conserved of All Known Primate Class I Histocompatibility Genes ». *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 160 (1):189-96.
- Knight, Andrea, Alejandro J. Madrigal, Sarah Grace, Janani Sivakumaran, Panagiotis Kottaridis, Stephen Mackinnon, Paul J. Travers, et Mark W. Lowdell. 2010. « The Role of V δ 2-Negative $\Gamma\delta$ T Cells during Cytomegalovirus Reactivation in Recipients of Allogeneic Stem Cell Transplantation ». *Blood* 116 (12):2164-72. <https://doi.org/10.1182/blood-2010-01-255166>.
- Koller, B. H., D. E. Geraghty, Y. Shimizu, R. DeMars, et H. T. Orr. 1988. « HLA-E. A Novel HLA Class I Gene Expressed in Resting T Lymphocytes ». *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 141 (3):897-904.
- Komatsu, H., S. Sierro, A. V Cuero, et P. Klenerman. 2003. « Population Analysis of Antiviral T Cell Responses Using MHC Class I-Peptide Tetramers ». *Clinical and Experimental Immunology* 134 (1):9-12.
- Komatsu, Takashi E., Andreas Pikiş, Lisa K. Naeger, et Patrick R. Harrington. 2014. « Resistance of human cytomegalovirus to ganciclovir/valganciclovir: A comprehensive review of putative resistance pathways ». *Antiviral Research* 101 (Supplement C):12-25. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2013.10.011>.
- Kotenko, S. V., S. Sacconi, L. S. Izotova, O. V. Mirochnitchenko, et 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):1695-1700.
- Kotton, Camille N., Deepali Kumar, Angela M. Caliendo, Anders Åsberg, Sunwen Chou, Lara Danziger-Isakov, et Atul Humar. 2013. « Updated International Consensus Guidelines on the Management of Cytomegalovirus in Solid-Organ Transplantation »: *Transplantation Journal* 96 (4):333-60. <https://doi.org/10.1097/TP.0b013e31829df29d>.
- Kraemer, Thomas, Alexander A. Celik, Trevor Huyton, Heike Kunze-Schumacher, Rainer Blasczyk, et Christina Bade-Döding. 2015. « HLA-E: Presentation of a Broader Peptide Repertoire Impacts the Cellular Immune Response—Implications on HSCT Outcome ». *Stem Cells International* 2015:1-12. <https://doi.org/10.1155/2015/346714>.
- Kubin, M., L. Cassiano, J. Chalupny, W. Chin, D. Cosman, W. Fanslow, J. Müllberg, A. M. Rousseau, D. Ulrich, et R. Armitage. 2001. « ULBP1, 2, 3: Novel MHC Class I-Related Molecules That Bind to Human Cytomegalovirus Glycoprotein UL16, Activate NK Cells ». *European Journal of Immunology* 31 (5):1428-37. [https://doi.org/10.1002/1521-4141\(200105\)31:5<1428::AID-IMMU1428>3.0.CO;2-4](https://doi.org/10.1002/1521-4141(200105)31:5<1428::AID-IMMU1428>3.0.CO;2-4).
- Kuijpers, Taco W., Mireille T. Vossen, Mi-Ran Gent, Jean-Claude Davin, Marijke T. Roos, Pauline M. Wertheim-van Dillen, Jan F. Weel, Paul A. Baars, et Rene A. van Lier. 2003. « Frequencies of Circulating Cytolytic, CD45RA+CD27-, CD8+ T Lymphocytes Depend on Infection with CMV ». *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 170 (8):4342-48.
- Kumar, D., S. Chernenko, G. Moussa, I. Cobos, O. Manuel, J. Preiksaitis, S. Venkataraman, et A. Humar. 2009. « Cell-Mediated Immunity to Predict Cytomegalovirus Disease in High-Risk Solid Organ Transplant Recipients ». *American Journal of Transplantation: Official Journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons* 9 (5):1214-22. <https://doi.org/10.1111/j.1600-6143.2009.02618.x>.
- Kwakkel-van Erp, J. M., A. W. M. Paantjens, D. A. van Kessel, J. C. Grutters, J. M. M. van den Bosch, E. A. van de Graaf, et H. G. Otten. 2011. « Mannose-Binding Lectin Deficiency Linked to Cytomegalovirus (CMV) Reactivation and Survival in Lung Transplantation ». *Clinical and Experimental Immunology* 165 (3):410-16. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2249.2011.04436.x>.
- Lafarge, X., P. Merville, M. C. Cazin, F. Bergé, L. Potaux, J. F. Moreau, et J. Déchanet-Merville. 2001. « Cytomegalovirus Infection in Transplant Recipients Resolves When Circulating Gammadelta T Lymphocytes Expand, Suggesting a Protective Antiviral Role ». *The Journal of Infectious Diseases* 184 (5):533-41. <https://doi.org/10.1086/322843>.
- Lampen, Margit H., Chopie Hassan, Marjolein Sluifjter, Annemieke Geluk, Karin Dijkman, Jennifer M. Tjon, Arnoud H. de Ru, Sjoerd H. van der Burg, Peter A. van Veelen, et Thorbald van Hall. 2013. « Alternative Peptide Repertoire of HLA-E Reveals a Binding Motif That Is Strikingly Similar to HLA-A2 ». *Molecular Immunology* 53 (1-2):126-31. <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2012.07.009>.
- Lanier, L. L. 1998. « NK Cell Receptors ». *Annual Review of Immunology* 16:359-93. <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.16.1.359>.
- Lauterbach, N., L. Wieten, H. E. Popeijus, J. Vanderlocht, P. M. H. van Zon, C. E. M. Voorter, et M. G. J. Tilanus. 2015. « Peptide-Induced HLA-E Expression in Human PBMCs Is Dependent on Peptide Sequence and the HLA-E Genotype ». *Tissue Antigens* 85 (4):242-51. <https://doi.org/10.1111/tan.12525>.

- Lazetic, S., C. Chang, J. P. Houchins, L. L. Lanier, et 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):4741-45.
- Le Roy, Emmanuelle, Annick Mühlethaler-Mottet, Christian Davrinche, Bernard Mach, et Jean-Luc Davignon. 1999. « Escape of Human Cytomegalovirus from HLA-DR-Restricted CD4+ T-Cell Response Is Mediated by Repression of Gamma Interferon-Induced Class II Transactivator Expression ». *Journal of Virology* 73 (8):6582-89.
- Lee, N., M. Llano, M. Carretero, A. Ishitani, F. Navarro, M. López-Botet, et 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):5199-5204. (a)
- Lee, Ni, David R. Goodlett, Akiko Ishitani, Hans Marquardt, et Daniel E. Geraghty. 1998. « HLA-E Surface Expression Depends on Binding of TAP-Dependent Peptides Derived from Certain HLA Class I Signal Sequences ». *The Journal of Immunology* 160 (10):4951-60. (b)
- Leeuwen, Ester M. M. van, Ester B. M. Remmerswaal, Mireille T. M. Vossen, Ajda T. Rowshani, Pauline M. E. Wertheim-van Dillen, René A. W. van Lier, et Ineke J. M. ten Berge. 2004. « Emergence of a CD4+CD28-Granzyme B+, Cytomegalovirus-Specific T Cell Subset after Recovery of Primary Cytomegalovirus Infection ». *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 173 (3):1834-41.
- Leeuwen, Ester M. van, Laila E. Gamadia, Paul A. Baars, Ester B. Remmerswaal, Ineke J. ten Berge, et René A. van Lier. 2002. « Proliferation Requirements of Cytomegalovirus-Specific, Effector-Type Human CD8+ T Cells ». *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 169 (10):5838-43.
- Lehner, P. J., J. T. Karttunen, G. W. Wilkinson, et 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):6904-9.
- Lemberg, M. K., F. A. Bland, A. Weihofen, V. M. Braud, et B. Martoglio. 2001. « Intramembrane Proteolysis of Signal Peptides: An Essential Step in the Generation of HLA-E Epitopes ». *The Journal of Immunology* 167 (11):6441-46. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.167.11.6441>.
- Levitsky, J., N. Singh, M. M. Wagener, V. Stosor, M. Abecassis, et M. G. Ison. 2008. « A Survey of CMV Prevention Strategies after Liver Transplantation ». *American Journal of Transplantation: Official Journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons* 8 (1):158-61. <https://doi.org/10.1111/j.1600-6143.2007.02026.x>.
- Lewinsohn, D. M., A. L. Briden, S. G. Reed, K. H. Grabstein, et M. R. Alderson. 2000. « Mycobacterium Tuberculosis-Reactive CD8+ T Lymphocytes: The Relative Contribution of Classical versus Nonclassical HLA Restriction ». *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 165 (2):925-30.
- Lewinsohn, David M., Mark R. Alderson, Andria L. Briden, Stanley R. Riddell, Steven G. Reed, et Kenneth H. Grabstein. 1998. « Characterization of Human CD8+ T Cells Reactive with Mycobacterium tuberculosis-infected Antigen-presenting Cells ». *The Journal of Experimental Medicine* 187 (10):1633-40.
- Li, Gang, Christopher C. Nguyen, Brent J. Ryckman, William J. Britt, et Jeremy P. Kamil. 2015. « A viral regulator of glycoprotein complexes contributes to human cytomegalovirus cell tropism ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 112 (14):4471-76. <https://doi.org/10.1073/pnas.1419875112>.
- Li, J., I. Goldstein, E. Glickman-Nir, H. Jiang, et L. Chess. 2001. « Induction of TCR V α -Specific CD8+ CTLs by TCR V α -Derived Peptides Bound to HLA-E ». *The Journal of Immunology* 167 (7):3800-3808. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.167.7.3800>.
- Lilleri, Daniele, Anna Kabanova, Maria Grazia Revello, Elena Percivalle, Antonella Sarasini, Emilia Genini, Federica Sallusto, Antonio Lanzavecchia, Davide Corti, et Giuseppe Gerna. 2013. « Fetal Human Cytomegalovirus Transmission Correlates with Delayed Maternal Antibodies to GH/GL/PUL128-130-131 Complex during Primary Infection ». *PLoS One* 8 (3):e59863. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0059863>.
- Litjens, Nicolle HR, Elly A de Wit, et Michiel GH Betjes. 2011. « Differential effects of age, cytomegalovirus-seropositivity and end-stage renal disease (ESRD) on circulating T lymphocyte subsets ». *Immunity & Ageing: I & A* 8 (janvier):2. <https://doi.org/10.1186/1742-4933-8-2>.
- Liu, Xue-feng, Xueqiong Wang, Shixian Yan, Zheng Zhang, Michael Abecassis, et Mary Hummel. 2013. « Epigenetic Control of Cytomegalovirus Latency and Reactivation ». *Viruses* 5 (5):1325-45. <https://doi.org/10.3390/v5051325>.

- Liu, Yu, Rong Mu, Ya-Ping Gao, Jie Dong, Lei Zhu, Yuyuan Ma, Yu-Hui Li, *et al.* 2016. « A Cytomegalovirus Peptide-Specific Antibody Alters Natural Killer Cell Homeostasis and Is Shared in Several Autoimmune Diseases ». *Cell Host & Microbe* 19 (3):400-408. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2016.02.005>.
- Ljungman, Per, Michael Boeckh, Hans H. Hirsch, Filip Josephson, Jens Lundgren, Garrett Nichols, Andreas Pikis, Raymund R. Razonable, Veronica Miller, et Paul D. Griffiths. 2017. « Definitions of Cytomegalovirus Infection and Disease in Transplant Patients for Use in Clinical Trials ». *Clinical Infectious Diseases* 64 (1):87-91. <https://doi.org/10.1093/cid/ciw668>.
- Ljungman, Per, Morgan Hakki, et Michael Boeckh. 2011. « Cytomegalovirus in Hematopoietic Stem Cell Transplant Recipients ». *Hematology/Oncology Clinics of North America* 25 (1):151-69. <https://doi.org/10.1016/j.hoc.2010.11.011>.
- Llano, M., N. Lee, F. Navarro, P. García, J. P. Albar, D. E. Geraghty, et 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):2854-63. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1521-4141\(199809\)28:09<2854::AID-IMMU2854>3.0.CO;2-W](https://doi.org/10.1002/(SICI)1521-4141(199809)28:09<2854::AID-IMMU2854>3.0.CO;2-W).
- Llano, Manuel, Mónica Gumá, Mara Ortega, Ana Angulo, et Miguel López-Botet. 2003. « Differential Effects of US2, US6 and US11 Human Cytomegalovirus Proteins on HLA Class Ia and HLA-E Expression: Impact on Target Susceptibility to NK Cell Subsets ». *European Journal of Immunology* 33 (10):2744-54. <https://doi.org/10.1002/eji.200324182>.
- Lo Monaco, Elisa, Leonardo Sibilio, Elisa Melucci, Elisa Tremante, Miloslav Suchànek, Vaclav Horejsi, Aline Martayan, et Patrizio Giacomini. 2008. « HLA-E: Strong Association with Beta2-Microglobulin and Surface Expression in the Absence of HLA Class I Signal Sequence-Derived Peptides ». *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 181 (8):5442-50.
- Loewendorf, A., et C. A. Benedict. 2010. « Modulation of host innate and adaptive immune defenses by cytomegalovirus: timing is everything ». *Journal of internal medicine* 267 (5):483-501. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2796.2010.02220.x>.
- Loomis, Rebecca J., Anders E. Lilja, James Monroe, Kara A. Balabanis, Luis A. Brito, Giuseppe Palladino, Michael Franti, Christian W. Mandl, Susan W. Barnett, et Peter W. Mason. 2013. « Vectored Co-Delivery of Human Cytomegalovirus GH and GL Proteins Elicits Potent Complement-Independent Neutralizing Antibodies ». *Vaccine* 31 (6):919-26. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2012.12.009>.
- Lopez-Vergès, Sandra, Jeffrey M. Milush, Suchitra Pandey, Vanessa A. York, Janice Arakawa-Hoyt, Hanspeter Pircher, Philip J. Norris, Douglas F. Nixon, et Lewis L. Lanier. 2010. « CD57 Defines a Functionally Distinct Population of Mature NK Cells in the Human CD56dimCD16+ NK-Cell Subset ». *Blood* 116 (19):3865-74. <https://doi.org/10.1182/blood-2010-04-282301>.
- Lopez-Vergès, Sandra, Jeffrey M. Milush, Brian S. Schwartz, Marcelo J. Pando, Jessica Jarjoura, Vanessa A. York, Jeffrey P. Houchins, *et al.* 2011. « Expansion of a Unique CD57⁺NKG2Chi Natural Killer Cell Subset during Acute Human Cytomegalovirus Infection ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108 (36):14725-32. <https://doi.org/10.1073/pnas.1110900108>.
- Loughney, John W., Richard R. Rustandi, Dai Wang, Matthew C. Troutman, Lawrence W. Dick, Guanghua Li, Zhong Liu, *et al.* 2015. « Soluble Human Cytomegalovirus GH/GL/PUL128-131 Pentameric Complex, but Not GH/GL, Inhibits Viral Entry to Epithelial Cells and Presents Dominant Native Neutralizing Epitopes ». *The Journal of Biological Chemistry* 290 (26):15985-95. <https://doi.org/10.1074/jbc.M115.652230>.
- Luisi, Kate, Mayuri Sharma, et Dong Yu. 2017. « Development of a vaccine against cytomegalovirus infection and disease ». *Current Opinion in Virology, Viral pathogenesis • Preventive and therapeutic vaccines*, 23 (Supplement C):23-29. <https://doi.org/10.1016/j.coviro.2017.02.003>.
- Lurain, Nell S., et Sunwen Chou. 2010. « Antiviral Drug Resistance of Human Cytomegalovirus ». *Clinical Microbiology Reviews* 23 (4):689-712. <https://doi.org/10.1128/CMR.00009-10>.
- Macagno, Annalisa, Nadia L. Bernasconi, Fabrizia Vanzetta, Erica Dander, Antonella Sarasini, Maria Grazia Revello, Giuseppe Gerna, Federica Sallusto, et Antonio Lanzavecchia. 2010. « Isolation of Human Monoclonal Antibodies That Potently Neutralize Human Cytomegalovirus Infection by Targeting Different Epitopes on the GH/GL/UL128-131A Complex ». *Journal of Virology* 84 (2):1005-13. <https://doi.org/10.1128/JVI.01809-09>.
- Macesic, N., D. Langsford, K. Nicholls, P. Hughes, D. J. Gottlieb, L. Clancy, E. Blyth, *et al.* 2015. « Adoptive T Cell Immunotherapy for Treatment of Ganciclovir-Resistant Cytomegalovirus Disease in a Renal Transplant Recipient ». *American Journal of Transplantation* 15 (3):827-32. <https://doi.org/10.1111/ajt.13023>.

- Maffei, Massimo, Fabio Ghiotto, Marzia Occhino, Maria Bono, Amleto De Santanna, Lorenzo Battini, G. Luca Gusella, Franco Fais, Silvia Bruno, et Ermanno Ciccone. 2008. « Human Cytomegalovirus Regulates Surface Expression of the Viral Protein UL18 by Means of Two Motifs Present in the Cytoplasmic Tail ». *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 180 (2):969-79.
- Magri, Giuliana, Aura Muntasell, Neus Romo, Andrea Sáez-Borderías, Daniela Pende, Daniel E. Geraghty, Hartmut Hengel, Ana Angulo, Alessandro Moretta, et Miguel López-Botet. 2011. « NKp46 and DNAM-1 NK-Cell Receptors Drive the Response to Human Cytomegalovirus-Infected Myeloid Dendritic Cells Overcoming Viral Immune Evasion Strategies ». *Blood* 117 (3):848-56. <https://doi.org/10.1182/blood-2010-08-301374>.
- Maier, S., M. Grzeschik, E. H. Weiss, et M. Ulbrecht. 2000. « Implications of HLA-E Allele Expression and Different HLA-E Ligand Diversity for the Regulation of NK Cells ». *Human Immunology* 61 (11):1059-65.
- Makwana, Nandini, Bree Foley, Sonia Fernandez, Silvia Lee, Ashley Irish, Hanspeter Pircher, et Patricia Price. 2017. « CMV Drives the Expansion of Highly Functional Memory T Cells Expressing NK-Cell Receptors in Renal Transplant Recipients ». *European Journal of Immunology* 47 (8):1324-34. <https://doi.org/10.1002/eji.201747018>.
- Malmberg, Karl-Johan, Victor Levitsky, Håkan Norell, Cristina Teixeira de Matos, Mattias Carlsten, Kjell Schedvins, Hodjattallah Rabbani, et al. 2002. « IFN-Gamma Protects Short-Term Ovarian Carcinoma Cell Lines from CTL Lysis via a CD94/NKG2A-Dependent Mechanism ». *The Journal of Clinical Investigation* 110 (10):1515-23. <https://doi.org/10.1172/JCI15564>.
- Manuel, Oriol, Shahid Husain, Deepali Kumar, Carlos Zayas, Steve Mawhorter, Marilyn E. Levi, Jayant Kalpoe, et al. 2013. « Assessment of Cytomegalovirus-Specific Cell-Mediated Immunity for the Prediction of Cytomegalovirus Disease in High-Risk Solid-Organ Transplant Recipients: A Multicenter Cohort Study ». *Clinical Infectious Diseases: An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America* 56 (6):817-24. <https://doi.org/10.1093/cid/cis993>.
- Manuel, Oriol, Manuel Pascual, Marten Trendelenburg, et Pascal R. Meylan. 2007. « Association between Mannose-Binding Lectin Deficiency and Cytomegalovirus Infection after Kidney Transplantation ». *Transplantation* 83 (3):359-62. <https://doi.org/10.1097/01.tp.0000251721.90688.c2>.
- Marlin, Romain, Angela Pappalardo, Hannah Kaminski, Carrie R. Willcox, Vincent Pitard, Sonia Netzer, Camille Khairallah, et al. 2017. « Sensing of Cell Stress by Human $\Gamma\delta$ TCR-Dependent Recognition of Annexin A2 ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 114 (12):3163-68. <https://doi.org/10.1073/pnas.1621052114>.
- Marschall, Manfred, Thomas Stamminger, Andreas Urban, Steffen Wildum, Helga Ruebsamen-Schaeff, Holger Zimmermann, et Peter Lischka. 2012. « In Vitro Evaluation of the Activities of the Novel Anticytomegalovirus Compound AIC246 (Letermovir) against Herpesviruses and Other Human Pathogenic Viruses ». *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 56 (2):1135-37. <https://doi.org/10.1128/AAC.05908-11>.
- Martín, Paloma, Isabel Krsnik, Belen Navarro, Mariano Provencio, Juan F. García, Carmen Bellas, Carlos Vilches, et Natalia Gomez-Lozano. 2015. « HLA Allele E*01:01 Is Associated with a Reduced Risk of EBV-Related Classical Hodgkin Lymphoma Independently of HLA-A*01/*02 ». *PloS One* 10 (8):e0135512. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0135512>.
- Martin-Gandul, C., N. J. Mueller, M. Pascual, et O. Manuel. 2015. « The Impact of Infection on Chronic Allograft Dysfunction and Allograft Survival After Solid Organ Transplantation ». *American Journal of Transplantation: Official Journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons* 15 (12):3024-40. <https://doi.org/10.1111/ajt.13486>.
- Marty, Francisco M., Drew J. Winston, Scott D. Rowley, Estil Vance, Genovefa A. Papanicolaou, Kathleen M. Mullane, Thomas M. Brundage, et al. 2013. « CMX001 to Prevent Cytomegalovirus Disease in Hematopoietic-Cell Transplantation ». *The New England Journal of Medicine* 369 (13):1227-36. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1303688>.
- Mason, Gavin M., Sarah Jackson, Georgina Okecha, Emma Poole, J. G. Patrick Sissons, John Sinclair, et Mark R. Wills. 2013. « Human Cytomegalovirus Latency-Associated Proteins Elicit Immune-Suppressive IL-10 Producing CD4⁺ T Cells ». *PLoS Pathogens* 9 (10):e1003635. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003635>.
- Masopust, D., V. Vezyz, A. L. Marzo, et L. Lefrançois. 2001. « Preferential Localization of Effector Memory Cells in Nonlymphoid Tissue ». *Science (New York, N.Y.)* 291 (5512):2413-17. <https://doi.org/10.1126/science.1058867>.
- Masopust, David, Daniel Choo, Vaiva Vezyz, E. John Wherry, Jaikumar Duraiswamy, Rama Akondy, Jun Wang, et al. 2010. « Dynamic T Cell Migration Program Provides Resident Memory within Intestinal Epithelium ». *Journal of Experimental Medicine*, février, jem.20090858. <https://doi.org/10.1084/jem.20090858>.

