



Université
de Toulouse

THÈSE

En vue de l'obtention du

DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE TOULOUSE

Délivré par :

Université Toulouse 3 Paul Sabatier (UT3 Paul Sabatier)

Présentée et soutenue par :

Johan SIEWIERA

le 30/04/14

Titre :

Plasticité fonctionnelle des cellules « Natural Killer » déciduales dans les conditions physiologiques et infectieuses

École doctorale et discipline ou spécialité :

ED BSB : Immunologie

Unité de recherche :

INSERM U1043 CPTP

Directeur(s) de Thèse :

Dr. Nabila Jabrane-Ferrat

Jury :

Pr. Joost van Meerwijk, Président de Jury

Dr. Thierry Walzer, Rapporteur

Dr. Julie Déchanet-Merville, Rapporteur

Dr. Nabila Jabrane-Ferrat, Directeur de thèse

Sommaire

Liste des abréviations	5
Résumé	8
Abstract	10
Introduction	12
I Les cellules Natural Killer	15
A Développement et homéostasie des cellules Natural Killer	15
1 Les étapes de développement des cellules NK	15
2 Facteurs de transcription	18
3 MicroARN (miRNA)	19
4 Contacts cellulaires	20
5 Education des cellules NK	20
6 Homéostasie	24
B Le répertoire de récepteurs des cellules Natural Killer	25
1 Les récepteurs des cellules NK	25
1.1 Récepteurs de type immunoglobuline (Ig)	
1.1.1 Les Killers Ig-like Receptors (KIR)	25
1.1.2 Les Leucocytes Ig-like Receptors (LIR)	27
1.1.3 Les récepteurs de cytotoxicité naturelle (NCR)	28
1.1.4 Les récepteurs de cytotoxicité dépendante des anticorps (ADCC)	29
1.1.5 Récepteurs et co-récepteurs de la famille CD2	30
1.1.6 Autres récepteurs de type Ig	31
1.2 Récepteurs de type lectine	32
1.2.1 Les hétérodimères CD94/NKG2	32
1.2.2 NKG2F	33
1.2.3 L'homodimère NKG2D/NKG2D	33
1.2.4 Autres récepteurs de type lectine-C	34
1.3 Signalisation induite après engagement des récepteurs des cellules NK	34
1.3.1 Les molécules adaptatrices DAP12 /FcR γ /CD3 ζ	35
1.3.2 La molécule adaptatrice DAP10	36
1.3.3 Les molécules adaptatrices de la famille de SAP	37
1.3.3 Les motifs ITIM	38
2 Les ligands des récepteurs NK	39
2.1 Les molécules du complexe majeur d'histocompatibilité de type I (CMH-I)	40
2.2 Les molécules apparentées au CMH-I	42
2.3 Les ligands des récepteurs de cytotoxicité naturelle	44
3 Balance des signaux/co-activation	45
C Les fonctions des cellules Natural Killer	46
1 Reconnaissance de la cible : la synapse immunologique	46
2 Fonction cytotoxique des cellules Natural Killer	47

2.1	Granules lytiques	47
2.2	Ligands des récepteurs à domaine de mort	53
2.3	Peptides antimicrobiens	56
3	Fonction cytokinique des cellules Natural Killer	56
3.1	Les cytokines	57
3.2	Les chimiokines	57
II	Les cellules NK dans la réponse immunitaire	59
A	Réponse anti-virale	59
1	Immunité NK anti-Herpesvirus	59
1.1	Immunité NK anti-CytomégaloVirus Humain (HCMV)	59
1.2	Immunité NK anti-Epstein Barr Virus (EBV)	61
1.3	Immunité NK anti-Herpes Simplex Virus (HSV)	62
1.4	Immunité NK anti_Kaposi's Sarcoma-associated Herpes Virus (KSHV)	62
2	Immunité NK anti-Virus de l'Immunodéficience Humaine (VIH-1)	62
3	Immunité NK anti-virus de l'hépatite C (HCV)	64
4	Immunité NK anti-virus de l'Influenza	65
B	Réponse anti-bactérienne	65
C	Réponse antiparasitaires	67
D	Réponse anti-tumorale	68
E	Les cellules NK et les allogreffes	69
III	Les cellules Natural Killer de la <i>decidua basalis</i>	70
A	La <i>decidua basalis</i>	70
B	Origine des cellules Natural Killer déciduales	71
1	Maturation des cellules Natural Killer de l'endomètre	71
2	Génération <i>in situ</i>	73
3	Recrutement de cellules Natural Killer du sang périphérique	73
C	Phénotype des cellules Natural Killer déciduales	75
D	Fonctions des cellules Natural Killer déciduales	75
1	Fonction cytokinique	76
2	Communication avec les trophoblastes	77
3	Cellules dNK et pathologies de la grossesse	78
3.1	La pré-éclampsie	78
3.2	Les avortements spontanés à répétition	79
4	Fonction cytotoxique	79
4.1	Environnement de la <i>decidua basalis</i>	80
4.2	Mécanismes de tolérance materno-fœtale	80
4.3	Mécanismes d'inhibition de l'activité cytotoxique des cellules dNK	82
5	La placentation chez la souris et d'autres mammifères	84
IV	Infections congénitales, Cytomegalovirus et cellules Natural Killer déciduales	85
A	Infections congénitales	85
1	Toxoplasmose congénitale	85
2	Malaria congénitale	85
3	Rubéole congénitale	85

B Infections congénitales par le Cytomegalovirus	86
1 Le Cytomégalovirus humain	86
2 Pathologies associées à l'infection congénitale par le HCMV	87
3 Réponse immune fœtale contre le HCMV	87
C Implications des cellules Natural Killer déciduales	88
Objectifs	89
Résultats	92
Article 1: Human Cytomegalovirus Infection Elicits New Decidual Natural Killer Cell Effector Functions. <i>Plos Pathogens</i> 2013;9(4):e1003257	95
Article 2: Microenvironment During Pregnancy Conditions NCR Isoform Expression By Decidual Natural Killer Cells <i>Manuscrit en préparation</i>	112
Discussion	137
Bibliographie	147
Annexes	184
Annexe 1: TGF- β -Induced (TGFBI) Protein in Melanoma: A Signature of High Metastatic Potential. <i>J Invest Dermatol.</i> 2014 Jan 17. [Epub ahead of print].	185
Annexe 2: NK cell crosstalk safely with allogeneic human cardiac-derived stem/progenitor cells <i>Cardiovascular Research</i> <i>En revision</i>	198
Annexe 3: The up side of Decidual Natural killer cells. <i>Immunology.</i> 2014 Apr;141(4):490-7.	220
Annexe 4: The human decidual NK-cell response to virus infection: what can we learn from circulating NK lymphocytes? <i>J Reprod Immunol.</i> 2011 Mar;88(2):170-5.	229
Annexe 5: CD160: a unique activating NK cell receptor. <i>Immunol Lett.</i> 2011 Aug 30;138(2):93-6.	236
Remerciements	241

Liste des abréviations

ADCC	Antibody Dependant Cell Cytotoxicity
APC	Antigen Presenting Cell
CLP	Common Lymphoid Progenitor
CMH-I/II	Complexe Majeur d'Histocompatibilité de type I/de type II
CSF	Colony Stimulating Factor
DC	Dendritic Cells
dNK	decidual NK cell
E4BP4/ NFIL3	E4-Binding Protein 4/Nuclear Factor Interleukin 3 regulated
EAT2	Ewing's sarcoma-associated transcript-2
EBV	Epstein Barr Virus
EGF	Endothelial Growth Factor
eNK	endometrial NK cell
ERT	EAT2-related transducer
Ets-1	v-ets avian erythroblastosis virus E26 oncogene homolog 1
EVT	Extravillous Trophoblast
FADD	DD-containing adaptor molecule Fas-associated death domain
GATA3	GATA binding protein 3
GM-CSF	Granulocyte Monocyte Colony Stimulating Factor
Gr	Granzyme
HCMV	Human Cytomegalovirus
HCV	Hepatitis C Virus
HLA	Human Leukocyte Antigen
Hsp	Heat Shock Protein
HSV	Herpes Simplex Virus
Id2	Inhibitor of DNA binding 2
Id3	Inhibitor of DNA binding 3
IFN	Interferon
Ig	Immunoglobulin
IL	Interleukin
ILC	Innate Lymphoid Cells
ILT-2	Immunoglobulin-like Transcript 2
IP-10	Interferon gamma inducible Protein 10
ITAM	Immunoreceptor Tyrosine-based Activatory Motif
ITIM	Immunoreceptor Tyrosin-based Inhibitory Motif
KIR	Killer Immunoglobulin-like Receptors
KLF4	Krüppel-like factor 4
KLR	Killer Lectin-like Receptor

KSHV	Kaposi's Sarcoma-associated Herpes Virus
LB	Lymphocytes B
LIF	Leukaemia Inhibitory Factor
LILR	Leucocytes Immunoglobulin-like Receptors
LRC	Leukocyte Receptor Complex
LT	Lymphocytes T
MAPK	Mitogen-Activated Protein Kinase
MCMV	Murine Cytomegalovirus
miARN	microARN
MICA/B	MHC class-I related Chain A/B
MMP	Matrix Metalloproteinase
NCR	Natural Cytotoxicity Receptor
NK	Natural Killer cells
NKC	Natural Killer Complex
NKG2	Natural Killer cell receptor Group 2
NKR	Natural Killer cell Receptor
NKT	Natural Killer T cell
NLR	Nod-like Receptor
PAMP	Pathogen-Associated Molecular Pattern
PGF	Placenta Growth Factor
PKC	Protein Kinase C
PLC	Phospholipase C
PRR	Pattern Recognition Receptor
RE	Réticulum Endoplasmique
RLR	RIG-I-like Receptor
SAP	SLAM-Associated Protein
TAP	Transporter-Associated Peptide
TGF-β	Transforming Growth Factor β
TLR	Toll-like Receptor
TNF	Tumor Necrosis Factor
TRAIL	Tumor necrosis factor-Related Apoptosis-Inducing Lligand
UL	Unique Long
ULBP	UL16-Binding Protein
US	Unique Short
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
VIH	Virus de l'Immunodéficience Humaine

Résumé

Résumé

Au début de la grossesse, des cellules Natural Killer (NK) sont massivement recrutées au niveau de l'utérus et constituent la population immunitaire maternelle majoritaire au niveau du site d'implantation embryonnaire, la *decidua basalis*. Les cellules NK déciduales (dNK) présentent des propriétés uniques par rapport aux autres populations de cellules NK. Leur fonction principale est l'aide à l'implantation embryonnaire et au bon déroulement de la grossesse. Les fonctions des cellules NK sont contrôlées par les nombreux récepteurs activateurs et inhibiteurs qu'elles expriment. Les récepteurs de cytotoxicité naturels (NCR) NKp30, NKp44 et NKp46 sont exprimés aussi bien par les cellules dNK que les cellules NK du sang périphérique (pNK). Toutefois, leur fonction diffère entre les deux populations. Ainsi, bien que les cellules NK soient des cellules cytotoxiques, ce potentiel est parfaitement contrôlé dans la decidua, afin d'éviter des dommages aux cellules fœtales semi-allogéniques. Pourtant le fœtus est susceptible d'être infecté *in utero* par des pathogènes de la mère.

Durant la première partie de ma thèse, nous avons analysé l'implication des cellules dNK dans la protection du fœtus contre les infections congénitales par le cytomégalovirus humain (HCMV). Nous avons mis au point un nouveau modèle d'infection de cellules stromales de decidua *in vitro*, afin d'étudier les mécanismes mis en jeu lors d'une réponse immune protectrice dans l'utérus gestant. Nous avons montré que les cellules dNK forment des synapses immunologiques activatrices avec des cellules cibles autologues infectées par le HCMV. Elles acquièrent un potentiel cytotoxique et sont capables de lyser les cibles infectées après engagement de récepteurs activateurs, notamment NKG2D et NKG2C. En réponse aux cellules infectées par le HCMV, les cellules dNK modifient leur profil de sécrétion de cytokines et de chimiokines. Cette première partie nous a permis de suggérer que les cellules dNK sont capables d'apporter une protection au fœtus contre les transmissions verticales de certains pathogènes.

Durant la seconde partie de ma thèse, je me suis intéressé aux mécanismes moléculaires responsables des différences fonctionnelles entre cellules dNK et cellules pNK, notamment en ce qui concerne les NCR. Les gènes qui codent les trois NCR subissent un épissage alternatif qui donne naissance à plusieurs variants. Les protéines issues de cet épissage sont très proches en termes de séquence mais elles présentent des différences fonctionnelles. Nous avons ainsi pu montrer que les cellules dNK expriment différemment les transcrits alternatifs de *NKp30* et *NKp44* par rapport aux cellules pNK. Nous avons également pu démontrer que l'épissage « sélectif » des transcrits des NCR est sous l'influence de l'environnement cytokinique particulier de la *decidua basalis*. En effet, des cellules pNK cultivées dans des cocktails de cytokines définis modifient le profil d'épissage des ARNm de *NKp30* et *NKp44*. L'environnement de la grossesse pourrait donc influencer sur l'expression et la fonction des récepteurs des cellules NK, pour les adapter à leur rôle dans le bon déroulement de la grossesse.

Abstract

Abstract

During the first trimester of pregnancy, Natural Killer cells massively infiltrate the pregnant uterus and constitute the principal immune population at the fetal implantation site, called *decidua basalis*. Decidual NK cells (dNK) are a unique NK cell population. They play an important role in the establishment and maintenance of pregnancy mainly through vascular remodeling of the uterine arteries. dNK cells establish privileged contacts with fetal-derived trophoblasts via NK cell receptor engagement. NK cell effector functions are tightly controlled by a large panel of activating and inhibitory receptors. Natural cytotoxicity receptors (NCRs) NKp30, NKp44 and NKp46 are expressed by dNK cells and pNK cells, but their functions are quite different between these two NK cell populations. NK cells are robust cytotoxic effectors of the immune system. However, the cytotoxic potential of dNK cells is perfectly controlled to ensure protection of semi-allogenic fetal cells. Pathogens such as human Cytomegalovirus (HCMV) can be transmitted to the fetus across materno-fetal interfaces.

In the first part of my PhD thesis, we investigated the role of dNK cells against the development of HCMV congenital infections. We developed a new *in vitro* autologous culture system of decidual stromal cells and dNK cells, to dissect the protective immune response in pregnant uterus. We showed that dNK cells can form activating immunological synapse with autologous HCMV-infected target cells. Engagement of NKG2D and NKG2C activating receptors trigger dNK cell cytotoxic functions against HCMV-infected cells. The dNK cell cytokine/chemokine secretion profile was modified after co-culture with HCMV-infected targets. All together, our data suggest that dNK cells can protect the fetus from vertically transmitted pathogens during pregnancy.

During the second part of my PhD thesis, we dissected molecular mechanisms that orchestrate the functional differences between dNK cells and pNK cells, notably NCRs functions. NCRs genes are transcribed in multiples mRNA splice variants that can be translated to different functional proteins. Although there is a high sequence homology, the resulting proteins are endowed with huge functional differences. We demonstrated that dNK cells differentially express *NKp30* and *NKp44* transcripts compared to pNK cells. To clarify the role of the microenvironment in the “selective” splicing of NCR transcripts, we used a defined cytokine cocktail that characterize the decidual milieu. We showed that pNK cells are able to adjust their alternative splicing for *NKp30* and *NKp44* mRNAs. Our data suggest that the pregnant uterus micro-environnement can influence NK cell receptor expression and function, to render them able to support pregnancy.

Introduction

L'organisme est en permanence au contact de microorganismes potentiellement pathogènes. La protection contre ces microorganismes a nécessité la mise en place d'organes et d'un système cellulaire perfectionnés et spécialisés destinés à lutter contre les pathogènes : le système immunitaire. Le système immunitaire est généralement divisé en deux composantes complémentaires qui interagissent fortement entre elles : l'immunité innée et l'immunité adaptative.

L'immunité adaptative repose sur des cellules qui expriment des récepteurs cellulaires spécifiques des pathogènes. Les gènes des récepteurs sont générés par recombinaisons géniques aléatoires au cours des processus de développement, ce qui permet la génération d'un répertoire extrêmement diversifié. L'immunité adaptative est composée de deux types cellulaires, les lymphocytes T et les lymphocytes B. Les lymphocytes T assurent la réponse immune cellulaire, grâce aux lymphocytes T CD8⁺ cytotoxiques, tandis que les lymphocytes B assurent la réponse humorale, en sécrétant des anticorps. Les lymphocytes T CD4⁺ sont dits auxiliaires car ils apportent une aide aux LT CD8⁺ et aux LB. L'immunité adaptative est responsable de la mémoire immunologique. Toutefois, la fréquence des cellules spécifiques du pathogène est très faible, et la mise en place d'une protection efficace nécessite un délai.

L'immunité innée est un ensemble de cellules lymphocytaires et myéloïdes dont la fonction est d'assurer la première ligne de défense contre les pathogènes. Contrairement aux cellules de l'immunité adaptatives, les cellules de l'immunité innée n'expriment pas de récepteurs spécifiques à l'antigène. Mais elles expriment un large panel de récepteurs invariables qui reconnaissent des motifs conservés exprimés par les pathogènes. Ainsi, l'immunité innée est l'immunité qui surveille l'organisme, est la première à détecter une infection, et est celle qui active les cellules de l'immunité adaptative dans les organes lymphoïdes secondaires. Une population cellulaire assure un rôle majeur dans l'immunité cellulaire innée : les cellules Natural Killer (NK).

Les cellules NK sont une population lymphocytaire capable d'exercer une activité cytotoxique envers une cellule infectée ou transformée sans exposition préalable. Les cellules NK sont également de grandes productrices de cytokines pro-inflammatoires et de chimiokines qui permettent d'orienter le type de la réponse adaptative. Bien qu'elles n'expriment pas de récepteurs spécifiques, les cellules NK expriment de nombreux récepteurs activateurs et inhibiteurs qui contrôlent l'état d'activation et donc les fonctions des cellules NK.

Les cellules immunitaires sont localisées dans le sang périphérique et divers organes spécialisés qui assurent soit leur développement (organes lymphoïdes primaires, comme la moelle osseuse et le thymus), soit leur maintien et leur rencontre en cas d'infection (organes lymphoïdes secondaires). Les cellules NK sont retrouvées dans tous ces compartiments en proportions variables. Elles sont également présentes dans d'autres organes, tels que les poumons ou l'endomètre, où elles constituent l'une des populations les plus importantes en nombre. En cas d'implantation embryonnaire au niveau de l'endomètre, ce dernier subit des modifications morphologiques et fonctionnelles importantes. Le processus de décidualisation se traduit notamment par un afflux massif de cellules NK

déciduales (dNK). Les cellules dNK représentent la population immunitaire maternelle dominante dans la *decidua basalis*. Ces cellules ont un rôle majeur dans les processus de remodelage vasculaire qui s'opèrent dans la *decidua basalis* au cours du premier trimestre, ainsi que dans l'invasion des tissus par les cellules trophoblastiques d'origine fœtale.

Les cellules trophoblastiques expriment des antigènes paternels et de ce fait peuvent être reconnues par les cellules immunitaires maternelles comme étrangères. Des processus de tolérisation aux antigènes fœtaux sont mis en place très tôt au cours de la grossesse. Ainsi, les LT régulateurs sont présents en grande proportion dans la *decidua basalis*. De même les cellules dendritiques, qui pourraient déclencher une réponse immunitaire contre les cellules fœtales ne peuvent migrer vers les nœuds lymphatiques drainants après activation. Enfin, bien que les cellules dNK expriment toutes les molécules lytiques, l'engagement permanent de récepteurs inhibiteurs par leurs ligands physiologiques empêche le déclenchement d'une réponse cytotoxique envers les cellules fœtales. Toutefois, le fœtus est susceptible d'être infecté *in utero* par divers pathogènes, tels que le Cytomégalovirus Humain (HCMV), avec des effets délétères sur la poursuite de la grossesse et l'enfant à naître.

Le travail effectué au cours de ma thèse consistait dans un premier temps à déterminer si dans certaines conditions, l'inhibition constitutive du potentiel cytotoxique des cellules dNK pouvait être levée afin d'apporter une protection au fœtus. Cette étude nous a permis de caractériser la réponse cytotoxique anti-virale des cellules dNK au cours d'une infection de cellules stromales de la *decidua* par le HCMV. Dans un second temps, nous avons voulu déterminer l'influence du microenvironnement cytokinique de la grossesse sur l'expression et les fonctions induites après engagement des récepteurs de cytotoxicité naturelle, NKp30, NKp44 et NKp46. Cette étude nous a permis de démontrer que les cellules dNK n'expriment pas les mêmes transcrits des NCR que leurs homologues du sang périphérique, et que cette expression sélective proviendrait de l'environnement particulier de la grossesse.

I Les cellules Natural Killer

A Développement et homéostasie des cellules Natural Killer

Les cellules NK sont des cellules de l'immunité innée qui ne requièrent pas de réarrangements géniques au cours de leur développement. Les premières étapes du développement des cellules NK se produisent dans la moelle osseuse, comme les lymphocytes B et les cellules myéloïdes (Freud and Caligiuri, 2006). Les cellules NK se développent en plusieurs étapes, identifiables par l'expression de récepteurs de surface, de facteurs de transcription et de certaines combinaisons de cytokines. Enfin, bien que les cellules NK n'expriment pas à leur surface de récepteurs variables, elles nécessitent des interactions qui les « sélectionnent ». Les cellules NK potentiellement dangereuses pour l'organisme deviennent anergiques. Il est possible que plusieurs organes périphériques permettent le développement de cellules NK fonctionnelles (Huntington et al., 2007). Les cellules NK font partie de la famille des Cellules Lymphoïdes Innées (ILC), et sont considérées comme le prototype des ILC de type 1.

1 Les étapes du développement des cellules NK

Les étapes précoces du développement des cellules NK sont mieux caractérisées chez la souris mais des informations existent chez l'Homme. La différenciation des cellules NK n'est pas un phénomène linéaire qui se produit dans la moelle osseuse avant que les cellules immatures migrent en périphérie pour se spécialiser et acquérir leurs fonctions. Les premières études ont montré que des souris traitées par des éléments radioactifs ou du β -œstradiol, qui affectent la moelle osseuse, ont un défaut très prononcé dans le compartiment NK comparé aux autres populations hématopoïétiques (Kumar et al., 1979; Seaman et al., 1978). Les cellules stromales de la moelle osseuse, supplémentées d'IL-2, peuvent supporter la différenciation de cellules NK à partir de précurseurs CD34⁺ CD38⁻ (Miller et al., 1999). Ces données indiquent que les premières étapes de développement se produisent dans la moelle osseuse. Mais, *in vitro*, il est possible de différencier des précurseurs CD34⁺ de la moelle osseuse, du sang ou des organes lymphoïdes secondaires en cellules NK. La moelle osseuse ne serait donc pas un site exclusif (Miller et al., 1994).

La prolifération des précurseurs NK nécessite la combinaison de différentes cytokines produites localement, notamment l'IL-15, et deux autres facteurs produits par les cellules stromales de la moelle osseuse, les ligands de c-kit (KL) et de Flt-3 (FL) (Mrozek et al., 1996; Yu et al., 1998). Le développement des cellules NK se divise en quatre étapes principales, définies sur la base de l'expression de marqueurs de surface. Chaque étape peut elle-même être divisée en sous-étapes. Les progéniteurs NK (pro-NK), retrouvés dans la moelle osseuse et les organes lymphoïdes secondaires ont un phénotype CD34⁺CD45RA⁺CD117⁻CD94⁻ (Freud and Caligiuri, 2006). Le niveau d'expression de CD34 semble important, puisque seules les cellules qui l'expriment à un haut niveau s'engagent dans le lignage NK. Les pro-NK sont phénotypiquement proches du progéniteur lymphoïde commun

(CLP), et expriment CD10 (Galy et al., 1995). KL et FL permettent le passage vers le stade 2 du développement, précurseurs NK (pré-NK), définis comme $CD34^+CD45RA^+CD117^+CD94^-$. C'est à ce stade que les cellules nécessitent de l'IL-15 (Yu et al., 1998).

Les pré-NK ne sont pas encore engagés exclusivement dans la voie des cellules NK, et peuvent encore donner des LT et des DC myéloïdes. La fixation du lignage s'effectue au stade 3. Les cellules qui sont engagées dans le stade 3 perdent leur potentiel multilymphoïde et sont considérées comme des cellules NK immatures (iNK) (Freud and Caligiuri, 2006). Les iNK expriment des marqueurs de cellules NK, comme CD2, NKp44 et la chaîne α du récepteur à l'IL-7 (CD127). L'expression de la molécule d'adhésion CD56, qui définit les cellules NK chez l'Homme, augmente durant cette étape de différenciation. Les cellules engagées dans cette voie n'expriment pas encore les protéines effectrices des cellules NK, l'IFN- γ et la perforine, ainsi que la plupart des récepteurs caractéristiques des cellules NK matures, comme NKG2D, NKp46 ou les KIR. En revanche, les iNK sont capables d'exercer une activité lytique par l'intermédiaire de TRAIL, un ligand de récepteurs à domaine de mort (Zamai et al., 1998). Cette population est très présente dans les organes lymphoïdes secondaires. (Figure 1).

La dernière étape du développement, le stade 4, est marquée par l'acquisition du récepteur inhibiteur CD94/NKG2A, de NKG2D, de NKp46, de FasL et de la perforine notamment. CD56 est fortement exprimé (population $CD56^{bright}$). La population $CD56^{bright}$ n'est pas homogène et pourrait représenter différentes phases de maturation des cellules NK (Freud and Caligiuri, 2006).

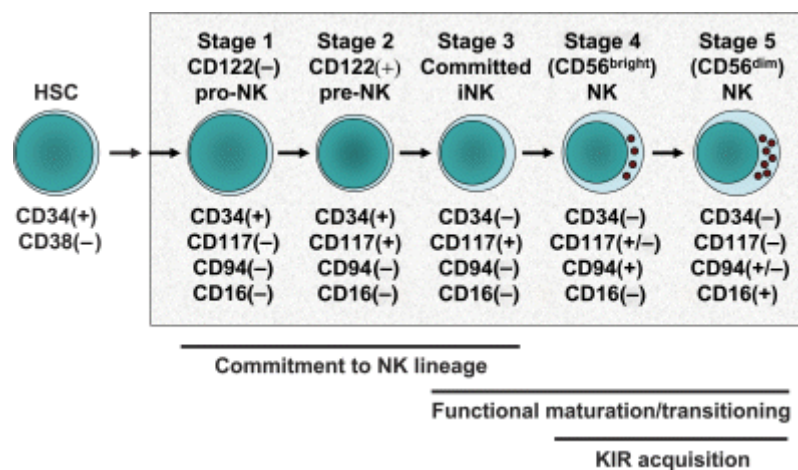


Figure 1 : Modèle des étapes du développement des cellules NK. Du stade 1 (pro-NK) au stade 3 (iNK), perte progressive de la multipotence. Du stade 3 au stade 5, étapes de maturation, acquisition des marqueurs de lignage NK et des capacités cytolytique et sécrétrice (Freud and Caligiuri, 2006).

Au stade $CD56^{bright}$, les cellules NK subissent d'autres stades de différenciation. Il est généralement accepté que les cellules NK $CD56^{bright}$ des organes lymphoïdes secondaires sont les précurseurs des cellules NK circulantes $CD56^{dim}$, parfois considérées comme le stade 5 (Chan et al., 2007; Romagnani et al., 2007). Cette dernière étape de maturation se caractérise par l'acquisition du

récepteur au fragment Fc des IgG CD16, des KIR et la diminution de l'expression de CD94/NKG2A (Shilling et al., 2003) (Figure 2). La population CD56^{dim} CD16⁺ peut elle-même être divisée en plusieurs sous-populations sur la base de l'expression de la molécule d'adhésion CD57 (Bjorkstrom et al., 2010).

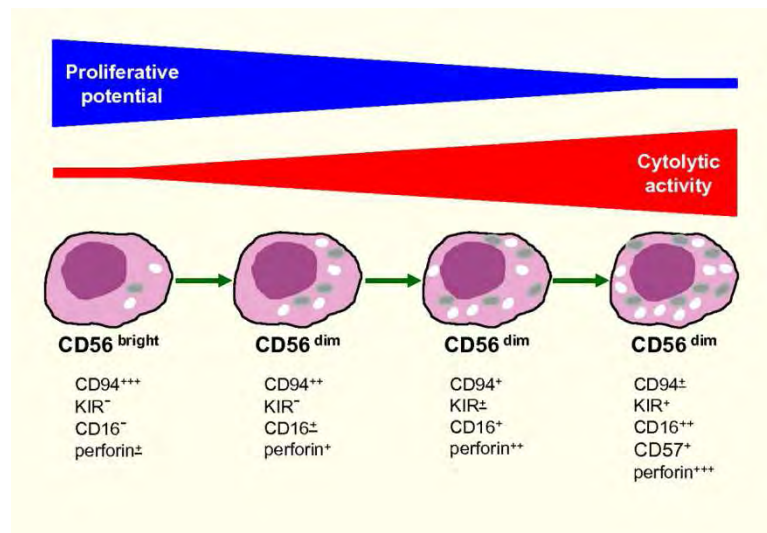


Figure 2 : Modèle de différenciation des cellules NK dans les dernières étapes de développement. Les cellules NK CD56^{bright} CD16⁻ NKG2A⁺ acquièrent progressivement la perforine, le CD16 et les KIR, et diminuent l'expression de NKG2A. En parallèle des modifications du répertoire de récepteurs, le potentiel cytotoxique est plus important, mais les capacités prolifératives diminuent (Moretta, 2010).

Les étapes du développement des cellules NK ne sont pas encore toutes clairement définies. Les organes où la maturation et l'acquisition des fonctions effectrices se produisent ne sont pas connus. NKp44, qui est un récepteur induit après activation, est ainsi exprimé au cours du développement sans que son implication dans la génération des cellules NK ne soit connue (Freud and Caligiuri, 2006). De plus, il est possible que les cellules NK ne constituent pas une population homogène tant au niveau phénotypique que fonctionnelle suivant l'organe où elles se développent, comme il a été proposé pour d'autres populations d'ILC humaines (Mjosberg et al., 2011). Des données récentes basées sur des analyses transcriptomiques suggèrent l'existence de plusieurs lignages NK (Daussy et al., 2014; Peng et al., 2013). Les microenvironnements cytokiniques et les ligands exprimés dans chacun des organes lymphoïdes secondaires diffèrent les uns des autres et pourraient conférer des propriétés propres et distinctes aux populations de cellules NK, par exemple dans le thymus ou l'utérus gestant (Figure 3). Chez la souris, les cellules iNK hépatiques peuvent reformer les différentes populations de cellules NK matures, contrairement aux cellules iNK spléniques (Takeda et al., 2005). La phylogénie des populations NK n'est pas encore complètement élucidée.

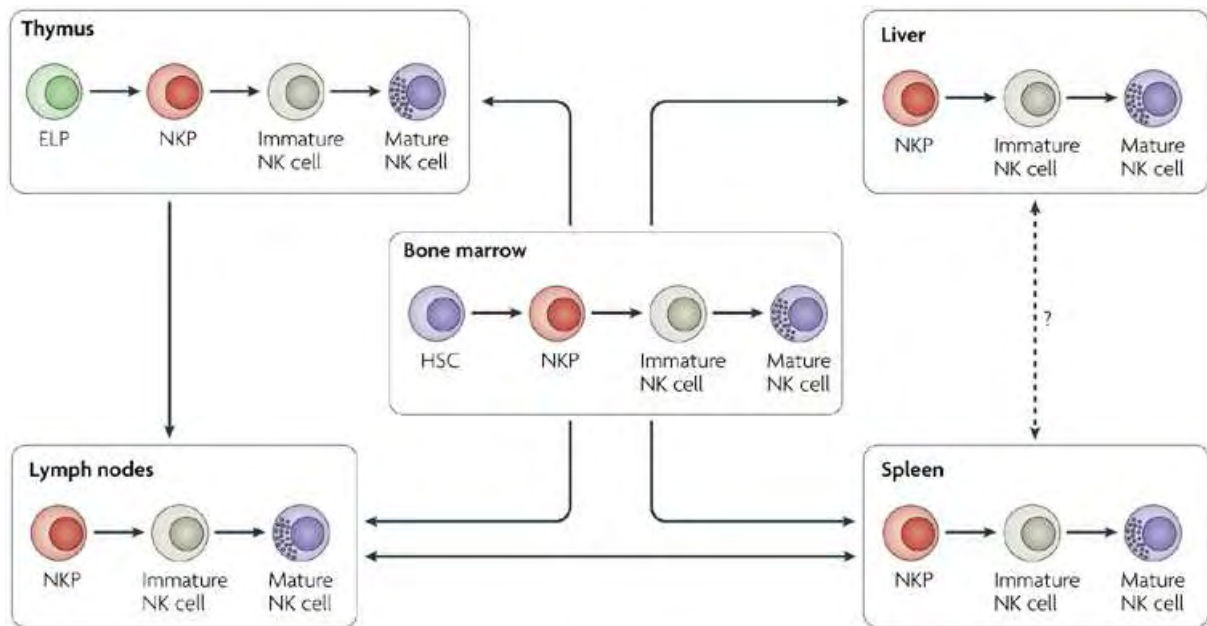


Figure 3 : Sites potentiels de développement des cellules NK. Les précurseurs hématopoïétiques de la moelle osseuse subissent les premières étapes de différenciation puis peuvent migrer dans différents organes lymphoïdes pour terminer leur maturation (Huntington et al., 2007).

2 Facteurs de transcription

Les facteurs de transcription sont des protéines clés dans les processus de différenciation et de choix de lignage des cellules hématopoïétiques. Plusieurs facteurs de transcription sont essentiels à la génération et la fonction des cellules NK (Luevano et al., 2012). Tous n'interviennent pas au même stade de différenciation et certains sont exprimés à un stade précis du développement. La régulation spatiale et temporelle de l'expression de ces facteurs de transcription assure le choix du lignage et la régulation des fonctions effectrices des cellules NK.

Il a récemment été décrit que le facteur de transcription E4BP4 (E4-binding protein 4, aussi appelé NFIL3) contrôle le développement des cellules NK de façon lignage spécifique. E4BP4 est essentiel à la progression du stade pré-NK vers le stade iNK puis vers le stade NK matures. Les souris déficientes en E4BP4 présentent une accumulation de cellules pré-NK dans la moelle osseuse, et des fonctions effectrices atténuées pour les cellules matures. La transcription d'E4BP4 est déclenchée suite à la signalisation *via* le récepteur à l'IL-15 (Gascoyne et al., 2009; Kamizono et al., 2009).

E4BP4 active d'autres facteurs de transcription qui interviennent dans le choix et la fixation du lignage NK, dont Id2 et Id3. Ces facteurs font partie d'une famille de facteurs de transcription qui sont des régulateurs importants de la différenciation cellulaire. En liant des protéines E, ils bloquent leur liaison aux séquences E de l'ADN (Sun et al., 1991). Id3 intervient également dans le développement NK. Id2 et Id3 agissent soit comme répresseurs, soit comme activateurs de la transcription (Boos et al., 2007; Heemskerk et al., 1997).

La transcription des gènes codant pour la perforine, les granzymes, l'IFN- γ ou le TNF- α est indicatif des derniers stades de différenciation (Freud and Caligiuri, 2006). Le contrôle de la transcription des protéines qui assurent les fonctions effectrices des cellules NK est orchestré par divers facteurs de transcription. T-bet et Eomes (Eomesodermine) sont deux facteurs de transcription de la famille T-box qui contrôlent les derniers stades de maturation des cellules NK (Gordon et al., 2012). Ces facteurs de transcription interviennent dans le contrôle de la fonction cytotoxique et la production d'IFN- γ par les cellules NK (Gill et al., 2012).

Ets-1 (Ramirez et al., 2012), Hélios (Narni-Mancinelli et al., 2012), KLF4 (Krüppel-like factor 4) (Park et al., 2012) ou encore GATA3 (Samson et al., 2003) ont été décrits comme intervenant dans le contrôle de la différenciation, des fonctions effectrices ou de l'homéostasie des cellules NK. Ces facteurs de transcription peuvent être différentiellement exprimés suivant le lieu de maturation des cellules NK. Ainsi, une déficience en GATA-3 affecte uniquement la population de cellules NK thymiques (Vosshenrich et al., 2006) alors qu'une déficience en KLF4 (Park et al., 2012) affecte les populations de cellules NK du sang sans affecter les autres populations. Là encore, le microenvironnement serait déterminant dans l'expression des facteurs de transcription.

3 MicroARN (miARN)

Les miARN sont une famille de petits ARN non codants qui agissent en tant que répresseurs post-transcriptionnels des ARN messagers (Fabian and Sonenberg, 2012). Chacun des miARN peut cibler plusieurs centaines de gènes (Berezikov et al., 2006). La régulation des miARN et la régulation post-transcriptionnelle par les miARN apparaissent de plus en plus comme absolument essentielles dans la plupart des processus physiologiques (Baek et al., 2008).

Les études réalisées chez des souris dont la moelle osseuse est déficiente en Dicer ou Dcgr8, deux enzymes de la voie de synthèse des miARN, montrent des problèmes de développement en cellules NK (Bezman et al., 2010). Plus de 400 miARN sont exprimés par les cellules NK (Fehniger et al., 2010; Liu et al., 2012). D'autres études ont été menées en délétant des miARN spécifiques chez la souris. miR-150 est un miARN qui cible c-Myb, facteur impliqué dans des signaux pro-survie et pro-prolifératifs dans les lymphocytes en développement (Bezman et al., 2011). Son absence aboutit à une diminution du nombre de cellules NK matures en périphérie. A l'inverse, la surexpression de miR-150 résulte en une augmentation du pool de cellules NK circulantes. miR181 module la signalisation induite après engagement de Notch (Cichocki et al., 2011). La signalisation *via* Notch est importante au cours du développement des populations T et NK (Bachanova et al., 2009). De ce fait, le knock-down de miR-181 diminue le développement des cellules NK.

miR-146a (Paik et al., 2011), miR-30b (Ng et al., 2011), miR-21 (Yamanaka et al., 2009) ou encore miR-155 (Trotta et al., 2012; Zawislak et al., 2013) sont impliqués dans la modulation des réponses proliférative, cytotoxique ou cytokinique des cellules NK, que ce soit au cours des processus

de maturation et d'acquisition des fonctions effectrices, ou encore au niveau de la régulation de la réponse immune dirigée par les cellules NK.

4 Contacts cellulaires

Peu de données sont disponibles sur les interactions cellulaires qui se produisent durant la différenciation et la maturation des cellules NK. Lors d'une réponse immune, les interactions entre cellules dendritiques et cellules NK, ou monocytes et cellules NK, supportent les derniers stades de maturation (Guimond et al., 2010; Soderquest et al., 2011) par l'apport d'IL-15. En revanche l'implication des DC ou des monocytes au cours des premières étapes du développement n'a pas été étudié. Dans les nœuds lymphatiques, les cellules iNK se retrouvent dans les régions parafolliculaires riches en LT, mais les raisons de cette localisation ne sont pas connues.

Une étude récente a montré la nécessité d'une interaction avec les neutrophiles au cours du développement pour la génération de cellules NK fonctionnelles. Chez les souris *Genista*, les cellules NK se localisent dans les mêmes zones que les neutrophiles dans la rate et les nœuds lymphatiques. De plus, la présence des neutrophiles dans la moelle osseuse est également nécessaire à la génération des cellules NK. Ces données obtenues chez la souris ont été confirmées chez des patients neutropéniques (Jaeger et al., 2012).

5 Education des cellules NK

Les cellules NK sont des cellules cytotoxiques qui jouent un rôle clef dans la surveillance de l'infection ou la transformation des cellules de l'hôte. Pendant de nombreuses années, les mécanismes qui contrôlent l'activation des cellules NK et qui leur permettent de distinguer cellules dangereuses pour l'hôte et cellules saines n'ont pas été élucidés. En 1986, Klas Kärre démontre que les cellules NK exercent leur activité cytotoxique envers des cellules tumorales qui ont perdu l'expression des molécules du CMH-I : c'est l'hypothèse du « Soi manquant » (Karre et al., 1986). Cette hypothèse postule que les cellules NK sont activées en l'absence de liaison d'une molécule de CMH-I à un récepteur inhibiteur. Ainsi, les cellules tumorales ou infectées par un pathogène, qui diminuent ou perdent complètement l'expression des molécules du CMH-I seraient reconnues comme étrangères et donc éliminées par les cellules NK. Depuis, la théorie a été élargie avec la découverte de récepteurs NK, comme NKG2D, qui ne lient pas le CMH-I mais qui reconnaissent des ligands de stress induits après infection ou transformation des cellules cibles : il s'agit de la théorie du « Soi induit » (Ogasawara et al., 2005). Ces deux modes de reconnaissance définissent les conditions dans lesquelles une cellule NK identifie une cellule comme cible et enclenche ses fonctions effectrices (Figure 4).

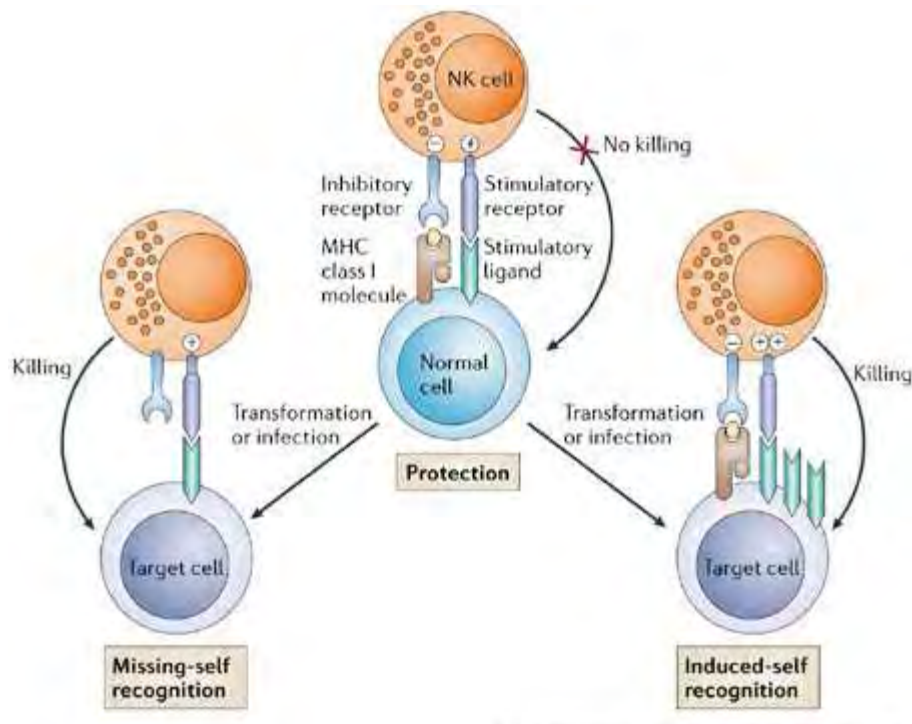


Figure 4 : La balance des signaux inhibiteurs et activateurs reçus par les cellules NK détermine le devenir de la cellule cible avec laquelle la cellule effectrice interagit. Sont présentés les deux modèles qui expliquent l'activation d'une cellule NK : l'absence de d'expression du CMH-I, qui conduit à une diminution des signaux inhibiteurs (Soi manquant) ; augmentation de l'expression de ligands de récepteurs activateurs qui permettent une signalisation activatrice plus importante (Soi induit) (Raulet and Vance, 2006).

Les cellules NK sont régulées par les molécules du CMH-I de l'environnement. La capacité des cellules NK à reconnaître les molécules du CMH-I, en l'absence de sélection positive, comme définie pour les lymphocytes T, est resté inexpliquée pendant plusieurs années. Il était supposé que chaque cellule NK exprime au moins un récepteur inhibiteur pour les molécules du CMH-I du Soi (Valiante et al., 1997). Cette vision a été modifiée depuis la découverte de cellules NK matures n'exprimant aucun de ces récepteurs, mais qui ne présentent pas de danger pour l'hôte, que ce soit chez la souris ou chez l'Homme (Anfossi et al., 2006; Fernandez et al., 2005). Les mécanismes de tolérance des cellules NK au Soi ont donc été redéfinis.

L'éducation des cellules NK pourraient s'effectuer de deux façons : un mode indépendant du CMH-I, qui n'est pas encore identifié, et un mode dépendant du CMH-I, pour les cellules qui expriment un récepteur inhibiteur au CMH-I du Soi. C'est le concept de la théorie de l' « éducation » des cellules NK. Les cellules NK « éduquées » seraient fonctionnelles grâce à leurs récepteurs activateurs, et leur tolérance au Soi s'expliquerait par l'expression de récepteurs inhibiteurs au CMH-I du Soi (Anfossi et al., 2006). Les cellules NK « non-éduquées » seraient dans ce cas tolérantes parce qu'anergiques, malgré l'expression de récepteurs activateurs à leur surface. L'état « éduqué » dépend

de la reconnaissance des molécules du CMH-I classiques (ou classe Ia). En effet, les cellules NK de souris déficientes en CD94 (qui n'expriment pas NKG2A, récepteur de Qa-1, CMH-I de classe Ib murin) sont fonctionnelles (Orr et al., 2010). En accord avec cette théorie, les cellules NK « non-éduquées » n'ont pas la capacité de reconnaître des cibles selon la théorie du « Soi manquant ». Les mécanismes moléculaires exacts qui définissent l'« éducation » ne sont pas élucidés et deux modèles s'affrontent actuellement pour expliquer l'éducation des cellules NK. Il s'agit des modèles « armement » et « désarmement » (Raulet and Vance, 2006).

Le modèle « armement » postule que l'engagement d'au moins un récepteur inhibiteur par les molécules de CMH-I suffit à transduire tous les signaux nécessaires pour l'« éducation ». Ce modèle est conforté par le fait que les motifs ITIM, qui transduisent les signaux enclenchés par l'engagement d'un récepteur inhibiteur, sont impliqués dans l'« éducation » (Kim et al., 2005).

Le modèle « désarmement » postule au contraire que les signaux activateurs sont constitutivement transduits dans les cellules NK. L'engagement d'un récepteur inhibiteur par le CMH-I viendrait s'opposer à ces signaux. Sans signalisation inhibitrice, la cellule NK deviendrait anergique, afin d'éviter des dommages à l'organisme (Oppenheim et al., 2005; Wiemann et al., 2005).

Plusieurs études, menées sur des souris transgéniques ou des cellules NK humaines, indiquent que les récepteurs activateurs interviennent dans les processus d'éducation des cellules NK (Fauriat et al., 2010). Toutefois, aucune de ces études n'a permis de trancher entre les deux modèles. De plus, l'anergie des cellules NK « non-éduquées » a été remise en cause dans un modèle murin d'infection par le MCMV (Murine Cytomegalovirus) (Orr et al., 2010). Des expériences de transferts adoptifs ont montré que des cellules « non-éduquées » issues de souris déficientes en CMH-I peuvent réverser leur phénotype anergique lorsqu'elles sont placées dans un environnement avec du CMH-I (Elliott et al., 2010; Joncker et al., 2010). A l'inverse, lorsque des cellules NK « éduquées » sont transférées dans un environnement sans CMH-I, elles deviennent hyporéactives. L'ensemble de ces études remet en cause le lieu de l'éducation des cellules NK, supposé être la moelle osseuse. Il est possible en effet que l'« éducation » se produise tout au long de la vie de la cellule NK (Miller et al., 2007; Sun, 2010). Cette possibilité expliquerait le paradoxe de la grossesse : le non-rejet du fœtus, bien que ce dernier exprime des molécules HLA de classe I du père, pour lesquelles les cellules NK maternelles ne seraient pas tolérantes (Parham and Guethlein, 2010). Suivant le lieu et le contexte d'engagement des molécules du CMH-I, l'« éducation » pourrait être un processus dynamique et des réajustements au niveau de la tolérance pourraient se produire dans d'autres organes que la moelle osseuse.

Il existe une autre théorie, la théorie du rhéostat, qui postule que l'éducation des cellules NK n'est pas un modèle binaire, et qu'elle serait dépendante du nombre de récepteurs inhibiteurs pour différentes molécules du CMH-I (Joncker et al., 2009). L'amplitude de la réponse des cellules NK dépendrait ainsi du nombre de récepteurs inhibiteurs qu'elles expriment (Figure 5). Une cellule NK possédant deux récepteurs inhibiteurs serait plus réactive qu'une cellule n'en exprimant qu'un seul

(Brodin et al., 2009). En accord avec ce modèle, les cellules NK de souris exprimant plusieurs allèles de CMH-I ont des fonctions effectrices de meilleures qualités que celles issues de souris n'exprimant qu'un seul allèle (Jonsson et al., 2010).

D'autres paramètres sont à prendre en compte pendant l'éducation des cellules NK, comme l'affinité du récepteur pour la molécule de CMH-I (Jonsson et al., 2010). La nature du peptide présenté par ces molécules influence l'affinité des récepteurs NK pour les molécules du CMH-I (Alter et al., 2011) (Fadda et al., 2010) (Borhis et al., 2013). En cas d'infection, la qualité de la « sélection » pourrait être modifiée.

L'anergie des cellules NK « non-éduquées » n'est pas un phénomène qui affecte tous les récepteurs. Des travaux récents indiquent que suite à la reconnaissance d'une cellule cible, les premiers évènements de signalisation *via* les molécules d'adhésion, notamment LFA-1, sont enclenchés. L'absence de réponse affecte la capacité des récepteurs activateurs à transduire des signaux qui interviennent après les étapes de fixation à la cellule cible et donc à renforcer l'interaction cellule cible/cellule effectrice et qui permettent notamment d'activer les fonctions effectrices des cellules NK (Thomas et al., 2013).

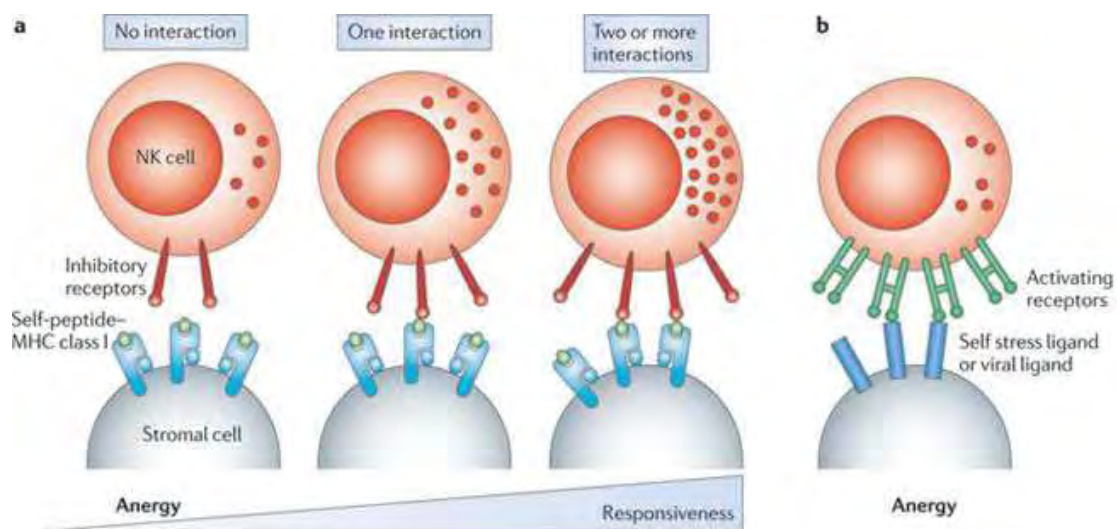


Figure 5 : Modèle d'éducation des cellules NK. a) Dans la moelle osseuse, les cellules NK en développement interagissent avec les molécules de CMH-I exprimées par les cellules hématopoïétiques ou stromales via les récepteurs inhibiteurs. Le nombre d'interaction détermine le degré de réponse des cellules NK. b) Les cellules NK en développement qui interagissent avec des ligands du Soi ou des ligands viraux *via* les récepteurs activateurs deviennent anergiques (Sun and Lanier, 2011).

6 Homéostasie des cellules NK

Les cellules NK sont des cellules de l'immunité innée et sont donc considérées comme ayant une durée de vie courte par rapport aux lymphocytes T et B. En périphérie, les cellules NK matures de souris immunocompétentes ont une demi-vie estimée à une semaine (Jamieson et al., 2004). La maintenance des cellules NK en périphérie est dépendante de l'IL-15 (Ranson et al., 2003). La signalisation IL-15 permet notamment l'expression de facteurs anti-apoptotiques de la famille de Bcl-2 (Koka et al., 2003).

La faible durée de vie des cellules NK a été remise en cause par plusieurs observations. L'homéostasie des cellules NK est ainsi plus proche de ce qui est observé pour les LT et LB, que des autres populations innées. Lorsqu'elles sont transférées dans un hôte lymphopénique, les cellules NK matures vont proliférer très rapidement pour reconstituer le système immunitaire de l'hôte receveur (Prlic et al., 2003). Durant cette prolifération homéostatique, elles acquièrent un phénotype de cellules activées et peuvent répondre très rapidement en cas d'infection. De façon surprenante, ces cellules sont capables de repeupler plusieurs organes de l'hôte mais aussi de persister pendant plus de 6 mois, tout en gardant leur capacité de réponse intacte. En revanche, après la phase proliférative, ces cellules acquièrent un phénotype de cellules quiescentes, contrairement aux LT (Sun and Lanier, 2011).

Lors d'une infection, les cellules NK prolifèrent rapidement (Dokun et al., 2001) (Gillard et al., 2011) (Cook and Whitmire, 2013) (van Helden et al., 2012) (Kim et al., 2008). Des études phénotypiques ont permis de démontrer une expansion clonale des cellules NK en réponse à certains pathogènes persistants tels que le HCMV (Guma et al., 2004; Guma et al., 2006). Cette population persiste plusieurs mois après que l'infection ait été contrôlée, ce qui indiquerait que les cellules NK sont douées de propriétés attribuées jusqu'ici aux cellules de l'immunité adaptative.

L'appartenance à l'immunité innée est également discutée, avec la découverte de populations NK ayant des caractéristiques de cellules mémoires (O'Leary et al., 2006). Les cellules NK sont en effet capables de persister plusieurs mois après une infection et de monter des réponses de rappel. Les différentes phases de cette réponse « mémoire » des cellules NK ressemblent à ce qui a été décrit pour les réponses mémoires des LT, avec des phases de prolifération et de contraction du pool de cellules NK répondant à l'infection (Sun et al., 2009). Chez la souris, la population de cellules NK « mémoires » réside dans le foie, qui fournit les signaux nécessaires à leur maintien. (Paust et al., 2010). Des populations de cellules NK dites « mémoires » ont également été identifiées chez l'Homme (Foley et al., 2012a; Lopez-Verges et al., 2011). De plus amples études sont nécessaires pour définir clairement ce type de cellules NK, et leur réelle capacité mémoire. Certains auteurs évoquent plutôt une immunité innée « entraînée » pour les caractériser (Netea et al., 2011).

B Le répertoire de récepteurs des cellules Natural Killer

Contrairement aux lymphocytes T et B, les récepteurs des cellules NK ne subissent pas de réarrangements géniques au cours de leur développement. Les nombreux récepteurs activateurs et inhibiteurs des cellules NK (NKR) sont directement codés par le génome. Des signaux sont transduits en permanence dans les cellules NK par l'engagement de ces récepteurs, provenant de cellules saines ou de cellules infectées ou transformées. Le répertoire sophistiqué de récepteurs activateurs et inhibiteurs qui régule l'activité des cellules NK assure qu'elles protègent l'hôte contre les pathogènes et prévient d'une activation délétère. Les récepteurs activateurs et inhibiteurs sont majoritairement de deux types : soit des glycoprotéines monomériques de type I de la superfamille des immunoglobulines (Ig), soit des glycoprotéines de type II de type lectine (Biassoni et al., 2001). Les gènes de la majorité des récepteurs de type Ig sont rassemblés dans le locus appelé LRC (Leukocyte-Receptor-Complex) (Figure 6) sur le chromosome 19q13.4 ; les gènes des récepteurs de type lectine sont localisés dans le locus NK-Complex (NKC) sur le chromosome 12p12-13 (Barrow and Trowsdale, 2008; Renedo et al., 2000).

1 Les récepteurs des cellules NK

1.1 Récepteurs de type immunoglobuline (Ig)

Les récepteurs de type Ig représentent chez l'Homme plusieurs groupes de récepteurs qui se distinguent par la nature de leurs ligands. Les cellules NK expriment différentes combinaisons de récepteurs suivant leur stade de maturation et leur état d'activation. L'infection de l'hôte par divers types de pathogènes, ou encore l'environnement cytokinique influe également sur leur expression.

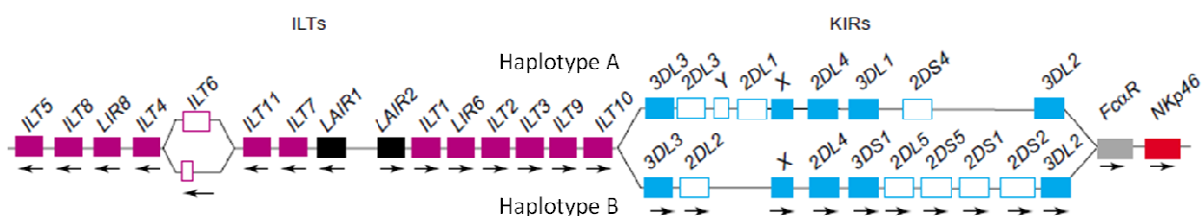


Figure 6: Organisation du LRC sur le chromosome 12p12-13 (Barten et al., 2001)

1.1.1 Les Killers Ig-like Receptors (KIR)

La famille des KIR (CD158a-k, z) est composée de 15 gènes codant pour des protéines fonctionnelles et de 2 pseudogènes. Ces récepteurs sont classés selon le nombre de domaines Ig dans leur partie extracellulaire et la taille de la région intracytoplasmique. Les récepteurs sont ainsi répertoriés sous la nomenclature KIR suivi du nombre de domaine Ig et de la lettre S (Short intracytoplasmic tail) ou L (Long intracytoplasmic tail). Les récepteurs sont donc nommés KIR2D ou KIR3D lorsqu'ils ont deux ou trois domaines Ig respectivement (Marsh et al., 2003) (Figure 7).

Tous les KIR sont probablement dérivés des KIR3DL et l'organisation des gènes est identique pour tous (Sambrook et al., 2006). Ils sont composés de 9 exons qui correspondent aux différentes régions des protéines. Les exons 1 et 2 codent pour le peptide signal. Les exons 3, 4 et 5 codent chacun pour un domaine Ig, respectivement D0, D1 et D2 en fonction de leur position par rapport à la membrane plasmique, D2 étant le plus proche. L'exon 6 connecte le domaine D2 à la région transmembranaire codée par l'exon 7. Les exons 8 et 9 codent la région intracytoplasmique (Wilson et al., 1997).

La majorité des KIR possède deux domaines Ig. Les KIR2D sont classés en fonction des domaines Ig qu'ils expriment. Les KIR2D de type 1 ont des domaines homologues aux D1 et D2 des KIR3DL, tandis que les KIR2D de type 2 ont des domaines homologues aux D0 et D2. Ces différences s'expliquent par la présence d'un pseudoexon 3 qui est épissé lors de la maturation de l'ARN messenger des KIR2D de type 1 (Vilches et al., 2000). Les KIR2D de type 2 ont une délétion de 2kb qui leur a fait perdre l'exon 4. Les exons 8 et 9 sont de même taille, mais des mutations ponctuelles ont introduit un codon stop dans leur séquence aboutissant à des protéines tronquées (Selvakumar et al., 1997).

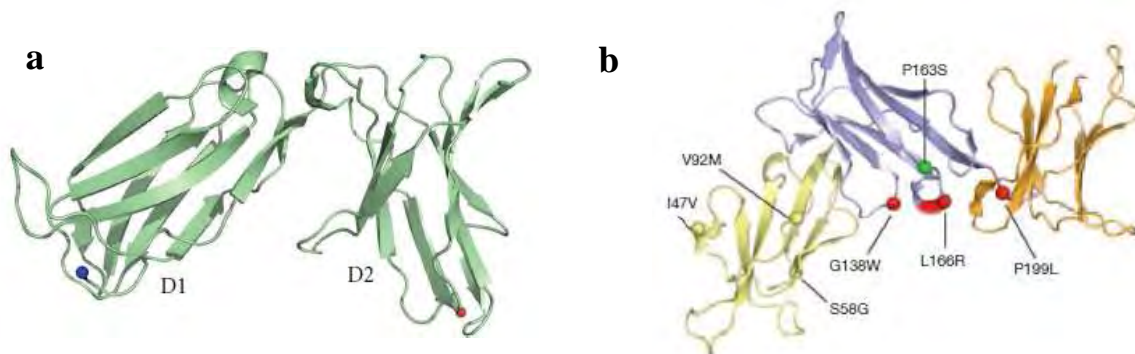


Figure 7 : a) Diagramme de Ribbon de la partie extracellulaire d'un KIR à deux domaines Ig (KIR2DL2) et b) diagramme de Ribbon de la partie extracellulaire d'un KIR à trois domaines Ig (KIR3DS1). (Joyce and Sun, 2011; Vivian et al., 2011)

La taille de la région cytoplasmique définit si le récepteur est activateur ou inhibiteur. Les KIR-L peuvent transduire directement des signaux inhibiteurs grâce à la présence dans leur partie intracytoplasmique de motifs ITIM (Immunoreceptor Tyrosine-based Inhibitory Motif). A l'inverse, les KIR-S, qui ne peuvent transduire de signaux *via* leur région intracytoplasmique, nécessitent le recrutement d'une molécule adaptatrice portant des motifs ITAM (Immunoreceptor Tyrosine-based Activatory Motif) (Lanier, 2008).

Les haplotypes de KIR montrent une très grande diversité, suivant la quantité de gènes qu'ils contiennent, résultats de duplications et de recombinaisons non-réciproques qui ont eu lieu dans le locus *KIR* (Uhrberg et al., 1997; Vendelbosch et al., 2013). La duplication suivie de la recombinaison d'une des copies expliquent la présence de paires de KIR ayant la même spécificité de ligands, mais des signalisations différentes (ex : KIR2DL1/KIR2DS1). Deux groupes d'haplotypes de KIR ont été

définis. Les haplotypes A contiennent moins de gènes, principalement des KIR-L. Les haplotypes B ont plus de gènes que les haplotypes A, dont plusieurs KIR-S. Les KIR montrent également un polymorphisme allélique très important. Ce polymorphisme a été observé pour tous les gènes codant pour des KIR inhibiteurs. Les gènes KIR ont ainsi une diversité approchant de celle du locus *HLA*. Les cellules NK n'expriment pas tous les récepteurs KIR, chacune exprime une combinaison propre. Seul KIR2DL4 est exprimé par toutes les cellules NK (Uhrberg et al., 1997).

1.1.2 Les Leucocytes Ig-like Receptors (LILR)

La famille des LILR est composée de 13 membres, six récepteurs activateurs potentiels (LILRA), cinq récepteurs inhibiteurs (LILRB) et deux pseudogènes (LILRP1 et LILRP2). Le locus est organisé en deux clusters qui résultent de la duplication suivie d'une inversion du locus originel (Barten et al., 2001; Wende et al., 2000). De ce fait l'homologie des séquences protéiques est de l'ordre de 63 à 84% entre les membres de cette famille. Malgré la proximité génétique avec les KIR, la variabilité des LILR est beaucoup moins importante en termes d'haplotypes et d'allèles, même si un certain niveau de polymorphisme existe. (Torkar et al., 2000). Le faible taux de recombinaison entre les clusters peut s'expliquer par la distance qui les sépare et la faible homologie de séquence entre les régions non-codantes des différents gènes.

A l'exception de LILRA3, tous les LILR sont des protéines transmembranaires de type I, constituées de deux ou quatre domaines Ig dans leur partie extracellulaire. Bien que les LILR soient structurellement proches des KIR, leurs domaines D1 et D2 ne présentent que 37% d'homologie de séquences avec ceux des KIR, ce qui implique des modalités de reconnaissance des ligands différentes (Chapman et al., 2000). Les domaines D3 et D4 sont moins connus car leur structure n'a pas été étudiée en détail. Ils ne semblent pas être impliqués dans la reconnaissance du ligand (Figure 8).

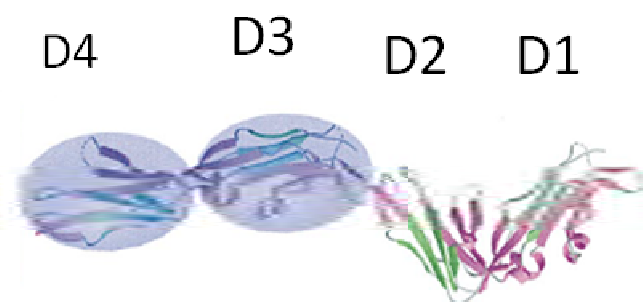


Figure 8 : Structure probable des domaines Ig extracellulaires du récepteur LILRB1 (Chapman et al., 2000).

Comme pour les KIR, il existe des LILR activateurs avec de courtes régions intracytoplasmiques, et des LILR inhibiteurs, avec des régions intracytoplasmiques plus longues (Brown et al., 2004). Les ARN messagers peuvent être épissés pour donner des protéines solubles qui entrent en compétition avec les récepteurs membranaires (Jones et al., 2009). Les LILR sont

principalement exprimés par les cellules de la lignée myéloïde et les cellules dendritiques plasmacytoïdes (pDC) (Brown et al., 2004). Le LILR exprimé par la majorité des cellules NK est le LILRB1 (ILT2) inhibiteur. D'autres, comme LILRB2, sont inductibles dans certaines conditions inflammatoires (LeMaoult et al., 2005).

1.1.3 Les récepteurs de cytotoxicité naturelle (NCR)

La famille des récepteurs de cytotoxicité naturelle (NCR) comporte trois membres, identifiés et clonés entre 1997 et 1999 (Pende et al., 1999; Sivori et al., 1997; Vitale et al., 1998). Ils sont nommés d'après leur capacité à déclencher l'activité cytotoxique des cellules NK contre des cellules infectées ou transformées. Ce sont des récepteurs transmembranaires de type Ig qui délivrent des signaux d'activation très puissants lorsqu'ils sont engagés par leurs ligands. Les trois NCR connus à l'heure actuelle sont NKp46, NKp44 et NKp30 (respectivement CD335, CD336 et CD337).

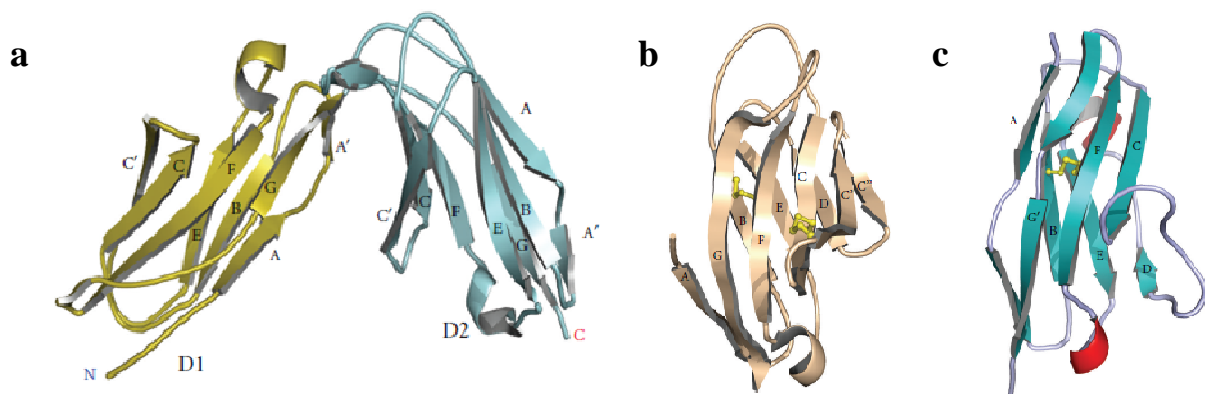


Figure 9 : Représentation de la structure des domaines Ig des NCR : a) NKp46, b) NKp44, c) NKp30. (Joyce et al. 2011)

NKp46 : NKp46 est le seul NCR conservé au cours de l'évolution chez tous les mammifères. Il est codé par le gène *NCR1*, situé dans le LRC. Il a été nommé NKp46 suite à sa découverte car il migre en Western Blot à 46 kDa. Sa structure est homologue à celle des KIR et des LILR (Figure 9). Comme les autres récepteurs activateurs des cellules NK, il possède un domaine transmembranaire et une partie intracytoplasmique courte. Il s'agit du seul NCR à posséder deux domaines Ig de type C2 dans sa partie extracellulaire (Pessino et al., 1998). NKp46 est constitutivement exprimé par les cellules NK matures.

NKp44 : NKp44 est le seul NCR inductible après activation (Cantoni et al., 1999). Le gène *NCR2* se situe sur le chromosome 6 (6p21) humain dans le cluster des récepteurs TREM (Triggering Receptors Expressed on Myeloid cells), auxquels il est structurellement relié (Allcock et al., 2003). Sa partie extracellulaire n'est composée que d'un seul domaine Ig de type V (Figure 9). La forme majoritaire du récepteur NKp44 comporte une partie intracytoplasmique courte, mais il existe deux isoformes qui possèdent un domaine intracellulaire plus long, qui ne semble pas associé à une fonction

particulière (Campbell et al., 2004). Certaines populations innées de lymphocytes (ILC) expriment NKp44, ainsi que les cellules dendritiques plasmacytoïdes (pDC) des amygdales, où il montre une activité inhibitrice (Fuchs et al., 2005).

NKp30 : le gène *NCR3* est situé sur le chromosome 6 (6p21) humain, dans le locus du Complexe Majeur d'Histocompatibilité de type III. *NCR3* est transcrit en plusieurs variants d'épissage, qui modifient la fonction de la protéine. Il est constitué de quatre exons, avec la particularité de posséder trois exons 4, qui code pour le domaine Ig (Delahaye et al., 2011). Suivant l'exon qui sera conservé lors de l'épissage, NKp30 aura soit un domaine Ig de type V (forme majoritaire), soit un domaine Ig de type C (forme minoritaire) (Figure 9). Sa séquence est proche des protéines de la famille de CD28. NKp30 est un récepteur important pour l'immunité NK anti-tumorale ou encore dans l'homéostasie des cellules dendritiques. En effet, *via* ce récepteur, les cellules NK vont éliminer les DC immatures ou mal activées pour les empêcher de migrer vers les organes lymphoïdes secondaires. Les mécanismes qui gouvernent l'expression préférentielle de certaines isoformes ne sont pas définis.

1.1.4 Les récepteurs de cytotoxicité dépendante des anticorps (ADCC)

L'infection de l'hôte par des pathogènes conduit à une réponse anticorps par les lymphocytes B spécifiques des antigènes du pathogène. L'opsonisation des cellules cibles par les anticorps les rend sensibles à une lyse dirigée par les protéines du complément ou par les cellules cytotoxiques qui expriment des récepteurs au fragment constant (FcR) des Ig. Les cellules NK expriment deux récepteurs Fc, le CD32 (Fc γ RII) et majoritairement le CD16 (Fc γ RIII) (Metes et al., 1998; Simmons and Seed, 1988). CD16 est un récepteur Fc γ de type III. Il en existe deux isoformes chez l'Homme, Fc γ RIIIa et Fc γ RIIIb, qui présentent 96% d'identité de séquence dans leur région extracellulaire. Il est organisé en deux domaine Ig (D1 et D2) de type C2 reliés par un peptide linker de deux acides aminés (Figure 10) (Sondermann et al., 2000; Zhang et al., 2000). CD16 est un récepteur Fc de faible affinité, toutefois il s'agit du seul récepteur activateur des cellules NK capable d'induire une activité cytotoxique sans costimulation (Bryceson et al., 2006).

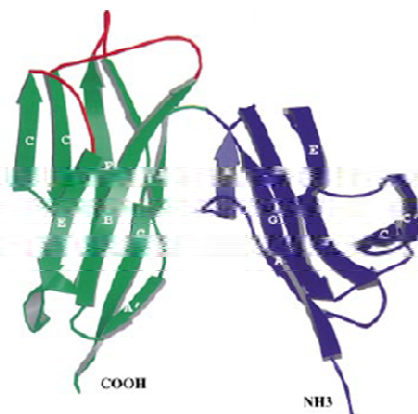


Figure 10 : Structure des domaines D1 et D2 du CD16 humain (Zhang et al., 2000)

1.1.5 Récepteurs et co-récepteurs de la famille CD2

Les récepteurs de la famille de CD2 (aussi appelée famille des récepteurs SLAM) regroupent onze membres : 2B4 (CD244), BLAME (B lymphocyte activator macrophage expressed), CD2, CD48, CD58, CD84, CD84-H1 (CD84 homolog 1), CD150 (signaling lymphocyte activation molecule SLAM), CD229 (DNAX accessory molecule 1, DNAM-1), CS1, et NTBA (NK-T-B-antigen).

En général, les membres de cette famille sont des protéines transmembranaires de type I, avec un seul domaine Ig de type V et un seul domaine Ig de type C dans la partie extracellulaire (Figure 11). Les gènes codant pour CD2 et CD58 sont localisés sur le chromosome 1q13, tandis que les neuf autres sont dans la région 1q21-24 (Boles et al., 2001). Tous les membres de cette famille de récepteurs interagissent de façon homotypique ou hétérotypique avec un autre membre de la famille. L'expression des récepteurs de la famille CD2 est restreinte aux cellules hématopoïétiques, à l'exception de CD48 et CD58. Les cellules NK expriment de façon variable 8 récepteurs de cette famille. Des transcrits alternatifs existent pour plusieurs de ces récepteurs. Enfin, des mutations ou des délétions de ces gènes sont associées à des susceptibilités à des infections ou encore à certains syndromes d'origine génétique comme les maladies lymphoprolifératives liées à l'X (McNerney and Kumar, 2006).

CD244 (2B4) et CD48: CD244 est exprimé sous la forme de deux transcrits chez l'Homme, *h2B4-A* et *h2B4-B*, qui codent pour les isoformes A et B respectivement (Mathew et al., 2009). Contrairement à leurs homologues chez la souris, ces deux isoformes ne diffèrent pas par la présence de motifs de signalisation dans la région intracytoplasmique (Stepp et al., 1999). En revanche, suivant le nombre de motifs phosphorylés dans la partie intracytoplasmique, la nature du signal peut être modifiée (Eissmann et al., 2005). *h2B4-A* et *h2B4-B* sont issus de l'épissage alternatif de l'exon 3, qui rajoute 15 nucléotides au transcrit *h2B4-B*, à la jonction entre les domaines Ig V et C2. *h2B4-B* contient ainsi 5 aminoacides supplémentaires dans sa partie extracellulaire, dont une proline. Ce qui pourrait modifier l'affinité du récepteur pour CD48, le ligand de 2B4, ou les modalités d'interaction. Il est établi que 2B4 a un double rôle dans la biologie des cellules NK. Ainsi, CD244 n'agit pas comme un récepteur primaire de cytotoxicité, mais comme un co-récepteur qui dépend de l'engagement d'autres récepteurs activateurs (Bryceson et al., 2006). L'interaction 2B4/CD48 entre cellules NK augmente leur prolifération, mais elle empêche aussi la lyse fratricide (Betser-Cohen et al., 2010; Kim et al., 2010).

CD48 est exprimé par toutes les cellules hématopoïétiques et par l'endothélium humain. Il est le seul membre de cette famille, avec CD58, à ne pas avoir de domaine transmembranaire. Il est ancré à la membrane par une ancre glycoprophatidylinositol (GPI) (Staunton et al., 1989). Du fait de l'ancre GPI, CD48 est susceptible d'être clivé après activation et donc d'être retrouvé sous forme soluble dans la circulation sanguine (Boles et al., 2001).

CD2 et CD58 : CD58 est le ligand physiologique de CD2 chez l'Homme. Le domaine intracytoplasmique de CD2 est riche en prolines et en résidus basiques, qui permettent le recrutement

des kinases. CD2 agit comme un co-récepteur activateur (Bryceson et al., 2006), son engagement par un anticorps monoclonal suffit à activer l'activité cytolytique des cellules NK. La fonction principale de CD2 est de permettre une meilleure adhésion entre la cellule NK et sa cible, ou entre une cellule NK et une cellule présentatrice d'antigène (APC) qui exprime CD58 (Crawford et al., 2003). Comme pour les lymphocytes T l'interaction CD2-CD58 peut conduire à la maturation de la cellule dendritique, et à l'activation de la cellule NK.

CD229 : ce récepteur est exprimé par environ 40% des cellules NK. CD229 est le seul membre de la famille de CD2 à posséder 4 domaines Ig dans sa portion extracellulaire (Tovar et al., 2000). Il se lie par interaction homophile à une autre molécule CD229 exprimée par une cellule hématopoïétique (Romero et al., 2005). Sa fonction dans les cellules NK n'est pas encore définie.

CS1 et NTB-A : il existe plusieurs transcrits de ces deux récepteurs. CS1 (CRACC/CD319) est soit activateur, soit inhibiteur, selon que l'isoforme longue ou l'isoforme courte est exprimée. La production du variant court est due à l'épissage de l'exon 5, tout de suite après le domaine transmembranaire (Boles et al., 2001). NTB-A est un récepteur activateur qui régule l'activité lytique des cellules NK et qui module également leur réponse proliférative. CS1 et NTB-A sont leur propre ligand (Falco et al., 2004).



Figure 11 : Diagrammes de Ribbon représentant les domaines extracellulaires de NTB-A, CD2 et CD58. Les résidus colorés correspondent aux aminoacides intervenant dans les interactions homotypiques entre les récepteurs de la famille SLAM (Yan et al., 2007).

1.1.6 Autres récepteurs de type Ig

DNAM-1 est codé par un gène situé sur le chromosome 18 chez l'Homme. Son engagement par ses ligands PVR (Poliovirus Receptor, CD155) et nectin-2 (CD112), augmente la cytotoxicité ainsi que la sécrétion de cytokines par les cellules NK (Bottino et al., 2003). CEACAM1 (CarcinoEmbryonic Antigen-related Cell Adhesion Molecule 1) est exprimé par un large spectre de cellules. Il interagit de façon homotypique et hétérotypique avec d'autres variants de la famille CEACAM, dont CEACAM5 et CEACAM6. Des interactions homotypiques entre cellules NK ou des cellules cibles aboutit à l'inhibition de la cytotoxicité (Stern et al., 2005). CEACAM1 peut aussi inhiber la réponse cytotoxique des cellules NK par rétention des ligands de NKG2D dans des cellules

tumorales (Chen et al., 2011). CDw328, aussi appelée SIGLEC7, est une glycoprotéine de la famille des sialoadhésines qui possède trois domaines Ig dans sa partie extracellulaire, un domaine de type V en partie N-terminale et deux de type C2. La partie cytoplasmique possède un motif ITIM (Avril et al., 2004). Le gène codant SIGLEC7 est localisé sur le chromosome 19.

LAIR-1 est une protéine transmembranaire de type I caractérisée par un seul domaine Ig de type C, une région transmembranaire et une queue cytoplasmique qui contient deux séquences ITIM. LAIR-2 partage 84% d'identité avec LAIR-1, mais ne possède pas de domaine transmembranaire (Meyaard et al., 1997; Wende et al., 2000). Les gènes codant pour LAIR-1 et LAIR-2 divisent le cluster LILR en deux.

CD160 est codé par un gène présent sur le chromosome 1 et dépourvu de domaine transmembranaire. Plusieurs isoformes du récepteur ont été décrites. CD160 lie les molécules HLA-C et HLA-G (Le Bouteiller et al., 2011).

1.2 Récepteurs de type lectine

En plus des récepteurs de type Ig, les cellules NK expriment également des récepteurs de type lectine-C ou KLR (Killer cell Lectin-like Receptor). Les lectines sont une famille de protéines qui lient les carbohydrates de façon calcium-dépendante. Certaines protéines de cette famille ont perdu la capacité de lier le calcium : ce sont les C-type lectin-like receptors, dont font partie les récepteurs des cellules NK (Boyington et al., 1999). Les gènes de ces récepteurs sont retrouvés dans le NK-complex (NKC) sur le chromosome 12 (Figure 12). Contrairement aux cellules NK de souris, qui expriment majoritairement des récepteurs de type lectine (famille des Ly49, homologues fonctionnels des KIR humains), ce type de récepteurs est peu exprimé par les cellules NK humaines. Comme pour les récepteurs de type Ig, il y a dans ce locus des récepteurs activateurs et d'autres inhibiteurs.

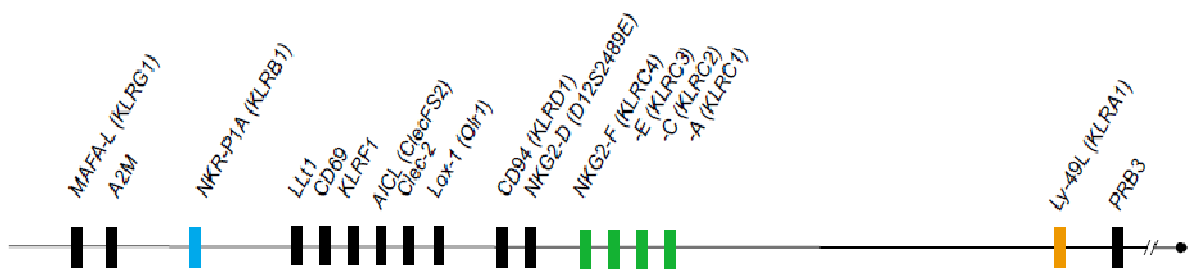


Figure 12 : Organisation du NK complex sur le chromosome 12p12-13 (Barten et al., 2001)

1.2.1 Les hétérodimères CD94/NKG2

Cinq molécules NKG2 différentes (NKG2A, B, C, E et H) se lient par des ponts disulfures à une chaîne invariante, CD94 (Lazetic et al., 1996) (Figure 13). CD94 n'a pas de domaine intracellulaire et ne peut donc transduire de signalisation par lui-même. La plupart des NKG2 ne peut être exprimé à la membrane s'ils n'est pas associé à CD94. Chaque sous-unité est composée d'un

domaine extracellulaire de type lectine C, d'un domaine transmembranaire et d'une portion intracytoplasmique. Les hétérodimères CD94/NKG2A et CD94/NKG2B sont des récepteurs inhibiteurs, avec deux motifs ITIM dans leur partie intracellulaire (Brooks et al., 1997). Les sous-unités NKG2A et NKG2B sont issues d'un épissage alternatif du même gène. Les autres récepteurs, lorsqu'ils sont associés à CD94, sont activateurs. NKG2E et H sont eux aussi issus d'un épissage alternatif, ce qui n'est pas le cas pour NKG2C. Ces récepteurs n'ont pas de portion intracytoplasmique et nécessitent donc le recrutement de molécules adaptatrices portant des motifs ITAM pour transduire des signaux activateurs après engagement par leur ligand (Lanier et al., 1998). Les protéines de cette famille présentent une grande homologie de séquence peptidique, de l'ordre de 56% entre NKG2A, C et E, et de 92% entre NKG2C et NKG2E (Borrego et al., 2002).

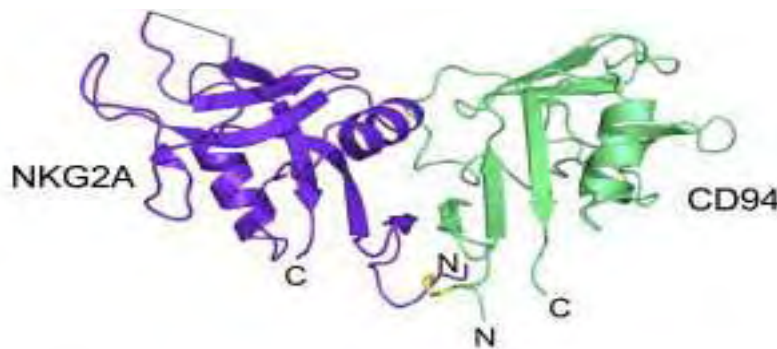


Figure 13 : Diagramme de Ribbon de la structure de l'hétérodimère CD94/NKG2A
(Sullivan et al., 2007)

1.2.2 NKG2F

NKG2F ne s'associe pas avec CD94. Il contient un résidu chargé dans sa région transmembranaire et de ce fait n'est exprimé que dans des compartiments intracellulaires, où il peut s'associer avec une molécule adaptatrice pour transduire des signaux. Son domaine extracellulaire apparaît tronqué par rapport aux autres protéines de la famille NKG2, et son domaine intracellulaire contient un motif ITIM-like (Kim et al., 2004). Ses fonctions ne sont pas encore identifiées.

1.2.3 L'homodimère NKG2D/NKG2D

NKG2D est le seul membre de cette famille qui forme un homodimère à la surface cellulaire par des ponts disulfures (Figure 14). Il montre peu d'homologie de séquence avec les autres récepteurs de la famille NKG2 (Houchins et al., 1991). Le gène codant NKG2D est aussi situé dans le NKC et présente très peu de polymorphisme. Chez la souris, le gène *NKG2D* produit deux transcrits, une isoforme longue et une forme courte, qui s'associent chacun à un adaptateur différent (Gilfillan et al., 2002). Chez l'Homme, un seul transcrit code pour NKG2D, qui ne s'associe qu'à une seule molécule adaptatrice (Rosen et al., 2004). L'engagement de NKG2D par ses ligands physiologiques active les capacités cytotoxiques des cellules NK et la sécrétion de cytokines (Kubin et al., 2001).

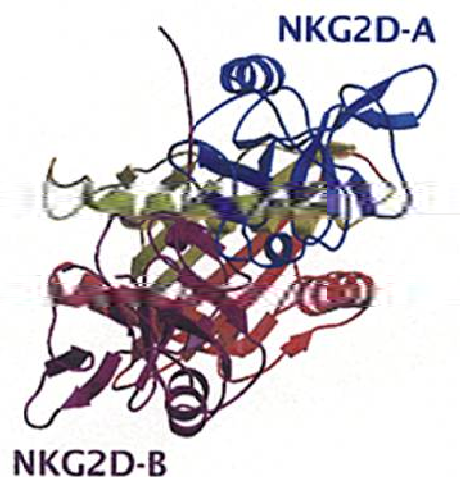


Figure 14 : Diagramme de Ribbon de la structure du dimère NKG2D (en bleu et en violet) complexé avec son ligand MICA (en jaune et en rouge) vu de dessus (Li et al., 2001)

1.2.4 Autres récepteurs de type lectine-C

Le NKC contient d'autres récepteurs exprimés par les cellules NK. Leurs fonctions ou leurs rôles physiologiques en cas d'infection ou de cancers ne sont pas encore tous déterminés.

Le génome murin contient plusieurs gènes codant pour des récepteurs de la famille NKR-P. Chez l'Homme, il n'existe qu'un seul gène non-polymorphique, codant pour NKR-P1A (CD161). Il est exprimé par la majorité des cellules NK, une sous-population de cellules NKT et quelques lymphocytes T. NKR-P1A inhibe la cytotoxicité des cellules NK malgré l'absence de motif ITIM dans la séquence de la protéine (Poggi et al., 1998).

KLRG1 est exprimé par environ 60% des cellules NK. Ce récepteur possède un motif ITIM dans sa partie intracytoplasmique. Il agit donc comme un récepteur inhibiteur. KLRG1 est un récepteur des E-cadherines (Ito et al., 2006).

NKp80 et AICL (Activation-Induced C-type Lectin) sont un couple récepteur-ligand. NKp80 est exprimé par les cellules NK sous forme d'homodimère. Son engagement par AICL exprimé par les cellules myéloïdes normales ou malignes est activateur (Welte et al., 2006).

NKp65 stimule la cytotoxicité des cellules NK et la sécrétion de cytokines après interaction avec son ligand, KACL (Keratinocyte-Associated C-type Lectin), une autre protéine de type lectine C, exprimée uniquement par les kératinocytes (Spreu et al., 2010).

Chez la souris, la famille des récepteurs Ly-49 compte au moins 14 gènes dans le NKC murin. Des analyses génomiques chez l'Homme ont mis en évidence l'existence d'une seule séquence proche de la famille de gènes *Ly-49* murins, appelée *KLRA1* ou *Ly-49L*. Toutefois le transcrite détecté n'est probablement pas fonctionnel, un codon stop précoce étant retrouvé dans la séquence de l'exon 5 (Barten and Trowsdale, 1999).

1.3 Signalisation induite après engagement des récepteurs des cellules NK

La plupart des récepteurs activateurs des cellules NK communiquent les stimuli externes par des associations non-covalentes avec des homodimères de protéines adaptatrices transmembranaires. Les cellules NK expriment quatre adaptateurs : CD3 ζ (CD247), Fc ϵ RI γ , DAP10 et DAP12.

L'association du récepteur activateur avec l'adaptateur se fait généralement par des interactions entre des résidus arginine ou lysine de la région transmembranaire avec un résidu acide, aspartate ou glutamate, de l'adaptateur (Lanier, 2008).

1.3.1 Les molécules adaptatrices DAP12/FcR γ /CD3 ζ

Les adaptateurs apportent les motifs ITAM nécessaires à la transduction du signal. Un motif ITAM est caractérisé par une séquence Yxx(L/I/V)_{x(6-8)}Txx(L/I/V) (Horejsi, 2004). CD3 ζ , Fc ϵ R1 γ et DAP12 contiennent un ou plusieurs ITAM. Quand un récepteur est engagé par son ligand, les résidus tyrosine des motifs ITAM sont phosphorylés par des tyrosines kinases de la famille Src (Lyn, Lck ou Fyn). Les motifs ITAM établissent ensuite des liaisons avec les domaines SH2 des protéines kinases de la famille Syk (Spleen Tyrosine Kinase Syk et ζ -associated protein of 70 kDa ZAP-70) (McVicar et al., 1998). Ces kinases initient une cascade de signalisation qui aboutit au déclenchement de la cytotoxicité et du relargage de cytokines par les cellules NK (Brumbaugh et al., 1997). Sont notamment recrutés LAT (Linker of Activated T cells) et des adaptateurs cytosoliques comme SLP-76 (SH2 domain-containing leukocyte phosphoprotein of 76 kD) et 3BP2 (SH3-Binding Protein 2). Syk et de ZAP-70 enclenchent les voies de la Phospholipase C γ et de 1 Phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K), les deux voies majeures d'activation des cellules NK (Jiang et al., 2000; Jiang et al., 2002).

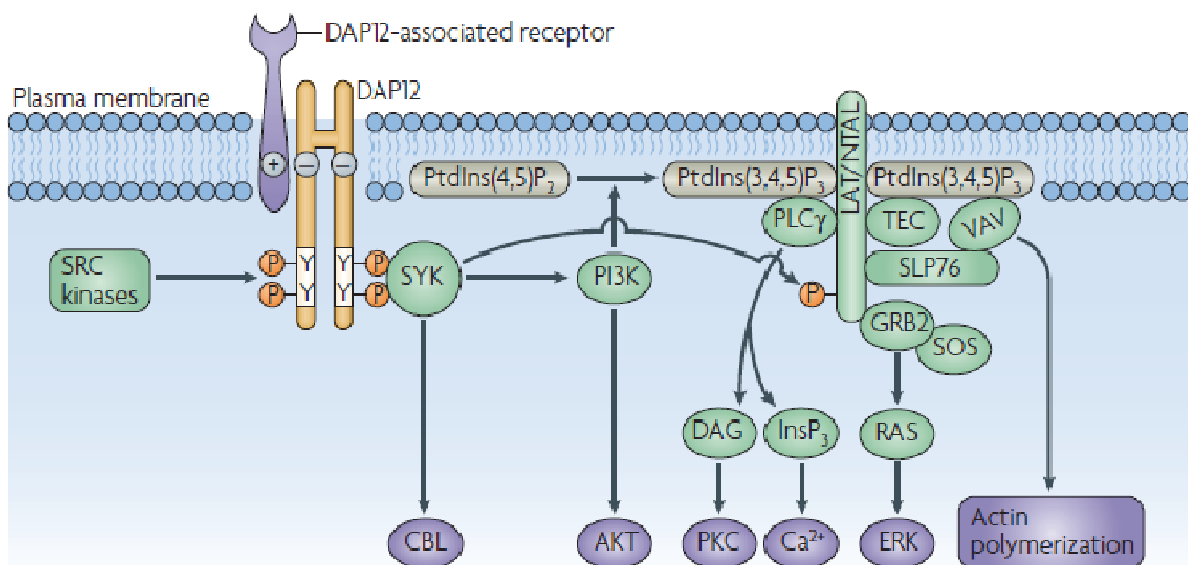


Figure 15 : Modèle de signalisation DAP12 après phosphorylation de ses motifs ITAM par des Src kinases, qui permet le recrutement de Syk, l'activation de la PI3K et de la PLC γ , la dégradation de leurs substrats et les phosphorylations en cascade qui activent l'activité cytotoxique et la sécrétion de cytokines (Turnbull and Colonna, 2007).