- Mazzarino, Paola, Gabriella Pietra, Paola Vacca, Michela Falco, Didier Colau, Pierre Coulie, Lorenzo Moretta, et Maria Cristina Mingari. 2005. « Identification of effector-memory CMV-specific T lymphocytes that kill CMV-infected target cells in an HLA-E-restricted fashion ». *European journal of immunology* 35 (11):3240–3247.
- Meijgaarden, Krista E. van, Mariëlle C. Haks, Nadia Caccamo, Francesco Dieli, Tom H. M. Ottenhoff, et Simone A. Joosten. 2015. « Human CD8+ T-Cells Recognizing Peptides from Mycobacterium Tuberculosis (Mtb) Presented by HLA-E Have an Unorthodox Th2-like, Multifunctional, Mtb Inhibitory Phenotype and Represent a Novel Human T-Cell Subset ». Édité par Sabine Ehrh. *PLOS Pathogens* 11 (3):e1004671. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1004671>.
- Michaelsson, J., C. Teixeira de Matos, A. Achour, L. L. Lanier, K. Karre, et K. Soderstrom. 2002. « A Signal Peptide Derived from Hsp60 Binds HLA-E and Interferes with CD94/NKG2A Recognition ». *Journal of Experimental Medicine* 196 (11):1403-14. <https://doi.org/10.1084/jem.20020797>.
- Miconnet, Isabelle, Angélique Marrau, Alex Farina, Patrick Taffé, Selena Viganò, Alexandre Harari, et Giuseppe Pantaleo. 2011. « Large TCR Diversity of Virus-Specific CD8 T Cells Provides the Mechanistic Basis for Massive TCR Renewal after Antigen Exposure ». *The Journal of Immunology* 186 (12):7039-49. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1003309>.
- Miller, Daniel M., Brian M. Rahill, Jeremy M. Boss, Michael D. Lairmore, Joan E. Durbin, James W. Waldman, et Daniel D. Sedmak. 1998. « Human Cytomegalovirus Inhibits Major Histocompatibility Complex Class II Expression By Disruption of the Jak/Stat Pathway ». *Journal of Experimental Medicine* 187 (5):675-83. <https://doi.org/10.1084/jem.187.5.675>.
- Miller, Joseph D., Dominique A. Weber, Chris Ibegbu, Jan Pohl, John D. Altman, et Peter E. Jensen. 2003. « CD94/NKG2 ». <http://www.microbio.uab.edu/CMIJournalClub/Oct6.pdf>.
- Millo, Enrico, et Gianluca Damonte. 2009. « HPLC and MS Analysis for the Identification and Characterisation of Peptides Presented in the Context of the Non-Classical Human Leukocytes Antigen (HLA) Class I Molecule HLA-E ». *Current Pharmaceutical Design* 15 (28):3325-35.
- Mingari, M C, F Schiavetti, M Ponte, C Vitale, E Maggi, S Romagnani, J Demarest, G Pantaleo, A S Fauci, et L Moretta. 1996. « Human CD8+ T lymphocyte subsets that express HLA class I-specific inhibitory receptors represent oligoclonally or monoclonally expanded cell populations. ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93 (22):12433-38.
- Mizuno, S., J. A. Trapani, B. H. Koller, B. Dupont, et S. Y. Yang. 1988. « Isolation and Nucleotide Sequence of a cDNA Clone Encoding a Novel HLA Class I Gene ». *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 140 (11):4024-30.
- Monsiváis-Urenda, Adriana, Daniel Noyola-Cherpitel, Alba Hernández-Salinas, Christian García-Sepúlveda, Neus Romo, Lourdes Baranda, Miguel López-Botet, et Roberto González-Amaro. 2010. « Influence of Human Cytomegalovirus Infection on the NK Cell Receptor Repertoire in Children ». *European Journal of Immunology* 40 (5):1418-27. <https://doi.org/10.1002/eji.200939898>.
- Morice, Alexis, Béatrice Charreau, Bérangère Neveu, Sophie Brouard, Jean-Paul Soulillou, Marc Bonneville, Elisabeth Houssaint, et Nicolas Degauque. 2010. « Cross-Reactivity of Herpesvirus-Specific CD8 T Cell Lines toward Allogeneic Class I MHC Molecules ». *PLoS One* 5 (8):e12120. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0012120>.
- Mourad, Georges, Lionel Rostaing, Christophe Legendre, Valérie Garrigue, Eric Thervet, et Dominique Durand. 2004. « Sequential Protocols Using Basiliximab versus Antithymocyte Globulins in Renal-Transplant Patients Receiving Mycophenolate Mofetil and Steroids ». *Transplantation* 78 (4):584-90.
- Mueller, Scott N., et Laura K. Mackay. 2015. « Tissue-resident memory T cells: local specialists in immune defence ». *Nature Reviews Immunology* 16 (2):79-89. <https://doi.org/10.1038/nri.2015.3>.
- Murphy, Eain, Dong Yu, Jane Grimwood, Jeremy Schmutz, Mark Dickson, Michael A. Jarvis, Gabriele Hahn, Jay A. Nelson, Richard M. Myers, et Thomas E. Shenk. 2003. « Coding Potential of Laboratory and Clinical Strains of Human Cytomegalovirus ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100 (25):14976-81. <https://doi.org/10.1073/pnas.2136652100>.
- Myhre, Hans-Arne, Dagny Haug Dorenberg, Knut Ivan Kristiansen, Halvor Rollag, Torbjørn Leivestad, Anders Asberg, et Anders Hartmann. 2011. « Incidence and Outcomes of Ganciclovir-Resistant Cytomegalovirus Infections in 1244 Kidney Transplant Recipients ». *Transplantation* 92 (2):217-23. <https://doi.org/10.1097/TP.0b013e31821fad25>.
- Nachmani, Daphna, Albert Zimmermann, Esther Oiknine Djian, Yiska Weisblum, Yoav Livneh, Vu Thuy Khanh Le, Eithan Galun, et al. 2014. « MicroRNA Editing Facilitates Immune Elimination of HCMV Infected Cells ». *PLOS Pathogens* 10 (2):e1003963. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003963>.

- Nash, William T., Jeffrey Teoh, Hairong Wei, Awdre Gamache, et Michael G. Brown. 2014. « Know Thyself: NK-Cell Inhibitory Receptors Prompt Self-Tolerance, Education, and Viral Control ». *Frontiers in Immunology* 5 (avril). <https://doi.org/10.3389/fimmu.2014.00175>.
- Nattermann, Jacob, Hans Dieter Nischalke, Valeska Hofmeister, Golo Ahlenstiel, Henning Zimmermann, Ludger Leifeld, Elisabeth H. Weiss, Tilman Sauerbruch, et Ulrich Spengler. 2005. « The HLA-A2 Restricted T Cell Epitope HCV Core< sub> 35–44</sub> Stabilizes HLA-E Expression and Inhibits Cytolysis Mediated by Natural Killer Cells ». *The American journal of pathology* 166 (2):443–453. (a)
- Nattermann, Jacob, Hans Dieter Nischalke, Valesko Hofmeister, Bernd Kupfer, Golo Ahlenstiel, Georg Feldmann, Jiirgen Rockstroh, Elisabeth H. Weiss, Tilman Sauerbruch, et 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. (b)
- Newell, Evan W., Natalia Sigal, Sean C. Bendall, Garry P. Nolan, et Mark M. Davis. 2012. « Cytometry by Time-of-Flight Shows Combinatorial Cytokine Expression and Virus-Specific Cell Niches within a Continuum of CD8+ T Cell Phenotypes ». *Immunity* 36 (1):142-52. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2012.01.002>.
- Nguyen, S., V. Beziat, N. Dhedin, M. Kuentz, J. P. Vernant, P. Debre, et V. Vieillard. 2009. « HLA-E Upregulation on IFN-Gamma-Activated AML Blasts Impairs CD94/NKG2A-Dependent NK Cytolysis after Haplo-Mismatched Hematopoietic SCT ». *Bone Marrow Transplantation* 43 (9):693-99. <https://doi.org/10.1038/bmt.2008.380>.
- Northfield, John, Michaela Lucas, Helena Jones, Neil T. Young, et Paul Klenerman. 2005. « Does Memory Improve with Age? CD85j (ILT-2/LIR-1) Expression on CD8 T Cells Correlates with “memory Inflation” in Human Cytomegalovirus Infection ». *Immunology and Cell Biology* 83 (2):182-88. <https://doi.org/10.1111/j.1440-1711.2005.01321.x>.
- O’Callaghan, Christopher A., José Tormo, Benjamin E. Willcox, Veronique M. Braud, Bent K. Jakobsen, David I. Stuart, Andrew J. McMichael, John I. Bell, et E. Yvonne Jones. 1998. « Structural Features Impose Tight Peptide Binding Specificity in the Nonclassical MHC Molecule HLA-E ». *Molecular Cell* 1 (4):531-41. [https://doi.org/10.1016/S1097-2765\(00\)80053-2](https://doi.org/10.1016/S1097-2765(00)80053-2).
- Odeberg, Jenny, Bodo Plachter, Lars Brandén, et 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):4870-77. <https://doi.org/10.1182/blood-2002-05-1504>.
- Ohta, Akane, Ayano Fujita, Tsugiyu Murayama, Yoshitaka Iba, Yoshikazu Kurosawa, Tetsushi Yoshikawa, et Yoshizo Asano. 2009. « Recombinant Human Monoclonal Antibodies to Human Cytomegalovirus Glycoprotein B Neutralize Virus in a Complement-Dependent Manner ». *Microbes and Infection* 11 (13):1029-36. <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2009.07.010>.
- Ohya, K., K. Kondo, et S. Mizuno. 1990. « Polymorphism in the Human Class I MHC Locus HLA-E in Japanese ». *Immunogenetics* 32 (3):205-9.
- Oliveira, Cláudia C., Peter A. van Veelen, Bianca Querido, Arnoud de Ru, Marjolein Sluijter, Sandra Laban, Jan W. Drijfhout, Sjoerd H. van der Burg, Rienk Offringa, et Thorbald van Hall. 2010. « The Nonpolymorphic MHC Qa-1b Mediates CD8+ T Cell Surveillance of Antigen-Processing Defects ». *The Journal of Experimental Medicine* 207 (1):207-21. <https://doi.org/10.1084/jem.20091429>.
- O’Sullivan, Timothy E., Joseph C. Sun, et Lewis L. Lanier. 2015. « Natural Killer Cell Memory ». *Immunity* 43 (4):634-45. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2015.09.013>.
- Pachnio, Annette, Miriam Ciaurritz, Jusnara Begum, Neeraj Lal, Jianmin Zuo, Andrew Beggs, et Paul Moss. 2016. « Cytomegalovirus Infection Leads to Development of High Frequencies of Cytotoxic Virus-Specific CD4+ T Cells Targeted to Vascular Endothelium ». *PLOS Pathogens* 12 (9):e1005832. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1005832>.
- Palmer, Scott M., Ajit P. Limaye, Missy Banks, Dianne Gallup, Jeffrey Chapman, E. Clinton Lawrence, Jordan Dunitz, et al. 2010. « Extended Valganciclovir Prophylaxis to Prevent Cytomegalovirus after Lung Transplantation: A Randomized, Controlled Trial ». *Annals of Internal Medicine* 152 (12):761-69. <https://doi.org/10.7326/0003-4819-152-12-201006150-00003>.
- Pang, X. L., J. D. Fox, J. M. Fenton, G. G. Miller, A. M. Caliendo, J. K. Preiksaitis, American Society of Transplantation Infectious Diseases Community of Practice, et Canadian Society of Transplantation. 2009. « Interlaboratory Comparison of Cytomegalovirus Viral Load Assays ». *American Journal of Transplantation: Official Journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons* 9 (2):258-68. <https://doi.org/10.1111/j.1600-6143.2008.02513.x>.

- Park, Boyoun, Youngkyun Kim, Jinwook Shin, Sunray Lee, Kwangmin Cho, Klaus Früh, Sungwook Lee, et 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):71-85.
- Park, Boyoun, Hokyung Oh, Sungwook Lee, Yangsook Song, Jinwook Shin, Young Chul Sung, Sue-Yun Hwang, et Kwangseog Ahn. 2002. « The MHC Class I Homolog of Human Cytomegalovirus Is Resistant to Down-Regulation Mediated by the Unique Short Region Protein (US)2, US3, US6, and US11 Gene Products ». *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 168 (7):3464-69.
- Park, Meerim, Ho Joon Im, Yu-Jin Lee, Nuree Park, Seongsoo Jang, Seog Woon Kwon, Chan-Jeoung Park, Eun Seok Choi, Kyung Nam Koh, et Jong Jin Seo. 2017. « Reconstitution of T and NK Cells after Haploidentical Hematopoietic Cell Transplantation Using A β T Cell Depleted Grafts and the Clinical Implication of $\Gamma\delta$ T Cells ». *Clinical Transplantation*, novembre. <https://doi.org/10.1111/ctr.13147>.
- Pass, Robert F., Changpin Zhang, Ashley Evans, Tina Simpson, William Andrews, Meei-Li Huang, Lawrence Corey, et al. 2009. « Vaccine Prevention of Maternal Cytomegalovirus Infection ». *New England Journal of Medicine* 360 (12):1191-99. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa0804749>.
- Paya, Carlos, Atul Humar, Ed Dominguez, Kenneth Washburn, Emily Blumberg, Barbara Alexander, Richard Freeman, Nigel Heaton, Mark D. Pescovitz, et Valganciclovir Solid Organ Transplant Study Group. 2004. « Efficacy and Safety of Valganciclovir vs. Oral Ganciclovir for Prevention of Cytomegalovirus Disease in Solid Organ Transplant Recipients ». *American Journal of Transplantation: Official Journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons* 4 (4):611-20. <https://doi.org/10.1111/j.1600-6143.2004.00382.x>.
- Peggs, Karl S., Kirsty Thomson, Edward Samuel, Gemma Dyer, Julie Armoogum, Ronjon Chakraverty, Kwok Pang, Stephen Mackinnon, et Mark W. Lowdell. 2011. « Directly Selected Cytomegalovirus-Reactive Donor T Cells Confer Rapid and Safe Systemic Reconstitution of Virus-Specific Immunity Following Stem Cell Transplantation ». *Clinical Infectious Diseases: An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America* 52 (1):49-57. <https://doi.org/10.1093/cid/ciq042>.
- Peggs, Karl S., Stephanie Verfuether, Arnold Pizzey, Shoon-Ling C. Chow, Kirsty Thomson, et Stephen Mackinnon. 2009. « Cytomegalovirus-Specific T Cell Immunotherapy Promotes Restoration of Durable Functional Antiviral Immunity following Allogeneic Stem Cell Transplantation ». *Clinical Infectious Diseases* 49 (12):1851-60. <https://doi.org/10.1086/648422>.
- Peggs, Karl S., Stephanie Verfuether, Arnold Pizzey, Naeem Khan, Malcolm Guiver, Paul A. Moss, et Stephen Mackinnon. 2003. « Adoptive Cellular Therapy for Early Cytomegalovirus Infection after Allogeneic Stem-Cell Transplantation with Virus-Specific T-Cell Lines ». *Lancet (London, England)* 362 (9393):1375-77. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(03\)14634-X](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(03)14634-X).
- Perera, Lilani, Ling Shao, Anjee Patel, Kelly Evans, Bertrand Meresse, Richard Blumberg, Daniel Geraghty, et al. 2007. « Expression of Nonclassical Class I Molecules by Intestinal Epithelial Cells ». *Inflammatory Bowel Diseases* 13 (3):298-307. <https://doi.org/10.1002/ibd.20026>.
- Petrie, Emma J., Craig S. Clements, Jie Lin, Lucy C. Sullivan, Darryl Johnson, Trevor Huyton, Annie Heroux, et al. 2008. « CD94-NKG2A Recognition of Human Leukocyte Antigen (HLA)-E Bound to an HLA Class I Leader Sequence ». *The Journal of Experimental Medicine* 205 (3):725-35. <https://doi.org/10.1084/jem.20072525>.
- Pietra, Gabriella, Chiara Romagnani, Michela Falco, Massimo Vitale, Roberta Castriconi, Daniela Pende, Enrico Millo, et al. 2001. « The analysis of the natural killer-like activity of human cytolytic T lymphocytes revealed HLA-E as a novel target for TCR α/β -mediated recognition ». *European journal of immunology* 31 (12):3687-3693.
- Pietra, Gabriella, Chiara Romagnani, Paola Mazzarino, Michela Falco, Enrico Millo, Alessandro Moretta, Lorenzo Moretta, et Maria Cristina Mingari. 2003. « HLA-E-restricted recognition of cytomegalovirus-derived peptides by human CD8+ cytolytic T lymphocytes ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 100 (19):10896-10901.
- Pitard, Vincent, David Roumanes, Xavier Lafarge, Lionel Couzi, Isabelle Garrigue, Marie-Edith Lafon, Pierre Merville, Jean-François Moreau, et Julie Déchanet-Merville. 2008. « Long-Term Expansion of Effector/Memory Vdelta2-Gammadelta T Cells Is a Specific Blood Signature of CMV Infection ». *Blood* 112 (4):1317-24. <https://doi.org/10.1182/blood-2008-01-136713>.
- Portela, D., R. Patel, J. J. Larson-Keller, D. M. Ilstrup, R. H. Wiesner, J. L. Steers, R. A. Krom, et C. V. Paya. 1995. « OKT3 Treatment for Allograft Rejection Is a Risk Factor for Cytomegalovirus Disease in Liver Transplantation ». *The Journal of Infectious Diseases* 171 (4):1014-18.
- Pourghesari, Batoul, Naeem Khan, Donna Best, Rachel Bruton, Laxman Nayak, et Paul A. H. Moss. 2007. « The Cytomegalovirus-Specific CD4+ T-Cell Response Expands with Age and Markedly Alters the CD4+ T-Cell Repertoire ». *Journal of Virology* 81 (14):7759-65. <https://doi.org/10.1128/JVI.01262-06>.

- 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):4473-81.
- Prod'homme, Virginie, Daniel M. Sugrue, Richard J. Stanton, Akio Nomoto, James Davies, Carole R. Rickards, Daniel Cochrane, Melanie Moore, Gavin W. G. Wilkinson, et 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):2034-39. <https://doi.org/10.1099/vir.0.021931-0>.
- Prod'homme, Virginie, Peter Tomasec, Charles Cunningham, Marius K. Lemberg, Richard J. Stanton, Brian P. McSharry, Eddie C. Y. Wang, *et al.* 2012. « Human Cytomegalovirus UL40 Signal Peptide Regulates Cell Surface Expression of the NK Cell Ligands HLA-E and GpUL18 ». *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 188 (6):2794-2804. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1102068>.
- Puig-Pey, Isabel, Felix Bohne, Carlos Benítez, Marta López, Marc Martínez-Llordella, Federico Oppenheimer, Juan José Lozano, *et al.* 2010. « Characterization of $\Gamma\delta$ T Cell Subsets in Organ Transplantation ». *Transplant International* 23 (10):1045-55. <https://doi.org/10.1111/j.1432-2277.2010.01095.x>.
- Quinnan, G. V., N. Kirmani, A. H. Rook, J. F. Manischewitz, L. Jackson, G. Moreschi, G. W. Santos, R. Saral, et W. H. Burns. 1982. « Cytotoxic t Cells in Cytomegalovirus Infection: HLA-Restricted T-Lymphocyte and Non-T-Lymphocyte Cytotoxic Responses Correlate with Recovery from Cytomegalovirus Infection in Bone-Marrow-Transplant Recipients ». *The New England Journal of Medicine* 307 (1):7-13. <https://doi.org/10.1056/NEJM198207013070102>.
- Razonable, R. R., A. Rivero, A. Rodriguez, J. Wilson, J. Daniels, G. Jenkins, T. Larson, W. C. Hellinger, J. R. Spivey, et C. V. Paya. 2001. « Allograft Rejection Predicts the Occurrence of Late-Onset Cytomegalovirus (CMV) Disease among CMV-Mismatched Solid Organ Transplant Patients Receiving Prophylaxis with Oral Ganciclovir ». *The Journal of Infectious Diseases* 184 (11):1461-64. <https://doi.org/10.1086/324516>.
- Razonable, Raymund R. 2010. « Strategies for Managing Cytomegalovirus in Transplant Recipients ». *Expert Opinion on Pharmacotherapy* 11 (12):1983-97. <https://doi.org/10.1517/14656566.2010.492395>.
- Razonable, Raymund R., Robert A. Brown, Jennie Wilson, Cynthia Groettum, Walter Kremers, Mark Espy, Thomas F. Smith, et Carlos V. Paya. 2002. « The Clinical Use of Various Blood Compartments for Cytomegalovirus (CMV) DNA Quantitation in Transplant Recipients with CMV Disease ». *Transplantation* 73 (6):968-73.
- Razonable, Raymund R., et Ajit P. Limaye. 2016. « Cytomegalovirus Infection After Solid Organ Transplantation ». In *Transplant Infections*, 441-75. Springer, Cham. https://doi.org/10.1007/978-3-319-28797-3_25.
- Rea, Federico, Luciano Potena, Nizar Yonan, Florian Wagner, et Fiorella Calabrese. 2016. « Cytomegalovirus Hyper Immunoglobulin for CMV Prophylaxis in Thoracic Transplantation ». *Transplantation* 100 (Suppl 3):S19-26. <https://doi.org/10.1097/TP.0000000000001096>.
- Redondo-Pachón, Dolores, Marta Crespo, Jose Yélamos, Aura Muntasell, María José Pérez-Sáez, Silvia Pérez-Fernández, Joan Vila, Carlos Vilches, Julio Pascual, et Miguel López-Botet. 2017. « Adaptive NKG2C+ NK Cell Response and the Risk of Cytomegalovirus Infection in Kidney Transplant Recipients ». *The Journal of Immunology* 198 (1):94-101. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1601236>.
- Reeves, M. B., P. A. MacAry, P. J. Lehner, J. G. P. Sissons, et J. H. Sinclair. 2005. « Latency, Chromatin Remodeling, and Reactivation of Human Cytomegalovirus in the Dendritic Cells of Healthy Carriers ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102 (11):4140-45. <https://doi.org/10.1073/pnas.0408994102>.
- Rehm, Armin, Arne Engelsberg, Domenico Tortorella, Ida J. Körner, Insa Lehmann, Hidde L. Ploegh, et Uta E. Höpken. 2002. « Human Cytomegalovirus Gene Products US2 and US11 Differ in Their Ability To Attack Major Histocompatibility Class I Heavy Chains in Dendritic Cells ». *Journal of Virology* 76 (10):5043-50. <https://doi.org/10.1128/JVI.76.10.5043-5050.2002>.
- Reischig, T., P. Jindra, O. Hes, M. Svecová, J. Klaboch, et V. Treska. 2008. « Valacyclovir Prophylaxis versus Preemptive Valganciclovir Therapy to Prevent Cytomegalovirus Disease after Renal Transplantation ». *American Journal of Transplantation: Official Journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons* 8 (1):69-77. <https://doi.org/10.1111/j.1600-6143.2007.02031.x>.
- Rentenaar, R. J., L. E. Gamadia, N. van DerHoek, F. N. van Diepen, R. Boom, J. F. Weel, P. M. Wertheim-van Dillen, R. A. van Lier, et I. J. ten Berge. 2000. « Development of Virus-Specific CD4(+) T Cells during Primary Cytomegalovirus Infection ». *The Journal of Clinical Investigation* 105 (4):541-48. <https://doi.org/10.1172/JCI8229>.

- Rentenaar, R. J., L. E. Gamadia, N. van der Hoek, F. N. J. van Diepen, R. Boom, J. F. L. Weel, R. A. W. van Lier, et I. J. M. ten Berge. 2001. « CD4+ T-Cell Dynamics in Primary Cytomegalovirus Infection ». *Transplantation Proceedings* 33 (3):2313-14. [https://doi.org/10.1016/S0041-1345\(01\)02004-8](https://doi.org/10.1016/S0041-1345(01)02004-8).
- Reusser, P., S. R. Riddell, J. D. Meyers, et P. D. Greenberg. 1991. « Cytotoxic T-Lymphocyte Response to Cytomegalovirus after Human Allogeneic Bone Marrow Transplantation: Pattern of Recovery and Correlation with Cytomegalovirus Infection and Disease ». *Blood* 78 (5):1373-80.
- Reyburn, H. T., O. Mandelboim, M. Valés-Gómez, D. M. Davis, L. Pazmany, et J. L. Strominger. 1997. « The Class I MHC Homologue of Human Cytomegalovirus Inhibits Attack by Natural Killer Cells ». *Nature* 386 (6624):514-17. <https://doi.org/10.1038/386514a0>.
- Riddell, S. R., K. S. Watanabe, J. M. Goodrich, C. R. Li, M. E. Agha, et P. D. Greenberg. 1992. « Restoration of Viral Immunity in Immunodeficient Humans by the Adoptive Transfer of T Cell Clones ». *Science (New York, N.Y.)* 257 (5067):238-41.
- Robinson, James, Jason A. Halliwell, James D. Hayhurst, Paul Flicek, Peter Parham, et Steven G. E. Marsh. 2015. « The IPD and IMGT/HLA database: allele variant databases ». *Nucleic Acids Research* 43 (Database issue):D423-31. <https://doi.org/10.1093/nar/gku1161>.
- Rölle, Alexander, Mehrdad Mousavi-Jazi, Mikael Eriksson, Jenny Odeberg, Cecilia Söderberg-Nauclér, David Cosman, Klas Kärre, et 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):902-8.
- Rölle, Alexander, Julia Pollmann, Eva-Maria Ewen, Vu Thuy Khanh Le, Anne Halenius, Hartmut Hengel, et Adelheid Cerwenka. 2014. « IL-12-Producing Monocytes and HLA-E Control HCMV-Driven NKG2C+ NK Cell Expansion ». *The Journal of Clinical Investigation* 124 (12):5305-16. <https://doi.org/10.1172/JCI77440>.
- Romagnani, Chiara, Gabriella Pietra, Michela Falco, Paola Mazzarino, Lorenzo Moretta, et Maria Cristina Mingari. 2004. « HLA-E-Restricted Recognition of Human Cytomegalovirus by a Subset of Cytolytic T Lymphocytes ». *Human Immunology* 65 (5):437-45. <https://doi.org/10.1016/j.humimm.2004.02.001>.
- Romagnani, Chiara, Gabriella Pietra, Michela Falco, Enrico Millo, Paola Mazzarino, Roberto Biassoni, Alessandro Moretta, Lorenzo Moretta, et Maria Cristina Mingari. 2002. « Identification of HLA-E-specific alloreactive T lymphocytes: a cell subset that undergoes preferential expansion in mixed lymphocyte culture and displays a broad cytolytic activity against allogeneic cells ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 99 (17):11328-11333.
- Roman, Antonio, Nicolás Manito, Josep Maria Campistol, Valentín Cuervas-Mons, Luis Almenar, Manuel Arias, Fernando Casafont, et al. 2014. « The impact of the prevention strategies on the indirect effects of CMV infection in solid organ transplant recipients ». *Transplantation Reviews* 28 (2):84-91. <https://doi.org/10.1016/j.trre.2014.01.001>.
- Roux, Antoine, Gisèle Mourin, Martin Larsen, Solène Fastenackels, Alejandra Urrutia, Guy Gorochov, Brigitte Autran, et al. 2013. « Differential Impact of Age and Cytomegalovirus Infection on the $\gamma\delta$ T Cell Compartment ». *The Journal of Immunology* 191 (3):1300-1306. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1202940>.
- Ryckman, Brent J., Michael A. Jarvis, Derek D. Drummond, Jay A. Nelson, et David C. Johnson. 2006. « Human Cytomegalovirus Entry into Epithelial and Endothelial Cells Depends on Genes UL128 to UL150 and Occurs by Endocytosis and Low-PH Fusion ». *Journal of Virology* 80 (2):710-22. <https://doi.org/10.1128/JVI.80.2.710-722.2006>.
- Sabbaj, Steffanie, Robert F. Pass, Paul A. Goepfert, et Sylvie Pichon. 2011. « Glycoprotein B Vaccine Is Capable of Boosting Both Antibody and CD4 T-Cell Responses to Cytomegalovirus in Chronically Infected Women ». *The Journal of Infectious Diseases* 203 (11):1534-41. <https://doi.org/10.1093/infdis/jir138>.
- Salerno-Gonçalves, Rosângela, Marcelo Fernandez-Viña, David M. Lewinsohn, et Marcelo B. Sztein. 2004. « Identification of a human HLA-E-restricted CD8+ T cell subset in volunteers immunized with Salmonella enterica serovar Typhi strain Ty21a typhoid vaccine ». *The Journal of Immunology* 173 (9):5852-5862.
- Salerno-Goncalves, Rosângela, Rezwanul Wahid, et Marcelo B. Sztein. 2010. « Ex Vivo Kinetics of Early and Long-Term Multifunctional Human Leukocyte Antigen E-Specific CD8+ Cells in Volunteers Immunized with the Ty21a Typhoid Vaccine ». *Clinical and Vaccine Immunology: CVI* 17 (9):1305-14. <https://doi.org/10.1128/CVI.00234-10>.
- Sallusto, F., D. Lenig, R. Förster, M. Lipp, et A. Lanzavecchia. 1999. « Two Subsets of Memory T Lymphocytes with Distinct Homing Potentials and Effector Functions ». *Nature* 401 (6754):708-12. <https://doi.org/10.1038/44385>.

- Sansoni, Paolo, Rosanna Vescovini, Francesco F. Fagnoni, Arne Akbar, Ramon Arens, Yen-Ling Chiu, Luka Čičin-Šain, *et al.* 2014. « New Advances in CMV and Immunosenescence ». *Experimental Gerontology* 55 (juillet):54-62. <https://doi.org/10.1016/j.exger.2014.03.020>.
- Sarmiento, E., M. Jaramillo, J. Navarro, J. Rodriguez-Molina, J. Fernandez-Yañez, J. Palomo, M. Gomez-Sanchez, *et al.* 2014. « Humoral Immunity Profiles to Identify CMV-Seropositive Heart Recipients at Risk of CMV Disease: A Prospective Multicenter Study ». *The Journal of Heart and Lung Transplantation* 33 (4):S20. <https://doi.org/10.1016/j.healun.2014.01.082>.
- Scheinberg, Phillip, Jan J. Melenhorst, Jason M. Brenchley, Brenna J. Hill, Nancy F. Hensel, Pratip K. Chattopadhyay, Mario Roederer, *et al.* 2009. « The Transfer of Adaptive Immunity to CMV during Hematopoietic Stem Cell Transplantation Is Dependent on the Specificity and Phenotype of CMV-Specific T Cells in the Donor ». *Blood* 114 (24):5071-80. <https://doi.org/10.1182/blood-2009-04-214684>.
- Scheper, W., S. van Dorp, S. Kersting, F. Pietersma, C. Lindemans, S. Hol, S. Heijhuurs, *et al.* 2013. « $\gamma\delta$ T Cells Elicited by CMV Reactivation after Allo-SCT Cross-Recognize CMV and Leukemia ». *Leukemia* 27 (6):1328-38. <https://doi.org/10.1038/leu.2012.374>.
- Schneider-Ohrum, Kirsten, Corinne Cayatte, Yi Liu, Zhaoti Wang, Alivelu Irrinki, Floro Cataniag, Nga Nguyen, *et al.* 2016. « Production of Cytomegalovirus Dense Bodies by Scalable Bioprocess Methods Maintains Immunogenicity and Improves Neutralizing Antibody Titers ». *Journal of Virology* 90 (22):10133-44. <https://doi.org/10.1128/JVI.00463-16>.
- Schottstedt, Volkmar, Johannes Blümel, Reinhard Burger, Christian Drosten, Albrecht Gröner, Lutz Gürtler, Margarethe Heiden, *et al.* 2010. « Human Cytomegalovirus (HCMV) – Revised* ». *Transfusion Medicine and Hemotherapy* 37 (6):365-75. <https://doi.org/10.1159/000322141>.
- Schulte, Daniela, Martin Vogel, Bettina Langhans, Benjamin Krämer, Christian Körner, Hans Dieter Nischalke, Verena Steinberg, *et al.* 2009. « The HLA-E(R)/HLA-E(R) Genotype Affects the Natural Course of Hepatitis C Virus (HCV) Infection and Is Associated with HLA-E-Restricted Recognition of an HCV-Derived Peptide by Interferon-Gamma-Secreting Human CD8(+) T Cells ». *The Journal of Infectious Diseases* 200 (9):1397-1401. <https://doi.org/10.1086/605889>.
- Schwanninger, Angelika, Birgit Weinberger, Daniela Weiskopf, Dietmar Herndler-Brandstetter, Stephan Reitinger, Christoph Gassner, Harald Schennach, Walther Parson, Reinhard Würzner, et Beatrix Grubeck-Loebenstein. 2008. « Age-related appearance of a CMV-specific high-avidity CD8+ T cell clonotype which does not occur in young adults ». *Immunity & Ageing: I & A* 5 (novembre):14. <https://doi.org/10.1186/1742-4933-5-14>.
- Seckert, Christof K., Marion Griebel, Julia K. Büttner, Sabine Scheller, Christian O. Simon, Kai A. Kropp, Angélique Renzaho, Birgit Kühnapfel, Natascha K. A. Grzimek, et Matthias J. Reddehase. 2012. « Viral Latency Drives 'Memory Inflation': A Unifying Hypothesis Linking Two Hallmarks of Cytomegalovirus Infection ». *Medical Microbiology and Immunology* 201 (4):551-66. <https://doi.org/10.1007/s00430-012-0273-y>.
- Sellarés, J., D. G. de Freitas, M. Mengel, J. Reeve, G. Einecke, B. Sis, L. G. Hidalgo, K. Famulski, A. Matas, et P. F. Halloran. 2012. « Understanding the Causes of Kidney Transplant Failure: The Dominant Role of Antibody-Mediated Rejection and Nonadherence ». *American Journal of Transplantation: Official Journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons* 12 (2):388-99. <https://doi.org/10.1111/j.1600-6143.2011.03840.x>.
- Sensi, M., G. Pietra, A. Molla, G. Nicolini, C. Vegetti, I. Bersani, E. Millo, *et al.* 2009. « Peptides with Dual Binding Specificity for HLA-A2 and HLA-E Are Encoded by Alternatively Spliced Isoforms of the Antioxidant Enzyme Peroxiredoxin 5 ». *International Immunology* 21 (3):257-68. <https://doi.org/10.1093/intimm/dxn141>.
- Sester, M., U. Sester, B. Gärtner, G. Heine, M. Girndt, N. Mueller-Lantzsch, A. Meyerhans, et H. Köhler. 2001. « Levels of Virus-Specific CD4 T Cells Correlate with Cytomegalovirus Control and Predict Virus-Induced Disease after Renal Transplantation ». *Transplantation* 71 (9):1287-94.
- Sester, Martina, Urban Sester, Barbara C. Gärtner, Matthias Girndt, Andreas Meyerhans, et Hans Köhler. 2002. « Dominance of Virus-Specific CD8 T Cells in Human Primary Cytomegalovirus Infection ». *Journal of the American Society of Nephrology: JASN* 13 (10):2577-84. (a)
- Sester, Martina, Urban Sester, Barbara Gärtner, Boris Kubuschok, Matthias Girndt, Andreas Meyerhans, et Hans Köhler. 2002. « Sustained High Frequencies of Specific CD4 T Cells Restricted to a Single Persistent Virus ». *Journal of Virology* 76 (8):3748-55. (b)
- Sester, Urban, Barbara C. Gärtner, Heinrike Wilkens, Bernhard Schwaab, Rolf Wössner, Ingrid Kindermann, Matthias Girndt, *et al.* 2005. « Differences in CMV-Specific T-Cell Levels and Long-Term Susceptibility to CMV Infection after Kidney, Heart and Lung Transplantation ». *American Journal of Transplantation* 5 (6):1483-89. <https://doi.org/10.1111/j.1600-6143.2005.00871.x>.

- Shamu, C. E., D. Flierman, H. L. Ploegh, T. A. Rapoport, et V. Chau. 2001. « Polyubiquitination Is Required for US11-Dependent Movement of MHC Class I Heavy Chain from Endoplasmic Reticulum into Cytosol ». *Molecular Biology of the Cell* 12 (8):2546-55.
- Shimamura, Masako. 2013. « The Contribution of Cytomegalovirus to Atherosclerotic Events after Kidney Transplantation ». *The Journal of Infectious Diseases* 207 (10):1487-90. <https://doi.org/10.1093/infdis/jit065>.
- Sia, I. G., J. A. Wilson, C. M. Groettum, M. J. Espy, T. F. Smith, et C. V. Paya. 2000. « Cytomegalovirus (CMV) DNA Load Predicts Relapsing CMV Infection after Solid Organ Transplantation ». *The Journal of Infectious Diseases* 181 (2):717-20. <https://doi.org/10.1086/315242>.
- Sijmons, Steven, Kim Thys, Mirabeau Mbong Ngwese, Ellen Van Damme, Jan Dvorak, Marnix Van Loock, Guangdi Li, et al. 2015. « High-Throughput Analysis of Human Cytomegalovirus Genome Diversity Highlights the Widespread Occurrence of Gene-Disrupting Mutations and Pervasive Recombination ». *Journal of Virology*, mai. <https://doi.org/10.1128/JVI.00578-15>.
- Sijmons, Steven, Marc Van Ranst, et Piet Maes. 2014. « Genomic and Functional Characteristics of Human Cytomegalovirus Revealed by Next-Generation Sequencing ». *Viruses* 6 (3):1049-72. <https://doi.org/10.3390/v6031049>.
- Simon, Sylvain, et Nathalie Labarriere. 2017. « PD-1 expression on tumor-specific T cells: Friend or foe for immunotherapy? ». *OncoImmunology* 0 (0):e1364828. <https://doi.org/10.1080/2162402X.2017.1364828>.
- Simon, Sylvain, Virginie Vignard, Laetitia Florenceau, B. Dreno, A. Khammari, F. Lang, et N. Labarriere. 2016. « PD-1 expression conditions T cell avidity within an antigen-specific repertoire ». *OncoImmunology* 5 (1):e1104448. <https://doi.org/10.1080/2162402X.2015.1104448>.
- Sinzger, C., M. Digel, et G. Jahn. 2008. « Cytomegalovirus Cell Tropism ». In *Human Cytomegalovirus*, 63-83. Current Topics in Microbiology and Immunology. Springer, Berlin, Heidelberg. https://doi.org/10.1007/978-3-540-77349-8_4.
- Slobedman, B., et E. S. Mocarski. 1999. « Quantitative Analysis of Latent Human Cytomegalovirus ». *Journal of Virology* 73 (6):4806-12.
- Small, Lorne N., Joseph Lau, et David R. Snyder. 2006. « Preventing Post-Organ Transplantation Cytomegalovirus Disease with Ganciclovir: A Meta-Analysis Comparing Prophylactic and Preemptive Therapies ». *Clinical Infectious Diseases* 43 (7):869-80. <https://doi.org/10.1086/507337>.
- Smith, Corey, Stephanie Gras, Rebekah M. Brennan, Nicola L. Bird, Sophie A. Valkenburg, Kelly-Anne Twist, Jacqueline M. Burrows, et al. 2014. « Molecular Imprint of Exposure to Naturally Occurring Genetic Variants of Human Cytomegalovirus on the T Cell Repertoire ». *Scientific Reports* 4 (février):3993. <https://doi.org/10.1038/srep03993>.
- Smith, Wendell, Peter Tomasec, Rebecca Aicheler, Andrea Loewendorf, Ivana Nemčovičová, Eddie C.Y. Wang, Richard J. Stanton, et al. 2013. « Human Cytomegalovirus Glycoprotein UL141 Targets the TRAIL Death Receptors to Thwart Host Innate Antiviral Defenses ». *Cell Host & Microbe* 13 (3):324-35. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2013.02.003>.
- Snyder, Christopher M. 2011. « Buffered Memory: A Hypothesis for the Maintenance of Functional, Virus-Specific CD8(+) T Cells during Cytomegalovirus Infection ». *Immunologic Research* 51 (2-3):195-204. <https://doi.org/10.1007/s12026-011-8251-9>.
- Snyder, Christopher M., Kathy S. Cho, Elizabeth L. Bonnett, Serani van Dommelen, Geoffrey R. Shellam, et Ann B. Hill. 2008. « Memory Inflation during Chronic Viral Infection Is Maintained by Continuous Production of Short-Lived, Functional T Cells ». *Immunity* 29 (4):650-59. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2008.07.017>.
- Söderberg-Nauclér, C., D. N. Streblow, K. N. Fish, J. Allan-Yorke, P. P. Smith, et J. A. Nelson. 2001. « Reactivation of Latent Human Cytomegalovirus in CD14(+) Monocytes Is Differentiation Dependent ». *Journal of Virology* 75 (16):7543-54. <https://doi.org/10.1128/JVI.75.16.7543-7554.2001>.
- Spencer, Juliet V., Kristen M. Lockridge, Peter A. Barry, Gaofeng Lin, Monica Tsang, Mark E. T. Penfold, et Thomas J. Schall. 2002. « Potent Immunosuppressive Activities of Cytomegalovirus-Encoded Interleukin-10 ». *Journal of Virology* 76 (3):1285-92.
- Srivastava, R., M. J. Chorney, S. K. Lawrance, J. Pan, Z. Smith, C. L. Smith, et S. M. Weissman. 1987. « Structure, Expression, and Molecular Mapping of a Divergent Member of the Class I HLA Gene Family ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 84 (12):4224-28.