La PLC γ clive le phosphatidylinositol 4,5-biphosphate PIP2 à la membrane plasmique pour donner deux seconds messagers : le 1,4,5-triphosphate (IP3) et le diacylglycérol (DAG). L'IP3 permet

la libération des stocks de calcium du réticulum endoplasmique. Le calcium se fixe à la calmoduline et active la phosphatase calcineurine. La calcineurine déphosphoryle le facteur de transcription NFAT, qui migre au noyau cellulaire et active la transcription des gènes des cytokines. L'autre produit de la dégradation de l'IP3, le DAG, permet le recrutement de la protéine kinase $C\gamma$ (PKC γ) et de la molécule Ras. La PKC γ induit la dégradation d'I κ B et donc l'activation du facteur de transcription NF- κ B et sa translocation au noyau. De son côté, Ras initie la voie de signalisation des MAPK (MAP-kinases), des sérines thréonines kinases cytosoliques impliquées dans la régulation de gènes essentiels à l'activation cellulaire (MacFarlane and Campbell, 2006; Vivier et al., 2004) (Figure 15)

Dans le même temps, la PI3K phosphoryle le groupe hydroxyinositol du PIP2 pour générer du phosphatidylinositol 3,4,5-triphosphate (PIP3). Le PIP3 recrute à la membrane des protéines de signalisation contenant des domaines pleckstrin homology (PH). Parmi ces protéines de signalisation, on retrouve notamment la PLC γ , Vav, Itk et 3BP2 (MacFarlane and Campbell, 2006). La voie de signalisation PI3K active aussi Akt, qui est impliquée dans la régulation de la prolifération et la survie cellulaire (Figure 15) (Jiang et al., 2003). L'activation des RhoGTPases par les protéines Vav initie la phosphorylation des kinases PAK, MEK et Erk, de la voie des MAPK. Cette voie est essentielle au réarrangement du cytosquelette et la mise en place de la fonction cytotoxique. Elle intervient aussi dans le contrôle de la prolifération, la régulation transcriptionnelle et la sécrétion de cytokines.

1.3.2 La molécule adaptatrice DAP10

DAP10 possède une séquence YINM dans sa partie intracellulaire. DAP10 s'associe sous forme de dimère au récepteur activateur NKG2D uniquement. Le motif YINM est phosphorylé après engagement de NKG2D, ce qui permet la création d'un site de liaison pour les domaines SH2 de l'adaptateur Grb2 et la sous-unité p85 de la PI3K (Chang and Wang, 1999; Wu, 1999). Ces deux protéines sont essentielles aux flux calciques permettent l'activation des cellules NK. Il semble qu'une synergie avec la signalisation IL-15 soit nécessaire pour enclencher la cytotoxicité, puisque Jak3 (Janus Kinase 3) est un candidat à la phosphorylation de DAP10 (Horng et al., 2007). La signalisation enclenchée par DAP10 diffère de celles induites par les autres adaptateurs. Sa phosphorylation est dépendante des kinases Src, de SLP-76, de la PLC γ , de Vav-1 et des RhoGTPases, mais pas des kinases Syk. L'engagement de NKG2D peut notamment activer les voies Jak2 (Janus Kinase 2) et STAT5 (Sutherland et al., 2002). L'engagement de NKG2D peut activer la fonction cytotoxique des cellules NK, mais son implication dans la sécrétion de cytokines n'a pas été clairement définie (Wu et al., 2000). Cette différence peut s'expliquer par les protéines de la famille Vav activées respectivement par DAP10 et DAP12. La signalisation en aval de DAP10 active Vav-1, tandis que DAP12 conduit à l'activation de Vav-2 et Vav-3, essentielles à la production d'IFN γ par les cellules NK, production Vav-1 indépendante (Cella et al., 2004) (Figure 16).

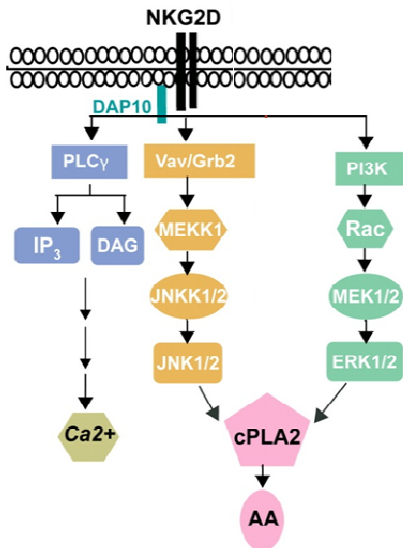


Figure 16 : Modèle de la signalisation de DAP10 après engagement de NKG2D. DAP10 permet l'activation de la PLC γ et de la PI3K indépendamment des Syk kinases (Tang et al., 2009)

1.3.3 Les molécules adaptatrices de la famille de SAP

Les récepteurs de la famille de CD2 interagissent avec des molécules de la famille des SLAM-associated protein (SAP), via des motifs ITSM (Immunoreceptor Tyrosine-based switch motifs TxYxxV/L/I). Ces adaptateurs sont caractérisés par la présence d'un domaine SH2 (SRC homology 2) et d'une courte partie C-terminale. Cette famille comporte trois membres, dont deux seulement sont exprimés chez l'Homme. Il s'agit de SAP et de EAT2 (Ewing's sarcoma-associated transcript-2) (Morra et al., 2001; Sayos et al., 2000). ERT (EAT2-related transducer) est exprimé uniquement chez la souris (pseudo-gène chez l'humain). SAP et EAT2 sont impliquées dans des signaux contraires. Ainsi SAP permet la transduction de signaux activateurs, tandis que EAT2 transduit des signaux inhibiteurs (Veillette, 2006). La présence d'un seul domaine SH2 indique que les deux adaptateurs pourraient être des compétiteurs pour le domaine ITSM.

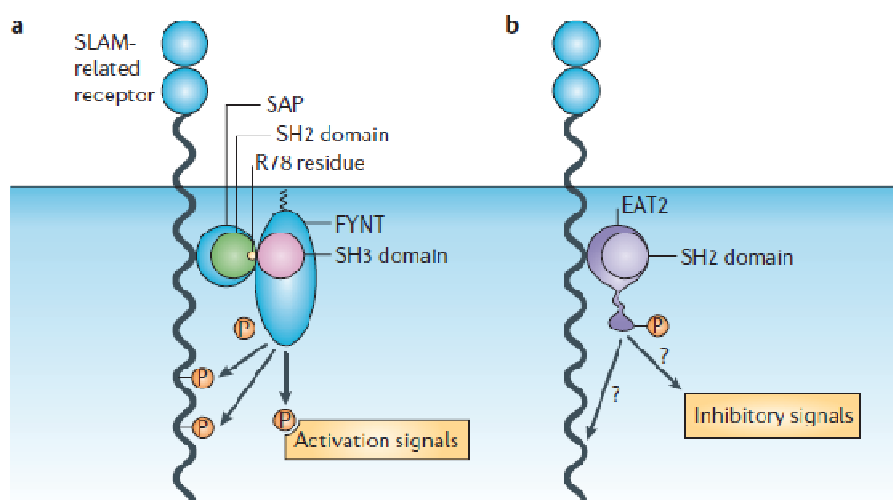


Figure 17 : Mécanismes d'action des adaptateurs des récepteurs de la famille SLAM, SAP et EAT2 après recrutement sur les motifs ITSM des portions intracellulaires des récepteurs (Veillette, 2006).

SAP permet le recrutement de FYNT (la forme hématopoïétique de FYN), une PTK de la famille des Src kinases (Latour and Veillette, 2001). Après phosphorylation, les récepteurs de la famille CD2 recrutent séquentiellement SHIP-1 (SH2 domain-containing inositol-5 phosphatase-1), Shc, Dok1/2, et RasGAP, afin de moduler l'activation des MAPK. SAP est essentielle aux activités cytotoxiques et cytokiniques des cellules NK (MacFarlane and Campbell, 2006). Au contraire EAT2, qui ne recrute pas FYNT, est phosphorylé dans les cellules NK sur des résidus tyrosine présents dans sa partie C-terminale (Roncagalli et al., 2005). La phosphorylation permet la liaison de tyrosines phosphatase, de kinases inhibitrices ou d'ubiquitine ligases. EAT peut également bloquer le recrutement d'autres protéines contenant des domaines SH2 sur les motifs ITSM (Figure 17).

Suivant l'adaptateur recruté, un même récepteur SLAM peut transduire des signalisations activatrices ou inhibitrices. Des défauts dans l'expression ou la fonction de ces protéines ont été associés à des pathologies telles que des syndromes lymphoprolifératifs (Tangye et al., 2000), des défauts de polarisation des lymphocytes T vers un profil Th2 (Davidson et al., 2004), une absence de commutation isotypique des anticorps dans les centres germinatifs (Morra et al., 2005), ou encore une susceptibilité à des maladies auto-immunes (Wandstrat et al., 2004).

1.3.4 Les motifs ITIM

Contrairement aux récepteurs activateurs, les récepteurs inhibiteurs n'ont pas besoin de recruter des protéines adaptatrices pour transduire des signaux. Leur région intracytoplasmique plus longue que celle des récepteurs activateurs comporte un ou des motifs ITIM (Immunoreceptor Tyrosine-based Inhibitory Motifs), qui peuvent être directement phosphorylés. Les ITIM sont définis par une séquence (I/L/V/S)xYxx(L/V) (Bruhns et al., 1999).

L'inhibition de l'activation des cellules NK se fait par le recrutement de protéines tyrosines phosphatases SHP-1 et SHP-2 (SH2 domain-containing protein tyrosine phosphatase 1 et 2) ou SHIP-1 (SH2 domain-containing inositol 5'-phosphatase-1). Ces phosphatases empêchent l'activation des cellules NK par déphosphorylation des substrats des protéines kinases recrutées par les récepteurs activateurs. Elles peuvent ainsi arrêter les flux calciques, la dégranulation, la production de cytokines et la prolifération des cellules NK (Ravetch and Lanier, 2000) (Figure 18).

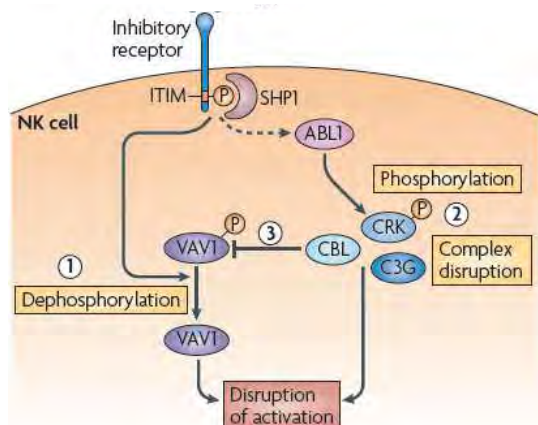


Figure 18 : Modèle de signalisation inhibitrice dans les cellules NK. La phosphorylation des motifs ITIM permet le recrutement de tyrosines phosphatases (SHP1) qui vont déphosphoryler les substrats des kinases activées par les signalisations activatrices (Hoglund and Brodin, 2010).

Les KIR inhibiteurs et les hétérodimères CD94/NKG2 inhibiteurs recrutent préférentiellement SHP-1 et SHP-2 (Stebbins et al., 2003), tandis que d'autres récepteurs, comme KLRG1 s'associent préférentiellement avec SHIP-1 (Tessmer et al., 2007). Les substrats des phosphatases peuvent différer suivant les récepteurs activateurs et inhibiteurs qui sont conjointement engagés. SHIP-1 peut cliver le PIP2 et le PIP3, ce qui prive la PLC γ de substrats, et empêche la PI3K de se fixer à certaines protéines possédant des domaines PH (MacFarlane and Campbell, 2006).

2 Les ligands des récepteurs NK

Les ligands des NKR sont généralement des protéines de l'hôte. Les molécules du Complexe Majeur d'Histocompatibilité de classe I (CMH-I) et des protéines apparentées sont les principaux ligands des NKR. Les signaux induits après engagement des récepteurs dépendent de la densité et du répertoire de ligands exprimées par une cellule cible et de modifications conformationnelles. Les modalités de reconnaissance des ligands dépendent de chaque groupe de récepteurs.

2.1 Les molécules du complexe majeur d'histocompatibilité de type I (CMH-I)

Les molécules du CMH-I (HLA Human Leukocyte Antigen chez l'Homme) sont classées en deux groupes. Les molécules HLA-I classiques, ou de classe Ia, sont codées par des gènes hautement polymorphiques et sont exprimées par la majorité des cellules nucléées. Ce groupe contient tous les allèles identifiés de HLA-A, -B, et -C. Au contraire, les gènes des molécules HLA-I non classiques ou de classe Ib, présentent moins de polymorphisme et leur distribution tissulaire est plus restreinte. Les molécules de classe Ib sont HLA-E, HLA-F et HLA-G. Les complexes du CMH-I sont des hétérodimères composés d'une chaîne lourde α très polymorphique ancrée dans la membrane plasmique et d'une chaîne légère non polymorphique β 2-microglobuline (β 2m) (Maenaka et al., 1999).

Les molécules du HLA-Ia présentent généralement des peptides dérivés de protéines endogènes dans un sillon formé par les domaines α 1 et α 2 de la chaîne lourde. Les molécules de classe Ib ont une fonction différente. HLA-E présente des peptides mais son répertoire est restreint, du fait de la présence de cinq résidus d'ancrage dans son sillon peptidique, au lieu de deux ou trois pour les molécules de classe Ia. Les peptides présentés sont dérivés de la séquence leader des autres molécules de classe I (Lee et al., 1998). Ainsi HLA-E indique que la dégradation et la présentation antigénique ne sont pas altérées dans la cellule. Lorsque TAP est inhibé, comme dans le cas d'une infection virale, le répertoire de peptides est modifié et HLA-E peut présenter des peptides normalement présentés par la molécule HLA-A2, ou des dérivés de la Hsp60 (Heat Shock Protein 60) (Lampen et al., 2013; Michaelsson et al., 2002). HLA-E est ubiquitaire mais est exprimé à un niveau moindre que les molécules HLA classiques. HLA-F est exprimé à la surface des cellules lymphocytaires activées sous une forme associée ou non à la β 2 microglobuline (Lee et al., 2010). HLA-F ne présente pas de peptides et a la particularité de pouvoir s'associer aux autres molécules HLA de classe I sous forme libre (Goodridge et al., 2010). L'association non classique de HLA-F avec un conformère ouvert des

molécules HLA classiques intervient dans la cross-présentation d'antigènes exogènes aux LT CD8+ cytotoxiques (Goodridge et al., 2013b). HLA-G est exprimé à faible niveau dans le thymus et à un niveau plus élevé dans l'utérus gestant, où il jouerait un rôle très important dans la tolérisation envers les antigènes fœtaux (Rouas-Freiss et al., 1997). Son rôle tolérogène est parfois détourné par des cellules tumorales.

Reconnaissance des molécules HLA par les récepteurs NK :

Les récepteurs KIR : les KIR-L se lient à plusieurs allèles HLA-A, HLA-B et HLA-C. En revanche, les ligands de la plupart des KIR activateurs ne sont pas identifiés. Les KIR3D se lient aux allèles de HLA-A et HLA-B, tandis que les KIR2D sont spécifiques des allèles de HLA-C, à l'exception de KIR2DL4 qui reconnaît HLA-G (Parham, 2005).

Les KIR2D sont divisés en deux groupes : ceux qui reconnaissent les allèles HLA-C du groupe C1 et ceux qui reconnaissent les allèles HLA-C du groupe C2. Les deux groupes d'allèles HLA-C sont définis par un dimorphisme de séquence en position 80 qui change la nature d'un aminoacide dans l'hélice $\alpha 1$, lysine ou asparagine, (Mandelboim et al., 1997; Winter and Long, 1997). Les KIR2D possèdent un dimorphisme correspondant en position 44 (méthionine ou lysine), qui lie l'acide aminé en position 80 de la molécule HLA-C. Les allèles HLA-Cw2, -Cw4, -Cw5 et -Cw6 possèdent un résidu lysine en position 80 alors que les allèles HLA-Cw1, -Cw3, -Cw7 possèdent un résidu asparagine.

Les domaines Ig des KIR2D contactent les hélices $\alpha 1$ et $\alpha 2$ de la molécule HLA par des liaisons hydrogènes et le peptide présenté en position P7 et P8, par la séquence linker entre les deux domaines Ig (Figure 19). Des études de mutagenèse ont déterminé que l'interaction linker-nonamère est essentielle à la stabilité de la liaison KIR/HLA (Fan et al., 2001). Ainsi, la nature du peptide présenté peut influencer sur la reconnaissance du CMH par les récepteurs NK.

Les KIR3D discriminent les haplotypes HLA-A et HLA-B de la même manière que les KIR2D. Le dimorphisme isoleucine/thréonine en position 80 des molécules HLA influence la reconnaissance spécifique par des KIR3D (Sharma et al., 2009). Les domaines D1 et D2 reconnaissent les hélices $\alpha 1$ et $\alpha 2$ de la même manière que les KIR2D, tandis que le domaine D0 établit un contact avec la $\beta 2m$ (Khakoo et al., 2002) (Figure 19). Les KIR3D établissent un contact avec le nonamère en position P8, mais avec une grande tolérance d'identité de l'acide aminé présent.

La plupart des KIR activateurs, malgré la grande identité de séquence avec leur homologue inhibiteur, n'a pas de ligand clairement identifié. Il est supposé que le KIR3DS1, qui n'a que 8 acides aminés de différence avec son pendant inhibiteur KIR3DL1, contacte le même ligand, HLA-Bw4. Ces associations HLA/KIR sont impliqués dans la résistance au HIV-1 (Martin et al., 2002; Martin et al., 2007).

Les récepteurs KIR3DL2 et KIR2DS4 reconnaissent la molécule HLA non classique HLA-F sous sa forme libre (Goodridge et al., 2013a). Les interactions entre des molécules HLA-I sous forme

libre et les récepteurs se produisent et elles peuvent moduler les réponses des cellules NK. Enfin, certaines observations suggèrent que les HLA-I ne seraient pas les ligands exclusifs des récepteurs KIR. KIR3DL2 peut en effet lier le CpG-oligodeoxynucleotides, un ligand du TLR9 (Sivori et al., 2010).

Les récepteurs LILR : tous les récepteurs de cette famille ne lient pas les molécules HLA. LILRB1 et LILRB2, exprimés par les cellules NK, reconnaissent à la fois les molécules HLA classiques et non classiques (Brown et al., 2004). Cette capacité s'explique par le site de reconnaissance des molécules HLA. En effet, alors que les KIR se lient aux régions polymorphiques $\alpha 1$ et $\alpha 2$ de la chaîne lourde, LILRB1 et LILRB2 se fixent sur l'hélice $\alpha 3$ relativement peu variée par leur domaine D1, et à la $\beta 2m$ par le peptide linker (Willcox et al., 2003) (Figure 19). LILRB1 est considéré comme un compétiteur de la molécule CD8 (Shiroishi et al., 2003). Bien que les LILR lient des régions conservées des molécules HLA, le polymorphisme du CMH-I et l'identité du peptide présenté jouent aussi un rôle dans la reconnaissance par ces récepteurs (Gruda et al., 2007). De plus, le rôle des domaines D3 et D4 dans ces interactions ne sont pas connus.

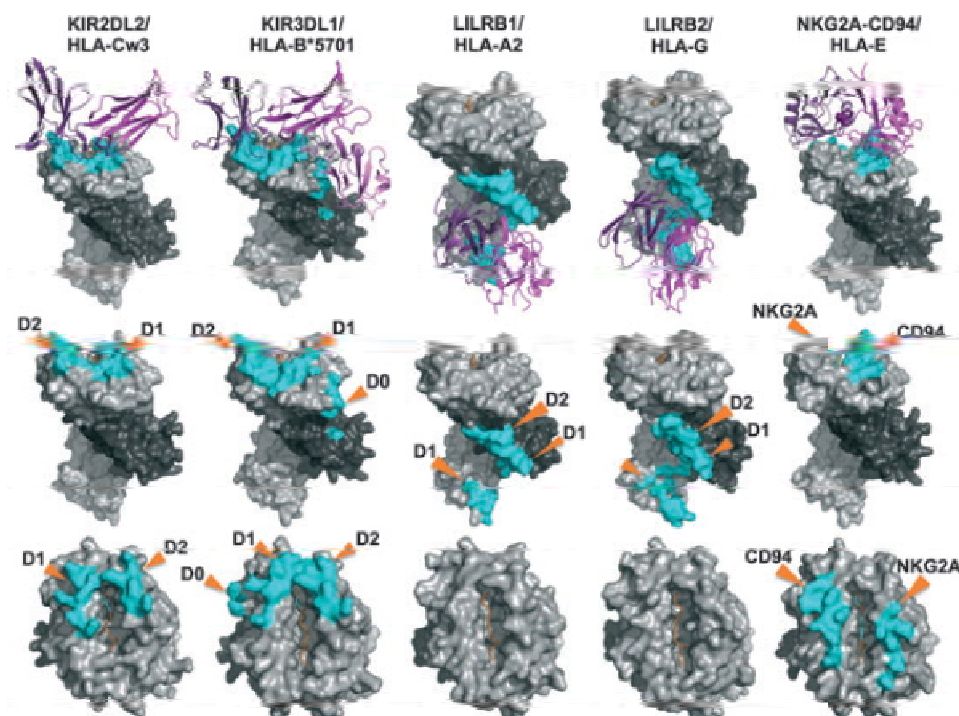


Figure 19 : Représentation des domaines d'interaction entre des récepteurs NK et les molécules HLA (chaîne lourde en gris clair et chaîne légère en gris foncé). Chaque famille de récepteur possède un mode de reconnaissance propre (Finton and Strong, 2012).

LILRB1 possède également un autre ligand, apparenté aux molécules HLA : la protéine UL18 du Cytomégalo virus humain (HCMV) (Browne et al., 1990). UL18 est une glycoprotéine

transmembranaire de type I homologue aux protéines du CMH-I humaines, mais qui présente beaucoup plus de sites de glycosylation. UL18 peut s'associer à la $\beta 2m$ et a la capacité de lier des peptides dans une poche mimant les hélices $\alpha 1$ et $\alpha 2$ des molécules HLA (Fahnestock et al., 1995). Bien qu'UL18 ne présente que 21% d'homologie de séquence avec les molécules HLA-I, la structure cristalline montre un haut degré de conservation de l'organisation des domaines reconnus par LILRB1 (Yang and Bjorkman, 2008). La liaison LILRB1/UL18 empêche l'activation des cellules NK.

Les hétérodimères CD94/NKG2 : les hétérodimères CD94/NKG2 exprimés à la surface cellulaire reconnaissent tous le même ligand HLA-E, avec des affinités différentes (Kaiser et al., 2005). Comme HLA-E présente principalement des peptides dérivés de la séquence leader des autres molécules HLA-I, sa reconnaissance permet aux cellules NK de vérifier que l'expression des molécules classiques est normale. En effet, la diminution de l'expression des molécules HLA est un mécanisme courant d'immunoévasion contre les lymphocytes T CD8⁺ (Sullivan et al., 2008).

Seul le mode de liaison de CD94/NKG2A à HLA-E a été élucidé par des analyses structurales (Petrie et al., 2008). CD94 se lie à l'hélice $\alpha 1$ de HLA-E et établit un contact avec la partie C-terminale du peptide présenté (Figure 19). La partie C-terminale du peptide est la seule portion qui peut varier entre tous les peptides présentés par HLA-E ce qui indique que CD94 peut discriminer divers peptides (Vales-Gomez et al., 1999) avec différentes affinités. NKG2A est le récepteur de cette famille qui se lie avec la plus forte affinité à l'hélice $\alpha 2$ de HLA-E. Il a été proposé que les différences d'affinités soient dues à des ajustements de l'orientation des deux partenaires du complexe. En effet les résidus à l'interface des deux protéines sont ceux qui présentent la plus grande diversité (Finton and Strong, 2012). NKG2F n'est pas exprimé en surface mais certaines modifications au niveau de sa séquence prédisent des modifications potentiellement importantes au niveau de sa structure et donc dans le site de liaison d'un éventuel ligand (Plougastel and Trowsdale, 1997).

2.2 Les molécules apparentées au CMH-I

L'homodimère NKG2D est le plus éloigné des récepteurs NKG2 avec une spécificité de ligand différente. NKG2D reconnaît plusieurs protéines génétiquement et structurellement reliées aux molécules HLA-I. Chez l'Homme on en compte à l'heure actuelle 8 : les protéines MICA et MICB (MHC class I chain-related proteins A and B) (Bauer et al., 1999), et les six ULBP (UL16-binding proteins) (Cosman et al., 2001). Aucune de ces protéines n'est associée à la $\beta 2m$. Elles sont inductibles par un stress cellulaire, mais les voies qui permettent leur expression sont différentes. Ainsi, une cellule cible n'exprimera pas tous les ligands de NKG2D en réponse à un stress donné. Certains de ces ligands peuvent être sécrétés ou circuler à la surface d'exosomes et se fixer sur le récepteur (Clayton et al., 2008). Il en résulte une inhibition des cellules NK.

Les ligands de NKG2D varient au niveau de leur séquence et de leur affinité pour le récepteur. MICA et MICB sont codés dans la région du CMH-I, et présentent de 28 à 35% d'homologie de

séquence avec les molécules HLA-I. Comme les protéines HLA de classe I, les ligands de NKG2D présentent un polymorphisme important (70 allèles sont référencés pour MICA et 31 pour MICB), avec des affinités différentes pour NKG2D (Raulet et al., 2013). Ces molécules sont organisées en trois chaînes α avec une courte portion intracellulaire mais elles ne présentent pas de peptides. Les ULBP n'ont pas de domaine $\alpha3$. Les MIC et les ULBP diffèrent aussi dans la façon dont ils sont ancrés à la membrane. MICA, MICB, ULBP4 et ULBP5 sont des protéines transmembranaires, tandis que les ULBP1, ULBP2, ULBP3 et ULBP6 sont associés à la membrane par une ancre GPI (Champsaur and Lanier, 2010) (Figure 20). L'ancrage pourrait avoir une influence sur la localisation de ces protéines à la surface cellulaire. Ainsi les protéines ancrées par l'ancre GPI sont retrouvées dans les rafts lipidiques, ce qui n'est pas le cas des autres ligands de NKG2D (Eleme et al., 2004).

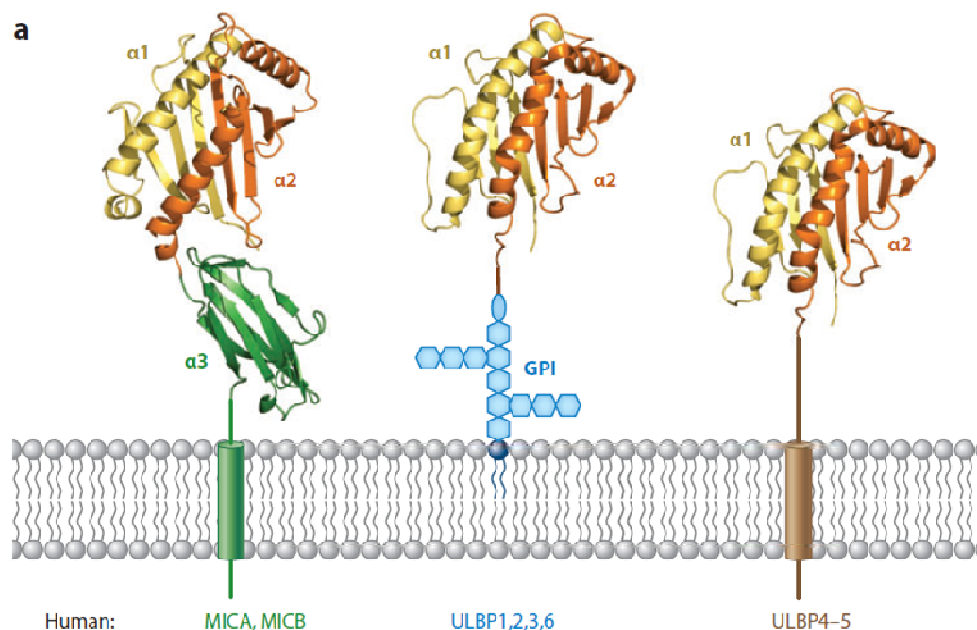


Figure 20 : Représentation schématique des 8 ligands de NKG2D. MICA et MICB ont trois domaines α et sont des protéines transmembranaires ; les ULBP n'ont que deux domaines α . ULBP 4 et 5 sont également des protéines transmembranaires, les autres sont attachés à la membrane par une ancre GPI. (Raulet et al., 2013)

Les dimères NKG2D lient des sites sur les hélices $\alpha1$ et $\alpha2$. Il est intéressant de noter que NKG2D peut lier une aussi grande diversité de ligands cellulaires, malgré les différences de séquences. Il semblerait que l'interaction des ligands avec NKG2D modifie suffisamment la conformation des protéines pour qu'elles puissent s'adapter au récepteur (Radaev et al., 2001). L'analyse cristallographique de MICA complexé à NKG2D indique en effet une grande flexibilité dans son peptide linker (Li et al., 2001).

OMCP (Orthopoxvirus Major histocompatibility Complex class I-like Protein) est un ligand viral de NKG2D. OMCP est sécrété par les cellules infectées et se fixe de façon compétitive sur

NKG2D, empêchant le récepteur d'interagir avec ses ligands. La fixation de OMCP inhibe l'activation des cellules NK via NKG2D (Campbell et al., 2007).

2.3 Les ligands des récepteurs de cytotoxicité naturelle

Les NCR sont des récepteurs très importants dans l'immunité NK anti-tumorale. De ce fait, de nombreuses études se sont penchées sur leurs ligands potentiels, qui peuvent être des molécules de stress, ou du Soi modifié. Pourtant la majorité des ligands des NCR connu à ce jour est d'origine virale. En effet, en plus de leur intervention dans l'activité anti-tumorale, les NCR sont des récepteurs cruciaux dans le contrôle de certains pathogènes (Moretta et al., 2001). Ces ligands incluent probablement des protéines surexprimées durant la transformation tumorale ou une infection, ou d'autres codés par des pathogènes. Les mécanismes de polyspécificité par lesquels ces récepteurs sont capables de lier des ligands multiples et distincts restent encore à déterminer, de même que la nature des autres ligands potentiels des NCR.

Il n'existe pas de ligand endogène connu de NKp46. PCNA (Proliferating Cell Nuclear Antigen) et une isoforme de MLL5 (Mixed-Lineage Leukemia-5), exprimés à la surface des cellules transformées, ont été décrits comme ligands du récepteur NKp44. Toutefois, la liaison de PCNA ou MLL5 à NKp44 induit des fonctions différentes. En effet, tandis que PCNA favoriserait une inhibition de la réponse des cellules NK, la liaison de MLL5 à NKp44 active les cellules NK (Baychelier et al., 2013; Rosental et al., 2011). NKp46 et NKp44 ont des ligands communs, les deux NCR utilisant des résidus d'acide sialique de leurs groupements carbohydrates. Il s'agit des hémagglutinines de l'Influenza Virus (Mandelboim et al., 2001), du Newcastle Disease Virus (Jarahian et al., 2009) et du Sendai Virus (Arnon et al., 2001). Cette capacité est également utilisée comme mécanisme d'immunoévasion par le virus de l'Influenza puisqu'il peut relarguer de l'hémagglutinine soluble qui va se fixer et conduire à la dégradation de CD3 ζ (Mao et al., 2010). Plus récemment, l'hémagglutinine des Poxvirus a été décrite comme un ligand de NKp46 et de NKp30, mais pas de NKp44 (Jarahian et al., 2011).

NKp30 est le seul NCR à avoir été analysé en cristallographie complexé à un de ses ligands, B7-H6 (Brandt et al., 2009; Joyce et al., 2011; Li et al., 2011) B7-H6 est un membre de la famille des molécules B7, initialement décrit comme étant exprimé spécifiquement par des cellules transformées. B7-H6 peut également être induit dans des situations inflammatoires sur des monocytes au cours d'un sepsis. Au cours de la pathologie, il y a également une forme soluble qui est sécrétée. Les cellules NK auraient alors un rôle négatif sur l'évolution de la pathologie, en déplaçant les monocytes pro-inflammatoires (Matta et al., 2013). PfEMP-1 (Duffy-binding-like domain 1 α of *Plasmodium falciparum* erythrocyte membrane protein-1) (Mavoungou et al., 2007), l'héparan sulfate proteoglycan (Bloushtain et al., 2004), et BAT3 (HLA-B-Associated Transcript 3) (Pogge von Strandmann et al., 2007) ont également été décrits comme des ligands de NKp30. Enfin, ce récepteur

est aussi la cible de mécanisme d'immunoévasion, puisque pp65, la protéine tégumentaire du HCMV, est capable de lier NKp30 et d'inhiber l'activation des cellules NK (Arnon et al., 2005).

3 Balance des signaux/co-activation

L'activation des cellules NK est le résultat de l'intégration des divers signaux activateurs et inhibiteurs que la cellule reçoit en permanence. Chaque cellule NK exprime de façon clonale un répertoire de récepteurs activateurs et inhibiteurs qui lui est propre et qui lui confère une certaine spécificité. La spécificité de ces cellules dépend aussi de la combinaison de récepteurs activateurs engagés, chacun pouvant transduire des signalisations différentes. Les récepteurs inhibiteurs bloquent les signalisations activatrices. On considère généralement que les signaux inhibiteurs sont dominants (Yokoyama and Kim, 2006). L'activation des cellules NK n'est pas déterminée simplement par l'addition de voies de signalisation activées en parallèle. La combinaison des signaux peut en effet aboutir à plusieurs résultats : la synergie des signaux, des signaux indépendants qui n'augmentent pas l'état d'activation, ou bien s'additionner. Les cellules NK s'activent en plusieurs étapes, chacune pouvant impliquer l'engagement d'un ou plusieurs récepteurs (Barber and Long, 2003).

C Les fonctions des cellules Natural Killer

Les cellules NK ont deux grandes fonctions : la cytotoxicité naturelle contre des cellules infectées ou transformées, et la sécrétion de facteurs solubles, cytokines et chimiokines, après stimulation. Le déclenchement de ces fonctions passe par l'activation des cellules NK, contrôlée par le large répertoire de récepteurs qu'elles expriment. L'engagement de la bonne combinaison de récepteurs permet la formation d'une structure particulière : la synapse immunologique.

1 Reconnaissance de la cible : la synapse immunologique

La reconnaissance des cellules cibles par les cellules NK passe par la formation d'une structure dynamique, une synapse immunologique. La formation de la synapse immunologique s'effectue en plusieurs étapes : une étape d'initiation où la cellule NK établit un contact avec la cellule cible, une étape effectrice où les granules sont transportés et délivrés à la zone de contact, et enfin une étape où la cellule NK rompt le contact avec la cellule cible (Orange, 2008).

Durant la phase d'initiation, la cellule NK établit un contact avec la cellule cible potentielle, *via* un récepteur activateur de haute affinité. Ce premier contact permet d'entamer la formation d'une synapse, la cellule NK « s'accroche » à la cible par la liaison de molécules d'adhésion de la famille des intégrines, comme LFA-1. Les intégrines clustérisent rapidement à la zone de contact, pour permettre une forte adhésion à la cible, puis augmenter la force des signaux activateurs transduits (Inoue et al., 2002; Orange et al., 2003; Vyas et al., 2001). A cette étape, les récepteurs activateurs engagés transmettent des signaux très puissants. Les cellules NK établissent d'abord un contact avec une cible *via* des molécules d'adhésion comme LFA-1 (Leukocyte Function-associated Antigen-1) qui se lie à ICAM-1 ou ICAM-2 (Intercellular Adhesion Molecule 1 et 2). Cette étape d'adhésion cruciale est suivie d'une cascade de signaux positifs nécessaires au déclenchement de l'activité des cellules NK (Bryceson et al., 2005; Matsumoto et al., 1998). Certains récepteurs agissent en synergie pour la dégranulation des lysosomes contenant les molécules cytotoxiques. Par exemple, l'engagement de NKG2D ou 2B4 seuls n'est pas suffisant, mais l'engagement concomitant des deux récepteurs aboutit au relargage des granules lytiques (Bryceson et al., 2006). Les récepteurs activateurs peuvent transduire des signaux indépendant dans les cellules NK afin d'activer les fonctions cytotoxiques et/ou la sécrétion de cytokines. Ces étapes impliquent le co-engagement d'au moins deux couples récepteurs/ligands. Aucun récepteur activateur ne semble capable d'induire toutes les étapes seul.

En l'absence de signaux inhibiteurs, la synapse NK commence à s'organiser. La première étape est la formation d'un réseau de F-actine, qui s'accumule à la zone de contact entre les deux cellules. Les récepteurs activateurs engagés clustérisent rapidement au centre de l'anneau formé par le cytosquelette d'actine pour amplifier le signal. Cette étape est responsable de la formation du complexe supramoléculaire de signalisation appelé SMAC (Andzelm et al., 2007; Roda-Navarro et al., 2004). La cellule NK réorganise son réseau de microtubules, oriente ensuite le centre organisateur des

microtubules vers la zone de contact, puis les granules lytiques ou les lysosomes contenant des cytokines sont acheminés par le réseau de microtubules pour se polariser à leur tour (Chen et al., 2006; Graham et al., 2006; Wulfiging et al., 2003). Les granules lytiques se déplacent le long du réseau de microtubule grâce au moteur moléculaire, la CIP4 (CDC42-interacting protein 4). CIP4 interagit avec la tubuline, CDC42 (Cell Division Cycle) et WASP (Wiskott-Aldrich Syndrome Protein) (Banerjee et al., 2007). Une fois les granules polarisés à la membrane, le réseau d'actine F se désassemble à certains endroits pour permettre la fusion des membranes plasmiques et lysosomales grâce aux protéines RAB27A et UNC13D (aussi appelée MUNC13-4) (Menager et al., 2007). Les granules lytiques ou les lysosomes contenant les cytokines libèrent alors leur contenu dans le milieu extracellulaire. La dégranulation des cellules NK est observée par l'apparition en surface de la protéine lysosomale CD107a. L'exposition de CD107a à la surface prévient d'une action néfaste des molécules lytiques contre la cellule NK sécrétrice (Cohnen et al., 2013). Lorsque les molécules effectrices sont libérées, la cellule NK se détache de sa cible et recycle alors son potentiel cytolytique en produisant de nouveaux granules lytiques (Figure 21).

Ces différentes étapes décrivent la formation d'une synapse immunologique activatrice qui constitue une étape essentielle pour les fonctions cytolytique et cytokinique de la cellule NK. Il existe un autre type de synapse immunologique, la synapse inhibitrice. Suite à la reconnaissance d'une cellule cible potentielle, les récepteurs inhibiteurs sont majoritairement engagés et les récepteurs activateurs sont exclus des rafts lipidiques. Les protéines des voies de signalisations activatrices sont déphosphorylées par les phosphatases. La cellule NK se détache de sa cible sans libérer ses granules (Faure et al., 2003; Vyas et al., 2004).

2 Fonction cytotoxique des cellules Natural Killer

2.1 Granules lytiques

Les granules lytiques sont des lysosomes sécrétoires, des compartiments intracellulaires particuliers qui stockent les molécules lytiques des cellules cytotoxiques (Blott and Griffiths, 2002). Ce sont des lysosomes qui contiennent un grand nombre d'enzymes spécifiques des lysosomes classiques, et d'autres spécifiques de ce compartiment cellulaire. Parmi les protéines spécifiques des granules lytiques, on retrouve la perforine, les granzymes, la granulysine, les ligands des récepteurs à domaine de mort, et des peptides antimicrobiens (Krzewski and Coligan, 2012). Toutes ces molécules participent à la fonction cytotoxique des cellules NK. L'exocytose des granules est le mécanisme lytique majeur des lymphocytes cytotoxiques.

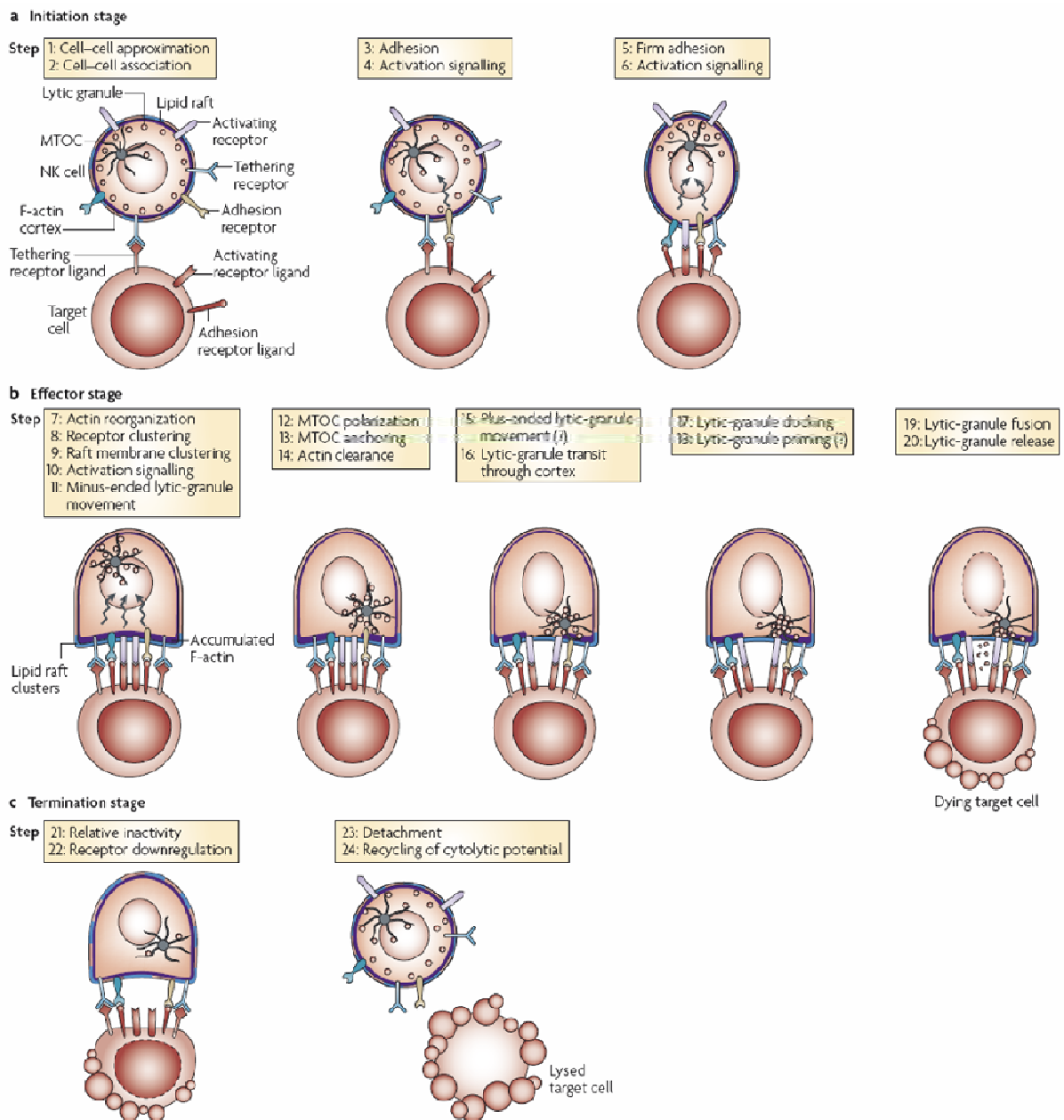


Figure 21 : Modèle des différentes étapes de la formation et de la fonction d'une synapse immunologique activatrice formée entre une cellule NK et une cellule cible. a) Etape d'initiation, avec les premières étapes de reconnaissance et d'adhésion à la cellule cible. b) Etape effectrice, avec accumulation d'actine et des récepteurs activateurs à la zone de contact avec la cellule cible. La machinerie sécrétoire de la cellule NK se polarise vers la cellule cible, les granules lytiques sont libérés à la synapse. c) Etape finale, la cellule NK rompt le contact avec la cellule cible (Orange, 2008).

La Perforine : la perforine, comme son nom l'indique, est une protéine capable de former des pores à la surface des cellules cibles, pour permettre la pénétration des granzymes et d'autres molécules dans le cytosol. Son action est similaire à ce qui est observé pour le complexe d'attaque moléculaire formé de protéines du complément (Rochel and Cowan, 1996).

La perforine est constitutivement exprimée par les cellules NK et stockée dans les granules lytiques (Salcedo et al., 1993). La protéine est synthétisée sous forme de précurseur de 65 kDa dans le RE. La partie N terminale de la protéine contient le peptide signal et le domaine MAPCF (Membrane Attack Complex/Perforin) qui est responsable de l'activité lytique. La partie C terminale contient un domaine EGF-like et un domaine C2 qui est capable de se lier à la membrane d'une façon calcium-dépendante (Voskoboinik et al., 2005). La perforine est transportée dans les granules lytiques par un mécanisme faisant intervenir le complexe AP-1 (Adaptor Protein 1) et CD107a à la surface des vésicules de transport qui sortent du Golgi (Krzewski et al., 2013). Une fois dans les granules, la perforine est clivée par la cathepsine L qui enlève 20 acides aminés de la partie C terminale (Konjar et al., 2010). L'activité lytique de la perforine est inhibée par l'environnement particulier des granules, comme l'acidité du milieu, la présence de calreticuline, ou encore l'interaction perforine/serglycine (Fraser et al., 2000; Metkar et al., 2002). Après mobilisation du calcium intracellulaire, les monomères de perforine vont s'assembler dans un pore qui va permettre le passage des autres molécules lytiques.

Le mode d'action de la perforine se fait en deux étapes et a été récemment défini. La formation de pores temporaires dans la membrane de la cellule cible, permet le passage des granzymes qui sont dans le milieu extracellulaire vers le cytosol de la cellule cible. Les dommages à la membrane cellulaire sont rapidement réparés (de l'ordre de 80 secondes), entraînant la formation de gigantosomes, dans lesquelles la perforine et les granzymes sont endocytés. La perforine forme à nouveau des pores dans les parois de l'endosome, permettant le relargage des granzymes endocytés dans le cytosol (Lopez et al., 2013; Thiery et al., 2011).

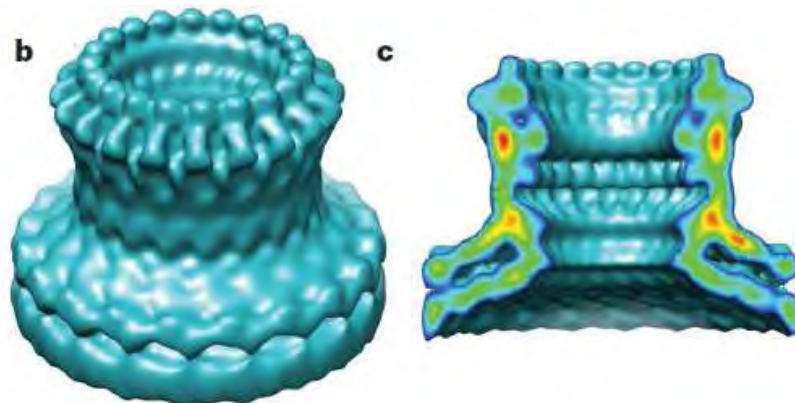


Figure 22 : Reconstruction par microscopie électronique de pores formés par la perforine à la surface cellulaire. (Law et al., 2010)

Les Granzymes (Granule Enzymes): les granzymes appartiennent à une famille de sérines protéases exprimées principalement par les lymphocytes cytotoxiques. Les cellules NK expriment constitutivement les granzymes. Il en existe cinq chez l'Homme, les granzymes A, B, H, K et M. Les gènes qui codent les granzymes sont organisés en trois clusters, montrant environ 60% d'homologie de séquence entre eux (Grossman et al., 2003). Les granzymes sont synthétisés en tant que pro-enzymes.

La voie du MPR (mannose-6-phosphate receptor) les emportent ensuite dans les granules lytiques, où les pro-enzymes seront clivées par les Cathepsines C et H pour donner la forme active (D'Angelo et al., 2010; Griffiths and Isaza, 1993; Meade et al., 2006). Sous forme active, les granzymes sont stockées en complexe avec la serglycine dans les granules en attente de sécrétion (Metkar et al., 2002). Les granzymes diffèrent les uns des autres par la spécificité de leurs substrats, même s'ils induisent tous la lyse de la cellule cible par des mécanismes communs.

Granzyme A (GrA) : le granzyme A induit la lyse des cellules cibles de façon perforine-dépendante (Nakajima et al., 1995). Le GrA exerce une activité tryptase. Il ne cible pas les caspases pour induire la mort cellulaire, mais ses mécanismes d'action montrent des similarités avec ces dernières. Une fois dans la cellule cible, le GrA va induire la condensation de la chromatine, la fragmentation du noyau cellulaire, des dommages simple brin à l'ADN et la perte du potentiel transmembranaire des mitochondries (Beresford et al., 1999; Zhang et al., 2001). Le GrA favorise également la création d'un environnement extracellulaire pro-inflammatoire en clivant le pro-peptide de l'IL-1 β (Irmiler et al., 1995). Le GrA active les macrophages et induit la sécrétion des cytokines, empêche l'agrégation des plaquettes et la coagulation par activation du plasminogène (Sower et al., 1996; Suidan et al., 1996).

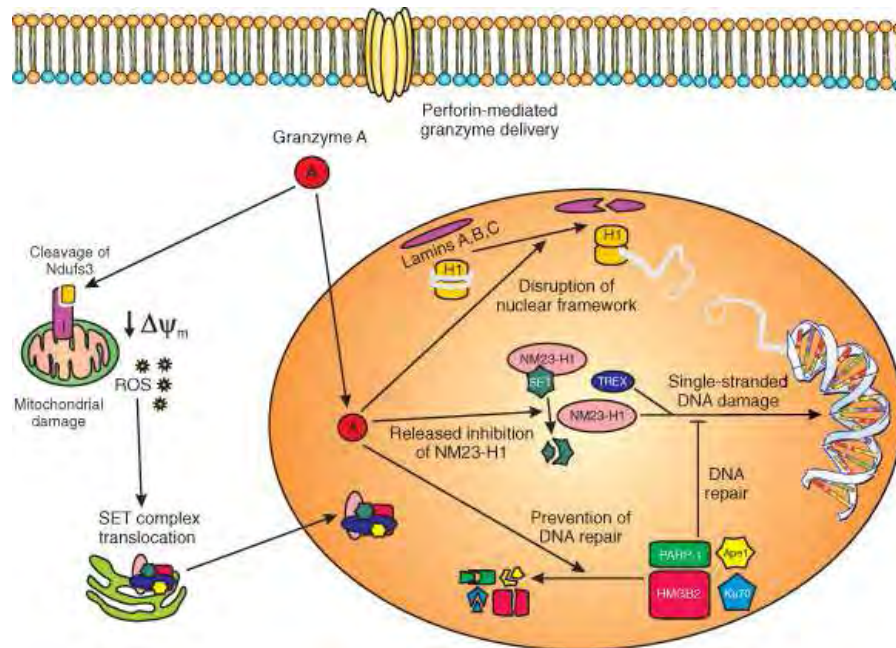


Figure 23 : Voies activées par le granzyme A lorsqu'il est relargué dans le cytoplasme de la cellule cible. Le GrA induit l'apoptose des cellules cibles en provoquant des dommages à la mitochondrie par le clivage de Ndufs3 et la déstructuration du noyau par clivage du complexe SET (Susanto et al., 2012).

Le GrA induit la perte de potentiel transmembranaire de la mitochondrie en clivant la protéine Ndufs3 (NADH dehydrogenase (ubiquinone) iron-sulfur protein 3). Le dysfonctionnement des mitochondries aboutit à l'augmentation de la production de réactifs oxygénés ROS (Martinvalet et al., 2008; Martinvalet et al., 2005). Les ROS vont induire la translocation au noyau du complexe SET, chargé de maintenir l'intégrité de l'ADN dans le noyau cellulaire. Le complexe SET, un complexe protéique associé au RE, est composé de deux facteurs suppresseurs de tumeurs (pp32 et NM23-H1) et de trois substrats du GrA : SET, une protéine d'assemblage des nucléosomes, HMG2 (DNA-binding protein high mobility group protein 2) et APE1 (rate-limiting base-excision repair enzyme apurinic/aprimidic endonuclease 1) (Beresford et al., 2001; Fan et al., 2003a; Fan et al., 2002; Fan et al., 2003b). En clivant ces trois protéines, le GrA empêche la réparation des dommages à l'ADN induit par NM23-H1, pp32 et d'autres nucléases. L'histone H1, les lamines A, B, C et les composantes principales de la membrane nucléaire sont aussi clivées par le GrA (Zhang et al., 2001) (Figure 23).

Granzyme B (GrB) : le GrB pénètre dans le cytosol de la cellule cible par un mécanisme perforine dépendant. Le GrB active deux mécanismes d'apoptose, faisant intervenir des voies distinctes : une voie caspases dépendante, et une voie caspases indépendante. Les deux voies peuvent se croiser, le GrB ayant des substrats identiques à ceux des caspases qu'il active (Trapani, 1998). Le GrB clive les pro-caspases 3, 7, 8 et 10 en caspases actives, qui vont ensuite enclencher la fragmentation de l'ADN, la dégradation du cytosquelette cellulaire et les dommages aux mitochondries (Darmon et al., 1995). L'apoptose induite par le GrB dépendante des caspases est prédominante chez la souris. Chez l'Homme, le GrB privilégie d'autres substrats, et l'apoptose passe principalement par la voie mitochondriale. Une des cibles les plus importantes du GrB est le facteur BID (BH3-interacting domain death agonist). Une fois activé, BID va se fixer à ses récepteurs mitochondriaux Bax et Bak, et détruit l'intégrité de la membrane mitochondriale (Kuwana et al., 2002). Les mitochondries endommagées vont relarguer des facteurs pro-apoptotiques, le cytochrome c, ENDOG (endonuclease G), et HtrA2, qui bloque des inhibiteurs d'apoptose (Sutton et al., 2000). La libération du cytochrome c va permettre la formation de l'apoptosome et l'activation des caspases 9 et 3. Le GrB peut aussi induire la dépolarisation de la membrane mitochondriale indépendamment de BID et des caspases, ce qui de la même façon augmente la production des ROS (Thomas et al., 2001). (Figure 24). Le GrB peut cliver d'autres substrats cellulaires, comme ICAD (Inhibitor of Caspase-Activated DNase), qui permet l'activation de la DNase CAD (Sharif-Askari et al., 2001) ou encore des enzymes de réparation de l'ADN, comme PARP (Poly-ADP-ribose Polymerase) ou DNA-PKcs (DNA-dependent Protein Kinase). Le clivage de ces trois protéines permet le fractionnement de l'ADN nucléaire. Comme le GrA, le GrB cible des composants de la membrane nucléaire, comme la lamine B. Enfin le GrB peut perturber la polymérisation des microtubules et provoquer la désorganisation du cytosquelette de la cellule cible (Zhang et al., 2001).

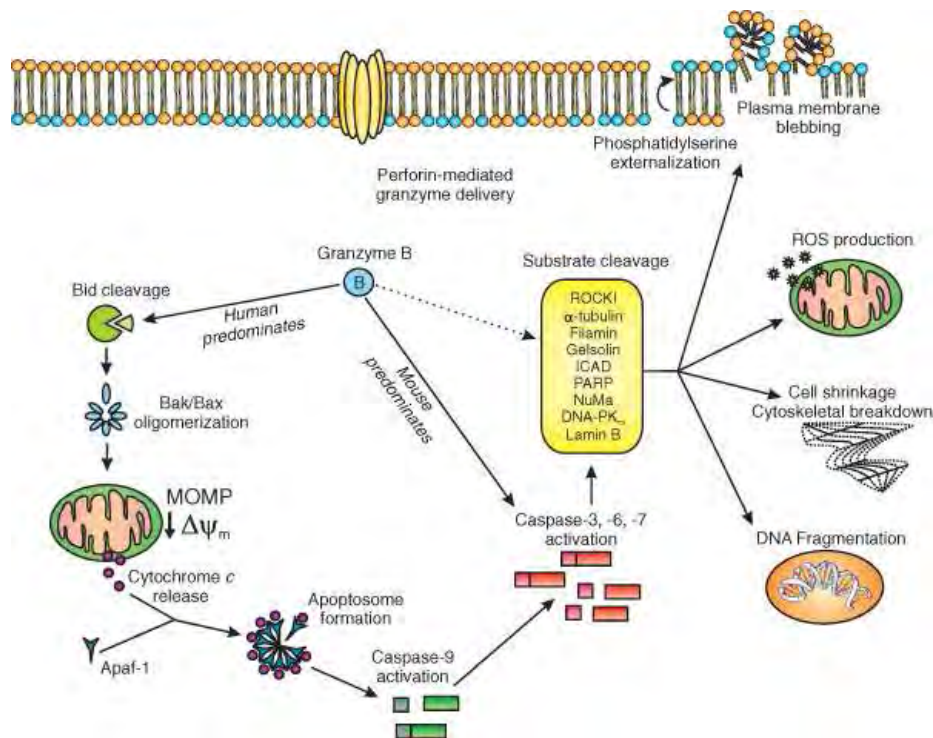


Figure 24 : Voies d'apoptose enclenchées par le granzyme B. Le GrB clive la protéine Bid qui induit la perte de potentiel transmembranaire de la mitochondrie. Le GrB clive également les caspases et d'autres substrats qui induisent la fragmentation de l'ADN (Susanto et al., 2012).

Granzyme H (GrH) : comme les autres granzymes, le GrH pénètre dans le cytosol de la cellule cible par un mécanisme perforine dépendant (Fellows et al., 2007). Le GrH est le seul granzyme à exercer une activité chymase. Le GrH induit les mêmes phénomènes que le GrA et le GrB, à savoir la dépolarisation de la membrane des mitochondries, la production de ROS, la dégradation de l'ADN et la condensation de la chromatine, mais il ne passe pas par le clivage de caspases ou de BID (Hou et al., 2008). Les substrats cellulaires du GrH restent encore à élucider, mais des substrats viraux ont été identifiés. Ainsi, le GrH peut cliver la protéine ADP (Adenovirus DNA-binding Protein), pour empêcher sa réplication, ou encore la protéine d'assemblage 100K des Adénovirus, un inhibiteur viral du GrB (Andrade et al., 2007).

Granzyme K (GrK) : le GrK est proche du GrA, de par sa localisation chromosomique et son activité tryptase (Carter et al., 1996). Le GrK induit l'apoptose de la cellule cible de façon caspase indépendante. Comme le GrA, le GrK clive les protéines du complexe SET, permettant l'activation de la DNase NM23-H1 pour induire les dommages à l'ADN (Zhao et al., 2007b). De façon similaire au GrB, le GrK clive le facteur BID pour induire le relargage de cytochrome c par les mitochondries (Zhao et al., 2007a). Enfin, le GrK peut cliver p53 en trois produits différents qui amplifient les actions pro-apoptotiques de p53 (Hua et al., 2009).

Granzyme M (GrM) : le GrM est une met-ase et son mode d'induction de l'apoptose par GrM est unique par rapport aux autres granzymes. Le GrM induit la formation de vacuoles cytoplasmiques, la condensation de la chromatine avec un faible fractionnement du noyau et enfin la lyse de la cellule (Kelly et al., 2004). Le phénotype d'apoptose induit par le GrM ressemble à ce qui est observé dans des cas de nécrose ou de lyse induite par autophagie. Ces mécanismes sont caspase indépendants. Plusieurs substrats macromoléculaires ont été identifiés, comme la tubuline α et l'eitrine, des composants du cytosquelette, NPM (Nucleolar Phosphoprotein Nucleophosmin) et PAK-2 (p21-activated kinase 2) (Bovenschen et al., 2008; Cullen et al., 2009). Certains de ces substrats sont similaires à ceux du GrB, comme ICAD et PARP et la caspase 3, ou encore HSP75, mais les clivages s'effectuent à des sites différents dus aux différences d'activités catalytiques (Hua et al., 2007; Lu et al., 2006).

La Granulysine : la granulysine est une protéine pro-inflammatoire spécifiquement humaine (Krensky and Clayberger, 2005). C'est une protéine cationique de la famille des saponines (Pena et al., 1997; Pena and Krensky, 1997). Deux isoformes de la granulysine sont exprimées, une de 15 kDa et une autre de 9 kDa, qui diffèrent par leur fonction et leur localisation cellulaire. La protéine de 9 kDa est issue du clivage de la forme de 15 kDa, se localise dans les granules perforine et granzymes positifs est la seule isoforme à montrer une activité cytotoxique (Hanson et al., 1999). LA forme de 15 kDa est en revanche constitutivement sécrétée par les cellules NK. Toutefois les cellules NK et les lymphocytes T CD8⁺ expriment des niveaux équivalents des deux isoformes. La granulysine est dépendante de la perforine pour tuer des pathogènes intracellulaires, et la protéine recombinante montre une activité bactéricide (Stenger et al., 1998). Le mode de pénétration de la granulysine n'est pas encore clairement défini, mais il a été démontré que son passage à travers la membrane cause une élévation du niveau de calcium cytosolique et une diminution concomitante du potassium (Kaspar et al., 2001). Ces deux phénomènes conduisent à des dommages mitochondriaux, avec un relargage du cytochrome c et une activation de la voie des caspases et d'endonucléases (Okada et al., 2003). La granulysine peut aussi induire la lyse des cellules cibles en activant les sphingomyélinases associées à la membrane pour générer des céramides, conduisant à la mort par un mécanisme qui n'est pas encore bien connu (Gamen et al., 1998). En plus des activités cytotoxiques, la granulysine montre aussi des effets chimioattractants (Deng et al., 2005).

2.2 Ligands des récepteurs à domaine de mort

Les ligands des récepteurs à domaine de mort sont au nombre de trois, FasL (Fas Ligand), TRAIL (TNF-related Apoptosis-Inducing Ligand) et TNFR1. FasL et TRAIL sont des molécules pro-apoptotiques localisées à l'état basal dans les granules lytiques des cellules NK (Ghosh et al., 2010), tandis que le TNF est une cytokine pro-inflammatoire sécrétées par les cellules NK après activation. Les signalisations induites par l'engagement de leur récepteur respectif, exprimés par les cellules

cibles passent par l'activation des caspases. FasL, TRAIL et TNF sont utilisés par les cellules NK matures, alors que les cellules NK immatures qui ne peuvent pas dégranuler, utilisent uniquement TRAIL (Zamai et al., 1998). La co-expression des deux molécules est ainsi un signe de la différenciation des cellules NK et d'une capacité cytotoxique totalement acquise.

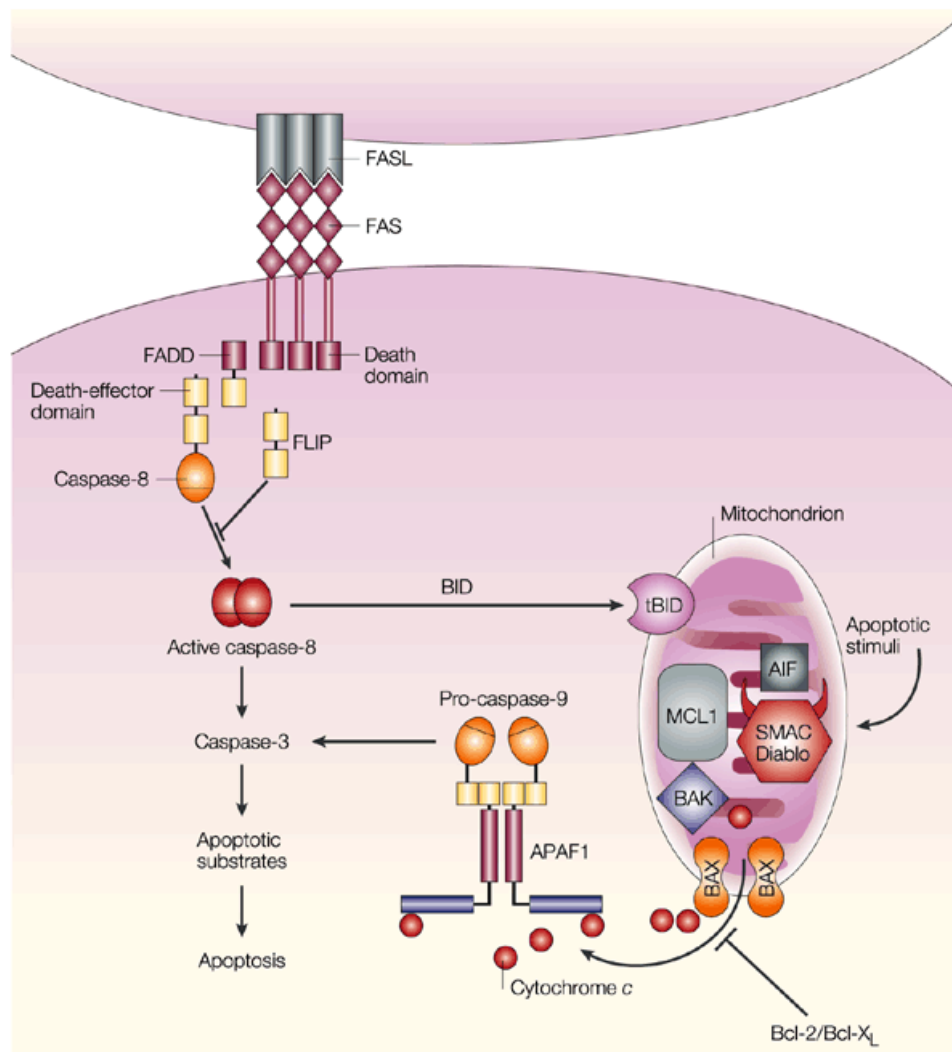


Figure 25 : Schéma des voies de signalisation enclenchées après liaison Fas/FasL. L'engagement du récepteur induit le recrutement de FADD et de la caspase 8 (complexe DISC). L'activation des caspases provoque des dommages à la mitochondrie et au noyau cellulaire (Pope, 2002)

FasL : FasL (CD95L) est le ligand du récepteur Fas (CD95) exprimé par la cellule cible. Comme FasL est stocké à l'intérieur des granules, seules les cellules NK activées l'expriment à leur surface. Après liaison Fas/FasL, les récepteurs Fas se multimérisent dans les rafts lipidiques, ce qui permet une modification du domaine intracellulaire (Scott et al., 2009). Cette modification permet le recrutement de FADD (DD-containing adaptor molecule Fas-associated death domain), et la pro-caspase 8, formant le complexe de signalisation DISC (Death-Inducing Signaling Complex) (Kischkel et al., 1995). Dans le DISC, la pro-caspase 8 s'auto-clive. Deux voies sont alors possibles dans les

cellules cibles. Soit la caspase 8 active les caspases 3, 6 et 7, permettant le clivage de leurs substrats respectifs et la mort de la cellule. Soit l'activation de la caspase 8 est réduite et la voie mitochondriale est privilégiée. Les dommages à la mitochondrie permettent le relargage du cytochrome c, l'activation de la caspase 9 et les voies qu'elle enclenche (Lee et al., 2007). L'apoptose dirigée par l'engagement de Fas peut être inhibée par l'expression du facteur anti-apoptotique XIAP (X chromosome-linked Inhibitor of Apoptosis Protein) (Jost et al., 2009).

FasL peut être clivé par des métalloprotéases et être sous forme soluble dans la circulation. Sous forme soluble, il peut se lier à son récepteur et induire une signalisation qui va conduire à la lyse de la cellule cible. Ce signal est toutefois plus faible qu'avec la forme membranaire (Weinlich et al., 2010).

TRAIL : TRAIL a une structure homotrimerique. Il possède deux récepteurs, nommés DR4 et DR5, qui transduisent les mêmes signalisations (LeBlanc and Ashkenazi, 2003). Après reconnaissance du ligand, le récepteur s'autotrimérise et modifie la conformation de son domaine intracellulaire, qui permet le recrutement de FADD et des pro-caspases 8 et 10 (Kischkel et al., 2000). Les pro-caspases vont s'autoactiver et enclencher la voie des caspases effectrices. La voie mitochondriale est aussi activée *via* le clivage de BID (MacFarlane et al., 2000). L'apoptose induite par la voie TRAIL peut être régulée de différentes façons. Il existe des récepteurs leurres, appelés DcR1 et DcR2 (Decoy Receptors) qui peuvent lier TRAIL. Ces récepteurs leurres n'ont pas de partie intracellulaire, et ne peuvent donc transduire de signalisation (Pan et al., 1997; Sheridan et al., 1997). c-FLIP (cellular FLICE-inhibitory protein) est un inhibiteur de la signalisation de TRAIL qui empêche la signalisation des domaines de mort en occupant le site de liaison de FADD sur la caspase 8 (Irmeler et al., 1997). La famille des IAP (Inhibitor of Apoptosis Proteins) inhibe l'activation des caspases 3, 7 et 9 induite après engagement du récepteur (Deveraux et al., 1997). Enfin, TRAIL possède un cinquième récepteur, qui est l'ostéoprotégerine (OPG), une protéine sécrétée, qui se lie avec une faible affinité au ligand.

TNFR1 : TNFR1 est le récepteur du TNF- α , une des cytokines majeures sécrétées par les cellules NK. Ce récepteur a deux fonctions. Il peut tout d'abord permettre d'enclencher des réponses pro-inflammatoires, après recrutement de TNFR1 dans les rafts lipidiques. Cette signalisation passe notamment par l'activation de NF- κ B et des Janus Kinases, et permet l'activation cellulaire, notamment pour les cellules immunitaires (Legler et al., 2003). Au contraire, la signalisation pro-apoptotique induite après engagement du récepteur par son ligand nécessite l'étape cruciale d'internalisation du récepteur, qui permet la formation des complexes de signalisation et notamment du DISC (Schneider-Brachert et al., 2004). Ces deux signalisations ne sont pas incompatibles, puisque l'internalisation du récepteur nécessite tout d'abord le recrutement de TNFR1 dans les rafts lipidiques. Il s'agirait d'une signalisation séquentielle, qui pourrait dépendre de la quantité de ligand présente dans le microenvironnement. Après internalisation de TNFR1, il y a recrutement de TRADD, FADD

et de la pro-caspase 8. Cette cascade de signalisation aboutit à l'activation de la caspase 7 et des ASMases. Les céramides produits par les ASMases activent la cathepsine D, qui clive BID et permet donc de déclencher les voies de dommages mitochondriaux qui amplifient les signaux pro-apoptotiques.

2.3 Peptides antimicrobiens

Les granules lytiques des cellules NK contiennent aussi des petits peptides antimicrobiens, qui une fois relargués vont avoir des effets directs sur les pathogènes mais vont également participer à l'activation des cellules NK et des autres populations immunitaires présentes localement. Ces petits peptides sont nommés LL-37 (cathélicidine) et les défensines 1, 2 et 3.

LL-37 : les cathélicidines sont une famille de protéines capables d'inhiber la cathepsine L. LL-37 est traduit en tant que précurseur de 18 kDa. Après clivage, les 27 aminoacides de la partie C-terminale vont former le peptide LL-37 actif (Duplantier and van Hoek, 2013). LL-37 montre un large spectre d'actions contre les bactéries Gram positives et négatives. Il peut notamment limiter leur croissance, en bloquant la synthèse de la paroi bactérienne, augmentant la porosité de ces parois et donc la mort des bactéries. LL-37 agit aussi en tant qu'agent anti-biofilm (Overhage et al., 2008). Enfin, en plus de ses activités antibactériennes, LL-37 peut moduler l'activation des cellules immunitaires. Il a un effet chimioattractant sur plusieurs types cellulaires, notamment les neutrophiles, les monocytes et les lymphocytes T (De et al., 2000).

Défensines : plus de 70 défensines ont été identifiées chez l'Homme, réparties en trois familles, α , β et θ (Jarczak et al., 2013). Les défensines exprimées par les cellules NK sont des α -défensines. Les défensines ont des effets antibactériens, antifongiques et antiviraux. Ainsi, l' α -défensine 1 peut inhiber la réplication et la synthèse protéique virale (Daher et al., 1986; Ogata et al., 1992; Salvatore et al., 2007). Comme le peptide LL-37, les défensines ont également un effet chimioattractant sur les monocytes.

3 Fonction cytokinique des cellules Natural Killer

Les cellules NK ont la capacité de s'activer rapidement et de sécréter de grandes quantités de médiateurs pro-inflammatoires. Les deux populations majoritaires de cellules NK sont réparties différemment entre le sang circulant, les organes lymphoïdes et les autres tissus. Chez l'Homme, la population CD56^{bright} CD16⁻ constituent la majorité de la population totale de cellules NK (Ferlazzo and Munz, 2004). Dans les nœuds lymphatiques, elles se situent principalement dans les régions périfolliculaires, proches des DC résidentes (Ferlazzo et al., 2004). Les cellules NK résidentes des organes lymphoïdes expriment des niveaux très faibles de perforine, et sont généralement considérées comme non cytotoxiques. Ces cellules exercent des fonctions immunomodulatrices, participant à

l'activation de l'immunité innée et adaptative. Les cellules NK sécrètent également des chimiokines, qui vont recruter des cellules immunitaires sur les sites inflammatoires.

3.1 Les cytokines

Les cytokines sont des glycoprotéines sécrétées par exocytose de vésicules de sécrétion après fusion de la membrane de lysosomes et la membrane plasmique. Elles se fixent sur des récepteurs membranaires spécifiques, et suivant les combinaisons de cytokines sécrétées, les réponses immunes seront différentes. L'effet des cytokines peut être paracrine sur des cellules proches, endocrine sur des cellules distantes, juxtacrine sur des cellules en contact ou autocrine sur la cellule productrice. Les cytokines sont impliquées dans la régulation des principales fonctions cellulaires telles que la transcription génique, la synthèse protéique, la prolifération, la différenciation ou encore la mort cellulaire. Les cytokines sécrétées dépendent du contexte d'activation (Zingoni et al., 2005).

Les cellules NK permettent notamment la maturation des cellules dendritiques *via* la sécrétion d'IFN- γ et de TNF- α et par contact cellulaire direct. Les cellules NK reconnaissent directement les cellules infectées ou transformées par leur large panel de récepteurs, en faisant des cellules accessoires essentielles dans l'initiation de la réponse immune par les DC (Gerosa et al., 2002; Mocikat et al., 2003). Après contact avec les cellules NK, les DC matures vont augmenter l'expression de CD86 et sécréter de l'IL-12, permettant aux DC d'activer et de polariser les lymphocytes T dans les nœuds lymphatiques (Piccioli et al., 2002). Cette interaction cellules NK-DC permet l'activation d'une réponse T CD8⁺ sans l'aide des LT CD4⁺ (Adam et al., 2005). En retour, les DC peuvent également activer les cellules NK par la trans-présentation d'IL-15 membranaire (Lucas et al., 2007).

Les cellules NK participent directement à la polarisation des lymphocytes T CD4⁺. Après activation elles sont recrutées dans les nœuds lymphatiques où elles vont sécréter de grandes quantités d'IFN- γ à proximité des DC et de LT CD4⁺ spécifiques de l'antigène (Bajenoff et al., 2006). Cet IFN- γ est suffisant pour polariser les LT CD4⁺ sans besoin de cytokines dérivées des DC (Martin-Fontecha et al., 2004). Cette capacité est très importante, puisque la réponse Th1 est la plus appropriée dans les réponses antitumorales et antivirales. L'IFN- γ active également les monocytes et les macrophages (Hayakawa et al., 2002). Enfin, certaines études suggèrent que les cellules NK sont aussi capables de sécréter du GM-CSF (Granulocyte Macrophages Colony Stimulating Factor), et des interleukines activatrices de l'immunité innée et adaptative (Campbell and Hasegawa, 2013), telles que l'IL-3, l'IL-5, l'IL-6, l'IL-13, l'IL-15 et l'IL-17 (Passos et al., 2010).

3.2 Les chimiokines

En plus des cytokines, les cellules NK sécrètent des chimiokines (Janeway, 2001; Walzer et al., 2005). Les chimiokines sont des molécules de faible poids moléculaire qui, après liaison à leurs récepteurs, permettent l'attraction des cellules inflammatoires pour combattre l'infection. Les cellules NK peuvent notamment recruter des cellules myéloïdes, des polymorfo-nucléaires neutrophiles et

basophiles, des éosinophiles par la sécrétion de GM-CSF, d'IL-8 (CXCL8), de MIP-1 α (CCL3), de MIP-1 β (CCL4) et de RANTES (CCL5). Ces chimiokines participent au recrutement des lymphocytes T et d'autres cellules NK, notamment la lymphotactine (XCL1). En permettant le recrutement et l'activation *in situ* des cellules innées et en participant à la polarisation de l'immunité adaptative, les cellules NK ont un rôle central dans les réponses immunitaires (Campbell and Hasegawa, 2013).

II Les cellules NK dans la réponse immunitaire

A Réponse anti-virale

Les cellules NK jouent un rôle clé dans le contrôle des infections virales. Les modèles animaux ont permis d'établir leur importance non seulement dans la lyse des cellules infectées, mais également dans la mise en place des réponses adaptatives T et B.

1 Immunité NK anti-Herpesvirus :

Les virus de la famille des herpes ont co-évolué avec leurs hôtes pendant des millions d'années. Le rôle majeur des cellules NK dans le contrôle des Herpesvirus est apparu très tôt, puisque les rares cas de patients immunodéficients en cellules NK se sont révélés très sensibles aux infections par ces virus (Biron et al., 1989; Orange, 2002). L'importance des cellules NK dans la réponse immunitaire anti-herpes peut être également appréciée par le nombre de gènes viraux dévolu aux mécanismes d'immunoévasion contre les cellules NK. Nous discuterons ici quelques uns des mécanismes mis en place par ces virus pour échapper à la surveillance des cellules NK.

1.1 Immunité NK anti-Cytomégalo virus humain (HCMV):

L'infection par le HCMV est généralement asymptomatique, mais le virus est responsable de pathologies sévères chez les cohortes d'immunodéprimés. C'est un virus qui peut établir une infection persistante et les cellules immunitaires sont probablement impliquées dans le contrôle de la latence virale.

Le rôle des cellules NK dans la réponse anti-CMV a été très étudié chez la souris. Les différences entre cellules NK murines et humaines ne permettent pas de transposer toutes les observations d'une espèce à l'autre. Ainsi, le MCMV code des protéines qui se fixent aux récepteurs Ly49, récepteurs absents chez l'Homme (Arase et al., 2002). Chez l'Homme, l'infection par le HCMV a un impact sur le répertoire de récepteurs des cellules NK. En réponse au HCMV, une population de cellules NK NKG2C⁺ prolifère de façon importante, pouvant représenter jusqu'à 25% de la population totale de cellules NK chez l'individu infecté (Guma et al., 2004; Guma et al., 2006). De plus, la population NKG2C⁺ prolifère très rapidement dans les cas de réactivation du HCMV, chez des patients immunodéprimés suite à une greffe. La prolifération est associée à une forte capacité de sécrétion de cytokines pro-inflammatoires (Foley et al., 2012b). Cette population est caractérisée par un phénotype associé aux dernières étapes de maturation des cellules NK avec l'expression du marqueur de maturation CD57 et la diminution de l'expression de NKG2A et de KIR3DL1 (Lopez-Verges et al., 2011), et une augmentation de certains KIR activateurs, comme KIR2DS4, KIR2DS2 et KIR3DS1 (Beziat et al., 2012). Bien que NKG2A et NKG2C reconnaissent le même ligand HLA-E, on ne sait pas si ces modifications sont liées. En revanche, le niveau d'expression de NKp30 et de

NKp46 est diminué (Guma et al., 2004). Le génotype des KIR est associé au contrôle de la réactivation du HCMV (Cook et al., 2006; Stern et al., 2008). Toutes ces études indiquent que l'infection par le HCMV modifie le répertoire global de récepteurs des cellules NK, probablement en favorisant l'expansion de certains clones. Les implications de ces modifications sur la persistance virale ou les bienfaits pour l'hôte restent encore à déterminer. Certaines études suggèrent que la population NKG2C⁺ CD57⁺ représenterait un pool de cellules NK « mémoires » spécifiques du HCMV (Lopez-Verges et al., 2011).

De façon intéressante, la réponse des cellules NK au HCMV semble être spécifique non seulement du virus, avec l'émergence de clones, mais également du tissu infecté. En effet, alors que le récepteur majeur dévolu à la lyse de fibroblastes infectés est NKG2D, la reconnaissance et l'élimination de cellules dendritiques infectées se fait via NKp46 et DNAM-1 (Magri et al., 2011). Les cellules NK sont des cellules de l'immunité innée et sont donc activées très précocement en réponse à l'infection. Des cytokines sécrétées par les cellules infectées, telles que l'IFN- α et l'IFN- β , ou encore l'IL-12, l'IL-15 et l'IL-18 sécrétées par d'autres populations immunitaires comme les cellules dendritiques et les macrophages, peuvent activer les cellules NK (Zitvogel, 2002). En réponse les cellules NK sécrètent de l'IFN- γ et du TNF- α , par exemple, qui participent au contrôle de la réplication virale et au recrutement et l'activation des effecteurs de l'immunité adaptative, comme les lymphocytes T (Yokoyama, 2005).

Afin d'échapper aux cellules NK en particulier et à la réponse immunitaire en général, le HCMV a mis en place plusieurs mécanismes d'immunoévasion. Un des mécanismes d'immunoévasion les plus importants est la diminution de l'expression des molécules du CMH-I pour échapper aux lymphocytes T CD8⁺. Plusieurs glycoprotéines virales sont dévolues au détournement des molécules HLA. US2 et US11 s'associent aux molécules de classe I pour les faire sortir du réticulum endoplasmique et les adresser au protéasome pour dégradation (Benz and Hengel, 2000; Jones and Sun, 1997). US10 s'associe aux chaînes lourdes du CMH-I et retarde leur maturation (Furman et al., 2002). US3 séquestre les protéines du CMH-I dans le réticulum endoplasmique. US6 bloque le transport TAP dépendant des peptides dans le réticulum pour empêcher le chargement des molécules de classe I (Hengel et al., 1997). Toutefois, la diminution de l'expression en surface des molécules du CMH de classe I par le virus rend les cellules infectées plus sensibles à la lyse dirigée par les cellules NK. Afin d'échapper à la reconnaissance par les cellules NK, le HCMV a développé plusieurs stratégies. La protéine UL18 présente de fortes homologues structurales avec les molécules du CMH-I. UL18 peut lier avec une forte affinité le récepteur inhibiteur LILRB1 (Saverino et al., 2004). Cette liaison permet d'inhiber les cellules NK LILRB1⁺, mais la population LILRB1⁻ peut toujours répondre aux cellules infectées (Prod'homme et al., 2007). L'inhibition de TAP empêche le chargement des molécules HLA-I. Afin de protéger les cellules qu'il infecte, le HCMV maintient ou augmente le niveau d'expression de HLA-E grâce à la protéine UL40. UL40 produit un peptide qui mime les peptides dérivées de la séquence leader des molécules du CMH-I. UL40 rentre dans le

réticulum endoplasmique de façon TAP indépendante, ce qui lui permet d'être chargé sur HLA-E. La population NKG2A⁺ est inhibée après liaison du complexe HLA-E/UL40 (Tomasec et al., 2000).

L'infection par le HCMV augmente également l'expression des molécules de stress, les MIC et les ULBP, ligands du récepteur activateur NKG2D. Pour éviter l'activation des cellules NK *via* le récepteur NKG2D, plusieurs protéines virales interfèrent avec l'expression de ses ligands. Ainsi, UL16 empêche l'expression en surface de MICB et des ULBP1, 2, 5 et 6 (Cosman et al., 2001; Dunn et al., 2003; Eagle et al., 2009; Rolle et al., 2003). UL16 fixe les protéines de stress par un résidu glutamine (MICB) ou glutamate (ULBP1 et 2) en position 169 pour éviter leur transport en surface (Muller et al., 2010). UL142 séquestre MICA et ULBP3 dans le Golgi pour empêcher leur expression en surface (Bennett et al., 2010). UL141 cible CD112 et CD155 pour empêcher la liaison à DNAM-1 (Tomasec et al., 2005) et l'expression en surface de TRAIL-R1/R2, afin de protéger la cellule infectée de la lyse *via* TRAIL (Nemcovicova et al., 2013). Enfin, la protéine de tégument du HCMV pp65 (UL83), se lie à NKp30 et empêche la liaison du récepteur à un autre ligand (Arnon et al., 2005).

En plus des interactions protéiques, le HCMV peut empêcher la traduction des protéines de stress. UL112 est un micro-ARN qui cible spécifiquement l'ARN messager de MICB et empêche sa traduction (Nachmani et al., 2010). Le HCMV détourne également la réponse immunitaire à son avantage. Les cellules NK activées sécrètent de fortes quantités de TNF- α . UL138, une protéine de latence, augmente l'expression du récepteur au TNF par les cellules infectées de façon latente (Montag et al., 2011). Or le TNF- α est une cytokine qui permet la réactivation du HCMV. Tous ces mécanismes concourent à l'échappement immunitaire et démontrent l'importance des cellules NK dans le contrôle de l'infection par le HCMV.

1.2 Immunité NK anti-virus d'Epstein Barr (EBV)

L'EBV établit une infection persistante chez environ 95% de la population mondiale. Il est asymptomatique chez la plupart des sujets infectés mais dans certains cas il peut être responsable de mononucléose, ou de lymphomes B. Au cours de la phase symptomatique de l'infection par EBV, le nombre et la fréquence des cellules NK sont augmentés dans la circulation sanguine (Williams et al., 2005). Des patients déficients en cellules NK développent des pathologies rares associées à l'EBV (Shaw et al., 2012). Les cellules NK préviennent la transformation tumorale des cellules B infectées par la sécrétion d'IFN- γ , tandis que l'infection lytique rend les cibles plus sensibles à la lyse (Chijioke et al., 2013). Cette différence s'explique par la diminution de l'expression des molécules HLA-I et de l'augmentation de ligands de récepteurs activateurs (Pappworth et al., 2007). Les récepteurs qui gouvernent la réponse des cellules dans le cas d'une infection par l'EBV ne sont pas clairement définis, mais l'intervention de 2B4, NTB-A, NKG2D, des NCR et de KIR2DS1 a été rapportée par des expériences *in vitro* (Pende et al., 2002).

1.3 Immunité NK anti-Herpes Simplex Virus (HSV)

Il existe deux sérotypes du HSV, les HSV-1 et -2, qui sont les agents responsables des herpès oraux et génitaux. Le HSV diminue l'expression des molécules du CMH-I pour échapper aux réponses immunes adaptatives grâce à la protéine ICP47 qui inhibe l'action de TAP1. Le CMH-I non chargé est donc séquestré dans le RE. De ce fait il rend les cellules infectées sensibles à la reconnaissance et à la lyse par les cellules NK (Huard and Fruh, 2000). En revanche, contrairement à d'autres Herpesvirus, comme le HCMV, les HSV ne laissent pas d'empreinte sur le répertoire des cellules NK, bien que l'infection permette la différenciation de cellules NK vers un phénotype NKG2A⁻NKG2C⁺KIR⁺CD57⁺ (Bjorkstrom et al., 2011). Le virus peut toutefois détourner la réponse NK. En effet, les DC infectées par le HSV-2 vont sélectivement diminuer l'expression de HLA-C, ce qui les rend sensibles à la lyse dirigée par les cellules NK et empêche la mise en place d'une réponse adaptative (Elboim et al., 2013).

1.4 Immunité NK anti-Kaposi's Sarcoma-associated Herpes Virus (KSHV)

Le KSHV peut établir une infection persistante durant toute la vie de l'hôte. Il s'agit d'un virus oncogène, qui peut être responsable de sévères pathologies chez des patients immunodéprimés, notamment les patients atteints du VIH-1. *In vitro*, les cellules NK peuvent lyser les cellules infectées par le KSHV *via* la sécrétion de perforine et de granzymes et la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires permet la mise en place de l'immunité adaptative. Le KSHV diminue l'expression des molécules HLA-I grâce à deux E3-ubiquitine ligases, K3/MIR1 et K5/MIR2, qui augmentent leur endocytose (Coscoy and Ganem, 2000, 2001). Pour échapper à la reconnaissance par les cellules NK, MIR2 diminue l'expression de MICA et MICB, ainsi que d'AIICL, le ligand de NKp80 (Thomas et al., 2008). Un microARN viral, mirK12-7, cible l'ARN messager de MICB pour dégradation (Nachmani et al., 2009). ORF54 est une dUTP pyrophosphatase (dUTPase) qui cible un ou plusieurs ligands du récepteur NKp44 et empêche donc la reconnaissance des cellules infectées *via* ce récepteur (Madrid and Ganem, 2012). Des modifications du phénotype des cellules NK ont aussi été rapportées chez les patients infectés par le KSHV, de façon différente suivant que le virus soit en phase latente ou en phase active. Chez les patients infectés de façon latente, il y a une diminution de l'expression de NKp30, NKp46 et CD161, alors que chez les patients infectés de façon active, la baisse d'expression de NKG2D est associée à une capacité lytique réduite (Dupuy et al., 2012).

2 Immunité NK anti-virus de l'immunodéficience humaine 1 (VIH-1)

Le VIH-1 est un rétrovirus responsable d'une pandémie mondiale et de plus de 30 millions de morts depuis son apparition dans les années 1980. Le VIH-1 infecte les lymphocytes T CD4⁺ et la maladie est due à une déplétion massive en LT CD4⁺. Les lymphocytes T CD8⁺ cytotoxiques ont très tôt été associés à la réponse immunitaire anti-VIH-1. Les cellules NK interviennent également dans le contrôle du VIH-1. Chez les populations infectées, certains polymorphismes des HLA et des KIR sont impliqués dans le contrôle de la virémie (Flores-Villanueva et al., 2001). Les patients co-exprimant

HLA-Bw4 (Ile 80) et les KIR3DS1 et KIR3DL1, ses récepteurs, progressent moins rapidement vers le stade SIDA (Martin et al., 2002; Martin et al., 2007). Les clones KIR3DS1⁺ et KIR3DL1⁺ sont également plus nombreux chez les patients HLA-Bw4 que chez les autres (Alter et al., 2009). Il est possible que les épitopes du VIH-1 présentés par les molécules HLA-C modifient l'affinité pour les récepteurs inhibiteurs et favorisent la liaison aux récepteurs activateurs. Les récepteurs KIR2DL n'ont pas de rôle démontré dans la réponse anti-VIH-1, bien que la protéine Nef du VIH-1, qui inhibe l'expression des molécules HLA-A et -B, n'affecte pas l'expression des molécules HLA-C (ligands des KIR2DL). Il est possible que de cette façon le VIH-1 maintienne des signaux inhibiteurs (Cohen et al., 1999) (Figure 26).