- Stein, J., H. D. Volk, C. Liebenthal, D. H. Krüger, et S. Prösch. 1993. « Tumour Necrosis Factor Alpha Stimulates the Activity of the Human Cytomegalovirus Major Immediate Early Enhancer/Promoter in Immature Monocytic Cells ». *The Journal of General Virology* 74 (Pt 11) (novembre):2333-38. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-74-11-2333>.
- Stemberger, Christian, Patricia Graef, Marcus Odendahl, Julia Albrecht, Georg Dössinger, Florian Anderl, Veit R. Buchholz, et al. 2014. « Lowest Numbers of Primary CD8(+) T Cells Can Reconstitute Protective Immunity upon Adoptive Immunotherapy ». *Blood* 124 (4):628-37. <https://doi.org/10.1182/blood-2013-12-547349>.
- Stern, M., H. Elsässer, G. Hönger, J. Steiger, S. Schaub, et 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):1312-17. <https://doi.org/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* 317 (5836):376-81. <https://doi.org/10.1126/science.1140956>.
- Stern-Ginossar, Noam, Ben Weisburd, Annette Michalski, Vu Thuy Khanh Le, Marco Y. Hein, Sheng-Xiong Huang, Ming Ma, et al. 2012. « Decoding human cytomegalovirus ». *Science (New York, N.Y.)* 338 (6110). <https://doi.org/10.1126/science.1227919>.
- Stevens, J., E. Joly, J. Trowsdale, et G. W. Butcher. 2001. « Peptide Binding Characteristics of the Non-Classical Class Ib MHC Molecule HLA-E Assessed by a Recombinant Random Peptide Approach ». *BMC Immunology* 2:5.
- Stijn, Amber van, Ajda T. Rowshani, Sila L. Yong, Frank Baas, Eddy Roosnek, Ineke J. M. ten Berge, et René A. W. van Lier. 2008. « Human Cytomegalovirus Infection Induces a Rapid and Sustained Change in the Expression of NK Cell Receptors on CD8+ T Cells ». *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 180 (7):4550-60.
- Stoelben, Susanne, Wolfgang Arns, Lutz Renders, Jürgen Hummel, Anja Mühlfeld, Manfred Stangl, Michael Fischereeder, et al. 2014. « Preemptive Treatment of Cytomegalovirus Infection in Kidney Transplant Recipients with Letemovir: Results of a Phase 2a Study ». *Transplant International: Official Journal of the European Society for Organ Transplantation* 27 (1):77-86. <https://doi.org/10.1111/tri.12225>.
- Streblov, Daniel N., Jerome Dumortier, Ashlee V. Moses, Susan L. Orloff, et Jay A. Nelson. 2008. « Mechanisms of Cytomegalovirus-Accelerated Vascular Disease: Induction of Paracrine Factors That Promote Angiogenesis and Wound Healing ». *Current topics in microbiology and immunology* 325:397-415.
- Strindhall, J., M. Skog, J. Ernerudh, M. Bengner, S. Löfgren, A. Matussek, B. O. Nilsson, et A. Wikby. 2013. « The Inverted CD4/CD8 Ratio and Associated Parameters in 66-Year-Old Individuals: The Swedish HEXA Immune Study ». *Age (Dordrecht, Netherlands)* 35 (3):985-91. <https://doi.org/10.1007/s11357-012-9400-3>.
- Strong, R. K. 2003. « HLA-E Allelic Variants. CORRELATING DIFFERENTIAL EXPRESSION, PEPTIDE AFFINITIES, CRYSTAL STRUCTURES, AND THERMAL STABILITIES ». *Journal of Biological Chemistry* 278 (7):5082-90. <https://doi.org/10.1074/jbc.M208268200>.
- Sullivan, Barbara A., Piotr Kraj, Dominique A. Weber, Leszek Ignatowicz, et Peter E. Jensen. 2002. « Positive Selection of a Qa-1-Restricted T Cell Receptor with Specificity for Insulin ». *Immunity* 17 (1):95-105.
- Sullivan, L. C., C. S. Clements, J. Rossjohn, et A. G. Brooks. 2008. « The Major Histocompatibility Complex Class Ib Molecule HLA-E at the Interface between Innate and Adaptive Immunity ». *Tissue Antigens* 72 (5):415-24. <https://doi.org/10.1111/j.1399-0039.2008.01138.x>.
- Sullivan, Lucy C., Craig S. Clements, Travis Beddoe, Darryl Johnson, Hilary L. Hoare, Jie Lin, Trevor Huyton, et al. 2007. « The Heterodimeric Assembly of the CD94-NKG2 Receptor Family and Implications for Human Leukocyte Antigen-E Recognition ». *Immunity* 27 (6):900-911. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2007.10.013>.
- Sullivan, Lucy C., Hilary L. Hoare, James McCluskey, Jamie Rossjohn, et Andrew G. Brooks. 2006. « A Structural Perspective on MHC Class Ib Molecules in Adaptive Immunity ». *Trends in Immunology* 27 (9):413-20. <https://doi.org/10.1016/j.it.2006.07.006>.
- Sullivan, Lucy C., Glen P. Westall, Jacqueline M. L. Widjaja, Nicole A. Mifsud, Thi H. O. Nguyen, Aislin C. Meehan, Tom C. Kotsimbos, et Andrew G. Brooks. 2015. « The Presence of HLA-E-Restricted, CMV-Specific CD8+ T Cells in the Blood of Lung Transplant Recipients Correlates with Chronic Allograft Rejection ». Édité par Peter Chen. *PLOS ONE* 10 (8):e0135972. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0135972>.

- Sylwester, Andrew, Kate Z. Nambiar, Stefano Caserta, Paul Klenerman, Louis J. Picker, et Florian Kern. 2016. « A new perspective of the structural complexity of HCMV-specific T-cell responses ». *Mechanisms of Ageing and Development, Cytomegalovirus, Immunity and Human Ageing*, 158 (septembre):14-22. <https://doi.org/10.1016/j.mad.2016.03.002>.
- 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 ». *Journal of Experimental Medicine* 202 (5):673-85. <https://doi.org/10.1084/jem.20050882>.
- Tamouza, Ryad, Marc Busson, Vanderson Rocha, Catherine Fortier, Yacine Haddad, Manuel Brun, Wahid Boukouaci, et al. 2006. « Homozygous Status for HLA-E*0103 Confers Protection from Acute Graft-Versus-Host Disease and Transplant-Related Mortality in HLA-Matched Sibling Hematopoietic Stem Cell Transplantation »: *Transplantation* 82 (11):1436-40. <https://doi.org/10.1097/01.tp.0000244598.92049.dd>.
- Tennakoon, Deepani K., Riyaz S. Mehta, Sterling B. Ortega, Vijay Bhoj, Michael K. Racke, et Nitin J. Karandikar. 2006. « Therapeutic Induction of Regulatory, Cytotoxic CD8+ T Cells in Multiple Sclerosis ». *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 176 (11):7119-29.
- Terhune, Scott S., Jörg Schröer, et Thomas Shenk. 2004. « RNAs Are Packaged into Human Cytomegalovirus Virions in Proportion to Their Intracellular Concentration ». *Journal of Virology* 78 (19):10390-98. <https://doi.org/10.1128/JVI.78.19.10390-10398.2004>.
- Terrazzano, G., M. Sica, C. Gianfrani, G. Mazzarella, F. Maurano, B. De Giulio, S. de Saint-Mezard, et al. 2007. « Gliadin Regulates the NK-Dendritic Cell Cross-Talk by HLA-E Surface Stabilization ». *The Journal of Immunology* 179 (1):372-81. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.179.1.372>.
- Tirabassi, Rebecca S., et Hidde L. Ploegh. 2002. « The Human Cytomegalovirus US8 Glycoprotein Binds to Major Histocompatibility Complex Class I Products ». *Journal of Virology* 76 (13):6832-35.
- Tomasec, P. 2000. « Surface Expression of HLA-E, an Inhibitor of Natural Killer Cells, Enhanced by Human Cytomegalovirus gpUL40 ». *Science* 287 (5455):1031-33. <https://doi.org/10.1126/science.287.5455.1031>.
- 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):181-88. <https://doi.org/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, et 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):1039-43. <https://doi.org/10.1038/12478>.
- Toyoda, M., S. Ge, E. Suviolahti, P. Pichurin, B. Shin, A. Pao, A. Vo, et al. 2012. « IFN γ Production by NK Cells from HLA-Sensitized Patients after in Vitro Exposure to Allo-Antigens ». *Transplant Immunology* 26 (2-3):107-12. <https://doi.org/10.1016/j.trim.2011.11.001>.
- Toyoda, Mieko, Karine Galfayan, Odette A Galera, Anna Petrosian, Lawrnce SC Czer, et Stanley C Jordan. 1997. « Cytomegalovirus infection induces anti-endothelial cell antibodies in cardiac and renal allograft recipients ». *Transplant Immunology* 5 (2):104-11. [https://doi.org/10.1016/S0966-3274\(97\)80050-0](https://doi.org/10.1016/S0966-3274(97)80050-0).
- Trautmann, Lydie, Marie Rimbart, Klara Echasserieau, Xavier Saulquin, Bérangère Neveu, Julie Dechanet, Vincenzo Cerundolo, et Marc Bonneville. 2005. « Selection of T Cell Clones Expressing High-Affinity Public TCRs within Human Cytomegalovirus-Specific CD8 T Cell Responses ». *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 175 (9):6123-32.
- Trgovcich, Joanne, Colleen Cebulla, Pete Zimmerman, et Daniel D. Sedmak. 2006. « Human Cytomegalovirus Protein Pp71 Disrupts Major Histocompatibility Complex Class I Cell Surface Expression ». *Journal of Virology* 80 (2):951-63. <https://doi.org/10.1128/JVI.80.2.951-963.2006>.
- Tu, Wenjuan, et Sudha Rao. 2016. « Mechanisms Underlying T Cell Immunosenescence: Aging and Cytomegalovirus Infection ». *Frontiers in Microbiology* 7 (décembre). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.02111>.
- Turner, D. L., K. L. Bickham, J. J. Thome, C. Y. Kim, F. D'Ovidio, E. J. Wherry, et D. L. Farber. 2014. « Lung Niches for the Generation and Maintenance of Tissue-Resident Memory T Cells ». *Mucosal Immunology* 7 (3):501-10. <https://doi.org/10.1038/mi.2013.67>.
- Ulbrecht, M., A. Couturier, S. Martinuzzi, M. Pla, R. Srivastava, P. A. Peterson, et E. H. Weiss. 1999. « Cell Surface Expression of HLA-E: Interaction with Human Beta2-Microglobulin and Allelic Differences ». *European Journal of Immunology* 29 (2):537-47.

- Ulbrecht, M., S. Martinozzi, M. Grzeschik, H. Hengel, J. W. Ellwart, M. Pla, et E. H. Weiss. 2000. « Cutting Edge: The Human Cytomegalovirus UL40 Gene Product Contains a Ligand for HLA-E and Prevents NK Cell-Mediated Lysis ». *The Journal of Immunology* 164 (10):5019-22. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.164.10.5019>.
- Ulbrecht, M., S. Modrow, R. Srivastava, P. A. Peterson, et E. H. Weiss. 1998. « Interaction of HLA-E with Peptides and the Peptide Transporter in Vitro: Implications for Its Function in Antigen Presentation ». *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 160 (9):4375-85.
- Valés-Gómez, M., H. T. Reyburn, R. A. Erskine, M. López-Botet, et 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):4250-60. <https://doi.org/10.1093/emboj/18.15.4250>.
- Valés-Gómez, Mar, Mitsunori Shiroishi, Katsumi Maenaka, et Hugh T. Reyburn. 2005. « Genetic Variability of the Major Histocompatibility Complex Class I Homologue Encoded by Human Cytomegalovirus Leads to Differential Binding to the Inhibitory Receptor ILT2 ». *Journal of Virology* 79 (4):2251-60. <https://doi.org/10.1128/JVI.79.4.2251-2260.2005>.
- Varnum, Susan M., Daniel N. Streblow, Matthew E. Monroe, Patricia Smith, Kenneth J. Auberry, Ljiljana Paša-Tolić, Dai Wang, et al. 2004. « Identification of Proteins in Human Cytomegalovirus (HCMV) Particles: the HCMV Proteome ». *Journal of Virology* 78 (20):10960-66. <https://doi.org/10.1128/JVI.78.20.10960-10966.2004>.
- Vermijlen, David, Margreet Brouwer, Catherine Donner, Corinne Liesnard, Marie Tackoen, Michel Van Rysselberge, Nicolas Twité, Michel Goldman, Arnaud Marchant, et Fabienne Willems. 2010. « Human cytomegalovirus elicits fetal $\gamma\delta$ T cell responses in utero ». *The Journal of Experimental Medicine* 207 (4):807-21. <https://doi.org/10.1084/jem.20090348>.
- Villartay, Jean-Pierre de, Annick Lim, Hamoud Al-Mousa, Sophie Dupont, Julie Déchanet-Merville, Edith Coumau-Gatbois, Marie-Lise Gougeon, et al. 2005. « A Novel Immunodeficiency Associated with Hypomorphic RAG1 Mutations and CMV Infection ». *The Journal of Clinical Investigation* 115 (11):3291-99. <https://doi.org/10.1172/JCI25178>.
- Wada, Haruka, Naoki Matsumoto, Katsumi Maenaka, Kazuhiro Suzuki, et Kazuo Yamamoto. 2004. « The inhibitory NK cell receptor CD94/NKG2A and the activating receptor CD94/NKG2C bind the top of HLA-E through mostly shared but partly distinct sets of HLA-E residues ». *European journal of immunology* 34 (1):81-90.
- Wagner, Claudia S., Gerdt C. Riise, Tomas Bergström, Klas Kärre, Ennio Carbone, et Louise Berg. 2007. « Increased Expression of Leukocyte Ig-Like Receptor-1 and Activating Role of UL18 in the Response to Cytomegalovirus Infection ». *The Journal of Immunology* 178 (6):3536-43. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.178.6.3536>.
- Wallace, Diana L., Joanne E. Masters, Catherine M. De Lara, Sian M. Henson, Andrew Worth, Yan Zhang, Shikha R. Kumar, Peter C. Beverley, Arne N. Akbar, et Derek C. Macallan. 2011. « Human Cytomegalovirus-Specific CD8(+) T-Cell Expansions Contain Long-Lived Cells That Retain Functional Capacity in Both Young and Elderly Subjects ». *Immunology* 132 (1):27-38. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2567.2010.03334.x>.
- Walter, Elizabeth A., Philip D. Greenberg, Mark J. Gilbert, Rosalynde J. Finch, Käthe S. Watanabe, E. Donnell Thomas, et Stanley R. Riddell. 1995. « Reconstitution of Cellular Immunity against Cytomegalovirus in Recipients of Allogeneic Bone Marrow by Transfer of T-Cell Clones from the Donor ». *New England Journal of Medicine* 333 (16):1038-44. <https://doi.org/10.1056/NEJM199510193331603>.
- Wang, Dai, Daniel C. Freed, Xi He, Fengsheng Li, Aimin Tang, Kara S. Cox, Sheri A. Dubey, et al. 2016. « A Replication-Defective Human Cytomegalovirus Vaccine for Prevention of Congenital Infection ». *Science Translational Medicine* 8 (362):362ra145-362ra145. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aaf9387>.
- Wang, Dai, Fengsheng Li, Daniel C. Freed, Adam C. Finnefrock, Aimin Tang, Shannon N. Grimes, Danilo R. Casimiro, et Tong-Ming Fu. 2011. « Quantitative Analysis of Neutralizing Antibody Response to Human Cytomegalovirus in Natural Infection ». *Vaccine* 29 (48):9075-80. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2011.09.056>.
- Wang, Eddie C. Y., Brian McSharry, Christelle Retiere, Peter Tomasec, Sheila Williams, Leszek K. Borysiewicz, Veronique M. Braud, et 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):7570-75. <https://doi.org/10.1073/pnas.112680099>.
- Wang, George C., Pradyot Dash, Jonathan A. McCullers, Peter C. Doherty, et Paul G. Thomas. 2012. « T Cell Receptor $\alpha\beta$ Diversity Inversely Correlates with Pathogen-Specific Antibody Levels in Human Cytomegalovirus Infection ». *Science Translational Medicine* 4 (128):128ra42. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3003647>.
- Weekes, M. P., M. R. Wills, K. Mynard, A. J. Carmichael, et J. G. Sissons. 1999. « The Memory Cytotoxic T-Lymphocyte (CTL) Response to Human Cytomegalovirus Infection Contains Individual Peptide-Specific CTL Clones That Have Undergone Extensive Expansion in Vivo ». *Journal of Virology* 73 (3):2099-2108.

- Wei, X. H., et H. T. Orr. 1990. « Differential Expression of HLA-E, HLA-F, and HLA-G Transcripts in Human Tissue ». *Human Immunology* 29 (2):131-42.
- Weihofen, Andreas, Kathleen Binns, Marius K. Lemberg, Keith Ashman, et Bruno Martoglio. 2002. « Identification of Signal Peptide Peptidase, a Presenilin-Type Aspartic Protease ». *Science (New York, N.Y.)* 296 (5576):2215-18. <https://doi.org/10.1126/science.1070925>.
- Wen, Yingxia, James Monroe, Christine Linton, Jacob Archer, Clayton W. Beard, Susan W. Barnett, Giuseppe Palladino, Peter W. Mason, Andrea Carfi, et Anders E. Lilja. 2014. « Human Cytomegalovirus GH/GL/UL128/UL130/UL131A Complex Elicits Potently Neutralizing Antibodies in Mice ». *Vaccine* 32 (30):3796-3804. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2014.05.004>.
- Wiertz, E. J., T. R. Jones, L. Sun, M. Bogyo, H. J. Geuze, et 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):769-79. (a)
- Wiertz, E. J., D. Tortorella, M. Bogyo, J. Yu, W. Mothes, T. R. Jones, T. A. Rapoport, et H. L. Ploegh. 1996. « Sec61-Mediated Transfer of a Membrane Protein from the Endoplasmic Reticulum to the Proteasome for Destruction ». *Nature* 384 (6608):432-38. <https://doi.org/10.1038/384432a0>. (b)
- Wiita, A. P., N. Roubinian, Y. Khan, P. V. Chin-Hong, J. P. Singer, J. A. Golden, et S. Miller. 2012. « Cytomegalovirus Disease and Infection in Lung Transplant Recipients in the Setting of Planned Indefinite Valganciclovir Prophylaxis ». *Transplant Infectious Disease: An Official Journal of the Transplantation Society* 14 (3):248-58. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3062.2012.00723.x>.
- Willcox, Carrie R., Vincent Pitard, Sonia Netzer, Lionel Couzi, Mahboob Salim, Tobias Silberzahn, Jean-François Moreau, Adrian C. Hayday, Benjamin E. Willcox, et Julie Déchanet-Merville. 2012. « Cytomegalovirus and Tumor Stress Surveillance by Binding of a Human $\Gamma\delta$ T Cell Antigen Receptor to Endothelial Protein C Receptor ». *Nature Immunology* 13 (9):872-79. <https://doi.org/10.1038/ni.2394>.
- Wills, Mark R., Omodele Ashiru, Matthew B. Reeves, Georgina Okecha, John Trowsdale, Peter Tomasec, Gavin W. G. Wilkinson, John Sinclair, et 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):7457-65.
- Wills, Mark R., Emma Poole, Betty Lau, Ben Krishna, et John H. Sinclair. 2015. « The Immunology of Human Cytomegalovirus Latency: Could Latent Infection Be Cleared by Novel Immunotherapeutic Strategies? » *Cellular & Molecular Immunology* 12 (2):128. <https://doi.org/10.1038/cmi.2014.75>.
- Wistuba-Hamprecht, Kilian, Daniela Frasca, Bonnie Blomberg, Graham Pawelec, et Evelyn Derhovanessian. 2013. « Age-Associated Alterations in $\Gamma\delta$ T-Cells Are Present Predominantly in Individuals Infected with Cytomegalovirus ». *Immunity & Ageing: I & A* 10 (1):26. <https://doi.org/10.1186/1742-4933-10-26>.
- Wooden, Stacey L., Suzanne R. Kalb, Robert J. Cotter, et Mark J. Soloski. 2005. « Cutting Edge: HLA-E Binds a Peptide Derived from the ATP-Binding Cassette Transporter Multidrug Resistance-Associated Protein 7 and Inhibits NK Cell-Mediated Lysis ». *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 175 (3):1383-87.
- Wussow, Felix, Flavia Chiuppesi, Heidi Contreras, et Don J. Diamond. 2017. « Neutralization of Human Cytomegalovirus Entry into Fibroblasts and Epithelial Cells ». *Vaccines* 5 (4). <https://doi.org/10.3390/vaccines5040039>.
- Wussow, Felix, Flavia Chiuppesi, Joy Martinez, John Campo, Erica Johnson, Christin Flechsig, Maegan Newell, et al. 2014. « Human Cytomegalovirus Vaccine Based on the Envelope gH/gL Pentamer Complex ». *PLOS Pathogens* 10 (11):e1004524. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1004524>.
- Wynn, Katherine K., Zara Fulton, Leanne Cooper, Sharon L. Silins, Stephanie Gras, Julia K. Archbold, Fleur E. Tynan, et al. 2008. « Impact of Clonal Competition for Peptide-MHC Complexes on the CD8+ T-Cell Repertoire Selection in a Persistent Viral Infection ». *Blood* 111 (8):4283-92. <https://doi.org/10.1182/blood-2007-11-122622>.
- Xu, George J., Tomasz Kula, Qikai Xu, Mamie Z. Li, Suzanne D. Vernon, Thumbi Ndung'u, Kiat Ruxrungtham, et al. 2015. « Viral Immunology. Comprehensive Serological Profiling of Human Populations Using a Synthetic Human Virome ». *Science (New York, N.Y.)* 348 (6239):aaa0698. <https://doi.org/10.1126/science.aaa0698>.
- Yang, Zhiru, et Pamela J. Bjorkman. 2008. « Structure of UL18, a Peptide-Binding Viral MHC Mimic, Bound to a Host Inhibitory Receptor ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105 (29):10095-100. <https://doi.org/10.1073/pnas.0804551105>.

- Yeager, M., S. Kumar, et A. L. Hughes. 1997. « Sequence Convergence in the Peptide-Binding Region of Primate and Rodent MHC Class Ib Molecules ». *Molecular Biology and Evolution* 14 (10):1035-41.
- Yu, Xuekui, Jonathan Jih, Jiansen Jiang, et Z. Hong Zhou. 2017. « Atomic Structure of the Human Cytomegalovirus Capsid with Its Securing Tegument Layer of Pp150 ». *Science (New York, N.Y.)* 356 (6345). <https://doi.org/10.1126/science.aam6892>.
- Zhou, Momei, Jean-Marc Lanchy, et Brent J. Ryckman. 2015. « Human Cytomegalovirus GH/GL/GO Promotes the Fusion Step of Entry into All Cell Types, Whereas GH/GL/UL128-131 Broadens Virus Tropism through a Distinct Mechanism ». *Journal of Virology* 89 (17):8999-9009. <https://doi.org/10.1128/JVI.01325-15>.
- Zhou, Wendi, Jeff Longmate, Simon F. Lacey, Joycelyne M. Palmer, Ghislaine Gallez-Hawkins, Lia Thao, Ricardo Spielberger, et al. 2009. « Impact of Donor CMV Status on Viral Infection and Reconstitution of Multifunction CMV-Specific T Cells in CMV-Positive Transplant Recipients ». *Blood* 113 (25):6465-76. <https://doi.org/10.1182/blood-2009-02-203307>.

ANNEXE



CD40L confers helper functions to human intra-melanoma class-I-restricted CD4⁺CD8⁺ double positive T cells

Tiphaine Parrot, Romain Oger, Housseem Benlalam, Diane Raingeard de la Blétière, Nicolas Jouand, Anne Coutolleau, Laurence Preisser, Amir Khammari, Brigitte Dréno, Philippe Guardiola, Yves Delneste, Nathalie Labarrière & Nadine Gervois

To cite this article: Tiphaine Parrot, Romain Oger, Housseem Benlalam, Diane Raingeard de la Blétière, Nicolas Jouand, Anne Coutolleau, Laurence Preisser, Amir Khammari, Brigitte Dréno, Philippe Guardiola, Yves Delneste, Nathalie Labarrière & Nadine Gervois (2016) CD40L confers helper functions to human intra-melanoma class-I-restricted CD4⁺CD8⁺ double positive T cells, *Oncoimmunology*, 5:12, e1250991, DOI: [10.1080/2162402X.2016.1250991](https://doi.org/10.1080/2162402X.2016.1250991)

To link to this article: <https://doi.org/10.1080/2162402X.2016.1250991>



© 2016 The Author(s). Published with license by Taylor & Francis Group, LLC© Tiphaine Parrot, Romain Oger, Housseem Benlalam, Diane Raingeard de la Blétière, Nicolas Jouand, Anne Coutolleau, Laurence Preisser, Amir Khammari, Brigitte Dréno, Philippe Guardiola, Yves Delneste, Nathalie Labarrière, and Nadine Gervois



[View supplementary material](#)



Accepted author version posted online: 28 Oct 2016.
Published online: 28 Oct 2016.