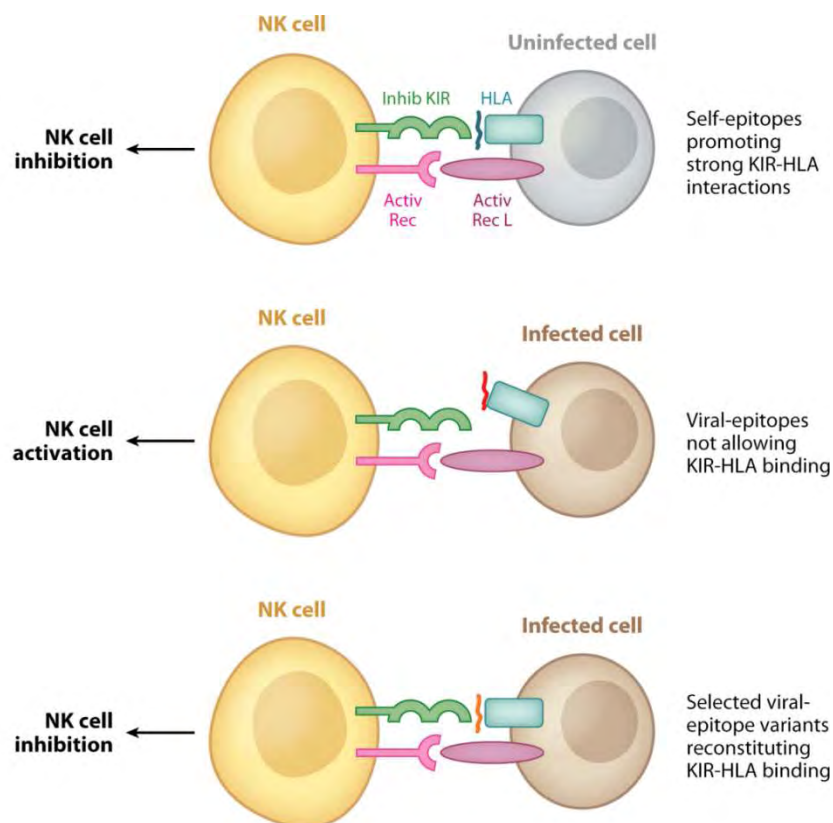


Figure 26 : Modèle d'interactions entre une molécule HLA et un récepteur KIR inhibiteur au cours d'une infection par le VIH-1. a) dans les conditions normales, les molécules HLA présentent des peptides dérivés du Soi et se lient aux KIR inhibiteurs ; b) dans le cas d'une infection, l'expression des molécules HLA est diminuée et la liaison aux KIR inhibiteurs peut être altérée par la présentation d'un épitope viral ; c) le VIH-1 peut être sélectionné sur la base de séquences protéiques qui génèrent des épitopes CMH-I qui favorisent la liaison aux KIR inhibiteurs. (d'après (Jost and Altfeld, 2013))

Le VIH-1 est un virus qui mute très rapidement pour échapper au système immunitaire. Chez les individus infectés, il y a un polymorphisme de peptides présentés par les molécules HLA qui favorise l'engagement des KIR inhibiteurs de l'individu, dépendamment de son génotype (Alter et al., 2011). De plus, la protéine Nef bloque l'expression des ligands de NKG2D pour éviter la

reconnaissance par les cellules NK (Cerboni et al., 2007). L'activation chronique du système immunitaire, comme dans le cas de l'infection par le VIH-1, conduit à des phénomènes d'épuisement des cellules effectrices. Les cellules épuisées montrent une capacité de réactivation et de prolifération moins importante. Les cellules NK sont sensibles à l'épuisement dans le cas d'une infection par le VIH-1. On assiste à une augmentation de cellules NK CD56^{dim} CD16⁺ CD57^{bright}, qui correspondent aux populations de cellules NK les plus différenciées dans le sang (Hong et al., 2010). Enfin, les cellules NK participent également à la déplétion des LT CD4⁺. La protéine gp41 induit l'expression d'un ligand du récepteur activateur NKp44 par les lymphocytes T CD4⁺ et conduit à la lyse des cellules cibles (Vieillard et al., 2005).

3 Immunité NK anti-virus de l'hépatite C (HCV)

Le virus de l'hépatite C est un virus à ARN simple brin enveloppé de la famille des Flaviviridae qui infecte environ 170 millions de personnes dans le monde. L'infection chronique par le HCV peut conduire au développement d'une cirrhose hépatique ou d'un carcinome hépatocellulaire. Les traitements constituent en une combinaison d'inhibiteurs de protéase virale, d'IFN- α pégylé et de ribavirine (Welsch et al., 2012). Les cellules de l'immunité innée, les cellules NKT et plus particulièrement les cellules NK, jouent un rôle important dans l'élimination du virus. Les cellules NK constituent 30% du pool lymphocytaire hépatique, et peuvent représenter jusqu'à 90% des lymphocytes présents en cas d'infection par le HCV (Doherty and O'Farrelly, 2000). L'IFN- γ qu'elles sécrètent inhibe la réplication virale. La production d'IFN- γ semble plus bénéfique que la réponse cytotoxique, puisque la lyse des hépatocytes infectés est en partie responsable des dommages au foie.

Des associations KIR/HLA sont corrélées à la résistance à l'infection par le HCV. Le génotype KIR2DL3, qui lie les molécules HLA-C du groupe 1 semble avoir un effet protecteur, les cellules NK montrant une meilleure activation en réponse au virus (Khakoo et al., 2004). A l'inverse, l'échec des thérapies anti-HCV est associé à l'expression de KIR2DL5 (Vidal-Castineira et al., 2010). Dans le foie des patients infectés, on observe des modifications des ratios entre cellules NK CD56^{dim} et CD56^{bright} (Cheent and Khakoo, 2011). L'infection chronique est associée à une augmentation de la population NKG2A⁺, corrélée à une plus forte expression d'HLA-E dans le foie infecté, ce qui pourrait expliquer le passage à la chronicité du HCV (Nattermann et al., 2005). L'expression des autres récepteurs de HLA-E, NKG2C et NKG2E est aussi augmentée chez les patients HCV⁺. Dans la circulation, les populations NKp46⁺ et NKp30⁺ diminuent, peut-être par recrutement de ces cellules dans le foie pour combattre l'infection (Kramer et al., 2012).

Le HCV met en place des mécanismes d'immunoévasion. Le niveau d'expression des molécules HLA-A, -B et -C ne diminue pas sensiblement, contrairement à HLA-E (Herzer et al., 2003; Nattermann et al., 2005). Les molécules HLA en se liant aux récepteurs KIR inhibiteurs empêchent l'activation des cellules NK. Mais le mécanisme majeur est la liaison de la protéine d'enveloppe E2 du HCV à CD81 qui est un co-récepteur cellulaire du virus. CD81 a été décrit comme intervenant dans le

remodelage du réseau d'actine des cellules NK, ainsi que dans leur migration (Crotta et al., 2006 ; Kramer et al., 2009). Une fois engagé, CD81 induit une cascade de déphosphorylation qui déphosphoryle notamment Erk et CD3- ζ , et inhibe l'activation des cellules NK (Crotta et al., 2002, Tseng, 2002 #666). Les ligands de NKG2D sont également diminués lors d'une infection par le HCV (Wen et al., 2008).

4 Immunité NK anti-virus de l'Influenza :

Les virus de l'Influenza A, B et C font partie de la famille des Orthomyxoviridae, et sont responsable d'épidémies annuelles. Les vaccins sont basés sur la production d'anticorps neutralisants et sur une réponse CD8 cytotoxique (Thomas et al., 2006). Le système immunitaire inné intervient également dans la réponse aux infections par Influenza. La plupart des études sur la réponse NK aux virus de l'Influenza a été réalisée dans des modèles animaux. L'importance des cellules NK dans l'élimination des virus de l'Influenza a pu être confirmée chez des souris déplétées en cellules NK, qui montrent une mortalité accrue (Liu et al., 2004). Cette protection pourrait passer par la liaison de NKp46 aux hémagglutinines des virus à la surface des cellules infectées et par ADCC envers les cellules infectées (Jegerlehner et al., 2004). Le rôle de NKp46 dans la réponse au virus de l'Influenza est discuté, certaines études indiquent une plus grande susceptibilité des souris déficientes à l'infection, tandis que d'autres montrent une résistance plus importante chez les souches de souris déficientes par rapport aux souches sauvages (Narni-Mancinelli et al., 2012). Chez l'Homme, la réponse à l'Influenza passe principalement par les récepteurs NKp46 et NKG2D. Les DC infectées activent les cellules NK en augmentant les ligands de ces récepteurs, et en sécrétant de grandes quantités d'IFN- α et d'IL-12 (Draghi et al., 2007). Des associations KIR/HLA ont été rapportées comme intervenant dans la susceptibilité des patients à déclencher des pathologies graves liées à l'infection par Influenza (La et al., 2011). L'Influenza peut détourner la réponse NK en modifiant le profil de glycosylation des hémagglutinines, qui permet de prévenir la reconnaissance par NKp46 (Owen et al., 2007). L'Influenza augmente l'expression des molécules de CMH-I dans les rafts lipidiques pour favoriser la reconnaissance par les récepteurs inhibiteurs (Achdout et al., 2008).

B Réponse anti-bactérienne

Les infections bactériennes fournissent de nombreux ligands aux récepteurs des cellules de l'immunité innée, notamment les TLR (Toll-like Receptors). La contribution des cellules NK durant les réponses immunes anti-bactériennes n'est pas très bien caractérisée. Bien qu'elles soient activées en réponse à une bactérie, cette activation est potentiellement indirecte, *via* d'autres cellules. Une fois activées, les cellules NK vont produire de l'IFN- γ qui augmente la phagocytose des bactéries par les macrophages. Peu d'études ont été réalisées sur des cellules NK humaines (Figure 27).

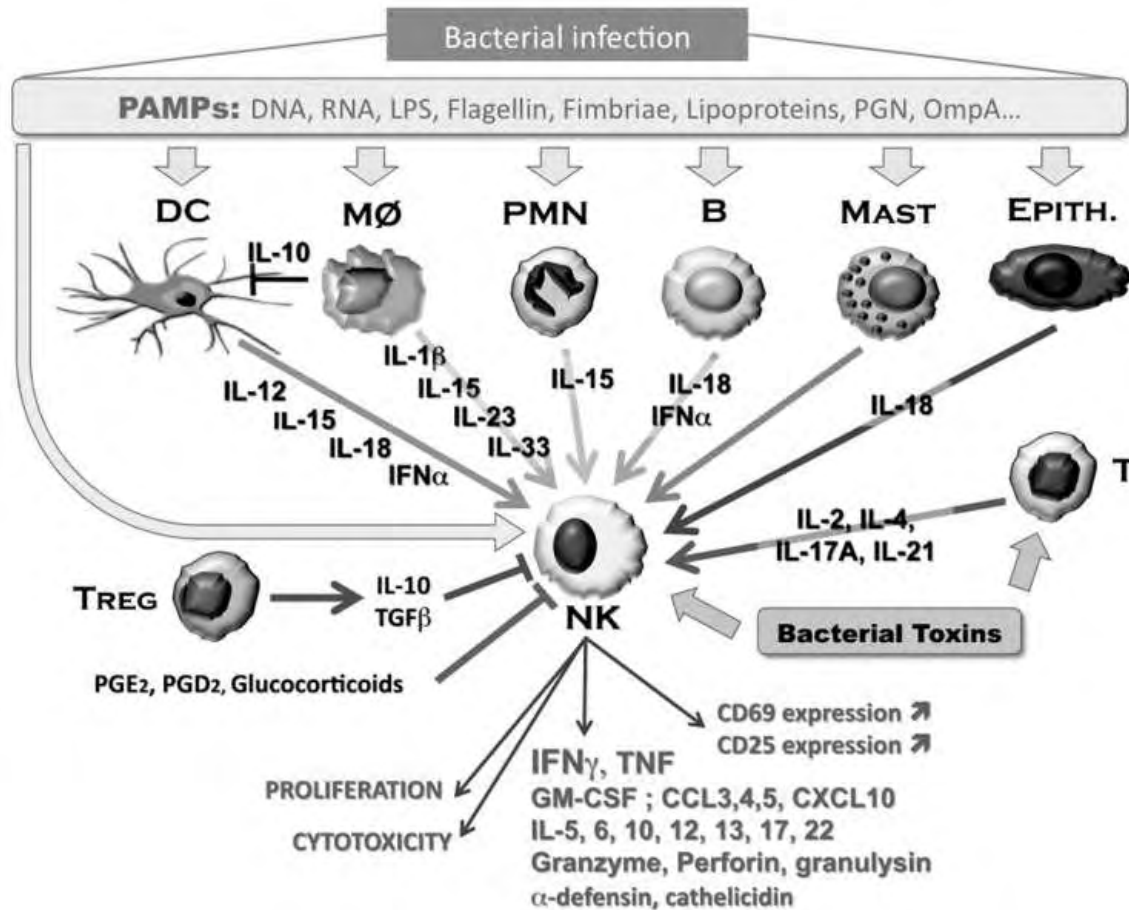


Figure 27 : Activation des cellules NK par des produits bactériens (PAMPs). Les cellules NK sont activées principalement *via* un réseau de cellules accessoires qui vont créer un microenvironnement pro-inflammatoire propice à l'activation des cellules NK. Activation des cellules NK grâce à la reconnaissance directe des PAMPs par les PRR exprimés par les cellules NK (Souza-Fonseca-Guimaraes et al., 2012a).

Les cellules NK expriment les TLR2, 3, 5 et 9, NOD1, 2 et NLRP3 (Hornung et al., 2002; Qiu et al., 2012). Ces PRR sont soit exprimés en surface de façon constitutive, soit exprimés après stimulation des cellules NK, certains étant retrouvés en intracellulaire à l'état basal. Toutefois il semblerait qu'aucun PRR ne puisse activer directement les cellules NK sans recours à des cellules auxiliaires. Ainsi, les cellules NK peuvent reconnaître le muramyl dipeptide (MDP) via NOD2, mais la sécrétion d'IFN- γ qui en résulte nécessite une costimulation des cellules NK par l'IFN- α et l'IL-12 sécrétées par les DC (Athie-Morales et al., 2008). La stimulation de cellules NK par un ARN double-brin synthétique (poly I :C), ligand de TLR3, conduit aussi à une réponse NK, mais se ferait plutôt *via* des RLR (RIG-I-like Receptors) (Perrot et al., 2010). Enfin, certaines études suggèrent que les récepteurs KIR pourraient également reconnaître directement des produits microbiens (Sivori et al., 2010). Certaines toxines produites par des bactéries, comme les superantigènes, peuvent activer les cellules NK, mais cet effet ne serait pas direct. En résumé, bien que les cellules NK expriment les

senseurs qui leur permettent de reconnaître directement des motifs microbiens, il semblerait que la présence de cellules auxiliaires soit nécessaire. Les cellules auxiliaires peuvent intervenir soit en créant un microenvironnement cytokinique propre à activer les cellules NK, soit par contact avec les cellules NK (Souza-Fonseca-Guimaraes et al., 2012b). Les cellules NK répondent principalement aux infections bactériennes en sécrétant de grandes quantités d'IFN- γ , essentiel à la résistance de l'hôte. De la même façon, lors de chocs septiques, les patients qui succombent ont une sévère lymphopénie en cellules NK (Giamarellos-Bourboulis et al., 2006; Venet et al., 2010).

C Réponse antiparasitaire

Les cellules NK sont impliquées dans les réponses immunes antiparasitaires, qu'il s'agisse de protozoaires ou d'Helminthes. Il n'y pas de preuves que ces pathogènes puissent être directement reconnus et donc activer d'eux-mêmes les cellules NK. Comme dans le cas des infections bactériennes, les cellules NK activées exercent leurs fonctions par la reconnaissance de cellules infectées, ou bien par la présence de cellules accessoires qui sécrètent des cytokines pro-inflammatoires (Korbel et al., 2004).

Des globules rouges infectés par *Plasmodium falciparum* induisent une forte sécrétion d'IFN- γ par les cellules NK, en présence de cytokines immunostimulantes comme l'IL-12 ou l'IL-18 (Artavanis-Tsakonas et al., 2003; Baratin et al., 2005). La réponse NK est plus intense lors de réinfection par *P. falciparum* que lors de la première rencontre avec le pathogène, suggérant une coopération entre les cellules NK et les cellules T mémoires (McCall et al., 2010). De même, la réponse IFN- γ est plus importante après vaccination. Les érythrocytes infectés par *P. falciparum* vont présenter à leur surface une protéine chaperonne, Hsp70, dans les rafts lipidiques. La partie C-terminale de cette chaperonne contient un épitope capable de déclencher une forte réponse cytotoxique des cellules NK. Après reconnaissance de l'épitope, les cellules NK éliminent les érythrocytes infectés *via* la libération de granzyme B. La réponse cytotoxique est d'autant plus forte que les cellules NK ont été stimulées au préalable par un peptide dérivé de Hsp70 (Bottger et al., 2012) (Figure 28). Les activités cytotoxique et cytokinique des cellules NK interviennent également, en présence de cellules accessoires, contre *Leishmania major*, ou de *Toxoplasma gondii*. Dans certains cas, la protection passe essentiellement par la sécrétion de cytokines, notamment le TNF- α (Manna et al., 2010). Les DC infectées par *T. gondii* sont lysées de façon perforine-dépendante. Dans les infections à *T. gondii*, les cellules NK ont un rôle majeur dans la réponse précoce contre le parasite, de par la sécrétion d'IL-17, cytokine essentielle au contrôle de l'infection (Passos et al., 2010).

Contrairement aux protozoaires, peu d'études se sont intéressées au rôle des cellules NK dans les réponses immunes anti-helminthes. La réponse immunitaire anti-helminthes nécessite notamment la mise en place d'une réponse de type Th2, avec la sécrétion de cytokines telles que l'IL-4, l'IL-5 et l'IL-13 (Allen and Maizels, 2011). Certains rapports montrent que des produits des parasites peuvent déclencher la sécrétion d'IFN- γ en se liant directement à un récepteur des cellules NK (Hsieh et al.,

2004). D'autres indiquent que les cellules NK peuvent sécréter de l'IL-13 lorsque le parasite a pu détourner la réponse Th2. De par leur capacité à sécréter des cytokines pro-Th1 ou pro-Th2, les cellules NK pourraient ainsi jouer un rôle dans la création d'un microenvironnement favorable à la mise en place d'une réponse T protectrice appropriée (Korten et al., 2002).

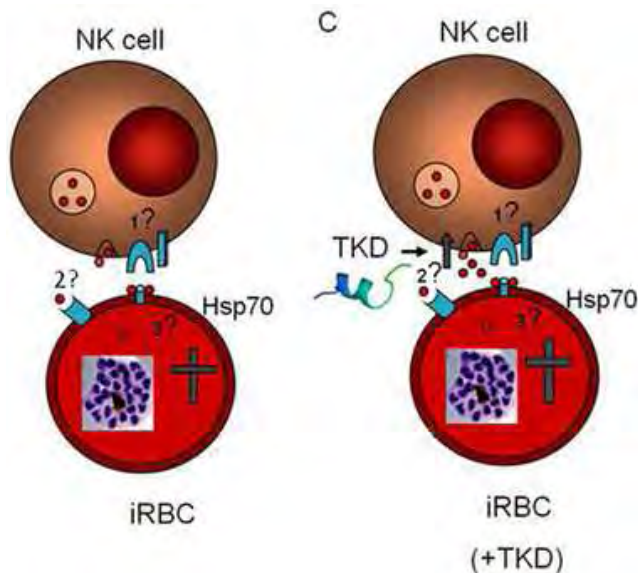


Figure 28 : Modèle de réponse des cellules NK aux érythrocytes infectés par *Plasmodium falciparum*. Les érythrocytes infectés vont exprimer Hsp70 et être reconnus par un récepteur activateur des cellules NK. Le traitement d'érythrocytes infectés par le TKD (peptide dérivé de Hsp70) augmente la réponse des cellules NK (Bottger et al., 2012)

D Réponse anti-tumorale

Les cellules NK ont été caractérisées par leur capacité à tuer des cellules tumorales *in vitro*, sans nécessité de stimulation préalable (Kiessling et al., 1975a; Kiessling et al., 1975b). Cette observation est à l'origine de leur nom. Les cellules tumorales qui diminuent ou perdent l'expression des molécules HLA-I, ou qui expriment des protéines de stress ou du Soi modifié sont des cibles de choix pour les cellules NK. *In vivo*, les cellules NK peuvent contrôler la dissémination des métastases dans des modèles murins. Chez l'Homme, l'évolution favorable de plusieurs cancers a été associée au nombre de cellules NK infiltrant les tumeurs (Coca et al., 1997). Les cellules NK reconnaissent les cellules tumorales *via* plusieurs récepteurs activateurs. NKG2D participe à l'immunosurveillance de tumeurs *in vivo* chez la souris. Le polymorphisme de NKG2D est corrélé avec l'activité cytotoxique des cellules NK et le risque de développer des cancers (Hayashi et al., 2006; Shafi et al., 2011). Les NCR sont également importants dans l'activité anti-tumorale des cellules NK. De ce fait, la diminution de l'expression de NKp30, ou l'expression sélective de l'isoforme c de NKp30 sont associées à un pronostic défavorable de leucémie ou de cancers pancréatiques (Delahaye et al., 2011). Les KIR influencent aussi le développement ou la protection de certains types de cancers (O'Connor and McVicar, 2013). De façon intéressante il semblerait que les cellules NK non éduquées, et qui ne possèdent donc pas de récepteurs inhibiteurs pour le CMH-I du Soi, soit des effecteurs clés dans la lyse des cellules tumorales (Tarek et al., 2013). Du fait de leur importance dans l'immunosurveillance des tumeurs, les cellules NK sont des cibles de choix pour le développement de nouvelles thérapies anti-tumorales. Des cytokines immunostimulatrices sont utilisées comme thérapies afin d'activer ou de

réactiver les cellules NK du patient. La capacité des cellules NK à exercer l'ADCC a permis le développement de thérapies basées sur des anticorps monoclonaux dirigés contre des antigènes tumoraux (Deckert et al., 2013; Rudnicka et al., 2013). Le transfert adoptif de cellules NK alloréactives a également été envisagée en thérapie anti-tumorale (Cooley et al., 2009; Symons et al., 2010). Les cellules tumorales peuvent échapper à la réponse des cellules NK. L'expression de CEACAM1 par les cellules tumorales diminue ainsi la reconnaissance des cellules cibles par les cellules NK (Chen et al., 2011; Markel et al., 2002). La création d'un microenvironnement immunosuppresseur riche en IL-10, en TGF- β ou en IDO (Indoléamine-2,3-dioxygénase) est un autre moyen d'empêcher leur activation (Sato et al., 2012; Szkaradkiewicz et al., 2010). L'expression de HLA-E dans les cancers colorectaux est associée à un mauvais pronostic (Bossard et al., 2012).

E Les cellules NK et les allogreffes

Les cellules NK interviennent également dans les réponses immunes contre les allogreffes, tant au niveau des rejets aigu que chronique. Les cellules NK peuvent être activées par la reconnaissance d'alloantigènes exprimés par les cellules du greffon. n mésappariement entre les haplotypes KIR/HLA favorise l'activation des cellules NK (Gagne et al., 2007). De même, l'expression des ligands de NKG2D, indication d'un stress cellulaire, est associée à un rejet aigu du greffon, auquel participe les cellules NK de l'hôte receveur (Hankey et al., 2002). Une fois activées, les cellules NK vont sécréter de l'IFN- γ , du TNF- α et plusieurs chimiokines, qui participent à la mise en place d'une réponse adaptative de type Th1 contre le greffon, augmentent les capacités de présentation des APC et l'infiltration immunitaire dans les tissus (Kondo et al., 2000; Obara et al., 2005). Des modèles murins déficients en LT et LB montrent que les cellules NK seules sont capables de rejeter le greffon (Obara et al., 2005). Les cellules NK peuvent également participer au rejet de greffe *via* l'ADCC de cibles recouvertes d'anticorps. L'état inflammatoire chronique et la lyse des cellules du greffon pourraient libérer des antigènes normalement séquestrés et conduire au rejet chronique. Enfin, l'existence de populations de cellules NK avec des propriétés « mémoire » pourrait également jouer dans le rejet chronique (Benichou et al., 2011). A l'inverse, dans certains cas, les cellules NK peuvent favoriser la tolérance envers le greffon. Ainsi, la capacité des cellules NK à reconnaître et lyser des cellules dendritiques permet de limiter la mise en place d'une réponse adaptative. La lyse des cellules dendritiques du donneur ou des cellules dendritiques du receveur mal activées dans le greffon protège ainsi d'une allo-réponse (Yu et al., 2006). Ce phénomène conduit à un biais de l'environnement cytokinique pro-Th1 vers un microenvironnement pro-Th2. En présence d'IL-12, dans des conditions inflammatoires chroniques, les cellules NK peuvent sécréter de l'IL-10, cytokine anti-inflammatoire, qui favorise la tolérance au greffon et l'émergence de cellules T régulatrices induites productrices d'IL-10 (Maroof et al., 2008). L'augmentation des cellules NK dans le sang périphérique est également associée chez l'Homme, à l'acceptation de greffes de reins (Sagoo et al., 2010).

III Les cellules Natural Killer de la *decidua basalis*

Les cellules NK sont des cellules effectrices importantes de l'immunité innée. Les différentes populations de cellules assurent la défense de l'organisme dans la circulation et les organes où elles se localisent. Durant la grossesse, il y a apparition d'une population de cellules NK particulière qui n'a pas de fonctions démontrées dans les réponses immunes mais qui assure des fonctions physiologiques très importantes : les cellules NK de la *decidua basalis* (dNK).

A La *decidua basalis*

Chez la femme, la partie supérieure de l'épithélium utérin constitue l'endomètre. Ce tissu subit des remodelages réguliers : c'est le cycle menstruel. Le cycle menstruel peut être divisé en trois phases. La phase proliférative ou folliculaire précède l'ovulation, au cours de laquelle l'endomètre subit des modifications vasculaires. L'ovulation correspond au début de la phase sécrétoire, durant laquelle un embryon peut s'implanter. En absence de fécondation et d'implantation d'un embryon, la partie fonctionnelle de l'endomètre est éliminée. Ce cycle menstruel est régulé par des modifications hormonales, elles-mêmes cycliques (Moffett-King, 2002). Suite à une fécondation, le cycle menstruel s'arrête et la grossesse commence. Les divisions de l'œuf vont donner naissance à l'embryon, ou blastocyste. Le blastocyste est composé d'une couche de cellules internes, qui vont se développer en fœtus, et une membrane externe, qui constitue le trophoblaste et va se développer en placenta. Un système d'interpénétration des microvillosités utérines et trophoblastiques se met alors en place, afin d'assurer les échanges sanguins nécessaires à la croissance du fœtus. Le trophoblaste se divise lui-même en deux couches. Une couche en profondeur, le cytotrophoblaste qui subit de nombreuses mitoses ; et une couche externe de cellules filles qui fusionnent pour donner le syncytiotrophoblaste. Le syncytiotrophoblaste se met en place au fur et à mesure que l'œuf pénètre dans le stroma et est donc en contact direct avec l'endomètre et le sang maternel. Ces zones de contact constituent les interfaces fœto-maternelles. La pénétration de l'œuf entraîne des modifications profondes de l'endomètre : c'est la décidualisation. La *decidua basalis* est la partie maternelle du placenta, dans laquelle sont ancrées les villosités chorioniques (Martin and Sutherland, 2001).

L'un des phénomènes essentiels de la décidualisation est le remodelage vasculaire de l'endomètre gestant. Ce remodelage vasculaire commence dès le début de la grossesse, lorsque le trophoblaste a adhéré à la surface de l'endomètre. Les cellules dérivées du placenta transforment les artères spiralées maternelles pour assurer au fœtus un afflux constant de sang contenant les nutriments nécessaires à la croissance. La colonisation de la *decidua* par le trophoblaste extravilleux et le remodelage vasculaire qui en découle permet la formation de vaisseaux plus dilatés qui échappent au contrôle vasomoteur de la mère (Pijnenborg et al., 2006).

Le remodelage des artères maternelles spiralées nécessite la destruction de la paroi endovasculaire des vaisseaux constituée de cellules endothéliales et leur remplacement par le trophoblaste extravilleux. Pour détruire la matrice extracellulaire, le cytotrophoblaste sécrète des métalloprotéases. Son invasion est également dirigée par un gradient de chimiokines sécrétées par les cellules NK déciduales (dNK), la population immunitaire majoritaire de la *decidua basalis* (Harris, 2010).

B Origine des cellules Natural Killer déciduales

L'origine des cellules dNK est encore l'objet de recherches. Plusieurs hypothèses ont été proposées pour expliquer l'apparition de cette population particulière de cellules NK. Les cellules dNK pourraient dériver de cellules NK recrutées du sang périphérique ou d'autres organes, ou bien être issues de la spécialisation de populations présentes avant le début de la grossesse, ou encore d'un développement *in situ* à partir de précurseurs hématopoïétiques. Ces hypothèses ne sont pas exclusives, et il est possible que les cellules dNK soient une population hétérogène composée de cellules de différentes origines (Acar et al., 2010).

1 Maturation des cellules Natural Killer de l'endomètre

Une population de cellules NK est retrouvée dans l'utérus non gestant, au niveau de l'endomètre : ce sont les cellules NK endométriales (eNK). Les cellules eNK représentent environ 30% des lymphocytes présents dans l'endomètre. L'absence d'expression des récepteurs aux chimiokines CXCR1, 2, 3 et 4 et CCR1, 2, 3, 5 et 7 par les cellules eNK suggère qu'elles seraient générées *in situ* à partir de progéniteurs hématopoïétiques et pas de cellules qui migreraient du sang ou d'autres tissus périphériques. La population de cellules eNK est considérée comme une population de cellules NK immatures. En effet, les cellules eNK sont très peu cytotoxiques et ne produisent pas de cytokines. Le répertoire de récepteurs particulier et le profil transcriptionnel font des cellules eNK une population unique parmi les autres cellules NK (Kopcow et al., 2010; Manaster et al., 2008). Le nombre de cellules eNK varie en fonction du cycle menstruel mais leur proportion reste la même parmi les cellules lymphocytaires présentes dans l'endomètre. La corrélation entre les différentes phases du cycle menstruel et la variation en nombre des cellules eNK suggère un rôle des hormones sexuelles. Lors de la phase sécrétoire, les taux d'œstrogène diminuent et ceux de la progestérone augmentent. La progestérone n'influe pas directement sur les cellules eNK puisque ces dernières n'expriment pas le récepteur (King et al., 1996). En revanche, il a été démontré qu'en réponse à une stimulation par la progestérone, les cellules stromales de l'endomètre sécrètent de l'IL-15 (Okada et al., 2000). Avec l'augmentation de la sécrétion d'IL-15, les cellules eNK prolifèrent rapidement (Figure 29). En fin de cycle, s'il n'y a pas eu implantation embryonnaire, les taux de progestérone diminuent, l'endomètre se résorbe et les taux d'œstrogènes commencent à augmenter. Les œstrogènes agissent directement sur les cellules eNK en se fixant à leurs récepteurs (Henderson et al., 2003). La

population de cellules eNK diminue alors pour retrouver son niveau basal de début de cycle. De plus, la xénotransplantation d'endomètre humain dans des souris NOD/SCID/ γc^{null} , qui n'ont ni T, ni B et très peu de cellules NK, montrent une augmentation de la population $CD56^+ CD16^-$ au jour 28 du cycle menstruel (Matsuura-Sawada et al., 2005).

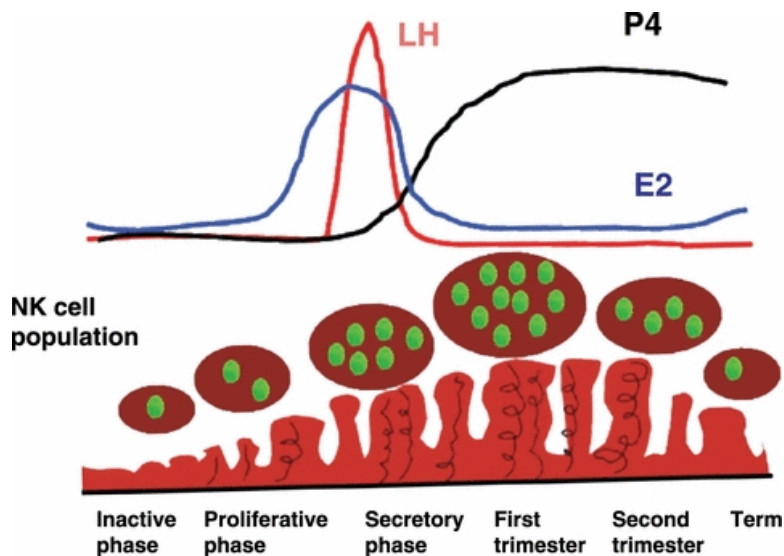


Figure 29 : Evolution du nombre de cellules NK utérine en fonction du cycle menstruel et du niveau d'œstrogène (E2) et de progestérone (P4) (Kalkunte et al., 2008).

Lors de l'implantation d'un embryon, le cycle s'arrête, le niveau d'IL-15 continue d'augmenter et les cellules eNK acquièrent un phénotype de cellules dNK. Elles continuent de s'accumuler dans l'endomètre qui se transforme. *In vitro* la stimulation des cellules eNK par l'IL-15 modifie également leur phénotype. Ces cellules acquièrent l'expression de NKp30 et de NKp44, et sécrètent de l'IP-10 et de l'IFN- γ , indiquant un processus de maturation, avec un phénotype proche de celui des cellules dNK. En revanche, les cellules eNK ne sécrètent pas les facteurs pro-angiogéniques nécessaires au remodelage utérin, y compris après stimulation par l'IL-15 (Manaster and Mandelboim, 2008) (Figure 30).

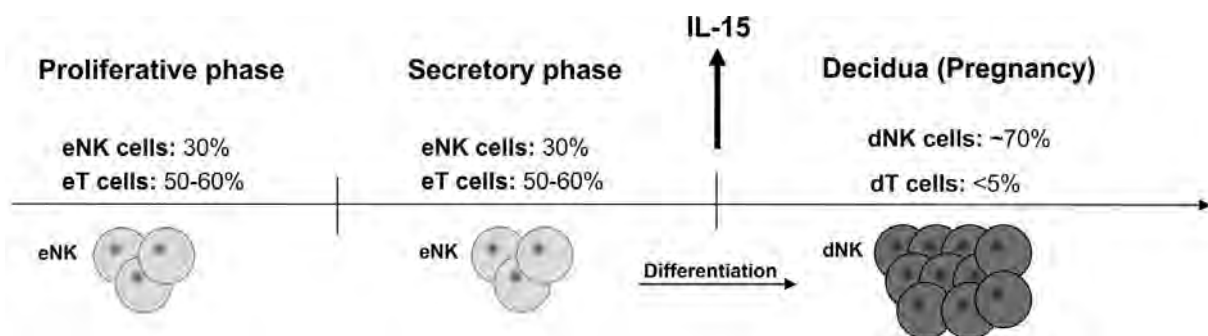


Figure 30 : Modèle de développement des cellules NK déciduales. Lors de l'implantation embryonnaire, le niveau d'IL-15 augmente dans la decidua permettant la maturation et la différenciation des cellules NK endométriales en cellules NK déciduales (Manaster et al., 2008).

2 Génération *in situ*

Une autre théorie propose que les cellules dNK soient issues de progéniteurs hématopoïétiques qui se différencieraient dans l'endomètre. Des progéniteurs hématopoïétiques sont présents dans la couche basale de l'endomètre. Cette partie de l'endomètre n'est pas détruite durant les menstruations, et constituerait donc un réservoir de progéniteurs capables de se différencier en cellules dNK. Ou alors, des progéniteurs CD34⁺ seraient recrutés à chaque cycle menstruel (Bulmer and Lash, 2005). Plusieurs études ont démontré que le stroma endométrial peut recruter des cellules souches hématopoïétiques circulantes et fournir l'environnement en cytokines (notamment l'IL-15) adapté pour la différenciation et la prolifération de cellules NK (Keskin et al., 2007). Plus récemment il a été démontré que les précurseurs CD34⁺ présents dans la decidua basalis étaient des cellules engagées dans le lignage NK. Ces cellules expriment E4BP4 et Id2, deux facteurs de transcription essentiels au développement des cellules NK, et sont incapables de se différencier en cellules myéloïdes (Vacca et al., 2011).

3 Recrutement de cellules Natural Killer du sang périphérique

La dernière théorie suggère que les cellules dNK seraient dérivées de cellules recrutées de la périphérie, et en particulier du sang circulant. Le recrutement des cellules NK dans les tissus est un processus qui se fait en plusieurs étapes et qui nécessite l'intervention de chimiokines et l'expression de molécules d'adhésion (Springer, 1994). Chez la souris, où la placentation et la décidualisation sont différentes, des études ont démontré que les cellules NK utérines (uNK) sont recrutées de la périphérie. Les progéniteurs des cellules uNK sont générés dans les tissus périphériques, le thymus, les nœuds lymphatiques ou encore la rate, et sont recrutés pendant la gestation (Chantakru et al., 2002).

Chez l'Homme, les cellules stromales de la *decidua basalis* et les cellules trophoblastiques sécrètent différentes chimiokines qui permettent le recrutement de certaines sous-populations de cellules NK à partir du sang périphérique. *In vitro*, CXCL12, CXCL10 et CX3CL1 sécrétées par des cellules déciduales en culture permettent l'attraction de cellules NK du sang périphérique (Carlino et al., 2008). L'endomètre humain sécrète de nombreuses chimiokines telles que CXCL9, CXCL10, CXCL12, CCL4, CCL3 (Kitaya et al., 2004; Kitaya et al., 2003) ou encore CX3CL1 (Hannan et al., 2004). Toutes ont des activités chimioattractantes sur les cellules NK. L'expression des chimiokines est elle aussi corrélée aux phases du cycle menstruel, les niveaux les plus élevés étant repérés durant la phase sécrétoire ou après implantation de l'embryon. Ces données suggèrent une régulation hormonale de la production des chimiokines (Jones et al., 2004). Une fois dans la *decidua basalis*, ces cellules seraient modifiées sous l'influence du microenvironnement local.

Les cellules dNK proviendraient ainsi de cellules NK du sang CD56^{dim} CD16⁺ qui migreraient dans la decidua, et sous l'action du microenvironnement local, notamment du TGF- β , acquerraient un phénotype de cellules dNK. Toutefois, la plupart des études soutiennent un recrutement préférentiel des cellules NK CD56^{bright} CD16⁻ circulantes. En effet, toute la population CD56^{bright} CD16⁻ exprime

CXCR4, le récepteur de CXCL12, sécrétée par les trophoblastes invasifs (Hanna et al., 2003; Wu et al., 2005). Les trophoblastes sécrètent également CCL3, qui attire aussi préférentiellement les cellules NK CD56^{bright} CD16⁻ (Drake et al., 2001).

Le recrutement des lymphocytes dans les tissus nécessite des interactions entre molécules d'adhésion. La L-sélectine (CD62L) est ainsi essentielle à l'extravasation sur les HEV (High Endothelial Venules). Seules les cellules NK CD56^{bright} CD16⁻ expriment CD62L (Frey et al., 1998). Le ligand de CD62L, CSPG-2, n'est exprimé par les cellules endothéliales de l'endomètre que durant la phase sécrétoire, ce qui est en faveur du recrutement des cellules NK CD56^{bright} CD16⁻ (Yamaguchi et al., 2006). D'autres interactions entre molécules d'adhésion telles que $\alpha 4\beta 1$ -VCAM-1 ou LFA-1-ICAM-1 sont aussi potentiellement impliquées dans le recrutement de cellules NK à partir du sang (Burrows et al., 1994; Tawia et al., 1993).

Toutefois, toutes les cellules dNK n'expriment pas le même répertoire de récepteurs aux chimiokines, et il est possible que différentes populations stromales attirent différentes sous-populations de cellules NK circulantes. De même, l'absence d'expression de récepteurs aux chimiokines par certaines cellules dNK indique que toutes ne seraient pas recrutées à partir de la périphérie (Manaster and Mandelboim, 2010). Enfin, quel que soit l'origine des cellules dNK, le microenvironnement semble être essentiel à la génération de ces cellules et à leurs fonctions.

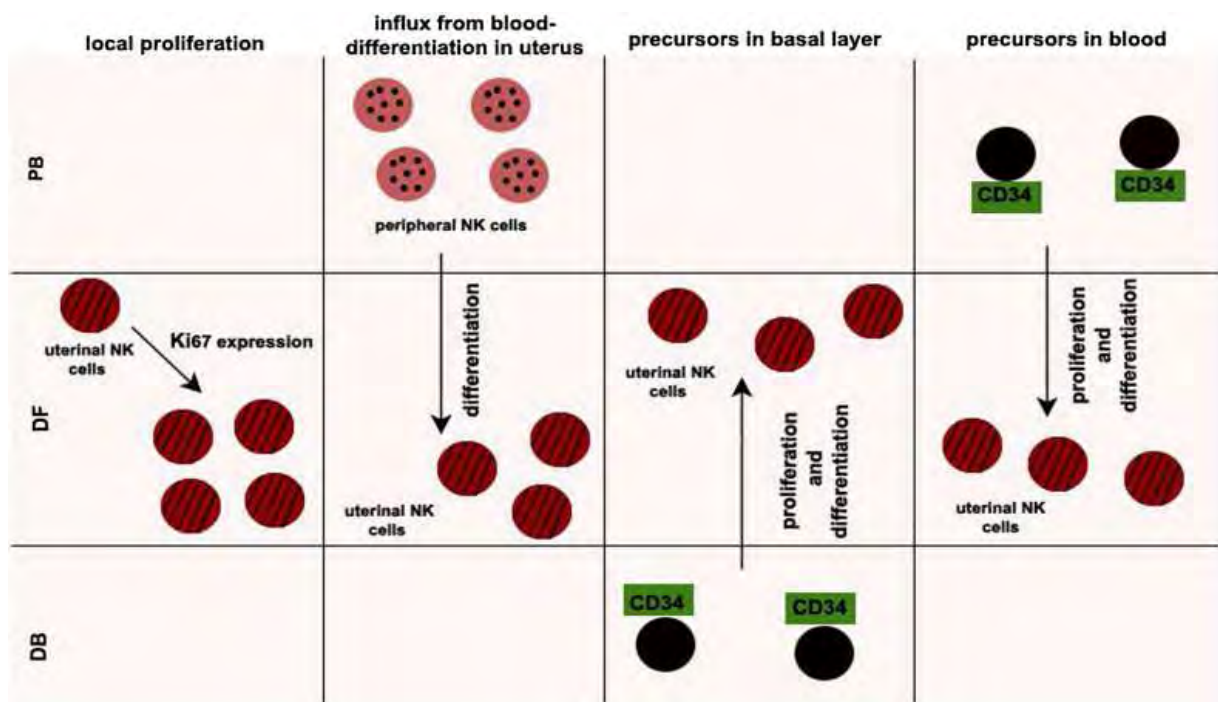


Figure 31 : Schéma résumé des différents modèles proposés pour le développement des cellules dNK. Les cellules dNK pourraient être générées à partir de progéniteurs locaux ; les cellules dNK proviendraient de la différenciation de cellules NK recrutées du sang périphérique ; le recrutement de progéniteurs permettrait la différenciation sous l'action du microenvironnement local. (Acar et al., 2010)

C Phénotype des cellules Natural Killer déciduales

Les cellules dNK sont majoritairement CD56^{bright} CD16⁻, phénotype classique des cellules NK tissulaires. Le répertoire de récepteurs activateurs et inhibiteurs exprimé par les cellules dNK est unique et très conservé entre les individus (El Costa et al., 2008). Les cellules dNK ressemblent aux cellules NK CD56^{bright} CD16⁻ du sang périphérique et des organes lymphoïdes secondaires, notamment parce qu'elles expriment des niveaux élevés d'hétérodimères CD94/NKG2 (Trundley and Moffett, 2004). Mais elles ont également des similarités avec les cellules NK CD56^{dim} CD16⁺ au niveau de l'expression des KIR (Hiby et al., 1997). Parmi les récepteurs activateurs exprimés, il y a les trois NCR (NKp46, NKp44 et NKp30), ainsi que NKG2D, 2B4 et CD2. L'expression de NKp44, ainsi que celle du marqueur d'activation CD69, suggère que les cellules dNK sont constitutivement activées dans le microenvironnement décidual. Les cellules dNK expriment aussi un certain nombre de récepteurs inhibiteurs, tels que NKG2A, KIR2DL4, KIR2DL1, KIR2DL2, KIR2DL3 et ILT2 (El Costa et al., 2008).

En plus des récepteurs contrôlant les fonctions effectrices des cellules dNK, ces dernières diffèrent des cellules NK circulantes par l'expression d'autres molécules de surface. Des analyses du transcriptome ont démontré que les cellules dNK expriment sélectivement certains gènes à des niveaux plus élevés que dans d'autres populations de cellules NK. Ainsi, les cellules dNK expriment fortement les récepteurs NKG2C et NKG2E. Les différences s'observent aussi au niveau de l'expression de certaines intégrines (expression plus élevées des sous-unités α^D , α^X , $\beta 1$ et $\beta 5$) et de certaines tétraspanines (CD9, CD151, CD53, CD63 et TSPAN-5) (Koopman et al., 2003). L'expression de CD9 par les cellules dNK en fait une population particulière, CD9 étant utilisé comme marqueur d'acquisition du phénotype décidual dans plusieurs études (Keskin et al., 2007).

Contrairement aux cellules CD56^{bright} CD16⁻ du sang, les cellules dNK sont granulaires et expriment la perforine, les granzymes et la granulysine, à des niveaux parfois supérieurs aux cellules NK CD56^{dim} CD16⁺ du sang. De plus, les cellules dNK expriment des protéines immunomodulatrices comme la galectine 1 et PP14 (Progestagen-associated Protein 14) qui pourraient avoir des fonctions importantes dans la réponse immune locale (Koopman et al., 2003). Enfin, il existe des différences au niveau de l'expression des récepteurs aux chimiokines. Comparées aux cellules NK du sang, les cellules dNK expriment fortement CXCR3 et plus faiblement CXCR4 et peu ou pas CXCR1, 2, CXCR1, CCR1, 2, 3, 4, 5, 6 et 7 (Santoni et al., 2008). Le phénotype particulier des cellules dNK et les différences au niveau de l'expression génique suggèrent que ces cellules exercent des fonctions particulières durant la grossesse.

D Fonctions des cellules Natural Killer déciduales

L'afflux massif de cellules dNK au site d'implantation de l'embryon et leur localisation au début de la gestation laisse penser que ces cellules joueraient un rôle essentiel dans le bon déroulement de la grossesse.

1 Fonction cytokinique

Bien qu'elles expriment la machinerie lytique, le phénotype des cellules dNK laisse penser que la fonction principale de ces cellules est la sécrétion de facteurs solubles. L'un des événements les plus importants du début de la grossesse est l'invasion de la *decidua basalis* par le cytotrophoblaste et le remodelage des artères maternelles spiralées. Plusieurs études indiquent que les cellules dNK participent activement au recrutement des cellules d'origine fœtale et au remodelage vasculaire

Des analyses histologiques de *decidua basalis* du premier trimestre de la gestation montrent des cellules dNK à proximité des vaisseaux sanguins. Les premières indications qu'un remodelage vasculaire s'opère sont observées en absence de trophoblastes extravilleux (EVT) (Craven et al., 1998). La perte initiale des cellules musculaires lisses vasculaires et les premières ruptures de la paroi de cellules endothéliales sont ainsi dépendantes de la présence de lymphocytes, notamment des cellules NK, mais pas des EVT. Les différentes étapes comme l'arrivée des cellules trophoblastiques, l'apoptose des cellules endothéliales de la paroi des vaisseaux et leur remplacement par le trophoblaste endovasculaire (EVT) ont été associées à la présence de cellules dNK et des macrophages dans les vaisseaux de la *decidua* (Smith et al., 2009). Les EVT finissent par tapisser complètement les vaisseaux, leur conférant une plasticité plus importante, et donc un flux sanguin vers le fœtus beaucoup plus important.

Les cellules dNK participent activement aux différentes étapes en sécrétant plusieurs facteurs solubles qui initient la déstabilisation des structures vasculaires et donc la transformation des artères spiralées maternelles. Les cellules dNK sécrètent notamment de l'Ang-1 (Angiopoïétine 1), de l'Ang-2 de l'IFN- γ et du VEGF-C (Vascular Endothelial Growth Factor), du PlGF (Placenta Growth Factor) et NKG5 dont les récepteurs sont exprimés dans les artères spiralées (Lash et al., 2006). Le VEGF-C augmente la perméabilité des vaisseaux. Le TGF- β et l'Ang2 participent à la séparation et la perte des cellules musculaires lisses des vaisseaux sanguins. Les propriétés pro-angiogéniques des cellules dNK ont été démontrées *in vitro* et *in vivo* (Robson et al., 2012). En effet, des surnageants de culture de cellules dNK favorisent la croissance et la migration de la lignée cellulaire HUVEC (Human Umbilical Vein Endothelial Cells), de façon VEGF-C et PGF (Placenta Growth Factor) dépendante. *In vivo*, les cellules dNK sont capables d'induire la formation de métastases dans des modèles de tumeurs murines (Hanna et al., 2006). L'importance de l'IFN- γ a été démontrée chez la souris. Des défauts du remodelage vasculaire utérin ont été observés dans des modèles murins déficients en cellules NK ou en IFN- γ (Croy et al., 2003). La reconstitution de la population de cellules NK ou l'injection d'IFN- γ restaurent le phénotype (Ashkar and Croy, 1999). Toutefois, l'implication de l'IFN- γ chez l'Homme n'a pas fait l'objet d'études détaillées.

Après les premières modifications des artères, l'invasion des EVT est nécessaire pour assurer le flux sanguin croissant vers le fœtus. L'invasion de la *decidua basalis* par les EVT est finement contrôlée par les cellules dNK. En plus des facteurs pro-angiogéniques, ces dernières sécrètent également des chimiokines telles que l'IL-8 et l'IP-10, dont les récepteurs CCR1 et CXCR3 sont

exprimés par les EVT. *In vitro*, l'ajout d'anticorps bloquants contre ces chimiokines inhibe l'invasion des EVT dans une matrice (Hanna et al., 2006). Les cellules dNK peuvent participer directement à l'invasion des EVT en dégradant la matrice extracellulaire par la production de métalloprotéases (MMP-2 et MMP-9).

Les cellules dNK contrôlent également l'arrêt de l'invasion des EVT par la sécrétion d'IFN- γ . L'IFN- γ agit sur les EVT en modifiant la sécrétion des métalloprotéases MMP-12 et MMP-9. La neutralisation de l'IFN- γ restaure partiellement l'invasion des EVT (Hu et al., 2006). Le TGF- β est lui aussi un inhibiteur de la migration des EVT *in vitro*. Les cellules dNK sécrètent plusieurs autres facteurs solubles qui influent également sur le bon déroulement de la grossesse, soit en agissant sur les cellules trophoblastiques ou les autres cellules immunes présentes localement, soit en favorisant la création d'un microenvironnement propice au bon déroulement de la grossesse. Parmi ces facteurs solubles, on retrouve le TNF- α , l'IL-10, le GM-CSF (Granulocyte Monocyte Colony Stimulating Factor), l'IL-1 β , le CSF-1 (Colony Stimulating Factor) et LIF (Leukaemia Inhibitory Factor) (Lash et al., 2006).

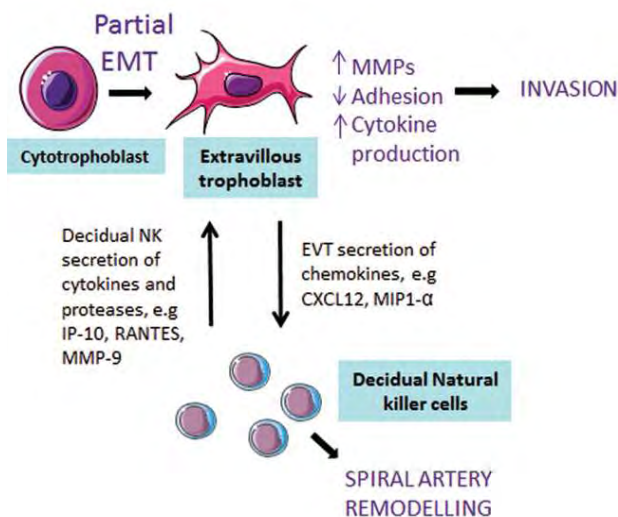


Figure 32 : Schéma représentant la collaboration entre les cellules NK et les EVT dans le remodelage des artères spiralées maternelles (Wallace et al., 2012)

2 Communication avec les trophoblastes

Les étapes du remodelage vasculaire utérin dépendent d'une coopération entre deux acteurs cellulaires majeurs : les cellules dNK et les trophoblastes. La coopération entre ces cellules peut se faire soit par la sécrétion de cytokines et de chimiokines, soit de façon contact dépendant (Wallace et al., 2012) (Figure 32). Plusieurs études montrent que le répertoire des KIR exprimé par les cellules NK et les haplotypes HLA-C exprimés par les cellules trophoblastiques sont importants pour le bon déroulement de la grossesse. Des interactions existent entre les récepteurs des cellules dNK et les trophoblastes qui expriment leurs ligands physiologiques. HLA-G, une molécule non classique du CMH-I, est considérée comme une molécule tolérogène très importante. En se liant à ses récepteurs ILT2 et KIR2DL4, tous deux inhibiteurs, HLA-G régule l'activité des cellules NK et favorise la

sécrétion de cytokines (IFN- γ , TNF- α , IL-1 β , IL-6 et IL-8) nécessaires à la grossesse par les cellules dNK (Li et al., 2009; Rajagopalan et al., 2006). Cette interaction serait essentielle dans la génération d'un phénotype de cellules dNK capables d'assurer le remodelage utérin. Toutefois, l'importance de KIR2DL4 dans ces phénomènes est encore sujette à controverse, son absence n'étant pas un signe d'infertilité (Gomez-Lozano et al., 2003; Nowak et al., 2011). Les EVT HLA-G⁺ expriment également des ligands de NKp46, NKp44 et NKp30 et l'interaction avec ces récepteurs induit la sécrétion de plusieurs facteurs solubles par les cellules dNK (Hanna et al., 2006). Le VEGF-C sécrété par les cellules dNK augmente le niveau d'oxygène au site de la placentation et donc la différenciation des trophoblastes via le facteur de réponse à l'hypoxie HIF-1 α (Chakraborty et al., 2011). L'IL-8 est connue pour augmenter la production de MMP-2 et MMP-9 par les EVT (De Oliveira et al., 2010; Jovanovic et al., 2010). Enfin, les cellules trophoblastiques peuvent réguler directement l'activité des cellules dNK en engageant NKG2A *via* l'expression de HLA-E (King et al., 2000).

Une autre interaction semble primordiale pour le bon déroulement de la grossesse. Les combinaisons KIR/HLA sont en effet associées à plusieurs pathologies de la grossesse, telles que la pré-éclampsie ou les retards de croissance intra-utérins. L'interaction KIR/HLA est supposée jouer un rôle très important dans la placentation et donc le succès de la grossesse. Les études génétiques indiquent ainsi que chez des femmes ayant des problèmes cliniques, la fréquence du génotype KIR A/A est plus élevée, en combinaison avec l'haplotype C2 chez le fœtus. Le risque est d'autant plus important de connaître des problèmes durant la grossesse que l'haplotype C2 présent à la surface des trophoblastes est dérivé du père (Hiby et al., 2010; Hiby et al., 2004).

3 Cellules dNK et pathologies de la grossesse

Des défauts de l'invasion de l'endomètre par les EVT conduisent à des pathologies de la grossesse parfois sévères, qui peuvent conduire à l'échec de la grossesse et à la mort de la mère. Le rôle essentiel des cellules dNK dans le contrôle de l'invasion trophoblastique en fait des candidates naturelles pour expliquer ces pathologies.

3.1 La pré-éclampsie

La pré-éclampsie est une cause majeure de mortalité et de morbidité périnatale et maternelle qui, lorsqu'elle n'est pas traitée, progresse vers l'éclampsie. Il s'agit d'une affection qui touche de 2 à 8% des grossesses (Duley, 2009). La pré-éclampsie se caractérise par une hypertension et une protéinurie, qui touche principalement l'utérus mais qui peut atteindre d'autres organes. Les causes du développement de la pré-éclampsie sont encore largement inconnues (Stegers et al., 2010). Les principaux phénomènes observés sont un défaut de placentation, avec une perfusion sanguine diminuée, et un remodelage vasculaire utérin diminué. La réduction du flot sanguin vers le fœtus peut conduire à des retards de croissance intra-utérins, et à la sécrétion de médiateurs pro-inflammatoires. Des études montrent une réduction du nombre des cellules dNK dans les grossesses pré-éclamptiques,

tandis que d'autres indiquent une augmentation de la population de cellules dNK lorsque la pré-éclampsie est associée à un retard de croissance intra-utérin (Eide et al., 2006; Wilczynski et al., 2003). Ces observations ne permettent pas de conclure clairement à une modification du nombre de cellules dNK, les différences observées peuvent provenir de la différence de sévérité de la pathologie, ou encore de stades de développement différents de l'affection. Des études génétiques ont établi un lien entre les haplotypes de récepteurs KIR maternels et les haplotypes HLA-C fœtaux (Hiby et al., 2010; Hiby et al., 2004). L'interaction entre les récepteurs NK et leurs ligands exprimés par les EVT semble être un facteur essentiel dans la bonne collaboration entre cellules dNK et EVT. Des modifications dans les interactions entre les deux types cellulaires peuvent modifier les fonctions des cellules dNK, influant sur la sécrétion des facteurs pro-angiogéniques et des chimiokines notamment, ce qui expliquerait les défauts d'invasion.

3.2 Les avortements spontanés à répétition

Les premières hypothèses formulées pour expliquer les avortements spontanés à répétition stipulaient une augmentation de la cytotoxicité des cellules NK utérines envers les cellules fœtales. Il a en effet été rapporté une augmentation du nombre de cellules eNK durant le cycle menstruel de femmes ayant connu plusieurs avortements spontanés. D'autres études rapportent une fréquence plus importante de la population $CD56^{dim} CD16^+$, population normalement minoritaire dans l'utérus (Lachapelle et al., 1996). Un fait notable chez les patientes est la formation précoce d'artères remodelées dans l'endomètre, ce qui augmente le flux sanguin au site d'implantation dès le début de la grossesse et donc une oxygénation importante (Quenby et al., 2009). Or le développement précoce du placenta se produit dans un environnement relativement hypoxique (Rodesch et al., 1992). Le niveau d'oxygène n'augmente qu'après le remodelage vasculaire, à la fin du premier trimestre. De hauts niveaux d'oxygène au début de la grossesse favoriseraient des stress oxydatifs au syncytiotrophoblaste (Hung et al., 2001). Les cellules dNK contrôlent les phases précoces du remodelage vasculaire, leur implication dans ce phénomène est donc plus que probable.

4 Fonction cytotoxique

La grossesse s'apparente à une greffe semi-allogénique. Les cellules trophoblastiques sont dérivées du placenta et expriment donc des antigènes fœtaux dérivés du père. Au niveau des interfaces foeto-maternelles, les trophoblastes sont en contact direct avec les cellules du système immunitaire maternel, dont les cellules dNK, qui représentent environ 70% des cellules immunes présentes localement. Les cellules NK sont des lymphocytes cytotoxiques et les cellules dNK expriment la perforine, les granzymes et la granulysine en grandes quantités. Et pourtant, le fœtus n'est pas rejeté et aucune cytotoxicité, qui serait néfaste pour le fœtus, n'est observée tout au long de la grossesse. Plusieurs études ont tenté de déterminer quels étaient les mécanismes mis en place pour éviter le déclenchement d'une réponse immunitaire, notamment d'une réponse dirigée par les cellules NK. Des

facteurs intrinsèques et extrinsèques aux cellules dNK ont ainsi été décrits pour expliquer la tolérance materno-fœtale.

4.1 Environnement de la *decidua basalis*

La grossesse est un état inflammatoire contrôlé. D'un point de vue immunologique, le fœtus peut être considéré comme une allogreffe. De nombreux points communs existent entre la grossesse et le développement de cancers : microenvironnement globalement immunosuppresseur, présence de cellules en développement très rapide, expression d'oncoantigènes, expression faible des molécules du CMH-I... En effet, les cellules fœtales expriment une combinaison unique de molécules du CMH-I : HLA-C, HLA-E et HLA-G. Le microenvironnement cytokinique doit lui aussi être contrôlé. Ainsi, la grossesse est considérée comme privilégiant un environnement pro-Th2. Toutefois, l'IFN- γ , cytokine de type Th1, est nécessaire au remodelage vasculaire utérin. Pour éviter d'être rejeté, le fœtus développe plusieurs mécanismes d'immunoévasion (Sargent et al., 2006).

4.2 Mécanismes de tolérance materno-fœtale (figure 33)

La réussite de la grossesse nécessite la mise en place de plusieurs mécanismes d'inhibition de la réponse immunitaire. La *decidua basalis*, où se côtoient des cellules immunes maternelles et des cellules fœtales est très riche en cellules immunitaires. Les cellules dNK constituent la majorité des cellules présentes (70%), suivies des macrophages (environ 20%), quelques lymphocytes T en proportion variable (environ 10%), des DC, des lymphocytes B et des cellules NKT. Les cellules de l'immunité adaptative sont donc très peu représentées durant la grossesse (Munoz-Suano et al., 2011). Plusieurs facteurs d'immunoévasion sont dévolus à la régulation de la réponse T. La sécrétion des chimiokines par les cellules stromales de la *decidua basalis* permet l'attraction de nombreux lymphocytes T. Toutefois, malgré l'expression de CXCL-9 et de CXCL-10, très peu de cellules T CXCR3⁺ sont retrouvées *in situ*, suggérant que leur recrutement est restreint (Mjosberg et al., 2010).

Le fœtus exprime des antigènes qui peuvent déclencher des réponses allogéniques. Chez la souris il a été démontré que les DC de la *decidua basalis* pouvaient capturer des antigènes fœtaux, acquérir un phénotype de DC matures, mais qu'elles ne modifient pas leur expression de récepteurs aux chimiokines (Collins et al., 2009). Ce dont résulte une incapacité à migrer vers les ganglions drainants l'utérus, empêchant ainsi le déclenchement d'une réponse T. De plus, il n'y a pas de lymphangiogénèse dans l'utérus murin. Chez l'Homme, de nouveaux vaisseaux lymphatiques sont formés durant la grossesse, mais à ce jour, il n'existe aucune preuve que ces vaisseaux permettent aux DC déciduales de migrer vers les nœuds lymphatiques (Bockle et al., 2008).

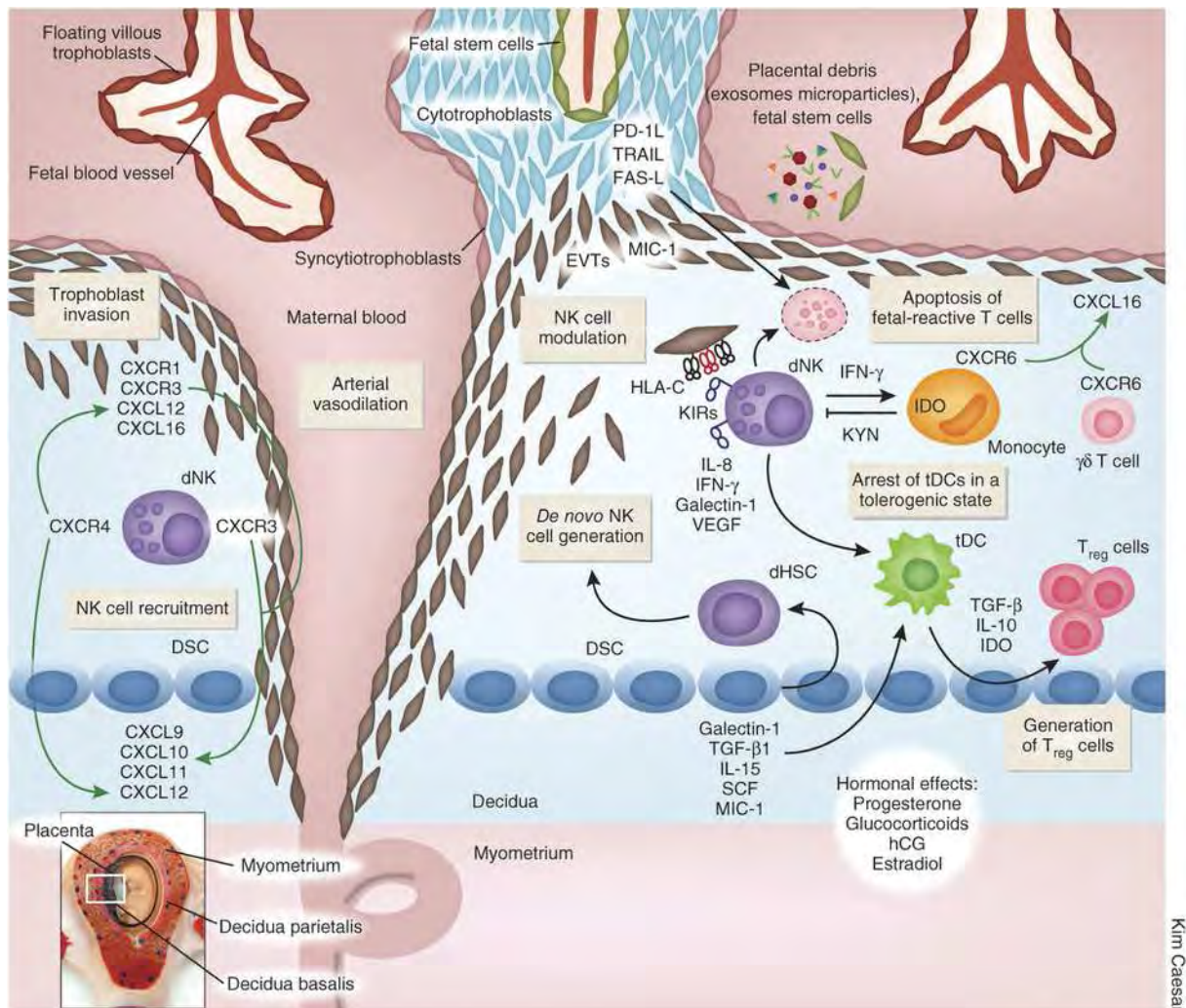


Figure 33 : Schéma des différents mécanismes immunosuppresseurs mis en place dans la decidua basalis au cours de la grossesse. L'immunosuppression permet au système immunitaire maternel de ne pas rejeter le fœtus en développement (Arck and Hecher, 2013).

En périphérie, des débris cellulaires, des microparticules et des exosomes dérivés du placenta circulent dans le sang de la mère et peuvent être capturés par des APC (Erlebacher et al., 2007). Toutefois, cela n'a pas de conséquences sur le devenir de la grossesse. Des LT peuvent malgré tout être activés et migrer vers l'utérus gestant. Afin d'éviter une réponse immune contre le fœtus, plusieurs voies sont mises en place. Les cellules trophoblastiques expriment ainsi PD-1 (Programmed Death 1) et CD95L (FasL) à leur surface (Nagamatsu et al., 2009; Runic et al., 1996). En liant leur récepteur respectif PD-1L et Fas à la surface des lymphocytes activés, les trophoblastes vont permettre la mort par apoptose des cellules effectrices qui migrent vers l'utérus. Les cellules NK peuvent également être concernées par ces protéines. Enfin, les cellules dNK sécrètent de la galectine 1, qui provoque la mort des LT (Kopcow et al., 2008). Ces voies permettent la délétion clonale de LT spécifiques d'antigènes fœtaux.

Il existe également un autre mécanisme qui permet d'empêcher la prolifération de LT alloréactifs, et qui favorise également la maintenance d'un micro-environnement pro-Th2. Les trophoblastes, les monocytes et les DC sécrètent de l'IDO (Indoléamine-2,3-Dioxygénase) en réponse à l'IFN- γ produit par les cellules dNK notamment (von Rango et al., 2007). L'IDO empêche la prolifération des cellules immunitaires en déplaçant le milieu en tryptophane, un acide aminé non-essentiels. L'un des produits de dégradation du tryptophane, la kynurénine est de plus toxique pour les LT, principalement les Th1 (Harden and Egilmez, 2012). Les DC produisent également de l'IL-10 et du TGF- β , deux cytokines immunosuppressives.

Parmi les LT présents, qu'ils soient CD4⁺ ou CD8⁺, la proportion de LT régulateurs est plus importante que ce qui est observé en périphérie. Alors qu'environ 5% des LT du sang circulants sont considérés comme des LT régulateurs, leur proportion dans la *decidua basalis* est d'environ 15% (Aluvihare et al., 2004). Il a été observé une migration des LT régulateurs spécifiques d'antigènes fœtaux vers la *decidua basalis* chez l'Homme (Tilburgs et al., 2008). Chez la souris, la déplétion des LT régulateurs aboutit au rejet du fœtus. De plus, les fortes concentrations de TGF- β et d'IL-10 dans la *decidua basalis* sont propices à la génération de LT régulateurs induits (Vacca et al., 2010). Il a récemment été décrit chez la souris que les LT régulateurs induits étaient les cellules régulatrices majoritaires dans la mise en place de tolérance envers le fœtus, puisque chez des souris incapables de générer cette population il y a rejet du fœtus (Samstein et al., 2012).

La présence de LT régulateurs CD8⁺ pourrait permettre le contrôle de la réponse B (Tilburgs et al., 2006). Il y a très peu de LB dans la *decidua basalis*. Il a de plus été observé une délétion des lymphocytes B spécifiques d'antigènes fœtaux dans la moelle osseuse des souris (Medina et al., 1993). La proportion de cellules NKT parmi les LT, qui ont des propriétés immunorégulatrices, est également plus importante dans la *decidua* que dans le sang périphérique (Boyson et al., 2002). L'immunité innée est également contrôlée durant la grossesse. Les facteurs du complément qui peuvent reconnaître des cellules recouvertes d'anticorps, sont inhibés, notamment par l'expression de CD59 (Holmes et al., 1992).

3.3 Mécanismes d'inhibition de l'activité cytotoxique des cellules dNK

Les cellules dNK constituent la population de cellules immunitaires la plus importantes durant le premier trimestre de la grossesse. De par leur nombre et leur capacité cytotoxique, elles représentent un danger pour le fœtus. Pourtant, ces cellules qui sont en permanence au contact des cellules trophoblastiques semi-allogéniques n'exercent pas d'activité cytolytique *in vivo*. Plusieurs explications ont été proposées pour comprendre l'absence d'activité cytotoxique contre les cellules fœtales. Il a été proposé que les cellules dNK n'étaient pas cytotoxiques envers les cellules trophoblastiques car incapable de polariser la machinerie lytique à la synapse immunologique formée avec une cellule cible. Cette incapacité pourrait provenir de l'absence d'expression d'une protéine de signalisation ou

d'un adaptateur pour la polarisation des granules lytiques, puisque la stimulation au préalable des cellules dNK avec de l'IL-15 restaure leur potentiel cytotoxique (Kopcow et al., 2005).

Des facteurs solubles interviennent également dans le contrôle de la réponse des cellules dNK. Les cellules dNK sécrètent du VEGF-C en grandes quantités, un facteur pro-angiogénique, qui a également la capacité d'augmenter l'expression du transporteur TAP, qui intervient dans la voie de présentation des antigènes par le CMH-I. L'augmentation de l'expression de TAP permet l'augmentation des molécules du CMH-I à la surface des cellules qui expriment le récepteur au VEGF-C. Le CMH-I permet ensuite l'inhibition de l'activation des cellules dNK en engageant les récepteurs inhibiteurs (Kalkunte et al., 2009).

Il a été observé que les cellules dNK n'expriment pas l'adaptateur de signalisation activatrice, SAP, qui intervient notamment après engagement de 2B4. L'absence de SAP induirait une signalisation inhibitrice suite à 2B4 est engagé par son ligand, exprimé à la fois par les cellules stromales et les cellules immunitaires de la *decidua basalis* (Vacca et al., 2006). Les trophoblastes sont des cellules résistantes à la lyse dirigée par les cellules NK. Ils expriment notamment des inhibiteurs d'apoptose, comme XIAP, ou encore des serpinines, qui inhibent l'activité des granzymes (Hirst et al., 2001; Straszewski-Chavez et al., 2004). Les trophoblastes sont responsables pour partie de l'« absence » de lyse.

Des études plus récentes ont permis de démontrer par des tests de lyse redirigée que les cellules dNK ont bien un potentiel cytotoxique. Toutefois, ce potentiel cytotoxique n'est pas contrôlé par les mêmes récepteurs que ceux impliqués dans la cytotoxicité des cellules NK du sang périphérique. Ainsi l'engagement de NKp46 et de NKG2C peut mobiliser la machinerie lytique et induire la dégranulation des cellules dNK. En revanche l'engagement de NKp30 n'induit pas de lyse des cellules. De plus, le co-engagement de NKG2A avec chacun des récepteurs activateurs inhibe les signalisations activatrices. Le ligand physiologique de NKG2A, HLA-E, est constitutivement exprimé par les cellules trophoblastiques. Les signalisations inhibitrices dominantes maintiendraient donc les cellules dNK dans un état non-cytolytique (El Costa et al., 2008). Ces études suggèrent que dans les conditions physiologiques, le potentiel cytolytique des cellules dNK semble donc étroitement contrôlé. Lors d'une grossesse normale, la balance entre signaux activateurs et inhibiteurs pencherait en faveur des signaux inhibiteurs. Des perturbations de cette balance pourraient toutefois modifier l'équilibre nécessaire au bon déroulement de la grossesse, ou au moins au contrôle de l'activité cytolytique, qui est potentiellement dangereuse pour le fœtus. Des déséquilibres de cette sorte pourraient se rencontrer lors d'infections congénitales, au cours desquelles des ligands des récepteurs activateurs peuvent être exprimés en plus grand nombre, ou encore lorsque les molécules du CMH-I sont diminuées, mécanisme courant d'immunoévasion utilisé par différents pathogènes.

5 La placentation chez la souris et d'autres mammifères

Il n'existe pas de modèle animaux qui reproduisent les différentes étapes de placentation et d'établissement de la grossesse, tels qu'observé chez l'Homme. Chez les rongeurs, la placentation est dite hémochoriale, comme chez l'Homme, mais des différences importantes empêchent d'appliquer les observations murines à l'Homme. Ainsi, la *decidua basalis* n'est formée qu'après implantation de l'embryon, et uniquement au site de placentation, alors que chez l'Homme, la transformation de l'endomètre s'opère à chaque cycle menstruel et dans tout l'utérus. De même, l'invasion trophoblastique de la paroi utérine est bien moins importante et ne nécessite pas l'aide des cellules NK déciduales, bien que des contacts existent entre les deux populations cellulaires. La localisation même de ces cellules diffère (Georgiades et al., 2002), les cellules NK déciduales infiltrant les artères chez la souris, où leur fonction principale est de participer à la destruction des parois vasculaires et au remodelage du réseau sanguin, indépendamment de la présence de trophoblastes fœtaux. La fonction même des cellules NK déciduales chez la souris n'est pas encore clairement établie. Ainsi, elles ne sont présentes en nombre important qu'aux jours 8 à 10 de la gestation. Puis leur nombre décroît et elles disparaissent quasiment de la *decidua basalis*, pour aller se localiser dans le triangle mésométrial, formé par les deux membranes du myomètre, à distance des cellules fœtales (Moffett and Loke, 2006). Il est possible qu'elles participent à la régulation du flux sanguin vers le fœtus. Enfin, bien que des problèmes puissent être observés chez la souris, notamment au niveau du nombre de fœtus chez la femelle gestante, ou au niveau de la taille des embryons, les souris déficientes en cellules NK sont fertiles. Les différences majeures sont observées au niveau du réseau vasculaire utérin, qui garde ses caractéristiques de réseau utérin en conditions non gestantes (Croy et al., 2002).

La placentation a été étudiée chez d'autres animaux. Ainsi, la grossesse chez le cochon d'Inde se rapproche-t-elle de ce qui est observé chez l'Homme au niveau de l'invasion trophoblastique. Chez le singe Rhésus, l'invasion trophoblastique est également importante, même si elle n'atteint pas le myomètre, mais le remodelage du réseau vasculaire utérin est moins marqué (Blankenship and Enders, 2003). Le meilleur moyen d'analyser la placentation humaine reste encore la xénogreffe, chaque espèce ayant une placentation qui lui est propre, et qui bien que donnant des indications, ne permet pas de conclure avec certitudes sur les mécanismes propres à une espèce.

IV Infections congénitales, Cytomegalovirus et cellules Natural Killer déciduales

A Infections congénitales

Une infection congénitale est une infection qui résulte de la transmission d'un agent pathogène, virus, bactérie ou parasite, de la mère enceinte au fœtus et qui persiste après la naissance. La transmission peut se produire avant la naissance (*in utero*) ou au moment de l'accouchement. Certaines infections congénitales peuvent avoir de graves conséquences pour le développement de l'enfant *in utero* ou sur sa santé après sa naissance.

1 Toxoplasmose congénitale

La transmission de *Toxoplasma gondii* résulte généralement d'une primo-infection de la mère durant la grossesse, la mère n'ayant pas développé d'immunité protectrice contre le parasite. Le taux de transmission est d'environ 20-33% chez les personnes nouvellement infectées. Ce taux varie selon le trimestre de la grossesse au cours duquel la mère contracte l'infection (6% lors du premier trimestre) (Montoya and Remington, 2008). Toutefois, les pathologies les plus graves sont observées chez les fœtus qui l'acquièrent très tôt. La transmission de *T. gondii* peut aboutir à la mort fœtale et un avortement, ou à des syndromes neurologiques, des déficits neurocognitifs et des chorioretinites (Jones et al., 2001).

2 Malaria congénitale

Durant la grossesse, l'agent responsable de la malaria, *Plasmodium falciparum*, est présent dans les érythrocytes qu'il infecte au niveau de l'espace intervilloux, dans lequel baignent les villosités chorioniques. Les traitements actuels et le développement de programmes nationaux pour contrôler le vecteur font que la transmission materno-fœtale est en constante réduction. Mais contrairement à d'autres pathogènes, il est possible que le parasite se transmette à chaque nouvelle grossesse. La transmission du parasite peut aboutir à l'arrêt de la grossesse, des accouchements prématurés et des retards de croissance intra-utérins (Ouedraogo et al., 2012).

3 Rubéole congénitale

La rubéole est une infection généralement bénigne chez les enfants, mais qui peut entraîner des complications plus sévères chez l'adulte. Chez la femme enceinte, une primo-infection aboutit dans 80% à un passage trans-placentaire et peut causer une infection persistante chez l'enfant (Enders et al., 2011). Le risque pour le fœtus est plus grave lorsque la transmission se fait durant les 12 premières semaines de la grossesse. Dans 20% des cas, le passage au fœtus entraîne des fausses couches (Best, 2007).

B Infections congénitales par le Cytomegalovirus

Le Cytomégalovirus Humain (HCMV) est l'une des causes majeures d'infections congénitales à travers le monde, avec une prévalence d'environ 0.64% (Dollard et al., 2007). Il affecte plus d'enfants que nombre d'autres syndromes, tels que le syndrome de Down. La séroconversion durant la grossesse se produit dans 1 à 4% des cas chez les femmes séronégatives (Cannon and Davis, 2005). La transmission au fœtus se produit dans les cas de primo-infection maternelle, de réactivation du virus, ou lors d'une surinfection par une autre souche du HCMV. Sinon, le système immunitaire maternel assure une protection contre la transmission intra-utérine.

1 Le Cytomegalovirus humain

Le Cytomegalovirus Humain (HCMV) ou HHV5 (Human HerpesVirus 5) est un β -herpesvirus, restreint à l'être humain (Figure 34). Son génome est composé d'environ 230 kb d'ADN double brin linéaire, enveloppé d'une matrice protéique (tégument). Il contient environ 160 cadres ouverts de lecture (Mocarski Jr, 2007). Le génome viral est contenu dans une double membrane lipidique où sont présentes des glycoprotéines virales. Son génome est composé de deux chromosomes, un long et un court. Les protéines issues du brin long sont appelées UL et celles du brin court US. La séroprévalence varie dans les pays développés de 30% à 70%, et peut monter jusqu'à 100% dans les pays en voie de développement (Pass, 1985).

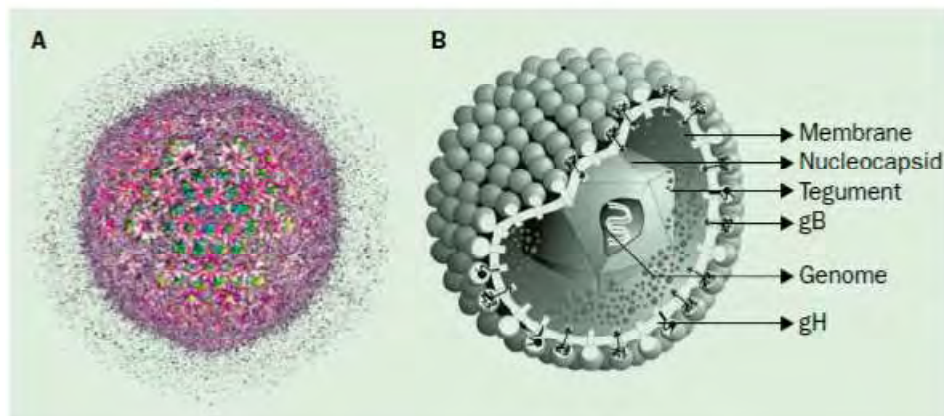


Figure 34 : Représentations du Cytomégalovirus Humain (HCMV). A) Reconstruction tridimensionnelle d'une particule du HCMV. B) Modèle virtuel de la particule virale, montrant les différents composants du virus (Gandhi and Khanna, 2004)

Après l'infection, le HCMV peut établir une infection persistante durant toute la vie de l'hôte, dans lequel les cellules myéloïdes constituent un important réservoir viral (Taylor-Wiedeman et al., 1991). La permissivité des cellules myéloïdes à un cycle lytique complet dépend de leur état de maturation. Par exemple les monocytes ne sont pas permissifs, mais les macrophages et les cellules dendritiques immatures le sont (Senechal et al., 2004). L'infection lytique ou productive dépend d'une

série d'évènements coordonnés qui conduisent à la synthèse des protéines IE (Immediate Early), E (Early) et L (Late).

Le HCMV se transmet par les fluides corporels (salive, sécrétions vaginales, sperme, lait maternel, transfusion sanguine), ou lors de greffes d'organes solides ou de moelle osseuse. L'infection d'hôtes immunocompétents est généralement asymptomatique, et les cas de pathologies associées au HCMV chez des adultes sains sont rares. Elles peuvent inclure une mononucléose, de l'arthrite, une colite ou encore une hépatite (Sissons et al., 2002). La mise en place d'une immunité protectrice prévient généralement des complications et restreint la réplication virale. En revanche chez des hôtes immunodéprimés, comme les patients greffés, la faible réponse immunitaire peut conduire à une réplication incontrôlée et à de sérieuses complications. Si le greffon est infecté, les dommages tissulaires se produisent généralement dans ce tissu, et conduisent à une inflammation qui aboutit à l'échec de la greffe (Evans et al., 2000). De ce fait, le HCMV continue d'être une cause majeure de morbidité dans les pays développés.

2 Pathologies associées à l'infection congénitale par le HCMV

Le HCMV est surtout responsable de pathologie lorsqu'il se transmet durant la grossesse. Le suivi d'enfants asymptomatiques à la naissance indique qu'environ 15% des cas finissent par développer des défauts auditifs ou des séquelles neurodéveloppementales. De 5 à 10% des cas d'infection congénitale conduisent à des défauts irréversibles touchant le système nerveux central. Le HCMV est ainsi responsable de microcéphalies, d'encéphalites, de surdités dans les cas d'atteintes des neurones moteurs, de retards psychomoteurs, et plus rarement de myopathies et de chorioretinites. D'autres signes cliniques peuvent apparaître, tels que des retards de croissance intra-utérins, une hépatosplénomégalie, une thrombocytopénie ou encore une hépatite. A plus long terme, environ 80% des enfants infectés finissent par montrer des atteintes neurologiques et des dysfonctions organiques qui conduisent dans environ 20% des cas à la mort du patient. Les symptômes les plus graves sont observés lorsque la transmission a lieu au cours du premier trimestre de la grossesse (Whitley, 2004). Le virus peut aussi être transmis au moment de la naissance, mais l'infection périnatale est généralement asymptomatique. Quelques cas montrent des symptômes légers d'hépatosplénomégalie, de lymphadénopathie, d'hépatite ou de pneumonie, mais aucun signe de troubles neurologiques. L'infection congénitale par le HCMV reste une problématique majeure car aucun traitement ne peut être administré à la femme enceinte sans avoir des effets néfastes sur le fœtus en développement (Gandhi and Khanna, 2004).

3 Réponse immune fœtale contre le HCMV

Le système immunitaire du fœtus et des nouveaux nés est considéré comme immature et incapable de protéger l'organisme contre des infections virales. Il a notamment été rapporté un biais de production de cytokines vers un profil de type Th2, défaut attribué aux cellules présentatrices

d'antigènes (Levy, 2007). Toutefois, bien qu'en développement, le système immunitaire fœtal est composé de cellules T ($\alpha\beta$ et $\gamma\delta$), connues pour intervenir dans les réponses immunes anti-HCMV (Li et al., 1994) ; (Dechanet et al., 1999). Des études démontrent ainsi que le HCMV peut déclencher des réponses immunitaires T fœtales *in utero* (Marchant et al., 2003) (Vermijlen et al., 2010).

C Implications des cellules Natural Killer déciduales dans les infections congénitales ?

Les cellules dNK représentent la population immunitaire majoritaire dans la *decidua basalis*. Leur rôle est principalement dévolu à créer un environnement favorable au bon devenir de la grossesse, en assistant les EVT dans le remodelage vasculaire utérin (Wallace et al., 2012). Du fait de l'absence de cytotoxicité observée dans des expériences *in vitro* face à des cibles classiques (Kopcow et al., 2005), l'implication des cellules dNK dans la protection du fœtus contre des infections congénitales n'a jamais été étudiée. Pourtant ces cellules expriment tous les médiateurs lytiques (perforine, granzymes et granulysine) et l'engagement spécifique de certains récepteurs activateurs avec un anticorps monoclonal démontre que les cellules dNK peuvent exercer une activité lytique (El Costa et al., 2008; Koopman et al., 2003).

Toutefois quelques observations tendent à laisser penser que les cellules dNK joueraient un rôle dans une réponse immunitaire au niveau de la *decidua basalis*. Ainsi, des analyses histologiques montrent que les cellules dNK sont HLA-DR⁺, indicateur d'une activité lytique, ou au moins d'un engagement de certains récepteurs activateurs par des ligands autres que physiologiques (Hanna et al., 2004). Enfin, certains mécanismes d'immunoévasion utilisés par le HCMV pour échapper à la réponse des cellules NK sont retrouvés dans la *decidua basalis* (Markel et al., 2002). Il est à noter que bien que les infections les plus graves sont celles qui touchent le fœtus durant le premier trimestre, le taux de transmission est plus élevé en fin de grossesse. Ce qui est inversement corrélé au nombre de cellules dNK, qui est plus élevé au début de la grossesse (Enders et al., 2011).

Les cellules NK sont des cellules très importantes dans l'immunité anti-Herpesvirus. Etant donné l'abondance des cellules dNK dans la *decidua basalis*, et leur potentiel cytotoxique, nous avons émis l'hypothèse que ces cellules interviennent dans le contrôle des infections congénitales et dans la protection du fœtus.

Objectifs

Objectifs

Les cellules dNK constituent la population immunitaire majoritaire dans la *decidua basalis*. De plus, bien qu'il y ait un contrôle très strict de leurs fonctions, notamment de leur fonction cytotoxique, les cellules dNK expriment fortement les molécules lytiques telles que la perforine et les granzymes. En tant qu'effecteur majeur de la réponse cellulaire innée, les cellules NK constituent la première ligne de défense contre les infections virales. Le fait que la transmission *in utero* de pathogènes se produise surtout dans le troisième trimestre de la grossesse laisse penser que dans certaines conditions les signaux inhibiteurs ne seraient plus dominants et les cellules dNK pourraient alors exercer leur fonction cytotoxique pour empêcher la transmission des pathogènes au fœtus. A ce jour, aucune étude n'a été réalisée avec des cellules dNK fraîchement isolées en condition d'infection. Les objectifs de la première partie de la thèse étaient donc les suivants :

- 1) Les cellules dNK sont considérées comme incapables de polariser la perforine à la zone de contact avec une cellule cible, ou encore d'exercer une activité cytotoxique contre des cibles classiques de cellules NK. Toutefois, aucune étude n'a été effectuée avec des cellules dNK fraîchement isolées au contact de cellules autologues infectées ou non. Des cocultures de ce type pourraient fournir des signaux qui sont absents lors de tests avec d'autres cibles, ce qui pourrait expliquer les phénomènes observés. Nous avons donc voulu déterminer si, au contact de cellules stromales de la decidua infectées par le HCMV, les cellules dNK mobilisaient leur machinerie lytique à la synapse immunologique formée avec une cellule cible infectée et exerçaient une activité cytotoxique.
- 2) Le potentiel cytotoxique des cellules dNK est parfaitement contrôlé au cours d'une grossesse normale, afin d'éviter des dommages au fœtus. Toutefois, l'infection de cellules saines par un pathogène entraîne des modifications dans l'expression des protéines de surface, notamment des molécules HLA de classe I, ligands des récepteurs inhibiteurs des cellules dNK. L'objectif suivant était donc de déterminer les mécanismes qui gouvernent la levée de l'inhibition de la fonction cytotoxique des cellules dNK, notamment par identification des couples récepteurs/ligands qui interviennent dans les interactions avec les cellules stromales déciduales infectées par le HCMV.
- 3) L'activation des cellules NK et la réponse à un pathogène entraîne des modifications phénotypiques des cellules effectrices. Nous avons voulu analyser les modifications phénotypiques associées aux modifications de fonctions des cellules dNK lors d'une réponse au HCMV.
- 4) La fonction principale des cellules dNK en condition physiologique est de sécréter de grandes quantités de chimiokines et de facteurs de croissance, qui aident à l'implantation embryonnaire. Lorsque les cellules NK du sang répondent à une infection, elles sécrètent des cytokines pro-inflammatoires qui aident au recrutement et à l'activation des autres populations immunitaires. Le dernier objectif était donc de déterminer si le contact des cellules dNK avec des cellules stromales déciduales infectées par le HCMV modifiait le profil de cytokines et de chimiokines sécrétées.

Ce premier travail nous a permis de mettre en évidence des modifications phénotypique et fonctionnelle des cellules dNK lorsque ces cellules sont placées dans des conditions d'infection.

Les résultats que nous avons obtenus au cours de ce travail, ainsi que d'autres données de la bibliographie indiquent des différences dans les fonctions induites après engagement de certains récepteurs activateurs entre les cellules dNK et pNK. Ainsi, l'engagement de NKp30 n'induit pas la polarisation de la perforine, ni le déclenchement d'une activité cytotoxique. De même, dans notre étude, le blocage de l'interaction entre NKp44 et son/ses ligand(s) exprimé(s) par des fibroblastes de décidua infectés par le HCMV montre une augmentation de l'activité cytotoxique des cellules dNK. Ce qui peut indiquer que NKp44 agisse comme récepteur inhibiteur de l'activité des cellules dNK.

Les gènes qui codent les NCR peuvent donner lieu à plusieurs transcrits, qui comportent un nombre d'exons différents. Ainsi, certains transcrits de NKp44 ont un exon supplémentaire qui code pour une portion intracellulaire. Cette partie intracellulaire contient un motif ITIM qui peut être phosphorylé dans certains cas et aboutir à une inhibition des fonctions cytotoxiques des cellules NK. La deuxième partie de mon travail de thèse a donc consisté à analyser l'expression des transcrits des NCR dans les cellules dNK et pNK et leur impact sur la fonction des deux types cellulaires. Les objectifs de ce deuxième travail sont les suivants :

- 1) Les différences de fonctions peuvent s'expliquer par une différence dans l'expression des transcrits de NKp30 et NKp44 entre cellules dNK et pNK. Le premier objectif de ce travail est d'analyser dans quelles proportions les transcrits de ces récepteurs sont retrouvés dans les deux types cellulaires, et s'il y a des transcrits « favorisés ».
- 2) Le second objectif de ce travail est déterminer les mécanismes par lesquels les cellules dNK et pNK « favorisent » l'expression de certains transcrits par rapport à d'autres. Les cellules dNK et pNK évoluent dans des environnements différents. L'hypothèse formulée est que le microenvironnement particulier de l'utérus gestant, notamment l'environnement cytokinique, jouerait un rôle sur l'expression des transcrits.
- 3) L'expression différentielle de transcrits des NCR pourrait moduler la fonction des cellules NK. Le dernier objectif est d'étudier l'impact de la modulation de l'expression des isoformes des NCR sur les fonctions cytotoxiques et cytokiniques des cellules pNK.

Durant la seconde partie de ma thèse, nous avons pu montrer que les cellules dNK et pNK expriment différemment les transcrits de NKp30 et NKp44. Les cellules dNK expriment davantage les isoformes inhibitrices de ces récepteurs. Enfin, nous avons pu montrer que l'environnement cytokinique particulier de l'utérus gestant influe sur cette expression, et donc sur la fonction des cellules NK.

Résultats

Article 1:

Human Cytomegalovirus Infection Elicits New Decidual Natural Killer Cell Effector Functions

Johan Siewiera, Hicham El Costa, Julie Tabiasco, Alain Berrebi, Géraldine Cartron, Philippe Le Bouteiller, Nabila Jabrane-Ferrat

Plos Pathogens 2013;9(4):e1003257.

Introduction

Le rôle des cellules NK du sang périphérique dans le contrôle des infections virales, notamment la réponse anti-CytomégaloVirus Humain (HCMV), est clairement établi (Biron et al., 1989; Orange, 2002). Le HCMV est un virus généralement asymptomatique chez les hôtes immunocompétents. Mais il peut provoquer des troubles importants en cas de réactivation chez des personnes immunodéprimées ou dans les cas de transmissions au fœtus *in utero*. Pourtant, le taux de transmission au fœtus est relativement faible durant le premier trimestre de la grossesse. Peu de données sont disponibles pour expliquer la relative protection apportée au fœtus au cours du premier trimestre de la grossesse.

Le premier trimestre de la grossesse est marqué par une accumulation importante de cellules immunes maternelles dans la *decidua basalis*, le lieu d'implantation embryonnaire. Les cellules Natural Killer déciduales (dNK) représentent 70% des leucocytes présents. Leur rôle dans l'implantation fœtale et le remodelage vasculaire utérin est bien connu. En revanche, l'implication des cellules dNK dans des réponses immunes protectrices n'a pas été élucidée.

Le potentiel cytotoxique des cellules dNK apparaît très bien contrôlé durant la grossesse, pour éviter des dommages aux cellules trophoblastiques d'origine fœtale. Des études ont ainsi démontré que les cellules dNK sont incapables de polariser leur centre organisateur de microtubules suite à la reconnaissance d'une cellule cible (Kopcow et al., 2005), ce qui empêche le relargage des granules lytiques. Le VEGF-C sécrété en grandes quantités par les cellules dNK augmente l'expression des molécules du CMH-I par les cellules stromales de la décidua, ce qui favorise l'interaction avec les récepteurs inhibiteurs des cellules dNK (Kalkunte et al., 2009).

Toutefois, une étude a démontré que des cellules dNK fraîchement isolées et stimulées *via* le récepteur activateur NKp46 ont la capacité de mobiliser leur machinerie lytique et de déclencher une réponse cytotoxique. Cette capacité semble parfaitement contrôlée par l'engagement du récepteur inhibiteur NKG2A par son ligand HLA-E, exprimé par les cellules stromales déciduales ainsi que par les cellules trophoblastiques (El Costa et al., 2008). Dans des conditions physiopathologiques, les

cellules dNK recevraient des signaux activateurs suffisamment forts pour lever l'inhibition de leur fonction cytotoxique.

Nous avons choisi de tester cette hypothèse dans le cas d'une infection par le HCMV, qui pose problème si la séroconversion de la mère se produit durant la grossesse. Pour cela, nous avons développé un modèle d'infection *in vitro* de cellules déciduales et nous avons analysé les différentes étapes aboutissant au déclenchement d'une réponse cytotoxique des cellules dNK provenant des mêmes donneurs. Nous avons ainsi démontré pour la première fois que suite à la reconnaissance d'une cible autologue infectée par le HCMV, les cellules dNK sont capables de mobiliser leur machinerie lytique, de dégranuler et d'induire la lyse des cellules cibles infectées. Le déclenchement de l'activité cytotoxique en réponse à l'infection par le HCMV dépend de l'engagement des récepteurs activateurs NKG2D et NKG2C/E par leurs ligands respectifs qui sont modulés par l'infection. La levée de l'inhibition de l'activité cytotoxique est accompagnée de modifications importantes du profil sécrétoire des cellules dNK.

Pour valider ces observations, nous avons développé un modèle de placenta infectés par le HCMV. Dans ce modèle de culture d'explants de villosités chorioniques humaines du premier trimestre de grossesse, nous avons montré que les cellules dNK sont capables d'infiltrer *in vitro* les tissus fœtaux infectés, dont elles sont normalement exclues. Nous avons ensuite utilisés des placentas issus d'interruption médicalisée de grossesse pour cause d'infection par le HCMV. L'analyse en immunohistologie a révélé la présence de cellules CD56 positives à proximité des cellules infectées. L'ensemble de ces travaux suggère qu'*in utero* les cellules dNK pourraient apporter une protection au fœtus en cas d'infection de la mère par un pathogène.

Human Cytomegalovirus Infection Elicits New Decidual Natural Killer Cell Effector Functions

Johan Siewiera^{1,2,3}, Hicham El Costa^{1,2,3}, Julie Tabiasco^{1,2,3}, Alain Berrebi⁴, Géraldine Cartron⁴, Philippe Bouteiller^{1,2,3}, Nabila Jabrane-Ferrat^{1,2,3*}

1 Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale; UMR 1043, Toulouse, France, **2** Centre National Recherche Scientifique; UMR 5282, Toulouse, France, **3** Université Toulouse III Paul Sabatier, Toulouse, France, **4** Service de Gynécologie-Obstétrique, Centre Hospitalo-Universitaire de Toulouse, Hôpital Paule de Viguier, Toulouse, France

Abstract

During the first trimester of pregnancy the uterus is massively infiltrated by decidual natural killer cells (dNK). These cells are not killers, but they rather provide a microenvironment that is propitious to healthy placentation. Human cytomegalovirus (HCMV) is the most common cause of intrauterine viral infections and a known cause of severe birth defects or fetal death. The rate of HCMV congenital infection is often low in the first trimester of pregnancy. The mechanisms controlling HCMV spreading during pregnancy are not yet fully revealed, but evidence indicating that the innate immune system plays a role in controlling HCMV infection in healthy adults exists. In this study, we investigated whether dNK cells could be involved in controlling viral spreading and in protecting the fetus against congenital HCMV infection. We found that freshly isolated dNK cells acquire major functional and phenotypic changes when they are exposed to HCMV-infected decidual autologous fibroblasts. Functional studies revealed that dNK cells, which are mainly cytokines and chemokines producers during normal pregnancy, become cytotoxic effectors upon their exposure to HCMV-infected autologous decidual fibroblasts. Both the NKG2D and the CD94/NKG2C or 2E activating receptors are involved in the acquired cytotoxic function. Moreover, we demonstrate that CD56^{Pos} dNK cells are able to infiltrate HCMV-infected trophoblast organ culture *ex-vivo* and to co-localize with infected cells *in situ* in HCMV-infected placenta. Taken together, our results present the first evidence suggesting the involvement of dNK cells in controlling HCMV intrauterine infection and provide insights into the mechanisms through which these cells may operate to limit the spreading of viral infection to fetal tissues.

Citation: Siewiera J, El Costa H, Tabiasco J, Berrebi A, Cartron G, et al. (2013) Human Cytomegalovirus Infection Elicits New Decidual Natural Killer Cell Effector Functions. *PLoS Pathog* 9(4): e1003257. doi:10.1371/journal.ppat.1003257

Editor: Stipan Jonjic, University of Rijeka, Croatia

Received: April 5, 2012; **Accepted:** February 5, 2013; **Published:** April 4, 2013

Copyright: © 2013 Siewiera et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Funding: JS is supported by a PhD Fellowship from the French Ministère de l'Éducation Nationale de la Recherche et de la Technologie. Financial support was provided by INSERM, CNRS and Toulouse University. 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.

* E-mail: nabila.jabrane-ferrat@inserm.fr

Introduction

Human cytomegalovirus (HCMV) infection is mostly asymptomatic in healthy adults and results in the establishment of long term latency. On the contrary, life threatening diseases may occur in immunocompromised patients after viral reactivation or primary HCMV infections. HCMV is the most common cause of intra-uterine viral infections and a leading cause of congenital infection [1,2]. Even though maternal-fetal transmission is not systematic [3], the prevalence of HCMV transmission is about 30% in the first trimester of pregnancy and can reach up to 72% in the third trimester [4]. It is believed that the first steps of infection and amplification take place in the *decidua* where both maternal and fetal cells are in close contact [5].

Human placentation is associated with a large increase of decidual NK cells (dNK). During the first trimester of pregnancy, dNK cells are the major population of maternal immune cells as they count for 70% of total immune cells present in the *decidua* in the first trimester of pregnancy [6,7], whereas other immune cells, macrophages, T cells (including CD8, CD4 and $\gamma\delta$ T cells) and dendritic cells count for 20, 10 and 2% respectively. The role of

dNK cells during pregnancy is not yet fully understood. Their contribution to successful placentation versus their potential ability to exert cytotoxicity remains a major paradox [8,9]. By secreting a unique profile of cytokines/chemokines and angiogenic factors, dNK cells are thought to be crucial for successful placentation and materno-fetal immune tolerance [9–15]. dNK cells exhibit different phenotypic and functional characteristics from other peripheral blood NK cells (pNK). The majority of dNK cells are CD56^{bright}CD16^{neg} and they express a repertoire of activating and inhibitory receptors (NKR) that resembles that of early differentiation stages of pNK cells [9,16–19]. The lack of dNK cell cytotoxicity has been attributed to defects in the formation of the immunological synapse and/or failure of 2B4 receptor to convey activating signals [8,20,21].

In contrast to the clearly defined role of human and mouse pNK cells in controlling viral infections [22–31], little is known about the ability of dNK cells to control viral infections during pregnancy [17,32,33]. dNK cells represent the major decidual lymphoid population in the first trimester of pregnancy [7,6] and vertical transmission of HCMV to the fetus is quite low during this trimester, therefore it is conceivable that dNK cells might be

Author Summary

Human cytomegalovirus (HCMV) is a herpes virus that can establish persisting infection in immunocompetent hosts. HCMV primary infection during pregnancy is devastating; it can result in up to 75% of congenital infections and it is a known cause of fetal death. The immune system and particularly natural killer cells (NK) are known to play a key role in the clearance of several viruses in healthy adults. Whether decidual NK cells (dNK), present in the pregnant uterus, have a role during HCMV infection is not known. We analyze changes in dNK cell function and phenotype in the presence of HCMV-infected targets in an autologous setting. We demonstrate the acquisition of cytotoxic profile which is associated with changes in dNK cell receptor repertoire and cytokine production. Finally, we find that dNK cells are able to sense HCMV infection, migrate and infiltrate infected tissues both in tissular organ culture and *in situ* in infected placenta. Together our results present the first report demonstrating the involvement of dNK cells in controlling HCMV infection.

involved in limiting HCMV viral spreading to fetal tissues. To test this possibility, we have conducted detailed analysis of functional and phenotypic changes of first trimester of pregnancy dNK cells after their exposure to infected target autologous fibroblasts. We found that dNK cells acquire cytotoxic effector function that is associated with phenotypic alterations in their receptor repertoire expression and involves key receptor-ligand pairs. Furthermore, we found that dNK cells were able to sense HCMV infection, migrate and infiltrate placental tissues both in tissue organ culture and *in situ* in HCMV-infected placenta. These results suggest that dNK cells control HCMV spreading across mucosal tissues probably through the acquisition of cytotoxic profile.

Results

Decidual NK cells efficiently kill HCMV-infected autologous target cells

Our previous study provided evidence indicating that cytolytic function of dNK cells during normal pregnancy is partially controlled by negative signals that involve NKG2A receptor [9] suggesting that such function might be modulated upon viral infections. Therefore, to test the possible involvement of dNK cells in controlling HCMV infection we examined their cytotoxic effector function against HCMV-infected autologous decidual fibroblasts. dNK cells and decidual fibroblasts (Figure S1A) were purified from the same *decidua basalis*. High purity fibroblasts (Vimentin^{pos} and Cytokeratin-7^{neg}, Figure S1A) were infected with two strains of HCMV; the VHLE clinical isolate and the laboratory strain AD169. Decidual fibroblasts were efficiently infected by both strains as evidenced by staining for HCMV-IE nuclear protein (Figure S1B and data not shown) where more than 60% ± 3 (mean ± S.D.) of cells were infected after 48 h (Figure S1C).

Through co-cultures in autologous settings, we then investigated the cytotoxicity of dNK cells by conventional chromium release assay. Neither dNK cells nor pNK cells killed efficiently HCMV-infected decidual fibroblasts after 4 h of contact (Figure S2A & B). However, after 18 h dNK cells efficiently killed VHLE- or AD169-infected fibroblasts (Figure 1A & B). With both strains up to 75% of killing was reached at the effector to target ratio of 50 and no killing of autologous uninfected fibroblasts was observed indicating the specificity of the cytotoxic function against HCMV-infected

targets. Significant increases were also observed in pNK cell lysis of HCMV-infected autologous fibroblasts after 18 h of contact (Figure S2C). Given that no major differences were observed between VHLE or AD169 strains, we extended the analysis of dNK cell cytotoxicity to a cohort of 10 *decidua basalis* and confirmed that dNK cells can specifically kill AD169-infected fibroblasts, although with some variable efficiency (Figure 1C). Taken together, these data suggest that under HCMV infection dNK cells become cytotoxic against infected autologous fibroblasts.

To further confirm the cytotoxic function of dNK cells, we next investigated lytic capacities of dNK cells in an MHC mismatched (heterologous) setting (Figure S2D–E). dNK cells were purified from one *decidua basalis* and their killing activity was tested against either uninfected or HCMV-infected heterologous decidual fibroblasts. While very little killing was observed after 4 h of contact (Figure S2D), up to 60% of uninfected and HCMV-infected heterologous fibroblasts were killed after 18 h of contact (Figure S2E). To exclude any external bias that could be responsible for initiating dNK cell cytotoxicity against heterologous fibroblasts, we tested the ability of dNK cells to kill K562 classical NK cell targets (Figure S2F). In agreement with previous studies [21], very little lysis was observed in the presence of dNK cells while pNK cells killed up to 75% of K562 cells (Figure S2F). Further analyses demonstrate that while dNK cells killed more than 55% of HCMV-infected autologous fibroblasts after 18 h of contact, they did not kill semi-allogeneic fetal trophoblasts (Figure S2G). In the same manner pNK cells did not kill semi-allogeneic trophoblasts (data not shown).

These observations suggest that dNK cells that are tolerant both *in vivo* and *in vitro* to semi-allogeneic fetal trophoblasts become activated when there is a danger signal such as HCMV-infection.

Cytotoxic effector function of dNK cells is independent of TRAIL or FasL killing pathway

NK cells achieve target cell killing either through delivery of soluble mediators or by triggering death receptor-ligand pathways such as Fas ligand (FasL) or the tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL). To provide insights into the mechanisms involved in dNK cell killing of HCMV-infected fibroblasts, we investigated the involvement of the death receptor-ligand pathway (Figure 1D–E). We used neutralizing antibodies to either TRAIL or FasL that are expressed on dNK cells, to block their interaction with cognate death receptors expressed on target cells. After 18 h of co-culture, the blockade of either FasL (Figure 1D) or TRAIL (Figure 1E) did not affect dNK cell cytotoxicity against HCMV-infected autologous fibroblasts. The blocking ability of both mAbs was confirmed since they prevented TRAIL- or FasL-induced killing of Jurkat cell line (see Figure S2H). These data strongly suggest that dNK cell killing of HCMV-infected fibroblasts proceeds through mechanisms independent of the death receptor-ligand pathways.

dNK cells engage immune synapse with HCMV-infected autologous fibroblasts and polarize their lytic machinery towards HCMV-infected targets

The delivery of perforin/granzyme lethal hits is a highly regulated multistep mechanism that involves the formation of a dynamic structure, namely immunological synapse (IS), between NK cell and its target [34]. We undertook a stepwise approach to dissect the involvement of perforin-induced killing mechanisms. First, we analyzed the capacity of dNK cells to form IS with autologous targets. Conjugates formation between dNK cells and

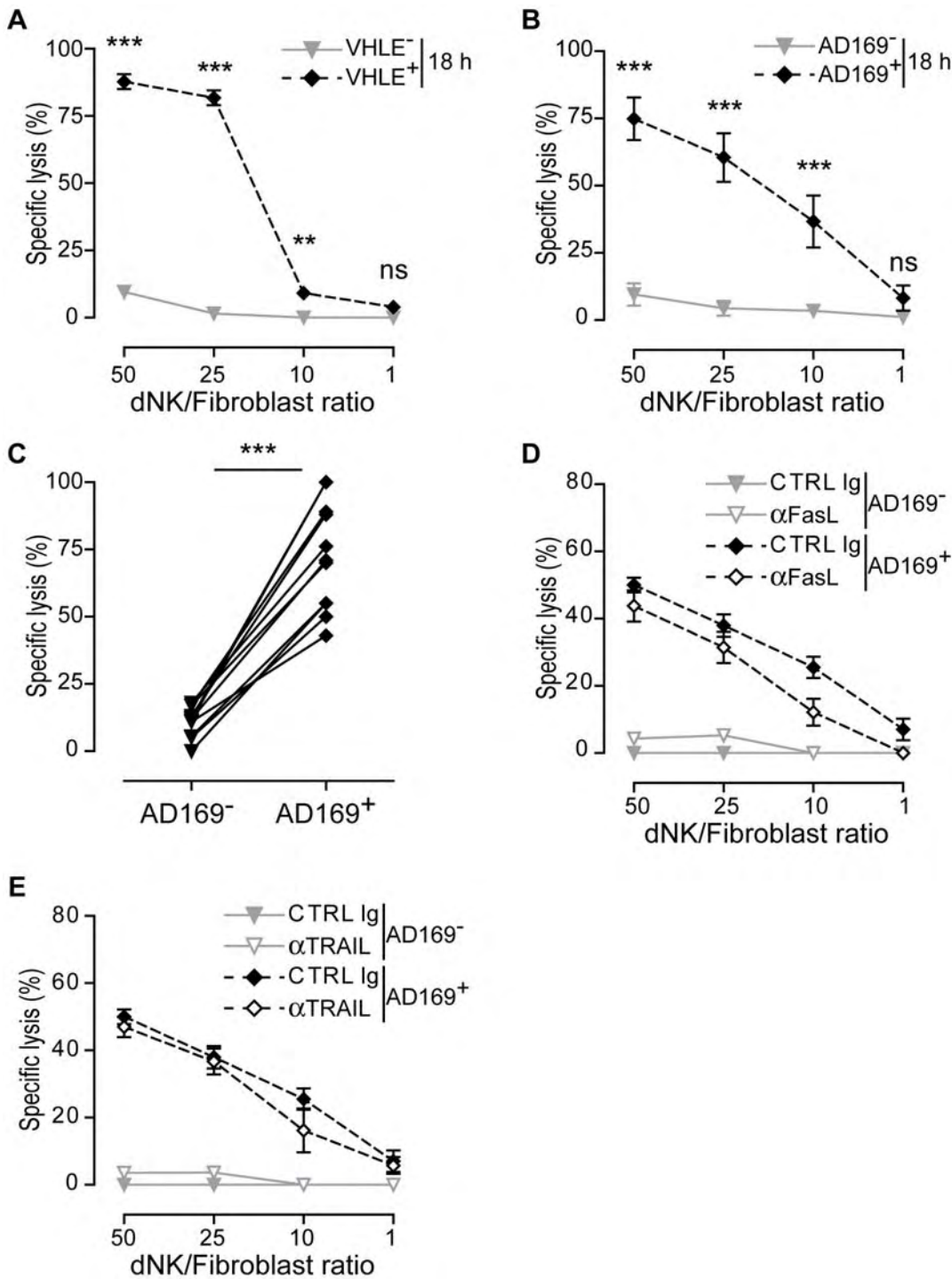


Figure 1. dNK cells are cytotoxic against HCMV-infected autologous fibroblasts. Decidual fibroblasts were kept uninfected or infected for 48 h with HCMV. dNK cell cytotoxicity was determined by ⁵¹Cr-release assay after 18 hours of contact at different E/T ratios. (A) Fibroblasts were infected with VHLE clinical isolate (n = 3), (B) cells infected with AD169 laboratory strain of HCMV (n = 5). (C) Analysis of dNK cell cytotoxicity from a cohort of 10 decidua samples at the 50 to 1 ratio. (D) dNK cells were pre-incubated with anti-FasL or (E) anti-TRAIL blocking mAbs at the final concentration of 10 μg/ml for 20 min and cytotoxicity was monitored after 18 h. Control (CTRL), lysis performed in the presence of IgG control. Each data point is calculated as the mean lysis ± S.D. from at least five independent experiments done in replicate tissue culture wells. Statistical comparisons of mean lysis of uninfected versus HCMV-infected were performed using two-way ANOVA test. ***, p < 0.001; **, p < 0.01; ns, not significant, p > 0.05. doi:10.1371/journal.ppat.1003257.g001

uninfected/HCMV-infected autologous decidual fibroblasts was analyzed after 20 min of interaction by monitoring F-actin remodeling and confocal microscopy. Although dNK cells recognized both uninfected and HCMV-infected target cells, as evidenced by their actin-enriched flattened shape (Figure S3A), only 17% uninfected cells were engaged in conjugates with dNK cells while more than 55% AD169-infected fibroblasts were recognized by dNK cells (Figure S3B). Thus, dNK cells form conjugates preferentially with HCMV-infected fibroblasts and reorganize their F-actin cytoskeleton at 20 min.

Being critical for the trafficking and delivery of lytic granules to the IS in NK cells [35,36], we then analyzed the microtubule organizing center (MTOC) (Figure 2A) and the Golgi apparatus polarization (Figure S3A) in fixed conjugates after 20 min of interaction. dNK cells in contact with uninfected cells displayed a random localization of the MTOC (Figure 2A). In contrast, the majority of conjugates formed with HCMV-infected targets displayed a reoriented dNK cell MTOC towards the immune synapse (Figure 2A). We then finely defined the MTOC reorientation by measuring the distance between dNK cell MTOC and the center of the IS for each conjugate (defined as the center of the interaction zone dNK cell-target, see scheme Figure 2B). The distance between the MTOC and the center of IS showed a quite compact distribution in dNK cells that contacted AD169-infected fibroblasts with a mean distance of $4.6 \pm 1.25 \mu\text{m}$ (mean \pm S.D.) (Figure 2B). In contrast, the distance from the MTOC to the center of the contact zone was very variable in dNK cell that formed conjugates with uninfected cells (Figure 2B) with a mean distance of $9.1 \pm 3.4 \mu\text{m}$ (mean \pm S.D.).

We next analyzed the distribution of lytic granules containing perforin after 20 min of conjugation (Figure 2). Similar to the MTOC, perforin containing granules were localized in a random manner, but upon recognition of HCMV-infected cells, dNK cells polarized their perforin containing granules with the MTOC close to the contact zone (Figure 2A). Quantification of perforin polarization in a large number of immune synapses, demonstrated that while the majority of dNK cells that formed immune synapse with AD169-infected fibroblasts showed polarization of their lytic granules ($83 \pm 4\%$), only 28% of dNK cells showed polarization towards uninfected targets (Figure 2C). Interestingly, when using a mixture of infected and non infected cells (one to one ratio), dNK cells polarize their MTOC and secretory machinery preferentially towards HCMV-infected fibroblasts (data not shown). Consistent with the MTOC and lytic granules, the Golgi apparatus was also distributed in clusters close to the MTOC only in dNK cells that formed immune synapses with AD169-infected fibroblasts (Figures S3A), but not in those that formed conjugates with uninfected targets (Figure S3A see right enlargement panels).

One of the critical step in the NK-IS formation includes the clustering of specific receptors that contribute to NK cell activation [34]. Despite the fact that CD9 would have been a better choice as it is mainly expressed by dNK cells but not pNK, decidual fibroblasts (data not shown) and other human fibroblasts express substantial amounts of this receptor [37,38] we choose to analyze the localization of CD2 receptor for two main reasons. CD2 is expressed on the majority of dNK [9,21] and it has been shown to rapidly cluster at the NK-IS [34,39,40]. Confocal analyses revealed that CD2 receptor microclusters were concentrated at the intercellular contact zone only in dNK cells that formed conjugates with infected fibroblasts (Figure S3C). We did not observe any changes in CD56 localization (data not shown). Thus, dNK cells engage mature immune synapse with HCMV-infected autologous fibroblasts that is characterized by polarization of the

MTOC, the secretory machinery and clustering of CD2 activating receptor at the intercellular contact zone.

We next examined whether dNK cells were able to degranulate upon recognition of HCMV-infected fibroblasts by analyzing the cell surface expression of the Lysosomal-associated membrane protein 1 (LAMP1/CD107a) (Figure 2D). The kinetics of CD107a cell surface expression by dNK cells in contact with HCMV-infected autologous fibroblasts was carried out for 8 hours. Very little variations were observed within the first four hours of contact. After six hours of contact, a significant increase of CD107a expression was observed in dNK cells that are in contact with HCMV-infected autologous fibroblasts. The degranulation reached maximal level by 8 hours of contact (Figure 2D). The significant increase in CD107a cell surface expression indicates that IS formation is accompanied by efficient release of lytic granules and that dNK cells cytotoxicity is perforin-dependent but only after six hours of contact.

Collectively, these findings indicate that dNK display cytotoxic activity towards HCMV-infected autologous decidual fibroblasts but also emphasize the unique properties of dNK cells cytotoxicity. Even if dNK cells can form mature IS within normal range of time they do need extended time frame in order to release their lytic granules and perform efficient killing of HCMV-infected autologous fibroblasts.

HCMV infection modulates dNK cell receptor repertoire

The repertoire of NK activating and inhibitory receptors (NKR) plays a critical role in cytotoxic activity of pNK cells and modulation of NKRs expression by these cells is often associated with their response to HCMV [30]. Thus, to provide further insights into the mechanisms involved in dNK cell cytolytic activity against HCMV, we analyzed whether these cells modulate their NKRs repertoire upon recognition of infected fibroblasts (Figure 3). Similar to freshly isolated dNK cells (data not shown), more than $76.3 \pm 5\%$ (mean \pm S.D.) of dNK cells co-cultured with uninfected autologous fibroblasts were CD56^{bright} (Figure 3). Exposure to HCMV-infected fibroblasts significantly decreased the percentage of CD56^{bright} dNK cells ($48 \pm 6.3\%$), but significantly increased the percentage of CD56^{dim} cells ($40 \pm 4\%$). The dampening down of CD56 expression was observed even after 18 hours of contact (Figure S4B) consistent with the acquisition of the cytotoxic profile. The changes in CD56 expression profile is always associated with the acquisition of CD16 expression (41% compared to 4.3%). There was a slight decrease in the mean fluorescence intensity of CD69 but the absolute number of CD69^{pos} dNK cells ($85 \pm 5\%$) did not vary after contact with HCMV-infected fibroblasts. Although optimal changes were reached by 48 h, our data demonstrate that HCMV infection orchestrate dampening of CD56 and increase of CD16 expression observed as early as 18 h of contact (Figure S4B) which is consistent with acquisition of a cytotoxic profile.

To further characterize phenotypic changes in dNK cell receptor repertoire, we analyzed the expression of natural cytotoxicity receptors (NCRs) (NKp30, NKp44, and NKp46), NKG2D that recognize viral or stress induced ligands and NKG2A or C receptors that are expressed by a large fraction of dNK cells and recognize HLA-E molecules (Figure 3). The frequency of dNK cells expressing NKp44 activating receptor was significantly increased in dNK cells that were exposed to HCMV-infected fibroblasts as compared to those exposed to uninfected fibroblasts (90% versus 46%). Furthermore, co-culture with infected cells also induced major changes in the expression of NKp46 receptor. A significant shift in the fluorescence intensity towards an NKp46^{low} profile with a complete loss of the bimodal

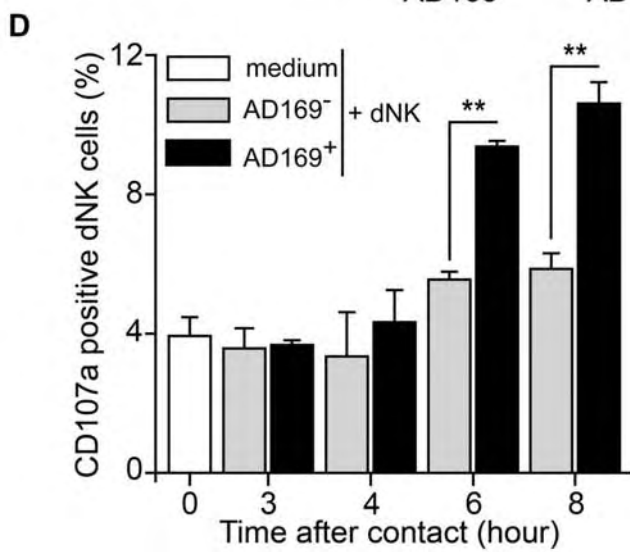
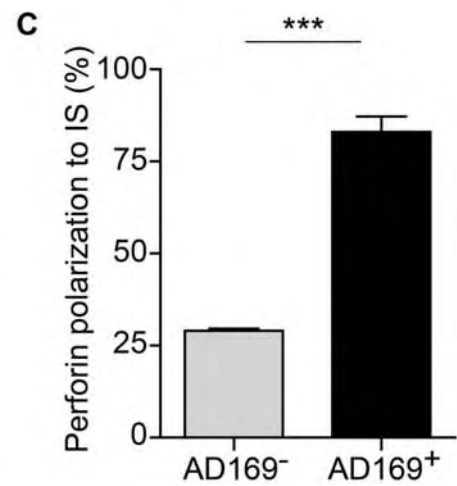
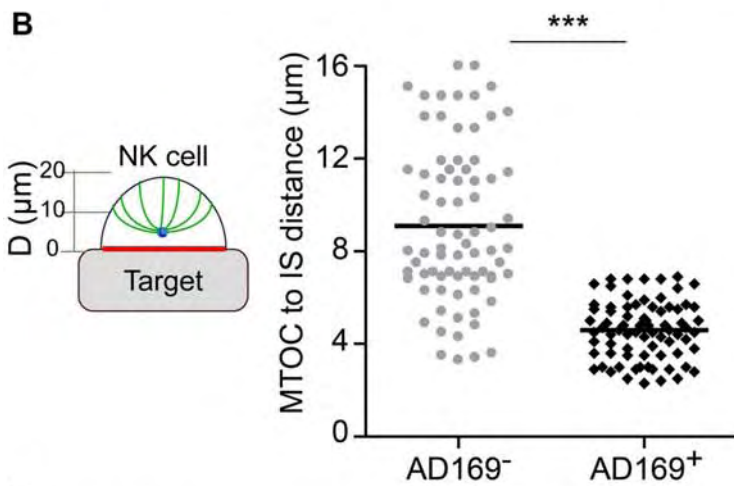
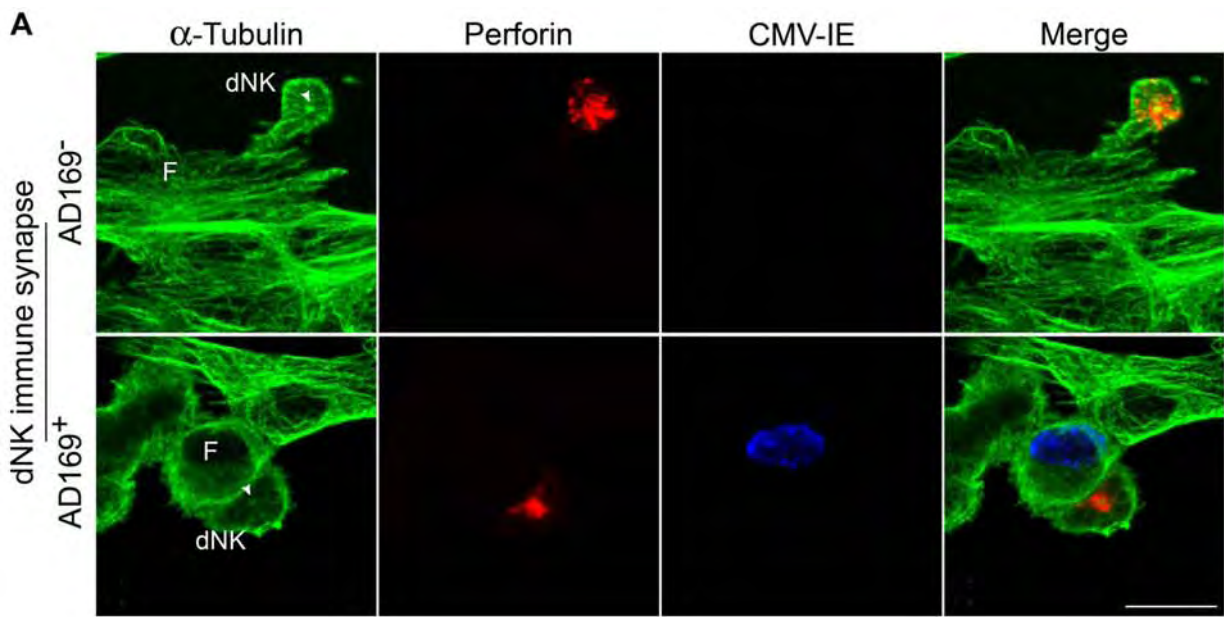


Figure 2. Polarization of the MTOC and lytic granules to the immune synapse formed with HCMV-infected fibroblasts. Uninfected (AD169⁻) or HCMV-infected (AD169⁺) decidual fibroblasts (F) plated on glass coverslips were incubated with autologous dNK cells (dNK) for 20 min at 37°C. (A) Representative images of maximum intensity projection. Microtubules (α -tubulin in green), lytic granules containing Perforin (red), HCMV-IE antigen (blue). Arrowhead points to the MTOC polarization (aster). Bar represent 20 μ m. (B) Left cartoon shows schematic representation of the immunological synapse (IS), D (distance in μ m). The center of IS was defined as the center of the contact zone between dNK and target cell (see cartoon, red line). Zero on the Y axis (μ m) represents synaptic area; blue dot represents the microtubule organizing center (MTOC) and microtubules are in green. The MTOC polarization (Right graph) defined by the distance between the MTOC and the center of IS formed with uninfected (AD169⁻) and HCMV-infected (AD169⁺) fibroblasts. Distances were calculated for 50 conjugates from five independent experiments. Statistical analysis was performed using unpaired Student's *t*-test. ***, $p < 0.001$. (C) Percentage of conjugates showing polarized perforin containing granules to the NKIS. Results from 5 independent conjugations were averaged, values represent means and S.D.s. At least 300 conjugates were analyzed. Statistical analysis was performed using unpaired Student's *t*-test. *** $p = 0.0002$. (D) Kinetic of CD107a cell surface expression was analyzed by flow cytometry on dNK cells that were in contact with uninfected or AD169-infected autologous fibroblasts. Values presented in the bar graphs are mean values calculated from three independent experiments done in triplicates at the ratio 1 to 1. Error bars are SEM. Statistical comparisons were performed using unpaired Student's *t*-test, ** $p < 0.01$.
doi:10.1371/journal.ppat.1003257.g002

NKp46^{hi} and NKp46^{low} expression pattern was observed when dNK cells were exposed to HCMV-infected cells. More than 80% of dNK cells become NKG2C⁺ after their exposure to HCMV-infected fibroblasts, while only minor yet reproducible decreases in the percentage of NKG2A⁺ cells was observed. Exposure to HCMV-infected cells induced significant decrease in the percentage of cells expressing KIR2DL1, KIR2DL4 and ILT-2, while no changes were observed with those expressing KIR2DL2/3 (Figure S4A). Some of the changes in the expression of dNK cell repertoire were observed after 18 hours of contact (Figure S4B) while only discrete changes were observed for pNK cells (Figure S4C) further highlighting the originality of dNK cells and stretching their differences compared to pNK cells. Altogether, our data indicate that HCMV infection induces major changes in dNK cell receptor repertoire with increases in NKp44, NKG2C and decreases in NKp46, KIR2DL1, KIR2DL4 and ILT2 expression.

It has been suggested that *de novo* expression of MHC-II by NK cells and their acquisition of an APC-like phenotype could regulate the activation of numbering immune cells in particular T cells. Therefore, to further examine the modulation in dNK cells properties and phenotype upon exposure to HCMV-infected fibroblasts we examined the expression of HLA-DR in dNK cells co-cultured with infected and non-infected cells (Figure 3). A great fraction of dNK cells exposed to HCMV-infected fibroblasts, but not uninfected cells, acquired significant *de novo* expression of MHC-II DR at their cell surface (48%) displaying a bimodal distribution of fluorescence with a prevalence of positive cells expressing intermediate levels of these cell surface molecules. The acquisition of HLA-DR expression was effective even after 18 hours of contact (Figure S4B). Increases of HLA-DR expression were also observed in pNK cells that were in contact with HCMV-infected autologous fibroblasts (Figure S4C).

Taken together, these data show that exposure to HCMV-infected fibroblasts not only modulates dNK cell receptor repertoire but also increases the expression of key elements of adaptive response (HLA-DR).

NKG2D and CD94/NKG2 activating receptors modulate dNK cell responsiveness to HCMV-infected fibroblasts

Cytotoxic function of NK cells could involve several NKR. To provide insights to their possible involvement in dNK cell cytotoxicity against HCMV-infected fibroblasts, we took advantage of Fc-chimeras to analyze NKR ligands expression in uninfected, AD169-infected (Figure 4A), or VHLE-infected (Figure S5A) decidual fibroblasts. Uninfected fibroblasts expressed low levels of NKp30L. Similar to human fetal foreskin fibroblasts (HFFF) [41], HCMV infection led to an increase in NKp30L expression by decidual fibroblasts (Figure 4A, S5A). Decidual fibroblasts expressed low levels of NKp46L that was further

decreased after HCMV infection. By contrast to NKp30L, ligands for NKp44, and NKG2D were highly expressed in uninfected decidual fibroblasts (Figure 4A, S5A). Both HCMV strain induced significant decreases in the expression of NKp44L and NKG2DL (Figure 4A, S5A).

We then investigated whether HCMV infection affected the expression level of HLA-E cell surface molecules. As shown in figure 4A (and S5A), decidual fibroblasts expressed both the nonclassical HLA-E and the classical HLA-A,-B,-C molecules at their surface. While infection with HCMV resulted in a significant decrease in HLA-E expression, only small effect was observed for the expression of classical HLA-A,-B,-C. This striking observation of HLA-E downregulation by HCMV prompted us to perform further analyses comparing the impact of HCMV infection in additional decidual fibroblasts and in other cells (Figure S5B). Consistently, we observed downregulation of cell surface expression of molecules HLA-E in HCMV-infected decidual fibroblasts (Figure 4, S5A, S5B). Consistent with previous studies using HFFF cells [42,43] and in contrast to decidual fibroblasts, HCMV resulted in upregulation of cell surface HLA-E in MRC-5 fibroblasts and in HEK293T cells (Figure S5B and data not shown). We also observed a small decrease in the level of HLA-A,-B,-C in these cell lines (Figure S5B and data not shown). Western blot analyses of total amount of HLA-E molecules demonstrated that HCMV-infection did not affect total amount of HLA-E proteins in decidual fibroblasts while increased levels were observed in MRC-5 cells expression (Figure S5C). The CD94/NKG2X (-A, -C or -E) family members recognize HLA-E molecule but these receptors can transmit opposing signals [23,44,45]. The differences between the two systems imply that HCMV infection of decidual fibroblasts might trigger their recognition and promote their killing through engagement of CD94/NKG2C/E activating receptors. This is in line with observed up-regulation of NKG2C on dNK upon their recognition of infected decidual fibroblast (Figure 3) and the high levels of NKG2E on dNK cells [12].

Using Fc-chimeric proteins to block specific receptor/ligand interactions, we found that neither blockade of NKp30 (Figure 4B) nor of NKp46 (Figure 4C), both modulated upon HCMV infection, interaction with their putative ligand(s) had an effect on dNK cell killing of autologous HCMV-infected fibroblasts. Blocking the interaction of NKp44 activating receptor with its ligand resulted in 50% increased killing of infected autologous fibroblasts (Figure 4D). In contrast, interference with NKG2D receptor ligation induced a significant decrease in dNK cell cytotoxicity; the mean lysis of HCMV-infected fibroblasts was 50% whereas only 20% of infected cells were lysed in the presence of NKG2D-Fc chimeric protein (Figure 4E). The decrease in cytotoxicity after blockade of NKG2D ligation to its cognate

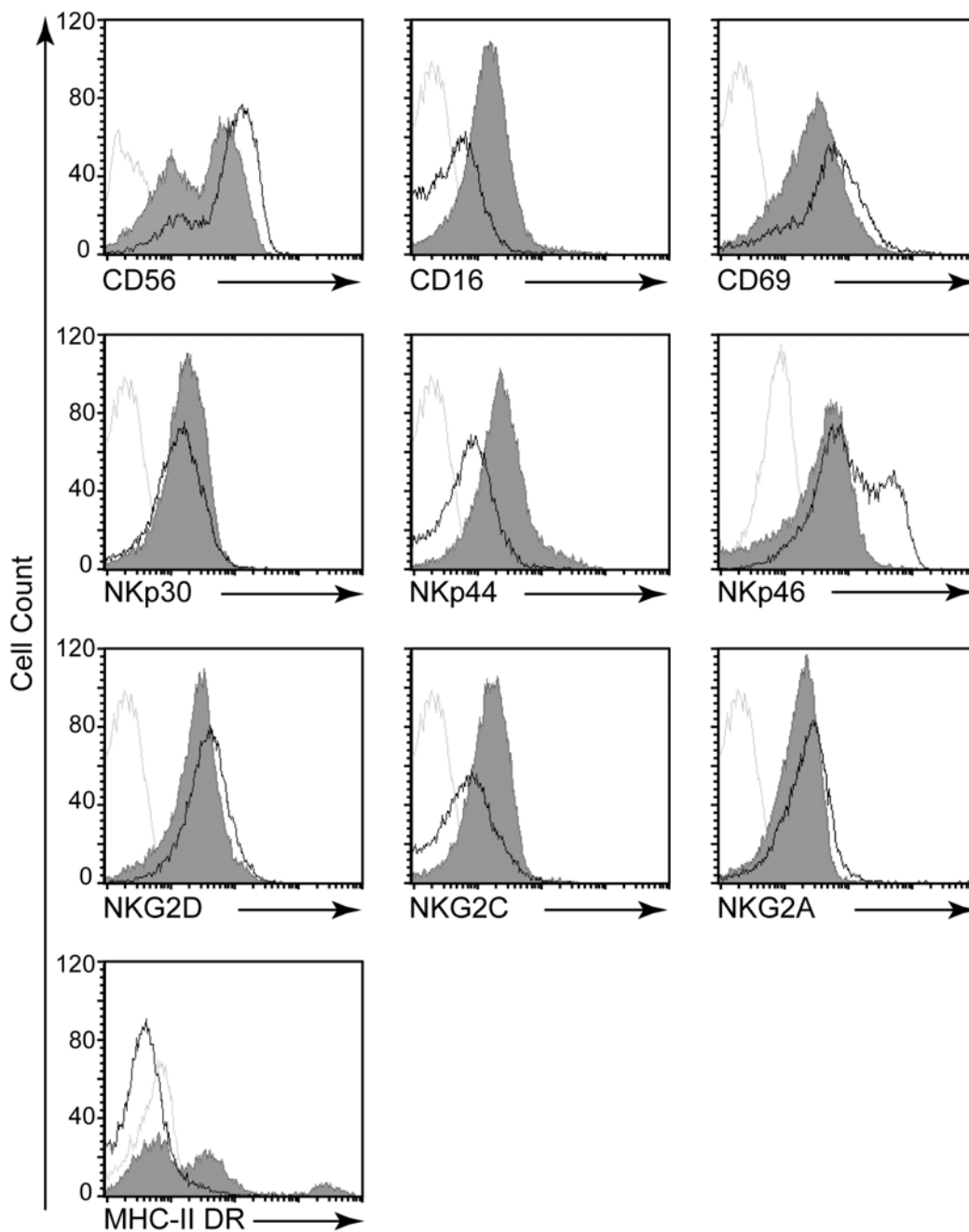


Figure 3. Exposure to infected cells modulates dNK cell receptor repertoire expression. dNK cells were co-cultured with autologous fibroblasts that were either uninfected or infected with HCMV-AD169 for 48 h. dNK cells were stained for surface expression of the indicated receptor using fluorochrome-conjugated antibodies and analyzed by flow cytometry. Representative FACS histograms gated on CD56^{pos} CD3^{neg} dNK cells are shown (n = 5). Specific receptors are indicated by the arrow. dNK cells in contact with uninfected fibroblasts are represented by black line, dNK cells in contact with HCMV-infected fibroblasts are represented by shaded gray. Dotted gray line represents isotype-matched control Ig. One representative histogram out of five independent experiments is shown.
doi:10.1371/journal.ppat.1003257.g003

ligands expressed on HCMV-infected fibroblasts underscored a role for NKG2D receptor in dNK cell cytotoxicity. Since neither NKp30-Fc nor NKp46-Fc had an effect on dNK cells lysis, we tested the ability of these chimeras to block pNK cell cytotoxicity. The binding of either chimera significantly decreased the killing of K562 cell line by pNK cells (Figure S6A) indicating that both chimeras are functionally active.

Since HLA-E is a ligand for both inhibitory CD94/NKG2A and activating CD94/NKG2C/E receptors, we explored its involvement in dNK cell cytotoxic response against HCMV-infected fibroblasts. To this end, we performed lysis assay in the presence of an anti-HLA-E blocking monoclonal antibody. Blockade of HLA-E ligation with its cognate receptor resulted in a two-fold decrease of the sensitivity to dNK cell lysis (36%

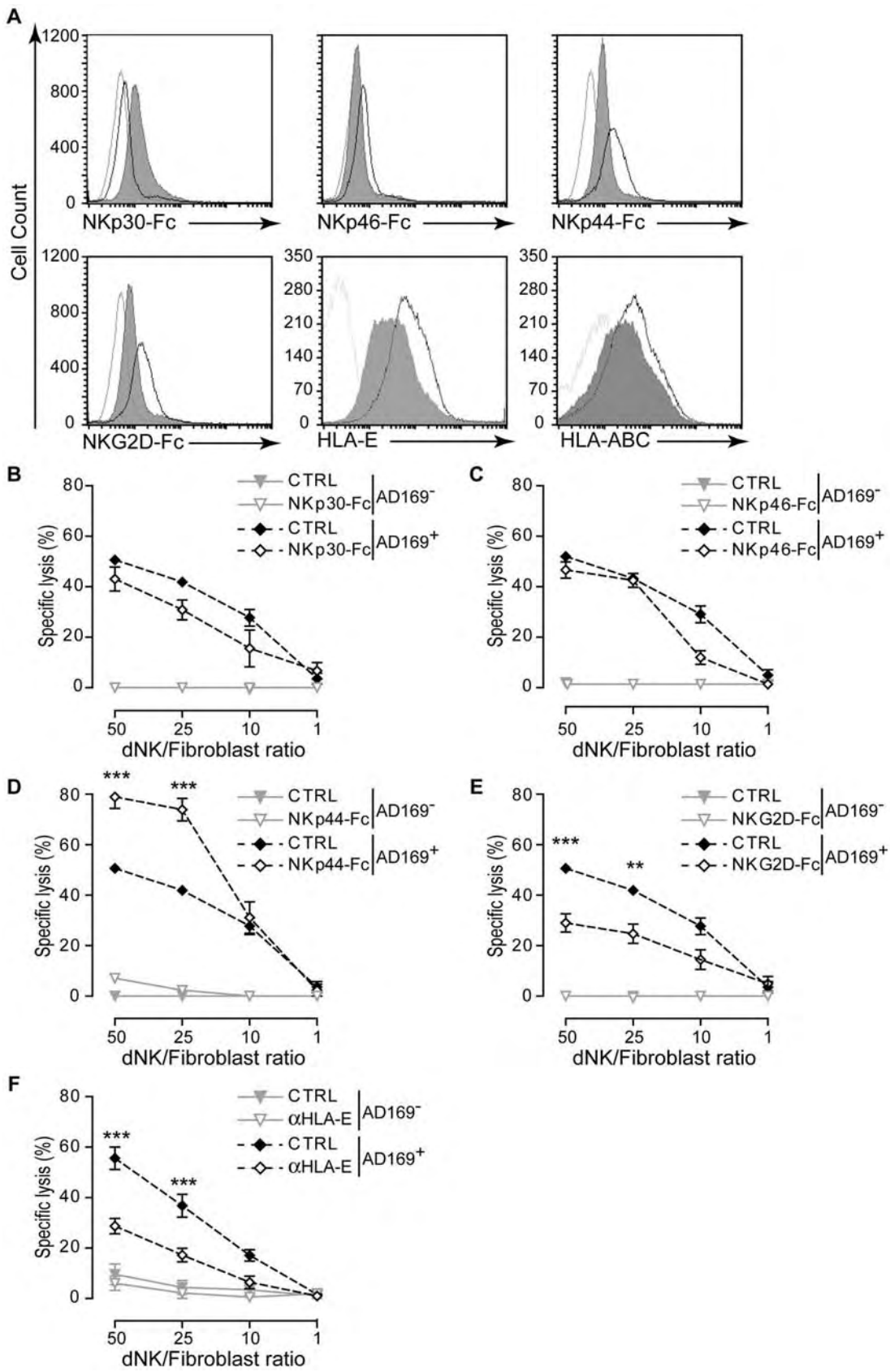


Figure 4. Functional analysis dNK cells specific receptors. (A) HCMV-infection modulates the expression of NKR ligands on decidual fibroblasts. The binding of human NKp30-Fc, NKp46-Fc, NKp44-Fc, and NKG2D-Fc chimera was used to evaluate the cell surface expression of specific receptor ligands. The expression of HLA-E and HLA-A, -B, -C molecules was evaluated using specific mAb. Uninfected fibroblasts are represented by black line, HCMV-infected fibroblasts (shaded gray). Dotted gray line represents negative control or isotype-matched control Ig. One representative FACS histogram out of five independent experiments is shown. (B–E) Decidual fibroblasts uninfected (AD169⁻) or infected (AD169⁺) were incubated with soluble receptor-Fc fusion protein at the concentration of 1 μ g/ml and dNK cell cytotoxicity was analyzed by chromium release assay after 18 h of co-culture. Control lysis was performed in the presence of CD99-Fc chimera (CTRL). Lysis analyzed in the presence of (B) NKp30-Fc, (C) NKp46-Fc, (D) NKp44-Fc, (E) NKG2D-Fc. (F) Analysis of NKG2A and NKG2C function was performed in the presence of blocking antibody against HLA-E molecules (α -HLA-E). Control lysis performed in the presence of isotype match control Ig (CTRL). Data sets represent mean lysis \pm S.D. from five independent experiments done in replicate. Statistical comparisons were performed using two-way ANOVA test. ***, $p < 0.001$; **, $p < 0.01$. doi:10.1371/journal.ppat.1003257.g004

compared to 75% for IgG1 isotype control) (Figure 4F). This inhibitory effect suggests that in our system model, HLA-E on infected-fibroblasts binds to the CD94/NKG2C or -E activating receptors rather than to CD94/NKG2A inhibitory receptor and such binding could mediate the cytotoxic effect of dNK.

Examination of pNK cell cytotoxicity shows that even though some minor changes were constantly observed with NKp30, NKp46 and NKp44 receptors (Figure S6B–D), only the NKG2D receptor played a major role in the killing of HCMV-infected autologous decidual fibroblasts (Figure S6E) as its blockade resulted in significant decrease in pNK cell cytotoxicity against autologous fibroblasts. The blockade of HLA-E did not impair pNK cell cytotoxicity (Figure S6F).

Taken together, our data uncover a crucial role of NKG2D and CD94/NKG2C or -E activating receptors in dNK cell cytotoxic response against HCMV-infected fibroblasts, while neither NKp30 nor NKp46 are implicated in dNK cell response. By contrast to its activating role in peripheral blood NK [24], NKp44 have an inhibitory effect in the control of dNK cell cytotoxic function.

Exposure to infected fibroblasts modulates dNK cells cytokine and chemokine secretion

In normal pregnancy, dNK cells are known to secrete great amount of soluble factors that play a key role in trophoblast attraction and vasculature remodeling. Since some of dNK cell soluble factors have also been found in HCMV secretome [46], we first analyzed the secretion profile of uninfected and HCMV-infected decidual fibroblasts, using a 42-multiplexed cytokine/chemokine/growth factor Luminex assay (Figure S7). Decidual fibroblasts produced GRO- α /CXCL-1, sICAM-1, IL-6, IL-8, IP10, MCP-1, MIP1 β , MIP1 α , and VEGF-A. After HCMV-infection, mild variations were observed for IL-8, MIP-1 β and VEGF-A without reaching statistical significance and only IL-6 secretion was significantly increased in AD169-infected decidual fibroblasts (1.7 fold increase) (Figure S7). To examine whether HCMV infection modulates dNK cell secretion profile, we analyzed specific dNK cell secretion in co-cultures either with uninfected or HCMV-infected autologous decidual fibroblasts (Figure 5). Although large variations were observed amongst the donors, only a limited number of secreted cytokines, chemokines and growth factors varied after 24 h of co-culture with HCMV-infected autologous targets (Figure 5). Similar to freshly isolated dNK cells ([9] and data not shown), dNK cells that were in contact with autologous uninfected decidual fibroblasts produced VEGF-A, sICAM-1, GRO- α /CXCL-1, IL-6, Granzyme B (GZ-B) (Figure 5A), MIP-1 β /CCL4, IL-8/CXCL8 and IP-10/CXCL10 (Figure 5B). They also produced substantial amounts of GM-CSF, RANTES/CCL5, MIP-1 α /CCL3 and low amounts of MCP-1/CCL2 (Figure 5C). Stimulation of dNK cells with HCMV-infected fibroblasts led to significant increased secretion of VEGF-A (1.6-fold), sICAM-1 (1.7-fold), GRO- α /CXCL-1 (2-fold), IL-6 (1.5-fold), GZ-B (2.1-fold) (Figure 5A) and MCP-1/CCL-2 (3.5-fold)

(Figure 5C). On the other hand, the production of MIP-1 β , IL-8, IP10 (Figure 5B), GM-CSF, RANTES, MIP-1 α (Figure 5C) was significantly decreased after stimulation with HCMV-infected cells. Finally, all other cytokines and chemokines tested were either below cut-off levels (IFN- γ , IFN- ω , TGF- α , TNF- α / β , IL-1 β , IL-2, IL2RA, IL-4, IL-5, IL-10, IL-12, IL-15, IL-17A/F, EGF, E-Selectin and Leptin) or did not vary after exposure to HCMV-infected fibroblasts (basic FGF, IFN- α 2, IFN- β , IL-1 α , IL-1RA, IL-22, SDF-1, sFas, sFasL, TRAIL, Eotaxin-3/CCL26, Fractalkine/CX3CL1) (data not shown). Overall, these data demonstrate that HCMV-infection modulates the secretory profile of dNK cells, with increased production of cytotoxic factors that may constitute virus-specific immune response.

dNK cells infiltrate HCMV-infected trophoblast

The maternal *decidua* is the main fetal-maternal interface where maternal dNK cells are in close contact with invasive fetal trophoblast. HCMV virions are believed to disseminate from decidual cells to the invasive trophoblasts and in floating and anchoring villous trophoblasts [5]. To support the relevance of our results, we developed an organ culture model of trophoblastic *villi* explants to assess the ability of dNK cells to infiltrate infected tissues. Villous explants were isolated, infected (48 h) or not and cultured for 2 h with autologous dNK cells that were labeled with CellTracker Red. As shown in Figure 6A and supplementary movies very few dNK cells were able to establish contact with autologous uninfected trophoblast. However, large number of dNK cells was able to infiltrate and establish close cellular contacts within HCMV-infected organ explants. We were able to analyze organ culture over 250 μ m deep section and demonstrate that dNK cells were able to formed synapse like structures with infected cells throughout the section (see 3D-reconstitution movie). These data demonstrate that dNK cells are able to sense and migrate within the infected tissues.

We then investigated the ability of dNK cells to interact with infected tissues *in vivo*; we analyze biopsies of placental samples from 24–26 weeks HCMV⁺ termination of pregnancy (Figure 6B). Thin sections of placental samples were analyzed by IHC for the presence of NK cells using anti-CD56 marker and anti-CMV-IE antibodies. Analysis of infected placenta showed that CD56^{pos} cells were present at the vicinity of infected HCMV positive cells (Figure 6B) while no CD56^{pos} cells were present in the HCMV negative tissue. Together these results clearly demonstrate that dNK (CD56^{pos}) cells are able to infiltrate HCMV-infected tissue both *in vitro* in organ culture model and *in situ* within HCMV⁺ placentas, providing thus solid evidence for the implication of dNK cells in controlling HCMV infection and spreading.

Discussion

Despite their importance in maintaining healthy pregnancy, the control of maternal HCMV infection and spreading by dNK cells is not yet fully understood. Our study is the first to assign a critical

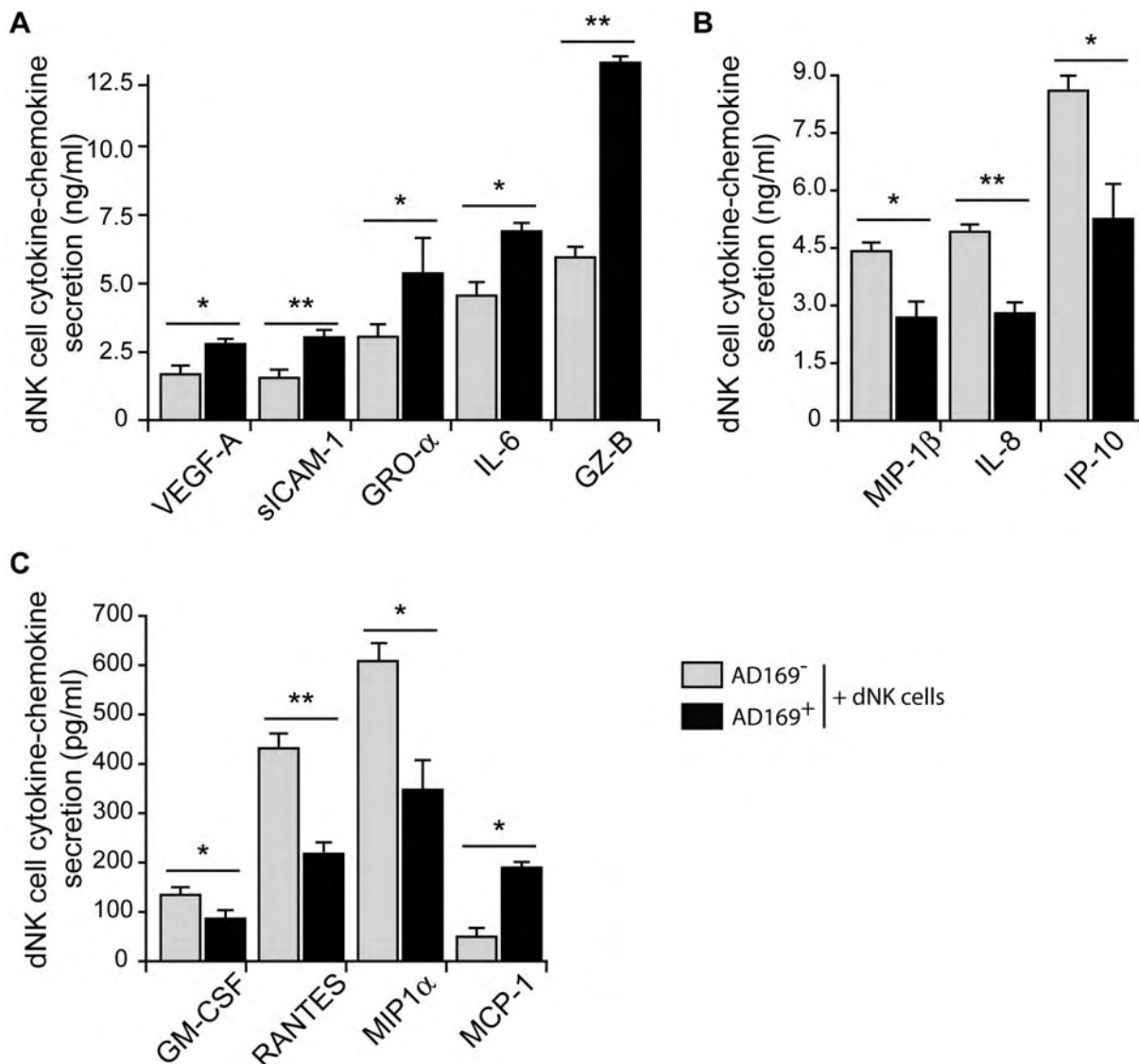


Figure 5. HCMV infection modulates dNK cells cytokine/chemokine production. dNK cells were stimulated with uninfected (AD169⁻, gray) or AD169-infected (AD169⁺, black) autologous decidual fibroblasts for 24 h. Cytokines were quantified in the supernatants using a 42-multi-plexed cytokine assay. Representative histograms from selected cytokines-chemokines that showed significant differences are presented. (A & B) Soluble factors that are produced at high levels by dNK cells. (C) Soluble factors that are produced at low levels by dNK cells. Concentrations are given as differences between secretions of dNK cell in presence of uninfected or infected fibroblasts and the corresponding uninfected or infected fibroblasts. Normalized data points are given as mean ± S.D. calculated as from four independent experiments. Statistical comparisons were performed using Mann & Whitney test. **, $p < 0.01$; *, $p < 0.05$. doi:10.1371/journal.ppat.1003257.g005

role to dNK cells in controlling maternal HCMV infection and in limiting its spreading to fetal tissues through their capacity to acquire potent cytotoxic activity when in contact with infected decidual cells. During normal pregnancy, the majority of dNK cells are CD56^{bright}CD16^{neg}. They secrete a large panel of cytokines and chemokines that are necessary for placental development. We demonstrate that dNK cells undergo phenotypic and cellular changes that allow them to recognize and kill autologous HCMV-infected cells in a FasL- and TRAIL-independent manner.

Immunological synapse formation is a crucial step for the delivery of lethal hits by effector cells. Rapid re-localization of the MTOC is needed for the trafficking and the polarization of lytic

granules to the IS [34,47–50]. We show that although dNK cells recognize and engage IS with HCMV-infected cells very rapidly, they require longer exposure time in order to degranulate and exert the cytotoxic effector function. The delay to unleash dNK cell cytotoxic effector function might correspond to the time necessary for dNK cells to mature and acquire necessary functional changes to exert cytotoxicity. However, we cannot exclude that HCMV-infected fibroblasts provide weak signal to induce fast degranulation or that decidual fibroblasts have an inherent resistance to cytotoxic granule mediated cell death.

Mechanisms that prevent dNK cell cytotoxicity are not completely understood. Even though dNK and pNK cells exhibit similar expression levels of cytotoxicity encoding genes [12], under

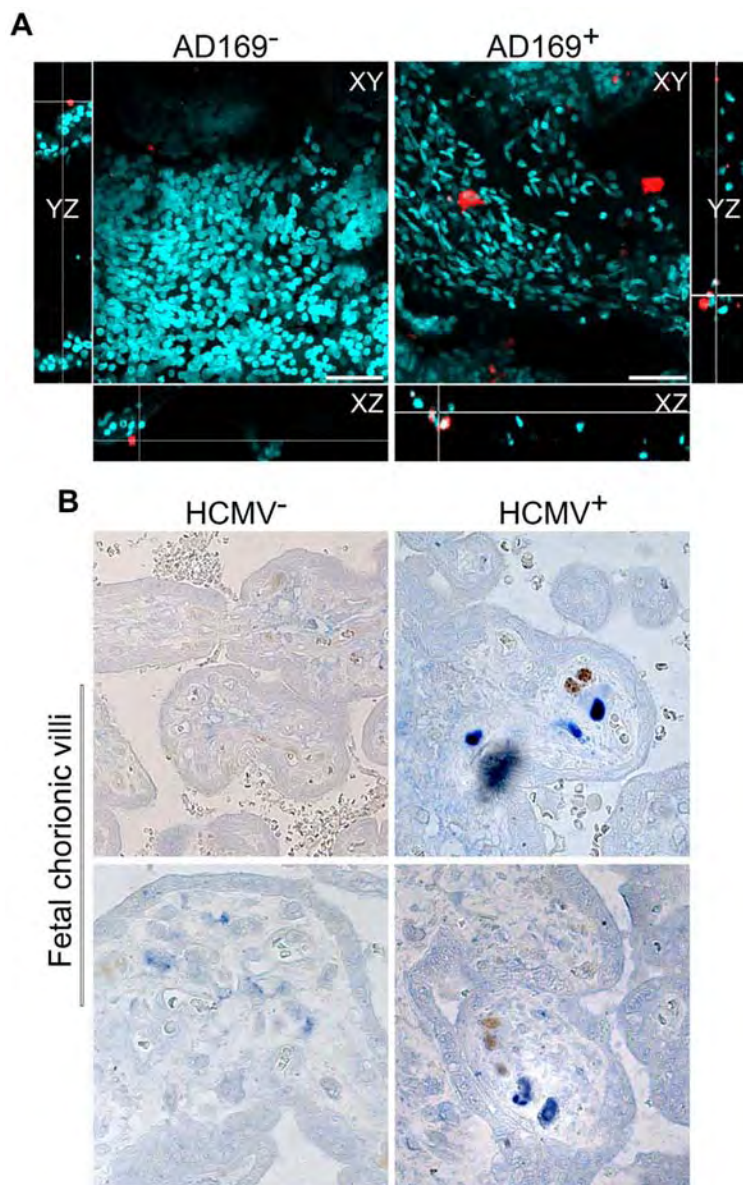


Figure 6. dNK cells infiltrate infected placental tissues. (A) Two-color 3D-images of chorionic *villi* explants organ cultures established from first trimester trophoblast either uninfected (AD169⁻) or HCMV-infected (AD169⁺). Nuclei were stained with dapi (cyan). Infiltrating dNK cells (red). Lower and side panels show orthogonal XZ and YZ slices, respectively. Images are from two-photon Z-stack (total of 200 μ m). Scale bars = 100 μ m. (B) Two-color IHC of 6- μ m-thick sections from paraffin-embedded whole placental biopsies of HCMV⁺ pregnancy termination. HCMV⁺ and HCMV⁻ tissue sections are presented. Representative immunostaining of HCMV-IE (blue, alkaline phosphatase staining) and CD56⁺ NK cells (brown, peroxidase staining) (n=2).

doi:10.1371/journal.ppat.1003257.g006

healthy conditions dNK cells are tolerant to semi-allogeneic fetal trophoblasts. Although mechanisms that control cytotoxicity are not well established, they may include strong interactions of inhibitory receptors with their cognate ligands expressed by fetal trophoblast, production of VEGF-C by dNK cells and/or expression of anti-apoptotic proteins (XIAP) by target cells [51,52]. The lack of dNK cell cytotoxicity can be reversed, at least *in vitro*, after exposure to cytokines such as IL-5 and IL-18 or upon engagement of specific activating receptors [9,21]. Here we show that HCMV infection provides the necessary activating signals to trigger dNK cell cytotoxicity. The fact that dNK cells killed heterologous targets from a different donor further

emphasizes the intrinsic ability of these cells to kill when they are exposed to the right activating signals. Our observation that dNK cells did not kill semi-allogeneic trophoblasts but killed HCMV-infected autologous fibroblasts highlights their plasticity and their specific ability to respond to HCMV infection.

In contrast to pNK cells, very little is known about dNK cell cytotoxicity as these cells are mainly cytokine and chemokine producers [9,10,13,21]. We demonstrated that under HCMV-infectious conditions, a significant fraction of dNK cells that are CD56^{bright} and CD16^{neg} rapidly dampened down their CD56 expression level and acquired CD16 expression. These changes are most probably due to the acquisition of cytotoxic function.

Several NKR have been involved in pNK cell cytotoxicity [53]. For instance, efficient control of HCMV infection involves NKG2D receptor and can be associated with the emergence of NKG2C⁺ subset that contribute to long term protective immune response [30]. Exposure of dNK cells to HCMV-infected fibroblasts resulted in an increased NKG2C⁺ expression without major changes in NKG2A expression. The role of other receptors in NK cell response to HCMV is not completely understood. HCMV is able to decrease a plethora of key receptor-ligand interactions that are involved in NK-cell response. By contrast to changes in pNK cell repertoire [22], opposite effects were observed for NKp44 and NKp46 receptors while no changes were observed for NKp30 receptor. These observations further highlight differences between dNK and pNK cells *modi operandi* during HCMV infection.

Since the nature of HCMV-induced cellular ligands is not known, we took advantage of NKR-Fc chimeric receptors to analyze the expression of NKR ligands on decidual fibroblasts. Although some variations were observed amongst different *decidua basalis*, we found that decidual fibroblasts constitutively express ligands for NKp44 and NKG2D while they barely express ligands for NKp30 or NKp46. HCMV infection induced NKp30L and resulted in significant decreases of NKp44L and NKG2DL but did not affect the expression of NKp46L. These findings suggest that HCMV infection interferes with the expression level of activating receptor ligands even if some of them are of cellular rather than virally induced.

Using chimeric proteins, we demonstrated that NKp44 receptor plays an inhibitory function in dNK cell cytotoxicity. dNK cells might express an inhibitory isoform of NKp44 receptor as a result of *NCR2* alternative splicing as it has been recently demonstrated for *NCR3* (NKp30) [54]. Alternatively, NKp44L expressed on decidual fibroblasts might participate to uncoupling of activating adaptor molecules thus promoting an inhibitory profile. However, the expression of an inhibitory isoform is the most likely explanation since dNK cells constitutively express the NKp44 receptor. It has been clearly demonstrated that HCMV maintains an inhibitory status either by preventing the cell-surface expression of NKG2D activating ligands [55,56] or by UL40-mediated up-regulation of HLA-E or MHC-I like surrogates molecules expression. Although, there are some discrepancies between our two observations, namely decreases of NKG2DL and acquired cytotoxicity through NKG2D receptor, it is possible that decreases in NKG2DL are selective resulting in the expression of high affinity ligands. Alternatively, co-engagement of other activating receptors is sufficient even if there is less NKG2D ligands.

Further studies are needed to identify NKG2DL that are expressed on decidual cells. Discovery of such ligand and the characterization of specific receptor-ligand interactions that mediates dNK cellular cytotoxicity will help uncover potential therapeutic target that, when activated *in vivo*, can limit viral spreading and/or prevent congenital disease.

Previous investigations demonstrated that both classical and non-classical MHC-I molecules have been targeted by HCMV evasion strategies. By contrast to human fetal foreskin fibroblasts and fibroblastic cell lines [42,43], HCMV-infection resulted in decreased cell surface HLA-E molecules without affecting the total amount of proteins in decidual fibroblasts. The difference between the two cellular systems might reside in the fact that decidual fibroblasts express substantial amounts of HLA-E at the steady state. In decidual fibroblasts, HCMV might interfere with the stability of cell surface HLA-E molecules by impairing rapid protein export or by increasing intra-cellular retention. The inhibitory profile observed upon blockade of HLA-E in HCMV-

infected fibroblasts further support the involvement of CD94/NKG2C or possibly CD94/NKG2E activating receptors, both greatly expressed by dNK cells [22–31]. In this context, HCMV peptides might play a critical role in promoting the recognition of HLA-E by activating members of CD94/NKG2C and CD94/NKG2E receptors thus increasing susceptibility of decidual fibroblasts to dNK cell cytotoxicity at early times of infection as it has been shown previously for pNK cells [57]. It will be very interesting to investigate whether late HCMV infection is responsible for similar changes and whether specific HCMV peptides play roles in the sequential changes in dNK cell function.

In parallel to these changes in NK cell receptor, dNK cells acquire *de novo* expression of MHC-II DR molecules. This potential acquisition of an APC-like phenotype during the course of HCMV immune response might play a crucial role in initiating a cross-talk with neighboring immune cells, including CD4⁺ T cells. Indeed, within the fetal-maternal interface, dNK cells are in close proximity with decidual CD4⁺ T cells. Expression of MHC-II DR antigens might be necessary for dNK cell activation and for shaping up the adaptive immunity [58,59]. However, further investigations are needed to demonstrate whether the expression of MHC-II molecules is associated with the acquisition of APC capabilities and HCMV antigen presentation.

It is very intriguing that only few cytokines and chemokines varied in the presence of HCMV infected fibroblasts. HCMV infection induces IL-6 secretion most probably through the expression of the viral-encoded chemokine receptor US28 and the activation of the IL6/STAT3 signaling pathway [60]. Interestingly, IL-6 was further increased when dNK cells were in contact with HCMV-infected fibroblasts, most probably through a paracrine effect on dNK cells. sICAM-1 was also increased under HCMV conditions. Previous reports suggested that IL-6 down-regulates the production of several soluble factors [61], while sICAM-1 increases have been correlated to HCMV reactivation [62]. Both IL-8 and IP-10 are necessary for trophoblast migration as these cells express a panel of receptors allowing them to respond to these chemokines [10]. By lowering the level of IL-8 and IP-10, dNK cells might reduce trophoblast invasion and prevent viral spreading from decidual stroma to fetal tissue or be partially responsible for fetal damages. Remarkably and in sharp contrast with pNK cell response to viral infection [63,64], there were no changes in secretion levels of cytokines such IL-12, IL15, type I IFN, TNF α or IFN- γ that are all known to regulate NK cell function. Moreover, it is possible that changes in dNK cell secretome create the necessary inflammatory environment that will favor the recruitment and the initiation of anti-HCMV adaptive immune response.

We demonstrate that during HCMV infection, there is a bias of the inflammatory environment in the *decidua basalis*. dNK cells seem to lose their “decidual status” and become killers in order to limit viral infection. Exposure to HCMV infection can imprint dNK cell receptor repertoire towards killer activity. We demonstrate that NKG2D, NKG2C/E activating receptors play a crucial role in dNK cell cytotoxic response against HCMV-infected fibroblasts. The fact that dNK cells are able to infiltrate HCMV-infected tissue *in vitro* and engage immunological synapse-like structures within the infected placentas *in situ* strongly suggest that dNK cells are key players in controlling HCMV infection and spreading during pregnancy. To our knowledge, we provide for the first time evidence for the involvement of dNK cells in clearing HCMV infection. In fact, we clearly show that dNK cells that are present only in the *decidua basalis* during healthy pregnancy are in contact with HCMV-infected fetal tissue *in vivo*. It is possible that upon activation there is an increased dynamic of dNK cells

allowing them to reach fetal site, which is normally devoid of maternal immune cells, and kill HCMV-infected cells. Recent reports have clearly linked the ability of NK cells in controlling HCV replication and liver fibrosis to specific soluble factor secretion and/or specific activating receptor expression [65,66]. Future studies, with large cohort of placentas from medical termination of pregnancy due to congenital HCMV infection, will be necessary to clarify the dynamic of dNK cell activation *in vivo* as well as the pivotal role of soluble factor secretion in mounting proper anti-HCMV responses and limiting virus spreading.

In conclusion, our data shed new light on the plasticity of dNK cells and provide evidence for a correlation between phenotypic changes and functional anti-viral response. We have demonstrated the ability of dNK cells to exert anti-viral effector functions *in vitro* and to infiltrate HCMV infected tissues both *ex-vivo* and form immune synapse like-structures *in vivo*. Careful investigations of dNK cell status *in vivo* in larger cohorts of HCMV⁺ termination of pregnancy will be required to see whether this predicts clinical outcome. Understanding mechanisms that regulate switch in dNK cell immune tolerance will help us discover key factors/pathways that are involved in the immunopathology of HCMV infection during pregnancy and design strategies to limit congenital infection.

Materials and Methods

This study was approved by the Research Ethical Comity Haute-Garonne. All patients signed the informed consent before samples were taken, Agence de la Biomédecine, PFS08-022.

Cell purification, cell lines

dNK cells were purified from first-trimester *decidua basalis* (8–12 wk of pregnancy) obtained after elective pregnancy terminations as previously described [9]. Briefly, *decidua* samples were minced, collagenase IV treated. Cell suspension is then allowed to adhere in tissue culture plates. dNK cells were purified from the non adherent cell fraction using MACS negative selection kits according to the manufacturer procedure (Miltenyi Biotec). dNK cells were kept at 4°C in conditioned media containing 20% heat-inactivated fetal calf serum (FCS). Autologous fibroblasts were purified from the adherent mononuclear cell fraction by successive round of mild trypsin treatment.

The purity of both dNK cells and decidual fibroblasts was assessed using a cocktail of antibodies. dNK cells were CD3^{neg} and CD56^{pos}. Decidual fibroblasts purity was confirmed by immunostaining with an anti-cytokeratin and anti-vimentin antibodies, fibroblasts are cytokeratin 7^{neg} (NM_001047870) and Vimentin^{pos} (NM_003380).

Virus production and cellular infection

Decidual fibroblasts were maintained in RPMI-1640 medium (GIBCO) supplemented with 10% (v/v) FCS and penicillin-streptomycin 100 U/ml each, under a 5% CO₂ atmosphere at 37°C.

Two HCMV strains were used, AD169 laboratory strain (ATCC strain, a gift from S. Michelson, Paris, France), and VHLE clinical isolate (a gift from C. Sinzger, Tubingen, Germany). Viral stocks were prepared from cell-released virions, using MRC-5 cells as previously described [67]. High titer virus stocks were stored in single use aliquots for up to six months at –80°C.

Adherent cell monolayers of decidual fibroblasts or MRC-5 cell line were infected with HCMV particles (MOI 3–5) for 48–

72 hours. Trophoblastic villous explants were infected under the same conditions.

Flow cytometry

Fibroblasts were cultured with dNK cells at 1:1 ratio. After 48 h of co-culture, conjugates were disrupted mechanically by repeated pipeting and dNK cells were collected and washed twice in PBS. dNK cell suspension were then liquoted in 100 µl containing 1×10⁵ cells and labeled with fluorophore-conjugated antibodies. The following mAbs were used: CD56-APC, CD3-PE-Cy7, CD16-PE, CD69-PE, CD2-PE, NKG2D-PE, NKG2A-PE, HLA-DR-FITC, KIR2DL1-PE and 2B4-PE (BD Pharmingen, France); NKp30-PE, NKp44-PE, NKp46-PE, KIR2DL2/3-PE (Beckman Coulter, France); NKG2C-PE, KIR2DL4 clone 181703 (R&D Systems, France); ILT2-PE (Biolegend); CD107a-PE, anti-human HLA-I (HLA-A,-B,-C BC)-PE (BD Pharmingen) and matched isotype controls. Histograms shown were obtained by applying a gate on CD56^{pos} CD3^{neg} dNK cells.

Fibroblasts were detached using 0.05% trypsin-EDTA, washed twice in buffer containing 1% FCS. Cells (5×10⁵ to 10⁶) were resuspended in 100 µl of FCS containing buffer and incubated either with primary specific Ab or isotype matched control followed by mouse anti-human IgG1 FITC coupled Ab. The expression of NCR-ligands on fibroblasts was analyzed by binding of NCR-Fc chimera followed immunostaining with FITC-coupled mouse anti-human IgG1 secondary Ab (Southern Biotec). The following chimeras were used: NKp30-Fc, NKp44-Fc, NKp46-Fc and NKG2D-Fc, CD99-Fc (R&D Systems, France). Non specific binding was blocked by preincubating the cells for 30 min in 2% FCS and 1% BSA containing buffer. Data were analyzed using CellQuest (Becton Dickinson).

Immunofluorescence, Conjugation and Confocal microscopy

For conjugation, fibroblasts were seeded onto 24-well plates containing glass coverslips. After 16 h adhesion, dNK cells were added at a 1 to 2 ratio and incubated at 37°C. Cells were washed briefly with PBS and fixed with 4% paraformaldehyde for 20 min and washed in PBS. Intracellular staining was in the presence of 0.5% Saponin. Cells were incubated in PBS containing 1% heat-inactivated calf serum for 30 min and stained with primary antibodies followed by incubation with Alexa fluor conjugated secondary antibody (Invitrogen) as previously described [68]. Filamentous actin cytoskeleton was visualized with Alexa fluor conjugated phalloidin. After extensive washing, coverslips were mounted with vectashield mounting medium (DAKO). Fluorescence was analyzed using Zeiss LSM710 confocal microscope using a 63x oil objective (Carl Zeiss AG, Jena, Germany).

Cell morphology was analyzed by examining the phalloidin-stained conjugates as an indicator of F-actin distribution. Images correspond to maximum intensity projection along the z-axis (Zen software).

The distance between the MTOC and the center of the IS was measured from single plane of unprocessed images using the single line function of the Imaris (Biplane Scientific Software).

The following antibodies were used to analyze microtubules and MTOC, perforin, CMV infection: anti-human alpha tubulin polyclonal Ab (Sigma-Aldrich, UK), anti-human golgin-97 (Invitrogen), anti-human perforin and anti-human CD2 (BD Pharmingen), anti-HCMV-IE (Argene), anti-human vimentin and anti-cytokeratin 7 (Dako). The F-actin cytoskeleton was analyzed using phalloidin coupled to either to Alexa fluor 488 or Alexa fluor 747 (Invitrogen).

Degranulation assay, CD107a expression

For degranulation assay, fibroblasts were harvested and incubated at 37°C with dNK cells at a 1 to 1 ratio for different time points. Reactions were stopped on ice, cells were stained with fluorochrome-conjugated anti-human CD107a (BD Pharmingen) or isotype matched control Ab in staining buffer containing 1% FCS. Fluorescence was analyzed by Flow Cytometry.

Cytotoxicity assays

Target cells (1×10^6 cells) were labeled with 100 μ Ci 51 Chromium (Sodium chromate, 1 mCi/ml, Perkin Elmer, Courtaboeuf, France). After 1 h incubation at 37°C, cells were washed 3 times in HEPES-buffered RPMI. dNK effector cells were added to 51 Cr labeled target cells (5×10^3) in replicate at various effector to target ratios in a total volume of 200 μ l RPMI containing 5% FCS per well of 96-well round-bottomed microtiter plates. Microtiter plates were centrifuged at 1200 rpm for 5 min and incubated at 37°C. After 4 h or 18 h of culture, 50 μ l cell free supernatants were transferred to Lumaplate (Perkin-Elmer) and the radioactivity was measured on a TopCount (Perkin-Elmer). The specific cytotoxicity was calculated. Spontaneous release was determined from wells containing target cells alone. Maximum release was determined from wells containing target cells lysed in 1% Triton X-100. The data were expressed as follows: % specific cytotoxicity = $100 \times [(\text{Sample mean (cpm)} - \text{Spontaneous mean (cpm)}) / (\text{Maximum mean (cpm)} - \text{Spontaneous mean (cpm)})]$. To block cell lysis due to the engagement of specific activating receptor engagement or specific pathway, 51 Cr-labeled target cells were incubated for 20 min on ice with various soluble receptor-Fc IgG1 chimeric protein (0.2 μ g/ml), anti-HLA-E mAb (clone MEM-E/08, Exbio) or an isotype match control (mouse IgG1) at the final concentration of 1.0 μ g/ml then included as targets in cytotoxicity assay with dNK effector cells. dNK cells were incubated with an anti-TRAIL and -FasL antibodies (10 μ g/ml) (R&D Systems, France) prior to cytotoxicity assay. Recombinant TRAIL and FasL proteins (gifts from A. Quillet-Mary, Toulouse, France) were used at the final concentration of 10 μ g/ml.

Multiplex cytokine and chemokine arrays

dNK cells were co-cultured with uninfected or HCMV-infected autologous decidual fibroblasts in complete medium in 96 microtiter plate. Controls experiments were performed using dNK cells, uninfected fibroblasts, HCMV-infected autologous fibroblasts that were cultured alone in the same conditions. Cleared supernatants replicates from 4 different experiments were collected after 24 hours of culture and stored at -80°C . Cytokines, chemokines and growth factors levels were measured using a 42-multiplexed Affymetrix cytokine assay according to the manufacturer protocol (Procarta/Ozyme). The following cytokines and chemokines were analyzed: IL-1 α (NM_000575), IL-1RA (NM_000577), IL-1 β (NM_000576), IL-2 (NM_000586), IL-2RA (NM_000417), IL-4 (NM_000589), IL-5 (NM_000879), IL-6 (NM_000600), IL-8/CXCL8 (NM_0005843), IL-10 (NM_000572), IL-12 (NM_002187), IL-15 (NM_000585), IL-17A (NM_002190), IL-17F (NM_052872), IL-22 (NM_020525.4), IP10/CXCL10 (NM_001565), Basic-FGF/FGF2 (NM_002006), EGF (NM_005429.2), Eotaxin-3/CCL26 (NM_006072), E-selectin/CD62E (NM_000450), sFas (NM_000043), sFasL (NM_000639), Fractalkine/CX3CL1 (NM_002996), GM-CSF (NM_000758), Granzyme B (NM_004131), GRO α /CXCL-1 (NM_001511), sICAM-1 (NM_000201), Leptin (NM_000230), IFN- α 2 (NM_000605), IFN- β (NM_002176), IFN- γ (NM_000619), IFN- ω (NM_002177), MCP-1/CCL2 (NM_002982), MIP-1 α /CCL3 (NM_002983), MIP-1 β /CCL4

(NM_002984), RANTES/CCL5 (NM_002985), SDF-1/CXCL12 (NM_000609), TGF- α (NM_001099691), TRAIL (NM_003810), TNF- α (NM_000594), TNF- β (NM_001159740), VEGF-A (NM_001025366). Measurement and analysis were performed using the BioRad Bio-Plex System (BioRad, France). Data points are expressed as follows: Specific dNK cell cytokine-chemokine secretion = [Total concentration of dNK cells cultured in the presence of fibroblasts - Fibroblasts secretion].

Explant organ culture preparation and dNK cell tissue invasion

Trophoblastic villous explants established from first trimester elective termination of pregnancy samples. Tissue was minced (1 to 2 mm) and placed in 24 well tissue culture plates in complete tissue culture media (PromoCell, France). After four hours of culture at 37°C and two changes of culture media, explants were at either left uninfected or infected with HCMV AD169 for two days.

For tissue invasion, trophoblast organ culture nuclei were stained with 4 μ M DAPI for 5 min, autologous dNK cells were labeled with 1 μ M Cell Tracker Red (Invitrogen) for 15 min. All staining procedures were performed at 37°C and quenched with 10 ml of tissue culture media containing 10% FCS. Each explant (1–2 mm) was incubated with 5×10^5 dNK cells at 37°C. After two hours of contact, organ explants were gently washed with excess of complete media (4 washes), fixed in 4% paraformaldehyde for 20 min, washed twice in PBS and mounted for two-photon microscopy analysis.

Two-photon microscopy

Images were taken using Zeiss two-photon microscopy at 900 nm laser excitation. Fluorescence emission was collected using dichroic mirrors to split fluorescence into three channels (blue, green and red). Z stacks were taken at 10 μ m slice intervals using Zeiss Zen software. Imaris software was used to analyze the acquired data.

Immunohistochemistry (IHC) examination

HCMV⁺ whole placental biopsies were obtained from two pathological termination of pregnancy (24.5 weeks and 25 weeks of pregnancy). Tissues were fixed in 10% formalin, embedded in paraffin and processed for IHC as previously described [69] Briefly, 6- μ m-thick sections of paraffin-embedded samples were immunostained with an anti-CD56 mAb (1B6 clone) and an anti-HCMV-IE mAb (Argene). Photographs were taken with 40X objective of Leica microscope.

Statistical analysis

Unpaired Student *t* test was calculated using GraphPad Prism 4.0 (GraphPad Software). Unless otherwise indicated, data represent the mean \pm S.D. from at least three independent experiments.

Gene accession numbers

CD69 (NM_001781), NKp30/NCR3 (NM_001145466), NKp44/NCR2 (NM_001199509), NKp46/NCR1 (NM_001145457), NKG2D/KLRK1 (NM_007360), KIR2DL1/CD158A (NM_014218), KIR2DL2/CD158B1 (NM_014219), KIR2DL3/CD158B2 (NM_015868), KIR2DL4/CD158D (NM_001080770), ILT2/LILRB1/CD85j (NM_001081637), NKG2C/KLRK2 (NM_002260), HLA-A,-B,-C (NM_001242758, NM_005514, NM_001243042), HLA-E (NM_005516), HLA-DR (NM_002124).

Supporting Information

Figure S1 Characterization and HCMV-AD169 infectivity of decidual fibroblasts. (A) Decidual fibroblasts were purified as described in M&M. The purity was analyzed using anti-vimentin (green, fibroblasts) and anti-cytokeratin-7 (red, cytotrophoblast) staining. Nuclei were stained with dapi (cyan). (B) Fibroblasts were infected with HCMV (AD169) for 48 h. Nuclei are stained with dapi (cyan) and HCMV-IE (red). Fibroblasts were stained for vimentin (green), α -tubulin (blue). Bar represent 20 μ m. (C) Kinetics of fibroblasts infection was quantified over three days. (TIF)

Figure S2 Specificity of effector cell cytotoxicity. (A) dNK cell cytotoxicity was analyzed against uninfected or AD169-infected autologous decidual fibroblasts after 4 h of contact. (B & C) pNK cell cytotoxicity was analyzed against autologous decidual fibroblasts after 4 h (B) or 18 h (C) assay, mean specific lysis is calculated from triplicates within the same experiment out of four. (D & E) dNK cell cytotoxicity against heterologous decidual fibroblasts analyzed after 4 h (D) or 18 h (E) of contact. Data on the graphs are from one representative experiment out of three. (F) dNK and pNK cell cytotoxicity against K562 classical target cell line after 4 h of contact. (G) dNK cell cytotoxicity towards semi-allogeneic trophoblasts was evaluated in three different decidual samples (Tropho_1, _2 and _3) and compared to lysis of autologous infected decidual fibroblasts. (H) Recombinant FasL and TRAIL induce lysis of Jurkat cell line. Jurkat cells were incubated with recombinant TRAIL (rTRAIL) or FasL (rFasL). Specific lysis was performed in the absence or the presence of blocking antibodies against TRAIL (α -TRAIL) or FasL (α -FasL). (TIF)

Figure S3 MTOC polarization and Golgi relocation to the immune synapse. Uninfected (AD169⁻) or HCMV-infected (AD169⁺) decidual fibroblasts (F) plated on glass coverslips were incubated with autologous dNK cells (dNK) for 20 min at 37°C. (A) Formed conjugates were fixed and permeabilized for intracellular staining of F-actin (blue), α -tubulin microtubules (green) and Golgin (red) simultaneously. Scale bar represent 20 μ m. Enlargement of the synaptic area of conjugates presented in the right panels. Asterisks indicate the MTOC. Arrowheads point to the Golgi apparatus. Scale bar represent 5 μ m. (B) Bar graphs show the frequency of conjugates formation between dNK cells and autologous fibroblasts that were either kept uninfected (AD169⁻) or HCMV-infected (AD169⁺). More than 500 fibroblasts (white graphs) and at least 50 conjugates (black graphs) were scored in each experiment (n = 5). Statistical analysis was performed using unpaired Student's *t*-test. ***, *p* < 0.001. (C) Immunostaining for F-actin (phalloidin in green), HCMV-IE1 (pink), CD2 (red). Scale bar, 20 μ m. (TIF)

Figure S4 Analysis of NK cell receptor repertoire during HCMV infection. (A) dNK cells were co-cultured with autologous fibroblasts that were either kept uninfected or infected with HCMV AD169 for 48 h. dNK cells were stained for surface expression of the indicated receptor using fluorochrome-conjugated antibodies and analyzed by FACS. Representative FACS histograms gated on CD56^{pos} CD3^{neg} dNK cells are shown (n = 5). Specific receptors are indicated below each panel. dNK cells in contact with uninfected fibroblasts are represented by black line, dNK cells in contact with HCMV-infected fibroblasts are represented by shaded gray. Dotted gray line represents isotype-matched control Ig. (B) dNK cells were co-cultured with

autologous fibroblasts that were either uninfected or infected with HCMV-AD169 for 18 h. dNK cells were stained for surface expression of the indicated receptor using fluorochrome-conjugated antibodies and analyzed by flow cytometry as indicated above. Representative FACS histograms gated on CD56^{pos} CD3^{neg} dNK cells are shown (n = 5). dNK cells in contact with uninfected fibroblasts are represented by black line, dNK cells in contact with HCMV-infected fibroblasts are represented by shaded gray. Dotted gray line represents isotype-matched control Ig. One representative histogram out of five independent experiments is shown. (C) pNK cells were co-cultured with autologous decidual fibroblasts that were either uninfected or infected with HCMV-VHLE for 18 h. pNK cells were stained for surface expression of the indicated receptor using fluorochrome-conjugated antibodies and analyzed by flow cytometry as indicated above. Representative FACS histograms gated on CD56^{pos} CD3^{neg} pNK cells are shown (n = 3). Cells in contact with uninfected fibroblasts are represented by black line, with VHLE-infected fibroblasts are represented by shaded dark gray. Light gray histograms represent isotype-matched control Ig. One representative histogram out of three independent experiments is shown. (TIF)

Figure S5 HCMV infection down-modulates cell surface expression of HLA-E without affecting the total amounts of HLA-E. (A) HCMV-VHLE infection modulates the expression of NKR ligands on decidual fibroblasts. The binding of human NKp30-Fc, NKp46-Fc, NKp44-Fc, NKG2D-Fc and CD99-Fc chimera was used to evaluate the cell surface expression of specific receptor ligands. HLA-E cell surface expression evaluated using MEM-E/08 mAb. One representative FACS histogram out of three independent experiments is shown. Uninfected (black line), VHLE-infected (shaded dark gray). (B) HLA-E expression evaluated in additional three decidual fibroblasts from three independent deciduas (dFibro_1, _2, _3) or in MRC-5 cell line. HLA-A, -B, -C expression by MRC-5 cells was analyzed by specific mAb. For MRC-5 cells, FACS histograms are representative of three independent experiments. Uninfected (black line), HCMV-infected (shaded dark gray). Light gray (line or shaded) histogram represent isotype-matched control Ig. (C) HLA-E detected by western blot in MRC-5 cells or decidual fibroblast from three different deciduas. Cells were HCMV-infected for 48 h. HLA-E detected by MEM-E/06 (top gel) and anti- β -actin (bottom gel). The size of protein ladder is given in kDa. (TIF)

Figure S6 HCMV infection regulates NKR ligand expression in decidual fibroblasts: Role on pNK cell cytotoxicity. (A) K562 cell line were incubated with CD99-Fc (CTRL), NKp46-Fc, NKp30-Fc chimera and used as target cells to evaluate pNK cell cytotoxicity in a 4 h chromium release assay. (B–E) pNK cells cytotoxicity against uninfected (gray plots) or VHLE-infected autologous decidual fibroblasts (black plots) after 18 h of contact. (B) NKp30-Fc, (C) NKp46-Fc, (D) NKp44-Fc, (E) NKG2D-Fc chimeric receptors were used to block the corresponding specific ligands. CD99-Fc soluble receptor was used as control (CTRL). (F) Analysis of NKG2A and NKG2C/E function was performed in the presence of blocking antibody against HLA-E molecules (α -HLA-E) or isotype matched control. Data sets represent mean lysis \pm S.D. from three independent experiments done in replicate. Statistical comparisons were performed using two-way ANOVA test. ***, *p* < 0.001. (TIF)

Figure S7 HCMV infection modulates Fibroblasts cytokine/chemokine production. Decidual fibroblasts were kept

uninfected (AD169⁻, gray) or AD169-infected (AD169⁺, black) for 48 h with HCMV-AD169 strain. Cytokines were quantified in the supernatants using a 42-multi-plexed cytokine assay. Representative histograms from specific cytokines-chemokines that are produced by uninfected and HCMV-infected decidual fibroblasts are presented. Normalized data points are given as mean values \pm S.D. calculated from four independent experiments. (TIF)

Text S1 Supplementary material and methods. (DOCX)

Video S1 dNK cells are localized at the external boarder of uninfected autologous trophoblasts. Three-dimensional reconstruction of dNK cell infiltration of chorionic *villi* organ explant shown in Figure 6. Volume rendering reconstruction and animation were obtained from two-photon Z-stack taken at 10 μ m slice intervals using Imaris software of 200 μ m section. dNK cells (Cell tracker Red), dapi staining of explants' nuclei (cyan). Images are at 5 frames/s; Scale bar: 100 μ m. (AVI)

Video S2 dNK cells infiltrate and form “immune synapse-like structures” with AD-169 infected autologous trophoblasts. Three-dimensional reconstruction of dNK cell infiltrating HCMV-infected chorionic *villi* organ explant shown in Figure 6. Volume rendering reconstruction and animation were obtained as in video S1. Images are at 5 frames/s; Scale bar: 100 μ m. (AVI)

Acknowledgments

We would like to thank C. Davrinche for providing HCMV strains and for helpful discussions. We thank D. Gonzales-Dunia and R. Al Daccak for critically reading the manuscript. We thank M. March for IHC experiments. We are grateful for the help from UMR 5282's cell imaging and flow cytometry facilities. We also thank patients and MDs from Paule de Viguier Hospital for providing clinical material to this study.