[Submit your article to this journal](#)



Article views: 409



[View related articles](#)



[View Crossmark data](#)



Citing articles: 2 [View citing articles](#)

Full Terms & Conditions of access and use can be found at <http://www.tandfonline.com/action/journalInformation?journalCode=koni20>

CD40L confers helper functions to human intra-melanoma class-I-restricted CD4⁺CD8⁺ double positive T cells

Tiphaine Parrot^{a,b}, Romain Oger^{a,b}, Housseem Benlalam^{a,b}, Diane Raingeard de la Blétière^{a,c}, Nicolas Jouand^{a,b}, Anne Coutolleau^c, Laurence Preisser^{a,b}, Amir Khammari^{a,b,d}, Brigitte Dréno^{a,b,d,e}, Philippe Guardiola^{a,b,c}, Yves Delneste^{a,b}, Nathalie Labarrière^{a,b}, and Nadine Gervois^{a,b}

^aCRCNA, INSERM, CNRS, Université d'Angers, Université de Nantes, Nantes, France; ^bLabEx IGO "Immunotherapy, Graft, Oncology", Nantes, France; ^cSNP Transcriptome & Epigenomics Facility, Centre Hospitalier Universitaire, Angers, France; ^dUnit of Skin Cancer, Centre Hospitalier Universitaire, Nantes, France; ^eGMP Unit of Cellular Therapy, Centre Hospitalier Universitaire, Nantes, France

ABSTRACT

Although CD4⁺CD8⁺ double positive (DP) T cells represent a small fraction of peripheral T lymphocytes in healthy human donors, their frequency is often increased under pathological conditions (in blood and targeted tissues). In solid cancers such as melanoma, we previously demonstrated an enrichment of tumor reactive CD4^{low}CD8^{high}αβ DP T cells among tumor-infiltrating lymphocytes of unknown function. Similarly to their single positive (SP) CD8⁺ counterparts, intra-melanoma DP T cells recognized melanoma cell lines in an HLA-class-I restricted context. However, they presented a poor cytotoxic activity but a strong production of diverse Th1 and Th2 cytokines. The aim of this study was to clearly define the role of intra-melanoma CD4^{low}CD8^{high}αβ DP T cells in the antitumor immune response. Based on a comparative transcriptome analysis between intra-melanoma SP CD4⁺, SP CD8⁺ and DP autologous melanoma-infiltrating T-cell compartments, we evidenced an overexpression of the CD40L co-stimulatory molecule on activated DP T cells. We showed that, like SP CD4⁺ T cells, and through CD40L involvement, DP T cells are able to induce both proliferation and differentiation of B lymphocytes and maturation of functional DCs able to efficiently prime cytotoxic melanoma-specific CD8 T-cell responses. Taken together, these results highlight the helper potential of atypical DP T cells and their role in potentiating antitumor response.

Abbreviations: DP, double positive; Mo-DC, monocyte-derived DC; TIL, tumor-infiltrating lymphocyte

ARTICLE HISTORY

Received 8 August 2016
Revised 14 October 2016
Accepted 14 October 2016

KEYWORDS

CD4⁺CD8⁺ double positive T cells; CD40L; helper function; melanoma; TIL

Introduction

It has long been admitted that the distribution of CD4⁺CD8⁺ double positive (DP) T cells was not limited to the thymus, and that mature DP T cells were also present in the peripheral blood of healthy humans as a distinct T lymphocyte population.^{1,2} This rare population, accounting for 1–2% of total peripheral T lymphocytes in healthy recipients,^{3,4} regroups at least three different subsets according to the surface expression level of the CD4⁺ and CD8⁺ co-receptors (CD4^{high}CD8^{low}, CD4^{high}CD8^{high} and CD4^{low}CD8^{high}) and on the nature of the CD8⁺ dimer expressed (CD8αα or CD8αβ).^{5,6} Although not clearly established, these diverse phenotypes may reflect different lineage origins according to their thymic or peripheral differentiation.^{7–10} DP T cells were largely described in diverse pathological contexts such as infectious diseases,^{2,11–14} autoimmune syndromes,^{15–17} inflammatory disorders^{18–20} and cancer.^{21–25} In most cases, a peculiar DP T-cell subset was generally found enriched in the blood and/or in the target organ, suggesting their involvement in the pathological process. Functional analyses in a given context attributed at least three different

functions for DP T cells from regulatory properties to helper or cytotoxic activity (for review, see Overgaard et al.²⁶). In human cancer, DP T-cell subsets were found enriched at the tumor site in lymphomas (cutaneous T-cell lymphoma and nodular lymphocyte predominant Hodgkin lymphoma)^{21,24} and solid tumors (melanoma, colorectal cancer and breast cancer)^{22,23,25} and were described as a tumor-reactive population suggesting their role in the antitumor immune response. From one cancer setting to another, opposite results were obtained regarding DP T-cell function and phenotype; therefore, their study should be dealt on a case-by-case basis. An efficient cytolytic activity was attributed to the CD4^{high}CD8^{low} DP T-cell subset found in lymphoma.²¹ Conversely, in solid tumors, we reported at least two different phenotypic DP T-cell subsets, the CD4^{low}CD8^{high} DP T-cell subpopulation in melanoma and breast cancer,^{22,23} and the CD4^{high}CD8^{high} DP T-cell subpopulation in colorectal cancer,²⁵ both sharing the CD8αβ dimer.

Because the frequency of these DP T cells was positively correlated with advanced cancer stage, we initially thought that intra-tumor DP T cells could exert regulatory functions.

CONTACT Nadine Gervois  nadine.gervois@inserm.fr  CRCNA, INSERM, CNRS, Université d'Angers, Université de Nantes, Nantes 44007, France.
 Supplemental data for this article can be accessed on the publisher's website.

Published with license by Taylor & Francis Group, LLC © Tiphaine Parrot, Romain Oger, Housseem Benlalam, Diane Raingeard de la Blétière, Nicolas Jouand, Anne Coutolleau, Laurence Preisser, Amir Khammari, Brigitte Dréno, Philippe Guardiola, Yves Delneste, Nathalie Labarrière, and Nadine Gervois.

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution-Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0/>), which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited. The moral rights of the named author(s) have been asserted.

However, we excluded this hypothesis as DP T cells (i) did not express any regulatory markers nor secreted immunoregulatory cytokines and (ii) did not suppress proliferation and cytokine production by various T-cell subsets (personal unpublished results). In addition, even these DP T cells shared class-I restriction with single positive (SP) CD8⁺ T cells, they did not exhibit high cytotoxic activity ruling out the hypothesis that cytotoxicity may represent their main function. Interestingly, we previously showed that melanoma infiltrating DP T cells were able to secrete high level of diverse Th1 and Th2 cytokines mostly IL-13 and TNF- α .²³ In addition, we demonstrated that DP T cells expressed high levels of IL-9R and that IL-9 both promotes their survival and their activation.²⁷

In this study, we sought out to clearly delineate the function of the melanoma-infiltrating CD4^{low}CD8^{high} $\alpha\beta$ DP T-cell subset (referred to as DP T cells for the rest of this manuscript) in order to define their role in the global antitumor immune response.

Starting from a comparative transcriptome analysis between autologous DP, SP CD4⁺ and SP CD8⁺ T-cell subsets sorted from melanoma-invaded lymph nodes, we identified a similar overexpression of the co-stimulatory molecule CD40L on activated DP and SP CD4⁺ T cells compared to SP CD8⁺ T cells. The expression of this key helper T-cell molecule by DP T cells led us to explore the potential helper function of these class-I restricted population. Results showed that CD40L allowed DP T cells to exert *in vitro* efficient helper activities on B cells and dendritic cells (DCs).

Results

CD40L overexpression is induced after activation of melanoma-infiltrating DP T cells

To decipher the role of the intra-melanoma DP T-cell population in melanoma, we initiated a comparative transcriptome analysis between autologous melanoma-infiltrating DP, SP CD4⁺ and SP CD8⁺ T lymphocytes at rest and upon anti-CD3 Ab activation. The three subpopulations were sorted from eight tumor-infiltrating lymphocytes (TIL) lines previously established from melanoma-invaded lymph nodes.²⁷ This analysis showed that DP T cells shared with SP CD4⁺ T cells the ability to significantly induce the expression of CD40L mRNA upon activation ($p < 0.01$) (Fig. 1A), a key feature in CD4⁺ helper functions.²⁸ This expression was similar between SP CD4⁺ and DP T cells and significantly elevated compared to SP CD8⁺ T cells ($p < 0.01$). These results were further confirmed by qPCR analysis (Fig. 1B). However, the expression profile of CD40L by activated DP T cells appeared more heterogeneous compared to SP CD4⁺ T cells. Flow cytometry identified at least three CD40L surface expression patterns on activated DP T cells: (i) some DP T-cell populations (3/8) expressed CD40L at a similar level than SP CD4⁺ T cells (>90%), (ii) others (4/8) presented an intermediate expression level (50–80%) and (iii) one DP T-cell population displayed a poor expression (<10%) (Fig. 1C). Although not significant, a non-negligible proportion (from 5% to 50%) of SP CD8⁺ T cells expressed CD40L. We also assessed the induction of CD40L expression by DP T cells in a more physiological context by using a tumor-reactive DP T-cell clone M314.13.2 that we have previously isolated from one

melanoma TIL population.²³ Following 6 h of co-culture with the autologous melanoma cell line M314, we observed a strong expression of the CD40L by the DP T-cell clone at a similar level to the one obtained upon non-specific anti-CD3 activation (Fig. S1). It is noteworthy that patients presenting the highest CD40L level on DP T cells were not necessarily the same as the ones expressing highest CD40L levels on CD4⁺ T cells. Since CD40L, through its interaction with its cognate receptor CD40, is a key element in T-cell help delivery, these data suggested that intra-tumor DP T cells could exert a helper function. To evaluate this hypothesis, we selected three representative DP T-cell populations for functional assays: two with a high CD40L expression (M125 and M265) and one with an intermediary expression level (M305) (Fig. 1D). As positive and negative controls, DP T cells were systematically compared to autologous SP CD4⁺ and SP CD8⁺ T cells. Since it was clearly demonstrated in the literature that CD40L-expressing CD8⁺ T cells can exert helper properties,^{29–31} and as a fraction of autologous SP CD8⁺ TILs expressed a non-negligible amount of CD40L, their use as a negative control was unsuitable. Therefore, sorted CD40L-negative (CD40L⁻) CD8⁺ T cells were used as a proper negative control (Fig. 1D).

Intra-tumor DP T cells induce memory B-cell proliferation and differentiation through the CD40L engagement

We started investigating CD40L functionality by looking at the ability of DP T cells to mediate B-cell help. Allogeneic CD19⁺ B cells were co-cultured with activated DP, SP CD4⁺ or SP CD40L⁻ CD8⁺ T cells; B-cell proliferation was monitored 4 d later by CFSE dilution assay. Pre-activated SP CD4⁺ T cells and, to a lower extent, DP T cells induced B-cell proliferation (Fig. 2A and B). This induction was not achieved with resting SP CD4⁺ and DP T cells (data not shown). As expected,²⁹ SP CD8⁺ CD40L⁻ largely failed to induce B-cell proliferation (Fig. 2A and B). According to the DP T-cell population tested, the B-cell proliferation ranged from 50% to 80%, a result consistent with the CD40L expression levels on each DP T-cell subset. We further investigated whether the B-cell proliferation induced in our co-culture conditions was the result of naive or memory B-cell proliferation. These two B-cell subsets were isolated from CD19⁺ B cells on the basis of CD27 expression³² and individually co-cultured with each activated T-cell subset. SP CD4⁺ T cells and, to a lower extent, DP T cells led to a modest proliferation of naive B cells (Fig. 2A and C). Memory B-cell proliferation was induced by both DP T cells and SP CD4⁺ T cells with a comparable efficiency, whereas SP CD8⁺ CD40L⁻ T cells were still inefficient. With the three DP T-cell populations tested, we obtained an average proliferation rate of naive and memory B cells up to 20% and 60%, respectively (Fig. 2C). To investigate the role of CD40–CD40L interaction in this process, the same experiments were performed in the presence of soluble CD40. Addition of a soluble CD40, added at the beginning of the co-culture, induced a clear decrease in memory B-cell proliferation up to 30% (Fig. 2D). This partial inhibition suggested the involvement of other co-stimulation pathways.

We then studied if, in addition to allow memory B-cell proliferation, DP T cells could support their differentiation into terminally differentiated B cells. Plasma cells

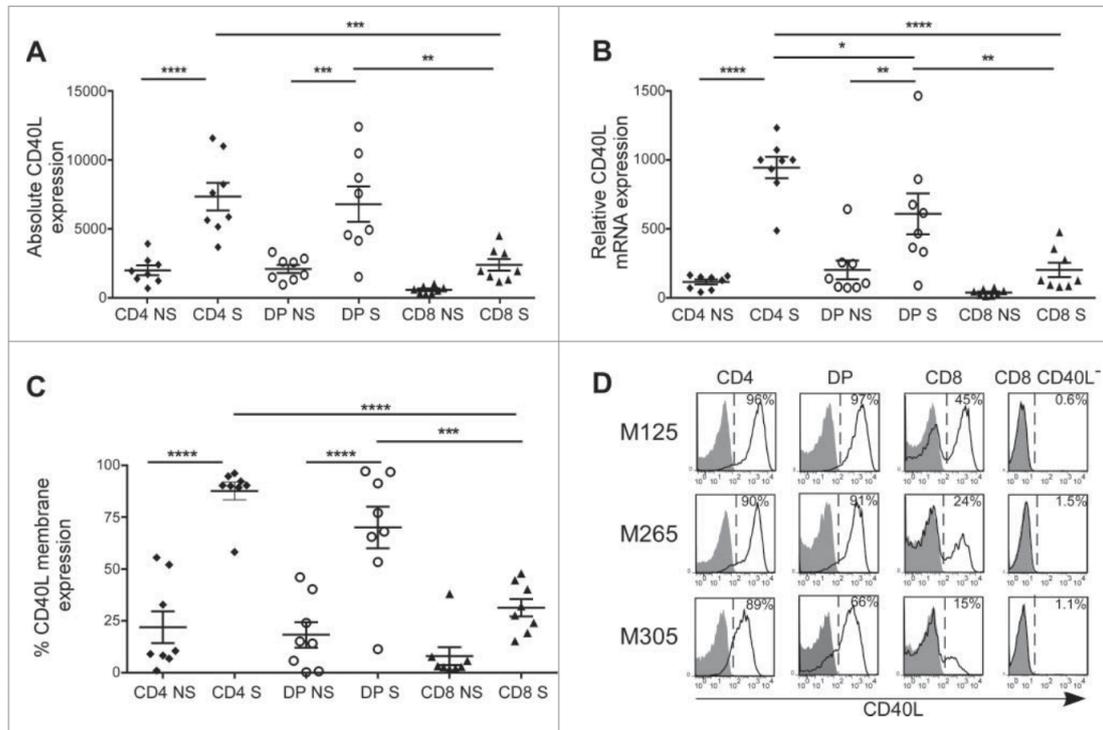


Figure 1. CD40L overexpression is induced on intra-melanoma DP T cells upon activation. CD40L expression of intra-melanoma SP CD4⁺ (black diamonds), DP (white circles) and SP CD8⁺ (black triangles) T-cell lines isolated from TILs, stimulated (S) or not (NS) with anti-CD3 mAb for 6 h was determined by (A) microarray analysis, (B) quantitative RT-PCR analysis and (C) flow cytometry ($n = 8$ melanoma patients). Results are expressed as mean \pm SEM. Statistical analysis was performed using the one-way ANOVA analysis, followed by a Tukey multiple comparison test. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$. (D) Representative flow cytometry staining of CD40L following anti-CD3 activation on the 3 autologous intra-melanoma SP CD4⁺, DP, SP CD8⁺ and SP CD8⁺ CD40L⁻ TIL sub-populations (M125, M265 and M305) selected for further experiments. Cells were co-stained with CD4⁺, CD8 α mAbs and with either the isotype control (filled histogram) or CD40L mAb (open histogram). Numbers indicated represent the percentages of CD40L⁺ cells.

(CD19⁺CD27⁺CD38^{high}CD20^{low}CD138⁻) and terminally differentiated plasma cells (CD19⁺CD27⁺CD38^{high}CD20^{low}CD138⁺) were counted 7 d after the initiation of the co-culture (Fig. 3A). Activated DP T cells induced the development of plasma cells from memory B cells at a level similar to SP CD4⁺ T cells (Fig. 3B). In addition, SP CD4⁺ cells and DP T cells were able to generate terminally differentiated plasma cells, more efficiently than SP CD8⁺ CD40L⁻ T cells. Moreover, B-cell differentiation induced by DP and SP CD4⁺ T cells was associated with the production of IgG (Fig. 3B). Taken together, these results showed that intra-tumor DP T cells share a similar helper potential with intra-tumor SP CD4⁺ T cells to promote B-cell proliferation and differentiation and that this function was partially dependent on CD40L.

Intra-tumor DP T cells allow the maturation of functional DCs able to prime antitumor CD8⁺ T-cell responses

We then evaluated the ability of DP T cells to induce DC activation and efficient cross-priming of antitumor CD8⁺ T cells. Immature DCs differentiated from healthy blood monocytes (Mo-DCs) were co-cultured with activated DP, SP CD4⁺ or SP CD8⁺ T cells for 36 h before analyzing the expression of

maturation markers by flow cytometry. Activated DP T cells strongly induced DC maturation from immature Mo-DCs as illustrated by an increased expression of CD83, CD80, CD86 and HLA-DR compared to immature Mo-DCs alone, whereas SP CD8⁺ CD40L⁻ T cells were poorly effective (Fig. 4A and B). For all DP T-cell populations tested, CD80, CD86 and HLA-DR expression levels were comparable to those of activated SP CD4⁺ T cells. CD83 expression was controversial between the three DP T-cell populations tested with two of them failing in inducing its expression, suggesting that DP T cells induced a less matured DC phenotype than SP CD4⁺ T cells.

We next asked whether direct contact between DP T cells and immature DCs was required to induce DC maturation. Using Transwell plates, we did not observe any phenotypic maturation of the DCs as assessed by the lack of CD83 expression and the low increase of CD80, CD86 and HLA-DR expressions, when immature DCs and activated DP T cells were cultured in separate chambers (Fig. 4C). These data demonstrated that the maturation of DC induced by DP T-cells was dependent on cell-cell contacts, in support of the role of CD40L/CD40L interaction.

To determine whether DP T-cell-matured DCs were functional, we investigated their ability to prime Melan-A-specific

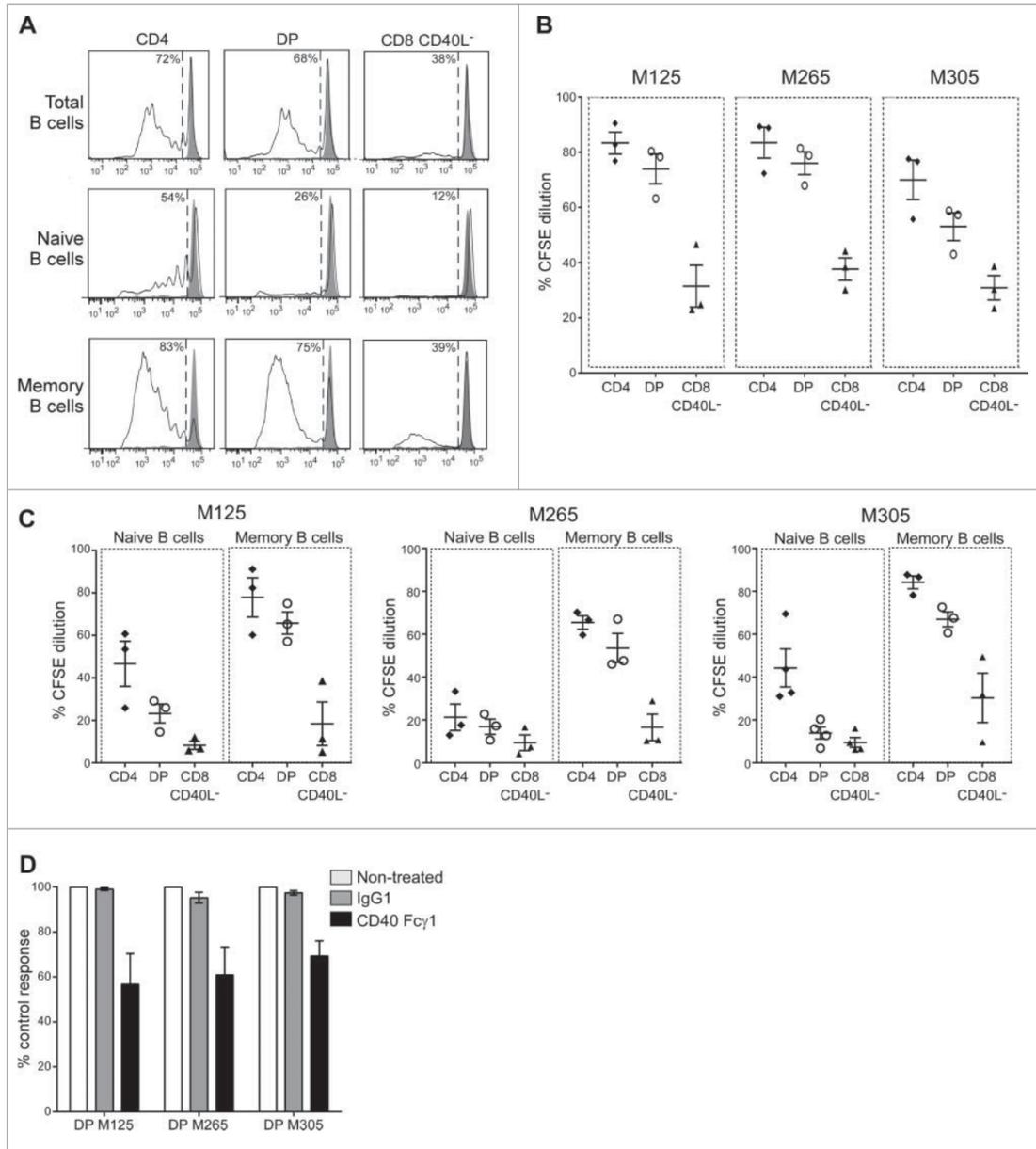


Figure 2. Intra-melanoma DP T cells mediate memory B-cell proliferation through CD40L engagement. Intra-melanoma SP CD4⁺, DP and SP CD8⁺ CD40L⁻ T-cell lines were co-cultured with CFSE-labeled B cells for 4 d at a 1:1 ratio on anti-CD3-coated microwells, and B-cell proliferation was evaluated by flow cytometry gated on CD19⁺ cells. (A) Representative CFSE dilution profiles of total (CD19⁺), naive (CD19⁺CD27⁻) and memory (CD19⁺CD27⁺) B-cell fractions after co-cultured with CD3-activated SP CD4⁺, DP and SP CD8⁺ CD40L⁻ T cells. B cell proliferation was expressed as the percentage of CFSE dilution. Results of total (B), naive or memory (C) B-cell proliferation stimulated with each T-cell subpopulations derived from the three patients M125, M265 and M305 are gathered on a single graph ($n = 3$ independent experiments with three different B-cell donors). (D) Memory B-cell proliferation stimulated with DP T cells derived from M125, M265 and M305 patients in the presence of either recombinant human CD40 Fc γ 1 (black bars), control IgG1 Fc (gray bars) or without treatment (white bars). Results are normalized to the non-treated control condition ($n = 3$ independent experiments with three different B-cell donors).