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: NJF. Performed the experiments: JS HEC JT. Analyzed the data: JS NJF. Contributed reagents/materials/analysis tools: AB GC PB. Wrote the paper: JS NJF.

References

- Cannon MJ (2009) Congenital cytomegalovirus (CMV) epidemiology and awareness. *J Clin Virol* 46 Suppl 4: S6–10.
- Gohring K, Dietz K, Hartleif S, Jahn G, Hamprecht K (2010) Influence of different extraction methods and PCR techniques on the sensitivity of HCMV-DNA detection in dried blood spot (DBS) filter cards. *J Clin Virol* 48: 278–281.
- Berger A, Reitter A, Harter PN, Buxmann H, Allwinn R, et al. (2011) Problems and challenges in the diagnosis of vertical infection with human cytomegalovirus (CMV): lessons from two accidental cases. *J Clin Virol* 51: 285–288.
- Enders G, Daiminger A, Bader U, Exler S, Enders M (2011) Intrauterine transmission and clinical outcome of 248 pregnancies with primary cytomegalovirus infection in relation to gestational age. *J Clin Virol* 52: 244–246.
- Pereira L, Maidji E (2008) Cytomegalovirus infection in the human placenta: maternal immunity and developmentally regulated receptors on trophoblasts converge. *Curr Top Microbiol Immunol* 325: 383–395.
- Manaster I, Mandelboim O (2010) The unique properties of uterine NK cells. *Am J Reprod Immunol* 63: 434–444.
- Whitelaw PF, Croy BA (1996) Granulated lymphocytes of pregnancy. *Placenta* 17: 533–543.
- Vacca P, Pietra G, Falco M, Romeo E, Bottino C, et al. (2006) Analysis of natural killer cells isolated from human decidua: Evidence that 2B4 (CD244) functions as an inhibitory receptor and blocks NK-cell function. *Blood* 108: 4078–4085.
- El Costa H, Casemayou A, Aguerre-Girr M, Rabot M, Berrebi A, et al. (2008) Critical and differential roles of NKP46- and NKP30-activating receptors expressed by uterine NK cells in early pregnancy. *J Immunol* 181: 3009–3017.
- Hanna J, Goldman-Wohl D, Hamani Y, Avraham I, Greenfield C, et al. (2006) Decidual NK cells regulate key developmental processes at the human fetal-maternal interface. *Nat Med* 12: 1065–1074.
- Keskin DB, Allan DS, Rybalov B, Andzelm MM, Stern JN, et al. (2007) TGF β promotes conversion of CD16⁺ peripheral blood NK cells into CD16⁻ NK cells with similarities to decidual NK cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104: 3378–3383.
- Koopman LA, Kopcow HD, Rybalov B, Boyson JE, Orange JS, et al. (2003) Human decidual natural killer cells are a unique NK cell subset with immunomodulatory potential. *J Exp Med* 198: 1201–1212.
- Le Bouteiller P, Siewiera J, Casart Y, Aguerre-Girr M, El Costa H, et al. (2011) The human decidual NK-cell response to virus infection: what can we learn from circulating NK lymphocytes? *J Reprod Immunol* 88: 170–175.
- Santoni A, Carlino C, Gismondi A (2008) Uterine NK cell development, migration and function. *Reprod Biomed Online* 16: 202–210.
- Vacca P, Cantoni C, Vitale M, Prato C, Canegallo F, et al. (2010) Crosstalk between decidual NK and CD14⁺ myelomonocytic cells results in induction of Tregs and immunosuppression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107: 11918–11923.
- Cooper MA, Fehniger TA, Caligiuri MA (2001) The biology of human natural killer-cell subsets. *Trends Immunol* 22: 633–640.
- Hanna J, Bechtel P, Zhai Y, Youssef F, McLachlan K, et al. (2004) Novel insights on human NK cells' immunological modalities revealed by gene expression profiling. *J Immunol* 173: 6547–6563.
- Male V, Hughes T, McClory S, Colucci F, Caligiuri MA, et al. (2010) Immature NK cells, capable of producing IL-22, are present in human uterine mucosa. *J Immunol* 185: 3913–3918.
- Male V, Trundle A, Gardner L, Northfield J, Chang C, et al. (2010) Natural killer cells in human pregnancy. *Methods Mol Biol* 612: 447–463.
- King A, Kalra P, Loke YW (1990) Human trophoblast cell resistance to decidual NK lysis is due to lack of NK target structure. *Cell Immunol* 127: 230–237.
- Kopcow HD, Allan DS, Chen X, Rybalov B, Andzelm MM, et al. (2005) Human decidual NK cells form immature activating synapses and are not cytotoxic. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102: 15563–15568.
- Lopez-Botet M, Angulo A, Guma M (2004) Natural killer cell receptors for major histocompatibility complex class I and related molecules in cytomegalovirus infection. *Tissue Antigens* 63: 195–203.
- Kuijpers TW, Baars PA, Dantin C, van den Burg M, van Lier RA, et al. (2008) Human NK cells can control CMV infection in the absence of T cells. *Blood* 112: 914–915.
- Lanier LL (2008) Up on the tightrope: natural killer cell activation and inhibition. *Nat Immunol* 9: 495–502.
- Saez-Borderias A, Romo N, Magri G, Guma M, Angulo A, et al. (2009) IL-12-dependent inducible expression of the CD94/NKG2A inhibitory receptor regulates CD94/NKG2C⁺ NK cell function. *J Immunol* 182: 829–836.
- Alter G, Altfield M (2009) NK cells in HIV-1 infection: evidence for their role in the control of HIV-1 infection. *J Intern Med* 265: 29–42.
- Orr MT, Murphy WJ, Lanier LL (2010) ‘Unlicensed’ natural killer cells dominate the response to cytomegalovirus infection. *Nat Immunol* 11: 321–327.
- Alter G, Heckerman D, Schneidewind A, Fadda L, Kadie CM, et al. (2011) HIV-1 adapting to NK-cell-mediated immune pressure. *Nature* 476: 96–100.
- Waggoner SN, Cornberg M, Selin LK, Welsh RM (2011) Natural killer cells act as rheostats modulating antiviral T cells. *Nature* 481: 394–8.
- Lopez-Verges S, Milush JM, Schwartz BS, Pando MJ, Jarjoura J, et al. (2011) Expansion of a unique CD57NKG2Chi natural killer cell subset during acute human cytomegalovirus infection. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108: 14725–14732.
- Vivier E, Raulet DH, Moretta A, Caligiuri MA, Zitvogel L, et al. (2011) Innate or adaptive immunity? The example of natural killer cells. *Science* 331: 44–49.
- Markel G, Wolf D, Hanna J, Gazit R, Goldman-Wohl D, et al. (2002) Pivotal role of CEACAM1 protein in the inhibition of activated decidual lymphocyte functions. *J Clin Invest* 110: 943–953.
- Mselle TF, Howell AL, Ghosh M, Wira CR, Sentman CL (2009) Human uterine natural killer cells but not blood natural killer cells inhibit human immunodeficiency virus type 1 infection by secretion of CXCL12. *J Virol* 83: 11188–11195.
- Orange JS (2008) Formation and function of the lytic NK-cell immunological synapse. *Nat Rev Immunol* 8: 713–725.
- Mentlik AN, Sanborn KB, Holzbaur EL, Orange JS (2010) Rapid lytic granule convergence to the MTOC in natural killer cells is dependent on dynein but not cytotlytic commitment. *Mol Biol Cell* 21: 2241–2256.
- Rak GD, Mace EM, Banerjee PP, Svitkina T, Orange JS (2011) Natural killer cell lytic granule secretion occurs through a pervasive actin network at the immune synapse. *PLoS Biol* 9: e1001151.
- Blaschitz A, Weiss U, Dohr G, Desoye G (2000) Antibody reaction patterns in first trimester placenta: implications for trophoblast isolation and purity screening. *Placenta* 21: 733–741.
- Toledo MS, Suzuki E, Handa K, Hakomori S (2005) Effect of ganglioside and tetraspanins in microdomains on interaction of integrins with fibroblast growth factor receptor. *J Biol Chem* 280: 16227–16234.
- Davis DM, Chiu I, Fassett M, Cohen GB, Mandelboim O, et al. (1999) The human natural killer cell immune synapse. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96: 15062–15067.

40. Inoue H, Miyaji M, Kosugi A, Nagafuku M, Okazaki T, et al. (2002) Lipid rafts as the signaling scaffold for NK cell activation: tyrosine phosphorylation and association of LAT with phosphatidylinositol 3-kinase and phospholipase C-gamma following CD2 stimulation. *Eur J Immunol* 32: 2188–2198.
41. Arnon TI, Achdout H, Levi O, Markel G, Saleh N, et al. (2005) Inhibition of the Nkp30 activating receptor by pp65 of human cytomegalovirus. *Nat Immunol* 6: 515–523.
42. Prod'homme V, Tomasec P, Cunningham C, Lemberg MK, Stanton RJ, et al. (2012) Human cytomegalovirus UL40 signal peptide regulates cell surface expression of the NK cell ligands HLA-E and gpUL18. *J Immunol* 188: 2794–2804.
43. Tomasec P, Braud VM, Rickards C, Powell MB, McSharry BP, et al. (2000) Surface expression of HLA-E, an inhibitor of natural killer cells, enhanced by human cytomegalovirus gpUL40. *Science* 287: 1031.
44. Guma M, Angulo A, Lopez-Botet M (2006) NK cell receptors involved in the response to human cytomegalovirus infection. *Curr Top Microbiol Immunol* 298: 207–223.
45. Guma M, Budt M, Saez A, Brckalo T, Hengel H, et al. (2006) Expansion of CD94/NKG2C+ NK cells in response to human cytomegalovirus-infected fibroblasts. *Blood* 107: 3624–3631.
46. Dumortier J, Streblov DN, Moses AV, Jacobs JM, Kreklywich CN, et al. (2008) Human cytomegalovirus secretome contains factors that induce angiogenesis and wound healing. *J Virol* 82: 6524–6535.
47. Kuhn JR, Poenic M (2002) Dynamic polarization of the microtubule cytoskeleton during CTL-mediated killing. *Immunity* 16: 111–121.
48. Trambas CM, Griffiths GM (2003) Delivering the kiss of death. *Nat Immunol* 4: 399–403.
49. Stinchcombe JC, Majorovits E, Bossi G, Fuller S, Griffiths GM (2006) Centrosome polarization delivers secretory granules to the immunological synapse. *Nature* 443: 462–465.
50. Stinchcombe JC, Salio M, Cerundolo V, Pende D, Arico M, et al. (2011) Centriole polarisation to the immunological synapse directs secretion from cytolytic cells of both the innate and adaptive immune systems. *BMC Biol* 9: 45.
51. Straszewski-Chavez SL, Abrahams VM, Funai EF, Mor G (2004) X-linked inhibitor of apoptosis (XIAP) confers human trophoblast cell resistance to Fas-mediated apoptosis. *Mol Hum Reprod* 10: 33–41.
52. Kalkunte SS, Mselle TF, Norris WE, Wira CR, Sentman CL, et al. (2009) Vascular endothelial growth factor C facilitates immune tolerance and endothelial activity of human uterine NK cells at the maternal-fetal interface. *J Immunol* 182: 4085–4092.
53. Chen X, Trivedi PP, Ge B, Krzewski K, Strominger JL (2007) Many NK cell receptors activate ERK2 and JNK1 to trigger microtubule organizing center and granule polarization and cytotoxicity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104: 6329–6334.
54. Delahaye NF, Rusakiewicz S, Martins I, Menard C, Roux S, et al. (2011) Alternatively spliced Nkp30 isoforms affect the prognosis of gastrointestinal stromal tumors. *Nat Med* 17: 700–707.
55. Eagle RA, Traherne JA, Hair JR, Jafferji I, Trowsdale J (2009) ULBP6/RAET1L is an additional human NKG2D ligand. *Eur J Immunol* 39: 3207–3216.
56. Bennett NJ, Ashiru O, Morgan FJ, Pang Y, Okecha G, et al. (2010) Intracellular sequestration of the NKG2D ligand ULBP3 by human cytomegalovirus. *J Immunol* 185: 1093–1102.
57. Kaiser BK, Barahmand-Pour F, Paulsene W, Medley S, Geraghty DE, et al. (2003) Interactions between NKG2x immunoreceptors and HLA-E ligands display overlapping affinities and thermodynamics. *J Immunol* 174: 2878–2884.
58. Hanna J, Gonen-Gross T, Fitchett J, Rowe T, Daniels M, et al. (2004) Novel APC-like properties of human NK cells directly regulate T cell activation. *J Clin Invest* 114: 1612–1623.
59. Zingoni A, Sornasse T, Cocks BG, Tanaka Y, Santoni A, et al. (2004) Cross-talk between activated human NK cells and CD4+ T cells via OX40-OX40 ligand interactions. *J Immunol* 173: 3716–3724.
60. Slinger E, Maussang D, Schreiber A, Siderius M, Rahbar A, et al. (2010) HCMV-encoded chemokine receptor US28 mediates proliferative signaling through the IL-6-STAT3 axis. *Sci Signal* 3: ra58.
61. Hurst SM, Wilkinson TS, McLoughlin RM, Jones S, Horiuchi S, et al. (2001) IL-6 and its soluble receptor orchestrate a temporal switch in the pattern of leukocyte recruitment seen during acute inflammation. *Immunity* 14: 705–714.
62. Nordoy I, Muller F, Nordal KP, Rollag H, Aukrust P, et al. (2000) Chemokines and soluble adhesion molecules in renal transplant recipients with cytomegalovirus infection. *Clin Exp Immunol* 120: 333–337.
63. Muntassell A, Magri G, Pende D, Angulo A, Lopez-Botet M (2010) Inhibition of NKG2D expression in NK cells by cytokines secreted in response to human cytomegalovirus infection. *Blood* 115: 5170–5179.
64. Nguyen KB, Salazar-Mather TP, Dalod MY, Van Deusen JB, Wei XQ, et al. (2002) Coordinated and distinct roles for IFN-alpha beta, IL-12, and IL-15 regulation of NK cell responses to viral infection. *J Immunol* 169: 4279–4287.
65. Gur C, Doron S, Kfir-Erenfeld S, Horwitz E, Abu-Tair L, et al. (2012) Nkp46-mediated killing of human and mouse hepatic stellate cells attenuates liver fibrosis. *Gut* 61: 885–893.
66. Ohira M, Ishiyama K, Tanaka Y, Doskali M, Igarashi Y, et al. (2009) Adoptive immunotherapy with liver allograft-derived lymphocytes induces anti-HCV activity after liver transplantation in humans and humanized mice. *J Clin Invest* 119: 3226–3235.
67. Rauwel B, Mariame B, Martin H, Nielsen R, Allart S, et al. (2010) Activation of peroxisome proliferator-activated receptor gamma by human cytomegalovirus for de novo replication impairs migration and invasiveness of cytotrophoblasts from early placentas. *J Virol* 84: 2946–2954.
68. Didier C, Merdes A, Gairin JE, Jabrane-Ferrat N (2008) Inhibition of proteasome activity impairs centrosome-dependent microtubule nucleation and organization. *Mol Biol Cell* 19: 1220–1229.
69. Jabrane-Ferrat N, Campbell MJ, Esserman LJ, Peterlin BM (2006) Challenge with mammary tumor cells expressing MHC class II and CD80 prevents the development of spontaneously arising tumors in MMTV-neu transgenic mice. *Cancer Gene Ther* 13: 1002–1010.

Article 2:

**Microenvironment During Pregnancy Conditions NCR Isoform Expression By
Decidual Natural Killer Cells**

Johan Siewiera, Jordi Gouilly, Laura Lauden, Christian Davrinche, Géraldine Cartron, Claude Levy,
Reem Al-Daccak and Nabila Jabrane-Ferrat

Manuscrit en préparation

Microenvironment during pregnancy conditions NCR isoform expression by decidual Natural Killer cells

Johan Siewiera^{1,2,3}, Jordi Gouilly^{1,2,3}, Laura Lauden⁴, Christian Davrinche^{1,2,3}, Géraldine Cartron⁵, Claude Levy⁶, Reem Al-Daccak⁴ and Nabila Jabrane-Ferrat^{1,2,3#}

¹*Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale; UMR 1043, Toulouse 31300, France*

²*Centre National Recherche Scientifique; UMR 5282, Toulouse 31300, France*

³*Université Toulouse III Paul Sabatier, Toulouse 31400, France*

⁴*INSERM UMRS940, Institut Universitaire d'Hématologie, Université Paris-Diderot and Laboratoire d'Immunologie et d'Histocompatibilité, Hôpital Saint Louis, Paris, France.*

⁵*Service de Gynécologie-Obstétrique, Centre Hospitalo-Universitaire de Toulouse, Hôpital Paule de Viguier, 31059 Toulouse, France*

⁶*Clinique Sarrus Teinturiers, Toulouse, France*

Short title:

Microenvironment selection of NCR variants

Abbreviations: NK, Natural Killer; dNK, decidual Natural Killer cells; NCR, Natural cytotoxicity Receptor.

Keywords: Decidual NK cells, Peripheral blood NK cell, NCR isoforms.

#Corresponding Author:

Nabila Jabrane-Ferrat, PhD

Centre de Physiopathologie Toulouse Purpan

CNRS UMR5282- INSERM U1043- Université Toulouse III

Toulouse, FRANCE

Tel : +33 5 62 74 83 85 e-mail: nabila.jabrane-ferrat@inserm.fr

Introduction

Natural killer (NK) cells have been originally classified as part of the innate immune system as they respond rapidly to invading pathogens without prior sensitization. However, recent works shed the light on NK cell effector functions and demonstrated that these cells share many features with adaptive immune cells. Despite the lack of receptor gene rearrangement, NK cells are able to expand after cognate antigen encounter, generate long-lasting “memory-like” cells that have the ability to mount an enhanced secondary immune response (Lopez-Verges et al., 2011; Sun et al., 2009). Moreover, a large variety of functionally distinct populations exist for NK cells.

NK cell effector functions are orchestrated by a wide array of germline-encoded inhibitory and activating receptors or co-receptors, many of which are expressed in a stochastic pattern. The expression of at least one inhibitory receptor during development is necessary for NK cell education and licensing. NK cell inhibitory receptors including CD94-NKG2A and the highly polymorphic inhibitory KIRs are able to recognize self-major histocompatibility complex (MHC) class I proteins. Several activating receptors can also recognize self-antigens. For example, major activating receptors such as NKG2D, activating KIRs or CD94-NKG2C receptors also recognize self-MHC-Ia and b molecules, while the “natural cytotoxicity receptors” (NCR) group (NKp30, NKp44, and NKp46) recognize yet to be identified self-ligands (Lanier, 2008; Moretta and Moretta, 2004; Vivier et al., 2004). Other activating co-receptors such as CD2, CD244 (2B4), and CD226 (DNAM-1) or LFA1 recognize a broad range of self-ligands.

The three NCRs (NKp46, NKp44 and NKp30) belong to the immunoglobulin-like family of NK receptors (NKR) and are clearly involved in the control of NK cell effector functions. The three NCRs are quite different from each other's even if they are involved in similar functions. NKp44 is expressed only on activated peripheral blood NK cells, while NKp46 and NKp30 are expressed on resting as well as activated NK cells (Cantoni et al., 1999; Sivori et al., 1997; Vitale et al., 1998). NKp30 and NKp46 that are expressed by all NK cell populations are involved in cytotoxic function against infected cells and tumors. *NCRs* genes encode proteins which contain a trans-membrane (TM) domain and a short cytoplasmic tail. *NCR1* (*NKp46* gene) encodes a protein with two Ig domains while *NCR2* (*NKp44*) and *NCR3* (*NKp30*) genes encode receptors with a single extracellular Ig domain. *NCRs* can be transcribed from several splice sites. For instance, *NKp30* gene (*NCR3*) is transcribed in 6 different splice variants with NKp30a, NKp30b, NKp30c being the most abundant transcripts (Hollyoake et al., 2005). The three isoforms of the receptor have different lengths of the intra-cellular domain (36, 12 or 15 aa residues) and different functions. NKp30a and NKp30b convey stimulatory functions while NKp30c seems to be immunosuppressive.

NKp44 gene (*NCR2*) and *NKp46* gene (*NCR1*) can also be transcribed from alternative splicing sites that could give rise to several isoforms. While no functional differences were observed for NKp46 splice variants, studies on NKp44 suggest the presence of an inhibitory isoform of the receptor.

During the first trimester of pregnancy, the maternal endometrium undergoes huge changes that are characterized by infiltration of the *decidua basalis* by decidual natural killer (dNK) cells that account for more than 70% of leukocytes within this tissue. By secreting large array of cytokines/chemokines and angiogenic factors, dNK cells participate in all steps of placentation including trophoblast differentiation/invasion into the maternal endometrium. Furthermore, by direct interaction with endothelial, smooth muscle cells and fetal trophoblasts these cells play a central role in spiral arteries' remodeling. Several reports indicate that fetal trophoblast express ligands for major NK cell receptors which are in favor of direct interactions between dNK and trophoblast cells. dNK cells are mainly CD56^{bright}CD16^{neg} and they are clearly different from their pNK cells counterparts both at phenotypic and functional levels (El Costa et al., 2008; Hanna et al., 2006; Moffett-King, 2002). While they express high amounts of granzymes and perforin, under healthy conditions, these cells are devoid of cytotoxic function and they rather secrete a large panel of cytokines, chemokines and growth factors that are necessary for vascular remodeling and trophoblast attraction (Apps et al., 2008; El Costa et al., 2008; Hanna et al., 2006; Jabrane-Ferrat and Siewiera, 2014; Siewiera et al., 2013; Vacca et al., 2008). Today, very little information is available on the origin of human dNK cells. They could derive from NK cell progenitors that migrate to the decidua and proliferate/differentiate in a local environment enriched in steroid hormones and cytokines/chemokines. The presence of an immature population of NK cells in the uterus even before conception further supports this notion of progenitors' migration (Bulmer and Lash, 2005); (Jabrane-Ferrat and Siewiera, 2014; Kane et al., 2009; Vacca et al., 2011). dNK cells might also derive from pNK cells that migrate to the decidua through the axis CXCR3-CXCL10 and/or CXCR4-CXCL12 and acquire decidual phenotype within the local microenvironment (Eriksson et al., 2004; Hanna et al., 2006; Keskin et al., 2007; Kunkel et al., 2002). Consistent with the notion of microenvironmental pressure, TGF- β alone or combined with IL-15 and/or a demethylating agent promotes the emergence of NK cell subset with reduced cytotoxic functions *in vitro* (Cerdeira et al., 2013; Keskin et al., 2007).

Regardless of their origin as recruited or resident precursors/progenitors that mature locally, it is clearly admitted that the decidual microenvironment conditions the education and/or the generation of dNK cells with unique phenotypic and functional properties to support healthy pregnancy (Jabrane-Ferrat and Siewiera, 2014; Parham and Guethlein, 2010). Unlike resting pNK cells, dNK cells express the CD69 activation marker and a large fraction express NKp44 activating receptor. Furthermore, the majority of first-trimester dNK cells express NKp46 and NKG2D activating receptors. More than 30% of dNK cells express NKp30, NKp44 and CD94-NKG2C activating receptors and show high levels of CD94-NKG2A inhibitory receptor. Activation of dNK cells occurs mainly through NCRs and NKG2D receptors (El Costa et al., 2008; Hanna et al., 2006; Vacca et al., 2008).

By contrast to pNK cells, none of the NCR receptors is involved in the acquisition of cytotoxic effector function triggered by HCMV infection. This discrepancy between NCR's function in dNK cells and pNK cells cytotoxicity might be related to differences in ligand-receptor affinity or to the expression of different forms of the NCRs. dNK cells might express different NCRs' isoforms as a result of selection pressure coming from the microenvironment. For instance, uterine NK cells express a highly glycosylated form of NKp30 receptor and this degree of glycosylation might regulate the functional status of NKp30 (Ponnampalam et al., 2008). Moreover, an immunosuppressive microenvironment such as in cancer might select for the expression of inhibitory isoforms as a result of *NCRs*' alternative splicing (Delahaye et al., 2011).

In the present study, we investigated the involvement of decidual microenvironment in the selection of NCR variants that are characteristic of dNK cells. We demonstrate that first trimester dNK cells express different NCR isoforms than pNK cells. Importantly, we show that alternative splicing of *NCR2* and *3* controls NK cell cytotoxic function and that the decidual cytokine microenvironment is key player for the selection of inhibitory rather than activating isoforms of these receptors.

Materials and methods

Ethics statement

Informed consent was provided according to the Declaration of Helsinki and approved by the local Research Ethical Comity Haute-Garonne (Agence de la Biomédecine, PFS08-022). All patients included in the study signed the informed consent before samples were taken.

Cell purification, cell lines

dNK cells were purified from first-trimester *decidua basalis* (8-12 wk of pregnancy) obtained after elective termination of pregnancy as previously described (El Costa et al., 2008) (El Costa et al., 2008) (El Costa et al., 2008) (El Costa et al., 2008) (El Costa et al., 2008) (El Costa et al., 2008) (El Costa et al., 2008) (El Costa et al., 2008). Briefly, *decidua* samples were minced, collagenase IV treated. Cell suspension is then allowed to adhere overnight in tissue cultures plate. dNK cells were purified from the non adherent cell fraction using MACS negative selection kits according to the manufacturer procedure (Miltenyi Biotech). dNK cells were stored at 4°C in conditioned media containing 20% heat-inactivated fetal calf serum (FCS). Fresh human pNK cells were isolated from healthy blood donors by MACS negative selection. The purity of dNK cells and pNK cells was assessed using a cocktail of specific monoclonal antibodies (mAb). More than 98% of purified cells were CD3^{neg} and CD56^{pos}.

Immunoblotting.

Tyrosine phosphorylation was detected by immunoblot analysis. Briefly, 2×10^6 purified dNK or pNK cells were seeded in 96-well plates coated with 2.5 µg/ml of mouse, α NKp30- (clone 210847) and α NKp46-specific antibodies (clone 195314), goat purified polyclonal α NKp44 or isotype matched control from R&D systems. After 4 hours of receptor cross-linking, NK cells were washed in cold PBS and lysed in sample buffer containing 1% NP40, 20mM HEPES (pH 7.9), 10mMKCl, 1mM EDTA, 1mM PMSF, 1% glycerol, and cocktail of proteases and phosphatases inhibitors.

8 µg of total proteins were separated on 12% SDS-PAGE gels and electrotransferred to Immobilon membranes. After blocking with 0.5% BSA and 0.1% Tween-20, protein-bound membranes were probed with primary antibody specific for phosphotyrosine (16-316, 4G10R Platinum, Fournisseur). Protein levels were normalized by probing the same membranes with primary antibody that recognize β -actin (MAB1501, clone C4). Finally, membrane-bound antibodies were detected with the appropriate horseradish peroxidase-labeled secondary antibodies and ECL Plus detection system.

Degranulation assay, CD107a expression.

For degranulation assay, dNK cells and pNK cells (2×10^5 per wells), freshly isolated or cultured for 6 days in presence of indicated cytokines, were incubated with the indicated activating monoclonal antibodies or isotype matched control for different time points. Reactions were stopped on ice, activated cells were stained with fluorochrome-conjugated anti-human CD107a (BD Pharmingen) or isotype matched control mAb in staining buffer containing 1% FCS. Fluorescence was analyzed by Flow Cytometry.

Flow cytometry based phenotype analysis

2×10^5 pNK cells were cultured in media or in presence of indicated cytokines (12.5 μ g/ml of TGF- β , 2.5 μ g/ml of IL-15 and 5 μ g/ml of IL-18) for 6 days. Media were refreshed every 48 hours. pNK cells were then labeled with fluorophore-conjugated antibodies. The following mAbs were used: α CD56-APC, α CD3-PE-Cy7, α CD16-PE, α CD69-FITC, α CD2-PE, α NKG2D-PE, α NKG2A-PE, α 2B4-PE; (BD Pharmingen, France); α NKp30-PE, α NKp44-PE, α NKp46-PE (Beckman Coulter, France); α NKG2C-FITC (R&D Systems, France) or the corresponding fluorochrome conjugated isotype matched controls. Histograms shown were obtained by applying a gate on CD56^{pos} CD3^{neg} cells. Data were analyzed using FlowJo software.

To assess cell death, pNK cells cultured in conditioned media (5×10^5 pNK cells per condition) were stained with propidium iodide (In VitroGen). Cells were counted on hemocytometer before use in cytometry to evaluate PI positive cell number.

Immunofluorescence and Confocal microscopy

For confocal microscopy analyses, dNK cells were cultured on glass coverslips coated with α NKp30, α NKp44 and α NKp46 activating antibodies and incubated at 37°C during 20 min. Cells were washed briefly with PBS and fixed with 4% paraformaldehyde for 20 min. Cells were washed in PBS supplemented with 1% mouse serum and 3% BSA. All intracellular staining were performed in the presence of 0.5% Saponin as previously described. Cells were stained with primary antibodies (α -perforin, α -tubulin), followed by incubation with Alexa Fluor conjugated secondary antibody (Invitrogen) as previously described. Filamentous actin cytoskeleton was visualized with Alexa Fluor-conjugated phalloidin and nuclei were stained with DAPI. After extensive washing, coverslips were mounted with vectashield mounting medium (DAKO). Fluorescence was analyzed using Zeiss LSM710 confocal microscope using a 63x oil objective (Carl Zeiss AG, Jena, Germany). Images were processed using ImageJ software.

Quantitative PCR.

Total cellular RNA was isolated from purified dNK cells, pNK cells pNK cells cultured in conditioned media with the RNeasy kit. First-strand cDNA was synthesized from 1µg of total RNA using SuperScript III reverse transcriptase and random primers according to Invitrogen's instructions. Primer sequences for quantitative RT-PCR of the three *NCR3* (NKp30) transcripts were previously described (Zitvogel). The qPCR primers for the three *NCR2* (NKp44) transcripts and the *β-actin* housekeeping transcript were designed with using NCBI primer blast. Quantitative PCR reactions were prepared with LightCycler 480 DNA SYBR Green I Master reaction mix (Roche, Mannheim, Germany) and run for 40 cycles in triplicate on a LightCycler 480 Instrument (Roche). The relative amounts of the transcripts encoding the gene of interest were determined in each sample by normalization with respect to the *actin* housekeeping gene, according to the standard ΔC_t method. Data were analyzed with LightCycler® 480 Software release 1.5.0.

Results

NCR activated dNK and pNK form different immune synapse

We previously demonstrated that engagement of NCRs triggers different functions in dNK and pNK cells. Unlike pNK cells, engagement of NKp30 on dNK cells resulted preferentially in cytokine secretion (El costa) while engagement of NKp46 results induces cytotoxic functions both in dNK and pNK cells. Furthermore, blockade of NKp44 enhanced dNK cell cytotoxicity against HCMV infected targets (Siewiera et al 2013). To understand functional differences between freshly isolated dNK cells and pNK cells cultured in low doses of IL-15, we first compared the molecular organization of immune synapse after ligation of single NCR. Recent work has defined the spatial-temporal organization of NK cell immune synapse. Cytolytic synapse is associated with cortical actin remodeling in micro-domains that are found in the vicinity of the microtubule organizing center (MTOC) and serve as a docking site for lytic granules. We analyzed the organization of immune synapse in cells that were activated through engagement of NCRs using glass cover slips coated with anti-NCR monoclonal antibodies (2.5 µg/ml) and staining for F-actin with phalloidin, MTOC with anti-alpha tubulin and lytic granules with anti-perforin antibodies (Figure 1).

After NKp30 ligation, the majority of dNK cells showed dispersed lytic granules with a random localization of the MTOC. Less than 20 % of cells showed polarized lytic granules. By contrast to dNK cells, activation of pNK cells through NKp30 ligation resulted in rapid reorganization of F-actin enriched cytoskeleton and polarization of both the MTOC and lytic granules in more than 50 % of activated cells (Figure 1a).

Similar to IgG control (data not shown), ligation of CD94/NKG2A inhibitory receptor showed dispersed perforin containing granules and less than 20% of cells in both NK cell populations have organized immune synapse (Figure 1d).

We next analyzed synapse formation after ligation of NKp44 receptor. Similar to NKp30 ligation, NKp44 ligation did not induce organized dNK cell synapse while it did for pNK cells. More than 70% of dNK cells showed dispersed lytic granules and a random localization of the MTOC. By contrast to dNK cells, more than half of IL15-pNK cells showed polarization of the MTOC and lytic granules to the center of synaptic area (Figure 1b). Finally, when cells were activated through NKp46 receptor, more than 45% of dNK and pNK cells organized their cortical actin filaments and polarized their MTOC and lytic granules within the same region. Moreover, MTOC and perforin enriched lytic granules are docked to the plasma membrane (Figure 1c).

These differences in the organization of immune synapses by dNK and IL15-pNK cells after NKp30 and NKp44 ligation is noteworthy and further highlights distinct functional and phenotypical differences between these two between NK cell populations.

Organization of lytic granules at the immune synapse is associated with increased NK cell cytotoxicity

To analyze the functional impact of the differences in synapse formation, we monitored degranulation in dNK and pNK cells that have been activated through ligation of NCRs. CD3-CD56^{pos} NK cells were activated for 4 hours with glass surface bound NCR antibodies (2.5µg/ml) and analyzed for cell surface expression of CD107a degranulation marker (Figure 2). Ligation of NKp30 but not NKp44, IgG control (Figure 2a-b) or NKG2A inhibitory receptor (data not shown) on dNK cells resulted in small increases of CD107a expression without reaching significance ($p=0.05$). By contrast to NCR2 and 3, ligation of NKp46 induced significant increases of dNK cell degranulation and more than 18 % of cells express CD107a cell surface marker. Moreover, co-engagement of NKp44 and NKp46 receptors resulted in more than 30% decrease in NKp46-induced degranulation ($p=0.0012$) while co-ligation of NKp30 had no effect on NKp46-activated dNK cell degranulation (Figure 2b). Similar to published data (refs), ligation of NKp30, NKp44, or NKp46 induced significant increases cell surface expression of CD107a degranulation marker on pNK cells cultured with low doses of IL15 (Figure 2a). Moreover, simultaneous ligation of NKp46 and NKp44 receptors had synergistic effects on the ability of pNK cells to degranulate while co-engagement of NKp30 and NKp46 had no effect on NKp46-induced degranulation (Figure 2c).

Taken together these data demonstrate that all three NCR favor pNK cell lytic granule exocytosis leading to CD107a degranulation marker expression. However, for dNK cells only NKp46 ligation is able to trigger degranulation while NKp44 acts rather as inhibitory receptor.

To dissect molecular mechanisms that are associated with NCR ligation, we next analyzed tyrosine phosphorylation in both dNK and pNK cell populations by immunoblot (Figure 2d). NCR ligation induced tyrosine phosphorylation in both dNK cells and IL-15pNK cells. Upon NKp30 or NKp44 ligation tyrosine phosphorylation patterns were quite different between the two NK cell populations. However, phosphorylation patterns were similar after NKp46 ligation on dNK and IL-15pNK cells (Figure 2d). These differences in tyrosine phosphorylation suggest the recruitment of different signaling pathways after engagement of the same NCR either in dNK or pNK cells especially that all three NCR can be transcribed into different splice variant that may have different functions all together.

Different isoforms of NCR are expressed by Decidual NK cells

NKp30 is transcribed from three splice variants which result in a, b, and c isoforms of NKp30 receptor that have different length of the intracellular domain and the extracellular Ig-like domain. Ligation of NKp30a and NKp30b isoforms is associated with cytotoxic response and production of high amounts of pro-inflammatory IFN- γ and TNF- α cytokines while NKp30c engagement results in the production of IL-10 anti-inflammatory cytokine and very low killing activity. In contrast with NKp30c isoform, NKp30a and NKp30b are able to recruit the CD3 ζ adaptor molecule that is necessary to convey downstream activating signal (see Figure 2d). Similar to NKp30, several splice variants have been

described for NKp44 and NKp46 but their functional relevance is yet to be defined. Furthermore, differences between dNK cell and pNK cell might be attributed to the expression of different splice variants for NKp30 and NKp44 that convey different signals or to the expression of dominant negative receptors. To investigate the role of NCR3 and NCR2 isoforms in functional differences between dNK cells and pNK cells, we designed specific primers that can differentiate between three splice variants for each NCR and compared their mRNA levels in dNK and pNK cells. We compared the NCR3 and NCR2 expression profiles from 10 dNK samples and 10 pNK cells purified from the same donors.

When compared to pNK cells, dNK cells express significantly lower amounts of NKp30a ($p=0.0086$) and NKp30b ($p=0.05$) isoforms but they express very high levels of NKp30c isoform ($p=0.0046$) (Figure 3a). These differences between dNK cells and pNK cells were further highlighted by the relative ratio of NKp30c isoform (Figure 3b). dNK cells express 8- to 10-fold higher amounts of NKp30c while they express NKp30a and NKp30b at significantly lower levels. Similar to published data, pNK cells express predominantly NKp30a and NKp30b isoforms and almost no NKp30c isoform (Figure 3b-c).

We next analyzed levels of NCR2 splice variants in dNK and pNK cells. dNK cells express similar levels of all three NKp44 isoforms while pNK cells express exclusively NKp44b isoform. Analyses of the relative ratios further demonstrated that freshly-isolated pNK cells express 12-fold more of NKp44b than NKp44a or NKp44c isoforms. When compared to pNK cells, dNK cells express at least 3- and 4-time higher quantities of NKp44a and NKp44c isoforms (Figure 3f).

Taken together, our data demonstrate that dNK cells and pNK cells express different dominant isoforms for NKp30 and NKp44 receptors that can convey different signals upon NCR ligation.

Decidual microenvironment impacts NK cell phenotype

We next explored molecular mechanisms that can explain the preferential expression of specific NCR2 and 3 by dNK cells. The decidual stroma that hosts fetal trophoblast is able to produce large amounts of immunomodulatory proteins (TGF- β , IL10) and proinflammatory cytokines such as or IL15, IL-18 two cytokines that are important for NK cell differentiation and that are known to be important for angiogenesis during pregnancy. In order to clarify the potential role of cytokine microenvironment in the decidual phenotype of NK cells, we cultured pNK cells in the presence of a cocktail containing TGF- β , IL-15 and IL-18 (Figure 4) as well as different combinations of the same cytokines. After six days of culture, cells were characterized by flow cytometry using several NK cell surface markers. The majority of pNK cells that are originally CD56 positive significantly up regulate their CD56 cell surface expression and more than 98% of cells become CD56^{bright} with very high levels of cell surface expression approaching levels observed for dNK cells (Figure 4 a-b and S2). Analyses of pNK cells from five healthy donors showed significant increases in Geo MFI (206.6 ± 9.6) when compared to cells cultured in medium (20.7 ± 2.6). Increases in GeoMFI were almost similar to those of CD56^{bright}

dNK cells (259 ± 8.4). Significantly lower increases were also observed in pNK cells that were treated with IL-15 alone (95 ± 12) or in combination with either IL-18 (92 ± 14) or TGF- β (111 ± 4).

Further phenotypic analysis showed that in the presence of IL-15, pNK cells significantly increased their CD69 activation marker (Figure 4). Freshly isolated pNK cells barely express the activation marker CD69. After culture in the presence of IL-15 alone or in combination with the other cytokines, more than 40% of cells express CD69 with GeoMFI (34.4 ± 5). CD16 is uniformly expressed on more than 70% of CD56^{pos} pNK cells and it is absent on freshly isolated dNK cells. After six days of culture in the absence of any cytokine, a huge fraction of pNK cells become CD16^{neg} and less than 40% of cells conserved their CD16 expression (Figure 4). The presence of all three cytokines allowed the maintenance of constant levels of CD16 on pNK cells (Figure 4). Furthermore, the presence of IL-15 alone or in combination with either IL-18 or TGF- β allowed the maintenance of CD16 expression in at least 70 % of cells (Figure S). These data suggest that in the absence of IL-15, the loss of CD16 in pNK cells might result from selective proliferation of CD16^{neg} population and/or excess death of CD16^{pos} cells. In our culture conditions, only slight increases of proliferation were observed in cells cultured in IL-15 alone and we did not observe any increases of PI positive cells under any condition (Figure S1).

We next analyzed the expression of the NCRs in the same culture conditions after six days. 20% of pNK cells express NKp30. After six days treatment with cytokine cocktail, more than 35% of cells expressed NKp30 at their cell surface (Figures 4 a, S1). Increases in the total number of positive cells were associated with moderate increases of the fluorescence intensity (Figure 4b). Treatment of pNK cells with IL-15 alone or in combination with the other cytokines induced NKp44 expression in 30 to 80% of pNK (Figure 4a and S1). Furthermore, GeoMFI comparison showed very low variability amongst the different donors, even if increases remained significantly lower than levels of NKp44-expression on freshly isolated dNK cells. Finally, culture in the presence of IL-15 alone or in combination with the other two cytokines was able to upregulate both the total number of NKp46-positive cells and the geometric fluorescence intensity. Cytokine treatment induced only minor changes in the expression of levels of NKG2D, CD94/NKG2C, CD94/NKG2A or CD2 receptors.

Cytokines enriched in the decidual microenvironment impact NK cell cytotoxic function

To test whether cytokine-induced changes in pNK cell phenotype impact cytotoxic effector function, we analyzed NCR-induced cytotoxic function after 6 days of culture in different culture conditions. Cells were activated for four hours by mAbs coated glass surfaces and analyzed for CD107a degranulation marker cell surface expression by flow cytometry (Figure 5 and Figure S). After 6 days of culture in medium alone, pNK cells show low capacity to degranulate after NCR ligation compared to IgG ligation. IL-15 treatment induced a significant increase in CD107a expression in cells that were activated by ligation of NCRs (Figure S2). Activation via NKp30 ligation resulted in higher increases of CD107a expression since more than 40 % of cells express CD107a at their surface. Ligation of

NKp44 induced only small degranulation on IL-15 treated cells and less than 10% of cells expressed CD107a at their surface. Finally, ligation of NKp46 induced CD107a cell expression in 25% of IL-15-treated pNK cells. TGF- β alone did not induce the expression of CD107a. Treatment with TGF β in combination with IL-15 or IL15 and IL-18 abrogated the stimulatory effect of IL-15 on CD107a expression (Figure S2). the addition of TGF- β significantly decreased the capacity of NKp30 to induce CD107a expression (a mean of 17% versus 42% for IL-15 alone). Similar to NKp30, addition of TGF- β induced 30% decreases in CD107a expression after ligation of NKp44 (a mean of 5.7% versus 10% for IL-15 alone). The activation induced by NKp46 ligation was not affected by the presence of TGF- β , IL-18 or the combination of TGF- β and IL-18. These data demonstrate that decidual cytokines are able to impact NCR-induced activation of NK cell cytotoxicity. Moreover, TGF- β immunosuppressive cytokine does not affect the three NCR in the same fashion.

Decidual microenvironment modulates NCR isoform expression by cultures peripheral blood NK cells.

To understand the impact of decidual microenvironment on selective expression of NCR isoforms in pNK cells, we first examined mRNA levels of NKp30 isoforms in pNK cells that were cultured for six days in different culture conditions (Figure 6, Figure S3). Treatment with IL-15 induced significant increases in the expression levels of the NKp30a and NKp30b isoforms but did not affect the expression of NKp30c isoform (Figure S3a-c). The presence of TGF- β induced significant decreases in the relative expression levels of all three isoforms and the addition of IL-18 had only minor effects (Figure S3a-c). The combination of TGF- β with IL15 and IL18 showed increases of all three isoforms (Figure 6 and Figure S3a-c) although statistical significances were obtained only for the NKp30b and NKp30c isoforms.

We next investigated the expression of NKp44 isoforms in the same culture conditions (Figure 6 and Figure S3). Cytokine treatment induced significant changes in the expression levels of NKp44a and NKp44c without affecting the expression of NKp44b isoform. The combination of all three cytokines induced seven-fold increase of NKp44a ($p=0.0150$) and significantly higher increases in NKp44c isoform ($p=0.0018$).

Acknowledgements

We are grateful for the help from UMR 1043's Cell Imaging and Flow Cytometry facilities. We also thank patients and MDs from Paule de Viguier Hospital and Sarrus Teinturier Clinic for providing clinical material to this study. J. Siewiera is supported by a PhD Fellowship from the Fondation pour la Recherche Médicale. Financial support was provided by INSERM, CNRS and Toulouse University. None of the funders had any role in study design, data collection and analysis, manuscript preparation or publishing decision.

Figure legends

Figure 1.

Polarization of the MTOC and lytic granules after specific engagement of NCR. Freshly isolated dNK cells or IL-15- pNK cells were stimulated on glass cover slip surfaces coated with α NKp30 (a), α NKp44 (b) or α NKp46 (c) monoclonal antibodies. Representative images acquired by confocal microscopy at the interface between NK cells and antibody coated glass coverslips. Polarization was imaged after 20 min of stimulation. F-actin (phalloidin in green), microtubules (α -tubulin in blue), lytic granules containing perforin (red). Scale bar = 20 μ m. Results are given as averaged mean values from 5 independent experiments \pm SEM. At least 300 conjugates were analyzed. Bar graphs to the left represent percentage of conjugates showing polarized perforin. * $p=0.0372$, ** $p=0.0024$.

Figure 2.

Differential activation between dNK cells and pNK cells after NCR cross-linking. (a) Freshly-isolated dNK cells and IL-15- pNK cells were stimulated for 4 hours with a single or a combination of two mAbs. NK cell degranulation (CD107a expression) was assessed by flow cytometry on CD56 positive cells. (b) Percentage of freshly-isolated dNK cells (left panel) and IL-15-pNK cells (right panel) showing CD107a surface expression. Values presented in the bar graphs are mean values \pm SEM calculated from four independent experiments. * $p=0.045$, **, $p=0.006$, *** $p=0.0001$. (c) Representative phosphotyrosine immunoblots (IB) performed on lysates prepared from NK cells that were stimulated for 20 min α NKp30, α NKp44 and α NKp46 (n=3).

Figure 3.

Differential expression of NCRs isoforms in dNK cells and pNK cells. (a) Relative expression of NKp30 (left panel) and NKp44 (right panel) isoforms in freshly-isolated dNK cells and pNK cells from same donors. The relative expression of the three NKp30 and NKp44 isoforms was determined by qRT-PCR. Bar histograms are mean values \pm SEM calculated from 10 donors. * $p<0.04$, ** $p<0.007$. (b) NKp30 (left panel) and NKp44 (right panel) isoforms expression ratios calculated for each donor of the same cohort. (c) NKp30 (left panel) and NKp44 (right panel) isoforms expression ratios between freshly-isolated dNK cells and pNK cells from same donor.

Figure 4.

Modulation of NCRs expression by pregnancy cytokines cocktail. (a) Flow cytometry analysis showing representative pNK cell phenotypes after six days culture with cytokine cocktail. CD3^{neg} CD56^{pos} NK cells were analyzed for the indicated markers (x-axis). Isotype match controls (gray), pNK cells cultured in complete media (black) and pNK cells in media supplemented with cytokine cocktail

(red). Percentage of positive cells is given for each condition (left of each histogram). (b) Mean Fluorescence Intensity for the indicated markers from 4 independent donors after six days culture with cytokine cocktail. Graphs represent freshly isolated dNK cells, pNK cells cultured in complete media or pNK cells in media supplemented with cytokine cocktail. $*p=0.0257$, $***p<0.0001$.

Figure 5.

Decidual cytokine environment impacts NK cell function. pNK cells cultured in media supplemented with cytokine cocktail were stimulated with α NKp30, α NKp44 and α NKp46. pNK cell degranulation (CD107a expression) was assessed by flow cytometry on CD56 positive cells. $*p=0.045$, $**p=0.0019$.

Figure 6.

Decidual cytokine environment impacts pNK cell NCRs isoform expression. (a) Comparative expression of NKp30 isoforms in pNK cells cultured in media supplemented with cytokine cocktail relative to expression in pNK cells cultured in complete media. Bar graphs represented mean values of four independent experiments. $*p=0.045$. (b) Comparative expression of NKp44 isoforms in pNK cells cultured in media supplemented with cytokine cocktail relative to expression in pNK cells cultured in complete media. Bar graphs represented mean values of four independent experiments. $**p=0.0043$. $***p=0.003$.

Table 1

Name	Sequence
Actin For	5'-CAAACATGATCTGGGTCATCTTCTC-3'
Actin Rev	5'-GCTCGTCGTTTCGACAACGGCT-3'
NKp30 For	5'-TTTCCTCCATGACCACCAGG-3'
NKp30 Rev 1	5'-AAGGGTACACTGTCACCGTAA-3'
NKp30 Rev 2	5'-GCCTCTCTCATCTAAACCGTAA-3'
NKp30 Rev 3	5'-CCTGGAAAGGTCCAGTCTGTAA-3'
NKp44 For 1	5'-AAGCCCCTGAGTCTCCATCT-3'
NKp44 Rev 1	5'-GTTTTCCACCATATGTCCCCC-3'
NKp44 For 2	5'-TTCAGACCCAGACCCAGAG-3'
NKp44 Rev 2	5'-AGGACGGGTGAAGGGACA-3'
NKp44 For 3	5'-GTCCCTTCACAGCCACAGAA-3'
NKp44 Rev 3	5'-GAGACCTCCCCTTGATGCTGC-3'

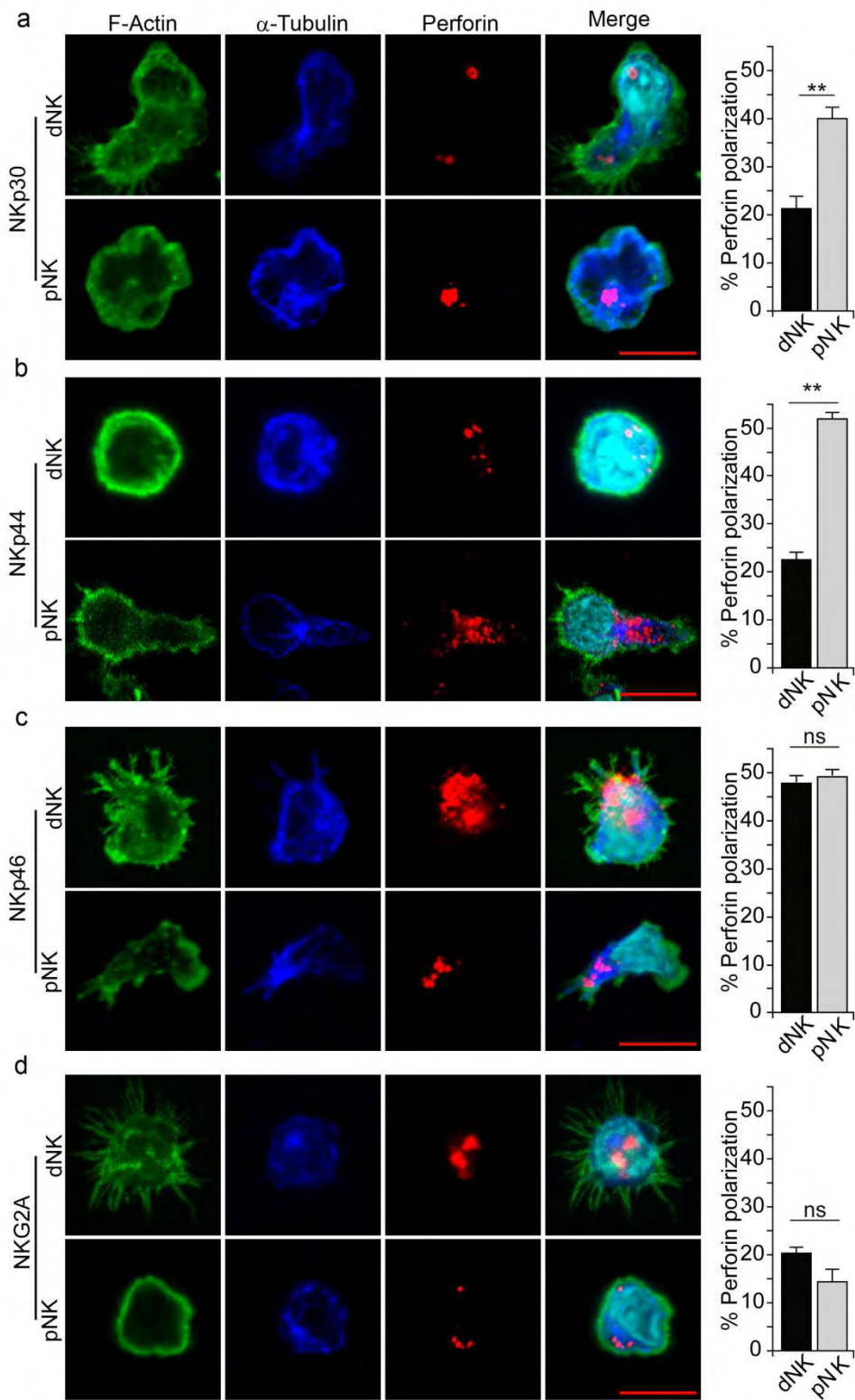


Figure 1

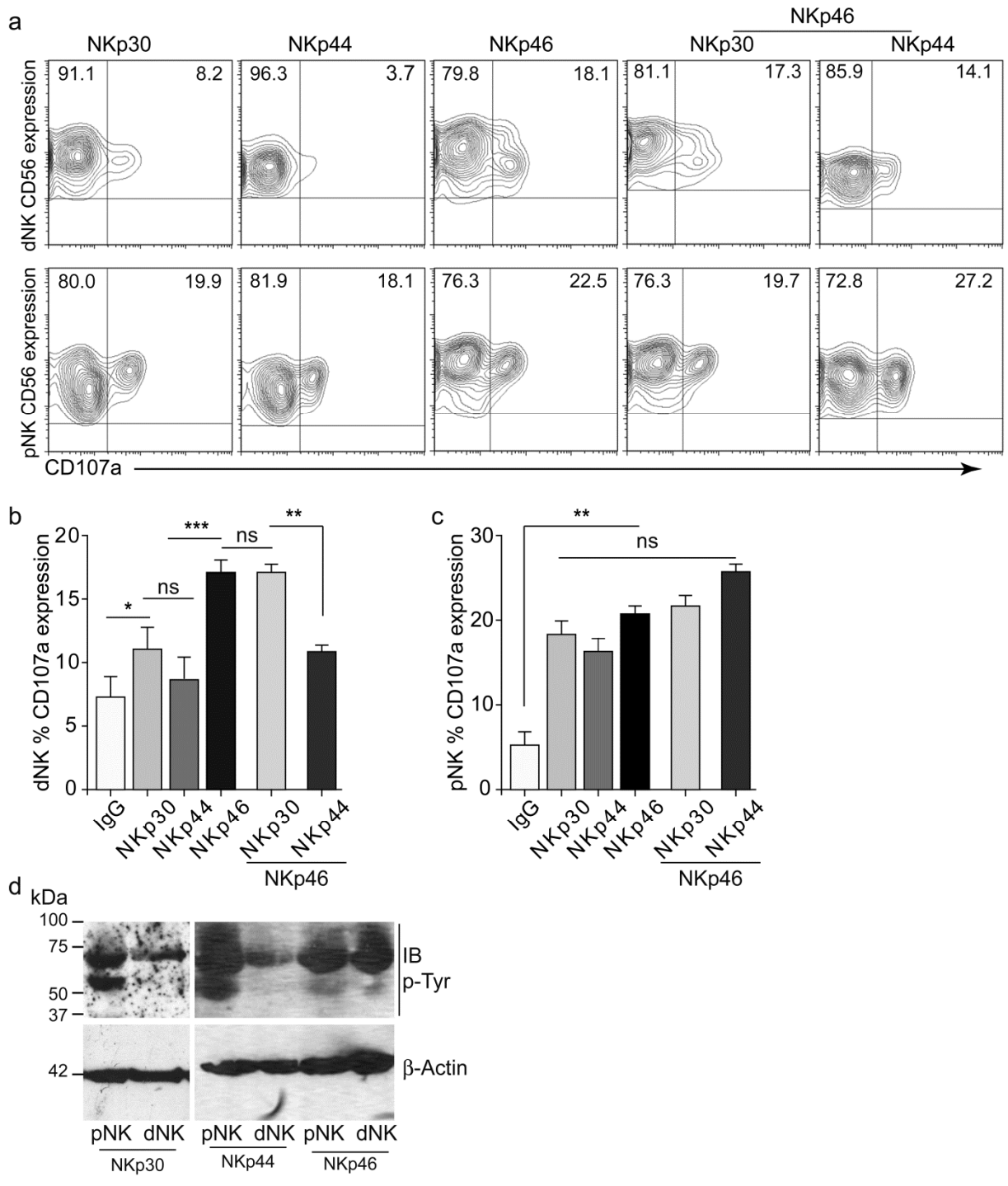


Figure 2

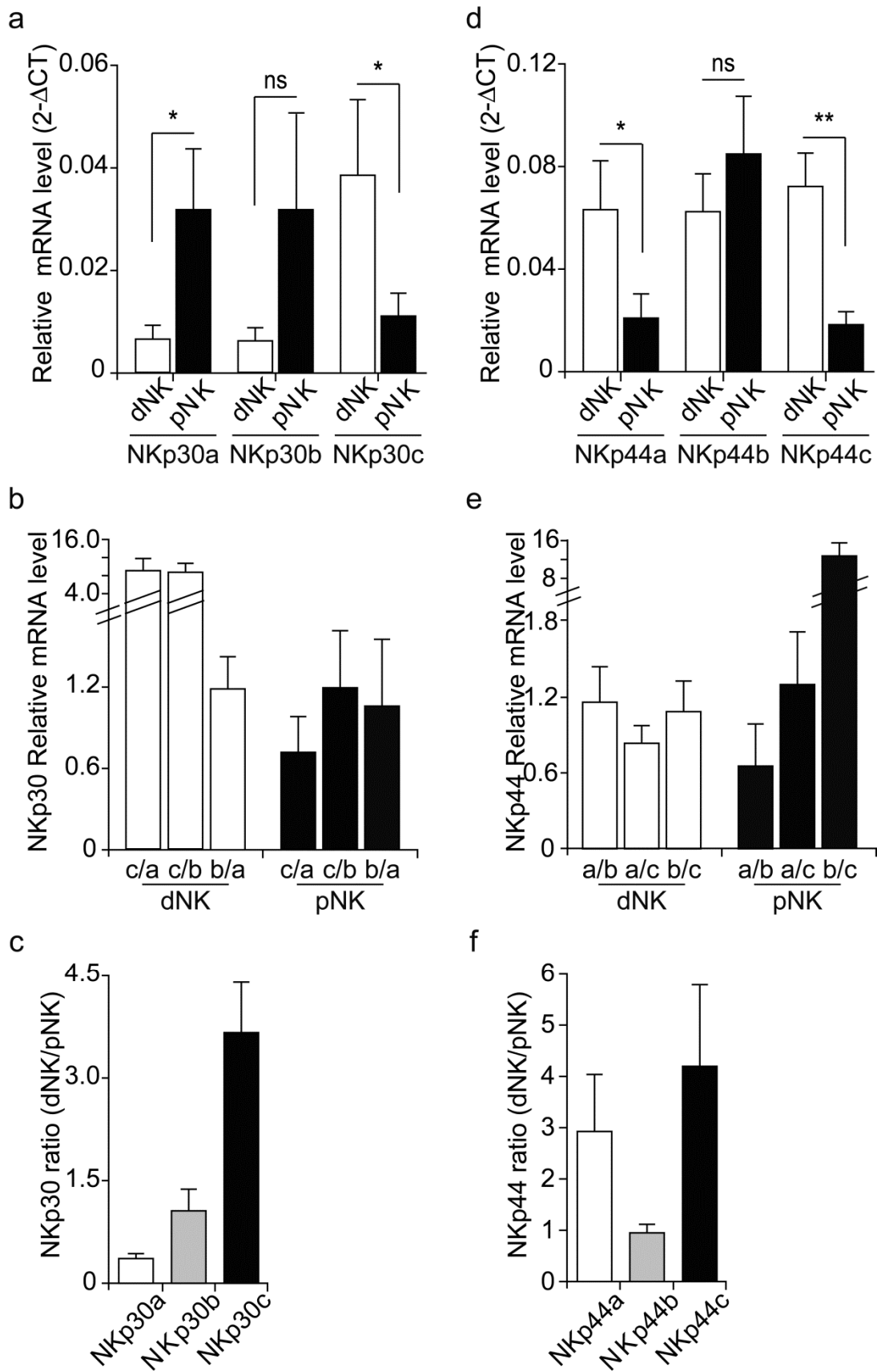


Figure 3

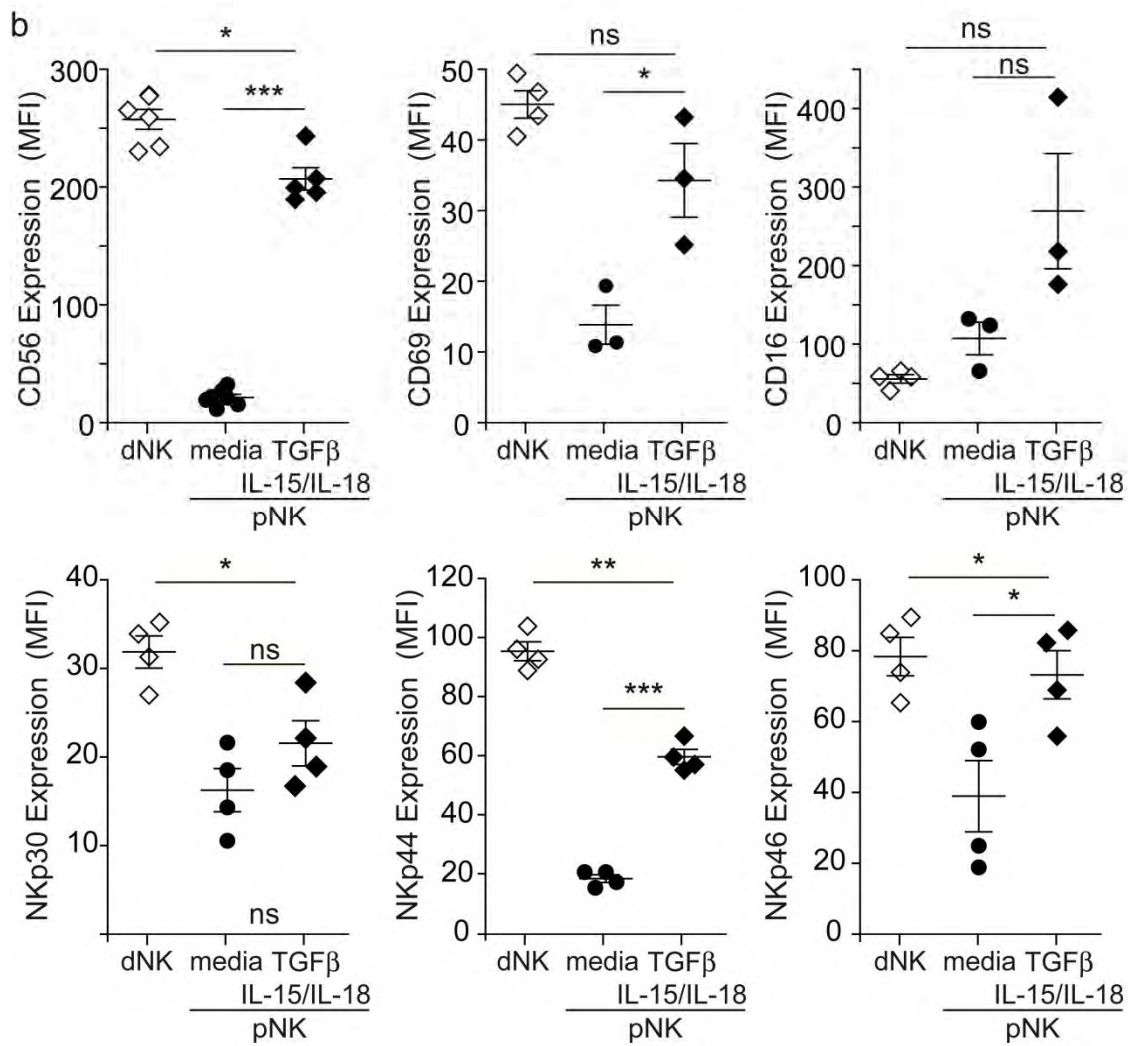
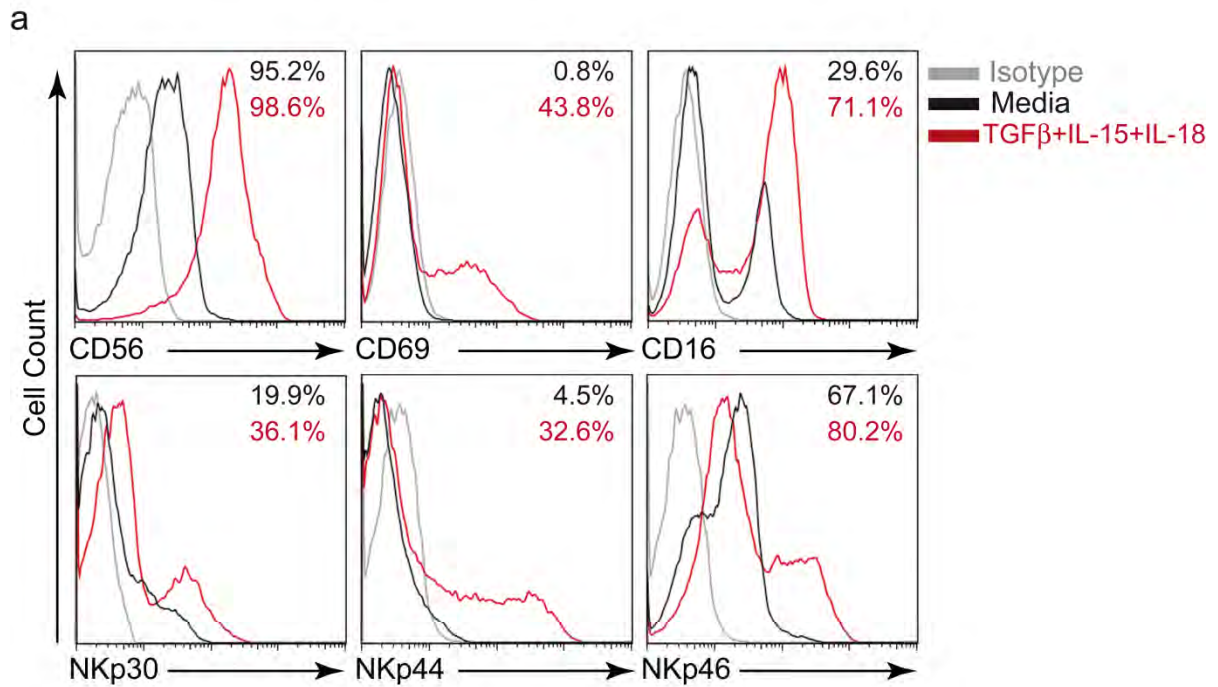


Figure 4

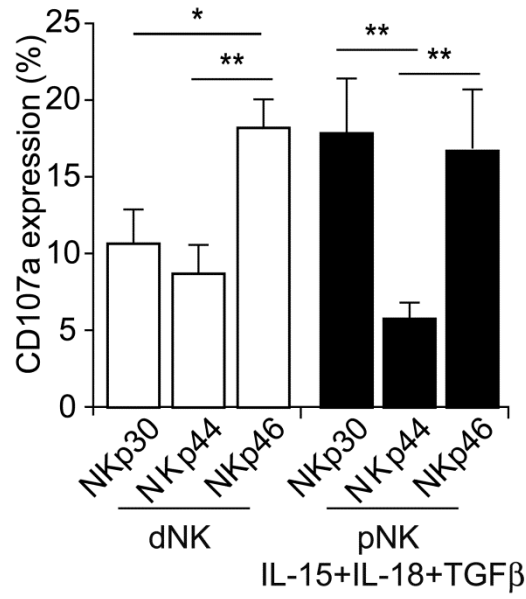


Figure 5

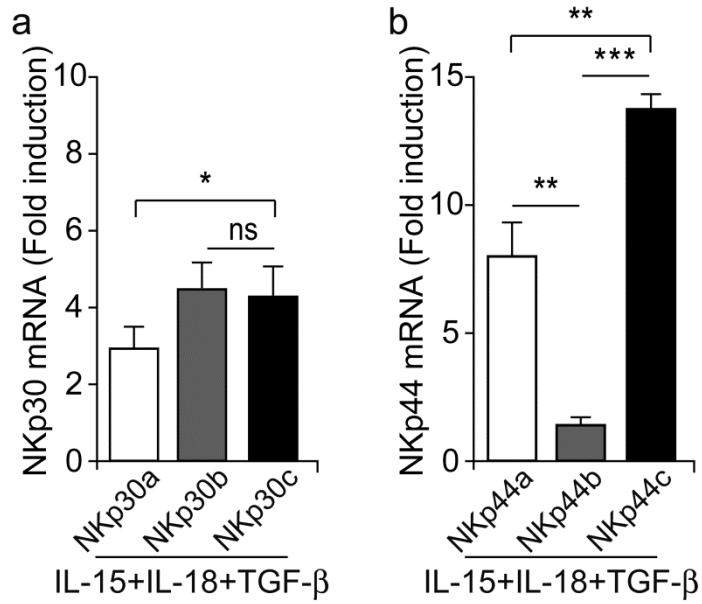


Figure 6

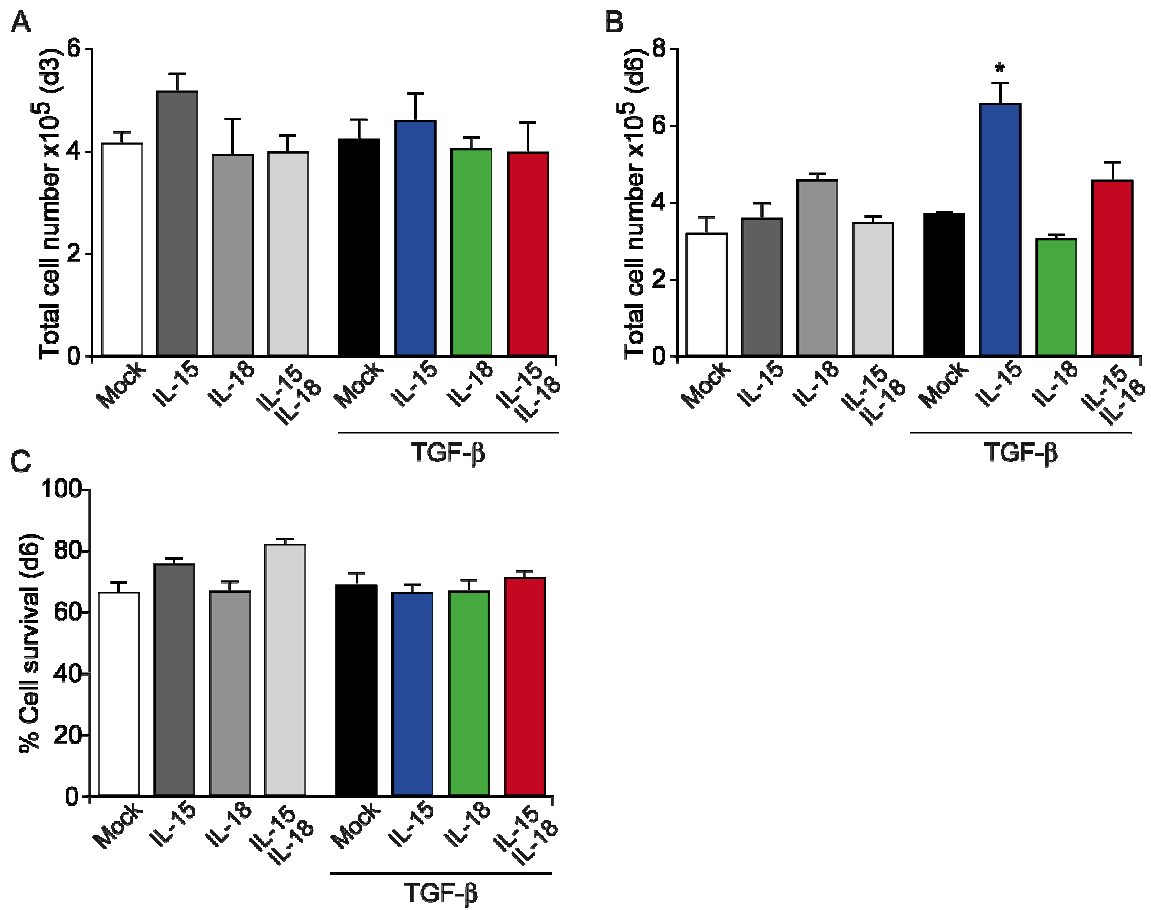


Figure S1

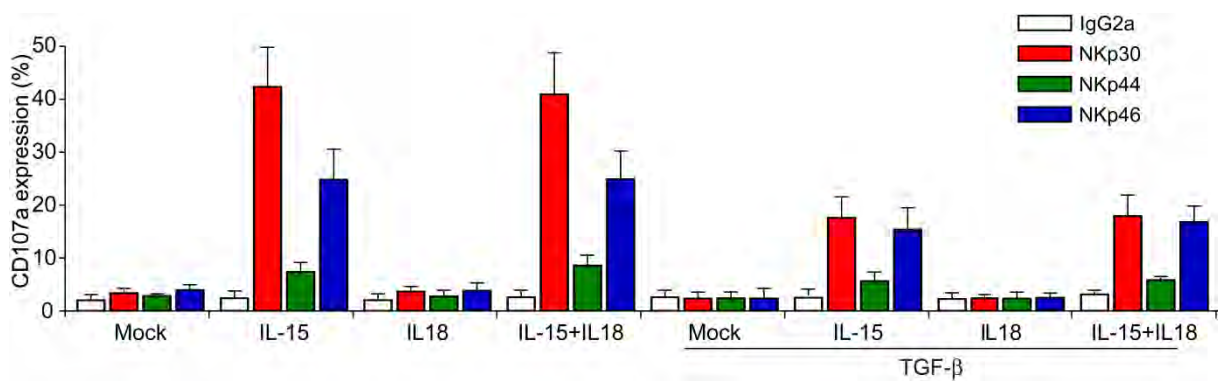


Figure S2

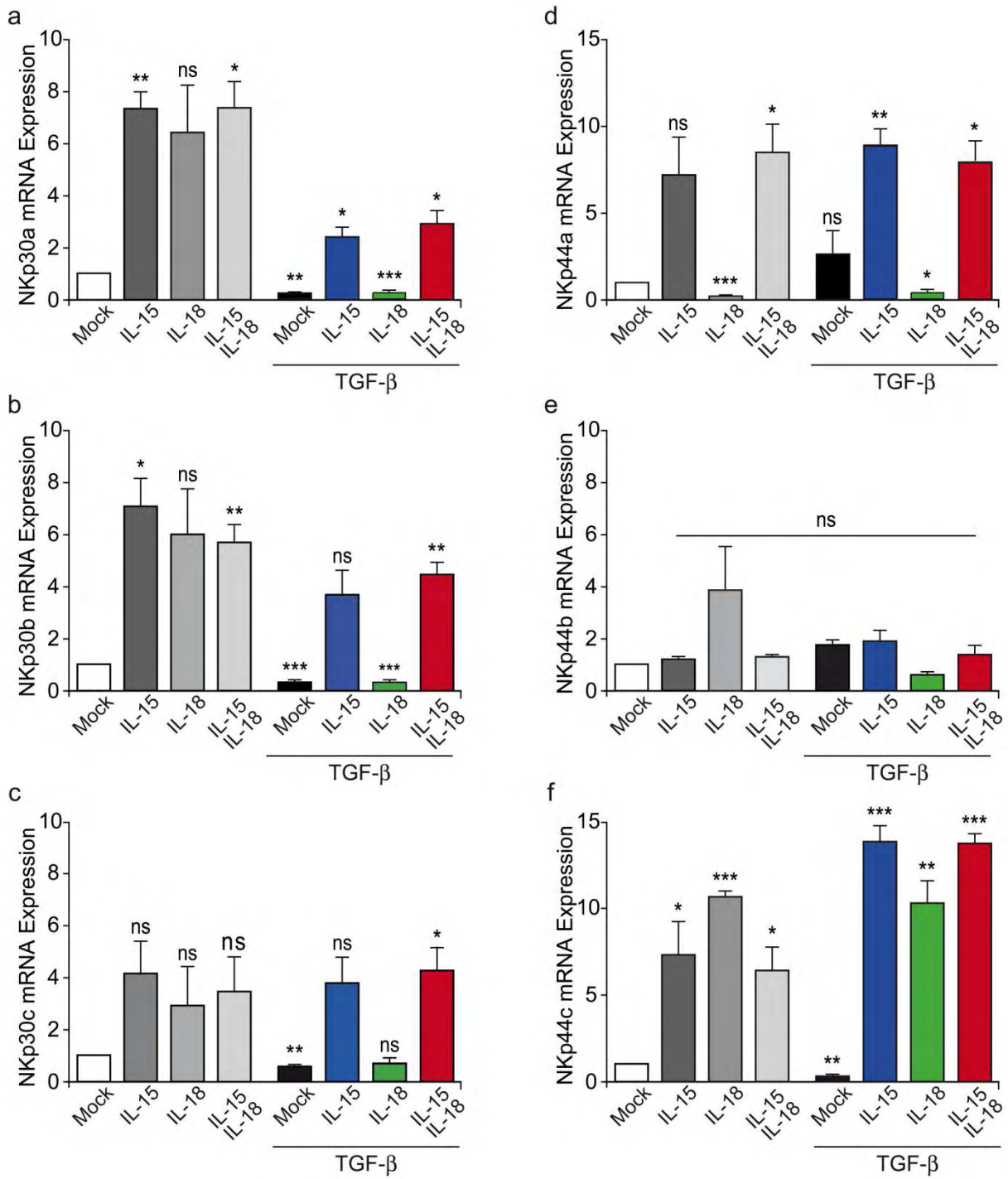


Figure S3

Bibliography

- Apps, R., Gardner, L., Traherne, J., Male, V., and Moffett, A. (2008). Natural-killer cell ligands at the maternal-fetal interface: UL-16 binding proteins, MHC class-I chain related molecules, HLA-F and CD48. *Human reproduction (Oxford, England)* *23*, 2535-2548.
- Bulmer, J.N., and Lash, G.E. (2005). Human uterine natural killer cells: a reappraisal. *Molecular immunology* *42*, 511-521.
- Cantoni, C., Bottino, C., Vitale, M., Pessino, A., Augugliaro, R., Malaspina, A., Parolini, S., Moretta, L., Moretta, A., and Biassoni, R. (1999). NKp44, a triggering receptor involved in tumor cell lysis by activated human natural killer cells, is a novel member of the immunoglobulin superfamily. *The Journal of experimental medicine* *189*, 787-796.
- Cerdeira, A.S., Rajakumar, A., Royle, C.M., Lo, A., Husain, Z., Thadhani, R.I., Sukhatme, V.P., Karumanchi, S.A., and Kopcow, H.D. (2013). Conversion of peripheral blood NK cells to a decidual NK-like phenotype by a cocktail of defined factors. *J Immunol* *190*, 3939-3948.
- Delahaye, N.F., Rusakiewicz, S., Martins, I., Menard, C., Roux, S., Lyonnet, L., Paul, P., Sarabi, M., Chaput, N., Semeraro, M., *et al.* (2011). Alternatively spliced NKp30 isoforms affect the prognosis of gastrointestinal stromal tumors. *Nature medicine* *17*, 700-707.
- El Costa, H., Casemayou, A., Aguerre-Girr, M., Rabot, M., Berrebi, A., Parant, O., Clouet-Delannoy, M., Lombardelli, L., Jabrane-Ferrat, N., Rukavina, D., *et al.* (2008). Critical and differential roles of NKp46- and NKp30-activating receptors expressed by uterine NK cells in early pregnancy. *J Immunol* *181*, 3009-3017.
- Eriksson, M., Meadows, S.K., Wira, C.R., and Sentman, C.L. (2004). Unique phenotype of human uterine NK cells and their regulation by endogenous TGF-beta. *Journal of leukocyte biology* *76*, 667-675.
- Hanna, J., Goldman-Wohl, D., Hamani, Y., Avraham, I., Greenfield, C., Natanson-Yaron, S., Prus, D., Cohen-Daniel, L., Arnon, T.I., Manaster, I., *et al.* (2006). Decidual NK cells regulate key developmental processes at the human fetal-maternal interface. *Nature medicine* *12*, 1065-1074.
- Hollyoake, M., Campbell, R.D., and Aguado, B. (2005). NKp30 (NCR3) is a pseudogene in 12 inbred and wild mouse strains, but an expressed gene in *Mus caroli*. *Molecular biology and evolution* *22*, 1661-1672.
- Jabrane-Ferrat, N., and Siewiera, J. (2014). The up side of decidual natural killer cells: new developments in immunology of pregnancy. *Immunology* *141*, 490-497.
- Kane, N., Kelly, R., Saunders, P.T., and Critchley, H.O. (2009). Proliferation of uterine natural killer cells is induced by human chorionic gonadotropin and mediated via the mannose receptor. *Endocrinology* *150*, 2882-2888.
- Keskin, D.B., Allan, D.S., Rybalov, B., Andzelm, M.M., Stern, J.N., Kopcow, H.D., Koopman, L.A., and Strominger, J.L. (2007). TGFbeta promotes conversion of CD16+ peripheral blood NK cells into CD16- NK cells with similarities to decidual NK cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *104*, 3378-3383.
- Kunkel, E.J., Boisvert, J., Murphy, K., Vierra, M.A., Genovese, M.C., Wardlaw, A.J., Greenberg, H.B., Hodge, M.R., Wu, L., Butcher, E.C., *et al.* (2002). Expression of the chemokine receptors CCR4, CCR5, and CXCR3 by human tissue-infiltrating lymphocytes. *The American journal of pathology* *160*, 347-355.

- Lanier, L.L. (2008). Up on the tightrope: natural killer cell activation and inhibition. *Nature immunology* 9, 495-502.
- Lopez-Verges, S., Milush, J.M., Schwartz, B.S., Pando, M.J., Jarjoura, J., York, V.A., Houchins, J.P., Miller, S., Kang, S.M., Norris, P.J., *et al.* (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, 14725-14732.
- Moffett-King, A. (2002). Natural killer cells and pregnancy. *Nature reviews* 2, 656-663.
- Moretta, L., and Moretta, A. (2004). Unravelling natural killer cell function: triggering and inhibitory human NK receptors. *The EMBO journal* 23, 255-259.
- Parham, P., and Guethlein, L.A. (2010). Pregnancy immunogenetics: NK cell education in the womb? *The Journal of clinical investigation* 120, 3801-3804.
- Ponnampalam, A.P., Gargett, C.E., and Rogers, P.A. (2008). Identification and hormonal regulation of a novel form of NKp30 in human endometrial epithelium. *European journal of immunology* 38, 216-226.
- Siewiera, J., El Costa, H., Tabiasco, J., Berrebi, A., Cartron, G., Le Bouteiller, P., and Jabrane-Ferrat, N. (2013). Human cytomegalovirus infection elicits new decidual natural killer cell effector functions. *PLoS pathogens* 9, e1003257.
- Sivori, S., Vitale, M., Morelli, L., Sanseverino, L., Augugliaro, R., Bottino, C., Moretta, L., and Moretta, A. (1997). p46, a novel natural killer cell-specific surface molecule that mediates cell activation. *The Journal of experimental medicine* 186, 1129-1136.
- Sun, J.C., Beilke, J.N., and Lanier, L.L. (2009). Adaptive immune features of natural killer cells. *Nature* 457, 557-561.
- Vacca, P., Cantoni, C., Prato, C., Fulcheri, E., Moretta, A., Moretta, L., and Mingari, M.C. (2008). Regulatory role of NKp44, NKp46, DNAM-1 and NKG2D receptors in the interaction between NK cells and trophoblast cells. Evidence for divergent functional profiles of decidual versus peripheral NK cells. *International immunology* 20, 1395-1405.
- Vacca, P., Vitale, C., Montaldo, E., Conte, R., Cantoni, C., Fulcheri, E., Darretta, V., Moretta, L., and Mingari, M.C. (2011). CD34+ hematopoietic precursors are present in human decidua and differentiate into natural killer cells upon interaction with stromal cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108, 2402-2407.
- Vitale, M., Bottino, C., Sivori, S., Sanseverino, L., Castriconi, R., Marcenaro, E., Augugliaro, R., Moretta, L., and Moretta, A. (1998). NKp44, a novel triggering surface molecule specifically expressed by activated natural killer cells, is involved in non-major histocompatibility complex-restricted tumor cell lysis. *The Journal of experimental medicine* 187, 2065-2072.
- Vivier, E., Nunes, J.A., and Vely, F. (2004). Natural killer cell signaling pathways. *Science (New York, NY)* 306, 1517-1519.

Discussion

Discussion

Nos résultats montrent que les cellules dNK peuvent répondre *in vitro* à l'infection de cellules stromales de la décidua par le HCMV et potentiellement empêcher le passage du virus au fœtus. La réponse des cellules dNK au HCMV implique la lyse des cellules infectées et une modification du profil de chimiokines et de cytokines sécrétées. Enfin, les cellules dNK modifient également l'expression des récepteurs activateurs et inhibiteurs à leur surface. Cette étude est la première à suggérer clairement un rôle des cellules dNK dans le cas d'une infection par le HCMV au cours de la grossesse.

Les cellules dNK sont capables *in vitro* d'exercer une activité cytotoxique contre des cellules autologues infectées par le HCMV. Cette réponse nécessite un temps de contact relativement long avant d'être effective, bien que la machinerie lytique soit mobilisée dans les premières minutes après reconnaissance de la cible. Ceci peut s'expliquer par le temps nécessaire aux cellules dNK pour modifier leurs fonctions, ou bien une résistance accrue des cellules cibles suite à l'infection. Les cellules NK du sang périphérique sont capables, aux plus hauts ratios effecteurs/cibles, d'exercer une activité cytotoxique dans des temps plus courts, ce qui indique des différences au niveau du déclenchement de la réponse. Il est possible que ce délai soit dû aux différences de fonctions observées pour l'engagement d'un même récepteur, exprimé par les deux populations de cellules NK. Ces différences de fonctions peuvent aussi provenir de niveaux d'expression différents d'un même récepteur. Il est connu que les cellules dNK expriment de plus forts niveaux du récepteur activateur NKG2E, qui lui aussi lie la molécule HLA-E (Koopman et al., 2003). Ainsi, le blocage de HLA-E, ligand physiologique des récepteurs NKG2X, n'a pas d'effet sur l'activité cytotoxique des cellules pNK, alors qu'il augmente de manière significative la cytotoxicité des cellules dNK. De même, le blocage des ligands du récepteur NKp44 ne modifie pas la lyse des fibroblastes infectés par les cellules pNK, alors qu'il augmente l'activité cytolytique des cellules dNK. Les deux types cellulaires pourraient exprimer des isoformes différentes de ces récepteurs, ou bien exprimer différemment les molécules adaptatrices des récepteurs (les cellules dNK n'expriment pas SAP par exemple) ou d'autres molécules de signalisation. 2B4 (CD244) est un corécepteur qui permet d'augmenter la force des signaux activateurs. Or, ce corécepteur transduit des signaux inhibiteurs dans le cas des cellules dNK (Vacca et al., 2006). De plus, les cellules stromales déciduales expriment son ligand physiologique, CD48 (Apps et al., 2008). Il est possible que l'activation de la fonction cytotoxique des cellules dNK nécessite des signaux prolongés pour passer outre les signaux inhibiteurs constitutifs transduits par la voie 2B4/CD48. D'autres facteurs, tels que des facteurs viraux sont également à prendre en compte dans ce délai de cytotoxicité. Ainsi, il est connu que le HCMV fait exprimer en surface des cellules infectées un ligand de CEACAM1, qui inhibe les fonctions des cellules dNK. CEACAM1 inhibe majoritairement les cellules NK CD16⁺, qui est la population majoritaire dans la *decidua basalis*. (Markel et al., 2002)

La fonction cytotoxique des cellules NK est déclenchée suite à l'engagement de plusieurs récepteurs activateurs exprimés en surface. La transduction des signaux dans les cellules NK permet ensuite à des facteurs de transcription spécifiques d'enclencher la transcription de nombreux gènes. Le niveau d'expression des différents facteurs de transcription qui interviennent dans l'activation des cellules NK, tels que T-bet, Eomes, ou encore Ikaros, pourrait être modifié, ou bien leur transcription modulée différemment. Il est connu que le facteur de transcription Ikaros augmente l'activité cytotoxique des cellules NK, et que son niveau d'expression est diminué suite à l'engagement de NKp46 (Narni-Mancinelli et al., 2012). Il est possible que les cellules dNK expriment des niveaux relativement faibles d'Ikaros et d'autres facteurs de transcription. Un délai dans la traduction de ces facteurs de transcription expliquerait en partie le temps nécessaire aux cellules dNK pour exercer leur activité cytotoxique. Ainsi, la culture préalable de cellules dNK en IL-15 augmente la capacité de ces cellules à lyser des cibles classiques de cellules NK.

Le contrôle de la production de protéines passe également par d'autres mécanismes. Les micro-ARN se sont ainsi révélés des molécules essentielles dans le contrôle de la transcription de nombreux gènes. miR-155 est ainsi connu pour réguler l'activité cytotoxique des cellules NK (Sullivan et al., 2013) et la production d'IFN- γ . A ce jour aucune étude n'a été faite sur le profil d'expression des micro-ARN par les cellules dNK comparativement aux cellules pNK. Une telle étude apporterait une compréhension plus importante et nécessaire sur les fonctions des cellules dNK, par rapport aux cellules pNK. Les cellules dNK pourraient ainsi exprimer de plus forts niveaux de miR-155, ce qui participerait à l'inhibition de leurs fonctions en conditions physiologiques. Plus de 1 800 micro-ARN sont décrits chez l'Homme. Plusieurs d'entre eux peuvent intervenir dans le contrôle des fonctions des cellules dNK.