CD8⁺ T cells. Peripheral blood T lymphocytes from HLA-A2 donors were stimulated with autologous Melan-A16-40L-pulsed-DCs matured with either activated intra-tumor DP or SP CD4⁺ T cells. Melan-A-specific CD8⁺ T cells were

monitored 15 d after the stimulation by Melan-A/A2 tetramer staining. DCs matured in the presence of DP T cells were able to generate Melan-A-specific CD8⁺ T cells with a fraction of positive microcultures ranging from 2% to 19% according to

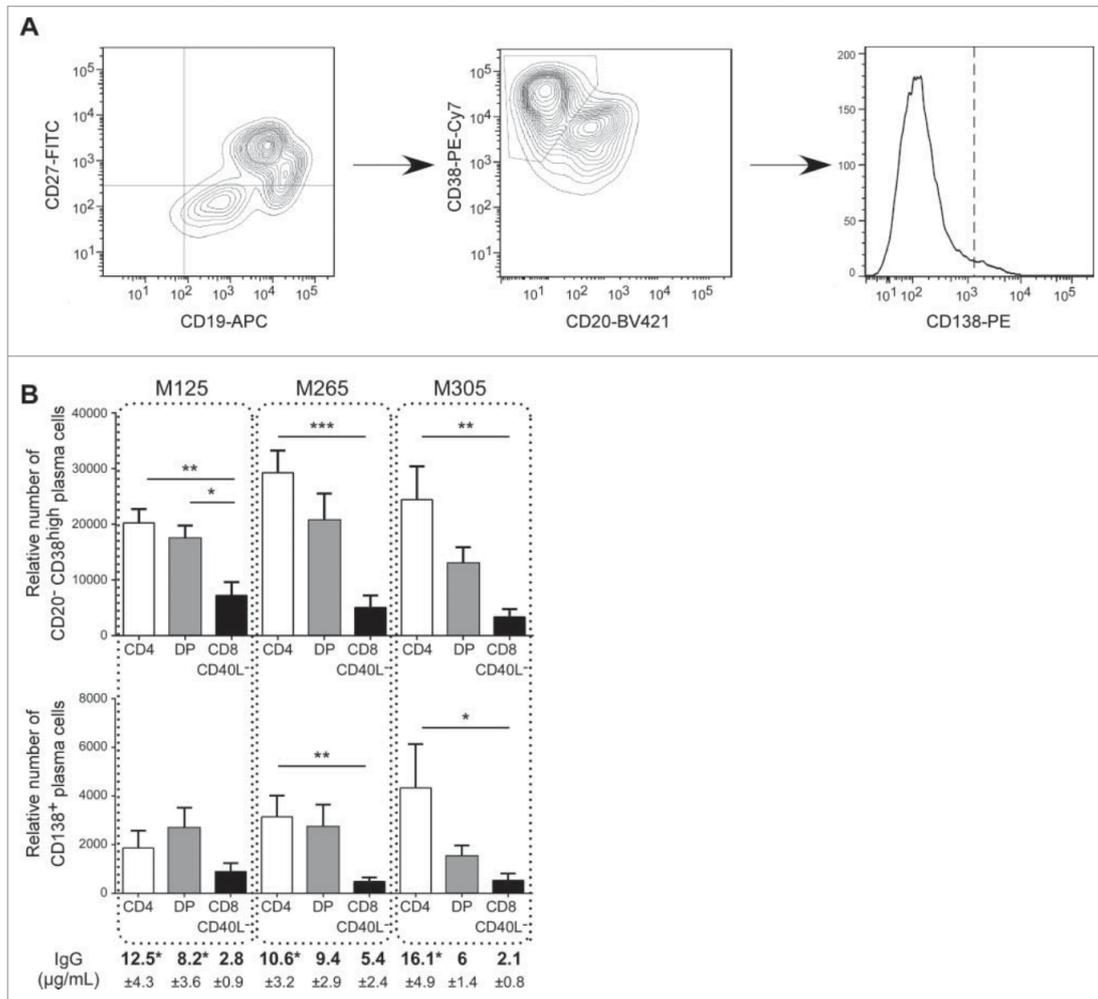


Figure 3. Intra-melanoma DP T cells mediate B-cell differentiation. The differentiation status of B cells was determined by flow cytometry after 7 d of co-culture of sorted memory B cells at a 1:1 ratio with anti-CD3 activated DP, SP CD4⁺ or SP CD8⁺ CD40L⁻. (A) Gating strategy performed on viable cells to discriminate plasma cells (CD19⁺CD27⁺CD38^{high}CD20^{low}CD138⁻) from highly differentiated plasma cells (CD19⁺CD27⁺CD38^{high}CD20^{low}CD138⁺). (B) The relative number of plasma cells and highly differentiated plasma cells was determined using counting beads at the end of the 7 d of memory B cells co-cultured with SP CD4⁺ (white bars), DP (gray bars) or SP CD8⁺ CD40L⁻ (black bars) T-cell subpopulations derived from M125, M265 and M305 melanoma patients ($n = 7$ independent experiments with seven B-cell donors). Supernatants from the same co-cultures were analyzed at day 7 by ELISA for secretion of IgG. Results are expressed as mean \pm SEM. Statistical analysis was performed using the non-parametric Friedman test, followed by Dunn's multiple comparison test. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

TIL populations (Table 1). However, and in agreement with a less mature phenotype, the priming by DP-matured DCs was less efficient than the one induced by SP CD4⁺ T cells (fraction of positive microcultures ranging from 5% to 32%). Nonetheless, among the positive microcultures, the mean percentage of specific T cells obtained in CD4⁺ and DP conditions was quite similar (1.01% and 0.8%, respectively). Both DP and SP CD4⁺ T cells from M305 population generated fewer positive microcultures, a result consistent with a weaker CD40L expression (Fig. 1D). Finally, we evaluated the *in vitro* tumor reactivity of sorted Melan-A-specific CD8⁺ T cells generated with SP CD4⁺-matured-DCs or DP T cell-matured-DCs. In response to Melan-A/HLA-A2-positive melanoma cell line, Melan-A-specific CD8⁺ T cells induced with DP-matured DCs were able

to secrete TNF- α , IFN γ and IL-2 (Fig. 5A) and exhibited an efficient cytotoxic activity as measured by ⁵¹Cr release assay (Fig. 5C). These responses were not observed against Melan-A-negative tumor cell lines (data not shown). Similar cytokine profile (Fig. 5B) and cytotoxic activity (Fig. 5D) were observed with Melan-A-specific CD8⁺ T cells induced with SP CD4⁺-matured DCs. These results demonstrate the efficient helper activity of the DP T cells in priming an antitumor CD8⁺ T-cell response.

Discussion

According to the traditional dichotomy, the CD8⁺ and CD4⁺ co-receptors expression delineates respectively the MHC class-

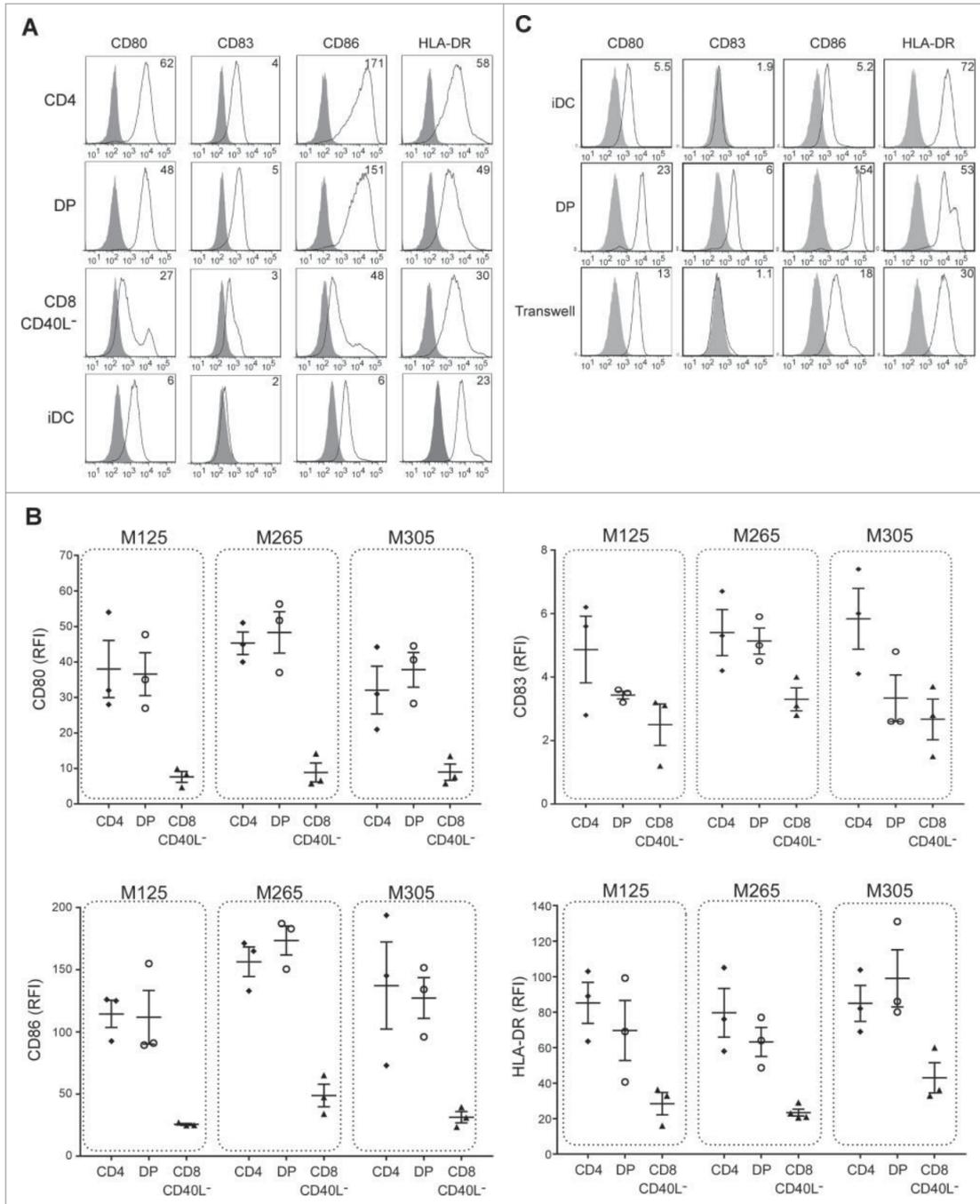


Figure 4. Intra-melanoma DP T cells induce DC maturation in a contact-dependent manner. iDCs were co-cultured for 36 h with intra-melanoma SP CD4⁺, DP and SP CD8⁺ CD40L⁻ T-cell subpopulations pre-stimulated for 6 h with OKT3 at ratio of 1:2, and the expression of maturation markers (CD80, CD83, CD86 and HLA-DR) was determined by flow cytometry. (A) Representative flow cytometry analysis of cell surface expression of different maturation markers. DCs were stained with either the isotype control mAb (filled histogram) or with the indicated maturation marker mAb (open histograms). Results are expressed as the relative fluorescence intensity (RFI). (B) RFI of CD83, CD80, CD86 and HLA-DR expression on DCs after maturation with either SP CD4⁺ (black diamonds), DP (white circles) and SP CD8⁺ CD40L⁻ (black triangles) T-cell subpopulations derived from TIL of M125, M265 and M305 melanoma patients ($n = 3$ independent experiments with three different DC donors). Results are expressed as mean \pm SEM. (C) Representative flow cytometry analysis of DCs maturation profile after co-culture of intra-melanoma DP T cells with iDCs respectively seeded in the upper chamber and in the lower chamber of a Transwell plate at a 1:2 ratio for 36 h. DCs were stained with either the isotype control (filled histograms) or with CD80, CD83, HLA-DR or CD86 mAbs (open histograms). Data are expressed as the RFI. Control experiments included the standard co-culture of Mo-DCs with or without DP T cells.

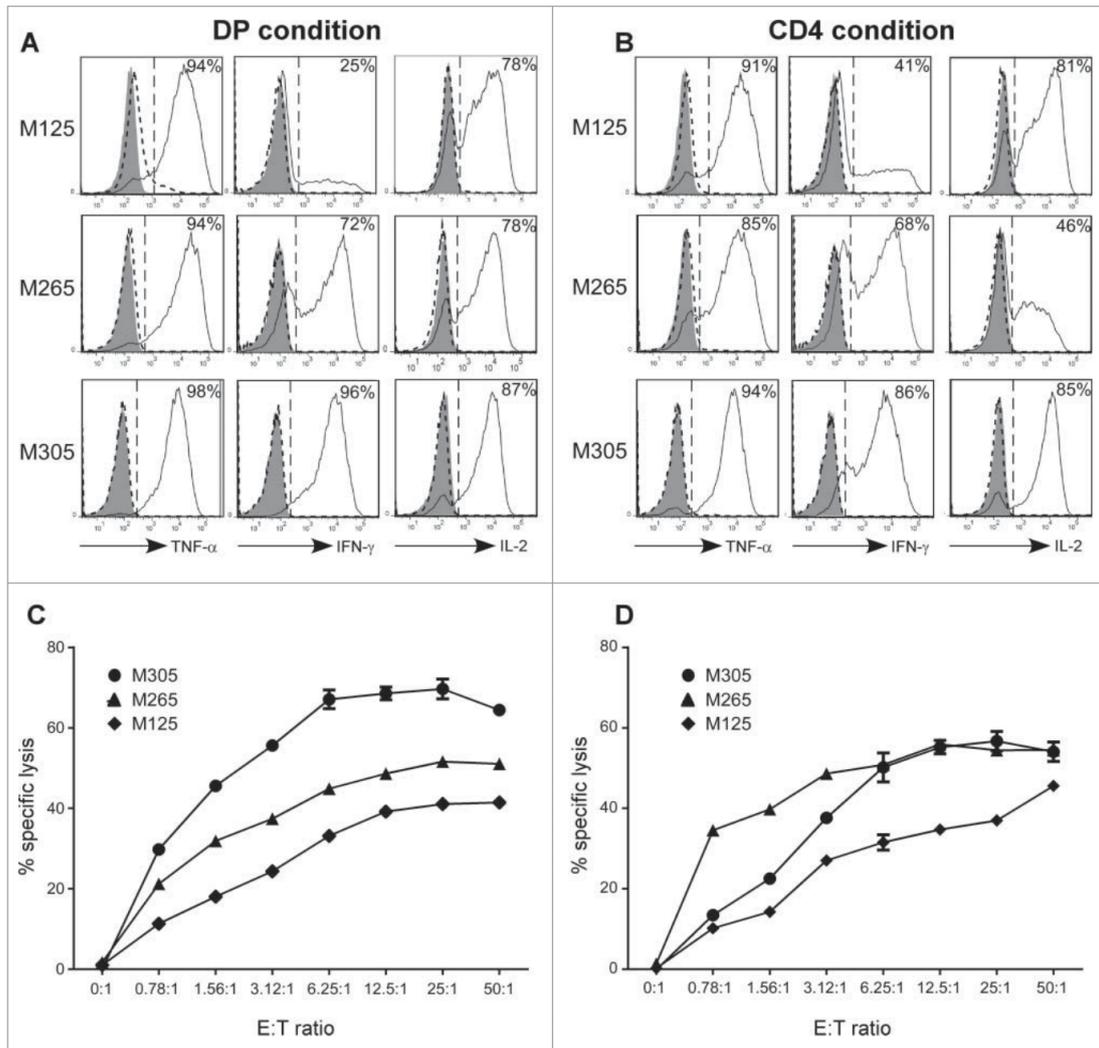


Figure 5. DCs matured with intra-melanoma DP T cells prime antitumor CD8⁺ T-cell responses as efficiently as conventional SP CD4⁺ T cells. CD3 T cells from healthy donors PBMCs were stimulated with Melan-A16-40 A27L peptide loaded HLA-A2⁺ DCs matured with intra-melanoma SP CD4⁺ (A, C) or DP (B, D) T cells derived from M125, M265 and M305 melanoma patients. After two weeks, Melan-A-specific CD8⁺ T cells were sorted and evaluated for their tumor reactivity. (A, B) Production of TNF- α , IFN- γ and IL-2 was determined by flow cytometry on Melan-A-specific CD8⁺ T cells at rest (filled histograms) or stimulated against a Melan-A-negative HLA-A2-positive melanoma cell line (dashed histogram) or a Melan-A/HLA-A2-positive melanoma cell line (solid line histogram). Results are expressed as the percentages of cytokine-positive T cells. (C, D) Cytolytic activity of Melan-A specific CD8⁺ T cells was measured by a ⁵¹Cr release assay at various effector/target ratios against a Melan-A/HLA-A2-positive melanoma-cell line. Results are expressed as the mean percentage of specific lysis \pm SEM in triplicate cultures.

I-restricted cytotoxic and the MHC class-II-restricted helper T-cell lineages. This scheme became outdated with the inclusion of CD4⁺ Treg cells, CD4^{+/−}/CD8^{+/−} NKT cells and non-conventional CD8⁺ innate T cells as independent lineages³³ as well as the description in the periphery of CD4⁺ cytotoxic T cells³⁴ and CD8⁺ helper T cells.²⁹ With this study, we add an additional degree of complexity by ascribing a helper potential to class-I restricted melanoma-infiltrating CD4^{low}CD8^{high} $\alpha\beta$ DP T cells involving the CD40L co-stimulatory molecule.

The CD40L co-stimulatory molecule through its interaction with its cognate receptor CD40 plays a key role in governing

both the humoral and the adaptive immune responses. CD40 is constitutively expressed on all antigen-presenting cells and is also found on T cells as well as non-hematopoietic cells.^{35,36} Overall, CD40 signaling of B cells promotes their activation, proliferation, isotype switching and differentiation into antibody-secreting plasma cells.²⁸ In addition, CD40 ligation triggers DC licensing by promoting their maturation and secretion of the pro-inflammatory cytokine IL-12p70 and thus, allowing an efficient CTL priming. In this context, CD40L is also required to generate memory CTL responses by a direct engagement of CD40 on CD8⁺ T cells.³⁵ Thus, CD40L is a characteristic feature of helper T-cell function and as such, its

Table 1. Distribution of Melan-A-specific T lymphocytes in microcultures of healthy donor T cells stimulated with SP CD4⁺- or DP-matured HLA-A2⁺ DCs.

	CD4 ⁺	DP
M125		
Fraction of positive microcultures (%)	28/96 ^a (29.2%)	15/96 (15.6%)
Mean percentage of specific T cells (% max)	1.37% ^b (9.3%)	1.08% (3.7%)
M265		
Fraction of positive microcultures (%)	36/96 (32.3%)	18/96 (18.7%)
Mean percentage of specific T cells (% max)	0.87% (7%)	0.87% (6.4%)
M305		
Fraction of positive microcultures (%)	5/96 (5.2%)	2/96 (2.1%)
Mean percentage of specific T cells (% max)	0.80% (1.3%)	0.50% (0.5%)

CD3 T cells from healthy donors PBMCs were stimulated with Melan-A16-40 A27L peptide loaded on SP CD4⁺- or DP-matured autologous HLA-A2⁺ Mo-DCs. Intramelanoma SP CD4⁺ or DP T-cell subpopulations isolated from TIL of M125, M265 and M305 melanoma patients. Microcultures positive for Melan-A specific CD8⁺ T cells were identified by flow cytometry after staining with Melan-A/A2 tetramer.

^aRatio of positive to total microcultures.