L'expression du récepteur activateur NKG2C est augmentée suite au contact entre cellules dNK et fibroblastes autologues infectés par le HCMV. L'expression du récepteur NKG2C chez les patients infectés par le HCMV a déjà été rapportée, notamment chez des patients greffés (Foley et al., 2012b). La population de cellules NK NKG2C⁺ dans le sang périphérique est considérée comme une population « mémoire » dans certaines infections, comme l'infection par le HCMV (Lopez-Verges et al., 2011). La présence d'une population de cellules dNK mémoires NKG2C⁺ reste à établir, mais elle pourrait expliquer en partie le confinement du virus dans la majorité des cas chez les mères déjà infectées.

Lors de la réponse au HCMV, les cellules dNK modifient leur phénotype pour se rapprocher de celui qui est associé aux cellules NK cytotoxiques du sang périphériques. La proportion de cellules CD56^{dim} CD16⁺ augmente. La modification des proportions de cellules CD56^{bright} et CD56^{dim} pourrait aussi expliquer certains problèmes de grossesse observés dans les cas d'infection par le HCMV, comme des avortements spontanés, des retards de croissance intra-utérins ou des défauts de développement du placenta. Les modifications du profil cytokines et de chimiokines sécrétées peuvent aussi être expliquées par le passage d'une partie de la population CD56^{bright} à un phénotype CD56^{dim}.

Or, les chimiokines sécrétées par les cellules dNK sont importantes pour l'attraction du trophoblaste dans la *decidua basalis* et le remodelage du réseau vasculaire utérin. Ainsi, la réponse des cellules dNK au HCMV pourrait indirectement influencer sur le développement fœtal. Des études de migration et d'invasion *in vitro* de trophoblastes dans des matrices extracellulaires peuvent être menées avec des surnageants de cellules dNK cultivées au contact de cellules infectées par le HCMV. La modification des quantités de chimiokines sécrétées aurait alors un impact sur la capacité de ces cellules à migrer et potentiellement, *in vivo*, à participer au remodelage vasculaire utérin. Des analyses de coupes histologiques de placentas issus d'interruptions médicales de grossesse à cause du HCMV permettraient de confirmer des défauts de remodelage dus à l'infection.

Les cytokines majeures sécrétées par les cellules NK sont l'IFN- γ et le TNF- α . L'IFN- γ est une cytokine importante dans les réponses anti-virales. Elle est également nécessaire dans les premières étapes de modification du réseau vasculaire utérin. Toutefois, la sécrétion de cette cytokine dans l'utérus gestant doit être étroitement contrôlée, l'excès d'IFN- γ aboutissant à des avortements spontanés chez la souris (Murphy et al., 2009). Or, suite à la culture avec les fibroblastes autologues infectés par le HCMV, les cellules dNK n'augmentent par la sécrétion d'IFN- γ , indiquant peut-être des mécanismes de rétrocontrôle qui empêchent la mise en place partielle d'une réponse immune délétère pour le devenir du fœtus. Là encore, l'étude des facteurs impliqués dans la régulation du panel de cytokines sécrétées par les cellules dNK serait intéressante et donneraient des indications supplémentaires sur les fonctions particulières des cellules dNK.

Enfin, la sécrétion en plus grande quantité de certaines chimiokines pourrait modifier la composition de la *decidua basalis* en cellules immunitaires. Or, les composantes immunes de la *decidua basalis* sont très particulières, il s'agit du seul tissu où les cellules NK sont majoritaires (Moffett-King, 2002). Ainsi, la modification de la sécrétion de certaines chimiokines pourrait permettre le recrutement à partir du sang d'un plus grand nombre de cellules immunitaires autres à partir du sang périphérique de la mère. L'arrivée massive de cellules immunitaires sanguines pourrait modifier le microenvironnement cytokinique pour combattre l'infection, mais elle serait également dommageable pour la grossesse.

Le dosage des cytokines et chimiokines pourrait servir de diagnostic pour surveiller la séroconversion des femmes enceintes et les possibles risques de transmission au fœtus à travers le placenta. Il pourrait également être envisageable de palier les baisses de niveau de certaines chimiokines par des injections, ce qui pourrait éviter les défauts de remodelage et les fausses couches ou problèmes développementaux du fœtus.

La modification du phénotype des cellules dNK pourrait aussi modifier le dialogue qui s'établit entre cellules dNK et cellules trophoblastiques. En effet, l'infection par le HCMV module l'expression des KIR (Beziat et al., 2013). Or la reconnaissance des molécules HLA exprimées sur les cellules fœtales par les KIR maternels est nécessaire au succès de l'implantation embryonnaire. Des mésappariements entre les récepteurs et leurs ligands sont en effet associés à des pathologies de la

grossesse, telles que la pré-éclampsie, des avortements spontanés, ou des retards de croissance intra-utérin (Hiby et al., 2010). Pour mieux apprécier l'impact des modifications phénotypiques des cellules dNK sur leur dialogue avec les cellules trophoblastiques, des études analysant la survie des trophoblastes au contact de cellules dNK modifiée pourraient être menées. Le dialogue entre cellules dNK et trophoblastes peut également être modifié dans les cas de transmissions du virus aux cellules fœtales. Les cellules dNK reconnaîtraient alors les cellules trophoblastiques comme des cellules dangereuses, et impacteraient sur leur capacité à envahir la *decidua basalis*. Le fait que l'on retrouve des cellules dNK au contact de cellules trophoblastiques dans les villosités chorioniques en cas d'infection par le HCMV laisse penser que de telles modifications de dialogues peuvent s'opérer.

La modification du phénotype et des fonctions des cellules dNK inclut une induction de l'expression en surface des molécules HLA de classe II. L'expression de ces molécules peut permettre l'activation des lymphocytes T CD4⁺ présents localement et déclencher une réponse de la part de ces cellules. Or l'état d'activation de ces cellules est étroitement contrôlé dans la *decidua basalis*. L'activation des lymphocytes T CD4⁺ pourrait conduire à une rupture de la tolérance envers les cellules fœtales semi-allogéniques. Le fait que des cellules dNK HLA-II⁺ soient retrouvées *in situ* dans des déciduas de patientes infectées par le HCMV au cours de la grossesse laisse penser que ce mécanisme se produit *in vivo* (Hanna et al., 2004). Mais il est possible que les modifications phénotypiques des cellules dNK ne soient que transitoires. Dans ce cas, on peut supposer qu'il n'y aurait pas de dommages irréversibles.

Lors de la réponse cytotoxique, les cellules dNK sécrètent de grandes quantités de perforine et de granzymes dans leur environnement. Il est possible que la forte concentration de molécules cytotoxiques dans le milieu inflige des dégâts aux cellules fœtales. Bien que ces dernières expriment des molécules anti-apoptotiques, comme XIAP (Straszewski-Chavez et al., 2004), une exposition prolongée aux molécules lytiques pourrait conduire à une augmentation de l'apoptose des cellules trophoblastiques. La modification de la quantité de cytokines et de chimiokines peut également influencer sur la survie des cellules trophoblastiques. STAT3 est une molécule de signalisation qui intervient dans les processus d'invasion de l'endomètre gestant par les trophoblastes (Fitzgerald et al., 2008). Or, lors de la réponse des cellules dNK au HCMV, la sécrétion d'IL-6, qui active la voie STAT3, est largement augmentée. L'augmentation de la maturation ou du nombre de cellules matures à un endroit donné pourrait modifier la fonction et/ou la survie des cellules trophoblastiques. Ces modifications peuvent là encore influencer sur le bon déroulement de la grossesse.

Bien que les cellules dNK soient les cellules immunes maternelles majoritaires dans la *decidua basalis*, il y a d'autres cellules présentes localement. Il pourrait être intéressant d'étudier l'apport de ces cellules dans la réponse immunitaire anti-HCMV, tant dans l'aide qu'elles peuvent apporter aux cellules NK qu'au contrôle de leur réponse. Ainsi, les cellules T régulatrices, très présentes, pourraient soit limiter l'activation des cellules dNK contre les cellules infectées, soit simplement protéger les cellules fœtales des dégâts que pourraient causer la réponse cytotoxique des cellules dNK. Les

monocytes sont également connus pour diminuer les capacités cytotoxiques des cellules dNK en conditions physiologiques. Mais il n'existe aucune donnée concernant leur potentiel rôle dans le contrôle d'une infection virale. La modification du microenvironnement cytokinique suite à une infection pourrait favoriser leur maturation en cellules dendritiques inflammatoires ou en macrophages, qui participeraient alors à la réponse immunitaire. D'un autre côté, la présence de cellules présentatrices d'antigènes professionnelles dans la *decidua basalis* pourrait permettre le développement d'une réponse T potentiellement dangereuse pour le fœtus.

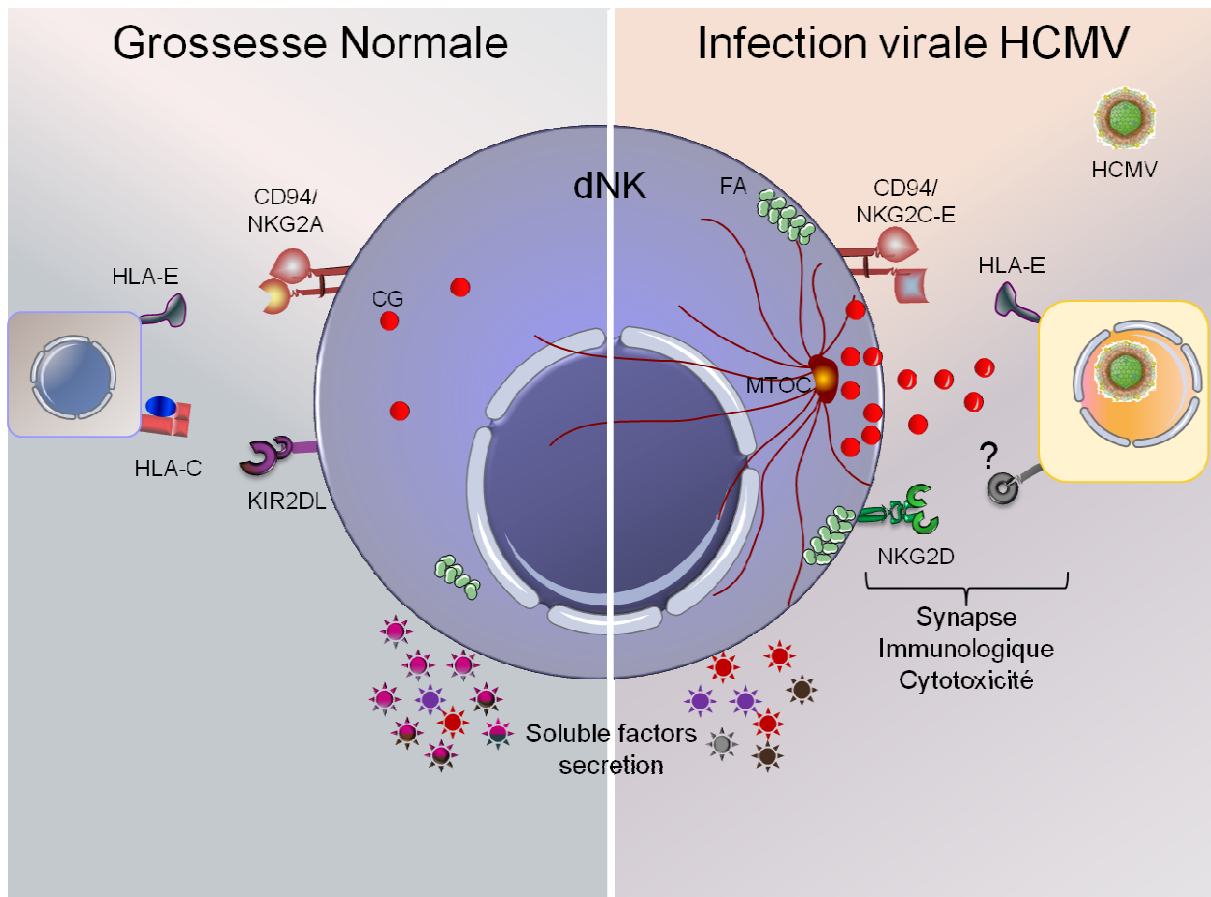


Figure 35 : schéma récapitulatif des fonctions des cellules dNK au cours d'une grossesse normale et d'une infection congénitale par le HCMV. Au cours d'une grossesse normale, les cellules dNK sécrètent de grandes quantités de facteurs solubles nécessaires à la placentation. Les cellules dNK sont tolérantes envers les trophoblastes d'origine fœtale par l'engagement de récepteurs inhibiteurs, comme NKG2A, par leurs ligands physiologiques. Au cours d'une infection congénitale par le HCMV, les cellules infectées modifient l'expression de leurs molécules HLA-I et expriment des molécules de stress, ligands de NKG2D. Les cellules dNK exercent leur activité cytotoxique contre les cellules infectées et modifient leur profil de sécrétion de facteurs solubles pour limiter la propagation du virus.

L'infection du stroma par le HCMV peut également influencer les cellules dNK. En effet, l'IL-15, nécessaire au développement et aux fonctions des cellules dNK est sécrétée principalement

par les cellules stromales de la *decidua basalis*. Or l'infection pourrait empêcher les cellules productrices de sécréter l'IL-15, ou bien augmenter sa production en réponse aux stimulations hormonales. La dérégulation de l'environnement cytokinique pourrait ainsi impacter le phénotype des cellules dNK et modifier leurs fonctions.

Il existe d'autres infections congénitales, comme par exemple par le Plasmodium ou le virus de l'hépatite E (Bose et al., 2014; Uneke, 2007), avec des conséquences parfois mortelles pour la mère et le fœtus. Etudier l'implication des cellules dNK dans le contrôle de la transmission d'autres pathogènes permettrait d'identifier des caractéristiques communes et des différences au niveau de leurs fonctions et permettre de mieux comprendre les défauts de développement qui peuvent en résulter. A plus long terme, il pourrait être envisageable de développer des traitements qui aideraient les cellules dNK à combattre les infections sans nuire au développement fœtal.

L'ensemble de ces travaux apporte une meilleure compréhension du rôle des cellules dNK, très présentes au début de la grossesse dans la *decidua basalis*. La dérégulation de certaines de leurs fonctions, visible notamment par des modifications phénotypiques importantes, peut expliquer des complications de la grossesse, par rupture de tolérance dans le cas de pathologies infectieuses, ou une mauvaise « polarisation » des cellules dNK lors de pathologies autres, telles que la pré-éclampsie.

Les cellules dNK et les cellules pNK expriment des répertoires de récepteurs différents. Les fonctions des cellules NK sont étroitement contrôlées par les signaux transduits en permanence par ces récepteurs. Toutefois, les cellules dNK ont des fonctions très différentes de ce qui est observé pour les cellules pNK. Ainsi, alors que les cellules pNK sont majoritairement cytotoxiques et sécrètent de grandes quantités de médiateurs pro-inflammatoires, les cellules dNK sont dépourvues d'activité cytolytique. Mais elles sécrètent en revanche des facteurs pro-angiogéniques et des facteurs de croissance, nécessaires au bon déroulement de la grossesse.

Les fonctions différentes peuvent s'expliquer par l'engagement de couples de récepteurs différents. Ainsi, HLA-G, le seul ligand connu du récepteur KIR2DL4, n'est exprimé que dans l'utérus gestant. A l'état basal, les cellules dNK expriment le récepteur de cytotoxicité naturelle NKp44 contrairement aux cellules pNK (El Costa et al., 2008). Les gènes qui codent pour les trois NCR donnent lieu à plusieurs transcrits, traduits en protéines fonctionnelles aux fonctions divergentes (Pende et al., 1999; Vitale et al., 1998). Ainsi, les trois transcrits majoritaires de NKp30, les transcrits a, b et c, peuvent induire la fonction cytotoxique, la fonction cytokinique ou inhiber l'activation des cellules NK respectivement (Delahaye et al., 2011).

Notre hypothèse était que les transcrits de NKp44 et NKp30 sont différenciellement exprimés par les cellules dNK et les cellules pNK. Les analyses par PCR quantitative indiquent que les cellules dNK expriment davantage le transcrit codant pour l'isoforme c, inhibitrice, que le transcrit codant pour l'isoforme a, qui déclenche l'activité cytotoxique, de NKp30. L'expression différentielle des isoformes de certains récepteurs entre les cellules dNK et les cellules pNK peut expliquer les différences

fonctionnelles observées entre les deux types cellulaires. Cela se traduit notamment par une incapacité des cellules dNK à polariser leurs granules lytiques lors de la stimulation de NKp30 et NKp44 par un anticorps monoclonal, tandis que les deux récepteurs le permettent pour les cellules pNK. La différence de fonction observée peut s'expliquer par des voies de signalisation différentes après engagement des récepteurs. Nos données indiquent des profils de phosphorylation différents entre cellules dNK et cellules pNK. Il est possible que les isoformes de NKp30 et NKp44 recrutent soit des adaptateurs différents, soit les recrutent moins. Ou encore, dans le cas de NKp44, qu'il transmette directement des signaux inhibiteurs par phosphorylation de la séquence ITIM contenue dans la portion intracellulaire des isoformes b et c, qui sont les formes majoritairement exprimées par les cellules dNK (Campbell et al., 2004). La nature des adaptateurs recrutés ou la quantité de ces adaptateurs recrutés à la membrane suite à l'engagement de ces récepteurs reste encore à déterminer. A l'inverse, aucune différence n'est observée entre cellules dNK et cellules pNK pour le récepteur NKp46.

L'expression préférentielle de ces transcrits semble être contrôlée par le microenvironnement cytokinique de l'utérus gestant, puisque la culture de cellules pNK dans des cocktails cytokiniques définis (IL-15, IL-18 et TGF- β) modifient les profils d'expression. De plus, les modifications des ratios d'expression des différentes isoformes des transcrits des NCR influent sur la capacité de NKp30 et de NKp44 à induire la dégranulation des cellules pNK cultivées dans le cocktail de cytokines. Au contraire, la capacité de NKp46 à induire la dégranulation des cellules pNK est conservée dans toutes les conditions de culture. Le rôle inhibiteur de NKp44 dans les cellules dNK est confirmé par la capacité de ce récepteur à diminuer la dégranulation induite par NKp46 lorsque les deux récepteurs sont co-engagés, contrairement à ce qui est observé pour les cellules pNK. Tandis que cette inhibition n'est pas observée lorsque NKp30 et NKp46 sont engagés simultanément.

D'autres populations cellulaires expriment NKp44, comme des ILC ou encore les pDC des amygdales. L'expression des différents transcrits n'a pas été testée dans ces cellules. Toutefois, l'engagement de NKp44 exprimé par les pDC des amygdales diminue la capacité de ces cellules à sécréter des cytokines pro-inflammatoires (Fuchs et al., 2005). Il est possible que dans l'environnement des amygdales, les pDC expriment majoritairement les isoformes b et c, qui portent la séquence ITIM dans leur portion intracellulaire. La possibilité de modifier les isoformes exprimées par les ILC NKp44⁺ reste également à étudier, ainsi que son impact sur la capacité de ces cellules à participer à une réponse immunitaire (Hoorweg et al., 2012).

Il est possible que d'autres facteurs interviennent dans ces phénomènes, notamment les contacts cellulaires, puisque les cellules dNK établissent des contacts étroits avec les cellules trophoblastiques qui expriment des ligands de ces récepteurs (Hanna et al., 2006). L'expression différentielle des transcrits peut expliquer les différences de fonctions observées entre cellules dNK et pNK après engagement des récepteurs, et donc les caractéristiques particulières des cellules dNK. Les modifications observées pourraient être une adaptation des cellules dNK aux nécessités de la grossesse. Il est à noter notamment que les cellules pNK cultivées dans les milieux conditionnés

n'adoptent pas un phénotype décidual complet, avec une augmentation ou un maintien de l'expression de CD16, alors que les cellules dNK sont majoritairement négatives. Parmi les facteurs importants qui peuvent expliquer cette observation, il y a l'hypoxie (Cerdeira et al., 2013). En effet, les débuts de la grossesse sont marqués par des conditions hypoxiques, nécessaires au développement précoce du placenta, mais également aux modifications phénotypiques de cellules NK cultivées en TGF- β . Combinée au milieu conditionné, l'hypoxie pourrait permettre de transformer complètement des cellules NK du sang périphérique en cellules NK ayant des caractéristiques déciduales.

L'expression différentielle de certaines isoformes de récepteurs activateurs pose la question des réponses immunes aux pathogènes dans lesquelles interviennent ces récepteurs. Ainsi, les cellules NK peuvent lyser des LT CD4⁺ infectés par le VIH-1 qui expriment un ligand de NKp44 (Vieillard et al., 2005). Dans le cas d'une infection de cellules de la *decidua basalis* par le VIH-1, il est possible que le virus échappe aux cellules dNK. Ou dans le cas d'une infection par le Plasmodium pour NKp30. Il serait intéressant d'étudier si l'infection par ces pathogènes modifient les profils d'expression des divers transcrits des NCR dans les cellules dNK. De même, l'environnement particulier de la grossesse pourrait moduler l'expression de transcrits alternatifs d'autres récepteurs, tels que 2B4, qui a deux transcrits, qui transduisent des signaux contraires (Mathew et al., 2009). Cette hypothèse est étayée par le fait que 2B4 agit comme un récepteur inhibiteur des fonctions des cellules dNK (Vacca et al., 2006). 2B4 est un corécepteur important, puisqu'il permet d'augmenter les signaux activateurs qui conduisent à l'activité lytique des cellules NK, mais également dans les réponses prolifératives de ces dernières. La prolifération des cellules dNK n'a jamais été étudiée, il est possible que ces cellules soient incapables de proliférer dans des conditions physiologiques ou infectieuses, dans le cas où ces dernières exprimeraient majoritairement l'isoforme inhibitrice. En effet, le ligand de 2B4, CD48, est constitutivement exprimé par toutes les cellules, stromales et hématopoïétiques, présentes dans la *decidua basalis*.

Les cytokines semblent être importantes pour l'expression préférentielle des transcrits de NKp30 et de NKp44. Or, dans l'organisme, les cellules NK sont constamment soumises à des modifications de l'environnement cytokinique, notamment dans les cas de transformation tumorale. Il serait intéressant d'analyser l'expression de ces transcrits dans diverses pathologies, comme cela a été fait dans les cas de cancers du pancréas (Delahaye et al., 2011). De telles modifications phénotypiques posent la question de l'impact sur la fonctionnalité des cellules NK. Nos premiers résultats indiquent une diminution de la cytotoxicité lorsque les cellules sont traitées avec le cocktail cytokinique complet. L'impact du traitement sur la fonction sécrétrice des cellules NK est encore à tester. Le fait que des traitements à base de cytokines stimulatrices puissent réactiver les cellules NK chez certains patients atteints de cancers vient étayer cette hypothèse. Il serait intéressant d'étudier la modulation de l'expression des transcrits des NCR dans diverses infections virales, et éventuellement l'impact de thérapies basées sur l'injection de cytokines sur ces transcrits.

Certaines infections virales modifient sensiblement l'environnement cytokinique, notamment les virus des hépatites. Ainsi, il est connu que l'infection par le virus de l'hépatite C diminue l'expression et la capacité d'activation des cellules NK via le récepteur NKp30 (Holder et al., 2013). L'infection par le virus de l'hépatite B promeut la sécrétion de TGF- β , qui diminue l'expression de NKG2D et de 2B4 (Sun et al., 2012). Or, l'IL-15 permet de restaurer en partie les pertes de fonction et d'expression dues au TGF- β (Park et al., 2011). Du point de vue de la grossesse, des dérégulations dans les niveaux de cytokines sécrétées ont été rapportés pour l'IL-15, l'IL-18 et le TGF- β dans des cas de pré-éclampsie (Hu et al., 2007) ;(Peracoli et al., 2008; Pugliese et al., 2008). Or le rôle des cellules dNK dans les désordres de la grossesse a été suspecté. Des niveaux de cytokines dérégulés modifieraient ainsi les ratios des différents transcrits, ce qui pourrait impacter sur les fonctions des cellules dNK. Des productions excessives d'IL-15 favoriseraient ainsi l'expression de l'isoforme a de NKp30, rendant les trophoblastes plus susceptibles à l'activité lytique des cellules dNK. Ces dernières pourraient sécréter moins de chimiokines, ce qui impacterait sur l'invasion de la *decidua basalis* par les trophoblastes, empêchant le remodelage vasculaire utérin.

La nature des ligands des NCR exprimés dans le *decidua basalis* peut aussi avoir une influence sur les isoformes de NKp30 et de NKp44 exprimées. En effet, l'isoforme c de NKp30 a un domaine Ig de type C, contrairement aux isoformes a et b, qui ont un domaine Ig de V (Delahaye et al., 2011). Ce qui pourrait éventuellement conduire à des modifications dans les modalités de liaison du récepteur à son ou ses ligands, et ainsi accorder un avantage sélectif aux cellules dNK qui expriment davantage l'isoforme c. Déterminer la nature exacte des ligands des NCR exprimés dans la *decidua basalis* apporterait également des informations supplémentaires sur les interactions entre cellules dNK et cellules stromales nécessaires au bon déroulement de la grossesse.

Les modifications post-traductionnelles que peuvent subir les différentes isoformes de NKp30 et NKp44 peuvent également varier. Ainsi, dans la *decidua basalis*, il a été identifié une modification post-traductionnelle de NKp30 unique, qui peut altérer sa reconnaissance du ligand (Ponnampalam et al., 2008). De telles modifications pour NKp44 restent encore à étudier.

La régulation de l'activité des cellules NK est très importante de par leur contribution majeure à l'immunité anti-tumorale et anti-virale. Nos résultats indiquent un nouveau mode de régulation de l'activité des cellules NK par l'expression d'isoformes de certains récepteurs. Cette modulation semble s'opérer *in vivo*, dans le cadre de la grossesse, avec une adaptation des cellules NK à l'environnement dans lequel elles évoluent.

L'ensemble de ces travaux apporte un nouvel éclairage sur les capacités et les fonctions des cellules dNK, des cellules absolument essentielles au bon déroulement de la grossesse. Nous avons montré pour la première fois que ces cellules ont la capacité de protéger le fœtus contre des infections congénitales, en plus de leurs fonctions d'aide à la placentation. De plus nous avons pu mettre en évidence que la régulation de la fonction de ces cellules passe par un mécanisme inédit de modification de l'expression de récepteurs activateurs.

Bibliographie

- Acar, N., Ustunel, I., and Demir, R. (2010). Uterine natural killer (uNK) cells and their missions during pregnancy: a review. *Acta histochemica* *113*, 82-91.
- Achdout, H., Manaster, I., and Mandelboim, O. (2008). Influenza virus infection augments NK cell inhibition through reorganization of major histocompatibility complex class I proteins. *Journal of virology* *82*, 8030-8037.
- Adam, C., King, S., Allgeier, T., Braumuller, H., Luking, C., Mysliwicz, J., Kriegeskorte, A., Busch, D.H., Rocken, M., and Mocikat, R. (2005). DC-NK cell cross talk as a novel CD4+ T-cell-independent pathway for antitumor CTL induction. *Blood* *106*, 338-344.
- Allcock, R.J., Barrow, A.D., Forbes, S., Beck, S., and Trowsdale, J. (2003). The human TREM gene cluster at 6p21.1 encodes both activating and inhibitory single IgV domain receptors and includes NKp44. *European journal of immunology* *33*, 567-577.
- Allen, J.E., and Maizels, R.M. (2011). Diversity and dialogue in immunity to helminths. *Nature reviews* *11*, 375-388.
- Alter, G., Heckerman, D., Schneidewind, A., Fadda, L., Kadie, C.M., Carlson, J.M., Oniangue-Ndza, C., Martin, M., Li, B., Khakoo, S.I., *et al.* (2011). HIV-1 adaptation to NK-cell-mediated immune pressure. *Nature* *476*, 96-100.
- Alter, G., Rihn, S., Walter, K., Nolting, A., Martin, M., Rosenberg, E.S., Miller, J.S., Carrington, M., and Altfeld, M. (2009). HLA class I subtype-dependent expansion of KIR3DS1+ and KIR3DL1+ NK cells during acute human immunodeficiency virus type 1 infection. *Journal of virology* *83*, 6798-6805.
- Aluvihare, V.R., Kallikourdis, M., and Betz, A.G. (2004). Regulatory T cells mediate maternal tolerance to the fetus. *Nature immunology* *5*, 266-271.
- Andrade, F., Fellows, E., Jenne, D.E., Rosen, A., and Young, C.S. (2007). Granzyme H destroys the function of critical adenoviral proteins required for viral DNA replication and granzyme B inhibition. *The EMBO journal* *26*, 2148-2157.
- Andzelm, M.M., Chen, X., Krzewski, K., Orange, J.S., and Strominger, J.L. (2007). Myosin IIA is required for cytolytic granule exocytosis in human NK cells. *The Journal of experimental medicine* *204*, 2285-2291.
- Anfossi, N., Andre, P., Guia, S., Falk, C.S., Roetynck, S., Stewart, C.A., Bresó, V., Frassati, C., Reviron, D., Middleton, D., *et al.* (2006). Human NK cell education by inhibitory receptors for MHC class I. *Immunity* *25*, 331-342.
- Apps, R., Gardner, L., Traherne, J., Male, V., and Moffett, A. (2008). Natural-killer cell ligands at the maternal-fetal interface: UL-16 binding proteins, MHC class-I chain related molecules, HLA-F and CD48. *Human reproduction (Oxford, England)* *23*, 2535-2548.
- Arase, H., Mocarski, E.S., Campbell, A.E., Hill, A.B., and Lanier, L.L. (2002). Direct recognition of cytomegalovirus by activating and inhibitory NK cell receptors. *Science (New York, NY)* *296*, 1323-1326.
- Arck, P.C., and Hecher, K. (2013). Fetomaternal immune cross-talk and its consequences for maternal and offspring's health. *Nature medicine* *19*, 548-556.
- Arnon, T.I., Achdout, H., Levi, O., Markel, G., Saleh, N., Katz, G., Gazit, R., Gonen-Gross, T., Hanna, J., Nahari, E., *et al.* (2005). Inhibition of the NKp30 activating receptor by pp65 of human cytomegalovirus. *Nature immunology* *6*, 515-523.
- Arnon, T.I., Lev, M., Katz, G., Chernobrov, Y., Porgador, A., and Mandelboim, O. (2001). Recognition of viral hemagglutinins by NKp44 but not by NKp30. *European journal of immunology* *31*, 2680-2689.
- Artavanis-Tsakonas, K., Eleme, K., McQueen, K.L., Cheng, N.W., Parham, P., Davis, D.M., and Riley, E.M. (2003). Activation of a subset of human NK cells upon contact with *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes. *J Immunol* *171*, 5396-5405.

- Ashkar, A.A., and Croy, B.A. (1999). Interferon-gamma contributes to the normalcy of murine pregnancy. *Biology of reproduction* *61*, 493-502.
- Athie-Morales, V., O'Connor, G.M., and Gardiner, C.M. (2008). Activation of human NK cells by the bacterial pathogen-associated molecular pattern muramyl dipeptide. *J Immunol* *180*, 4082-4089.
- Avril, T., Floyd, H., Lopez, F., Vivier, E., and Crocker, P.R. (2004). The membrane-proximal immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif is critical for the inhibitory signaling mediated by Siglecs-7 and -9, CD33-related Siglecs expressed on human monocytes and NK cells. *J Immunol* *173*, 6841-6849.
- Bachanova, V., McCullar, V., Lenvik, T., Wangen, R., Peterson, K.A., Ankarlo, D.E., Panoskaltsis-Mortari, A., Wagner, J.E., and Miller, J.S. (2009). Activated notch supports development of cytokine producing NK cells which are hyporesponsive and fail to acquire NK cell effector functions. *Biol Blood Marrow Transplant* *15*, 183-194.
- Baek, D., Villen, J., Shin, C., Camargo, F.D., Gygi, S.P., and Bartel, D.P. (2008). The impact of microRNAs on protein output. *Nature* *455*, 64-71.
- Bajenoff, M., Breart, B., Huang, A.Y., Qi, H., Cazareth, J., Braud, V.M., Germain, R.N., and Glaichenhaus, N. (2006). Natural killer cell behavior in lymph nodes revealed by static and real-time imaging. *The Journal of experimental medicine* *203*, 619-631.
- Banerjee, P.P., Pandey, R., Zheng, R., Suhoski, M.M., Monaco-Shawver, L., and Orange, J.S. (2007). Cdc42-interacting protein-4 functionally links actin and microtubule networks at the cytolytic NK cell immunological synapse. *The Journal of experimental medicine* *204*, 2305-2320.
- Baratin, M., Roetyneck, S., Lepolard, C., Falk, C., Sawadogo, S., Uematsu, S., Akira, S., Ryffel, B., Tiraby, J.G., Alexopoulou, L., *et al.* (2005). Natural killer cell and macrophage cooperation in MyD88-dependent innate responses to *Plasmodium falciparum*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *102*, 14747-14752.
- Barber, D.F., and Long, E.O. (2003). Coexpression of CD58 or CD48 with intercellular adhesion molecule 1 on target cells enhances adhesion of resting NK cells. *J Immunol* *170*, 294-299.
- Barrow, A.D., and Trowsdale, J. (2008). The extended human leukocyte receptor complex: diverse ways of modulating immune responses. *Immunological reviews* *224*, 98-123.
- Barten, R., Torkar, M., Haude, A., Trowsdale, J., and Wilson, M.J. (2001). Divergent and convergent evolution of NK-cell receptors. *Trends in immunology* *22*, 52-57.
- Barten, R., and Trowsdale, J. (1999). The human Ly-49L gene. *Immunogenetics* *49*, 731-734.
- Bauer, S., Groh, V., Wu, J., Steinle, A., Phillips, J.H., Lanier, L.L., and Spies, T. (1999). Activation of NK cells and T cells by NKG2D, a receptor for stress-inducible MICA. *Science (New York, NY)* *285*, 727-729.
- Baychelier, F., Sennepin, A., Ermonval, M., Dorgham, K., Debre, P., and Vieillard, V. (2013). Identification of a cellular ligand for the natural cytotoxicity receptor NKp44. *Blood*.
- Benichou, G., Yamada, Y., Aoyama, A., and Madsen, J.C. (2011). Natural killer cells in rejection and tolerance of solid organ allografts. *Current opinion in organ transplantation* *16*, 47-53.
- Bennett, N.J., Ashiru, O., Morgan, F.J., Pang, Y., Okecha, G., Eagle, R.A., Trowsdale, J., Sissons, J.G., and Wills, M.R. (2010). Intracellular sequestration of the NKG2D ligand ULBP3 by human cytomegalovirus. *J Immunol* *185*, 1093-1102.
- Benz, C., and Hengel, H. (2000). MHC class I-subversive gene functions of cytomegalovirus and their regulation by interferons-an intricate balance. *Virus genes* *21*, 39-47.
- Beresford, P.J., Xia, Z., Greenberg, A.H., and Lieberman, J. (1999). Granzyme A loading induces rapid cytolysis and a novel form of DNA damage independently of caspase activation. *Immunity* *10*, 585-594.

- Beresford, P.J., Zhang, D., Oh, D.Y., Fan, Z., Greer, E.L., Russo, M.L., Jaju, M., and Lieberman, J. (2001). Granzyme A activates an endoplasmic reticulum-associated caspase-independent nuclease to induce single-stranded DNA nicks. *The Journal of biological chemistry* 276, 43285-43293.
- Berezikov, E., van Tetering, G., Verheul, M., van de Belt, J., van Laake, L., Vos, J., Verloop, R., van de Wetering, M., Guryev, V., Takada, S., *et al.* (2006). Many novel mammalian microRNA candidates identified by extensive cloning and RAKE analysis. *Genome research* 16, 1289-1298.
- Best, J.M. (2007). Rubella. *Seminars in fetal & neonatal medicine* 12, 182-192.
- Betsler-Cohen, G., Mizrahi, S., Elboim, M., Alsheich-Bartok, O., and Mandelboim, O. (2010). The association of MHC class I proteins with the 2B4 receptor inhibits self-killing of human NK cells. *J Immunol* 184, 2761-2768.
- Beziat, V., Dalgard, O., Asselah, T., Halfon, P., Bedossa, P., Boudifa, A., Hervier, B., Theodorou, I., Martinot, M., Debre, P., *et al.* (2012). CMV drives clonal expansion of NKG2C⁺ NK cells expressing self-specific KIRs in chronic hepatitis patients. *European journal of immunology* 42, 447-457.
- Beziat, V., Liu, L.L., Malmberg, J.A., Ivarsson, M.A., Sohlberg, E., Bjorklund, A.T., Retiere, C., Sverremark-Ekstrom, E., Traherne, J., Ljungman, P., *et al.* (2013). NK cell responses to cytomegalovirus infection lead to stable imprints in the human KIR repertoire and involve activating KIRs. *Blood* 121, 2678-2688.
- Bezman, N.A., Cedars, E., Steiner, D.F., Belloch, R., Hesslein, D.G., and Lanier, L.L. (2010). Distinct requirements of microRNAs in NK cell activation, survival, and function. *J Immunol* 185, 3835-3846.
- Bezman, N.A., Chakraborty, T., Bender, T., and Lanier, L.L. (2011). miR-150 regulates the development of NK and iNKT cells. *The Journal of experimental medicine* 208, 2717-2731.
- Biassoni, R., Cantoni, C., Pende, D., Sivori, S., Parolini, S., Vitale, M., Bottino, C., and Moretta, A. (2001). Human natural killer cell receptors and co-receptors. *Immunological reviews* 181, 203-214.
- Biron, C.A., Byron, K.S., and Sullivan, J.L. (1989). Severe herpesvirus infections in an adolescent without natural killer cells. *The New England journal of medicine* 320, 1731-1735.
- Bjorkstrom, N.K., Riese, P., Heuts, F., Andersson, S., Fauriat, C., Ivarsson, M.A., Bjorklund, A.T., Flodstrom-Tullberg, M., Michaelsson, J., Rottenberg, M.E., *et al.* (2010). Expression patterns of NKG2A, KIR, and CD57 define a process of CD56dim NK-cell differentiation uncoupled from NK-cell education. *Blood* 116, 3853-3864.
- Bjorkstrom, N.K., Svensson, A., Malmberg, K.J., Eriksson, K., and Ljunggren, H.G. (2011). Characterization of natural killer cell phenotype and function during recurrent human HSV-2 infection. *PloS one* 6, e27664.
- Blankenship, T.N., and Enders, A.C. (2003). Modification of uterine vasculature during pregnancy in macaques. *Microscopy research and technique* 60, 390-401.
- Blott, E.J., and Griffiths, G.M. (2002). Secretory lysosomes. *Nat Rev Mol Cell Biol* 3, 122-131.
- Bloushtain, N., Qimron, U., Bar-Ilan, A., Hershkovitz, O., Gazit, R., Fima, E., Korc, M., Vlodaysky, I., Bovin, N.V., and Porgador, A. (2004). Membrane-associated heparan sulfate proteoglycans are involved in the recognition of cellular targets by NKp30 and NKp46. *J Immunol* 173, 2392-2401.
- Bockle, B.C., Solder, E., Kind, S., Romani, N., and Sepp, N.T. (2008). DC-sign⁺ CD163⁺ macrophages expressing hyaluronan receptor LYVE-1 are located within chorion villi of the placenta. *Placenta* 29, 187-192.
- Boles, K.S., Stepp, S.E., Bennett, M., Kumar, V., and Mathew, P.A. (2001). 2B4 (CD244) and CS1: novel members of the CD2 subset of the immunoglobulin superfamily molecules expressed on natural killer cells and other leukocytes. *Immunological reviews* 181, 234-249.
- Boos, M.D., Yokota, Y., Eberl, G., and Kee, B.L. (2007). Mature natural killer cell and lymphoid tissue-inducing cell development requires Id2-mediated suppression of E protein activity. *The Journal of experimental medicine* 204, 1119-1130.

- Borhis, G., Ahmed, P.S., Mbiribindi, B., Naiyer, M.M., Davis, D.M., Purbhoo, M.A., and Khakoo, S.I. (2013). A peptide antagonist disrupts NK cell inhibitory synapse formation. *J Immunol* *190*, 2924-2930.
- Borrego, F., Kabat, J., Kim, D.K., Lieto, L., Maasho, K., Pena, J., Solana, R., and Coligan, J.E. (2002). Structure and function of major histocompatibility complex (MHC) class I specific receptors expressed on human natural killer (NK) cells. *Molecular immunology* *38*, 637-660.
- Bose, P.D., Das, B.C., Hazam, R.K., Kumar, A., Medhi, S., and Kar, P. (2014). Evidence of extrahepatic replication of Hepatitis E virus in human placenta. *The Journal of general virology*.
- Bossard, C., Bezieau, S., Matysiak-Budnik, T., Volteau, C., Laboisse, C.L., Jotereau, F., and Mosnier, J.F. (2012). HLA-E/beta2 microglobulin overexpression in colorectal cancer is associated with recruitment of inhibitory immune cells and tumor progression. *International journal of cancer* *131*, 855-863.
- Bottger, E., Multhoff, G., Kun, J.F., and Esen, M. (2012). Plasmodium falciparum-infected erythrocytes induce granzyme B by NK cells through expression of host-Hsp70. *PloS one* *7*, e33774.
- Bottino, C., Castriconi, R., Pende, D., Rivera, P., Nanni, M., Carnemolla, B., Cantoni, C., Grassi, J., Marcenaro, S., Reymond, N., *et al.* (2003). Identification of PVR (CD155) and Nectin-2 (CD112) as cell surface ligands for the human DNAM-1 (CD226) activating molecule. *The Journal of experimental medicine* *198*, 557-567.
- Bovenschen, N., de Koning, P.J., Quadir, R., Broekhuizen, R., Damen, J.M., Froelich, C.J., Slijper, M., and Kummer, J.A. (2008). NK cell protease granzyme M targets alpha-tubulin and disorganizes the microtubule network. *J Immunol* *180*, 8184-8191.
- Boyington, J.C., Riaz, A.N., Patamawenu, A., Coligan, J.E., Brooks, A.G., and Sun, P.D. (1999). Structure of CD94 reveals a novel C-type lectin fold: implications for the NK cell-associated CD94/NG2 receptors. *Immunity* *10*, 75-82.
- Boyson, J.E., Rybalov, B., Koopman, L.A., Exley, M., Balk, S.P., Racke, F.K., Schatz, F., Masch, R., Wilson, S.B., and Strominger, J.L. (2002). CD1d and invariant NKT cells at the human maternal-fetal interface. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *99*, 13741-13746.
- Brandt, C.S., Baratin, M., Yi, E.C., Kennedy, J., Gao, Z., Fox, B., Haldeman, B., Ostrander, C.D., Kaifu, T., Chabannon, C., *et al.* (2009). The B7 family member B7-H6 is a tumor cell ligand for the activating natural killer cell receptor Nkp30 in humans. *The Journal of experimental medicine* *206*, 1495-1503.
- Brodin, P., Lakshmikanth, T., Johansson, S., Karre, K., and Hoglund, P. (2009). The strength of inhibitory input during education quantitatively tunes the functional responsiveness of individual natural killer cells. *Blood* *113*, 2434-2441.
- Brooks, A.G., Posch, P.E., Scorzelli, C.J., Borrego, F., and Coligan, J.E. (1997). NKG2A complexed with CD94 defines a novel inhibitory natural killer cell receptor. *The Journal of experimental medicine* *185*, 795-800.
- Brown, D., Trowsdale, J., and Allen, R. (2004). The LILR family: modulators of innate and adaptive immune pathways in health and disease. *Tissue antigens* *64*, 215-225.
- Browne, H., Smith, G., Beck, S., and Minson, T. (1990). A complex between the MHC class I homologue encoded by human cytomegalovirus and beta 2 microglobulin. *Nature* *347*, 770-772.
- Bruhns, P., Marchetti, P., Fridman, W.H., Vivier, E., and Daeron, M. (1999). Differential roles of N- and C-terminal immunoreceptor tyrosine-based inhibition motifs during inhibition of cell activation by killer cell inhibitory receptors. *J Immunol* *162*, 3168-3175.
- Brumbaugh, K.M., Binstadt, B.A., Billadeau, D.D., Schoon, R.A., Dick, C.J., Ten, R.M., and Leibson, P.J. (1997). Functional role for Syk tyrosine kinase in natural killer cell-mediated natural cytotoxicity. *The Journal of experimental medicine* *186*, 1965-1974.

- Bryceson, Y.T., March, M.E., Barber, D.F., Ljunggren, H.G., and Long, E.O. (2005). Cytolytic granule polarization and degranulation controlled by different receptors in resting NK cells. *The Journal of experimental medicine* *202*, 1001-1012.
- Bryceson, Y.T., March, M.E., Ljunggren, H.G., and Long, E.O. (2006). Activation, coactivation, and costimulation of resting human natural killer cells. *Immunological reviews* *214*, 73-91.
- Bulmer, J.N., and Lash, G.E. (2005). Human uterine natural killer cells: a reappraisal. *Molecular immunology* *42*, 511-521.
- Burrows, T.D., King, A., and Loke, Y.W. (1994). Expression of adhesion molecules by endovascular trophoblast and decidual endothelial cells: implications for vascular invasion during implantation. *Placenta* *15*, 21-33.
- Campbell, J.A., Trossman, D.S., Yokoyama, W.M., and Carayannopoulos, L.N. (2007). Zoonotic orthopoxviruses encode a high-affinity antagonist of NKG2D. *The Journal of experimental medicine* *204*, 1311-1317.
- Campbell, K.S., and Hasegawa, J. (2013). Natural killer cell biology: An update and future directions. *The Journal of allergy and clinical immunology* *132*, 536-544.
- Campbell, K.S., Yusa, S., Kikuchi-Maki, A., and Catina, T.L. (2004). NKp44 triggers NK cell activation through DAP12 association that is not influenced by a putative cytoplasmic inhibitory sequence. *J Immunol* *172*, 899-906.
- Cannon, M.J., and Davis, K.F. (2005). Washing our hands of the congenital cytomegalovirus disease epidemic. *BMC public health* *5*, 70.
- Cantoni, C., Bottino, C., Vitale, M., Pessino, A., Augugliaro, R., Malaspina, A., Parolini, S., Moretta, L., Moretta, A., and Biassoni, R. (1999). NKp44, a triggering receptor involved in tumor cell lysis by activated human natural killer cells, is a novel member of the immunoglobulin superfamily. *The Journal of experimental medicine* *189*, 787-796.
- Carlino, C., Stabile, H., Morrone, S., Bulla, R., Soriani, A., Agostinis, C., Bossi, F., Mocci, C., Sarazani, F., Tedesco, F., *et al.* (2008). Recruitment of circulating NK cells through decidual tissues: a possible mechanism controlling NK cell accumulation in the uterus during early pregnancy. *Blood* *111*, 3108-3115.
- Carter, C.R., Sayers, T.J., Wiltrout, R.H., Turcovski-Corrales, S.M., and Taub, D.D. (1996). Generation of antigenic peptides by lymphocyte granule serine proteases (granzymes). *Cellular immunology* *172*, 235-245.
- Cella, M., Fujikawa, K., Tassi, I., Kim, S., Latinis, K., Nishi, S., Yokoyama, W., Colonna, M., and Swat, W. (2004). Differential requirements for Vav proteins in DAP10- and ITAM-mediated NK cell cytotoxicity. *The Journal of experimental medicine* *200*, 817-823.
- Cerboni, C., Neri, F., Casartelli, N., Zingoni, A., Cosman, D., Rossi, P., Santoni, A., and Doria, M. (2007). Human immunodeficiency virus 1 Nef protein downmodulates the ligands of the activating receptor NKG2D and inhibits natural killer cell-mediated cytotoxicity. *The Journal of general virology* *88*, 242-250.
- Cerdeira, A.S., Rajakumar, A., Royle, C.M., Lo, A., Husain, Z., Thadhani, R.I., Sukhatme, V.P., Karumanchi, S.A., and Kopcow, H.D. (2013). Conversion of peripheral blood NK cells to a decidual NK-like phenotype by a cocktail of defined factors. *J Immunol* *190*, 3939-3948.
- Chakraborty, D., Rumi, M.A., Konno, T., and Soares, M.J. (2011). Natural killer cells direct hemochorial placentation by regulating hypoxia-inducible factor dependent trophoblast lineage decisions. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *108*, 16295-16300.
- Champsaur, M., and Lanier, L.L. (2010). Effect of NKG2D ligand expression on host immune responses. *Immunological reviews* *235*, 267-285.

- Chan, A., Hong, D.L., Atzberger, A., Kollnberger, S., Filer, A.D., Buckley, C.D., McMichael, A., Enver, T., and Bowness, P. (2007). CD56bright human NK cells differentiate into CD56dim cells: role of contact with peripheral fibroblasts. *J Immunol* *179*, 89-94.
- Chang, L.C., and Wang, J.P. (1999). Examination of the signal transduction pathways leading to activation of extracellular signal-regulated kinase by formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine in rat neutrophils. *FEBS letters* *454*, 165-168.
- Chantakru, S., Miller, C., Roach, L.E., Kuziel, W.A., Maeda, N., Wang, W.C., Evans, S.S., and Croy, B.A. (2002). Contributions from self-renewal and trafficking to the uterine NK cell population of early pregnancy. *J Immunol* *168*, 22-28.
- Chapman, T.L., Heikema, A.P., West, A.P., Jr., and Bjorkman, P.J. (2000). Crystal structure and ligand binding properties of the D1D2 region of the inhibitory receptor LIR-1 (ILT2). *Immunity* *13*, 727-736.
- Cheent, K., and Khakoo, S.I. (2011). Natural killer cells and hepatitis C: action and reaction. *Gut* *60*, 268-278.
- Chen, X., Allan, D.S., Krzewski, K., Ge, B., Kopcow, H., and Strominger, J.L. (2006). CD28-stimulated ERK2 phosphorylation is required for polarization of the microtubule organizing center and granules in YTS NK cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *103*, 10346-10351.
- Chen, Z., Chen, L., Baker, K., Olszak, T., Zeissig, S., Huang, Y.H., Kuo, T.T., Mandelboim, O., Beauchemin, N., Lanier, L.L., *et al.* (2011). CEACAM1 dampens antitumor immunity by down-regulating NKG2D ligand expression on tumor cells. *The Journal of experimental medicine* *208*, 2633-2640.
- Chijioke, O., Azzi, T., Nadal, D., and Munz, C. (2013). Innate immune responses against Epstein Barr virus infection. *Journal of leukocyte biology*.
- Cichocki, F., Felices, M., McCullar, V., Presnell, S.R., Al-Attar, A., Lutz, C.T., and Miller, J.S. (2011). Cutting edge: microRNA-181 promotes human NK cell development by regulating Notch signaling. *J Immunol* *187*, 6171-6175.
- Clayton, A., Mitchell, J.P., Court, J., Linnane, S., Mason, M.D., and Tabi, Z. (2008). Human tumor-derived exosomes down-modulate NKG2D expression. *J Immunol* *180*, 7249-7258.
- Coca, S., Perez-Piqueras, J., Martinez, D., Colmenarejo, A., Saez, M.A., Vallejo, C., Martos, J.A., and Moreno, M. (1997). The prognostic significance of intratumoral natural killer cells in patients with colorectal carcinoma. *Cancer* *79*, 2320-2328.
- Cohen, G.B., Gandhi, R.T., Davis, D.M., Mandelboim, O., Chen, B.K., Strominger, J.L., and Baltimore, D. (1999). The selective downregulation of class I major histocompatibility complex proteins by HIV-1 protects HIV-infected cells from NK cells. *Immunity* *10*, 661-671.
- Cohnen, A., Chiang, S.C., Stojanovic, A., Schmidt, H., Claus, M., Saftig, P., Janssen, O., Cerwenka, A., Bryceson, Y.T., and Watzl, C. (2013). Surface CD107a/LAMP-1 protects natural killer cells from degranulation-associated damage. *Blood* *122*, 1411-1418.
- Collins, M.K., Tay, C.S., and Erlebacher, A. (2009). Dendritic cell entrapment within the pregnant uterus inhibits immune surveillance of the maternal/fetal interface in mice. *The Journal of clinical investigation* *119*, 2062-2073.
- Cook, K.D., and Whitmire, J.K. (2013). The depletion of NK cells prevents T cell exhaustion to efficiently control disseminating virus infection. *J Immunol* *190*, 641-649.
- Cook, M., Briggs, D., Craddock, C., Mahendra, P., Milligan, D., Fegan, C., Darbyshire, P., Lawson, S., Boxall, E., and Moss, P. (2006). Donor KIR genotype has a major influence on the rate of cytomegalovirus reactivation following T-cell replete stem cell transplantation. *Blood* *107*, 1230-1232.

- Cooley, S., Trachtenberg, E., Bergemann, T.L., Saetern, K., Klein, J., Le, C.T., Marsh, S.G., Guethlein, L.A., Parham, P., Miller, J.S., *et al.* (2009). Donors with group B KIR haplotypes improve relapse-free survival after unrelated hematopoietic cell transplantation for acute myelogenous leukemia. *Blood* *113*, 726-732.
- Coscoy, L., and Ganem, D. (2000). Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus encodes two proteins that block cell surface display of MHC class I chains by enhancing their endocytosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *97*, 8051-8056.
- Coscoy, L., and Ganem, D. (2001). A viral protein that selectively downregulates ICAM-1 and B7-2 and modulates T cell costimulation. *The Journal of clinical investigation* *107*, 1599-1606.
- Cosman, D., Mullberg, J., Sutherland, C.L., Chin, W., Armitage, R., Fanslow, W., Kubin, M., and Chalupny, N.J. (2001). ULBPs, novel MHC class I-related molecules, bind to CMV glycoprotein UL16 and stimulate NK cytotoxicity through the NKG2D receptor. *Immunity* *14*, 123-133.
- Craven, C.M., Morgan, T., and Ward, K. (1998). Decidual spiral artery remodelling begins before cellular interaction with cytotrophoblasts. *Placenta* *19*, 241-252.
- Crawford, K., Stark, A., Kitchens, B., Sternheim, K., Pantazopoulos, V., Triantafellow, E., Wang, Z., Vasir, B., Larsen, C.E., Gabuzda, D., *et al.* (2003). CD2 engagement induces dendritic cell activation: implications for immune surveillance and T-cell activation. *Blood* *102*, 1745-1752.
- Crotta, S., Ronconi, V., Ulivieri, C., Baldari, C.T., Valiante, N.M., Abrignani, S., and Wack, A. (2006). Cytoskeleton rearrangement induced by tetraspanin engagement modulates the activation of T and NK cells. *European journal of immunology* *36*, 919-929.
- Crotta, S., Stilla, A., Wack, A., D'Andrea, A., Nuti, S., D'Oro, U., Mosca, M., Filliponi, F., Brunetto, R.M., Bonino, F., *et al.* (2002). Inhibition of natural killer cells through engagement of CD81 by the major hepatitis C virus envelope protein. *The Journal of experimental medicine* *195*, 35-41.
- Croy, B.A., Chantakru, S., Esadeg, S., Ashkar, A.A., and Wei, Q. (2002). Decidual natural killer cells: key regulators of placental development (a review). *Journal of reproductive immunology* *57*, 151-168.
- Croy, B.A., He, H., Esadeg, S., Wei, Q., McCartney, D., Zhang, J., Borzychowski, A., Ashkar, A.A., Black, G.P., Evans, S.S., *et al.* (2003). Uterine natural killer cells: insights into their cellular and molecular biology from mouse modelling. *Reproduction (Cambridge, England)* *126*, 149-160.
- Cullen, S.P., Afonina, I.S., Donadini, R., Luthi, A.U., Medema, J.P., Bird, P.I., and Martin, S.J. (2009). Nucleophosmin is cleaved and inactivated by the cytotoxic granule protease granzyme M during natural killer cell-mediated killing. *The Journal of biological chemistry* *284*, 5137-5147.
- D'Angelo, M.E., Bird, P.I., Peters, C., Reinheckel, T., Trapani, J.A., and Sutton, V.R. (2010). Cathepsin H is an additional convertase of pro-granzyme B. *The Journal of biological chemistry* *285*, 20514-20519.
- Daher, K.A., Selsted, M.E., and Lehrer, R.I. (1986). Direct inactivation of viruses by human granulocyte defensins. *Journal of virology* *60*, 1068-1074.
- Darmon, A.J., Nicholson, D.W., and Bleackley, R.C. (1995). Activation of the apoptotic protease CPP32 by cytotoxic T-cell-derived granzyme B. *Nature* *377*, 446-448.
- Daussy, C., Faure, F., Mayol, K., Viel, S., Gasteiger, G., Charrier, E., Bienvenu, J., Henry, T., Debiens, E., Hasan, U.A., *et al.* (2014). T-bet and Eomes instruct the development of two distinct natural killer cell lineages in the liver and in the bone marrow. *The Journal of experimental medicine* *211*, 563-577.
- Davidson, D., Shi, X., Zhang, S., Wang, H., Nemer, M., Ono, N., Ohno, S., Yanagi, Y., and Veillette, A. (2004). Genetic evidence linking SAP, the X-linked lymphoproliferative gene product, to Src-related kinase FynT in T(H)2 cytokine regulation. *Immunity* *21*, 707-717.

- De Oliveira, L.G., Lash, G.E., Murray-Dunning, C., Bulmer, J.N., Innes, B.A., Searle, R.F., Sass, N., and Robson, S.C. (2010). Role of interleukin 8 in uterine natural killer cell regulation of extravillous trophoblast cell invasion. *Placenta* *31*, 595-601.
- De, Y., Chen, Q., Schmidt, A.P., Anderson, G.M., Wang, J.M., Wooters, J., Oppenheim, J.J., and Chertov, O. (2000). LL-37, the neutrophil granule- and epithelial cell-derived cathelicidin, utilizes formyl peptide receptor-like 1 (FPRL1) as a receptor to chemoattract human peripheral blood neutrophils, monocytes, and T cells. *The Journal of experimental medicine* *192*, 1069-1074.
- Dechanet, J., Merville, P., Lim, A., Retiere, C., Pitard, V., Lafarge, X., Michelson, S., Meric, C., Hallet, M.M., Kourilsky, P., *et al.* (1999). Implication of gammadelta T cells in the human immune response to cytomegalovirus. *The Journal of clinical investigation* *103*, 1437-1449.
- Deckert, J., Park, P.U., Chicklas, S., Yi, Y., Li, M., Lai, K.C., Mayo, M.F., Carrigan, C.N., Erickson, H.K., Pinkas, J., *et al.* (2013). A novel anti-CD37 antibody-drug conjugate with multiple anti-tumor mechanisms for the treatment of B-cell malignancies. *Blood*.
- Delahaye, N.F., Rusakiewicz, S., Martins, I., Menard, C., Roux, S., Lyonnet, L., Paul, P., Sarabi, M., Chaput, N., Semeraro, M., *et al.* (2011). Alternatively spliced NKp30 isoforms affect the prognosis of gastrointestinal stromal tumors. *Nature medicine* *17*, 700-707.
- Deng, A., Chen, S., Li, Q., Lyu, S.C., Clayberger, C., and Krensky, A.M. (2005). Granulysin, a cytolytic molecule, is also a chemoattractant and proinflammatory activator. *J Immunol* *174*, 5243-5248.
- Deveraux, Q.L., Takahashi, R., Salvesen, G.S., and Reed, J.C. (1997). X-linked IAP is a direct inhibitor of cell-death proteases. *Nature* *388*, 300-304.
- Doherty, D.G., and O'Farrelly, C. (2000). Innate and adaptive lymphoid cells in the human liver. *Immunological reviews* *174*, 5-20.
- Dokun, A.O., Kim, S., Smith, H.R., Kang, H.S., Chu, D.T., and Yokoyama, W.M. (2001). Specific and nonspecific NK cell activation during virus infection. *Nature immunology* *2*, 951-956.
- Dollard, S.C., Grosse, S.D., and Ross, D.S. (2007). New estimates of the prevalence of neurological and sensory sequelae and mortality associated with congenital cytomegalovirus infection. *Reviews in medical virology* *17*, 355-363.
- Draghi, M., Pashine, A., Sanjanwala, B., Gendzekhadze, K., Cantoni, C., Cosman, D., Moretta, A., Valiante, N.M., and Parham, P. (2007). NKp46 and NKG2D recognition of infected dendritic cells is necessary for NK cell activation in the human response to influenza infection. *J Immunol* *178*, 2688-2698.
- Drake, P.M., Gunn, M.D., Charo, I.F., Tsou, C.L., Zhou, Y., Huang, L., and Fisher, S.J. (2001). Human placental cytotrophoblasts attract monocytes and CD56(bright) natural killer cells via the actions of monocyte inflammatory protein 1alpha. *The Journal of experimental medicine* *193*, 1199-1212.
- Duley, L. (2009). The global impact of pre-eclampsia and eclampsia. *Seminars in perinatology* *33*, 130-137.
- Dunn, C., Chalupny, N.J., Sutherland, C.L., Dosch, S., Sivakumar, P.V., Johnson, D.C., and Cosman, D. (2003). Human cytomegalovirus glycoprotein UL16 causes intracellular sequestration of NKG2D ligands, protecting against natural killer cell cytotoxicity. *The Journal of experimental medicine* *197*, 1427-1439.
- Duplantier, A.J., and van Hoek, M.L. (2013). The Human Cathelicidin Antimicrobial Peptide LL-37 as a Potential Treatment for Polymicrobial Infected Wounds. *Frontiers in immunology* *4*, 143.
- Dupuy, S., Lambert, M., Zucman, D., Choukem, S.P., Tognarelli, S., Pages, C., Lebbe, C., and Caillat-Zucman, S. (2012). Human Herpesvirus 8 (HHV8) sequentially shapes the NK cell repertoire during the course of asymptomatic infection and Kaposi sarcoma. *PLoS pathogens* *8*, e1002486.
- Eagle, R.A., Traherne, J.A., Hair, J.R., Jafferji, I., and Trowsdale, J. (2009). ULBP6/RAET1L is an additional human NKG2D ligand. *European journal of immunology* *39*, 3207-3216.

- Eide, I.P., Rolfseng, T., Isaksen, C.V., Mecsei, R., Roald, B., Lydersen, S., Salvesen, K.A., Harsem, N.K., and Austgulen, R. (2006). Serious foetal growth restriction is associated with reduced proportions of natural killer cells in decidua basalis. *Virchows Archiv : an international journal of pathology* *448*, 269-276.
- Eissmann, P., Beauchamp, L., Wooters, J., Tilton, J.C., Long, E.O., and Watzl, C. (2005). Molecular basis for positive and negative signaling by the natural killer cell receptor 2B4 (CD244). *Blood* *105*, 4722-4729.
- El Costa, H., Casemayou, A., Aguerre-Girr, M., Rabot, M., Berrebi, A., Parant, O., Clouet-Delannoy, M., Lombardelli, L., Jabrane-Ferrat, N., Rukavina, D., *et al.* (2008). Critical and differential roles of NKp46- and NKp30-activating receptors expressed by uterine NK cells in early pregnancy. *J Immunol* *181*, 3009-3017.
- Elboim, M., Grodzovski, I., Djian, E., Wolf, D.G., and Mandelboim, O. (2013). HSV-2 specifically down regulates HLA-C expression to render HSV-2-infected DCs susceptible to NK cell killing. *PLoS pathogens* *9*, e1003226.
- Eleme, K., Taner, S.B., Onfelt, B., Collinson, L.M., McCann, F.E., Chalupny, N.J., Cosman, D., Hopkins, C., Magee, A.I., and Davis, D.M. (2004). Cell surface organization of stress-inducible proteins ULBP and MICA that stimulate human NK cells and T cells via NKG2D. *The Journal of experimental medicine* *199*, 1005-1010.
- Elliott, J.M., Wahle, J.A., and Yokoyama, W.M. (2010). MHC class I-deficient natural killer cells acquire a licensed phenotype after transfer into an MHC class I-sufficient environment. *The Journal of experimental medicine* *207*, 2073-2079.
- Enders, G., Daiminger, A., Bader, U., Exler, S., and Enders, M. (2011). Intrauterine transmission and clinical outcome of 248 pregnancies with primary cytomegalovirus infection in relation to gestational age. *J Clin Virol* *52*, 244-246.
- Erlebacher, A., Vencato, D., Price, K.A., Zhang, D., and Glimcher, L.H. (2007). Constraints in antigen presentation severely restrict T cell recognition of the allogeneic fetus. *The Journal of clinical investigation* *117*, 1399-1411.
- Evans, P.C., Soin, A., Wreghitt, T.G., Taylor, C.J., Wight, D.G., and Alexander, G.J. (2000). An association between cytomegalovirus infection and chronic rejection after liver transplantation. *Transplantation* *69*, 30-35.
- Fabian, M.R., and Sonenberg, N. (2012). The mechanics of miRNA-mediated gene silencing: a look under the hood of miRISC. *Nature structural & molecular biology* *19*, 586-593.
- Fadda, L., Borhis, G., Ahmed, P., Cheent, K., Pagoon, S.V., Cazaly, A., Stathopoulos, S., Middleton, D., Mulder, A., Claas, F.H., *et al.* (2010). Peptide antagonism as a mechanism for NK cell activation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *107*, 10160-10165.
- Fahnestock, M.L., Johnson, J.L., Feldman, R.M., Neveu, J.M., Lane, W.S., and Bjorkman, P.J. (1995). The MHC class I homolog encoded by human cytomegalovirus binds endogenous peptides. *Immunity* *3*, 583-590.
- Falco, M., Marcenaro, E., Romeo, E., Bellora, F., Marras, D., Vely, F., Ferracci, G., Moretta, L., Moretta, A., and Bottino, C. (2004). Homophilic interaction of NTBA, a member of the CD2 molecular family: induction of cytotoxicity and cytokine release in human NK cells. *European journal of immunology* *34*, 1663-1672.
- Fan, Q.R., Long, E.O., and Wiley, D.C. (2001). Crystal structure of the human natural killer cell inhibitory receptor KIR2DL1-HLA-Cw4 complex. *Nature immunology* *2*, 452-460.
- Fan, Z., Beresford, P.J., Oh, D.Y., Zhang, D., and Lieberman, J. (2003a). Tumor suppressor NM23-H1 is a granzyme A-activated DNase during CTL-mediated apoptosis, and the nucleosome assembly protein SET is its inhibitor. *Cell* *112*, 659-672.
- Fan, Z., Beresford, P.J., Zhang, D., and Lieberman, J. (2002). HMG2 interacts with the nucleosome assembly protein SET and is a target of the cytotoxic T-lymphocyte protease granzyme A. *Molecular and cellular biology* *22*, 2810-2820.

- Fan, Z., Beresford, P.J., Zhang, D., Xu, Z., Novina, C.D., Yoshida, A., Pommier, Y., and Lieberman, J. (2003b). Cleaving the oxidative repair protein Ape1 enhances cell death mediated by granzyme A. *Nature immunology* *4*, 145-153.
- Faure, M., Barber, D.F., Takahashi, S.M., Jin, T., and Long, E.O. (2003). Spontaneous clustering and tyrosine phosphorylation of NK cell inhibitory receptor induced by ligand binding. *J Immunol* *170*, 6107-6114.
- Fauriat, C., Ivarsson, M.A., Ljunggren, H.G., Malmberg, K.J., and Michaelsson, J. (2010). Education of human natural killer cells by activating killer cell immunoglobulin-like receptors. *Blood* *115*, 1166-1174.
- Fehniger, T.A., Wylie, T., Germino, E., Leong, J.W., Magrini, V.J., Koul, S., Keppel, C.R., Schneider, S.E., Koboldt, D.C., Sullivan, R.P., *et al.* (2010). Next-generation sequencing identifies the natural killer cell microRNA transcriptome. *Genome research* *20*, 1590-1604.
- Fellows, E., Gil-Parrado, S., Jenne, D.E., and Kurschus, F.C. (2007). Natural killer cell-derived human granzyme H induces an alternative, caspase-independent cell-death program. *Blood* *110*, 544-552.
- Ferlazzo, G., and Munz, C. (2004). NK cell compartments and their activation by dendritic cells. *J Immunol* *172*, 1333-1339.
- Ferlazzo, G., Thomas, D., Lin, S.L., Goodman, K., Morandi, B., Muller, W.A., Moretta, A., and Munz, C. (2004). The abundant NK cells in human secondary lymphoid tissues require activation to express killer cell Ig-like receptors and become cytolytic. *J Immunol* *172*, 1455-1462.
- Fernandez, N.C., Treiner, E., Vance, R.E., Jamieson, A.M., Lemieux, S., and Raulet, D.H. (2005). A subset of natural killer cells achieves self-tolerance without expressing inhibitory receptors specific for self-MHC molecules. *Blood* *105*, 4416-4423.
- Finton, K.A., and Strong, R.K. (2012). Structural insights into activation of antiviral NK cell responses. *Immunological reviews* *250*, 239-257.
- Fitzgerald, J.S., Poehlmann, T.G., Schleussner, E., and Markert, U.R. (2008). Trophoblast invasion: the role of intracellular cytokine signalling via signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3). *Human reproduction update* *14*, 335-344.
- Flores-Villanueva, P.O., Yunis, E.J., Delgado, J.C., Vittinghoff, E., Buchbinder, S., Leung, J.Y., Ugliero, A.M., Clavijo, O.P., Rosenberg, E.S., Kalams, S.A., *et al.* (2001). Control of HIV-1 viremia and protection from AIDS are associated with HLA-Bw4 homozygosity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *98*, 5140-5145.
- Foley, B., Cooley, S., Verneris, M.R., Curtsinger, J., Luo, X., Waller, E.K., Anasetti, C., Weisdorf, D., and Miller, J.S. (2012a). Human cytomegalovirus (CMV)-induced memory-like NKG2C(+) NK cells are transplantable and expand in vivo in response to recipient CMV antigen. *J Immunol* *189*, 5082-5088.
- Foley, B., Cooley, S., Verneris, M.R., Pitt, M., Curtsinger, J., Luo, X., Lopez-Verges, S., Lanier, L.L., Weisdorf, D., and Miller, J.S. (2012b). Cytomegalovirus reactivation after allogeneic transplantation promotes a lasting increase in educated NKG2C+ natural killer cells with potent function. *Blood* *119*, 2665-2674.
- Fraser, S.A., Karimi, R., Michalak, M., and Hudig, D. (2000). Perforin lytic activity is controlled by calreticulin. *J Immunol* *164*, 4150-4155.
- Freud, A.G., and Caligiuri, M.A. (2006). Human natural killer cell development. *Immunological reviews* *214*, 56-72.
- Frey, M., Packianathan, N.B., Fehniger, T.A., Ross, M.E., Wang, W.C., Stewart, C.C., Caligiuri, M.A., and Evans, S.S. (1998). Differential expression and function of L-selectin on CD56bright and CD56dim natural killer cell subsets. *J Immunol* *161*, 400-408.
- Fuchs, A., Cella, M., Kondo, T., and Colonna, M. (2005). Paradoxical inhibition of human natural interferon-producing cells by the activating receptor NKp44. *Blood* *106*, 2076-2082.

- Furman, M.H., Dey, N., Tortorella, D., and Ploegh, H.L. (2002). The human cytomegalovirus US10 gene product delays trafficking of major histocompatibility complex class I molecules. *Journal of virology* *76*, 11753-11756.
- Gagne, K., Busson, M., Balere-Appert, M.L., Absi, L., Jollet, I., Bignon, J.D., Bois, M., Dormoy, A., Dubois, V., Gebuhrer, L., *et al.* (2007). Relevance of KIR gene matching in unrelated hematopoietic stem cell transplantations. *Tissue antigens* *69 Suppl 1*, 118-122.
- Galy, A., Travis, M., Cen, D., and Chen, B. (1995). Human T, B, natural killer, and dendritic cells arise from a common bone marrow progenitor cell subset. *Immunity* *3*, 459-473.
- Gamen, S., Hanson, D.A., Kaspar, A., Naval, J., Krensky, A.M., and Anel, A. (1998). Granulysin-induced apoptosis. I. Involvement of at least two distinct pathways. *J Immunol* *161*, 1758-1764.
- Gandhi, M.K., and Khanna, R. (2004). Human cytomegalovirus: clinical aspects, immune regulation, and emerging treatments. *The Lancet infectious diseases* *4*, 725-738.
- Gascoyne, D.M., Long, E., Veiga-Fernandes, H., de Boer, J., Williams, O., Seddon, B., Coles, M., Kioussis, D., and Brady, H.J. (2009). The basic leucine zipper transcription factor E4BP4 is essential for natural killer cell development. *Nature immunology* *10*, 1118-1124.
- Georgiades, P., Ferguson-Smith, A.C., and Burton, G.J. (2002). Comparative developmental anatomy of the murine and human definitive placentae. *Placenta* *23*, 3-19.
- Gerosa, F., Baldani-Guerra, B., Nisii, C., Marchesini, V., Carra, G., and Trinchieri, G. (2002). Reciprocal activating interaction between natural killer cells and dendritic cells. *The Journal of experimental medicine* *195*, 327-333.
- Ghosh, D., Lippert, D., Krokhin, O., Cortens, J.P., and Wilkins, J.A. (2010). Defining the membrane proteome of NK cells. *J Mass Spectrom* *45*, 1-25.
- Giamarellos-Bourboulis, E.J., Tsaganos, T., Spyridaki, E., Mouktaroudi, M., Plachouras, D., Vaki, I., Karagianni, V., Antonopoulou, A., Veloni, V., and Giamarellou, H. (2006). Early changes of CD4-positive lymphocytes and NK cells in patients with severe Gram-negative sepsis. *Critical care (London, England)* *10*, R166.
- Gilfillan, S., Ho, E.L., Cella, M., Yokoyama, W.M., and Colonna, M. (2002). NKG2D recruits two distinct adapters to trigger NK cell activation and costimulation. *Nature immunology* *3*, 1150-1155.
- Gill, S., Vasey, A.E., De Souza, A., Baker, J., Smith, A.T., Kohrt, H.E., Florek, M., Gibbs, K.D., Jr., Tate, K., Ritchie, D.S., *et al.* (2012). Rapid development of exhaustion and down-regulation of eomesodermin limit the antitumor activity of adoptively transferred murine natural killer cells. *Blood* *119*, 5758-5768.
- Gillard, G.O., Bivas-Benita, M., Hovav, A.H., Grandpre, L.E., Panas, M.W., Seaman, M.S., Haynes, B.F., and Letvin, N.L. (2011). Thy1+ NK [corrected] cells from vaccinia virus-primed mice confer protection against vaccinia virus challenge in the absence of adaptive lymphocytes. *PLoS pathogens* *7*, e1002141.
- Gomez-Lozano, N., de Pablo, R., Puente, S., and Vilches, C. (2003). Recognition of HLA-G by the NK cell receptor KIR2DL4 is not essential for human reproduction. *European journal of immunology* *33*, 639-644.
- Goodridge, J.P., Burian, A., Lee, N., and Geraghty, D.E. (2010). HLA-F complex without peptide binds to MHC class I protein in the open conformer form. *J Immunol* *184*, 6199-6208.
- Goodridge, J.P., Burian, A., Lee, N., and Geraghty, D.E. (2013a). HLA-F and MHC Class I Open Conformers Are Ligands for NK Cell Ig-like Receptors. *J Immunol* *191*, 3553-3562.
- Goodridge, J.P., Lee, N., Burian, A., Pyo, C.W., Tykodi, S.S., Warren, E.H., Yee, C., Riddell, S.R., and Geraghty, D.E. (2013b). HLA-F and MHC-I open conformers cooperate in a MHC-I antigen cross-presentation pathway. *J Immunol* *191*, 1567-1577.

- Gordon, S.M., Chaix, J., Rupp, L.J., Wu, J., Madera, S., Sun, J.C., Lindsten, T., and Reiner, S.L. (2012). The transcription factors T-bet and Eomes control key checkpoints of natural killer cell maturation. *Immunity* *36*, 55-67.
- Graham, D.B., Cella, M., Giurisato, E., Fujikawa, K., Miletic, A.V., Kloepfel, T., Brim, K., Takai, T., Shaw, A.S., Colonna, M., *et al.* (2006). Vav1 controls DAP10-mediated natural cytotoxicity by regulating actin and microtubule dynamics. *J Immunol* *177*, 2349-2355.
- Griffiths, G.M., and Isaacs, S. (1993). Granzymes A and B are targeted to the lytic granules of lymphocytes by the mannose-6-phosphate receptor. *The Journal of cell biology* *120*, 885-896.
- Grossman, W.J., Revell, P.A., Lu, Z.H., Johnson, H., Bredemeyer, A.J., and Ley, T.J. (2003). The orphan granzymes of humans and mice. *Current opinion in immunology* *15*, 544-552.
- Gruda, R., Achdout, H., Stern-Ginossar, N., Gazit, R., Betser-Cohen, G., Manaster, I., Katz, G., Gonen-Gross, T., Tirosh, B., and Mandelboim, O. (2007). Intracellular cysteine residues in the tail of MHC class I proteins are crucial for extracellular recognition by leukocyte Ig-like receptor 1. *J Immunol* *179*, 3655-3661.
- Guimond, M., Freud, A.G., Mao, H.C., Yu, J., Blaser, B.W., Leong, J.W., Vandeusen, J.B., Dorrance, A., Zhang, J., Mackall, C.L., *et al.* (2010). In vivo role of Flt3 ligand and dendritic cells in NK cell homeostasis. *J Immunol* *184*, 2769-2775.
- Guma, M., Angulo, A., Vilches, C., Gomez-Lozano, N., Malats, N., and Lopez-Botet, M. (2004). Imprint of human cytomegalovirus infection on the NK cell receptor repertoire. *Blood* *104*, 3664-3671.
- Guma, M., Budt, M., Saez, A., Brckalo, T., Hengel, H., Angulo, A., and Lopez-Botet, M. (2006). Expansion of CD94/NKG2C⁺ NK cells in response to human cytomegalovirus-infected fibroblasts. *Blood* *107*, 3624-3631.
- Hankey, K.G., Drachenberg, C.B., Papadimitriou, J.C., Klassen, D.K., Philosophe, B., Bartlett, S.T., Groh, V., Spies, T., and Mann, D.L. (2002). MIC expression in renal and pancreatic allografts. *Transplantation* *73*, 304-306.
- Hanna, J., Goldman-Wohl, D., Hamani, Y., Avraham, I., Greenfield, C., Natanson-Yaron, S., Prus, D., Cohen-Daniel, L., Arnon, T.I., Manaster, I., *et al.* (2006). Decidual NK cells regulate key developmental processes at the human fetal-maternal interface. *Nature medicine* *12*, 1065-1074.
- Hanna, J., Gonen-Gross, T., Fitchett, J., Rowe, T., Daniels, M., Arnon, T.I., Gazit, R., Joseph, A., Schjetne, K.W., Steinle, A., *et al.* (2004). Novel APC-like properties of human NK cells directly regulate T cell activation. *The Journal of clinical investigation* *114*, 1612-1623.
- Hanna, J., Wald, O., Goldman-Wohl, D., Prus, D., Markel, G., Gazit, R., Katz, G., Haimov-Kochman, R., Fujii, N., Yagel, S., *et al.* (2003). CXCL12 expression by invasive trophoblasts induces the specific migration of CD16⁺ human natural killer cells. *Blood* *102*, 1569-1577.
- Hannan, N.J., Jones, R.L., Critchley, H.O., Kovacs, G.J., Rogers, P.A., Affandi, B., and Salamonsen, L.A. (2004). Coexpression of fractalkine and its receptor in normal human endometrium and in endometrium from users of progestin-only contraception supports a role for fractalkine in leukocyte recruitment and endometrial remodeling. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* *89*, 6119-6129.
- Hanson, D.A., Kaspar, A.A., Poulain, F.R., and Krensky, A.M. (1999). Biosynthesis of granulysin, a novel cytolytic molecule. *Molecular immunology* *36*, 413-422.
- Harden, J.L., and Egilmez, N.K. (2012). Indoleamine 2,3-dioxygenase and dendritic cell tolerogenicity. *Immunological investigations* *41*, 738-764.
- Harris, L.K. (2010). Review: Trophoblast-vascular cell interactions in early pregnancy: how to remodel a vessel. *Placenta* *31 Suppl*, S93-98.

- Hayakawa, Y., Takeda, K., Yagita, H., Smyth, M.J., Van Kaer, L., Okumura, K., and Saiki, I. (2002). IFN-gamma-mediated inhibition of tumor angiogenesis by natural killer T-cell ligand, alpha-galactosylceramide. *Blood* 100, 1728-1733.
- Hayashi, T., Imai, K., Morishita, Y., Hayashi, I., Kusunoki, Y., and Nakachi, K. (2006). Identification of the NKG2D haplotypes associated with natural cytotoxic activity of peripheral blood lymphocytes and cancer immunosurveillance. *Cancer research* 66, 563-570.
- Heemskerk, M.H., Blom, B., Nolan, G., Stegmann, A.P., Bakker, A.Q., Weijer, K., Res, P.C., and Spits, H. (1997). Inhibition of T cell and promotion of natural killer cell development by the dominant negative helix loop helix factor Id3. *The Journal of experimental medicine* 186, 1597-1602.
- Henderson, T.A., Saunders, P.T., Moffett-King, A., Groome, N.P., and Critchley, H.O. (2003). Steroid receptor expression in uterine natural killer cells. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 88, 440-449.
- Hengel, H., Koopmann, J.O., Flohr, T., Muranyi, W., Goulmy, E., Hammerling, G.J., Koszinowski, U.H., and Momburg, F. (1997). A viral ER-resident glycoprotein inactivates the MHC-encoded peptide transporter. *Immunity* 6, 623-632.
- Herzer, K., Falk, C.S., Encke, J., Eichhorst, S.T., Ulsenheimer, A., Seliger, B., and Krammer, P.H. (2003). Upregulation of major histocompatibility complex class I on liver cells by hepatitis C virus core protein via p53 and TAP1 impairs natural killer cell cytotoxicity. *Journal of virology* 77, 8299-8309.
- Hiby, S.E., Apps, R., Sharkey, A.M., Farrell, L.E., Gardner, L., Mulder, A., Claas, F.H., Walker, J.J., Redman, C.W., Morgan, L., *et al.* (2010). Maternal activating KIRs protect against human reproductive failure mediated by fetal HLA-C2. *The Journal of clinical investigation* 120, 4102-4110.
- Hiby, S.E., King, A., Sharkey, A.M., and Loke, Y.W. (1997). Human uterine NK cells have a similar repertoire of killer inhibitory and activatory receptors to those found in blood, as demonstrated by RT-PCR and sequencing. *Molecular immunology* 34, 419-430.
- Hiby, S.E., Walker, J.J., O'Shaughnessy, K. M., Redman, C.W., Carrington, M., Trowsdale, J., and Moffett, A. (2004). Combinations of maternal KIR and fetal HLA-C genes influence the risk of preeclampsia and reproductive success. *The Journal of experimental medicine* 200, 957-965.
- Hirst, C.E., Buzza, M.S., Sutton, V.R., Trapani, J.A., Loveland, K.L., and Bird, P.I. (2001). Perforin-independent expression of granzyme B and proteinase inhibitor 9 in human testis and placenta suggests a role for granzyme B-mediated proteolysis in reproduction. *Molecular human reproduction* 7, 1133-1142.
- Hoglund, P., and Brodin, P. (2010). Current perspectives of natural killer cell education by MHC class I molecules. *Nature reviews* 10, 724-734.
- Holder, K.A., Stapleton, S.N., Gallant, M.E., Russell, R.S., and Grant, M.D. (2013). Hepatitis C virus-infected cells downregulate NKp30 and inhibit ex vivo NK cell functions. *J Immunol* 191, 3308-3318.
- Holmes, C.H., Simpson, K.L., Okada, H., Okada, N., Wainwright, S.D., Purcell, D.F., and Houlihan, J.M. (1992). Complement regulatory proteins at the feto-maternal interface during human placental development: distribution of CD59 by comparison with membrane cofactor protein (CD46) and decay accelerating factor (CD55). *European journal of immunology* 22, 1579-1585.
- Hong, H.S., Eberhard, J.M., Keudel, P., Bollmann, B.A., Ballmaier, M., Bhatnagar, N., Zielinska-Skowronek, M., Schmidt, R.E., and Meyer-Olson, D. (2010). HIV infection is associated with a preferential decline in less-differentiated CD56dim CD16+ NK cells. *Journal of virology* 84, 1183-1188.
- Hoorweg, K., Peters, C.P., Cornelissen, F., Aparicio-Domingo, P., Papazian, N., Kazemier, G., Mjosberg, J.M., Spits, H., and Cupedo, T. (2012). Functional Differences between Human NKp44(-) and NKp44(+) RORC(+) Innate Lymphoid Cells. *Frontiers in immunology* 3, 72.
- Horejsi, V. (2004). Transmembrane adaptor proteins in membrane microdomains: important regulators of immunoreceptor signaling. *Immunology letters* 92, 43-49.

- Hornig, T., Bezbradica, J.S., and Medzhitov, R. (2007). NKG2D signaling is coupled to the interleukin 15 receptor signaling pathway. *Nature immunology* 8, 1345-1352.
- Hornung, V., Rothenfusser, S., Britsch, S., Krug, A., Jahrsdorfer, B., Giese, T., Endres, S., and Hartmann, G. (2002). Quantitative expression of toll-like receptor 1-10 mRNA in cellular subsets of human peripheral blood mononuclear cells and sensitivity to CpG oligodeoxynucleotides. *J Immunol* 168, 4531-4537.
- Hou, Q., Zhao, T., Zhang, H., Lu, H., Zhang, Q., Sun, L., and Fan, Z. (2008). Granzyme H induces apoptosis of target tumor cells characterized by DNA fragmentation and Bid-dependent mitochondrial damage. *Molecular immunology* 45, 1044-1055.
- Houchins, J.P., Yabe, T., McSherry, C., and Bach, F.H. (1991). DNA sequence analysis of NKG2, a family of related cDNA clones encoding type II integral membrane proteins on human natural killer cells. *The Journal of experimental medicine* 173, 1017-1020.
- Hsieh, G.C., Loukas, A., Wahl, A.M., Bhatia, M., Wang, Y., Williamson, A.L., Kehn, K.W., Maruyama, H., Hotez, P.J., Leitenberg, D., *et al.* (2004). A secreted protein from the human hookworm necator americanus binds selectively to NK cells and induces IFN-gamma production. *J Immunol* 173, 2699-2704.
- Hu, W., Wang, H., Wang, Z., Huang, H., and Dong, M. (2007). Elevated serum levels of interleukin-15 and interleukin-16 in preeclampsia. *Journal of reproductive immunology* 73, 166-171.
- Hu, Y., Dutz, J.P., MacCalman, C.D., Yong, P., Tan, R., and von Dadelszen, P. (2006). Decidual NK cells alter in vitro first trimester extravillous cytotrophoblast migration: a role for IFN-gamma. *J Immunol* 177, 8522-8530.
- Hua, G., Wang, S., Zhong, C., Xue, P., and Fan, Z. (2009). Ignition of p53 bomb sensitizes tumor cells to granzyme K-mediated cytotoxicity. *J Immunol* 182, 2152-2159.
- Hua, G., Zhang, Q., and Fan, Z. (2007). Heat shock protein 75 (TRAP1) antagonizes reactive oxygen species generation and protects cells from granzyme M-mediated apoptosis. *The Journal of biological chemistry* 282, 20553-20560.
- Huard, B., and Fruh, K. (2000). A role for MHC class I down-regulation in NK cell lysis of herpes virus-infected cells. *European journal of immunology* 30, 509-515.
- Hung, T.H., Skepper, J.N., and Burton, G.J. (2001). In vitro ischemia-reperfusion injury in term human placenta as a model for oxidative stress in pathological pregnancies. *The American journal of pathology* 159, 1031-1043.
- Huntington, N.D., Voshchenrich, C.A., and Di Santo, J.P. (2007). Developmental pathways that generate natural-killer-cell diversity in mice and humans. *Nature reviews* 7, 703-714.
- Inoue, H., Miyaji, M., Kosugi, A., Nagafuku, M., Okazaki, T., Mimori, T., Amakawa, R., Fukuhara, S., Domae, N., Bloom, E.T., *et al.* (2002). Lipid rafts as the signaling scaffold for NK cell activation: tyrosine phosphorylation and association of LAT with phosphatidylinositol 3-kinase and phospholipase C-gamma following CD2 stimulation. *European journal of immunology* 32, 2188-2198.
- Irmeler, M., Hertig, S., MacDonald, H.R., Sadoul, R., Becherer, J.D., Proudfoot, A., Solari, R., and Tschopp, J. (1995). Granzyme A is an interleukin 1 beta-converting enzyme. *The Journal of experimental medicine* 181, 1917-1922.
- Irmeler, M., Thome, M., Hahne, M., Schneider, P., Hofmann, K., Steiner, V., Bodmer, J.L., Schroter, M., Burns, K., Mattmann, C., *et al.* (1997). Inhibition of death receptor signals by cellular FLIP. *Nature* 388, 190-195.
- Ito, M., Maruyama, T., Saito, N., Koganei, S., Yamamoto, K., and Matsumoto, N. (2006). Killer cell lectin-like receptor G1 binds three members of the classical cadherin family to inhibit NK cell cytotoxicity. *The Journal of experimental medicine* 203, 289-295.
- Jaeger, B.N., Donadieu, J., Cognet, C., Bernat, C., Ordonez-Rueda, D., Barlogis, V., Mahlaoui, N., Fenis, A., Narni-Mancinelli, E., Beaupain, B., *et al.* (2012). Neutrophil depletion impairs natural killer cell maturation, function, and homeostasis. *The Journal of experimental medicine* 209, 565-580.

- Jamieson, A.M., Isnard, P., Dorfman, J.R., Coles, M.C., and Raulet, D.H. (2004). Turnover and proliferation of NK cells in steady state and lymphopenic conditions. *J Immunol* *172*, 864-870.
- Janeway, C.A., Jr. (2001). How the immune system protects the host from infection. *Microbes and infection / Institut Pasteur* *3*, 1167-1171.
- Jarahian, M., Fiedler, M., Cohnen, A., Djandji, D., Hammerling, G.J., Gati, C., Cerwenka, A., Turner, P.C., Moyer, R.W., Watzl, C., *et al.* (2011). Modulation of NKp30- and NKp46-mediated natural killer cell responses by poxviral hemagglutinin. *PLoS pathogens* *7*, e1002195.
- Jarahian, M., Watzl, C., Fournier, P., Arnold, A., Djandji, D., Zahedi, S., Cerwenka, A., Paschen, A., Schirmmacher, V., and Momburg, F. (2009). Activation of natural killer cells by newcastle disease virus hemagglutinin-neuraminidase. *Journal of virology* *83*, 8108-8121.
- Jarczak, J., Kosciuczuk, E.M., Lisowski, P., Strzalkowska, N., Jozwik, A., Horbanczuk, J., Krzyzewski, J., Zwierzchowski, L., and Bagnicka, E. (2013). Defensins: Natural component of human innate immunity. *Human immunology* *74*, 1069-1079.
- Jegerlehner, A., Schmitz, N., Storni, T., and Bachmann, M.F. (2004). Influenza A vaccine based on the extracellular domain of M2: weak protection mediated via antibody-dependent NK cell activity. *J Immunol* *172*, 5598-5605.
- Jiang, K., Zhong, B., Gilvary, D.L., Corliss, B.C., Hong-Geller, E., Wei, S., and Djeu, J.Y. (2000). Pivotal role of phosphoinositide-3 kinase in regulation of cytotoxicity in natural killer cells. *Nature immunology* *1*, 419-425.
- Jiang, K., Zhong, B., Gilvary, D.L., Corliss, B.C., Vivier, E., Hong-Geller, E., Wei, S., and Djeu, J.Y. (2002). Syk regulation of phosphoinositide 3-kinase-dependent NK cell function. *J Immunol* *168*, 3155-3164.
- Jiang, K., Zhong, B., Ritchey, C., Gilvary, D.L., Hong-Geller, E., Wei, S., and Djeu, J.Y. (2003). Regulation of Akt-dependent cell survival by Syk and Rac. *Blood* *101*, 236-244.
- Joncker, N.T., Fernandez, N.C., Treiner, E., Vivier, E., and Raulet, D.H. (2009). NK cell responsiveness is tuned commensurate with the number of inhibitory receptors for self-MHC class I: the rheostat model. *J Immunol* *182*, 4572-4580.
- Joncker, N.T., Shifrin, N., Delebecque, F., and Raulet, D.H. (2010). Mature natural killer cells reset their responsiveness when exposed to an altered MHC environment. *The Journal of experimental medicine* *207*, 2065-2072.
- Jones, D.C., Roghanian, A., Brown, D.P., Chang, C., Allen, R.L., Trowsdale, J., and Young, N.T. (2009). Alternative mRNA splicing creates transcripts encoding soluble proteins from most LILR genes. *European journal of immunology* *39*, 3195-3206.
- Jones, J.L., Lopez, A., Wilson, M., Schulkin, J., and Gibbs, R. (2001). Congenital toxoplasmosis: a review. *Obstetrical & gynecological survey* *56*, 296-305.
- Jones, R.L., Hannan, N.J., Kaitu'u, T.J., Zhang, J., and Salamonsen, L.A. (2004). Identification of chemokines important for leukocyte recruitment to the human endometrium at the times of embryo implantation and menstruation. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* *89*, 6155-6167.
- Jones, T.R., and Sun, L. (1997). Human cytomegalovirus US2 destabilizes major histocompatibility complex class I heavy chains. *Journal of virology* *71*, 2970-2979.
- Jonsson, A.H., Yang, L., Kim, S., Taffner, S.M., and Yokoyama, W.M. (2010). Effects of MHC class I alleles on licensing of Ly49A+ NK cells. *J Immunol* *184*, 3424-3432.
- Jost, P.J., Grabow, S., Gray, D., McKenzie, M.D., Nachbur, U., Huang, D.C., Bouillet, P., Thomas, H.E., Borner, C., Silke, J., *et al.* (2009). XIAP discriminates between type I and type II FAS-induced apoptosis. *Nature* *460*, 1035-1039.