^bMean percentage of specific CD8⁺ T lymphocytes stained by tetramer among the positive microcultures.

expression was initially thought to be restricted to T cells from the class-II-restricted helper CD4⁺ lineage. Since then, CD40L expression was described on a larger cell panel following activation or under inflammatory conditions and includes, among others, CD8⁺ T cells, NKT cells, mast cells, activated B cells and DCs.²⁸

Using an *in vitro* allogeneic co-culture model dedicated to the evaluation of DP T-cell-mediated B-cell help, we described the ability of activated DP T cells to stimulate the proliferation and differentiation of memory B cells at a level comparable to SP CD4⁺ T cells. Unlike memory B cells that have a reduced threshold of activation and can be activated without BCR signaling, naive B cells require additional signals including BCR and TLR stimulation for their complete activation.³⁷ Therefore, consistently with our co-culture model, we did not observe a major proliferation of naive B cells upon DP T-cell stimulation, which does not exclude this possibility *in vivo* in the presence of adequate additional signals. The use of a CD40 antagonist demonstrated that memory B-cell proliferation was dependent on CD40L engagement. This inhibition was however partial, suggesting that other mechanisms related to the activation status of DP T cells might be involved. Among other molecules, the cytokines IL-2,^{38,39} IL-4,^{40,41} IL-10,^{42,43} IL-13⁴⁴ or IL-21^{45,46} were shown to be required for B-cell proliferation and/or differentiation. We previously showed that melanoma-infiltrating activated DP T cells produced, upon activation, IL-2, TNF- α , IFN γ and GM-CSF and were distinguishable from SP CD4⁺ and CD8⁺ T cells by a cytokine expression profile biased toward IL-13, IL-4 and IL-5 expression.²³ Therefore, IL-2, IL-13 and IL-4 could probably be involved in B-cell proliferation in addition to CD40L engagement as well as an allogeneic BCR recognition. DP T cells also induced B-cell differentiation into IgG-secreting plasma cells with a fraction of them expressing CD138, a marker of terminally differentiated plasma cells.⁴⁷

In the tumor microenvironment, B cells are versatile and can exert both antitumor and regulatory functions.⁴⁸ In melanoma, an immunosuppressive activity was recently attributed to IgG4-positive B cells since IgG4 serum level is associated to a negative prognosis factor.^{49,50} Since DP T cells distinguished themselves from SP T cells by their production of IL-4 and IL-13, and since these cytokines are described to promote IgG4 class switching in B cells,^{51,52} one can argue that DP T cells could promote the expression of IgG4 by B cells and therefore could negatively impact the antitumor immune response. In our co-culture system of naive B cells and activated DP T cells, we neither detect any IgG4 membrane expression (flow cytometry) nor soluble IgG4 production (ELISA), therefore, excluding this hypothesis (data not shown). Regulatory B cells (Bregs) constitute another immunosuppressive B cell subtype found in the infiltrate of several solid tumors and generally associated with an increase tumor progression.⁵³ As the CD40/CD40L interaction is one of the mechanisms described in the induction of B-cell regulatory functions,⁵⁴ we addressed this point through co-culture of naive B cells with activated DP cells. The results did not reveal any B cells expressing a regulatory phenotype (CD19⁺CD24^{high}CD38^{high}) (flow cytometry) no more than the secretion of the immunosuppressive cytokine IL-10 (ELISA) (data not shown). Overall, our results did not support the ability of DP T cells to induce a pro-tumor B-cell phenotype and are in favor of an antitumor function for DP T cells. The activation, proliferation and differentiation of B cells are a specific feature of follicular helper CD4⁺ T cells (Tfh) found in germinal center.⁵⁵ Although DP T cells did not share some Tfh characteristics, such as CXCR5 expression and IL-21 production (data not shown), and are probably less efficient in activating B cells than Tfh, they still present a significant helper activity that can be valuable *in situ* to mediate an antitumor immune response.

In addition, we reported that melanoma-infiltrating DP T cells induced the maturation of DCs able to efficiently prime CD8⁺ anti-melanoma specific responses. Although the phenotypic maturation of DCs was clearly observed (as evidenced by an increased expression of CD83, CD80, CD86 and HLA-DR increased expression), we did not detect any IL-12p70 secretion by DCs matured in the presence of DP T cells and either with our SP CD4⁺ T cells. However, both populations produced IFN- γ that in combination with CD40L/CD40 engagement was described as necessary for IL-12p70 synthesis.⁵⁶ This could be explained by the lack of additional signal(s), such as TLR signaling that has been reported to contribute to IL-12p70 production.^{57,58} Furthermore, we demonstrated, using a Transwell assay, that the maturation of DC by DP T cells was dependent on cell-contact, in support of the role of CD40/CD40L interaction.

Although CD40L expression is mainly associated to helper CD4⁺ T cells, early *in vitro* studies described that a subset of CD8⁺ T cells can also induce, upon activation, the expression of CD40L able both to induce the differentiation of B cells into IgG-secreting plasma cells³⁰ and to induce DC maturation.⁵⁸ Recent *in vivo* studies confirmed the existence of such CD4⁺ helper-independent CTL^{59,60} that are characterized in human as a memory T-cell population displaying a cytokine expression profile similar to conventional helper CD4⁺ T cells.²⁹ It has been hypothesized that CD40L expression by CD8⁺ T cells

might result from a strong TCR avidity for its peptide-MHC complex in combination with the presence of pro-inflammatory cytokines, such as IL-12.⁶¹ It was recently described *in vitro* and *in vivo* that some highly immunogenic CD8⁺ T-cell peptides could act as helper epitopes.⁶⁰ Whether CD40L expression by DP T cells is an original feature or results from DP T-cell activation with such epitopes in the periphery remains to be established.

In conclusion, intra-melanoma DP T-cell population could supplement the conventional CD4⁺ helper T-cell function and actively participate in shaping antitumor immunity. First, it will contribute to the maturation of DCs directly in the tumor microenvironment, which would lead to the promotion of antitumor immune T-cell responses. Second, it will enhance B-cell infiltration and activation, which by antibody secretion, antigen presentation, tertiary lymphoid structure formation or direct killing of tumor cells could potentiate the antitumor immune response.⁶² This scheme is consistent with the view that tumor infiltration by activated B cells has been reported to be associated with a better prognosis, especially when combined with CD4⁺ or CD8⁺ tumor infiltration.⁶³⁻⁶⁵ Moreover, as we previously reported that IL-9 promotes the function of intra-melanoma DP T cells,²⁷ this cytokine may also foster DP helper functions. In support, we observed that IL-9 enhances CD40L expression level on DP T cells (data not shown). Finally, it should be pointed out that due to their HLA class I restriction, CD4^{low}CD8^{high} $\alpha\beta$ DP T cells could fulfill their helper function even in HLA class II-negative tumors.

Materials and methods

PBMCs and cell lines

PBMCs were isolated from HLA-A2-positive healthy donors (Etablissement Français du Sang (EFS), Nantes, France), and PBL and monocytes fractions were isolated by elutriation (DTC facility, Nantes).

All melanoma cell lines were cultured in RPMI-1640 medium supplemented with 10% heat-inactivated fetal calf serum (FCS) (Gibco, 31870-025), 2 nM L-glutamine (Gibco, 25030-024), 100 U/mL penicillin and 0.1 mg/mL streptomycin (Gibco, 15140-122). They have been established in the GMP Unit of Cellular Therapy (PCU892-NL biocollection, CHU Nantes). This biocollection was approved by the local ethic committee of Nantes hospital (GNDES) and registered under the CNIL number "1278197".

Generation of tumor-infiltrating DP, SP CD4⁺ and SP CD8⁺ T-cell lines and culture

TILs were previously obtained from tumor-invaded lymph nodes of eight melanoma patients (M125, M256, M261, M265, M288, M291, M298, M305, M314 and M329). TILs were expanded by stimulation with PHA-L (Sigma-Aldrich, L4144) and 150 U/mL human rIL-2 (Proleukin, Novartis) in the presence of allogeneic irradiated feeder cells (PBMCs and B-EBV B cells) in RPMI-1640 medium supplemented with 8% human serum (local production), 2 mM L-glutamine, 100 U/mL penicillin and 0.1 mg/mL streptomycin, as previously described.⁶⁶

Pure DP, SP CD4⁺ and SP CD8⁺ T-cell polyclonal populations were generated by cell sorting using a BD FACSAria III cell sorter (BD Biosciences). TILs were stained with APC-conjugated anti-CD4⁺ MAB (Clone SK3, BD Biosciences, 340672) and BV421-conjugated anti-CD8⁺ mAb (Clone RPA-T8, BD Biosciences, 562428) for 30 min at 4°C in PBS 0.1% BSA and then washed two times in PBS 0.1% BSA (Sigma-Aldrich, A9576) before cell sorting. To ensure that DP T-cell phenotype does not result from doublets of SP T cells, doublets were excluded using FSC-A/FSC-H and SSC-A/SSC-H dot plots. The purity of each sorted T-cell population was checked right after cell-sorting and routinely by flow cytometry. After 24 h, sorted cell populations were amplified in culture as described above. In order to isolate SP CD8⁺ CD40L⁻ T cells, SP CD8⁺ T cells were stimulated for 6 h by anti-CD3 stimulation (1 μ g/mL, local production) in the presence of anti-CD40L-mAb (Clone 24-31, BioLegend, BLE310802), and FACS-sorted.

Microarray analysis

Total RNA was extracted from 5×10^6 sorted DP, SP CD4⁺ and SP CD8⁺ TIL populations from eight melanoma patients. After cell lysis with Trizol reagent (Life Technologies, 15596026), total RNA was extracted using the RNeasy Micro kit (Qiagen, 74004) and quantified using a Nanodrop ND-1000 spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific, Inc.) according to manufacturer's recommendations. Integrity of the extracted RNAs was assessed with a Bioanalyzer 2100 using the RNA6000 Nano kit (Agilent Technologies, Inc.). An RNA integrity number (RIN) greater or equal to 7.00 was achieved for all samples. No sign of DNA contamination was detected. The starting amount of total RNA used for the reactions was 400 ng per sample. The Illumina Total Prep RNA Amplification kit (Ambion, Life Technologies, AML1791) was used to generate biotinylated, amplified cRNA according to the manufacturer's recommendations. Hybridization on Illumina HumanHT-12 v3 Expression BeadChips, staining and detection of cRNAs with the I-Scan system were performed according to manufacturer's protocol (Illumina, Inc.). The HumanHT-12 v3 Expression BeadChip assesses a total of 48,803 marker probes, of which 27,455 are NM coding transcripts; and 7,870 are XM coding transcripts (RefSeq Content, Build 36.2, Release 22). It also contains 12,837 experimentally confirmed mRNA sequences that align to EST clusters (UniGene, Build 199). This entire process was performed in duplicate. GenomeStudio 2011 v1 and its Expression Analysis Module (version 1.9.0) were used for signal extraction and quantile normalization (Illumina, Inc.). Omics Explorer 3.2 software (Qlucore AB) was used on log-transformed data for hierarchical clustering analysis, and paired *t*-test comparisons with adjusted *p*-values (or *q*-values).

Analysis of transcript expression

Total RNA from different TIL sub-populations, prepared as described above, was reverse transcribed using the Superscript II reverse transcriptase (Life Technologies, 18064014). The expression of CD40L mRNA was analyzed by quantitative RT-PCR. Amplification was done by using iQ SYBR Green Supermix (Bio-Rad, 1708880). Relative gene expression was

calculated using the $\Delta\Delta C_t$ method with ΔC_t values calculated from the sample with the largest C_t (fewest gene copies) and then normalized against the GAPDH (determined as the most stably expressed housekeeping gene using the geNorm method). Primer sequences are available upon request.

CD40L membrane expression

Intra-melanoma DP, SP CD4⁺ and SP CD8⁺ TILs were stimulated for 6 h with coated anti-CD3 mAb (1 μ g/mL, OKT3) before being stained with anti-CD40L mAb or isotype control mAb (Clone MOPC-21, BioLegend, 400101) for 20 min at 4°C in PBS 0.1% BSA. CD40L membrane expression was analyzed on BD FACSCanto II (BD Biosciences). Relative fluorescence intensity (RFI) was calculated as sample mean fluorescence intensity divided by isotype control mean fluorescence intensity.

B-cell helper assay

CD19⁺ B cells were isolated from healthy donors PBMCs by negative immunomagnetic selection (STEMCELL Technologies, 19054) and cultured in RPMI supplemented with 10% SVF. After 24 h, naive (CD27⁻) and memory B (CD27⁺) cell fractions were then separated with anti-human-CD27 microbeads (Miltenyi Biotec, 130-051-601). For proliferation assay, B cells were labeled with 1 μ M CFSE (Invitrogen, C34554) for 10 min at 37°C and incubated in RPMI 10% FBS at a 1:1 ratio with intra-melanoma SP CD4⁺, DP and SP CD8⁺ CD40L⁻ T-cell subpopulations pre-irradiated at 35 Gy. The co-cultures were performed in microwells, pre-coated or not with anti-CD3 mAb (1 μ g/mL, OKT3) to induce T-cell activation. At day 4, cells were recovered and stained with anti-CD19-APC mAb and Zombie NIRTM viability dye (BioLegend, 423105) before analysis on a BD FACS Canto II cytometer (BD Biosciences).

For the blockade of CD40L/CD40 interactions, 10 μ g/mL of recombinant human CD40 Fc chimera protein (R&D Systems, 1493-CD-050) was added at the beginning of T-cell-B-cell co-culture. The recombinant human IgG1 Fc chimera protein (R&D Systems, 110-HG-100) was used as a negative control. For differentiation assay, unlabeled memory B cells were cultured as described above for 7 d and stained with anti-CD19-APC (Clone SJ25C1, 363029), anti-CD20-BV421 (Clone 2H7, 302329), anti-CD38-PE-Cy7 (Clone HIT2, BioLegend, 303516), anti-CD27-FITC (Clone M-T271, 555440) and anti-CD138-PE (BD Biosciences, Clone MI15, 347215) mAbs. At day 7, supernatants were collected and the level of IgG was quantified with the human IgG ELISA kit (eBioscience, 88-50550-22) according to the manufacturer's instructions.

DC maturation assay

Monocytes were obtained by elutriation (DTC Facility, Federative Structure Research François Bonamy, Nantes) and differentiated into immature monocyte-derived DCs (Mo-DCs) in RPMI containing 2% human albumin, GM-CSF (1,000 U/mL, CellGenix, 1412-050) and IL-4 (200 U/mL, CellGenix, 1003-050) for 5 d. Then, immature Mo-DCs (iDCs) were cultured at a 1:2 ratio in a 24-well plate for 36 h with intra-melanoma SP CD4⁺ or DP T-cell subpopulations pre-activated for 6 h with

anti-CD3 mAb (1 μ g/mL, OKT3). DC maturation was analyzed by flow cytometry after staining with anti-CD80-PE (Clone 2D10, 305207), anti-CD83-FITC (Clone HB15e, 305305), anti-CD86-PE anti-HLA-DR-PE (Clone LN3, 327007) mAbs and their respective isotype controls (BioLegend). To evaluate the cell contact dependency of DC maturation, iDCs were seeded at a 1:2 ratio into the bottom chamber of a 24-well Transwell (0.4 μ m pores) plate (Costar, 3413), whereas pre-activated intra-melanoma DP T cells were seeded into the upper chamber. After 36 h, DC maturation profile was evaluated by flow cytometry as described above.

Priming of Melan-A specific CD8⁺ T-cell responses

For CD8⁺ T-cell priming, HLA-A2⁺ DCs were pulsed with the modified Melan-A16-40 A27L peptide for 24 h before maturation with activated T-cell subsets. This modified long peptide was chosen for its ability to generate the highly immunogenic class-I-restricted Melan-A26-35 ELAGIGILTV epitope (carrying the substitution of Ala for Leu at position 2 from the NH₂ terminus hereafter A27L) that forms stable complexes with HLA-A*0201, conferring it a more immunogenic potential than the natural Melan-A peptide. The superior efficiency of cross-priming with this long peptide loaded on DC has already been documented in comparison with the non-modified peptide.⁶⁷ DCs were then separated from the remaining allogeneic T cells with anti-CD3-positive immunomagnetic selection (eBioscience, 8802-6830-74) and cultured at a 1:10 ratio with autologous CD3⁺ T cells enriched by anti-CD3-negative selection (STEMCELL Technologies, 19051) in RPMI 8% human serum and 50 U/mL IL-2. At day 15, Melan-A-specific CD8⁺ T cells were detected using tetramer (Recombinant Protein Facility, Federative Structure Research François Bonamy, Nantes) labeling. Microcultures were considered positive when the percentage of Melan-A-specific CD8⁺ T cells was \geq 0.2%.

Melan-A-specific CD8⁺ T-cell sorting and functional evaluation

Sorting and amplification of Melan-A-specific CD8⁺ T cells were performed as previously described.⁶⁸ Melan-A-specific CD8⁺ T cells were stimulated against HLA-A2⁺ Melan-A⁺ M113 and HLA-A2⁺ Melan-A⁻ M25 melanoma cell lines at a 1:2 ratio for 6 h in the presence of 10 μ g/mL Brefeldin A (Sigma, B7651). After fixation with PBS 4% paraformaldehyde (VWR, 100504-858) for 10 min, cells were stained with anti-TNF- α -APC (Clone cA2, 130-098-882), anti-IFN- γ -APC (Clone 45-15, 130-097-944) (Miltenyi Biotec) or anti-IL-2-PE (Clone 5344.111, BD Biosciences, 340450) mAbs for 30 min in PBS 0.1% BSA and 0.1% saponin (Sigma-Aldrich).

Cytolytic activity of Melan-A-specific CD8⁺ T cells was tested against the ⁵¹Cr-labeled M113 melanoma cell line. Briefly, 1 \times 10⁶ M113 cells were labeled with 100 μ Ci of Na₂CrO₄ (2,77MBq) (NEZ030, PerkinElmer) for 1 h at 37°C. After five washes in RPMI 1640 10% FCS, ⁵¹Cr-labeled M113 cells were plated at 1 \times 10³ cells/well. 5 \times 10⁴-0.7 \times 10³ Melan-A-specific CD8⁺ T cells were added (50:1-0.78:1 effector/target ratios). After 4 h at 37°C, 25 μ L of supernatants was mixed with 100 μ L of scintillation liquid (Optiphase Supermix,

Wallack) for measurement of radioactive content on a beta plate counter (Microbeta Jet 1450, PerkinElmer). Percentage of target cell lysis was calculated according to the following formula: $[(\text{experimental release} - \text{spontaneous release}) / (\text{maximum release} - \text{spontaneous release})] \times 100$. Maximum and spontaneous releases were respectively determined by adding 0.1% Triton X-100 or RPMI 1640 10% FCS on ^{51}Cr -labeled M113 cells.

Disclosure of potential conflicts of interest

No potential conflicts of interest were disclosed.

Acknowledgments

We thank the Recombinant Protein Facility for HLA-A2/peptide monomers' production, the Clinical Development and Transfer DTC Facility for monocyte production and the Cytometry Facility « CytoCell » for expert technical assistance all from the Federative Structure Research François Bonamy, Nantes.

Funding

This work was supported by grants awarded by the "Cancéropôle Grand Ouest" and the "Région Pays de la Loire." This work was realized in the context of the LabEX IGO program supported by the National Research Agency via the investment of the future program ANR-11-LABX-0016-01. Tiphaine Parrot was supported by an allocation from the «Ligue Nationale contre le Cancer».

References

- Blue ML, Daley JF, Levine H, Branton KR, Jr., Schlossman SF. Regulation of CD4 and CD8 surface expression on human thymocyte subpopulations by triggering through CD2 and the CD3-T cell receptor. *J Immunol* 1989; 142:374-80; PMID:2783435
- Ortolani C, Forti E, Radin E, Cibin R, Cossarizza A. Cytofluorimetric identification of two populations of double positive (CD4+,CD8+) T lymphocytes in human peripheral blood. *Biochem Biophys Res Commun* 1993; 191:601-9; PMID:8461016; <http://dx.doi.org/10.1006/bbrc.1993.1260>
- Blue ML, Daley JF, Levine H, Schlossman SF. Coexpression of T4 and T8 on peripheral blood T cells demonstrated by two-color fluorescence flow cytometry. *J Immunol* 1985; 134:2281-6; PMID:2982943
- Nascimbeni M, Shin EC, Chiriboga L, Kleiner DE, Rehmann B. Peripheral CD4(+)CD8(+) T cells are differentiated effector memory cells with antiviral functions. *Blood* 2004; 104:478-86; PMID:15044252; <http://dx.doi.org/10.1182/blood-2003-12-4395>
- Parel Y, Chizzolini C. CD4+ CD8+ double positive (DP) T cells in health and disease. *Autoimmun Rev* 2004; 3:215-20; PMID:15110234; <http://dx.doi.org/10.1016/j.autrev.2003.09.001>
- Zloza A, Al-Harhi L. Multiple populations of T lymphocytes are distinguished by the level of CD4 and CD8 coexpression and require individual consideration. *J Leukoc Biol* 2006; 79:4-6; PMID:16380600; <http://dx.doi.org/10.1189/jlb.0805455>
- Bonomo A, Kehn PJ, Shevach EM. Premature escape of double-positive thymocytes to the periphery of young mice. Possible role in autoimmunity. *J Immunol* 1994; 152:1509-14; PMID:8120365
- Jimenez E, Sacedon R, Vicente A, Hernandez-Lopez C, Zapata AG, Varas A. Rat peripheral CD4+CD8+ T lymphocytes are partially immunocompetent thymus-derived cells that undergo post-thymic maturation to become functionally mature CD4+ T lymphocytes. *J Immunol* 2002; 168:5005-13; PMID:11994452; <http://dx.doi.org/10.4049/jimmunol.168.10.5005>
- Paliard X, Malefijt RW, de Vries JE, Spits H. Interleukin-4 mediates CD8 induction on human CD4+ T-cell clones. *Nature* 1988; 335:642-4; PMID:3262830; <http://dx.doi.org/10.1038/335642a0>
- Sullivan YB, Landay AL, Zack JA, Kitchen SG, Al-Harhi L. Upregulation of CD4 on CD8+ T cells: CD4^{dim}CD8^{bright} T cells constitute an activated phenotype of CD8+ T cells. *Immunology* 2001; 103:270-80; PMID:11454056; <http://dx.doi.org/10.1046/j.1365-2567.2001.01243.x>
- Giraldo NA, Bolanos NI, Cuellar A, Guzman F, Uribe AM, Bedoya A, Olaya N, Cucunubá ZM, Roa N, Rosas F et al. Increased CD4+/CD8+ double-positive T cells in chronic Chagasic patients. *PLoS Negl Trop Dis* 2011; 5:e1294; PMID:21886854; <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pntd.0001294>
- Nascimbeni M, Pol S, Saunier B. Distinct CD4+ CD8+ double-positive T cells in the blood and liver of patients during chronic hepatitis B and C. *PLoS One* 2011; 6:e20145; PMID:21647449; <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0020145>
- Weiss L, Roux A, Garcia S, Demouchy C, Haeflner-Cavaillon N, Kazatchkine MD, Gougeon ML. Persistent expansion, in a human immunodeficiency virus-infected person, of V beta-restricted CD4+CD8+ T lymphocytes that express cytotoxicity-associated molecules and are committed to produce interferon-gamma and tumor necrosis factor-alpha. *J Infect Dis* 1998; 178:1158-62; PMID:9806050; <http://dx.doi.org/10.1086/515674>
- Zloza A, Schenkel JM, Tenorio AR, Martinson JA, Jeziorczak PM, Al-Harhi L. Potent HIV-specific responses are enriched in a unique subset of CD8+ T cells that coexpresses CD4 on its surface. *Blood* 2009; 114:3841-53; PMID:19700667; <http://dx.doi.org/10.1182/blood-2009-02-202481>
- Parel Y, Aurrand-Lions M, Scheja A, Dayer JM, Roosnek E, Chizzolini C. Presence of CD4+CD8+ double-positive T cells with very high interleukin-4 production potential in lesional skin of patients with systemic sclerosis. *Arthritis Rheum* 2007; 56:3459-67; PMID:17907151; <http://dx.doi.org/10.1002/art.22927>
- Quandt D, Rothe K, Scholz R, Baerwald CW, Wagner U. Peripheral CD4CD8 double positive T cells with a distinct helper cytokine profile are increased in rheumatoid arthritis. *PLoS One* 2014; 9:e93293; PMID:24667579; <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0093293>
- Waschbisch A, Sammet L, Schroder S, Lee DH, Barrantes-Freer A, Stadelmann C, Linker RA. Analysis of CD4+ CD8+ double-positive T cells in blood, cerebrospinal fluid and multiple sclerosis lesions. *Clin Exp Immunol* 2014; 177:404-11; PMID:24730443; <http://dx.doi.org/10.1111/cei.12345>
- Carton J, Byrne B, Madrigal-Estebas L, O'Donoghue DP, O'Farrelly C. CD4+CD8+ human small intestinal T cells are decreased in coeliac patients, with CD8 expression downregulated on intra-epithelial T cells in the active disease. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2004; 16:961-8; PMID:15371918; <http://dx.doi.org/10.1097/00042737-200410000-00003>
- Sarrabayrouse G, Bossard C, Chauvin JM, Jarry A, Meurette G, Quevrain E, Bridonneau C, Preisser L, Asehnoune K, Labarrière N et al. CD4CD8alpha lymphocytes, a novel human regulatory T cell subset induced by colonic bacteria and deficient in patients with inflammatory bowel disease. *PLoS Biol* 2014; 12:e1001833; PMID:24714093; <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pbio.1001833>
- Senju M, Wu KC, Mahida YR, Jewell DP. Coexpression of CD4 and CD8 on peripheral blood T cells and lamina propria T cells in inflammatory bowel disease by two colour immunofluorescence and flow cytometric analysis. *Gut* 1991; 32:918-22; PMID:1885074; <http://dx.doi.org/10.1136/gut.32.8.918>
- Bagot M, Echchakir H, Mami-Chouaib F, Delfau-Larue MH, Charue D, Bernheim A, Chouaib S, Boumsell L, Bensussan A. Isolation of tumor-specific cytotoxic CD4+ and CD4+CD8dim+ T-cell clones infiltrating a cutaneous T-cell lymphoma. *Blood* 1998; 91:4331-41; PMID:9596682
- Desfrancois J, Derre L, Corvaisier M, Le Mevel B, Catros V, Jotereau F, Gervois N. Increased frequency of nonconventional double positive CD4CD8 alphabeta T cells in human breast pleural effusions. *Int J Cancer* 2009; 125:374-80; PMID:19358272; <http://dx.doi.org/10.1002/ijc.24366>