- Jost, S., and Altfeld, M. (2013). Control of human viral infections by natural killer cells. *Annual review of immunology* 31, 163-194.
- Jovanovic, M., Stefanoska, I., Radojic, L., and Vicovac, L. (2010). Interleukin-8 (CXCL8) stimulates trophoblast cell migration and invasion by increasing levels of matrix metalloproteinase (MMP)2 and MMP9 and integrins alpha5 and beta1. *Reproduction (Cambridge, England)* 139, 789-798.
- Joyce, M.G., and Sun, P.D. (2011). The structural basis of ligand recognition by natural killer cell receptors. *Journal of biomedicine & biotechnology* 2011, 203628.
- Joyce, M.G., Tran, P., Zhuravleva, M.A., Jaw, J., Colonna, M., and Sun, P.D. (2011). Crystal structure of human natural cytotoxicity receptor Nkp30 and identification of its ligand binding site. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108, 6223-6228.
- Kaiser, B.K., Barahmand-Pour, F., Paulsene, W., Medley, S., Geraghty, D.E., and Strong, R.K. (2005). Interactions between NKG2x immunoreceptors and HLA-E ligands display overlapping affinities and thermodynamics. *J Immunol* 174, 2878-2884.
- Kalkunte, S., Chichester, C.O., Gotsch, F., Sentman, C.L., Romero, R., and Sharma, S. (2008). Evolution of non-cytotoxic uterine natural killer cells. *Am J Reprod Immunol* 59, 425-432.
- Kalkunte, S.S., Mselle, T.F., Norris, W.E., Wira, C.R., Sentman, C.L., and Sharma, S. (2009). Vascular endothelial growth factor C facilitates immune tolerance and endovascular activity of human uterine NK cells at the maternal-fetal interface. *J Immunol* 182, 4085-4092.
- Kamizono, S., Duncan, G.S., Seidel, M.G., Morimoto, A., Hamada, K., Grosveld, G., Akashi, K., Lind, E.F., Haight, J.P., Ohashi, P.S., *et al.* (2009). Nfil3/E4bp4 is required for the development and maturation of NK cells in vivo. *The Journal of experimental medicine* 206, 2977-2986.
- Karre, K., Ljunggren, H.G., Piontek, G., and Kiessling, R. (1986). Selective rejection of H-2-deficient lymphoma variants suggests alternative immune defence strategy. *Nature* 319, 675-678.
- Kaspar, A.A., Okada, S., Kumar, J., Poulain, F.R., Drouvalakis, K.A., Kelekar, A., Hanson, D.A., Kluck, R.M., Hitoshi, Y., Johnson, D.E., *et al.* (2001). A distinct pathway of cell-mediated apoptosis initiated by granzysin. *J Immunol* 167, 350-356.
- Kelly, J.M., Waterhouse, N.J., Cretney, E., Browne, K.A., Ellis, S., Trapani, J.A., and Smyth, M.J. (2004). Granzyme M mediates a novel form of perforin-dependent cell death. *The Journal of biological chemistry* 279, 22236-22242.
- Keskin, D.B., Allan, D.S., Rybalov, B., Andzelm, M.M., Stern, J.N., Kopcow, H.D., Koopman, L.A., and Strominger, J.L. (2007). TGFbeta promotes conversion of CD16+ peripheral blood NK cells into CD16- NK cells with similarities to decidual NK cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104, 3378-3383.
- Khakoo, S.I., Geller, R., Shin, S., Jenkins, J.A., and Parham, P. (2002). The D0 domain of KIR3D acts as a major histocompatibility complex class I binding enhancer. *The Journal of experimental medicine* 196, 911-921.
- Khakoo, S.I., Thio, C.L., Martin, M.P., Brooks, C.R., Gao, X., Astemborski, J., Cheng, J., Goedert, J.J., Vlahov, D., Hilgartner, M., *et al.* (2004). HLA and NK cell inhibitory receptor genes in resolving hepatitis C virus infection. *Science (New York, NY)* 305, 872-874.
- Kiessling, R., Klein, E., Pross, H., and Wigzell, H. (1975a). "Natural" killer cells in the mouse. II. Cytotoxic cells with specificity for mouse Moloney leukemia cells. Characteristics of the killer cell. *European journal of immunology* 5, 117-121.
- Kiessling, R., Klein, E., and Wigzell, H. (1975b). "Natural" killer cells in the mouse. I. Cytotoxic cells with specificity for mouse Moloney leukemia cells. Specificity and distribution according to genotype. *European journal of immunology* 5, 112-117.

- Kim, C.C., Parikh, S., Sun, J.C., Myrick, A., Lanier, L.L., Rosenthal, P.J., and DeRisi, J.L. (2008). Experimental malaria infection triggers early expansion of natural killer cells. *Infection and immunity* 76, 5873-5882.
- Kim, D.K., Kabat, J., Borrego, F., Sanni, T.B., You, C.H., and Coligan, J.E. (2004). Human NKG2F is expressed and can associate with DAP12. *Molecular immunology* 41, 53-62.
- Kim, E.O., Kim, T.J., Kim, N., Kim, S.T., Kumar, V., and Lee, K.M. (2010). Homotypic cell to cell cross-talk among human natural killer cells reveals differential and overlapping roles of 2B4 and CD2. *The Journal of biological chemistry* 285, 41755-41764.
- Kim, S., Poursine-Laurent, J., Truscott, S.M., Lybarger, L., Song, Y.J., Yang, L., French, A.R., Sunwoo, J.B., Lemieux, S., Hansen, T.H., *et al.* (2005). Licensing of natural killer cells by host major histocompatibility complex class I molecules. *Nature* 436, 709-713.
- King, A., Allan, D.S., Bowen, M., Powis, S.J., Joseph, S., Verma, S., Hiby, S.E., McMichael, A.J., Loke, Y.W., and Braud, V.M. (2000). HLA-E is expressed on trophoblast and interacts with CD94/NKG2 receptors on decidual NK cells. *European journal of immunology* 30, 1623-1631.
- King, A., Gardner, L., and Loke, Y.W. (1996). Evaluation of oestrogen and progesterone receptor expression in uterine mucosal lymphocytes. *Human reproduction (Oxford, England)* 11, 1079-1082.
- Kischkel, F.C., Hellbardt, S., Behrmann, I., Germer, M., Pawlita, M., Krammer, P.H., and Peter, M.E. (1995). Cytotoxicity-dependent APO-1 (Fas/CD95)-associated proteins form a death-inducing signaling complex (DISC) with the receptor. *The EMBO journal* 14, 5579-5588.
- Kischkel, F.C., Lawrence, D.A., Chuntharapai, A., Schow, P., Kim, K.J., and Ashkenazi, A. (2000). Apo2L/TRAIL-dependent recruitment of endogenous FADD and caspase-8 to death receptors 4 and 5. *Immunity* 12, 611-620.
- Kitaya, K., Nakayama, T., Daikoku, N., Fushiki, S., and Honjo, H. (2004). Spatial and temporal expression of ligands for CXCR3 and CXCR4 in human endometrium. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 89, 2470-2476.
- Kitaya, K., Nakayama, T., Okubo, T., Kuroboshi, H., Fushiki, S., and Honjo, H. (2003). Expression of macrophage inflammatory protein-1beta in human endometrium: its role in endometrial recruitment of natural killer cells. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 88, 1809-1814.
- Koka, R., Burkett, P.R., Chien, M., Chai, S., Chan, F., Lodolce, J.P., Boone, D.L., and Ma, A. (2003). Interleukin (IL)-15R[alpha]-deficient natural killer cells survive in normal but not IL-15R[alpha]-deficient mice. *The Journal of experimental medicine* 197, 977-984.
- Kondo, T., Morita, K., Watarai, Y., Auerbach, M.B., Taub, D.D., Novick, A.C., Toma, H., and Fairchild, R.L. (2000). Early increased chemokine expression and production in murine allogeneic skin grafts is mediated by natural killer cells. *Transplantation* 69, 969-977.
- Konjar, S., Sutton, V.R., Hoves, S., Repnik, U., Yagita, H., Reinheckel, T., Peters, C., Turk, V., Turk, B., Trapani, J.A., *et al.* (2010). Human and mouse perforin are processed in part through cleavage by the lysosomal cysteine proteinase cathepsin L. *Immunology* 131, 257-267.
- Koopman, L.A., Kopcow, H.D., Rybalov, B., Boyson, J.E., Orange, J.S., Schatz, F., Masch, R., Lockwood, C.J., Schachter, A.D., Park, P.J., *et al.* (2003). Human decidual natural killer cells are a unique NK cell subset with immunomodulatory potential. *The Journal of experimental medicine* 198, 1201-1212.
- Kopcow, H.D., Allan, D.S., Chen, X., Rybalov, B., Andzelm, M.M., Ge, B., and Strominger, J.L. (2005). Human decidual NK cells form immature activating synapses and are not cytotoxic. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102, 15563-15568.
- Kopcow, H.D., Eriksson, M., Mselle, T.F., Damrauer, S.M., Wira, C.R., Sentman, C.L., and Strominger, J.L. (2010). Human decidual NK cells from gravid uteri and NK cells from cycling endometrium are distinct NK cell subsets. *Placenta* 31, 334-338.

- Kopcow, H.D., Rosetti, F., Leung, Y., Allan, D.S., Kutok, J.L., and Strominger, J.L. (2008). T cell apoptosis at the maternal-fetal interface in early human pregnancy, involvement of galectin-1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *105*, 18472-18477.
- Korbel, D.S., Finney, O.C., and Riley, E.M. (2004). Natural killer cells and innate immunity to protozoan pathogens. *International journal for parasitology* *34*, 1517-1528.
- Korten, S., Volkmann, L., Saefel, M., Fischer, K., Taniguchi, M., Fleischer, B., and Hoerauf, A. (2002). Expansion of NK cells with reduction of their inhibitory Ly-49A, Ly-49C, and Ly-49G2 receptor-expressing subsets in a murine helminth infection: contribution to parasite control. *J Immunol* *168*, 5199-5206.
- Kramer, B., Korner, C., Kebschull, M., Glassner, A., Eisenhardt, M., Nischalke, H.D., Alexander, M., Sauerbruch, T., Spengler, U., and Nattermann, J. (2012). Natural killer p46High expression defines a natural killer cell subset that is potentially involved in control of hepatitis C virus replication and modulation of liver fibrosis. *Hepatology (Baltimore, Md)* *56*, 1201-1213.
- Kramer, B., Schulte, D., Korner, C., Zwank, C., Hartmann, A., Michalk, M., Sohne, J., Langhans, B., Nischalke, H.D., Coenen, M., *et al.* (2009). Regulation of NK cell trafficking by CD81. *European journal of immunology* *39*, 3447-3458.
- Krensky, A.M., and Clayberger, C. (2005). Granulysin: a novel host defense molecule. *Am J Transplant* *5*, 1789-1792.
- Krzewski, K., and Coligan, J.E. (2012). Human NK cell lytic granules and regulation of their exocytosis. *Frontiers in immunology* *3*, 335.
- Krzewski, K., Gil-Krzewska, A., Nguyen, V., Peruzzi, G., and Coligan, J.E. (2013). LAMP1/CD107a is required for efficient perforin delivery to lytic granules and NK-cell cytotoxicity. *Blood* *121*, 4672-4683.
- Kubin, M., Cassiano, L., Chalupny, J., Chin, W., Cosman, D., Fanslow, W., Mullberg, J., Rousseau, A.M., Ulrich, D., and Armitage, R. (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*, 1428-1437.
- Kumar, V., Ben-Ezra, J., Bennett, M., and Sonnenfeld, G. (1979). Natural killer cells in mice treated with 89strontium: normal target-binding cell numbers but inability to kill even after interferon administration. *J Immunol* *123*, 1832-1838.
- Kuwana, T., Mackey, M.R., Perkins, G., Ellisman, M.H., Latterich, M., Schneiter, R., Green, D.R., and Newmeyer, D.D. (2002). Bid, Bax, and lipids cooperate to form supramolecular openings in the outer mitochondrial membrane. *Cell* *111*, 331-342.
- La, D., Czarnecki, C., El-Gabalawy, H., Kumar, A., Meyers, A.F., Bastien, N., Simonsen, J.N., Plummer, F.A., and Luo, M. (2011). Enrichment of variations in KIR3DL1/S1 and KIR2DL2/L3 among H1N1/09 ICU patients: an exploratory study. *PloS one* *6*, e29200.
- Lachapelle, M.H., Miron, P., Hemmings, R., and Roy, D.C. (1996). Endometrial T, B, and NK cells in patients with recurrent spontaneous abortion. Altered profile and pregnancy outcome. *J Immunol* *156*, 4027-4034.
- Lampen, M.H., Hassan, C., Sluijter, M., Geluk, A., Dijkman, K., Tjon, J.M., de Ru, A.H., van der Burg, S.H., van Veelen, P.A., and van Hall, T. (2013). Alternative peptide repertoire of HLA-E reveals a binding motif that is strikingly similar to HLA-A2. *Molecular immunology* *53*, 126-131.
- Lanier, L.L. (2008). Up on the tightrope: natural killer cell activation and inhibition. *Nature immunology* *9*, 495-502.
- Lanier, L.L., Corliss, B., Wu, J., and Phillips, J.H. (1998). Association of DAP12 with activating CD94/NKG2C NK cell receptors. *Immunity* *8*, 693-701.

- Lash, G.E., Schiessl, B., Kirkley, M., Innes, B.A., Cooper, A., Searle, R.F., Robson, S.C., and Bulmer, J.N. (2006). Expression of angiogenic growth factors by uterine natural killer cells during early pregnancy. *Journal of leukocyte biology* 80, 572-580.
- Latour, S., and Veillette, A. (2001). Proximal protein tyrosine kinases in immunoreceptor signaling. *Current opinion in immunology* 13, 299-306.
- Law, R.H., Lukyanova, N., Voskoboinik, I., Caradoc-Davies, T.T., Baran, K., Dunstone, M.A., D'Angelo, M.E., Orlova, E.V., Coulibaly, F., Verschoor, S., *et al.* (2010). The structural basis for membrane binding and pore formation by lymphocyte perforin. *Nature* 468, 447-451.
- Lazetic, S., Chang, C., Houchins, J.P., Lanier, L.L., and Phillips, J.H. (1996). Human natural killer cell receptors involved in MHC class I recognition are disulfide-linked heterodimers of CD94 and NKG2 subunits. *J Immunol* 157, 4741-4745.
- Le Bouteiller, P., Tabiasco, J., Polgar, B., Kozma, N., Giustiniani, J., Siewiera, J., Berrebi, A., Aguerre-Girr, M., Bensussan, A., and Jabrane-Ferrat, N. (2011). CD160: a unique activating NK cell receptor. *Immunology letters* 138, 93-96.
- LeBlanc, H.N., and Ashkenazi, A. (2003). Apo2L/TRAIL and its death and decoy receptors. *Cell death and differentiation* 10, 66-75.
- Lee, N., Ishitani, A., and Geraghty, D.E. (2010). HLA-F is a surface marker on activated lymphocytes. *European journal of immunology* 40, 2308-2318.
- Lee, N., Llano, M., Carretero, M., Ishitani, A., Navarro, F., Lopez-Botet, M., and Geraghty, D.E. (1998). HLA-E is a major ligand for the natural killer inhibitory receptor CD94/NKG2A. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95, 5199-5204.
- Lee, S.D., Kuo, W.W., Lin, J.A., Chu, Y.F., Wang, C.K., Yeh, Y.L., Wang, S.G., Liu, J.Y., Chang, M.H., and Huang, C.Y. (2007). Effects of long-term intermittent hypoxia on mitochondrial and Fas death receptor dependent apoptotic pathways in rat hearts. *International journal of cardiology* 116, 348-356.
- Legler, D.F., Micheau, O., Doucey, M.A., Tschopp, J., and Bron, C. (2003). Recruitment of TNF receptor 1 to lipid rafts is essential for TNF α -mediated NF- κ B activation. *Immunity* 18, 655-664.
- LeMaout, J., Zafaranloo, K., Le Danff, C., and Carosella, E.D. (2005). HLA-G up-regulates ILT2, ILT3, ILT4, and KIR2DL4 in antigen presenting cells, NK cells, and T cells. *Faseb J* 19, 662-664.
- Levy, O. (2007). Innate immunity of the newborn: basic mechanisms and clinical correlates. *Nature reviews* 7, 379-390.
- Li, C., Houser, B.L., Nicotra, M.L., and Strominger, J.L. (2009). HLA-G homodimer-induced cytokine secretion through HLA-G receptors on human decidual macrophages and natural killer cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106, 5767-5772.
- Li, C.R., Greenberg, P.D., Gilbert, M.J., Goodrich, J.M., and Riddell, S.R. (1994). Recovery of HLA-restricted cytomegalovirus (CMV)-specific T-cell responses after allogeneic bone marrow transplant: correlation with CMV disease and effect of ganciclovir prophylaxis. *Blood* 83, 1971-1979.
- Li, P., Morris, D.L., Willcox, B.E., Steinle, A., Spies, T., and Strong, R.K. (2001). Complex structure of the activating immunoreceptor NKG2D and its MHC class I-like ligand MICA. *Nature immunology* 2, 443-451.
- Li, Y., Wang, Q., and Mariuzza, R.A. (2011). Structure of the human activating natural cytotoxicity receptor NKp30 bound to its tumor cell ligand B7-H6. *The Journal of experimental medicine* 208, 703-714.
- Liu, B., Mori, I., Hossain, M.J., Dong, L., Takeda, K., and Kimura, Y. (2004). Interleukin-18 improves the early defence system against influenza virus infection by augmenting natural killer cell-mediated cytotoxicity. *The Journal of general virology* 85, 423-428.

- Liu, X., Wang, Y., Sun, Q., Yan, J., Huang, J., Zhu, S., and Yu, J. (2012). Identification of microRNA transcriptome involved in human natural killer cell activation. *Immunology letters* *143*, 208-217.
- Lopez-Verges, S., Milush, J.M., Schwartz, B.S., Pando, M.J., Jarjoura, J., York, V.A., Houchins, J.P., Miller, S., Kang, S.M., Norris, P.J., *et al.* (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*, 14725-14732.
- Lopez, J.A., Susanto, O., Jenkins, M.R., Lukoyanova, N., Sutton, V.R., Law, R.H., Johnston, A., Bird, C.H., Bird, P.I., Whisstock, J.C., *et al.* (2013). Perforin forms transient pores on the target cell plasma membrane to facilitate rapid access of granzymes during killer cell attack. *Blood* *121*, 2659-2668.
- Lu, H., Hou, Q., Zhao, T., Zhang, H., Zhang, Q., Wu, L., and Fan, Z. (2006). Granzyme M directly cleaves inhibitor of caspase-activated DNase (CAD) to unleash CAD leading to DNA fragmentation. *J Immunol* *177*, 1171-1178.
- Lucas, M., Schachterle, W., Oberle, K., Aichele, P., and Diefenbach, A. (2007). Dendritic cells prime natural killer cells by trans-presenting interleukin 15. *Immunity* *26*, 503-517.
- Luevano, M., Madrigal, A., and Saudemont, A. (2012). Transcription factors involved in the regulation of natural killer cell development and function: an update. *Frontiers in immunology* *3*, 319.
- MacFarlane, A.W.t., and Campbell, K.S. (2006). Signal transduction in natural killer cells. *Current topics in microbiology and immunology* *298*, 23-57.
- MacFarlane, M., Merrison, W., Dinsdale, D., and Cohen, G.M. (2000). Active caspases and cleaved cytokeratins are sequestered into cytoplasmic inclusions in TRAIL-induced apoptosis. *The Journal of cell biology* *148*, 1239-1254.
- Madrid, A.S., and Ganem, D. (2012). Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus ORF54/dUTPase downregulates a ligand for the NK activating receptor Nkp44. *Journal of virology* *86*, 8693-8704.
- Maenaka, K., Juji, T., Stuart, D.I., and Jones, E.Y. (1999). Crystal structure of the human p58 killer cell inhibitory receptor (KIR2DL3) specific for HLA-Cw3-related MHC class I. *Structure* *7*, 391-398.
- Magri, G., Muntasell, A., Romo, N., Saez-Borderias, A., Pende, D., Geraghty, D.E., Hengel, H., Angulo, A., Moretta, A., and Lopez-Botet, M. (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*, 848-856.
- Manaster, I., and Mandelboim, O. (2008). The unique properties of human NK cells in the uterine mucosa. *Placenta* *29 Suppl A*, S60-66.
- Manaster, I., and Mandelboim, O. (2010). The unique properties of uterine NK cells. *Am J Reprod Immunol* *63*, 434-444.
- Manaster, I., Mizrahi, S., Goldman-Wohl, D., Sela, H.Y., Stern-Ginossar, N., Lankry, D., Gruda, R., Hurwitz, A., Bdolah, Y., Haimov-Kochman, R., *et al.* (2008). Endometrial NK cells are special immature cells that await pregnancy. *J Immunol* *181*, 1869-1876.
- Mandelboim, O., Lieberman, N., Lev, M., Paul, L., Arnon, T.I., Bushkin, Y., Davis, D.M., Strominger, J.L., Yewdell, J.W., and Porgador, A. (2001). Recognition of haemagglutinins on virus-infected cells by Nkp46 activates lysis by human NK cells. *Nature* *409*, 1055-1060.
- Mandelboim, O., Reyburn, H.T., Sheu, E.G., Vales-Gomez, M., Davis, D.M., Pazmany, L., and Strominger, J.L. (1997). The binding site of NK receptors on HLA-C molecules. *Immunity* *6*, 341-350.
- Manna, P.P., Chakrabarti, G., and Bandyopadhyay, S. (2010). Innate immune defense in visceral leishmaniasis: cytokine mediated protective role by allogeneic effector cell. *Vaccine* *28*, 803-810.

- Mao, H., Tu, W., Liu, Y., Qin, G., Zheng, J., Chan, P.L., Lam, K.T., Peiris, J.S., and Lau, Y.L. (2010). Inhibition of human natural killer cell activity by influenza virions and hemagglutinin. *Journal of virology* *84*, 4148-4157.
- Marchant, A., Appay, V., Van Der Sande, M., Dulphy, N., Liesnard, C., Kidd, M., Kaye, S., Ojuola, O., Gillespie, G.M., Vargas Cuero, A.L., *et al.* (2003). Mature CD8(+) T lymphocyte response to viral infection during fetal life. *The Journal of clinical investigation* *111*, 1747-1755.
- Markel, G., Wolf, D., Hanna, J., Gazit, R., Goldman-Wohl, D., Lavy, Y., Yagel, S., and Mandelboim, O. (2002). Pivotal role of CEACAM1 protein in the inhibition of activated decidual lymphocyte functions. *The Journal of clinical investigation* *110*, 943-953.
- Maroof, A., Beattie, L., Zubairi, S., Svensson, M., Stager, S., and Kaye, P.M. (2008). Posttranscriptional regulation of II10 gene expression allows natural killer cells to express immunoregulatory function. *Immunity* *29*, 295-305.
- Marsh, S.G., Parham, P., Dupont, B., Geraghty, D.E., Trowsdale, J., Middleton, D., Vilches, C., Carrington, M., Witt, C., Guethlein, L.A., *et al.* (2003). Killer-cell immunoglobulin-like receptor (KIR) nomenclature report, 2002. *Human immunology* *64*, 648-654.
- Martin-Fontecha, A., Thomsen, L.L., Brett, S., Gerard, C., Lipp, M., Lanzavecchia, A., and Sallusto, F. (2004). Induced recruitment of NK cells to lymph nodes provides IFN-gamma for T(H)1 priming. *Nature immunology* *5*, 1260-1265.
- Martin, M.P., Gao, X., Lee, J.H., Nelson, G.W., Detels, R., Goedert, J.J., Buchbinder, S., Hoots, K., Vlahov, D., Trowsdale, J., *et al.* (2002). Epistatic interaction between KIR3DS1 and HLA-B delays the progression to AIDS. *Nature genetics* *31*, 429-434.
- Martin, M.P., Qi, Y., Gao, X., Yamada, E., Martin, J.N., Pereyra, F., Colombo, S., Brown, E.E., Shupert, W.L., Phair, J., *et al.* (2007). Innate partnership of HLA-B and KIR3DL1 subtypes against HIV-1. *Nature genetics* *39*, 733-740.
- Martin, P.M., and Sutherland, A.E. (2001). Exogenous amino acids regulate trophectoderm differentiation in the mouse blastocyst through an mTOR-dependent pathway. *Developmental biology* *240*, 182-193.
- Martinvalet, D., Dykxhoorn, D.M., Ferrini, R., and Lieberman, J. (2008). Granzyme A cleaves a mitochondrial complex I protein to initiate caspase-independent cell death. *Cell* *133*, 681-692.
- Martinvalet, D., Zhu, P., and Lieberman, J. (2005). Granzyme A induces caspase-independent mitochondrial damage, a required first step for apoptosis. *Immunity* *22*, 355-370.
- Mathew, S.O., Rao, K.K., Kim, J.R., Bambard, N.D., and Mathew, P.A. (2009). Functional role of human NK cell receptor 2B4 (CD244) isoforms. *European journal of immunology* *39*, 1632-1641.
- Matsumoto, G., Nghiem, M.P., Nozaki, N., Schmits, R., and Penninger, J.M. (1998). Cooperation between CD44 and LFA-1/CD11a adhesion receptors in lymphokine-activated killer cell cytotoxicity. *J Immunol* *160*, 5781-5789.
- Matsuura-Sawada, R., Murakami, T., Ozawa, Y., Nabeshima, H., Akahira, J., Sato, Y., Koyanagi, Y., Ito, M., Terada, Y., and Okamura, K. (2005). Reproduction of menstrual changes in transplanted human endometrial tissue in immunodeficient mice. *Human reproduction (Oxford, England)* *20*, 1477-1484.
- Matta, J., Baratin, M., Chiche, L., Forel, J.M., Cognet, C., Thomas, G., Farnarier, C., Piperoglou, C., Papazian, L., Chaussabel, D., *et al.* (2013). Induction of B7-H6, a ligand for the natural killer cell-activating receptor NKp30, in inflammatory conditions. *Blood* *122*, 394-404.
- Mavoungou, E., Held, J., Mewono, L., and Kremsner, P.G. (2007). A Duffy binding-like domain is involved in the NKp30-mediated recognition of Plasmodium falciparum-parasitized erythrocytes by natural killer cells. *The Journal of infectious diseases* *195*, 1521-1531.

- McCall, M.B., Roestenberg, M., Ploemen, I., Teirlinck, A., Hopman, J., de Mast, Q., Dolo, A., Doumbo, O.K., Luty, A., van der Ven, A.J., *et al.* (2010). Memory-like IFN-gamma response by NK cells following malaria infection reveals the crucial role of T cells in NK cell activation by *P. falciparum*. *European journal of immunology* *40*, 3472-3477.
- McNerney, M.E., and Kumar, V. (2006). The CD2 family of natural killer cell receptors. *Current topics in microbiology and immunology* *298*, 91-120.
- McVicar, D.W., Taylor, L.S., Gosselin, P., Willette-Brown, J., Mikhael, A.I., Geahlen, R.L., Nakamura, M.C., Linnemeyer, P., Seaman, W.E., Anderson, S.K., *et al.* (1998). DAP12-mediated signal transduction in natural killer cells. A dominant role for the Syk protein-tyrosine kinase. *The Journal of biological chemistry* *273*, 32934-32942.
- Meade, J.L., de Wynter, E.A., Brett, P., Sharif, S.M., Woods, C.G., Markham, A.F., and Cook, G.P. (2006). A family with Papillon-Lefevre syndrome reveals a requirement for cathepsin C in granzyme B activation and NK cell cytolytic activity. *Blood* *107*, 3665-3668.
- Medina, K.L., Smithson, G., and Kincade, P.W. (1993). Suppression of B lymphopoiesis during normal pregnancy. *The Journal of experimental medicine* *178*, 1507-1515.
- Menager, M.M., Menasche, G., Romao, M., Knapnougel, P., Ho, C.H., Garfa, M., Raposo, G., Feldmann, J., Fischer, A., and de Saint Basile, G. (2007). Secretory cytotoxic granule maturation and exocytosis require the effector protein hMunc13-4. *Nature immunology* *8*, 257-267.
- Metes, D., Ernst, L.K., Chambers, W.H., Sulica, A., Herberman, R.B., and Morel, P.A. (1998). Expression of functional CD32 molecules on human NK cells is determined by an allelic polymorphism of the FcγRIIC gene. *Blood* *91*, 2369-2380.
- Metkar, S.S., Wang, B., Aguilar-Santelises, M., Raja, S.M., Uhlin-Hansen, L., Podack, E., Trapani, J.A., and Froelich, C.J. (2002). Cytotoxic cell granule-mediated apoptosis: perforin delivers granzyme B-serglycin complexes into target cells without plasma membrane pore formation. *Immunity* *16*, 417-428.
- Meyaard, L., Adema, G.J., Chang, C., Woollatt, E., Sutherland, G.R., Lanier, L.L., and Phillips, J.H. (1997). LAIR-1, a novel inhibitory receptor expressed on human mononuclear leukocytes. *Immunity* *7*, 283-290.
- Michaelsson, J., Teixeira de Matos, C., Achour, A., Lanier, L.L., Karre, K., and Soderstrom, K. (2002). A signal peptide derived from hsp60 binds HLA-E and interferes with CD94/NKG2A recognition. *The Journal of experimental medicine* *196*, 1403-1414.
- Miller, J.S., Alley, K.A., and McGlave, P. (1994). Differentiation of natural killer (NK) cells from human primitive marrow progenitors in a stroma-based long-term culture system: identification of a CD34⁺7⁺ NK progenitor. *Blood* *83*, 2594-2601.
- Miller, J.S., Cooley, S., Parham, P., Farag, S.S., Verneris, M.R., McQueen, K.L., Guethlein, L.A., Trachtenberg, E.A., Haagenson, M., Horowitz, M.M., *et al.* (2007). Missing KIR ligands are associated with less relapse and increased graft-versus-host disease (GVHD) following unrelated donor allogeneic HCT. *Blood* *109*, 5058-5061.
- Miller, J.S., McCullar, V., Punzel, M., Lemischka, I.R., and Moore, K.A. (1999). Single adult human CD34⁽⁺⁾/Lin⁻/CD38⁽⁻⁾ progenitors give rise to natural killer cells, B-lineage cells, dendritic cells, and myeloid cells. *Blood* *93*, 96-106.
- Mjosberg, J., Berg, G., Jenmalm, M.C., and Ernerudh, J. (2010). FOXP3⁺ regulatory T cells and T helper 1, T helper 2, and T helper 17 cells in human early pregnancy decidua. *Biology of reproduction* *82*, 698-705.
- Mjosberg, J.M., Trifari, S., Crellin, N.K., Peters, C.P., van Drunen, C.M., Piet, B., Fokkens, W.J., Cupedo, T., and Spits, H. (2011). Human IL-25- and IL-33-responsive type 2 innate lymphoid cells are defined by expression of CCR4 and CD161. *Nature immunology* *12*, 1055-1062.
- Mocarski Jr, E. (2007). Betaherpes viral genes and their functions.

- Mocikat, R., Braumuller, H., Gummy, A., Egeter, O., Ziegler, H., Reusch, U., Bubeck, A., Louis, J., Mailhammer, R., Riethmuller, G., *et al.* (2003). Natural killer cells activated by MHC class I(low) targets prime dendritic cells to induce protective CD8 T cell responses. *Immunity* *19*, 561-569.
- Moffett-King, A. (2002). Natural killer cells and pregnancy. *Nature reviews* *2*, 656-663.
- Moffett, A., and Loke, C. (2006). Immunology of placentation in eutherian mammals. *Nature reviews* *6*, 584-594.
- Montag, C., Wagner, J.A., Gruska, I., Vetter, B., Wiebusch, L., and Hagemeyer, C. (2011). The latency-associated UL138 gene product of human cytomegalovirus sensitizes cells to tumor necrosis factor alpha (TNF-alpha) signaling by upregulating TNF-alpha receptor 1 cell surface expression. *Journal of virology* *85*, 11409-11421.
- Montoya, J.G., and Remington, J.S. (2008). Management of *Toxoplasma gondii* infection during pregnancy. *Clin Infect Dis* *47*, 554-566.
- Moretta, A., Bottino, C., Vitale, M., Pende, D., Cantoni, C., Mingari, M.C., Biassoni, R., and Moretta, L. (2001). Activating receptors and coreceptors involved in human natural killer cell-mediated cytotoxicity. *Annual review of immunology* *19*, 197-223.
- Moretta, L. (2010). Dissecting CD56dim human NK cells. *Blood* *116*, 3689-3691.
- Morra, M., Barrington, R.A., Abadia-Molina, A.C., Okamoto, S., Julien, A., Gullo, C., Kalsy, A., Edwards, M.J., Chen, G., Spolski, R., *et al.* (2005). Defective B cell responses in the absence of SH2D1A. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *102*, 4819-4823.
- Morra, M., Lu, J., Poy, F., Martin, M., Sayos, J., Calpe, S., Gullo, C., Howie, D., Rietdijk, S., Thompson, A., *et al.* (2001). Structural basis for the interaction of the free SH2 domain EAT-2 with SLAM receptors in hematopoietic cells. *The EMBO journal* *20*, 5840-5852.
- Mrozek, E., Anderson, P., and Caligiuri, M.A. (1996). Role of interleukin-15 in the development of human CD56+ natural killer cells from CD34+ hematopoietic progenitor cells. *Blood* *87*, 2632-2640.
- Muller, S., Zocher, G., Steinle, A., and Stehle, T. (2010). Structure of the HCMV UL16-MICB complex elucidates select binding of a viral immunoevasin to diverse NKG2D ligands. *PLoS pathogens* *6*, e1000723.
- Munoz-Suano, A., Hamilton, A.B., and Betz, A.G. (2011). Gimme shelter: the immune system during pregnancy. *Immunological reviews* *241*, 20-38.
- Murphy, S.P., Tayade, C., Ashkar, A.A., Hatta, K., Zhang, J., and Croy, B.A. (2009). Interferon gamma in successful pregnancies. *Biology of reproduction* *80*, 848-859.
- Nachmani, D., Lankry, D., Wolf, D.G., and Mandelboim, O. (2010). The human cytomegalovirus microRNA miR-UL112 acts synergistically with a cellular microRNA to escape immune elimination. *Nature immunology* *11*, 806-813.
- Nachmani, D., Stern-Ginossar, N., Sarid, R., and Mandelboim, O. (2009). Diverse herpesvirus microRNAs target the stress-induced immune ligand MICB to escape recognition by natural killer cells. *Cell host & microbe* *5*, 376-385.
- Nagamatsu, T., Schust, D.J., Sugimoto, J., and Barrier, B.F. (2009). Human decidual stromal cells suppress cytokine secretion by allogenic CD4+ T cells via PD-1 ligand interactions. *Human reproduction (Oxford, England)* *24*, 3160-3171.
- Nakajima, H., Park, H.L., and Henkart, P.A. (1995). Synergistic roles of granzymes A and B in mediating target cell death by rat basophilic leukemia mast cell tumors also expressing cytolysin/perforin. *The Journal of experimental medicine* *181*, 1037-1046.

- Narni-Mancinelli, E., Jaeger, B.N., Bernat, C., Fenis, A., Kung, S., De Gassart, A., Mahmood, S., Gut, M., Heath, S.C., Estelle, J., *et al.* (2012). Tuning of natural killer cell reactivity by NKp46 and Helios calibrates T cell responses. *Science (New York, NY)* *335*, 344-348.
- Nattermann, J., Nischalke, H.D., Hofmeister, V., Ahlenstiel, G., Zimmermann, H., Leifeld, L., Weiss, E.H., Sauerbruch, T., and Spengler, U. (2005). The HLA-A2 restricted T cell epitope HCV core 35-44 stabilizes HLA-E expression and inhibits cytolysis mediated by natural killer cells. *The American journal of pathology* *166*, 443-453.
- Nemcovicova, I., Benedict, C.A., and Zajonc, D.M. (2013). Structure of human cytomegalovirus UL141 binding to TRAIL-R2 reveals novel, non-canonical death receptor interactions. *PLoS pathogens* *9*, e1003224.
- Netea, M.G., Quintin, J., and van der Meer, J.W. (2011). Trained immunity: a memory for innate host defense. *Cell host & microbe* *9*, 355-361.
- Ng, S.B., Yan, J., Huang, G., Selvarajan, V., Tay, J.L., Lin, B., Bi, C., Tan, J., Kwong, Y.L., Shimizu, N., *et al.* (2011). Dysregulated microRNAs affect pathways and targets of biologic relevance in nasal-type natural killer/T-cell lymphoma. *Blood* *118*, 4919-4929.
- Nowak, I., Majorczyk, E., Ploski, R., Senitzer, D., Sun, J.Y., and Kusnierczyk, P. (2011). Lack of KIR2DL4 gene in a fertile Caucasian woman. *Tissue antigens* *78*, 115-119.
- O'Connor, G.M., and McVicar, D. (2013). The yin-yang of KIR3DL1/S1: molecular mechanisms and cellular function. *Critical reviews in immunology* *33*, 203-218.
- O'Leary, J.G., Goodarzi, M., Drayton, D.L., and von Andrian, U.H. (2006). T cell- and B cell-independent adaptive immunity mediated by natural killer cells. *Nature immunology* *7*, 507-516.
- Obara, H., Nagasaki, K., Hsieh, C.L., Ogura, Y., Esquivel, C.O., Martinez, O.M., and Krams, S.M. (2005). IFN-gamma, produced by NK cells that infiltrate liver allografts early after transplantation, links the innate and adaptive immune responses. *Am J Transplant* *5*, 2094-2103.
- Ogasawara, K., Benjamin, J., Takaki, R., Phillips, J.H., and Lanier, L.L. (2005). Function of NKG2D in natural killer cell-mediated rejection of mouse bone marrow grafts. *Nature immunology* *6*, 938-945.
- Ogata, K., Linzer, B.A., Zuberi, R.I., Ganz, T., Lehrer, R.I., and Catanzaro, A. (1992). Activity of defensins from human neutrophilic granulocytes against *Mycobacterium avium-Mycobacterium intracellulare*. *Infection and immunity* *60*, 4720-4725.
- Okada, S., Li, Q., Whitin, J.C., Clayberger, C., and Krensky, A.M. (2003). Intracellular mediators of granulysin-induced cell death. *J Immunol* *171*, 2556-2562.
- Okada, S., Okada, H., Sanezumi, M., Nakajima, T., Yasuda, K., and Kanzaki, H. (2000). Expression of interleukin-15 in human endometrium and decidua. *Molecular human reproduction* *6*, 75-80.
- Oppenheim, D.E., Roberts, S.J., Clarke, S.L., Filler, R., Lewis, J.M., Tigelaar, R.E., Girardi, M., and Hayday, A.C. (2005). Sustained localized expression of ligand for the activating NKG2D receptor impairs natural cytotoxicity in vivo and reduces tumor immunosurveillance. *Nature immunology* *6*, 928-937.
- Orange, J.S. (2002). Human natural killer cell deficiencies and susceptibility to infection. *Microbes and infection / Institut Pasteur* *4*, 1545-1558.
- Orange, J.S. (2008). Formation and function of the lytic NK-cell immunological synapse. *Nature reviews* *8*, 713-725.
- Orange, J.S., Harris, K.E., Andzelm, M.M., Valter, M.M., Geha, R.S., and Strominger, J.L. (2003). The mature activating natural killer cell immunologic synapse is formed in distinct stages. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *100*, 14151-14156.

- Orr, M.T., Murphy, W.J., and Lanier, L.L. (2010). 'Unlicensed' natural killer cells dominate the response to cytomegalovirus infection. *Nature immunology* *11*, 321-327.
- Ouedraogo, A., Tiono, A.B., Diarra, A., Bougouma, E.C., Nebie, I., Konate, A.T., and Sirima, S.B. (2012). Transplacental Transmission of *Plasmodium falciparum* in a Highly Malaria Endemic Area of Burkina Faso. *Journal of tropical medicine* *2012*, 109705.
- Overhage, J., Campisano, A., Bains, M., Torfs, E.C., Rehm, B.H., and Hancock, R.E. (2008). Human host defense peptide LL-37 prevents bacterial biofilm formation. *Infection and immunity* *76*, 4176-4182.
- Owen, R.E., Yamada, E., Thompson, C.I., Phillipson, L.J., Thompson, C., Taylor, E., Zambon, M., Osborn, H.M., Barclay, W.S., and Borrow, P. (2007). Alterations in receptor binding properties of recent human influenza H3N2 viruses are associated with reduced natural killer cell lysis of infected cells. *Journal of virology* *81*, 11170-11178.
- Paik, J.H., Jang, J.Y., Jeon, Y.K., Kim, W.Y., Kim, T.M., Heo, D.S., and Kim, C.W. (2011). MicroRNA-146a downregulates NFkappaB activity via targeting TRAF6 and functions as a tumor suppressor having strong prognostic implications in NK/T cell lymphoma. *Clin Cancer Res* *17*, 4761-4771.
- Pan, G., Ni, J., Wei, Y.F., Yu, G., Gentz, R., and Dixit, V.M. (1997). An antagonist decoy receptor and a death domain-containing receptor for TRAIL. *Science (New York, NY)* *277*, 815-818.
- Pappworth, I.Y., Wang, E.C., and Rowe, M. (2007). The switch from latent to productive infection in Epstein-Barr virus-infected B cells is associated with sensitization to NK cell killing. *Journal of virology* *81*, 474-482.
- Parham, P. (2005). MHC class I molecules and KIRs in human history, health and survival. *Nature reviews* *5*, 201-214.
- Parham, P., and Guethlein, L.A. (2010). Pregnancy immunogenetics: NK cell education in the womb? *The Journal of clinical investigation* *120*, 3801-3804.
- Park, C.S., Lee, P.H., Yamada, T., Burns, A., Shen, Y., Puppi, M., and Lacorazza, H.D. (2012). Kruppel-like factor 4 (KLF4) promotes the survival of natural killer cells and maintains the number of conventional dendritic cells in the spleen. *Journal of leukocyte biology* *91*, 739-750.
- Park, Y.P., Choi, S.C., Kiesler, P., Gil-Krzewska, A., Borrego, F., Weck, J., Krzewski, K., and Coligan, J.E. (2011). Complex regulation of human NKG2D-DAP10 cell surface expression: opposing roles of the gamma cytokines and TGF-beta1. *Blood* *118*, 3019-3027.
- Pass, R.F. (1985). Epidemiology and transmission of cytomegalovirus. *The Journal of infectious diseases* *152*, 243-248.
- Passos, S.T., Silver, J.S., O'Hara, A.C., Sehy, D., Stumhofer, J.S., and Hunter, C.A. (2010). IL-6 promotes NK cell production of IL-17 during toxoplasmosis. *J Immunol* *184*, 1776-1783.
- Paust, S., Gill, H.S., Wang, B.Z., Flynn, M.P., Moseman, E.A., Senman, B., Szczepanik, M., Telenti, A., Askenase, P.W., Compans, R.W., *et al.* (2010). Critical role for the chemokine receptor CXCR6 in NK cell-mediated antigen-specific memory of haptens and viruses. *Nature immunology* *11*, 1127-1135.
- Pena, S.V., Hanson, D.A., Carr, B.A., Goralski, T.J., and Krensky, A.M. (1997). Processing, subcellular localization, and function of 519 (granulysin), a human late T cell activation molecule with homology to small, lytic, granule proteins. *J Immunol* *158*, 2680-2688.
- Pena, S.V., and Krensky, A.M. (1997). Granulysin, a new human cytolytic granule-associated protein with possible involvement in cell-mediated cytotoxicity. *Seminars in immunology* *9*, 117-125.
- Pende, D., Parolini, S., Pessino, A., Sivori, S., Augugliaro, R., Morelli, L., Marcenaro, E., Accame, L., Malaspina, A., Biassoni, R., *et al.* (1999). Identification and molecular characterization of NKP30, a novel triggering receptor involved in natural cytotoxicity mediated by human natural killer cells. *The Journal of experimental medicine* *190*, 1505-1516.

- Pende, D., Rivera, P., Marcenaro, S., Chang, C.C., Biassoni, R., Conte, R., Kubin, M., Cosman, D., Ferrone, S., Moretta, L., *et al.* (2002). Major histocompatibility complex class I-related chain A and UL16-binding protein expression on tumor cell lines of different histotypes: analysis of tumor susceptibility to NKG2D-dependent natural killer cell cytotoxicity. *Cancer research* 62, 6178-6186.
- Peng, H., Jiang, X., Chen, Y., Sojka, D.K., Wei, H., Gao, X., Sun, R., Yokoyama, W.M., and Tian, Z. (2013). Liver-resident NK cells confer adaptive immunity in skin-contact inflammation. *The Journal of clinical investigation* 123, 1444-1456.
- Peracoli, M.T., Menegon, F.T., Borges, V.T., de Araujo Costa, R.A., Thomazini-Santos, I.A., and Peracoli, J.C. (2008). Platelet aggregation and TGF-beta(1) plasma levels in pregnant women with preeclampsia. *Journal of reproductive immunology* 79, 79-84.
- Perrot, I., Deauvieu, F., Massacrier, C., Hughes, N., Garrone, P., Durand, I., Demaria, O., Viaud, N., Gauthier, L., Blery, M., *et al.* (2010). TLR3 and Rig-like receptor on myeloid dendritic cells and Rig-like receptor on human NK cells are both mandatory for production of IFN-gamma in response to double-stranded RNA. *J Immunol* 185, 2080-2088.
- Pessino, A., Sivori, S., Bottino, C., Malaspina, A., Morelli, L., Moretta, L., Biassoni, R., and Moretta, A. (1998). Molecular cloning of Nkp46: a novel member of the immunoglobulin superfamily involved in triggering of natural cytotoxicity. *The Journal of experimental medicine* 188, 953-960.
- Petrie, E.J., Clements, C.S., Lin, J., Sullivan, L.C., Johnson, D., Huyton, T., Heroux, A., Hoare, H.L., Beddoe, T., Reid, H.H., *et al.* (2008). CD94-NKG2A recognition of human leukocyte antigen (HLA)-E bound to an HLA class I leader sequence. *The Journal of experimental medicine* 205, 725-735.
- Piccioli, D., Sbrana, S., Melandri, E., and Valiante, N.M. (2002). Contact-dependent stimulation and inhibition of dendritic cells by natural killer cells. *The Journal of experimental medicine* 195, 335-341.
- Pijnenborg, R., Vercruyse, L., and Hanssens, M. (2006). The uterine spiral arteries in human pregnancy: facts and controversies. *Placenta* 27, 939-958.
- Plougastel, B., and Trowsdale, J. (1997). Cloning of NKG2-F, a new member of the NKG2 family of human natural killer cell receptor genes. *European journal of immunology* 27, 2835-2839.
- Pogge von Strandmann, E., Simhadri, V.R., von Tresckow, B., Sasse, S., Reiners, K.S., Hansen, H.P., Rothe, A., Boll, B., Simhadri, V.L., Borchmann, P., *et al.* (2007). Human leukocyte antigen-B-associated transcript 3 is released from tumor cells and engages the Nkp30 receptor on natural killer cells. *Immunity* 27, 965-974.
- Poggi, A., Costa, P., Tomasello, E., and Moretta, L. (1998). IL-12-induced up-regulation of NKR1A expression in human NK cells and consequent NKR1A-mediated down-regulation of NK cell activation. *European journal of immunology* 28, 1611-1616.
- Ponnampalam, A.P., Gargett, C.E., and Rogers, P.A. (2008). Identification and hormonal regulation of a novel form of Nkp30 in human endometrial epithelium. *European journal of immunology* 38, 216-226.
- Pope, R.M. (2002). Apoptosis as a therapeutic tool in rheumatoid arthritis. *Nature reviews* 2, 527-535.
- Prlic, M., Blazar, B.R., Farrar, M.A., and Jameson, S.C. (2003). In vivo survival and homeostatic proliferation of natural killer cells. *The Journal of experimental medicine* 197, 967-976.
- Prod'homme, V., Griffin, C., Aicheler, R.J., Wang, E.C., McSharry, B.P., Rickards, C.R., Stanton, R.J., Borysiewicz, L.K., Lopez-Botet, M., Wilkinson, G.W., *et al.* (2007). The human cytomegalovirus MHC class I homolog UL18 inhibits LIR-1+ but activates LIR-1- NK cells. *J Immunol* 178, 4473-4481.
- Pugliese, A., Beltramo, T., Todros, T., Cardaropoli, S., and Ponzetto, A. (2008). Interleukin-18 and gestosis: correlation with *Helicobacter pylori* seropositivity. *Cell biochemistry and function* 26, 817-819.

- Qiu, F., Maniar, A., Diaz, M.Q., Chapoval, A.I., and Medvedev, A.E. (2012). Activation of cytokine-producing and antitumor activities of natural killer cells and macrophages by engagement of Toll-like and NOD-like receptors. *Innate immunity* *17*, 375-387.
- Quenby, S., Nik, H., Innes, B., Lash, G., Turner, M., Drury, J., and Bulmer, J. (2009). Uterine natural killer cells and angiogenesis in recurrent reproductive failure. *Human reproduction (Oxford, England)* *24*, 45-54.
- Radaev, S., Rostro, B., Brooks, A.G., Colonna, M., and Sun, P.D. (2001). Conformational plasticity revealed by the cocrystal structure of NKG2D and its class I MHC-like ligand ULBP3. *Immunity* *15*, 1039-1049.
- Rajagopalan, S., Bryceson, Y.T., Kuppusamy, S.P., Geraghty, D.E., van der Meer, A., Joosten, I., and Long, E.O. (2006). Activation of NK cells by an endocytosed receptor for soluble HLA-G. *PLoS biology* *4*, e9.
- Ramirez, K., Chandler, K.J., Spaulding, C., Zandi, S., Sigvardsson, M., Graves, B.J., and Kee, B.L. (2012). Gene deregulation and chronic activation in natural killer cells deficient in the transcription factor ETS1. *Immunity* *36*, 921-932.
- Ranson, T., Vosshenrich, C.A., Corcuff, E., Richard, O., Muller, W., and Di Santo, J.P. (2003). IL-15 is an essential mediator of peripheral NK-cell homeostasis. *Blood* *101*, 4887-4893.
- Raulet, D.H., Gasser, S., Gowen, B.G., Deng, W., and Jung, H. (2013). Regulation of ligands for the NKG2D activating receptor. *Annual review of immunology* *31*, 413-441.
- Raulet, D.H., and Vance, R.E. (2006). Self-tolerance of natural killer cells. *Nature reviews* *6*, 520-531.
- Ravetch, J.V., and Lanier, L.L. (2000). Immune inhibitory receptors. *Science (New York, NY)* *290*, 84-89.
- Renedo, M., Arce, I., Montgomery, K., Roda-Navarro, P., Lee, E., Kucherlapati, R., and Fernandez-Ruiz, E. (2000). A sequence-ready physical map of the region containing the human natural killer gene complex on chromosome 12p12.3-p13.2. *Genomics* *65*, 129-136.
- Robson, A., Harris, L.K., Innes, B.A., Lash, G.E., Aljunaidy, M.M., Aplin, J.D., Baker, P.N., Robson, S.C., and Bulmer, J.N. (2012). Uterine natural killer cells initiate spiral artery remodeling in human pregnancy. *Faseb J* *26*, 4876-4885.
- Rochel, N., and Cowan, J. (1996). Negative cooperativity exhibited by the lytic amino-terminal domain of human perforin: implications for perforin-mediated cell lysis. *Chemistry & biology* *3*, 31-36.
- Roda-Navarro, P., Mittelbrunn, M., Ortega, M., Howie, D., Terhorst, C., Sanchez-Madrid, F., and Fernandez-Ruiz, E. (2004). Dynamic redistribution of the activating 2B4/SAP complex at the cytotoxic NK cell immune synapse. *J Immunol* *173*, 3640-3646.
- Rodesch, F., Simon, P., Donner, C., and Jauniaux, E. (1992). Oxygen measurements in endometrial and trophoblastic tissues during early pregnancy. *Obstetrics and gynecology* *80*, 283-285.
- Rolle, A., Mousavi-Jazi, M., Eriksson, M., Odeberg, J., Soderberg-Naucler, C., Cosman, D., Karre, K., and Cerboni, C. (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. *J Immunol* *171*, 902-908.
- Romagnani, C., Juelke, K., Falco, M., Morandi, B., D'Agostino, A., Costa, R., Ratto, G., Forte, G., Carrega, P., Lui, G., *et al.* (2007). CD56brightCD16- killer Ig-like receptor- NK cells display longer telomeres and acquire features of CD56dim NK cells upon activation. *J Immunol* *178*, 4947-4955.
- Romero, X., Zapater, N., Calvo, M., Kalko, S.G., de la Fuente, M.A., Tovar, V., Ockeloen, C., Pizcueta, P., and Engel, P. (2005). CD229 (Ly9) lymphocyte cell surface receptor interacts homophilically through its N-terminal domain and relocalizes to the immunological synapse. *J Immunol* *174*, 7033-7042.

- Roncagalli, R., Taylor, J.E., Zhang, S., Shi, X., Chen, R., Cruz-Munoz, M.E., Yin, L., Latour, S., and Veillette, A. (2005). Negative regulation of natural killer cell function by EAT-2, a SAP-related adaptor. *Nature immunology* 6, 1002-1010.
- Rosen, D.B., Araki, M., Hamerman, J.A., Chen, T., Yamamura, T., and Lanier, L.L. (2004). A Structural basis for the association of DAP12 with mouse, but not human, NKG2D. *J Immunol* 173, 2470-2478.
- Rosental, B., Brusilovsky, M., Hadad, U., Oz, D., Appel, M.Y., Afergan, F., Yossef, R., Rosenberg, L.A., Aharoni, A., Cerwenka, A., *et al.* (2011). Proliferating cell nuclear antigen is a novel inhibitory ligand for the natural cytotoxicity receptor NKp44. *J Immunol* 187, 5693-5702.
- Rouas-Freiss, N., Goncalves, R.M., Menier, C., Dausset, J., and Carosella, E.D. (1997). Direct evidence to support the role of HLA-G in protecting the fetus from maternal uterine natural killer cytotoxicity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94, 11520-11525.
- Rudnicka, D., Oszmiana, A., Finch, D.K., Strickland, I., Schofield, D.J., Lowe, D.C., Sleeman, M.A., and Davis, D.M. (2013). Rituximab causes a polarization of B cells that augments its therapeutic function in NK-cell-mediated antibody-dependent cellular cytotoxicity. *Blood* 121, 4694-4702.
- Runic, R., Lockwood, C.J., Ma, Y., Dipasquale, B., and Guller, S. (1996). Expression of Fas ligand by human cytotrophoblasts: implications in placentation and fetal survival. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 81, 3119-3122.
- Sagoo, P., Perucha, E., Sawitzki, B., Tomiuk, S., Stephens, D.A., Miqueu, P., Chapman, S., Craciun, L., Sergeant, R., Brouard, S., *et al.* (2010). Development of a cross-platform biomarker signature to detect renal transplant tolerance in humans. *The Journal of clinical investigation* 120, 1848-1861.
- Salcedo, T.W., Azzoni, L., Wolf, S.F., and Perussia, B. (1993). Modulation of perforin and granzyme messenger RNA expression in human natural killer cells. *J Immunol* 151, 2511-2520.
- Salvatore, M., Garcia-Sastre, A., Ruchala, P., Lehrer, R.I., Chang, T., and Klotman, M.E. (2007). alpha-Defensin inhibits influenza virus replication by cell-mediated mechanism(s). *The Journal of infectious diseases* 196, 835-843.
- Sambrook, J.G., Bashirova, A., Andersen, H., Piatak, M., Vernikos, G.S., Coghill, P., Lifson, J.D., Carrington, M., and Beck, S. (2006). Identification of the ancestral killer immunoglobulin-like receptor gene in primates. *BMC genomics* 7, 209.
- Samson, S.I., Richard, O., Tavian, M., Ranson, T., Vosshenrich, C.A., Colucci, F., Buer, J., Grosveld, F., Godin, I., and Di Santo, J.P. (2003). GATA-3 promotes maturation, IFN-gamma production, and liver-specific homing of NK cells. *Immunity* 19, 701-711.
- Samstein, R.M., Josefowicz, S.Z., Arvey, A., Treuting, P.M., and Rudensky, A.Y. (2012). Extrathymic generation of regulatory T cells in placental mammals mitigates maternal-fetal conflict. *Cell* 150, 29-38.
- Santoni, A., Carlino, C., and Gismondi, A. (2008). Uterine NK cell development, migration and function. *Reproductive biomedicine online* 16, 202-210.
- Sargent, I.L., Borzychowski, A.M., and Redman, C.W. (2006). NK cells and human pregnancy--an inflammatory view. *Trends in immunology* 27, 399-404.
- Sato, N., Saga, Y., Mizukami, H., Wang, D., Takahashi, S., Nonaka, H., Fujiwara, H., Takei, Y., Machida, S., Takikawa, O., *et al.* (2012). Downregulation of indoleamine-2,3-dioxygenase in cervical cancer cells suppresses tumor growth by promoting natural killer cell accumulation. *Oncology reports* 28, 1574-1578.
- Saverino, D., Ghiotto, F., Merlo, A., Bruno, S., Battini, L., Occhino, M., Maffei, M., Tenca, C., Pileri, S., Baldi, L., *et al.* (2004). Specific recognition of the viral protein UL18 by CD85j/LIR-1/ILT2 on CD8+ T cells mediates the non-MHC-restricted lysis of human cytomegalovirus-infected cells. *J Immunol* 172, 5629-5637.

- Sayos, J., Nguyen, K.B., Wu, C., Stepp, S.E., Howie, D., Schatzle, J.D., Kumar, V., Biron, C.A., and Terhorst, C. (2000). Potential pathways for regulation of NK and T cell responses: differential X-linked lymphoproliferative syndrome gene product SAP interactions with SLAM and 2B4. *International immunology* *12*, 1749-1757.
- Schneider-Brachert, W., Tchikov, V., Neumeyer, J., Jakob, M., Winoto-Morbach, S., Held-Feindt, J., Heinrich, M., Merkel, O., Ehrenschwender, M., Adam, D., *et al.* (2004). Compartmentalization of TNF receptor 1 signaling: internalized TNF receptosomes as death signaling vesicles. *Immunity* *21*, 415-428.
- Scott, F.L., Stec, B., Pop, C., Dobaczewska, M.K., Lee, J.J., Monosov, E., Robinson, H., Salvesen, G.S., Schwarzenbacher, R., and Riedl, S.J. (2009). The Fas-FADD death domain complex structure unravels signalling by receptor clustering. *Nature* *457*, 1019-1022.
- Seaman, W.E., Blackman, M.A., Gindhart, T.D., Roubinian, J.R., Loeb, J.M., and Talal, N. (1978). beta-Estradiol reduces natural killer cells in mice. *J Immunol* *121*, 2193-2198.
- Selvakumar, A., Steffens, U., and Dupont, B. (1997). Polymorphism and domain variability of human killer cell inhibitory receptors. *Immunological reviews* *155*, 183-196.
- Senechal, B., Boruchov, A.M., Reagan, J.L., Hart, D.N., and Young, J.W. (2004). Infection of mature monocyte-derived dendritic cells with human cytomegalovirus inhibits stimulation of T-cell proliferation via the release of soluble CD83. *Blood* *103*, 4207-4215.
- Shafi, S., Vantourout, P., Wallace, G., Antoun, A., Vaughan, R., Stanford, M., and Hayday, A. (2011). An NKG2D-mediated human lymphoid stress surveillance response with high interindividual variation. *Science translational medicine* *3*, 113ra124.
- Sharif-Askari, E., Alam, A., Rheaume, E., Beresford, P.J., Scotto, C., Sharma, K., Lee, D., DeWolf, W.E., Nuttall, M.E., Lieberman, J., *et al.* (2001). Direct cleavage of the human DNA fragmentation factor-45 by granzyme B induces caspase-activated DNase release and DNA fragmentation. *The EMBO journal* *20*, 3101-3113.
- Sharma, D., Bastard, K., Guethlein, L.A., Norman, P.J., Yawata, N., Yawata, M., Pando, M., Thananchai, H., Dong, T., Rowland-Jones, S., *et al.* (2009). Dimorphic motifs in D0 and D1+D2 domains of killer cell Ig-like receptor 3DL1 combine to form receptors with high, moderate, and no avidity for the complex of a peptide derived from HIV and HLA-A*2402. *J Immunol* *183*, 4569-4582.
- Shaw, R.K., Issekutz, A.C., Fraser, R., Schmit, P., Morash, B., Monaco-Shawver, L., Orange, J.S., and Fernandez, C.V. (2012). Bilateral adrenal EBV-associated smooth muscle tumors in a child with a natural killer cell deficiency. *Blood* *119*, 4009-4012.
- Sheridan, J.P., Marsters, S.A., Pitti, R.M., Gurney, A., Skubatch, M., Baldwin, D., Ramakrishnan, L., Gray, C.L., Baker, K., Wood, W.I., *et al.* (1997). Control of TRAIL-induced apoptosis by a family of signaling and decoy receptors. *Science (New York, NY)* *277*, 818-821.
- Shilling, H.G., McQueen, K.L., Cheng, N.W., Shizuru, J.A., Negrin, R.S., and Parham, P. (2003). Reconstitution of NK cell receptor repertoire following HLA-matched hematopoietic cell transplantation. *Blood* *101*, 3730-3740.
- Shiroishi, M., Tsumoto, K., Amano, K., Shirakihara, Y., Colonna, M., Braud, V.M., Allan, D.S., Makadzange, A., Rowland-Jones, S., Willcox, B., *et al.* (2003). Human inhibitory receptors Ig-like transcript 2 (ILT2) and ILT4 compete with CD8 for MHC class I binding and bind preferentially to HLA-G. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *100*, 8856-8861.
- Simmons, D., and Seed, B. (1988). The Fc gamma receptor of natural killer cells is a phospholipid-linked membrane protein. *Nature* *333*, 568-570.
- Sissons, J.G., Bain, M., and Wills, M.R. (2002). Latency and reactivation of human cytomegalovirus. *The Journal of infection* *44*, 73-77.

- Sivori, S., Falco, M., Carlomagno, S., Romeo, E., Soldani, C., Bensussan, A., Viola, A., Moretta, L., and Moretta, A. (2010). A novel KIR-associated function: evidence that CpG DNA uptake and shuttling to early endosomes is mediated by KIR3DL2. *Blood* *116*, 1637-1647.
- Sivori, S., Vitale, M., Morelli, L., Sanseverino, L., Augugliaro, R., Bottino, C., Moretta, L., and Moretta, A. (1997). p46, a novel natural killer cell-specific surface molecule that mediates cell activation. *The Journal of experimental medicine* *186*, 1129-1136.
- Smith, S.D., Dunk, C.E., Aplin, J.D., Harris, L.K., and Jones, R.L. (2009). Evidence for immune cell involvement in decidual spiral arteriole remodeling in early human pregnancy. *The American journal of pathology* *174*, 1959-1971.
- Soderquest, K., Powell, N., Luci, C., van Rooijen, N., Hidalgo, A., Geissmann, F., Walzer, T., Lord, G.M., and Martin-Fontecha, A. (2011). Monocytes control natural killer cell differentiation to effector phenotypes. *Blood* *117*, 4511-4518.
- Sondermann, P., Huber, R., Oosthuizen, V., and Jacob, U. (2000). The 3.2-A crystal structure of the human IgG1 Fc fragment-Fc gammaRIII complex. *Nature* *406*, 267-273.
- Souza-Fonseca-Guimaraes, F., Adib-Conquy, M., and Cavaillon, J.M. (2012a). Natural killer (NK) cells in antibacterial innate immunity: angels or devils? *Molecular medicine (Cambridge, Mass)* *18*, 270-285.
- Souza-Fonseca-Guimaraes, F., Parlato, M., Philippart, F., Misset, B., Cavaillon, J.M., and Adib-Conquy, M. (2012b). Toll-like receptors expression and interferon-gamma production by NK cells in human sepsis. *Critical care (London, England)* *16*, R206.
- Sower, L.E., Klimpel, G.R., Hanna, W., and Froelich, C.J. (1996). Extracellular Activities of Human Granzymes. *Cellular immunology* *171*, 159-163.
- Spreu, J., Kuttruff, S., Stejfova, V., Dennehy, K.M., Schittek, B., and Steinle, A. (2010). Interaction of C-type lectin-like receptors NKp65 and KACL facilitates dedicated immune recognition of human keratinocytes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *107*, 5100-5105.
- Springer, T.A. (1994). Traffic signals for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration: the multistep paradigm. *Cell* *76*, 301-314.
- Staunton, D.E., Fisher, R.C., LeBeau, M.M., Lawrence, J.B., Barton, D.E., Francke, U., Dustin, M., and Thorley-Lawson, D.A. (1989). Blast-1 possesses a glycosyl-phosphatidylinositol (GPI) membrane anchor, is related to LFA-3 and OX-45, and maps to chromosome 1q21-23. *The Journal of experimental medicine* *169*, 1087-1099.
- Stebbins, C.C., Watzl, C., Billadeau, D.D., Leibson, P.J., Burshtyn, D.N., and Long, E.O. (2003). Vav1 dephosphorylation by the tyrosine phosphatase SHP-1 as a mechanism for inhibition of cellular cytotoxicity. *Molecular and cellular biology* *23*, 6291-6299.
- Stegers, E.A., von Dadelszen, P., Duvekot, J.J., and Pijnenborg, R. (2010). Pre-eclampsia. *Lancet* *376*, 631-644.
- Stenger, S., Hanson, D.A., Teitelbaum, R., Dewan, P., Niazi, K.R., Froelich, C.J., Ganz, T., Thoma-Uszynski, S., Melian, A., Bogdan, C., *et al.* (1998). An antimicrobial activity of cytolytic T cells mediated by granulysin. *Science (New York, NY)* *282*, 121-125.
- Stepp, S.E., Schatzle, J.D., Bennett, M., Kumar, V., and Mathew, P.A. (1999). Gene structure of the murine NK cell receptor 2B4: presence of two alternatively spliced isoforms with distinct cytoplasmic domains. *European journal of immunology* *29*, 2392-2399.
- Stern, M., Elsasser, H., Honger, G., Steiger, J., Schaub, S., and Hess, C. (2008). The number of activating KIR genes inversely correlates with the rate of CMV infection/reactivation in kidney transplant recipients. *Am J Transplant* *8*, 1312-1317.

- Stern, N., Markel, G., Arnon, T.I., Gruda, R., Wong, H., Gray-Owen, S.D., and Mandelboim, O. (2005). Carcinoembryonic antigen (CEA) inhibits NK killing via interaction with CEA-related cell adhesion molecule 1. *J Immunol* *174*, 6692-6701.
- Straszewski-Chavez, S.L., Abrahams, V.M., Funai, E.F., and Mor, G. (2004). X-linked inhibitor of apoptosis (XIAP) confers human trophoblast cell resistance to Fas-mediated apoptosis. *Molecular human reproduction* *10*, 33-41.
- Suidan, H.S., Clemetson, K.J., Brown-Luedi, M., Niclou, S.P., Clemetson, J.M., Tschopp, J., and Monard, D. (1996). The serine protease granzyme A does not induce platelet aggregation but inhibits responses triggered by thrombin. *The Biochemical journal* *315* (Pt 3), 939-945.
- Sullivan, L.C., Clements, C.S., Beddoe, T., Johnson, D., Hoare, H.L., Lin, J., Huyton, T., Hopkins, E.J., Reid, H.H., Wilce, M.C., *et al.* (2007). The heterodimeric assembly of the CD94-NKG2 receptor family and implications for human leukocyte antigen-E recognition. *Immunity* *27*, 900-911.
- Sullivan, L.C., Clements, C.S., Rossjohn, J., and Brooks, A.G. (2008). The major histocompatibility complex class Ib molecule HLA-E at the interface between innate and adaptive immunity. *Tissue antigens* *72*, 415-424.
- Sullivan, R.P., Fogel, L.A., Leong, J.W., Schneider, S.E., Wong, R., Romee, R., Thai, T.H., Sexl, V., Matkovich, S.J., Dorn, G.W., 2nd, *et al.* (2013). MicroRNA-155 tunes both the threshold and extent of NK cell activation via targeting of multiple signaling pathways. *J Immunol* *191*, 5904-5913.
- Sun, C., Fu, B., Gao, Y., Liao, X., Sun, R., Tian, Z., and Wei, H. (2012). TGF-beta1 down-regulation of NKG2D/DAP10 and 2B4/SAP expression on human NK cells contributes to HBV persistence. *PLoS pathogens* *8*, e1002594.
- Sun, J.C. (2010). Re-educating natural killer cells. *The Journal of experimental medicine* *207*, 2049-2052.
- Sun, J.C., Beilke, J.N., and Lanier, L.L. (2009). Adaptive immune features of natural killer cells. *Nature* *457*, 557-561.
- Sun, J.C., and Lanier, L.L. (2011). NK cell development, homeostasis and function: parallels with CD8(+) T cells. *Nature reviews* *11*, 645-657.
- Sun, X.H., Copeland, N.G., Jenkins, N.A., and Baltimore, D. (1991). Id proteins Id1 and Id2 selectively inhibit DNA binding by one class of helix-loop-helix proteins. *Molecular and cellular biology* *11*, 5603-5611.
- Susanto, O., Trapani, J.A., and Brasacchio, D. (2012). Controversies in granzyme biology. *Tissue antigens* *80*, 477-487.
- Sutherland, C.L., Chalupny, N.J., Schooley, K., VandenBos, T., Kubin, M., and Cosman, D. (2002). UL16-binding proteins, novel MHC class I-related proteins, bind to NKG2D and activate multiple signaling pathways in primary NK cells. *J Immunol* *168*, 671-679.
- Sutton, V.R., Davis, J.E., Cancilla, M., Johnstone, R.W., Ruefli, A.A., Sedelies, K., Browne, K.A., and Trapani, J.A. (2000). Initiation of apoptosis by granzyme B requires direct cleavage of bid, but not direct granzyme B-mediated caspase activation. *The Journal of experimental medicine* *192*, 1403-1414.
- Symons, H.J., Leffell, M.S., Rossiter, N.D., Zahurak, M., Jones, R.J., and Fuchs, E.J. (2010). Improved survival with inhibitory killer immunoglobulin receptor (KIR) gene mismatches and KIR haplotype B donors after nonmyeloablative, HLA-haploidentical bone marrow transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant* *16*, 533-542.
- Szkaradkiewicz, A., Karpinski, T.M., Drews, M., Borejsza-Wysocki, M., Majewski, P., and Andrzejewska, E. (2010). Natural killer cell cytotoxicity and immunosuppressive cytokines (IL-10, TGF-beta1) in patients with gastric cancer. *Journal of biomedicine & biotechnology* *2010*, 901564.

- Takeda, K., Cretney, E., Hayakawa, Y., Ota, T., Akiba, H., Ogasawara, K., Yagita, H., Kinoshita, K., Okumura, K., and Smyth, M.J. (2005). TRAIL identifies immature natural killer cells in newborn mice and adult mouse liver. *Blood* *105*, 2082-2089.
- Tang, F., Chen, Z., Ciszewski, C., Setty, M., Solus, J., Tretiakova, M., Ebert, E., Han, J., Lin, A., Guandalini, S., *et al.* (2009). Cytosolic PLA2 is required for CTL-mediated immunopathology of celiac disease via NKG2D and IL-15. *The Journal of experimental medicine* *206*, 707-719.
- Tangye, S.G., Phillips, J.H., Lanier, L.L., and Nichols, K.E. (2000). Functional requirement for SAP in 2B4-mediated activation of human natural killer cells as revealed by the X-linked lymphoproliferative syndrome. *J Immunol* *165*, 2932-2936.
- Tarek, N., Le Luduec, J.B., Gallagher, M.M., Zheng, J., Venstrom, J.M., Chamberlain, E., Modak, S., Heller, G., Dupont, B., Cheung, N.K., *et al.* (2013). Unlicensed NK cells target neuroblastoma following anti-GD2 antibody treatment. *The Journal of clinical investigation* *122*, 3260-3270.
- Tawia, S.A., Beaton, L.A., and Rogers, P.A. (1993). Immunolocalization of the cellular adhesion molecules, intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) and platelet endothelial cell adhesion molecule (PECAM), in human endometrium throughout the menstrual cycle. *Human reproduction (Oxford, England)* *8*, 175-181.
- Taylor-Wiedeman, J., Sissons, J.G., Borysiewicz, L.K., and Sinclair, J.H. (1991). Monocytes are a major site of persistence of human cytomegalovirus in peripheral blood mononuclear cells. *The Journal of general virology* *72* (Pt 9), 2059-2064.
- Tessmer, M.S., Fugere, C., Stevenaert, F., Naidenko, O.V., Chong, H.J., Leclercq, G., and Brossay, L. (2007). KLRG1 binds cadherins and preferentially associates with SHIP-1. *International immunology* *19*, 391-400.
- Thiery, J., Keefe, D., Boulant, S., Boucrot, E., Walch, M., Martinvalet, D., Goping, I.S., Bleackley, R.C., Kirchhausen, T., and Lieberman, J. (2011). Perforin pores in the endosomal membrane trigger the release of endocytosed granzyme B into the cytosol of target cells. *Nature immunology* *12*, 770-777.
- Thomas, D.A., Scorrano, L., Putcha, G.V., Korsmeyer, S.J., and Ley, T.J. (2001). Granzyme B can cause mitochondrial depolarization and cell death in the absence of BID, BAX, and BAK. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *98*, 14985-14990.
- Thomas, L.M., Peterson, M.E., and Long, E.O. (2013). Cutting Edge: NK Cell Licensing Modulates Adhesion To Target Cells. *J Immunol*.
- Thomas, M., Boname, J.M., Field, S., Nejentsev, S., Salio, M., Cerundolo, V., Wills, M., and Lehner, P.J. (2008). Down-regulation of NKG2D and NKp80 ligands by Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus K5 protects against NK cell cytotoxicity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *105*, 1656-1661.
- Thomas, P.G., Brown, S.A., Yue, W., So, J., Webby, R.J., and Doherty, P.C. (2006). An unexpected antibody response to an engineered influenza virus modifies CD8+ T cell responses. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *103*, 2764-2769.
- Tilburgs, T., Roelen, D.L., van der Mast, B.J., de Groot-Swings, G.M., Kleijburg, C., Scherjon, S.A., and Claas, F.H. (2008). Evidence for a selective migration of fetus-specific CD4+CD25bright regulatory T cells from the peripheral blood to the decidua in human pregnancy. *J Immunol* *180*, 5737-5745.
- Tilburgs, T., Roelen, D.L., van der Mast, B.J., van Schip, J.J., Kleijburg, C., de Groot-Swings, G.M., Kanhai, H.H., Claas, F.H., and Scherjon, S.A. (2006). Differential distribution of CD4(+)/CD25(bright) and CD8(+)/CD28(-) T-cells in decidua and maternal blood during human pregnancy. *Placenta* *27 Suppl A*, S47-53.
- Tomasec, P., Braud, V.M., Rickards, C., Powell, M.B., McSharry, B.P., Gadola, S., Cerundolo, V., Borysiewicz, L.K., McMichael, A.J., and Wilkinson, G.W. (2000). Surface expression of HLA-E, an inhibitor of natural killer cells, enhanced by human cytomegalovirus gpUL40. *Science (New York, NY)* *287*, 1031.

- Tomasec, P., Wang, E.C., Davison, A.J., Vojtesek, B., Armstrong, M., Griffin, C., McSharry, B.P., Morris, R.J., Llewellyn-Lacey, S., Rickards, C., *et al.* (2005). Downregulation of natural killer cell-activating ligand CD155 by human cytomegalovirus UL141. *Nature immunology* *6*, 181-188.
- Torkar, M., Haude, A., Milne, S., Beck, S., Trowsdale, J., and Wilson, M.J. (2000). Arrangement of the ILT gene cluster: a common null allele of the ILT6 gene results from a 6.7-kbp deletion. *European journal of immunology* *30*, 3655-3662.
- Tovar, V., de la Fuente, M.A., Pizcueta, P., Bosch, J., and Engel, P. (2000). Gene structure of the mouse leukocyte cell surface molecule Ly9. *Immunogenetics* *51*, 788-793.
- Trapani, J.A. (1998). Dual mechanisms of apoptosis induction by cytotoxic lymphocytes. *International review of cytology* *182*, 111-192.
- Trotta, R., Chen, L., Ciarlariello, D., Josyula, S., Mao, C., Costinean, S., Yu, L., Butchar, J.P., Tridandapani, S., Croce, C.M., *et al.* (2012). miR-155 regulates IFN-gamma production in natural killer cells. *Blood* *119*, 3478-3485.
- Trundley, A., and Moffett, A. (2004). Human uterine leukocytes and pregnancy. *Tissue antigens* *63*, 1-12.
- Turnbull, I.R., and Colonna, M. (2007). Activating and inhibitory functions of DAP12. *Nature reviews* *7*, 155-161.
- Uhrberg, M., Valiante, N.M., Shum, B.P., Shilling, H.G., Lienert-Weidenbach, K., Corliss, B., Tyan, D., Lanier, L.L., and Parham, P. (1997). Human diversity in killer cell inhibitory receptor genes. *Immunity* *7*, 753-763.
- Uneke, C.J. (2007). Congenital Plasmodium falciparum malaria in sub-Saharan Africa: a rarity or frequent occurrence? *Parasitology research* *101*, 835-842.
- Vacca, P., Cantoni, C., Vitale, M., Prato, C., Canegallo, F., Fenoglio, D., Ragni, N., Moretta, L., and Mingari, M.C. (2010). Crosstalk between decidual NK and CD14+ myelomonocytic cells results in induction of Tregs and immunosuppression. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *107*, 11918-11923.
- Vacca, P., Pietra, G., Falco, M., Romeo, E., Bottino, C., Bellora, F., Prefumo, F., Fulcheri, E., Venturini, P.L., Costa, M., *et al.* (2006). Analysis of natural killer cells isolated from human decidua: Evidence that 2B4 (CD244) functions as an inhibitory receptor and blocks NK-cell function. *Blood* *108*, 4078-4085.
- Vacca, P., Vitale, C., Montaldo, E., Conte, R., Cantoni, C., Fulcheri, E., Darretta, V., Moretta, L., and Mingari, M.C. (2011). CD34+ hematopoietic precursors are present in human decidua and differentiate into natural killer cells upon interaction with stromal cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *108*, 2402-2407.
- Vales-Gomez, M., Reyburn, H.T., Erskine, R.A., Lopez-Botet, M., and Strominger, J.L. (1999). Kinetics and peptide dependency of the binding of the inhibitory NK receptor CD94/NKG2-A and the activating receptor CD94/NKG2-C to HLA-E. *The EMBO journal* *18*, 4250-4260.
- Valiante, N.M., Uhrberg, M., Shilling, H.G., Lienert-Weidenbach, K., Arnett, K.L., D'Andrea, A., Phillips, J.H., Lanier, L.L., and Parham, P. (1997). Functionally and structurally distinct NK cell receptor repertoires in the peripheral blood of two human donors. *Immunity* *7*, 739-751.
- van Helden, M.J., de Graaf, N., Boog, C.J., Topham, D.J., Zaiss, D.M., and Sijts, A.J. (2012). The bone marrow functions as the central site of proliferation for long-lived NK cells. *J Immunol* *189*, 2333-2337.
- Veillette, A. (2006). Immune regulation by SLAM family receptors and SAP-related adaptors. *Nature reviews* *6*, 56-66.
- Vendelbosch, S., de Boer, M., Gouw, R.A., Ho, C.K., Geissler, J., Swelsen, W.T., Moorhouse, M.J., Lardy, N.M., Roos, D., van den Berg, T.K., *et al.* (2013). Extensive variation in gene copy number at the killer immunoglobulin-like receptor locus in humans. *PloS one* *8*, e67619.

- Venet, F., Davin, F., Guignant, C., Larue, A., Cazalis, M.A., Darbon, R., Allombert, C., Mougin, B., Malcus, C., Poitevin-Later, F., *et al.* (2010). Early assessment of leukocyte alterations at diagnosis of septic shock. *Shock* (Augusta, Ga *34*, 358-363.
- Vermijlen, D., Brouwer, M., Donner, C., Liesnard, C., Tackoen, M., Van Rysselberge, M., Twite, N., Goldman, M., Marchant, A., and Willems, F. (2010). Human cytomegalovirus elicits fetal gammadelta T cell responses in utero. *The Journal of experimental medicine* *207*, 807-821.
- Vidal-Castineira, J.R., Lopez-Vazquez, A., Diaz-Pena, R., Alonso-Arias, R., Martinez-Borra, J., Perez, R., Fernandez-Suarez, J., Melon, S., Prieto, J., Rodrigo, L., *et al.* (2010). Effect of killer immunoglobulin-like receptors in the response to combined treatment in patients with chronic hepatitis C virus infection. *Journal of virology* *84*, 475-481.
- Vieillard, V., Strominger, J.L., and Debre, P. (2005). NK cytotoxicity against CD4+ T cells during HIV-1 infection: a gp41 peptide induces the expression of an NKp44 ligand. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *102*, 10981-10986.
- Vilches, C., Pando, M.J., and Parham, P. (2000). Genes encoding human killer-cell Ig-like receptors with D1 and D2 extracellular domains all contain untranslated pseudoexons encoding a third Ig-like domain. *Immunogenetics* *51*, 639-646.
- Vitale, M., Bottino, C., Sivori, S., Sanseverino, L., Castriconi, R., Marcenaro, E., Augugliaro, R., Moretta, L., and Moretta, A. (1998). NKp44, a novel triggering surface molecule specifically expressed by activated natural killer cells, is involved in non-major histocompatibility complex-restricted tumor cell lysis. *The Journal of experimental medicine* *187*, 2065-2072.
- Vivian, J.P., Duncan, R.C., Berry, R., O'Connor, G.M., Reid, H.H., Beddoe, T., Gras, S., Saunders, P.M., Olshina, M.A., Widjaja, J.M., *et al.* (2011). Killer cell immunoglobulin-like receptor 3DL1-mediated recognition of human leukocyte antigen B. *Nature* *479*, 401-405.
- Vivier, E., Nunes, J.A., and Vely, F. (2004). Natural killer cell signaling pathways. *Science (New York, NY)* *306*, 1517-1519.
- von Rango, U., Krusche, C.A., Beier, H.M., and Classen-Linke, I. (2007). Indoleamine-dioxygenase is expressed in human decidua at the time maternal tolerance is established. *Journal of reproductive immunology* *74*, 34-45.
- Voskoboinik, I., Thia, M.C., Fletcher, J., Ciccone, A., Browne, K., Smyth, M.J., and Trapani, J.A. (2005). Calcium-dependent plasma membrane binding and cell lysis by perforin are mediated through its C2 domain: A critical role for aspartate residues 429, 435, 483, and 485 but not 491. *The Journal of biological chemistry* *280*, 8426-8434.
- Vosshenrich, C.A., Garcia-Ojeda, M.E., Samson-Villeger, S.I., Pasqualetto, V., Enault, L., Richard-Le Goff, O., Corcuff, E., Guy-Grand, D., Rocha, B., Cumano, A., *et al.* (2006). A thymic pathway of mouse natural killer cell development characterized by expression of GATA-3 and CD127. *Nature immunology* *7*, 1217-1224.
- Vyas, Y.M., Maniar, H., Lyddane, C.E., Sadelain, M., and Dupont, B. (2004). Ligand binding to inhibitory killer cell Ig-like receptors induce colocalization with Src homology domain 2-containing protein tyrosine phosphatase 1 and interruption of ongoing activation signals. *J Immunol* *173*, 1571-1578.
- Vyas, Y.M., Mehta, K.M., Morgan, M., Maniar, H., Butros, L., Jung, S., Burkhardt, J.K., and Dupont, B. (2001). Spatial organization of signal transduction molecules in the NK cell immune synapses during MHC class I-regulated noncytolytic and cytolytic interactions. *J Immunol* *167*, 4358-4367.
- Wallace, A.E., Fraser, R., and Cartwright, J.E. (2012). Extravillous trophoblast and decidual natural killer cells: a remodelling partnership. *Human reproduction update* *18*, 458-471.
- Walzer, T., Dalod, M., Vivier, E., and Zitvogel, L. (2005). Natural killer cell-dendritic cell crosstalk in the initiation of immune responses. *Expert opinion on biological therapy* *5 Suppl 1*, S49-59.

- Wandstrat, A.E., Nguyen, C., Limaye, N., Chan, A.Y., Subramanian, S., Tian, X.H., Yim, Y.S., Pertsemlidis, A., Garner, H.R., Jr., Morel, L., *et al.* (2004). Association of extensive polymorphisms in the SLAM/CD2 gene cluster with murine lupus. *Immunity* *21*, 769-780.
- Weinlich, R., Brunner, T., and Amarante-Mendes, G.P. (2010). Control of death receptor ligand activity by posttranslational modifications. *Cell Mol Life Sci* *67*, 1631-1642.
- Welsch, C., Jesudian, A., Zeuzem, S., and Jacobson, I. (2012). New direct-acting antiviral agents for the treatment of hepatitis C virus infection and perspectives. *Gut* *61 Suppl 1*, i36-46.
- Welte, S., Kuttruff, S., Waldhauer, I., and Steinle, A. (2006). Mutual activation of natural killer cells and monocytes mediated by Nkp80-AICL interaction. *Nature immunology* *7*, 1334-1342.
- Wen, C., He, X., Ma, H., Hou, N., Wei, C., Song, T., Zhang, Y., Sun, L., Ma, Q., and Zhong, H. (2008). Hepatitis C virus infection downregulates the ligands of the activating receptor NKG2D. *Cellular & molecular immunology* *5*, 475-478.
- Wende, H., Volz, A., and Ziegler, A. (2000). Extensive gene duplications and a large inversion characterize the human leukocyte receptor cluster. *Immunogenetics* *51*, 703-713.
- Whitley, R.J. (2004). Congenital cytomegalovirus infection: epidemiology and treatment. *Advances in experimental medicine and biology* *549*, 155-160.
- Wiemann, K., Mittrucker, H.W., Feger, U., Welte, S.A., Yokoyama, W.M., Spies, T., Rammensee, H.G., and Steinle, A. (2005). Systemic NKG2D down-regulation impairs NK and CD8 T cell responses in vivo. *J Immunol* *175*, 720-729.
- Wilczynski, J.R., Tchorzewski, H., Banasik, M., Glowacka, E., Wieczorek, A., Lewkowicz, P., Malinowski, A., Szpakowski, M., and Wilczynski, J. (2003). Lymphocyte subset distribution and cytokine secretion in third trimester decidua in normal pregnancy and preeclampsia. *European journal of obstetrics, gynecology, and reproductive biology* *109*, 8-15.
- Willcox, B.E., Thomas, L.M., and Bjorkman, P.J. (2003). Crystal structure of HLA-A2 bound to LIR-1, a host and viral major histocompatibility complex receptor. *Nature immunology* *4*, 913-919.
- Williams, H., McAulay, K., Macsween, K.F., Gallacher, N.J., Higgins, C.D., Harrison, N., Swerdlow, A.J., and Crawford, D.H. (2005). The immune response to primary EBV infection: a role for natural killer cells. *British journal of haematology* *129*, 266-274.
- Wilson, M.J., Torkar, M., and Trowsdale, J. (1997). Genomic organization of a human killer cell inhibitory receptor gene. *Tissue antigens* *49*, 574-579.
- Winter, C.C., and Long, E.O. (1997). A single amino acid in the p58 killer cell inhibitory receptor controls the ability of natural killer cells to discriminate between the two groups of HLA-C allotypes. *J Immunol* *158*, 4026-4028.
- Wu, C. (1999). Integrin-linked kinase and PINCH: partners in regulation of cell-extracellular matrix interaction and signal transduction. *Journal of cell science* *112 (Pt 24)*, 4485-4489.
- Wu, J., Cherwinski, H., Spies, T., Phillips, J.H., and Lanier, L.L. (2000). DAP10 and DAP12 form distinct, but functionally cooperative, receptor complexes in natural killer cells. *The Journal of experimental medicine* *192*, 1059-1068.
- Wu, X., Jin, L.P., Yuan, M.M., Zhu, Y., Wang, M.Y., and Li, D.J. (2005). Human first-trimester trophoblast cells recruit CD56^{bright}CD16⁻ NK cells into decidua by way of expressing and secreting of CXCL12/stromal cell-derived factor 1. *J Immunol* *175*, 61-68.
- Wulfiging, C., Puritic, B., Klem, J., and Schatzle, J.D. (2003). Stepwise cytoskeletal polarization as a series of checkpoints in innate but not adaptive cytolytic killing. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *100*, 7767-7772.

- Yamaguchi, T., Kitaya, K., Daikoku, N., Yasuo, T., Fushiki, S., and Honjo, H. (2006). Potential selectin L ligands involved in selective recruitment of peripheral blood CD16(-) natural killer cells into human endometrium. *Biology of reproduction* *74*, 35-40.
- Yamanaka, Y., Tagawa, H., Takahashi, N., Watanabe, A., Guo, Y.M., Iwamoto, K., Yamashita, J., Saitoh, H., Kameoka, Y., Shimizu, N., *et al.* (2009). Aberrant overexpression of microRNAs activate AKT signaling via down-regulation of tumor suppressors in natural killer-cell lymphoma/leukemia. *Blood* *114*, 3265-3275.
- Yan, Q., Malashkevich, V.N., Fedorov, A., Fedorov, E., Cao, E., Lary, J.W., Cole, J.L., Nathenson, S.G., and Almo, S.C. (2007). Structure of CD84 provides insight into SLAM family function. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *104*, 10583-10588.
- Yang, Z., and Bjorkman, P.J. (2008). Structure of UL18, a peptide-binding viral MHC mimic, bound to a host inhibitory receptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *105*, 10095-10100.
- Yokoyama, W.M. (2005). Specific and non-specific natural killer cell responses to viral infection. *Advances in experimental medicine and biology* *560*, 57-61.
- Yokoyama, W.M., and Kim, S. (2006). How do natural killer cells find self to achieve tolerance? *Immunity* *24*, 249-257.
- Yu, G., Xu, X., Vu, M.D., Kilpatrick, E.D., and Li, X.C. (2006). NK cells promote transplant tolerance by killing donor antigen-presenting cells. *The Journal of experimental medicine* *203*, 1851-1858.
- Yu, H., Fehniger, T.A., Fuchshuber, P., Thiel, K.S., Vivier, E., Carson, W.E., and Caligiuri, M.A. (1998). Flt3 ligand promotes the generation of a distinct CD34(+) human natural killer cell progenitor that responds to interleukin-15. *Blood* *92*, 3647-3657.
- Zamai, L., Ahmad, M., Bennett, I.M., Azzoni, L., Alnemri, E.S., and Perussia, B. (1998). Natural killer (NK) cell-mediated cytotoxicity: differential use of TRAIL and Fas ligand by immature and mature primary human NK cells. *The Journal of experimental medicine* *188*, 2375-2380.
- Zawislak, C.L., Beaulieu, A.M., Loeb, G.B., Karo, J., Canner, D., Bezman, N.A., Lanier, L.L., Rudensky, A.Y., and Sun, J.C. (2013). Stage-specific regulation of natural killer cell homeostasis and response against viral infection by microRNA-155. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *110*, 6967-6972.
- Zhang, D., Beresford, P.J., Greenberg, A.H., and Lieberman, J. (2001). Granzymes A and B directly cleave lamins and disrupt the nuclear lamina during granule-mediated cytolysis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *98*, 5746-5751.
- Zhang, Y., Boesen, C.C., Radaev, S., Brooks, A.G., Fridman, W.H., Sautes-Fridman, C., and Sun, P.D. (2000). Crystal structure of the extracellular domain of a human Fc gamma RIII. *Immunity* *13*, 387-395.
- Zhao, T., Zhang, H., Guo, Y., and Fan, Z. (2007a). Granzyme K directly processes bid to release cytochrome c and endonuclease G leading to mitochondria-dependent cell death. *The Journal of biological chemistry* *282*, 12104-12111.
- Zhao, T., Zhang, H., Guo, Y., Zhang, Q., Hua, G., Lu, H., Hou, Q., Liu, H., and Fan, Z. (2007b). Granzyme K cleaves the nucleosome assembly protein SET to induce single-stranded DNA nicks of target cells. *Cell death and differentiation* *14*, 489-499.
- Zingoni, A., Sornasse, T., Cocks, B.G., Tanaka, Y., Santoni, A., and Lanier, L.L. (2005). NK cell regulation of T cell-mediated responses. *Molecular immunology* *42*, 451-454.
- Zitvogel, L. (2002). Dendritic and natural killer cells cooperate in the control/switch of innate immunity. *The Journal of experimental medicine* *195*, F9-14.