23. Desfrancois J, Moreau-Aubry A, Vignard V, Godet Y, Khammari A, Dreno B, Jotereau F, Gervois N. Double positive CD4CD8 alphabeta T cells: a new tumor-reactive population in human melanomas. *PLoS One* 2010; 5:e8437; PMID:20052413; <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0008437>
24. Rahemtullah A, Reichard KK, Preffer FI, Harris NL, Hassserjian RP. A double-positive CD4+CD8+ T-cell population is commonly found in nodular lymphocyte predominant Hodgkin lymphoma. *Am J Clin Pathol* 2006; 126:805-14; PMID:17050078; <http://dx.doi.org/10.1309/Y8KD32QGRYFN1XQX>
25. Sarabayrouse G, Corvaisier M, Ouisse LH, Bossard C, Le Mevel B, Potiron L, Meurette G, Gervois N, Jotereau F. Tumor-reactive CD4+ CD8alphabeta+ CD103+ alphabetaT cells: a prevalent tumor-reactive T-cell subset in metastatic colorectal cancers. *Int J Cancer* 2011; 128:2923-32; PMID:20824715; <http://dx.doi.org/10.1002/ijc.25640>
26. Overgaard NH, Jung JW, Steptoe RJ, Wells JW. CD4+/CD8+ double-positive T cells: more than just a developmental stage? *J Leukoc Biol* 2015; 97:31-8; PMID:25360000; <http://dx.doi.org/10.1189/jlb.1RU0814-382>
27. Parrot T, Allard M, Oger R, Benlalam H, Raingard de la Bletiere D, Coutolleau A, Preisser L, Desfrancois J, Khammari A, Dréno B et al. IL-9 promotes the survival and function of human melanoma-infiltrating CD4(+) CD8(+) double-positive T cells. *Eur J Immunol* 2016; 46:1770-82; PMID:27094152; <http://dx.doi.org/10.1002/eji.201546061>
28. van Kooten C, Banchereau J. CD40-CD40 ligand. *J Leukoc Biol* 2000; 67:2-17; PMID:10647992
29. Frensch M, Stark R, Matzmohr N, Meier S, Durlanik S, Schulz AR, Stervbo U, Jürchott K, Gebhardt F, Heine G, et al. CD40L expression permits CD8+ T cells to execute immunologic helper functions. *Blood* 2013; 122:405-12; PMID:23719298; <http://dx.doi.org/10.1182/blood-2013-02-483586>
30. Hermann P, Van-Kooten C, Gaillard C, Banchereau J, Blanchard D. CD40 ligand-positive CD8+ T cell clones allow B cell growth and differentiation. *Eur J Immunol* 1995; 25:2972-7; PMID:7589100; <http://dx.doi.org/10.1002/eji.1830251039>
31. Lane P, Trauneker A, Hubele S, Inui S, Lanzavecchia A, Gray D. Activated human T cells express a ligand for the human B cell-associated antigen CD40 which participates in T cell-dependent activation of B lymphocytes. *Eur J Immunol* 1992; 22:2573-8; PMID:1382991; <http://dx.doi.org/10.1002/eji.1830221016>
32. Klein U, Rajewsky K, Kuppers R. Human immunoglobulin (Ig) M+IgD+ peripheral blood B cells expressing the CD27 cell surface antigen carry somatically mutated variable region genes: CD27 as a general marker for somatically mutated (memory) B cells. *J Exp Med* 1998; 188:1679-89; PMID:9802980; <http://dx.doi.org/10.1084/jem.188.9.1679>
33. Berg LJ. Signalling through TEC kinases regulates conventional versus innate CD8(+) T-cell development. *Nat Rev Immunol* 2007; 7:479-85; PMID:17479128; <http://dx.doi.org/10.1038/nri2091>
34. Cheroutre H, Husain MM. CD4 CTL: living up to the challenge. *Semin Immunol* 2013; 25:273-81; PMID:24246226; <http://dx.doi.org/10.1016/j.smim.2013.10.022>
35. Bourgeois C, Rocha B, Tanchot C. A role for CD40 expression on CD8+ T cells in the generation of CD8+ T cell memory. *Science* 2002; 297:2060-3; PMID:12242444; <http://dx.doi.org/10.1126/science.1072615>
36. Schonbeck U, Libby P. The CD40/CD154 receptor/ligand dyad. *Cell Mol Life Sci* 2001; 58:4-43; PMID:11229815; <http://dx.doi.org/10.1007/PL00000776>
37. Ruprecht CR, Lanzavecchia A. Toll-like receptor stimulation as a third signal required for activation of human naive B cells. *Eur J Immunol* 2006; 36:810-6; PMID:16541472; <http://dx.doi.org/10.1002/eji.200535744>
38. Le Gallou S, Caron G, Delalay C, Rossille D, Tarte K, Fest T. IL-2 requirement for human plasma cell generation: coupling differentiation and proliferation by enhancing MAPK-ERK signaling. *J Immunol* 2012; 189:161-73; PMID:22634617; <http://dx.doi.org/10.4049/jimmunol.1200301>
39. Mingari MC, Gerosa F, Carra G, Accolla RS, Moretta A, Zubler RH, Waldmann TA, Moretta L. Human interleukin-2 promotes proliferation of activated B cells via surface receptors similar to those of activated T cells. *Nature* 1984; 312:641-3; PMID:6438535; <http://dx.doi.org/10.1038/312641a0>
40. Howard M, Farrar J, Hilfiker M, Johnson B, Takatsu K, Hamaoka T, Paul WE. Identification of a T cell-derived b cell growth factor distinct from interleukin 2. *J Exp Med* 1982; 155:914-23; PMID:6977612; <http://dx.doi.org/10.1084/jem.155.3.914>
41. Kindler V, Zubler RH. Memory, but not naive, peripheral blood B lymphocytes differentiate into Ig-secreting cells after CD40 ligation and costimulation with IL-4 and the differentiation factors IL-2, IL-10, and IL-3. *J Immunol* 1997; 159:2085-90; PMID:9278293
42. Arpin C, Dechanet J, Van Kooten C, Merville P, Grouard G, Briere F, Banchereau J, Liu YJ. Generation of memory B cells and plasma cells in vitro. *Science* 1995; 268:720-2; PMID:7537388; <http://dx.doi.org/10.1126/science.7537388>
43. Choe J, Choi YS. IL-10 interrupts memory B cell expansion in the germinal center by inducing differentiation into plasma cells. *Eur J Immunol* 1998; 28:508-15; PMID:9521060; [http://dx.doi.org/10.1002/\(SICI\)1521-4141\(199802\)28:02%3c508::AID-IMMU508%3e3.0.CO;2-I](http://dx.doi.org/10.1002/(SICI)1521-4141(199802)28:02%3c508::AID-IMMU508%3e3.0.CO;2-I)
44. Cocks BG, de Waal Malefyt R, Galizzi JP, de Vries JE, Aversa G. IL-13 induces proliferation and differentiation of human B cells activated by the CD40 ligand. *Int Immunol* 1993; 5:657-63; PMID:7688562; <http://dx.doi.org/10.1093/intimm/5.6.657>
45. Good KL, Bryant VL, Tangye SG. Kinetics of human B cell behavior and amplification of proliferative responses following stimulation with IL-21. *J Immunol* 2006; 177:5236-47; PMID:17015709; <http://dx.doi.org/10.4049/jimmunol.177.8.5236>
46. Kuchen S, Robbins R, Sims GP, Sheng C, Phillips TM, Lipsky PE, Ettinger R. Essential role of IL-21 in B cell activation, expansion, and plasma cell generation during CD4+ T cell-B cell collaboration. *J Immunol* 2007; 179:5886-96; PMID:17947662; <http://dx.doi.org/10.4049/jimmunol.179.9.5886>
47. Fink K. Origin and Function of Circulating Plasmablasts during Acute Viral Infections. *Front Immunol* 2012; 3:78; PMID:22566959; <http://dx.doi.org/10.3389/fimmu.2012.00078>
48. Shen M, Sun Q, Wang J, Pan W, Ren X. Positive and negative functions of B lymphocytes in tumors. *Oncotarget* 2016; PMID:27331871; <http://dx.doi.org/10.18632/oncotarget.10094>
49. Karagiannis P, Gilbert AE, Josephs DH, Ali N, Dodev T, Saul L, Correa I, Roberts L, Beddowes E, Koers A et al. IgG4 subclass antibodies impair antitumor immunity in melanoma. *J Clin Invest* 2013; 123:1457-74; PMID:23454746; <http://dx.doi.org/10.1172/JCI65579>
50. Karagiannis P, Villanova F, Josephs DH, Correa I, Van Hemelrijck M, Hobbs C, Saul L, Egbuniwe IU, Tosi I, Ilieva KM et al. Elevated IgG4 in patient circulation is associated with the risk of disease progression in melanoma. *Oncoimmunology* 2015; 4:e1032492; PMID:26451312; <http://dx.doi.org/10.1080/2162402X.2015.1032492>
51. Gascan H, Gauchat JF, Aversa G, Van Vlasselaer P, de Vries JE. Anti-CD40 monoclonal antibodies or CD4+ T cell clones and IL-4 induce IgG4 and IgE switching in purified human B cells via different signaling pathways. *J Immunol* 1991; 147:8-13; PMID:1711085
52. Punnonen J, Aversa G, Cocks BG, McKenzie AN, Menon S, Zurawski G, de Waal Malefyt R, de Vries JE. Interleukin 13 induces interleukin 4-independent IgG4 and IgE synthesis and CD23 expression by human B cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; 90:3730-4; PMID:8097323; <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.90.8.3730>
53. Schwartz M, Zhang Y, Rosenblatt JD. B cell regulation of the anti-tumor response and role in carcinogenesis. *J Immunother Cancer* 2016; 4:40; PMID:27437104; <http://dx.doi.org/10.1186/s40425-016-0145-x>
54. Lemoine S, Morva A, Youinou P, Jamin C. Human T cells induce their own regulation through activation of B cells. *J Autoimmun* 2011; 36:228-38; PMID:21316922; <http://dx.doi.org/10.1016/j.jaut.2011.01.005>
55. Crotty S. T follicular helper cell differentiation, function, and roles in disease. *Immunity* 2014; 41:529-42; PMID:25367570; <http://dx.doi.org/10.1016/j.immuni.2014.10.004>
56. Miro F, Nobile C, Blanchard N, Lind M, Filipe-Santos O, Fieschi C, Chappier A, Vogt G, de Beaucoudrey L, Kumararatne DS et al. T cell-dependent activation of dendritic cells requires IL-12 and IFN-gamma signaling in T cells. *J Immunol* 2006; 177:3625-34; PMID:16951322; <http://dx.doi.org/10.4049/jimmunol.177.6.3625>

57. Simon T, Tanguy-Royer S, Royer PJ, Boisgerault N, Frikeche J, Fonteneau JF, Grégoire M. Human dendritic cells sequentially matured with CD4(+) T cells as a secondary signal favor CTL and long-term T memory cell responses. *Biol Res* 2012; 45:33-43; PMID:22688982; <http://dx.doi.org/10.4067/S0716-97602012000100005>
58. Wong KL, Lew FC, MacAry PA, Kemeny DM. CD40L-expressing CD8 T cells prime CD8alpha(+) DC for IL-12p70 production. *Eur J Immunol* 2008; 38:2251-62; PMID:18600823; <http://dx.doi.org/10.1002/eji.200838199>
59. Hernandez MG, Shen L, Rock KL. CD40-CD40 ligand interaction between dendritic cells and CD8+ T cells is needed to stimulate maximal T cell responses in the absence of CD4+ T cell help. *J Immunol* 2007; 178:2844-52; PMID:17312128; <http://dx.doi.org/10.4049/jimmunol.178.5.2844>
60. Llopiz D, Huarte E, Ruiz M, Bezunarte J, Belsue V, Zabaleta A, Lasarte JJ, Prieto J, Borrás-Cuesta F, Sarobe P. Helper cell-independent antitumor activity of potent CD8+ T cell epitope peptide vaccines is dependent upon CD40L. *Oncoimmunology* 2013; 2:e27009; PMID:24498563; <http://dx.doi.org/10.4161/onci.27009>
61. Stark R, Hartung A, Zehn D, Frentsch M, Thiel A. IL-12-mediated STAT4 signaling and TCR signal strength cooperate in the induction of CD40L in human and mouse CD8+ T cells. *Eur J Immunol* 2013; 43:1511-7; PMID:23765345; <http://dx.doi.org/10.1002/eji.201243218>
62. Nelson BH. CD20+ B cells: the other tumor-infiltrating lymphocytes. *J Immunol* 2010; 185:4977-82; PMID:20962266; <http://dx.doi.org/10.4049/jimmunol.1001323>
63. Dieu-Nosjean MC, Antoine M, Danel C, Heudes D, Wislez M, Poulot V, Rabbe N, Laurans L, Tartour E, de Chaisemartin L et al. Long-term survival for patients with non-small-cell lung cancer with intratumoral lymphoid structures. *J Clin Oncol* 2008; 26:4410-7; PMID:18802153; <http://dx.doi.org/10.1200/JCO.2007.15.0284>
64. Milne K, Kobel M, Kalloger SE, Barnes RO, Gao D, Gilks CB, Watson PH, Nelson BH. Systematic analysis of immune infiltrates in high-grade serous ovarian cancer reveals CD20, FoxP3 and TIA-1 as positive prognostic factors. *PLoS One* 2009; 4:e6412; PMID:19641607; <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0006412>
65. Nedergaard BS, Ladekarl M, Nyengaard JR, Nielsen K. A comparative study of the cellular immune response in patients with stage IB cervical squamous cell carcinoma. Low numbers of several immune cell subtypes are strongly associated with relapse of disease within 5 years. *Gynecol Oncol* 2008; 108:106-11; PMID:17945335; <http://dx.doi.org/10.1016/j.ygyno.2007.08.089>
66. Gervois N, Labarriere N, Le Guiner S, Pandolfino MC, Fonteneau JF, Guilloux Y, Diez E, Dreno B, Jotereau F. High avidity melanoma-reactive cytotoxic T lymphocytes are efficiently induced from peripheral blood lymphocytes on stimulation by peptide-pulsed melanoma cells. *Clin Cancer Res* 2000; 6:1459-67; PMID:10778978
67. Chauvin JM, Larrieu P, Sarabayrouse G, Prevost-Blondel A, Lengagne R, Desfrancois J, Labarriere N, Jotereau F. HLA anchor optimization of the melan-A-HLA-A2 epitope within a long peptide is required for efficient cross-priming of human tumor-reactive T cells. *J Immunol* 2012; 188:2102-10; PMID:22291187; <http://dx.doi.org/10.4049/jimmunol.1101807>
68. Labarriere N, Gervois N, Bonnin A, Bouquie R, Jotereau F, Lang F. PBMC are as good a source of tumor-reactive T lymphocytes as TIL after selection by Melan-A/A2 multimer immunomagnetic sorting. *Cancer Immunol Immunother* 2008; 57:185-95; PMID:17646986; <http://dx.doi.org/10.1007/s00262-007-0361-9>

Thèse de Doctorat

Nicolas JOUAND

Étude de la réponse lymphocytaire T non conventionnelle restreinte par HLA-E lors de l'infection par le cytomégalovirus chez les patients transplantés rénaux

Study of the unconventional cytomegalovirus-specific HLA-E-restricted T cells in kidney transplanted patients

Résumé

L'infection à Cytomégalovirus Humain (HCMV) demeure une cause majeure de morbidité chez les individus immunodéficients. L'immunité antivirale étant primordiale dans la gestion du virus chez l'hôte, la compréhension du rôle de chacun des effecteurs immuns dans la lutte contre le HCMV est cruciale pour améliorer à l'avenir la prise en charge de ces patients.

Dans cette étude, nous avons caractérisé *ex vivo* par une approche qualitative et quantitative les lymphocytes T CD8 non conventionnels restreints par HLA-E et spécifiques du peptide signal d'UL40 (LT HLA-E_{UL40}) chez des patients transplantés rénaux (n=119) et des individus sains (n=25). Nous montrons que leur développement est lié à l'infection à HCMV du receveur et est spécifique de la souche virale infectante. Présents chez un individu HCMV⁺ sur trois, les LT HLA-E_{UL40} s'amplifient de manière quasi-clonale pouvant représenter jusqu'à 40% des LT CD8 circulants. De plus, il apparaît que l'allèle *HLA-A*02* et le génotype *HLA-E*01:01/01:03* sont des facteurs associés à la génération de ces populations.

De phénotype effecteur-mémoire, les LT HLA-E_{UL40} sont doués de capacités cytotoxique et cytokinique (TNF- α , IFN- γ , IL-2). Ils reconnaissent, outre le peptide nominal, des nonamères relativement proches, dont certains correspondent à des peptides signaux issus des protéines HLA-I présentés physiologiquement par HLA-E, posant ainsi la question d'une réactivité autologue et/ou allogénique potentielle.

En conclusion, nos résultats soulignent l'importance d'étudier le rôle des LT HLA-E_{UL40} dans la protection contre le HCMV et leur possible impact dans un contexte de transplantation.

Mots clés

Immunologie antivirale, HCMV, lymphocytes T $\alpha\beta$ CD8, HLA-E, UL40, transplantation

Abstract

Human Cytomegalovirus (HCMV) infection remains a major cause of morbidity in immunodeficient individuals. Antiviral immunity being essential in the management of the virus in the host, understanding the role of each of the immune effectors in the anti-HCMV immune response is crucial to improve the upcoming management of these patients.

In this study, we characterized *ex vivo*, by a qualitative and quantitative approach, the unconventional UL40-specific HLA-E-restricted CD8 T lymphocytes (LT HLA-E_{UL40}) in kidney transplant patients (n = 119) and healthy volunteers (n = 25). We show that their development is related to HCMV infection of the recipient and is specific for the infectious viral strain. LT HLA-E_{UL40} cells are quasiclonal populations present in approximately 30% of the HCMV⁺ individuals and can account for up to 40% of circulating CD8 T cells. In addition, it appears that the *HLA-A*02* allele and the *HLA-E*01:01/01:03* genotype are factors associated with the generation of these populations.

LT HLA-E_{UL40} are effector-memory CD8 T cells capable of cytotoxicity and cytokine production (TNF- α , IFN- γ , IL-2). In addition to the nominal peptide, these cells recognize a set of relatively close nonamers, including signal peptides derived from HLA-I proteins presented physiologically by HLA-E, thus raising the question of potential autologous and/or allogeneic reactivity.

In conclusion, our results highlight the importance of studying the role of LT HLA-E_{UL40} in the protection against HCMV and their possible impact in a transplant context.

Key Words

Antiviral immunology, HCMV, CD8 $\alpha\beta$ T cells, HLA-E, UL40, transplantation