Annexes

Annexe 1:

TGF- β -Induced (TGFBI) Protein in Melanoma: A Signature of High Metastatic Potential.

Lauden L, **Siewiera J**, Boukouaci W, Ramgolam K, Mourah S, Lebbe C, Charron D, Aoudjit F, Jabrane-Ferrat N, Al-Daccak R.

J Invest Dermatol. 2014 Jun;134(6):1675-85.

TGF- β -Induced (TGFB1) Protein in Melanoma: A Signature of High Metastatic Potential

Laura Lauden¹, Johan Siewiera², Wahid Boukouaci¹, Kiran Ramgolam¹, Samia Mourah^{1,3}, Celeste Lebbe^{4,5}, Dominique Charron^{1,6}, Fawzi Aoudjit⁷, Nabila Jabrane-Ferrat^{2,8} and Reem Al-Daccak^{1,8}

Tumor-produced extracellular matrix (ECM) proteins can be key elements in tumor growth and metastasis. Transforming growth factor beta-inducible (TGFB1) protein is a secreted ECM component that can have dual function in cancer, acting as tumor suppressor or promoter. Although TGFB1 is expressed in human melanoma cells, the exact role it might have in melanoma metastasis remains elusive. Assessing the expression and secretion of TGFB1, we show that human metastatic melanomas express and secrete significantly higher amounts of TGFB1, compared with nevus lesions and primary melanoma tumors. Intravenous injection of highly metastatic human melanoma cells expressing shRNA that targets TGFB1 assigns a critical role for TGFB1 in the formation of melanoma distal metastases in nude mice. *In vivo* assays demonstrate that TGFB1 silencing does not interfere with melanoma cells' dissemination to distal sites but rather with their proliferation and outgrowth within new microenvironment. In line, TGFB1 silencing increases melanoma cells motility/invasion/extravasation *in vitro* but interferes with their progression through the cell cycle, drastically reducing their proliferation. Furthermore, we show that TGFB1 is a regulator of cyclins and cyclin-dependent kinases in melanoma. Collectively, our data describe a mechanism of melanoma metastatic outgrowth via promotion of growth/survival by the ECM protein TGFB1.

Journal of Investigative Dermatology (2014) **134**, 1675–1685; doi:10.1038/jid.2014.20; published online 6 February 2014

INTRODUCTION

Melanomas are highly aggressive malignancies that frequently disseminate, remaining therefore an enormous clinical challenge. The factors involved in their metastatic outgrowth are not yet fully explored, and a deeper understanding of such factors should lead to more effective therapies (Spano *et al.*, 2012).

The extracellular matrix (ECM) proteins, compromising tumor microenvironment, can be key elements in tumor

growth and metastasis (Wong and Rustgi, 2013). They can act as regulators of survival, proliferation, differentiation, and cell migration/invasion. Melanoma cells often modify their microenvironment through secretion of specific ECM proteins and ECM-modifying proteases to be more permissive for their growth and dissemination (Botti *et al.*, 2012).

The transforming growth factor beta (TGF β)-induced protein (TGFB1) is a secreted ECM protein mainly expressed in fibroblasts, keratinocytes, and muscle cells. It can associate with several ECM proteins and function in many cell types as a linker protein connecting various matrix molecules to each other facilitating cell–ECM interactions (Thapa *et al.*, 2007).

In cancer, the expression and functional role of TGFB1 has been controversial. TGFB1 was found increased in various tumors (Sasaki *et al.*, 2002; Ma *et al.*, 2008; Lin *et al.*, 2010; Turtoi *et al.*, 2011; Ma *et al.*, 2012) whereas downregulated in others (Kang *et al.*, 2010; Kaiser *et al.*, 2013). However, recent findings in ovarian cancer have indicated that TGFB1 could probably have dual function acting as tumor suppressor or promoter (Ween *et al.*, 2012). In melanoma, while microarray analysis showed increased expression of TGFB1 in cells from metastatic and vertical growth phases (Hoek, 2007; Nummela *et al.*, 2012), TGFB1 was also identified as decitabine-induced gene through epigenetic histone modification (Halaban *et al.*, 2009). We found that TGFB1 is upregulated in multicellular melanoma spheroids, which possess high metastatic potential (Ramgolam *et al.*, 2011). These studies have been supported by recent findings showing that TGFB1 is located in fibrillar structures in human melanoma metastases, and knockdown

¹Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM) UMRS 940, University Paris 7—Denis Diderot, AP-HP, Saint Louis Hospital, Paris, France; ²INSERM UMR 1043 and CNRS UMR 5282, University Toulouse III Paul Sabatier, Toulouse, France; ³Pharmacology–Genetics Laboratory, University Paris 7—Denis Diderot, AP-HP, Saint Louis Hospital, Paris, France; ⁴Dermatology Department, University Paris 7—Denis Diderot, AP-HP, Saint Louis Hospital, Paris, France; ⁵Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM) UMR 976, University Paris 7—Denis Diderot, AP-HP, Saint Louis Hospital, Paris, France; ⁶Jean Dausset Laboratory, University Paris 7—Denis Diderot, AP-HP, Saint Louis Hospital, Paris, France and ⁷Centre de Recherche du CHU de Québec, Université Laval, Québec, Canada

⁸These two authors are co-senior authors.

Correspondence: Nabila Jabrane-Ferrat, UMR1043—CNRS UMR5282, Centre de Physiopathologie Toulouse Purpan (CPTP), CHU PURPAN—BP 3028, Toulouse CEDEX 3 31024, France. E-mail: nabila.jabrane-ferrat@inserm.fr or Reem Al-Daccak, UMRS U940, Hôpital Saint Louis, Batiment Bazin 1 Avenue Claude Vellefaux, Paris 75010, France. E-mail: reem.al-daccak@inserm.fr

Abbreviations: CCN, cyclin; CDK, cyclin-dependent kinase; ECM, extracellular matrix; GFP, green fluorescent protein; TGFB1, transforming growth factor β -induced protein; TGF β , transforming growth factor β ; WT, wild type

Received 4 September 2013; revised 3 December 2013; accepted 16 December 2013; accepted article preview online 17 January 2014; published online 6 February 2014

of TGFBI expression in melanoma cells impaired tumor formation and vertical growth phase (Nummela *et al.*, 2012). However, the exact role of TGFBI in melanoma metastasis remains incompletely understood.

In this study, we developed a metastasis model based on intravenous injection of highly metastatic 1205Lu human melanoma in nude mice and assessed the effect of silencing TGFBI on melanoma cells' dissemination and metastases formation. Our results show that lack of TGFBI secretion by metastatic melanomas results in drastic reduction in their distal metastatic outgrowth mainly by disturbing their cell cycle progression likely with defects in G1/S transition and S phase regulation.

RESULTS

Metastatic melanomas produce large amounts of TGFBI

We first compared the mRNA expression in biopsies from human nevi lesions, primary skin and metastatic melanomas. Primary skin melanomas showed little variations in *TGFBI* level compared with benign nevi (1- to 2-fold induction). *TGFBI* expression levels were higher in metastatic melanomas than in benign lesions or primary melanomas (ranging from 1.5- to 9.5-fold induction) (Figure 1a). This scattered variation in *TGFBI* mRNA expression was not tissue specific, but we could clearly define two groups of metastatic melanomas, a low (1- to 2.5-fold induction) and a high (2.7- to 9.8-fold induction) expressing group. To see the potential relevance of these findings, we then performed TGFBI immunostaining in human nevi lesions, primary melanomas, and skin, liver and lymph node metastases. Despite heterogeneity in the expression level, nevi lesions showed non- or very faint TGFBI staining (Figure 1b). In contrast, TGFBI was detected around melanoma cells in primary and metastatic lesions (Figure 1b), which is in accordance with being a secreted ECM and with its reported localization within fibrillar structures surrounding melanoma cells (Nummela *et al.*, 2012). Compared with nevus lesions and primary tumors, TGFBI staining was more intense in metastases, suggesting that metastatic melanoma cells secrete higher amounts of TGFBI than primary melanomas.

To verify the possibility that TGFBI was secreted by melanoma cells and not surrounding cells, we compared the secretion of TGFBI in different cell lines derived from human primary melanomas (WM983A and WM793) or their respective metastatic counterparts from the same patients (WM983B, 1205Lu). All melanoma cell lines secrete large amounts of TGFBI, but secretion levels were significantly higher in metastatic ones (Figure 1c).

TGFBI is required for melanoma metastatic outgrowth

The above findings suggest that the secretion of TGFBI by melanoma cells might have a role in melanoma metastasis, therefore we developed a metastasis model and assessed the effect of silencing TGFBI. Metastatic melanoma cells were engineered to express either a non-target shRNA (CTRL-GFP (green fluorescent protein)-shRNA-1205Lu) or shRNA that targets TGFBI (GFP-TGFBI-shRNA-1205Lu) (Supplementary Figure S1 online) and were injected into the retro-orbital venous sinus of immunodeficient mice. All mice that received TGFBI-producing CTRL-shRNA-1205Lu cells (16 mice)

showed significant weight loss 3 weeks post injection (Figure 2a). Three out of the 16 recipient mice died very early (day 15), and the remaining mice were moribund 15–47 days post injection (Figure 2b). In contrast, mice that received TGFBI-shRNA-1205Lu cells (15 mice) producing very low levels of TGFBI (Supplementary Figure S1b and c online) did not show major changes of their weight (Figure 2a), showed delay in disease development, and increase in disease-free survival (6/15 TGFBI-shRNA-1205Lu challenged mice) (Figure 2b).

CTRL-shRNA-1205Lu group (10/10) developed proximal tumor metastases while only 9/15 mice that received TGFBI-shRNA-1205Lu cells developed proximal metastases (Figure 2c), which were remarkably smaller than those of the CTRL-shRNA-1205Lu challenged group. Examination of the lung showed high incidence of distal metastases foci in CTRL-shRNA group (10/10), whereas none of the mice in the TGFBI-shRNA group developed distal metastases (Figure 2c). In line, the mitotic figures were more abundant in CTRL-shRNA compared with the TGFBI-shRNA group (Figure 2d). Examination of draining and non-draining lymph nodes as well as several other organs (data not shown) did not reveal any other metastases development both in CTRL or TGFBI knockdown tumor-challenged mice. Immunohistochemical analyses showed intense TGFBI staining around infiltrating tumor cells in proximal and distal lung and ovary metastases in CTRL-shRNA-1205Lu-induced tumors (Figure 2e). In contrast, TGFBI-shRNA-1205Lu-induced tumors showed either faint TGFBI staining of the proximal metastasis and no or only background staining level of lung and ovary tissues. Thus, TGFBI is critical for distal metastases development in melanomas.

TGFBI knockdown does not interfere with melanoma cells' dissemination to the lung

We then tested whether the absence of TGFBI impairs the dissemination of melanoma cells through a kinetic study of micro-metastases formation in the lung. Mice received intravenous injection of CTRL- or TGFBI-shRNA-1205Lu cells at day 0. Groups of five mice were euthanized at different time points, and the lungs were analyzed for micro-metastases development. We took advantage of GFP expression (Supplementary Figure S1a online) to analyze the whole-lung cell suspensions by flow cytometry. Although, we did not reach significance, extravasation to the lung was detected as early as 24 hours post challenge with TGFBI-shRNA-1205Lu cells (mean of 0.02% GFP⁺ cells in total lung) while it was detected only on day 3 with CTRL-shRNA-1205Lu cells (Figure 3a).

The percentage of CTRL-shRNA-1205Lu extravasating cells at day 5 remained similar to that at day 3, but a considerable decline in the percentage (from mean of 0.08 to 0.037%) of TGFBI-shRNA-1205Lu extravasating cells was observed after 5 days, and we could barely detect any GFP⁺ cells after 7 days. On the contrary, increasing numbers of GFP⁺ CTRL-shRNA-1205Lu cells were detected over time, reaching a mean of 0.4% by day 9. High-resolution two-photon microscopy analyzing the localization of melanoma cells to the lung corroborated with flow cytometry analysis (Figure 3b). Hematological dissemination of melanoma cells to the lung was

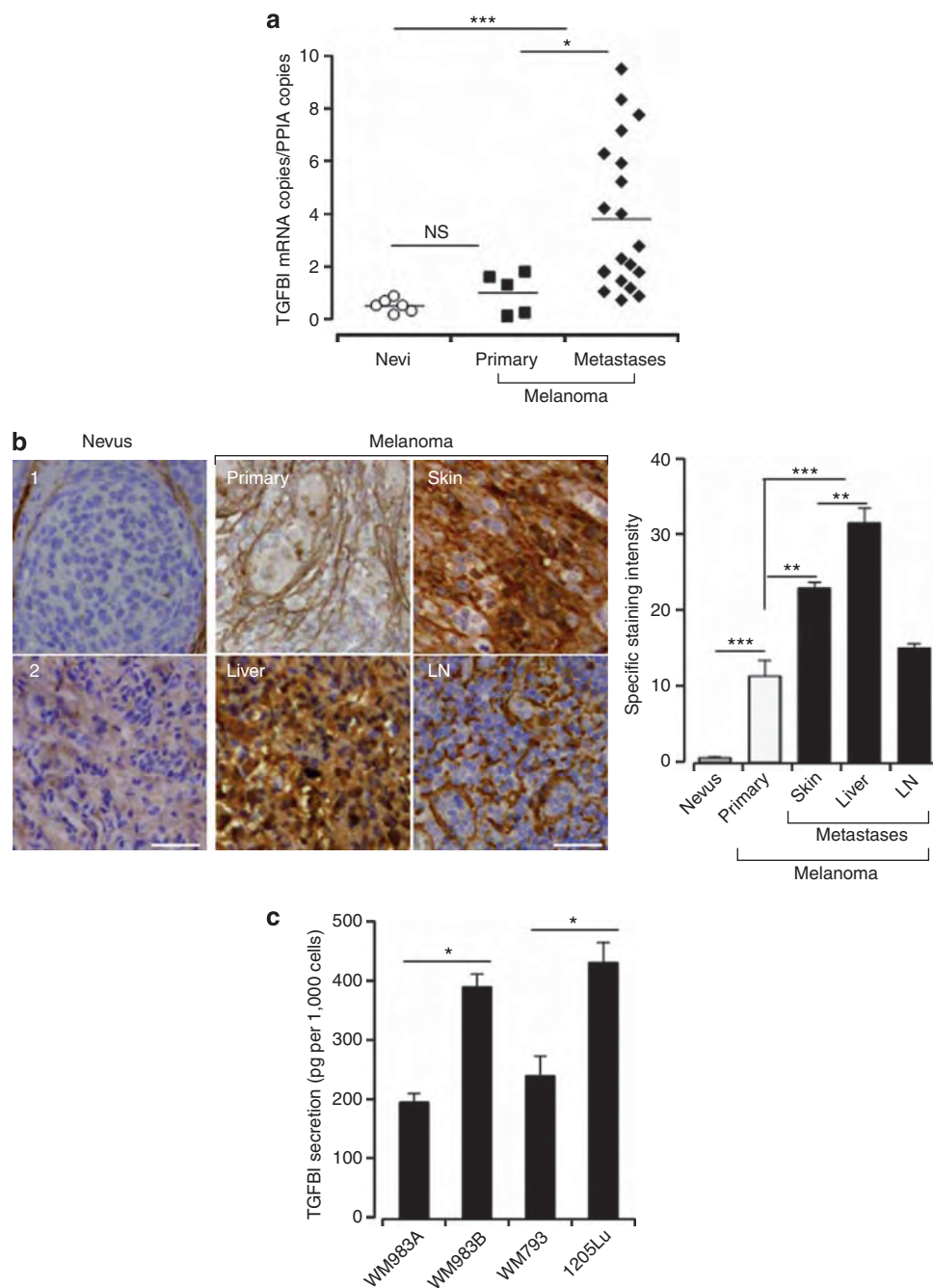


Figure 1. Human melanoma produces large amounts of transforming growth factor beta (TGFB)-induced protein (TGFB1). (a) Expression of *TGFB1* mRNA relative to *PPIA* housekeeping gene mRNA in benign nevi, primary skin, and metastatic melanomas. Median values are 0.50 ± 0.087 (nevi), 1.15 ± 0.28 (primary skin), and 3.82 ± 0.28 (metastatic melanoma). (b) Representative images of TGFB1 staining and quantification (right panel) in nine nevi (1 and 2), five primary skin melanoma (primary), and in five skin, five liver, five lymph node (LN) metastases. Bar = $50 \mu\text{m}$. Mean values \pm SEM are presented. (c) Secretion of TGFB1 by primary (WM293A, WM793) and their respective metastatic (WM983B, 1205Lu) melanoma cell lines. Results are expressed as mean values \pm SD of TGFB1 (pg) secreted by 1,000 cells from three independent experiments performed in triplicate. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$. NS, not significant.

clearly visible as single-cell micro-metastasis 5 days after implantation with both melanoma cell lines. However, by 9 days post implantation, several foci of larger metastases were detected only in the CTRL-shRNA-1205Lu group, whereas almost no GFP⁺ cells were present in the TGFB1-shRNA group (Figure 3b).

Therefore, we investigated the role of TGFB1 knockdown in cell migration, invasion, extravasation, and adhesion capacity *in vitro*. We found that TGFB1-shRNA-1205Lu cells not only have higher migration than CTRL-shRNA-1205Lu or wild-type (WT) 1205Lu cells (3.5-fold increase) (Supplementary Figure S2a online) but also higher capacity

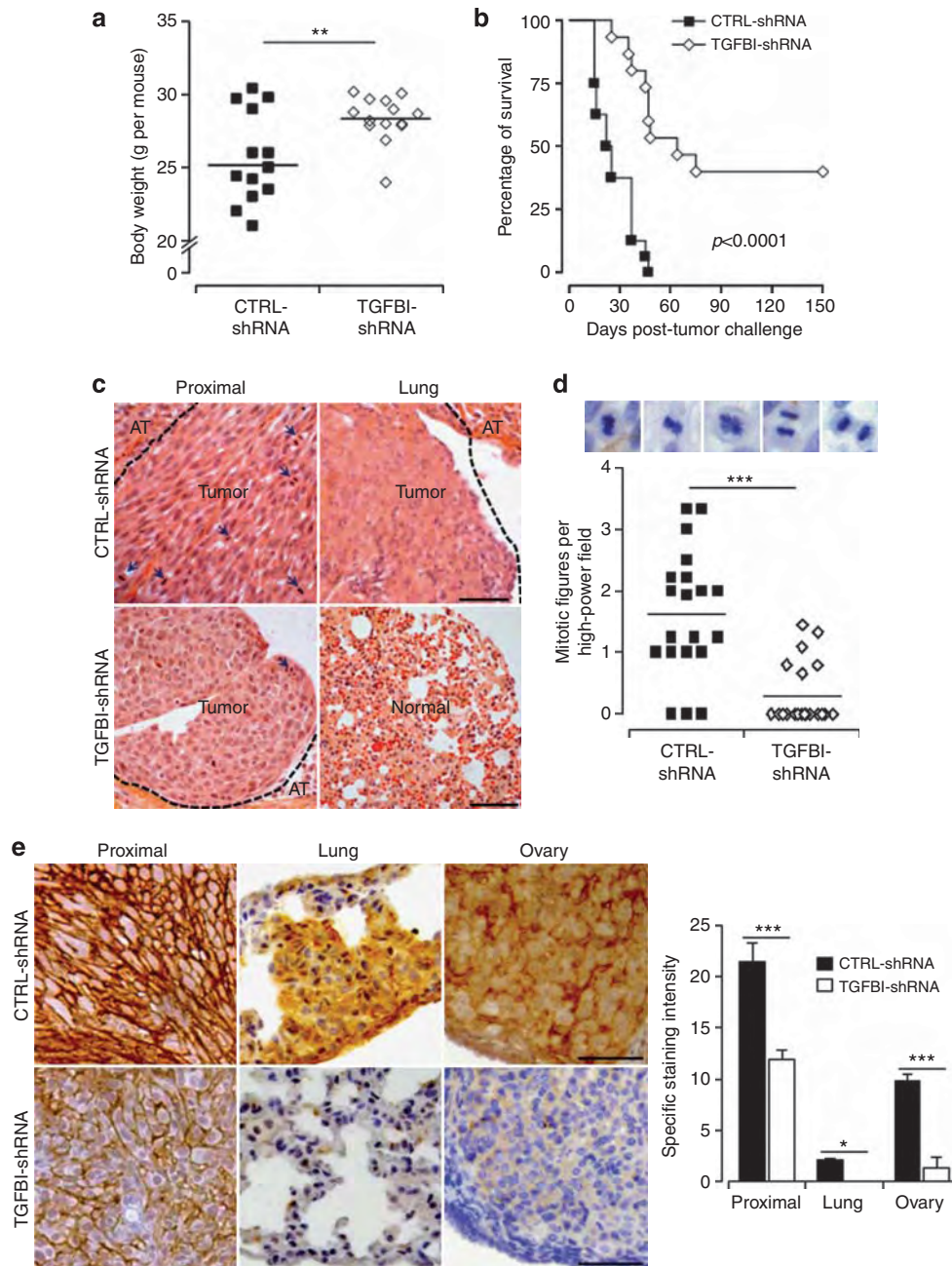


Figure 2. Transforming growth factor beta (TGFβ)-induced protein (TGFBI) expression is required for metastatic outgrowth. Nude mice received either CTRL- or TGFBI-shRNA-1205Lu melanoma cells. (a) Body weight analysis at 3 weeks post-tumor inoculation. (b) Kaplan–Meier disease-free survival curves. (c) Hematoxylin and eosin (H&E) staining of proximal and distal tissues indicating metastases formation (Tumor) and normal adjacent tissue (AT). Dashed lines delineate tumor tissue border from normal AT. Bar = 50 μm. Arrowheads point to mitotic figures. (d) H&E staining and quantification of frequently observed mitotic figures in proximal metastases taken with × 400 objectives. Each data point represents the average count of mitotic figures in 10 fields. Median (horizontal line) is shown. (e) Representative TGFBI expression (left panel) and quantification (right panel) in different tissues (× 200 magnification). Mean values ± SEM are presented. **P* < 0.05, ***P* < 0.01, ****P* < 0.001.

to invade (2.5-fold increase) (Figure 3c left panel and Supplementary Figure S2b online) and extravasate through endothelial cells (2-fold increase) (Supplementary Figure S2c online). TGFBI-shRNA-1205Lu cells also displayed higher capacity to adhere than WT and CTRL-shRNA-1205Lu cells (1.5-fold increase) (Figure 3c right panel and Supplementary Figure S2d). The addition of recombinant TGFBI restored

invasion and adhesion to the level of WT cells (Figure 3c and Supplementary Figure S3 online), indicating that the observed increases are linked to the knockdown of TGFBI secretion in TGFBI-shRNA-1205Lu cells. Similar results were obtained when assays were conducted with cells engineered with a second TGFBI-shRNA (Supplementary Figures S2 and S3 online).

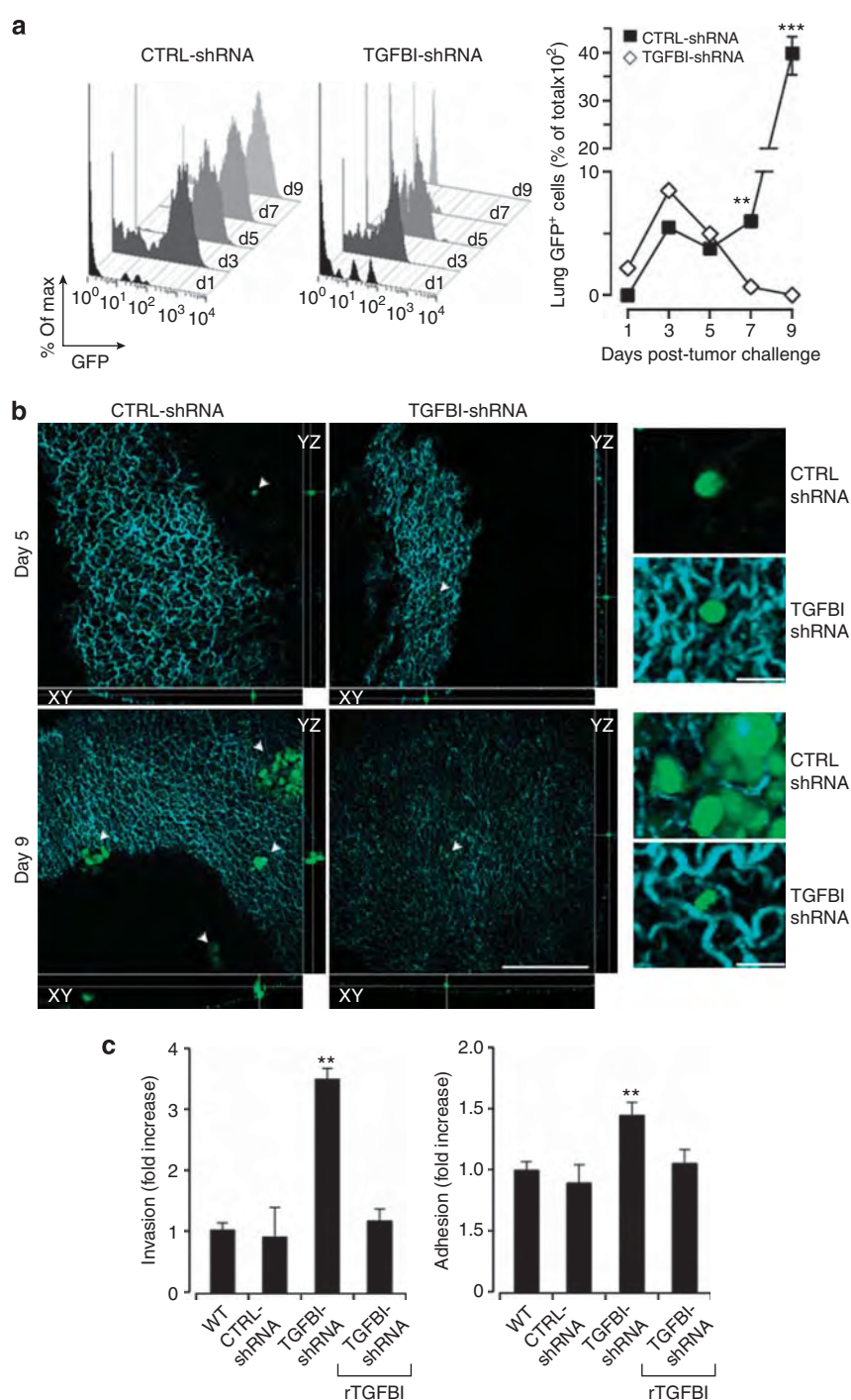


Figure 3. Transforming growth factor beta (TGFB)-induced protein (TGFB1) silencing does not affect dissemination capacity of melanoma cells. (a) GFP⁺ (green fluorescent protein-positive) cells detected in total lung from CTRL- or TGFB1-shRNA-1205Lu cells nude mice. Representative overlay of FACS plots at different time points (left panel) and quantification of GFP⁺ cells given as mean values \pm SEM (right panel). (b) Images on fixed lungs from maximum intensity projection of z-stacks (15 μ m). YZ and XY orthogonal views are shown. Second-harmonic generation of type I collagen (cyan); GFP⁺ CTRL- or TGFB1-shRNA-1205Lu cells (green). Arrowheads indicate GFP⁺ cells. Bar = 100 μ m. Higher magnification images are given, bar = 20 μ m. (c) Wild-type (WT) or CTRL- or TGFB1-shRNA-1205Lu cells' invasion and adhesion presented as mean values \pm SD from three independent experiments performed in triplicates. ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$.

Collectively, these *in vivo* and *in vitro* findings show that TGFB1-shRNA-1205Lu cells can extravasate like CTRL-shRNA-1205Lu cells, but their survival is impeded in a new microenvironment.

TGFB1 is required for melanoma cells' proliferation and survival
We then investigated the role of TGFB1 in tumor cell engraftment, namely cell growth and survival. Immunohistochemical analyses showed that while CTRL-shRNA-induced

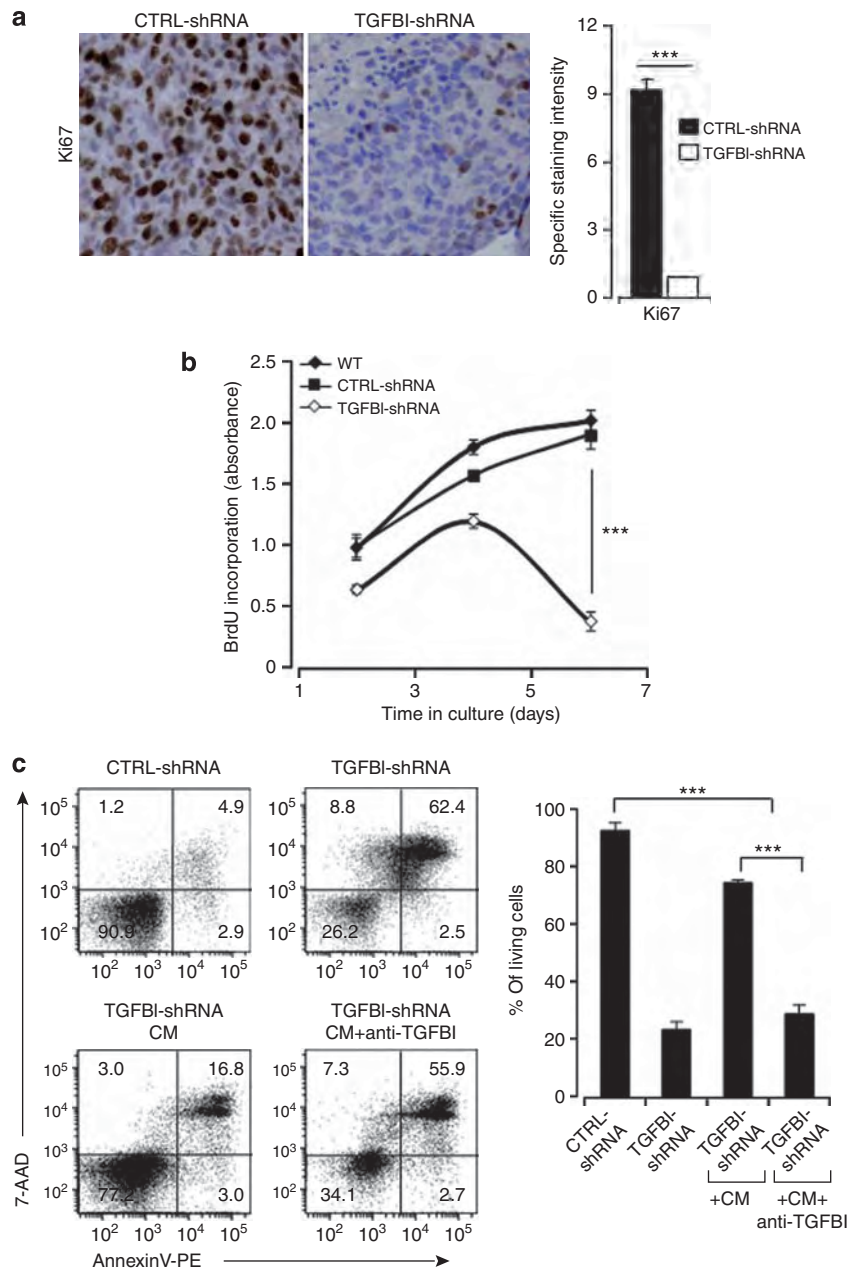


Figure 4. Transforming growth factor beta (TGFβ)-induced protein (TGFBI)-shRNA-1205Lu cells display lower proliferation rate and decreased survival. (a) Representative images (left panel) and quantification (right panel) of Ki67 expression in CTRL- ($n=10$) and TGFBI-shRNA-1205Lu ($n=9$) proximal tumors performed using 3DHISTECH panoramic slide viewer. Bar = 50 μm. (b) Proliferation of wild-type (WT), CTRL- and TGFBI-shRNA-1205Lu cells was determined at indicated time points. Results are presented as mean values ± SD of absorbance from three independent experiments performed in triplicates. (c) Apoptosis and survival of TGFBI-shRNA-1205Lu cells. Conditioned medium (CM) from CTRL-shRNA-1205Lu or anti-TGFBI-blocking antibody was added. Representative dot-plot showing the percentage of cells in each quadrain (left panel), and the percentage of 7-AAD^{neg}Annexin^{neg} cells presented as mean values ± SD from three independent experiments (right panel). *** $P < 0.001$. BrdU, 5-bromo-2'-deoxy-uridine; PE, phycoerythrin; 7-AAD, 7-aminoactinomycin D.

tumors display intense staining of cellular proliferation marker Ki67, TGFBI-shRNA-induced tumors display reduced numbers of Ki67⁺-proliferating cells (Figure 4a). Accordingly, we evaluated the effects of TGFBI knockdown on melanoma cells growth *in vitro*. Proliferation of TGFBI-shRNA-1205Lu cells was slower compared with WT and CTRL-shRNA-1205Lu cells (Figure 4b). Notably TGFBI-shRNA-1205Lu cells showed a drastic decline in their growth beginning at day 4 and

demonstrated the lowest rate of proliferation by day 6 (10-folds less than WT and CTRL-shRNA-1205Lu cells). Melanoma cells engineered with another TGFBI-shRNA displayed similar proliferation profile (Supplementary Figure S2e online). 7-Aminoactinomycin D (7-AAD)/Annexin-V staining showed that only 20% of TGFBI-shRNA-1205Lu cells survived after 4 days of culture compared with 90% of CTRL-shRNA-1205Lu cells (Figure 4c). Culturing TGFBI-shRNA-1205Lu cells in the

presence of conditioned medium from CTRL-shRNA-1205Lu cultures increased the percentage of living TGFBI-shRNA-1205Lu cells to 70%, and the presence of a blocking anti-TGFBI antibody completely abrogated this rescue (Figure 4c). Thus, secretion of TGFBI contributes to melanoma cells' growth and survival within their microenvironment.

Melanoma cells lacking TGFBI have defective cell cycle progression

As the successful division and replication of cells is essential for their survival, we examined the progression in cell cycle of CTRL-shRNA-1205Lu cells in comparison to TGFBI-shRNA-1205Lu over 5 days (Figure 5a and b). On day 1 TGFBI-shRNA-1205Lu cells tend to increase their G0/G1 phase ($P=0.08$) and significantly decreased G2/M phases populations ($P=0.03$) compared with CTRL-shRNA-1205Lu cells. On day 2, TGFBI-shRNA-1205Lu cells showed significantly decreased G0/G1 and G2/M phases ($P=0.01$ and $P=0.006$, respectively) compared with CTRL-shRNA-1205Lu cells, whereas the percentage of cells in S phase increased without reaching significance. This is likely due to the emergence of a subG1 phase population (15% apoptotic cells), while CTRL-shRNA-1205Lu cells did not show any apoptotic cells on day 2. At the end of the culture, G0/G1, S, and G2/M phase populations presented, respectively, nearly 71, 13, and 10% in CTRL-shRNA-1205Lu cultures compared with 44, 5 and 3% in TGFBI-shRNA-1205Lu cultures ($P=0.0001$, $P=0.007$, and $P=0.02$, respectively). Nearly 6% of cell death was observed in CTRL-shRNA-1205Lu cultures compared with 48% in TGFBI-shRNA-1205Lu cultures. These results indicate that TGFBI-shRNA-1205Lu cells have disturbed cell cycle progression likely with defects in G1/S transition and S phase regulation. Therefore, we analyzed the expression of the cyclin-dependent kinases (CDKs) and their regulators the cyclins (CCN). Quantitative reverse transcriptase-PCR (RT-PCR) analysis showed that TGFBI-shRNA-1205Lu cells express extremely low levels of CDK2 and significantly lower level of CDK6 compared with CTRL-shRNA-1205Lu cells (Figure 5c). TGFBI-shRNA-1205Lu cells also expressed very low levels of both CCNA and CCNE compared with CTRL-shRNA-1205Lu cells (Figure 5d). CCNE/CDK2 complex activity is required for G1/S transition. CCNA regulates two different phases, S and M, in function of whether it binds to CDK2 or CDK1, respectively. CDK6 is a catalytic subunit of the complex CCND1/CDK6 that is important for cell cycle G1 phase progression and G1/S transition.

Together, these results indicate that the secretion of TGFBI by melanoma cells is likely implicated in maintaining the expression of key regulators of their cell cycle and in the regulation of melanoma metastatic outgrowth.

DISCUSSION

Through a knockdown approach and *in vivo* metastasis model, we demonstrate the implication of TGFBI in melanoma distal metastasis formation through regulation of melanoma cells growth.

We found that TGFBI is expressed in nevus and melanoma clinical specimens. However, it was more abundant, although

with a scattered pattern, in metastatic melanoma tissues. Metastatic melanoma cell lines also secreted higher amounts of TGFBI compared with their primary counterparts. Thus the expression of TGFBI in melanoma is proportional to tumor progression stage and aggressiveness. Melanoma tumors are marked by their extensive heterogeneity (Fidler and Kripke, 1977; Banerjee and Harris, 2000), and specific transcriptional signatures delineate various melanoma cells subpopulations (Haqq *et al.*, 2005; Hoek *et al.*, 2006). *In vivo*, these specific transcriptional signatures are linked and reversible given appropriate signals and microenvironment cues, suggesting that melanoma progression is associated with transcription signature plasticity (Hoek *et al.*, 2008). Heterogeneity and plasticity could explain the scattered pattern of TGFBI by different metastatic melanoma clinical specimens. In this perspective, our findings endorse the expression of TGFBI by melanoma as part of their plasticity towards aggressive metastatic phenotype. Our *in vivo* studies in a model of metastasis strongly support this notion. We found that the lack of TGFBI not only reduces tumor incidence but also distant metastases. That the secretion of TGFBI by melanoma cells promotes their development and permits their metastatic outgrowth suggests that TGFBI is part of the tumor-induced ECM modifications allowing progression and dissemination.

In ovarian cancer, TGFBI production by peritoneal cells promotes motility/invasion and adhesion of cancer cells to peritoneal cells increasing their metastatic potential (Ween *et al.*, 2011). Human colon cancer cells lacking TGFBI have decreased capacity to extravasate and decreased metastatic potential (Ma *et al.*, 2008). In our melanoma model, TGFBI knockdown increases the capacity of tumor cells to migrate/invade/extravasate and does not affect their dissemination capacity *in vivo*. This is in line with TGFBI being an anti-adhesive protein for melanoma cells (Nummela *et al.*, 2012) and indicates that TGFBI in melanoma potentiates metastases in a manner distinct from that operating in other tumors. One possible mechanism by which TGFBI affects cell adhesion and migration is through its negative effect on cytoskeleton dynamics. Downregulation of TGFBI in melanoma cells results in increased co-localization of actin filaments, $\beta 1$ integrins, and talin (Nummela *et al.*, 2012). TGFBI also stabilizes microtubules (Ahmed *et al.*, 2007), which could also affect the migration process, and TGFBI silencing would favor microtubule dynamics and thereby cell motility and invasion. The lack of TGFBI resulted in a drastic decrease in the capacity of melanoma cells to proliferate to form micro-metastases. In line, we show that TGFBI produced from melanoma cells is critical for their proliferation, and their growth inhibition and defects in cell cycle progression were concomitant with drastic cell death. This finding suggests that the drastic decrease in cell proliferation observed *in vivo* is likely due to extensive cell death in the absence of secreted TGFBI. This indicates that even if melanoma cells lacking TGFBI have increased motility/invasion/extravasation, their establishment, survival, and growth within a new microenvironment, which is part of the overall metastatic process, is impaired.

If TGFBI produced from melanoma cells is functionally linked to their own growth and survival in distal metastases,

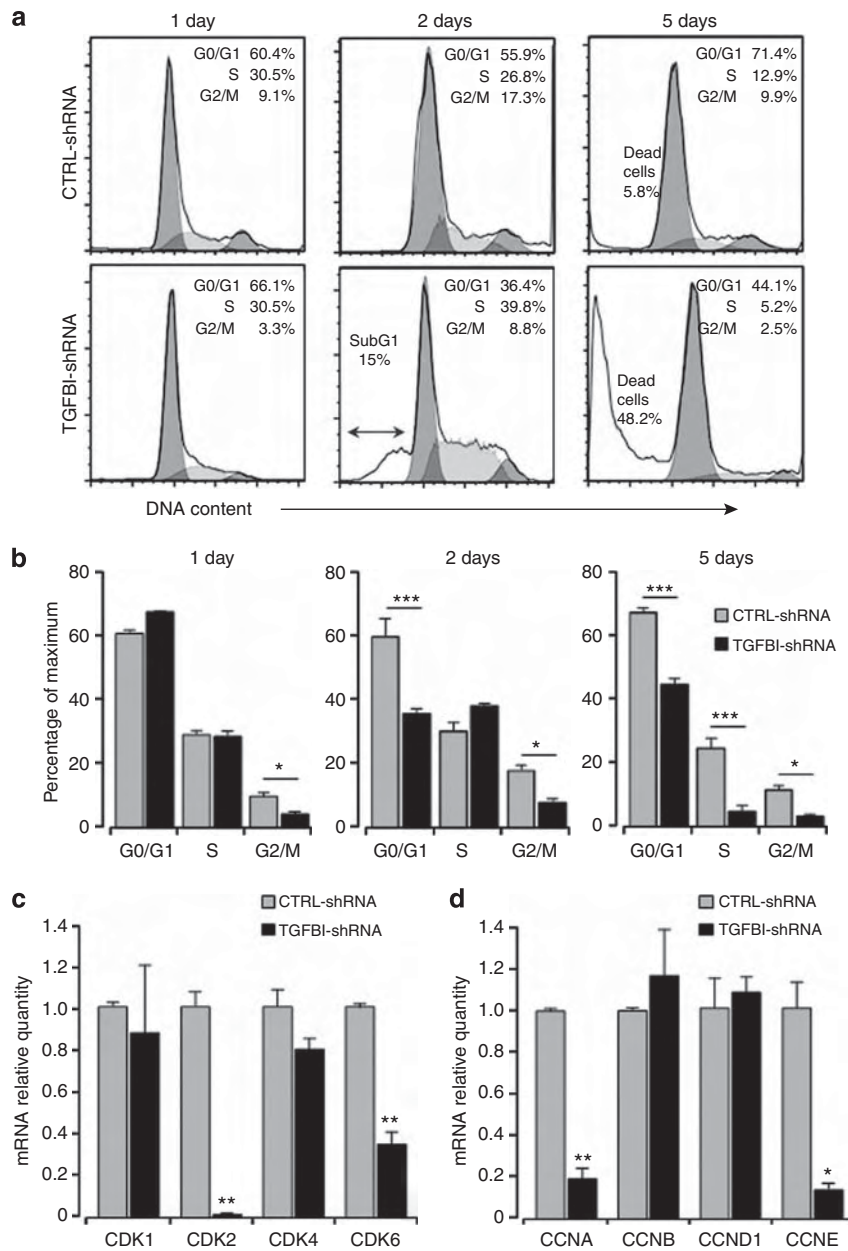


Figure 5. Transforming growth factor beta (TGFβ)-induced protein (TGFBI)-shRNA-1205Lu cells have defective cell cycle progression. (a) Cell cycle distribution of CTRL- and TGFBI-shRNA-1205Lu cells at indicated time points. The percentage of cells in each phase of the cycle is shown for each panel. Percentages of sub-G1 and dead cells are given. (b) Quantification given as percentage of maximum calculated from replicate experiments. (c and d) mRNA levels for cell cycle regulatory cyclin-dependent kinases (CDK1, 2, 4, and 6) (c) and cyclins (CCNA/B, D1, and E) (d) genes were determined for CTRL- and TGFBI-shRNA-1205Lu cells. Results from three independent experiments are expressed as mean values of relative mRNA quantity of each CDK or CCN against *RPL13* gene. Error bars are ± SEM. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ comparing TGFBI- with CTRL-shRNA-1205Lu cells.

how does it operate? Our rescue experiments in which shRNA effect was reversed by exogenous TGFBI in conditioned medium or recombinant TGFBI indicate that TGFBI released by melanoma cells, rather than an intracellular form, likely regulates their proliferation and survival. Actions of secreted TGFBI depend on interactions between other ECM proteins and specific integrins present in tumor microenvironment. Growth and survival of melanoma cells through integrins is regulated by the composition and the physical nature of the

ECM proteins (Petitclerc *et al.*, 1999; Henriet *et al.*, 2000). Beside tumor-derived proteases, tumor-secreted ECM proteins can also have critical roles in ECM modification/re-organization to promote growth and survival (Berking *et al.*, 2001; Botti *et al.*, 2012). Thus TGFBI upon its secretion by melanoma cells could also be an actor of ECM remodeling and re-organization providing a supporting scaffolding and a positive feedback stimulation of tumor growth/survival. This could be supported by the capacity of TGFBI to bind to several

ECM proteins, including collagens, fibronectin, proteoglycans, and periostin (Thapa *et al.*, 2007), and its localization within fibrillar fibronectin structures in melanoma tumors (Nummela *et al.*, 2012).

TGFB1 knockdown induced growth inhibition through defects in G1/S transition and S phase regulation by controlling the expression of CDK2 and CDK6 and their regulators CCNA and CCNE. Regulation of CCNs requires coordinated signaling from soluble factors and ECM/integrins. The signaling pathways activated upon TGFB1/integrins interactions are not yet fully determined, and we did not investigate the signaling pathways supported by TGFB1 in melanoma or the implicated integrin. However, as part of intracellular signaling, TGFB1 interaction with integrins supports actin stress fiber formation in adhering cells (Billings *et al.*, 2002), phosphorylation of AKT, extracellular signal-regulated kinase, focal adhesion kinase, and paxillin in U87 and vascular smooth cells (Kim *et al.*, 2003; Lee *et al.*, 2006), and activation of phosphatidylinositol 3'-kinase pathway in keratinocytes (Oh *et al.*, 2005).

TGFB1 was originally identified as a TGF β -inducible gene (Thapa *et al.*, 2007). As increased TGF β expression was correlated with melanoma progression and implicated in promoting aggressiveness and metastasis (Javelaud *et al.*, 2008), it is possible that TGFB1 acts among the effectors in mediating the prometastatic/metastatic activity of TGF β in these tumors. In breast cancer, a link between TGF β signaling, TGFB1 expression, and metastasis was proposed (Shipitsin *et al.*, 2007). In human melanomas, two populations with very distinct gene expression profiles were identified: neural crest and melanocytic differentiation phenotype and more aggressive phenotype displaying a TGF β signature (Hoek *et al.*, 2006; Hoek, 2007; Hoek *et al.*, 2008). TGF β has anti-proliferative effects on normal melanocytes, whereas melanoma cells display increased resistance to TGF β -dependent growth inhibition, proportional to tumor progression stage (Krasagakis *et al.*, 1998) and is probably highly specific to cell cycle progression (Rodeck *et al.*, 1999; Reed *et al.*, 2001; Poser *et al.*, 2005). Our results demonstrate that the lack of TGFB1 decreases the expression of CDK2 and CCNE, thus CDK2/CCNE complex, which binds to p21 inhibiting its activity and promoting cell cycle progression. Therefore, we propose the abundance of TGFB1 in metastatic melanoma among the mechanisms mediating the desensitization of aggressive melanoma cells to TGF β anti-proliferative effect and suggest a link between TGF β signaling, TGFB1 expression, and melanoma metastatic growth.

In summary, we describe a mechanism of melanoma metastatic outgrowth via promotion of growth/survival by TGFB1. The management of melanoma metastatic outgrowth remains a clinical challenge, and elevated secretion of TGFB1 could be used as a biomarker for indicating patients with progressing tumors. Although this warrant further investigations, TGFB1 being an ECM protein, peptides or antibodies that inhibit or limit its action might be among the strategies to control or limit melanoma metastases.

MATERIALS AND METHODS

Patient samples and melanoma cell cultures

Frozen human nevus ($n=6$), primary skin melanoma ($n=5$), and metastatic melanoma ($n=20$) specimens (Saint Louis Hospital, Dermatology Department, Paris, France) were used for RNA extraction. Paraffin blocks of human nevus ($n=9$), primary skin melanoma (5), and skin ($n=5$), lymph node ($n=5$), and liver ($n=5$) metastatic melanomas were obtained from the laboratory of anatomy and pathological cytology (Purpan Hospital, Toulouse, France). Specimens were collected, and the study was performed according to the guidelines of Hospitals institutional boards and Ethic Committees after written informed patients' consent, in accordance with the Helsinki Declaration. Human melanoma cell lines (gift from Alain Mauviel (Curie Institute, Orsay, France)) derived from tumor biopsies from patients with primary (WM983A and WM793) or metastatic (WM983B and 1205Lu) melanoma lesions (Alexaki *et al.*, 2010) were grown in DMEM/F-12 medium supplemented with 10% fetal calf serum (Invitrogen, Saint Aubin, France).

Stable TGFB1 silencing in 1205Lu human melanoma cells

Stably transduced cells were generated by lentiviral infection using pLKO.1-puro-CMV-TurboGFP plasmid (Sigma-Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France) encoding non-targeting shRNA (CTRL-shRNA, Sigma-Aldrich SHC002V) or shRNA targeting the coding sequence of TGFB1 (TGFB1-shRNA clone TRCN0000062174 and TRCN0000062175). RT-PCR and ELISA verified stable reduction of TGFB1 mRNA expression and TGFB1 secretion over time. Detailed procedures are described under Supplementary Information online.

Gene expression

Total mRNA was isolated using RNeasy kit (Qiagen, Valenica, CA) and reverse transcribed with Omniscript (Qiagen). cDNAs were then processed for RT-PCR using SYBR Green PCR kit (Applied Biosystems, Villebon-sur-Yvette, France). Gene-specific primers are summarized in Supplementary Table S1 online, and technical details are under Supplementary Information online.

Experimental metastasis in mice

Six to 8-week-old female nude mice (NMRI Nu/Nu) were injected into the retro-orbital venous sinus with 5×10^5 melanoma cells expressing CTRL-shRNA or TGFB1-shRNA as described (Galaup *et al.*, 2006). Mice were monitored twice a week to detect weakness, weight loss, or morbidity, and those losing >15% of their weight were euthanized. Spleen, lymph nodes, liver, lung, kidney, colon, ovary, and uterus were removed and processed for histopathological analysis as described (Chabot *et al.*, 2011). All animal experiments were performed in agreement with the European Union guidelines and approved by the local Ethic Committee (MP/02/37/06/08).

Histopathology and immunostaining

Formalin-fixed paraffin-embedded specimens of melanoma tissues were processed for hematoxylin/eosin staining or immunohistochemistry. Immunohistochemistry were performed with anti-TGFB1 (Proteintech, Manchester, UK) or anti-Ki67 (Thermo Scientific, Courtaboeuf, France) mAbs, revealed using the ABC-peroxidase kit (Vector Laboratories, Peterborough, UK), analyzed with a Leica DMR microscope (Leica Microsystems, Nanterre, France) at $\times 200$.

objective, and specific pixel intensities over field area were calculated in mm² using 3DHISTECH panoramic slide viewer (3DHISTECH Kft, Budapest, Hungary). Details are under Supplementary Information online.

Two-photon microscopy and second-harmonic generation

Lungs were removed, fixed in 3% formaldehyde, and tissues were mounted using surgical glue. Images were taken on a Zeiss inverted two-photon microscope ($\times 20$ water-immersion objective) (Carl Zeiss, Jena, Germany). Helical structures of collagen fibers were imaged using the second-harmonic generation structures. The appearance of lung metastases was followed using GFP. Z-stack images were collected over 250- μ m deep sections.

Proliferation, apoptosis, and cell cycle assays

CTRL- and TGFBI-shRNA-1205Lu cells were grown as indicated, and proliferation, apoptosis, and cell cycle were analyzed. Proliferation was evaluated using 5-bromo-2'-deoxy-uridine labeling and detection kit III (Roche, Boulogne-Billancourt, France) by absorbance measurement at 405 nm. Apoptosis was determined using 7-AAD and Annexin-V-phycoerythrin (BD Biosciences, Le Pont-de-Claix, France) staining and flow cytometry (FACS Canto II) analysis (BD Biosciences). Supernatant from CTRL-shRNA-1205Lu cultures was used to replace that of TGFBI-shRNA-1205Lu cultures in the presence or absence of an anti-TGFBI-blocking antibody (Proteintech). Cell cycle was analyzed on fixed cells and stained using propidium iodide supplemented with RNase A (Sigma-Aldrich). DNA contents were analyzed on a FACS Calibur cytometer (BD Biosciences). Percentages of cells in G0/G1, S, and G2/M phases were determined by Watson method using the FlowJo software (Celega, Olten, Switzerland).

Migration, matrigel invasion, and extravasation assays

CTRL- and TGFBI-shRNA-1205Lu cells were harvested, re-suspended in serum-free medium (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany) with or without soluble recombinant TGFBI (100 nM) (R&D Systems, Lille, France) and seeded at 5×10^4 cell on Transwell inserts coated or not with growth-factor reduced Matrigel (BD Bioscience). After 6 hours, migrating/invasive cells were fixed, stained, and counted under a light microscope. Extravasation assays were conducted following the above procedure but using fluoroblok transwell inserts coated with matrigel and human microvascular endothelial cells seeded at 5×10^4 cell/well, and DiO-labeled extravasating melanoma cells were directly counted using fluorescence microscopy. Details are under Supplementary Information online.

Adhesion assays

CTRL- and TGFBI-shRNA-1205Lu melanoma cells were harvested, re-suspended in serum-free medium with 0.1% BSA, seeded in a 96-well plate at 2.5×10^4 cell/well, and allowed to adhere for 1 hour. Cells were then fixed with 1% formaldehyde, stained with violet crystal, then lysed with 1% SDS, and absorbance at 600 nm using a microplate reader determined the relative adherence.

Statistical analyses

For TGFBI gene expression, migration/invasion/extravasation, and proliferation assays, we used the *t* test to calculate 95% confidence intervals on differences between median or mean and Mann-Whitney test to obtain *P* value. Data related to experimental metastasis in mice were

analyzed using two-way analysis of variance test. All statistical tests were two-sided. *P* < 0.05 was considered to be statistically significant.

CONFLICT OF INTEREST

The authors state no conflict of interest.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Drs Sebastien Jauliac (INSERM U944, Paris, France) and Talal Alsaati (INSERM US006) for discussions, Core Facilities—Imagery and Cytometry Department of the Institut Universitaire d'Hématologie (Paris, France), and imagery, cytometry, and histology of the Centre de Physiopathologie Toulouse Purpan (Toulouse, France). Work described in this article was supported in part by "HLA et Médecine" and INSERM grants for UMRS940 and the Ligue Régionale Midi-Pyrénées Contre le Cancer (NJ-F). LL and JS are supported by doctoral fellowships from the "Ministère de l'Éducation et de la Recherche" of France.

SUPPLEMENTARY MATERIAL

Supplementary material is linked to the online version of the paper at <http://www.nature.com/jid>

REFERENCES

- Ahmed AA, Mills AD, Ibrahim AE *et al.* (2007) The extracellular matrix protein TGFBI induces microtubule stabilization and sensitizes ovarian cancers to paclitaxel. *Cancer Cell* 12:514–27
- Alexaki VI, Javelaud D, Van Kempen LC *et al.* (2010) GLI2-mediated melanoma invasion and metastasis. *J Natl Cancer Inst* 102:1148–59
- Banerjee SS, Harris M (2000) Morphological and immunophenotypic variations in malignant melanoma. *Histopathology* 36:387–402
- Berking C, Takemoto R, Schaidler H *et al.* (2001) Transforming growth factor-beta1 increases survival of human melanoma through stroma remodeling. *Cancer Res* 61:8306–16
- Billings PC, Whitbeck JC, Adams CS *et al.* (2002) The transforming growth factor-beta-inducible matrix protein (beta)ig-h3 interacts with fibronectin. *J Biol Chem* 277:28003–9
- Botti G, Cerrone M, Scognamiglio G *et al.* (2012) Microenvironment and tumor progression of melanoma: New therapeutic perspectives. *J Immunotoxicol* 10:235–52
- Chabot S, Jabrane-Ferrat N, Bigot K *et al.* (2011) A novel antiangiogenic and vascular normalization therapy targeted against human CD160 receptor. *J Exp Med* 208:973–86
- Fidler IJ, Kripke ML (1977) Metastasis results from preexisting variant cells within a malignant tumor. *Science* 197:893–5
- Galaup A, Cazes A, Le Jan S *et al.* (2006) Angiopoietin-like 4 prevents metastasis through inhibition of vascular permeability and tumor cell motility and invasiveness. *Proc Natl Acad Sci USA* 103:18721–6
- Halaban R, Krauthammer M, Pelizzola M *et al.* (2009) Integrative analysis of epigenetic modulation in melanoma cell response to decitabine: clinical implications. *PLoS One* 4:e4563
- Haqq C, Nosrati M, Sudilovsky D *et al.* (2005) The gene expression signatures of melanoma progression. *Proc Natl Acad Sci USA* 102:6092–7
- Henriet P, Zhong ZD, Brooks PC *et al.* (2000) Contact with fibrillar collagen inhibits melanoma cell proliferation by up-regulating p27KIP1. *Proc Natl Acad Sci USA* 97:10026–31
- Hoek KS (2007) DNA microarray analyses of melanoma gene expression: a decade in the mines. *Pigment Cell Res* 20:466–84
- Hoek KS, Eichhoff OM, Schlegel NC *et al.* (2008) In vivo switching of human melanoma cells between proliferative and invasive states. *Cancer Res* 68:650–6
- Hoek KS, Schlegel NC, Brafford P *et al.* (2006) Metastatic potential of melanomas defined by specific gene expression profiles with no BRAF signature. *Pigment Cell Res* 19:290–302
- Javelaud D, Alexaki VI, Mauviel A (2008) Transforming growth factor-beta in cutaneous melanoma. *Pigment Cell Melanoma Res* 21:123–32

- Kaiser MF, Johnson DC, Wu P *et al.* (2013) Global methylation analysis identifies prognostically important epigenetically inactivated tumor suppressor genes in multiple myeloma. *Blood* 122:219–26
- Kang S, Dong SM, Park NH (2010) Frequent promoter hypermethylation of TGFBI in epithelial ovarian cancer. *Gynecol Oncol* 118:58–63
- Kim MO, Yun SJ, Kim IS *et al.* (2003) Transforming growth factor-beta-inducible gene-h3 (betaig-h3) promotes cell adhesion of human astrocytoma cells in vitro: implication of alpha6beta4 integrin. *Neurosci Lett* 336:93–6
- Krasagakis K, Tholke D, Farthmann B *et al.* (1998) Elevated plasma levels of transforming growth factor (TGF)-beta1 and TGF-beta2 in patients with disseminated malignant melanoma. *Br J Cancer* 77:1492–4
- Lee BH, Bae JS, Park RW *et al.* (2006) Betaig-h3 triggers signaling pathways mediating adhesion and migration of vascular smooth muscle cells through alphavbeta5 integrin. *Exp Mol Med* 38:153–61
- Lin B, Madan A, Yoon JG *et al.* (2010) Massively parallel signature sequencing and bioinformatics analysis identifies up-regulation of TGFBI and SOX4 in human glioblastoma. *PLoS One* 5:e10210
- Ma C, Rong Y, Radloff DR *et al.* (2008) Extracellular matrix protein betaig-h3/TGFBI promotes metastasis of colon cancer by enhancing cell extravasation. *Genes Dev* 22:308–21
- Ma J, Cui W, He SM *et al.* (2012) Human U87 astrocytoma cell invasion induced by interaction of betaig-h3 with integrin alpha5beta1 involves calpain-2. *PLoS One* 7:e37297
- Nummela P, Lammi J, Soikkeli J *et al.* (2012) Transforming growth factor beta-induced (TGFBI) is an anti-adhesive protein regulating the invasive growth of melanoma cells. *Am J Pathol* 180:1663–74
- Oh JE, Kook JK, Min BM (2005) Beta ig-h3 induces keratinocyte differentiation via modulation of involucrin and transglutaminase expression through the integrin alpha3beta1 and the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt signaling pathway. *J Biol Chem* 280:21629–37
- Petitclerc E, Stromblad S, von Schalscha TL *et al.* (1999) Integrin alpha(v)beta3 promotes M21 melanoma growth in human skin by regulating tumor cell survival. *Cancer Res* 59:2724–30
- Poser I, Rothhammer T, Dooley S *et al.* (2005) Characterization of Sno expression in malignant melanoma. *Int J Oncol* 26:1411–7
- Ramgolam K, Lauriol J, Lalou C *et al.* (2011) Melanoma spheroids grown under neural crest cell conditions are highly plastic migratory/invasive tumor cells endowed with immunomodulator function. *PLoS One* 6:e18784
- Reed JA, Bales E, Xu W *et al.* (2001) Cytoplasmic localization of the oncogenic protein Ski in human cutaneous melanomas in vivo: functional implications for transforming growth factor beta signaling. *Cancer Res* 61:8074–8
- Rodeck U, Nishiyama T, Mauviel A (1999) Independent regulation of growth and SMAD-mediated transcription by transforming growth factor beta in human melanoma cells. *Cancer Res* 59:547–50
- Sasaki H, Kobayashi Y, Nakashima Y *et al.* (2002) Beta IGH3, a TGF-beta inducible gene, is overexpressed in lung cancer. *Jpn J Clin Oncol* 32:85–9
- Shipitsin M, Campbell LL, Argani P *et al.* (2007) Molecular definition of breast tumor heterogeneity. *Cancer Cell* 11:259–73
- Spano D, Heck C, De Antonellis P *et al.* (2012) Molecular networks that regulate cancer metastasis. *Semin Cancer Biol* 22:234–49
- Thapa N, Lee BH, Kim IS (2007) TGFBI/betaig-h3 protein: a versatile matrix molecule induced by TGF-beta. *Int J Biochem Cell Biol* 39:2183–94
- Turtoi A, Musmeci D, Wang Y *et al.* (2011) Identification of novel accessible proteins bearing diagnostic and therapeutic potential in human pancreatic ductal adenocarcinoma. *J Proteome Res* 10:4302–13
- Ween MP, Lokman NA, Hoffmann P *et al.* (2011) Transforming growth factor-beta-induced protein secreted by peritoneal cells increases the metastatic potential of ovarian cancer cells. *Int J Cancer* 128:1570–84
- Ween MP, Oehler MK, Ricciardelli C (2012) Transforming growth factor-beta-induced protein (TGFBI)/(betaig-H3): a matrix protein with dual functions in ovarian cancer. *Int J Mol Sci* 13:10461–77
- Wong GS, Rustgi AK (2013) Matricellular proteins: priming the tumour microenvironment for cancer development and metastasis. *Br J Cancer* 108:755–61

Annexe 2:

NK cell crosstalk safely with allogeneic human cardiac-derived stem/progenitor cells

Wahid Boukouaci*, Laura Lauden*, **Johan Siewiera**, Noemie Dam, Rachid-Hocine Hocine, Zena Khaznadar¹, Ryad Tamouza¹, Luis R. Borlado, Dominique Charron, Nabila Jabrane-Ferrat, and Reem Al-Daccak

Cardiovascular Research *En revision*

Natural Killer cell crosstalk with allogeneic human cardiac-derived stem/progenitor cells controls persistence

Wahid Boukouaci^{1*}, Laura Laudén^{1*}, Johan Siewiera², Noemie Dam^{1,3}, Rachid-Hocine Hocine¹, Zena Khaznadar¹, Ryad Tamouza¹, Luis R. Borlado³, Dominique Charron¹, Nabila Jabrane-Ferrat², and Reem Al-Daccak^{1#}

1. Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM) UMRS940, Institut Universitaire d'Hématologie, Université Paris-Diderot and Laboratoire d'Immunologie et d'Histocompatibilité, Hôpital Saint Louis, CIB-HOG, AP-HP, Paris, France, 2. INSERM UMR 1043 and CNRS UMR 5282, University Toulouse III Paul Sabatier, Toulouse, France and 3. Coretherapix S.L. Madrid, Spain.

Short title: Allogeneic hCPC/NK cell crosstalk

*W.B. and L.L. contributed equally to the work

Corresponding Author:

Reem Al-Daccak, PhD

UMRS U940, Hôpital Saint Louis, Batiment bazin

1 Avenue Claude Vellefaux, 75010 Paris, France

Tel: +33-1-53722063; Fax: +33-1-53722051 e-mail: reem.al-daccak@inserm.fr

Abstract

Aims: Allogeneic human cardiac-derived stem/progenitor cells (hCPC) are promising candidates for cardiac repair. They interact with T cells, major effectors of the adaptive immune response, inducing “paracrine” anti-inflammatory effects that could sustain tissue repair/regeneration. Yet, to get through successful clinical translation their expected persistence upon administration to injured myocardium is to be evaluated. Natural killer (NK) cells are major effectors of the innate immune system that might influence the persistence of therapeutic stem/progenitor cells. Therefore, to anticipate the allogeneic hCPC persistence we defined their potential crosstalk with NK cells under steady state and inflammatory conditions.

Methods and Results: By using an experimental model of allogeneic hCPC/NK cell interaction, we demonstrate that hCPC moderately trigger cytokine-activated, but not resting, NK cell killing that occurs through formation of lytic immunological synapse and NK cell natural cytotoxicity. Yet, inflammatory context substantially decreases their capacity to set cytokine-activated NK cell functions toward NK cell cytotoxicity and protects hCPC from NK cell killing. Allogeneic hCPC also restrain NK cell cytotoxicity against conventional targets and inflammatory cytokine secretion biasing the latter toward anti-inflammatory cytokines. Thus, hCPC are unprivileged targets for allogeneic NK cells and can restrain NK cell functions in allogeneic settings.

Conclusions: Collectively, our data suggest that allogeneic hCPC/innate NK cells crosstalk would prolong their retention within injured inflamed myocardium and might contribute to attenuating inflammation and to preventing adverse cardiac remodeling.

Key words: human cardiac stem/progenitor cells; myocardial infarction; allogenicity; NK cells

1. Introduction

Cardiac stem/progenitor cells are intensively investigated as promising therapeutics to incurable heart failure (HF) post-myocardial infarction (MI)¹⁻³. Pre-clinical studies with allogeneic cardiosphere-derived cells⁴ and cardiospheres⁵ showed the efficiency of these cells in attenuating left ventricular remodeling and improved ventricular function in the settings of post-MI HF, without eliciting deleterious immune reactions. This has made the use of these cells a pragmatic proposition for cardiac repair. Our recent immunological studies of human cardiac-derived progenitor cells (hCPC) reinforced this notion³.

The c-kit-immunoselected hCPC³ present a population of cardiac-derived progenitor cells with a mixed stem-cell phenotype³. They express the pluripotency transcription factors OCT4, SOX2, and NANOG, are negative for hematopoietic CD34 and CD45, and endothelial CD133 markers, display low levels of c-Kit (2-5%), but express SSEA-1, SSEA-4, CD90, CD73, CD105, and CD166 stem/progenitor markers and the cardiac lineage commitment factors Nkx2.5, GATA-4, Islet-1, and MEF2C³. Injection of these cells in experimental animal models demonstrated their potential to promote cardiac repair/regeneration³. In a recognized pre-transplantation experimental model of allogeneic grafts, hCPC trigger activation and expansion of regulatory T cells rather than inflammatory Th1/Th2 cells, promoting a contact-dependent allogeneic-driven immunomodulation³. Thus, the inherent immune features of hCPC shift their capacities toward the delivery of signals that would promote the development and maintenance of functional anti-inflammatory, rather than deleterious, adaptive immune response, as well as their eventual translation.

MI causes inflammation typified by recruitment and activation of the adaptive but also the innate immune cells¹³. Allogeneic immune reactions were believed to be only an adaptive immune T cell-mediated event that determines the outcome of organ or cell transplantation. Yet, the complexity in reaching allogeneic transplant tolerance stressed the importance of Natural killer (NK) cells, the major effectors of the innate immune system, in allogeneic transplantation⁶. In animal models, steady state NK cells are sufficient to kill allogeneic cells in the absence of adaptive immunity⁷. In humans, NK cells are involved in antibody-mediated graft rejection⁸ but alloreactive NK cells might also control leukemia relapse and eliminate rejection of hematopoietic transplants^{9,10}. Therefore, besides T cell-mediated events, understanding the crosstalk between allogeneic cardiac-derived stem/progenitor cells and NK cells is important for rational therapies to HF post-MI.

NK cells use an array of activating and inhibitory receptors to sense their environment and respond. No single NK activating receptor dominates; instead synergistic signals from combinations of receptors are integrated to activate NK cell functions, cytotoxicity and cytokine secretion¹¹. The NK cell inhibitory receptors are specific for Major Histocompatibility Complex class I (MHC I) molecules (Human Leukocyte Antigens class I (HLA I)), and their engagement during NK cell development is necessary for the maintenance of self-tolerance¹¹. In allogeneic transplant models alloreactive NK cells are fully responsive (functional) and the net balance of signals emanating from their activating and inhibitory receptors would determine the outcome of their effector functions. In addition, a large panel of cytokines regulates NK cell effector functions. Inflammatory IL2, IL12, IL15 and IL18 cytokines promote their cytotoxicity and cytokine secretion whereas TGF β and IL10 down-regulate these effector functions¹².

Thus toward rational hCPC therapeutics, we thoroughly investigated the interaction of allogeneic hCPC with NK cells. We found that hCPC, are modestly susceptible for allogeneic NK cells natural cytotoxicity and are significantly protected from this cytotoxicity within an inflammatory context. hCPC also down-regulate NK cells cytotoxicity against conventional targets and bias their cytokine secretion function toward anti-inflammatory cytokines, in particular IL10, instead of IFN and TNF inflammatory cytokines. Together our data suggest that the hCPC crosstalk with NK cells in allogeneic settings would prolong hCPC retention within an injured heart and as such might contribute to their therapeutic efficiency.

2. Methods

Refer to Supplementary Material online for detailed experimental methods.

2.1. Experimental model: Clinical settings for cardiac repair would administrate human cardiac stem/progenitor cells (hCPC) in a post-MI inflammatory context. The oxygen concentration of the *in vivo* microenvironment of stem cells is known to be low (1-7% depending on the tissue). To mimic, we cultured and expanded hCPC, and set up our experimental model at low oxygen tension operative *in vivo* (3% O₂), under steady-state and inflammatory conditions as we described³. NK cells were isolated from peripheral blood mononuclear cells (PBMC) using immunomagnetic beads and were stimulated with recombinant human inflammatory cytokines (rhIL2, rhIL15 or rhIL12/rhIL18) in RPMI-10% fetal bovine serum (FBS) medium. All cells were genotyped for HLA (Online Table S1). The project has been approved by the ethical committees of “Hospital 12 de Octubre” and “Fundacion Jimenez Diaz”, Madrid – Spain, and “Saint Louis Hospital”, Paris – France, and the study was performed conform to the declaration of Helsinki. All experiments were conducted with both freshly-isolated and cytokine-activated NK cells and hCPC and IFN γ -treated hCPC (IFN γ -hCPC) as target cells, IFN γ being a major inflammatory cytokine impacting cell immunogenicity without affecting the stem/progenitor properties³ and recognized model of inflammation.

2.2. NK cells cytotoxicity: Specific lysis of target cells was evaluated by CFSE/7AAD staining and calculated according to: $100 \times [(observed\ lysis - spontaneous\ lysis) / (100 - spontaneous\ lysis)]^{14}$.

2.3. NK cells degranulation: The expression of CD107a (Online Table S2) was analyzed on CD3⁺CD56⁺ NK cells, cultured alone or in the presence of different target cells by flow cytometry.

2.4. Conjugates detection: CFSE-labeled NK cells were mixed with CMRA-labeled-hCPC or CMRA-labeled-IFN γ -hCPC and the number of CFSE/CMRA double positive events in CFSE-positive NK cells was determined by flow cytometry.

2.5. Immunologic synapse: NK cells were incubated with hCPC or IFN γ -hCPC and stained with mouse anti-perforin (Online Table S2) and phalloidin-Alexa568 (to detect actin). Images of immunological synapse were acquired by Axiovert 200 microscope. Synapses were considered polarized when the perforin and actin network of NK cells were oriented toward hCPC.

2.6. NK and hCPC phenotyping: Expression of NK cell activating and inhibitory receptors and their ligands on hCPC, was analyzed by flow cytometry using specific antibodies (Online Table S2), and is presented as percentage of positive cells and geometric mean of fluorescence intensity (MFI).

2.7. Immunomodulation assays: NK cells were cultured alone or in the presence of hCPC or IFN γ -hCPC then re-cultured with conventional targets and their degranulation and cytotoxicity were determined. For effect of hCPC or IFN γ -hCPC on cytokine-induced NK cell proliferation, CFSE-labeled NK cells were stimulated with cytokines in the absence or presence of hCPC or IFN γ -hCPC, and their proliferation was estimated by the decrease of CFSE staining on CD3⁺CD56⁺ NK cells.

2.8. Cytokine assays: The level of cytokines was measured in the supernatants of cultures by ELISA specific kits or premixed Multiplex kits.

2.9. Statistical analyses: Statistical analyses were performed using the GraphPad InStat3 software. Statistical significance (p-values) was calculated using One-Way Analysis of Variance (ANOVA)-Student Newman Keuls Multiple Comparisons Test. A p-value < 0.05 was considered statistically significant.

3. Results

3.1. hCPC display moderate susceptibility to allogeneic cytokine-activated NK cells

We investigated the susceptibility of hCPC to NK cell-mediated killing under steady-state and inflammatory conditions. hCPC and IFN γ -hCPC were co-cultured in allogeneic settings with freshly-isolated or IL15-activated NK cells and their cytotoxicity was measured. The reference cell lines for NK cells susceptibility and resistance, HLA I-negative NK-sensitive leukemic cell line K562 and highly HLA I-positive NK-resistant B-cell lymphoma Raji cells were used as positive and negative control targets, respectively. Allogeneic freshly-isolated NK cells neither killed hCPC nor IFN γ -hCPC nor Raji cells but did kill K562 cells (Figure 1A, left panel). However, when hCPC were cultured with IL15-activated NK cells they were killed although to significantly lesser extent than conventional NK cell target ($p < 0.001$). Specific lysis of hCPC was almost 50% compared to 95% for K562 cells at the highest effector:target ratio of 10:1 (Figure 1A, right panel). Remarkably, the IL15-activated NK cell killing toward IFN γ -hCPC was decreased by 50% compared to hCPC (Figure 1A, right panel) ($p < 0.001$). Blocking TRAIL and/or FasL in co-cultures of hCPC with activated-NK cells did not reduce the cytotoxicity of these cells toward hCPC and had negligible effect on the cytotoxicity against IFN γ -hCPC (data not shown). This signifies that lysis of hCPC is independent of the death receptors pathway and it probably occurs through NK cell-based natural cytotoxicity and release of cytolytic granules. This pathway is reflected by the membrane expression of NK degranulation marker CD107a on effector NK cells¹⁵. In our settings, we found that 4.5% of freshly-isolated NK cells and nearly 40% of IL15-activated NK express CD107a upon their recognition of hCPC. Only 2.5% of freshly-isolated NK cells and 19.5% of IL15-activated NK cells express CD107a upon recognition of IFN γ -hCPC (Figure 1B). Prolonged co-cultures increased neither the freshly-isolated nor IL15-activated NK cell-mediated hCPC nor IFN γ -hCPC killing (Online Figure S1). Similar results were obtained with IL2- or IL12/IL18-activated NK cells (Online Figure S2). Thus, although to a much lesser extent than conventional NK cell target, allogeneic NK cells when activated by inflammatory cytokines can kill hCPC yet IFN γ significantly protects ($p < 0.001$) stem/progenitor cells from this killing.

3.2. hCPC are more potent than IFN γ -hCPC to set the function of NK cells toward killing

NK cell recognition of target cells and conjugate formation leads to lytic immunological synapse formation (IS). At the IS, cortical filamentous actin remodeling and microtubule-organizing center (MTOC) polarization allow perforin-containing lytic granules traffic to the plasma membrane¹⁶. To expand the above findings and provide insights into the mechanisms of NK cells-mediated killing of hCPC, we investigated conjugates and IS formation upon interaction of hCPC and IFN γ -hCPC with allogeneic freshly-isolated or IL15-activated NK cells.

CFSE-labeled freshly-isolated and IL15-activated allogeneic NK cells were co-cultured with CMRA-labeled hCPC or IFN γ -hCPC, and the formation of conjugates (double-positive events) was evaluated as a primer indicator of IS formation. Nearly 20% of freshly-isolated NK cells formed conjugates with both hCPC and IFN γ -hCPC. Up to 40% of IL15-activated NK cells were able to interact with hCPC but only 21% of activated NK cells interacted with IFN γ -hCPC (Figure 2A). Conjugates formation can result in either cytolytic (polarized synapse) or neutral (non-polarized) events. Therefore, we then determined the percentage of polarized synapses for each interaction. Using fluorescent microscopy, we monitored F-actin remodeling (Figure 2B, left panel) or MTOC polarization (Online Figure S3) and orientation of perforin containing granules. Nearly 50% of conjugates formed with hCPC and either resting or IL15-activated NK cells were polarized while only 30% of conjugates formed with IFN γ -hCPC were polarized (Figure 2B right panel). Thus, cytokine-activated NK cells are significantly more prone to form IS with hCPC than freshly-isolated NK cells ($p < 0.001$). However, both resting and activated NK cells have the same capacity to polarize their cytolytic granules to the IS while they have significantly lower capacity to form IS with IFN γ -hCPC ($p < 0.01$).

These results demonstrate that hCPC have higher capacity than IFN γ -hCPC to set the function of allogeneic cytokine-activated NK cells toward killing, and suggest that inflammatory context although may well activate NK cells favoring their recognition and killing of hCPC, it would mutually provide protection.

3.3. HLA I protects IFN γ -hCPC from NK cell-mediated killing

NK cell-based natural cytotoxicity is dependent on the net balance between activating and inhibitory signals they receive from target cells. The expression level of ligands for both activating and inhibitory receptors also manages NK cell responsiveness. Treatment of hCPC with IFN γ does not significantly alter the expression of NK cell-activating receptor ligands (Online Figure S4), but significantly increases HLA I (HLA-A, B, C) and non-classical HLA-E molecules, which are ligands for killer-cell immunoglobulin-like receptors (KIRs) and the NKG2A inhibitory NK cell receptor, respectively (Figure 3A). The non-classical HLA-G, which is also a ligand for KIRs, was neither expressed by hCPC nor induced on IFN γ -hCPC (Figure 3A). Therefore, we investigated whether neutralization of HLA I or HLA-E would increase NK cell specific lysis. Neutralizing HLA I, but not HLA-E, with specific blocking antibodies significantly increased IL15-activated NK cell cytotoxicity (2 fold-increase ($p < 0.01$)) against IFN γ -hCPC but did not affect hCPC specific lysis (Figure 3B). Thus, the increase of HLA I expression by hCPC under inflammatory conditions is one mechanism responsible for shifting the balance of signals received by NK cells from hCPC toward inhibition.

3.4. hCPC impair NK cell cytotoxic activity and inflammatory cytokine-induced proliferation

NK cells contribute to Post-MI inflammation and we have demonstrated that hCPC have the capacity to down-modulate inflammatory adaptive T cell response³. Therefore, we investigated whether hCPC can also modulate NK cell lytic activity toward conventional targets. IL15-activated NK cells were cultured with hCPC or IFN γ -hCPC then their degranulation was tested against leukemic HLA-negative K562 and HLA-positive THP-1 targets. Upon their interaction with K562 cells, IL15-activated NK cells primed with hCPC or IFN γ -hCPC showed significantly lower cytolytic degranulation compared to unprimed cells cultured in medium alone (Figure 4A, upper panel). In average 30% and 38% of IL15-activated NK cells primed with hCPC- or IFN γ -hCPC, respectively, expressed CD107a versus 70% for unprimed cells ($p < 0.001$) (Figure 4A, lower panel). The priming effect was contact-dependent since no difference in the degranulation was observed when the experiment was performed in Transwell settings (Figure 4A). IFN γ -hCPC were less potent than hCPC in down-regulating the lytic potential of IL15-activated NK cells ($p < 0.01$), which is in line with lower capacity to form functional IS with cytokine-activated NK cells compared to hCPC (Figure 2). IL15-activated NK cells primed with hCPC or IFN γ -hCPC compared to unprimed cells also displayed decreased cytotoxicity. hCPC- or IFN γ -hCPC-primed IL15-activated NK cells resulted in 35% cytotoxicity toward K562 cells compared to 85% for unprimed cells (Online Figure S5A) and release of granzyme A and B by primed IL15-activated NK cells was significantly less than of unprimed cells (Online Figure S5B). hCPC priming have similar inhibitory effect on freshly-isolated NK cells or IL-2 or IL-12/IL-18-activated NK cells (data not shown). In a similar fashion, priming of NK cells results in strong inhibition of THP-1 cells killing (Online Figure S5C).

In inflammatory environment, NK cell proliferation can be induced by various inflammatory cytokines. We asked the question whether the presence of hCPC or IFN γ -hCPC would affect cytokine-induced proliferation of NK cells. Freshly-isolated NK cells were stimulated with IL15 in the presence or absence of allogeneic hCPC or IFN γ -hCPC then their proliferation was evaluated. The presence of both hCPC and IFN γ -hCPC significantly inhibited the IL15-induced proliferation (by 30% and 42%, respectively) ($p < 0.01$ and < 0.001 , respectively) (Figure 4B). Although the difference did not reach significance, IFN γ -hCPC were more prone than hCPC to modulate IL15-induced NK cell proliferation. The reduced proliferation of NK cells was not due to cell death since both hCPC and IFN γ -hCPC NK cells showed significantly lower cell death than cells cultured in medium alone (Online Figure S6A). hCPC and IFN γ -hCPC also decreased IL2- and IL12/IL18-induced allogeneic NK cells proliferation (Online Figure S6B).

Thus, hCPC have the capacity to impair not only the cytotoxic activity of allogeneic NK cells but also their cytokine-induced proliferation, which is further strengthened by inflammatory conditions.

3.5. Interaction of allogeneic NK cells with hCPC down-modulates expression of their activating receptors

Given that NK cell activities are modulated by hCPC, we investigated whether interaction of hCPC or IFN γ -hCPC with allogeneic NK cells could affect the surface expression of NK cell activating and/or inhibitory receptors that govern their activities¹¹.

Freshly-isolated or IL15-activated NK cells were cultured alone or in the presence of hCPC or IFN γ -hCPC and their expression levels of activating (NKp30, 44, and 46, NKG2D, DNAM-1) and inhibitory (KIRs, NKG2A) receptors as well as the activation marker CD69 were determined. Both resting and activated NK cells expressed the activating and inhibitory receptors. IL15-activated NK cells showed increased expression of CD69 activation marker and NKG2D, DNAM-1, and NKp44 activating receptors. Only minor changes were observed for NKp30 and NKp46 activating receptors or KIRs and NKG2A inhibitory receptors (Online Figure S7A&B). When co-cultured with hCPC or IFN γ -hCPC in allogeneic settings, IL15-activated NK cells displayed overall decreased expression levels of NK cell activating receptors and CD69 activation marker (Figure 5A) but no changes were observed for KIRs and NKG2A inhibitory receptors (Online Figure S7C). Relative geometric mean of fluorescence intensity of surface expression from different donors (n=10) shows that co-culture of IL15-activated NK cells with hCPC and IFN γ -hCPC induced significant decreases in the expression levels of NKp44, NKp46, and NKG2D activating receptors as well as CD69 activation marker ($p < 0.0001$, $p < 0.05$, $p < 0.001$, and $p < 0.001$, respectively) (Figure 5B). Similar effects were observed for NKp30 and DNAM-1 activating receptors without reaching significance (Figure 5B). IFN γ -hCPC did not induce any further down-regulation of these receptors compared to hCPC. Similar results were obtained with freshly-isolated NK cells co-cultures (data not shown).

These results indicate that hCPC whether under inflammatory conditions or not down-regulate the expression of NK cell activating receptors on the surface of NK cells without affecting the levels of inhibitory receptors. This might provide, at least partly, a molecular base for their capacity to down-regulate NK cell activity.

3.6. NK cells produce IL-10 rather than IFN γ or TNF α upon their interaction with hCPC or IFN γ -hCPC

NK cells produce a plethora of pro-inflammatory type I (IFN γ , TNF α) and anti-inflammatory/regulatory type II (IL4, IL5, IL13, IL10) cytokines therefore, we investigated the cytokines secreted by NK cells upon their interaction with hCPC and IFN γ -hCPC in allogeneic settings.

hCPC and IFN γ -hCPC induced significant increase in IL15-activated NK cell secretion of IFN γ ($p < 0.001$) but did not significantly increase the production of TNF α (Figure 6A). The interaction of hCPC with allogeneic IL15-activated NK also led to significant secretion of IL13 and IL10 ($p < 0.05$) (Figure 6B) but no effects were observed for IL4 or IL5 (data not shown). Compared to K562 cells, hCPC and IFN γ -hCPC triggered significantly lower levels of type I proinflammatory cytokines while they induced significantly higher amounts of type II anti-inflammatory cytokines ($p < 0.001$). Interestingly, IFN γ -hCPC compared to hCPC triggered significantly lower secretion of IFN γ and TNF α but significantly higher secretion of IL10 by allogeneic activated NK cells ($p < 0.01$ and $p < 0.05$, respectively). Again both IL10/TNF α and IL10/IFN γ ratios were higher in supernatants from IFN γ -hCPC co-cultures compared to hCPC ($p < 0.001$ and $p < 0.01$, respectively) (Figure 6C). The level of all analyzed cytokines was higher in supernatants from long-term hCPC or IFN γ -hCPC co-cultures, but again the levels of type I cytokines were lower while those of type II cytokines were much higher leading to higher ratios of IL-10/IFN γ or IL10/TNF α as compared to K562 cells co-cultures or to IL15-activated NK cells cultured alone (Online Figure S8). Of note, neither the hCPC nor the IFN γ -hCPC produced any of the tested cytokines at either time period (data not shown).

We next analyzed whether priming of NK cells with hCPC and IFN γ -hCPC could modulate their cytokine secretion as it did for their cytotoxicity against conventional targets. When co-cultured with K562 target, IL15-activated NK cells primed with hCPC or IFN γ -hCPC secrete less IFN γ and TNF α compared to non-primed NK cells ($p < 0.001$ and < 0.01 , respectively) (Figure 6D). Again, IFN γ -hCPC were less potent in decreasing NK cell cytokine secretion ($p < 0.01$). Furthermore, priming of freshly-isolated NK cells with hCPC or IFN γ -hCPC also decreased their capacity to secrete IFN γ and TNF α upon recognition of K562 (data not shown).

Together, these results indicate that the interaction of allogeneic NK cells with hCPC not only bias their cytokine secretion toward anti-inflammatory/regulatory type II cytokine, which may well be accentuated within an inflammatory context, but also down-modulates their capacity to secrete inflammatory cytokines.

4. Discussion

Recent advances in allogeneic cardiac stem/progenitor cells pointed them as promising candidates for cardiac repair^{3, 5}. Yet, to boost up the potential of clinical translation, we examined the interaction of allogeneic hCPC with innate immune NK cells using a recognized pre-transplantation *in vitro* model of allogeneic reactions. Our data demonstrate that the interaction of hCPC with NK cells in allogeneic settings would prolong their retention within injured heart rather than provoking their immediate elimination, which similar to their interactions with CD4⁺ T cells³, would contribute to their therapeutic efficiency but also to attenuating inflammation through modulation of inflammatory immune response.

Despite their expression of various ligands for NK cell activating receptors, in allogeneic context hCPC do not incite elevated NK cell cytotoxicity even when NK cells are cytokine-activated. hCPC are resistant to freshly-isolated resting NK cell lysis and they trigger modest degranulation and cytotoxicity of inflammatory cytokine-activated NK cells, which express higher levels of activating receptors compared to resting NK cells. Lysis occurs when combination of activation signals overcomes inhibitory signals provided by ligands on target cells. MHC I molecules are cellular ligands for NK cell inhibitory KIRs receptors^{11, 17}. The susceptibility of target cells to NK cell killing is often related to the degree of HLA I expression and in particular to the interactions between KIRs and the HLA-C1 and HLA-C2, two mutually exclusive HLA-C allotypes¹⁷. Since both HLA-C and KIR encoding genes are highly polymorphic, interaction between KIR and HLA-C is sensitive to single amino acid substitution that can change epitope specificity or eliminate recognition of HLA-C¹⁷. Our panel of hCPC (n=5) express substantial level of MHC I molecules and both HLA-C allotypes, except for one being homozygote for C2. Thus, lack of hCPC susceptibility to resting NK-mediated lysis could be attributed to the expression of inhibitory KIRs ligands, which upon their ligation to their receptors induce inhibitory signals in NK effectors. Although we did not observe significant differences in the susceptibility to NK cell killing of homozygote C2/C2-hCPC compared to C1/C2 heterozygotes, caution should be taken concerning HLA-C allotype of banked hCPC. The modest susceptibility of hCPC to lysis by cytokine-activated NK cells, in addition to higher expression levels of activating receptors by these cells, implies that activating NK cell receptor ligands are also present on hCPC at sufficient levels to overcome inhibitory signals resulting from hCPC-HLA I/NK-KIR interactions.

In vivo, NK cells are exposed to combinations of cytokines that influence their maturation, phenotype, and effector functions¹². In allograft rejection models, IL15-activated NK cells are potent alloreactive cells that mediate acute rejection of skin allograft and allogeneic cells engraftment in the absence of any adaptive immune cells⁷. This denotes that the cytokine milieu present during MI inflammation, which includes various activating cytokines including IL15, is likely to influence NK cell responsiveness and hCPC susceptibility to lysis *in situ*^{13, 18}. However, the microenvironment of injured myocardium also contains IFN γ and TNF α as well as growth factors, which are all recognized potent inducers of HLA I molecules. We demonstrated that treatment of hCPC with IFN γ endorses their protection from NK cell cytotoxicity. This was mainly due to increasing their HLA I cell surface expression but not that of ligands for activating NK receptors. This increase probably counterbalanced, at least partially, the higher expression of activating NK cell receptors within inflammatory environment. In support, IFN γ -induced expression of MHC I on embryonic stem cells (ESC)-derived progenitor cells is associated with attenuated host NK cell attack, enhanced graft survival, and further differentiation of transplanted cells¹⁹. This strongly suggests that upon their administration *in vivo* and despite the possible attack by cytokine-activated NK cells, hCPC would be protected by the inflammatory MI microenvironment, and would likely persists for a period of time sufficient to exert their beneficial reparative activities.

NK cell killing of hCPC occurs essentially through natural cytotoxicity and involves the perforin/granzyme pathway, which is in line with the expression of most of the activating NK cell receptor ligands by hCPC. The formation of polarized immunological synapse further confirms this pathway as a dominant mechanism in NK cell cytotoxicity toward hCPC. IFN γ -hCPC formed less conjugates with NK cells, which resulted in fewer functional immune synapses correlating with the inhibitory effect of HLA I increase. This further confirms the protection of hCPC that is provided by the MI inflammatory microenvironment. NK cell-mediated killing of multipotent fetal mesenchymal stem cells involves TRAIL receptor pathway²⁰. Lysis of hCPC was independent of death receptors

(Fas and TRAIL) pathway. This could be due at least in part to the inherent resistance of hCPC to TRAIL-induced and Fas-mediated cell death and their modest sensitization to these death receptor pathways by IFN γ (data not shown). Multipotent cells are more likely early precursors to hCPC, and TRAIL/FasL have developmental roles that are consistent with these differences. In this study, we did not identify activating NK cell receptor(s) that triggers perforin/granzyme pathway in order to kill hCPC and therefore, we do not rule out any other unidentified activators of cell death pathways that might contribute to cytokine-activated NK cell killing of hCPC.

Our study provides evidence illustrating the capacity of hCPC to exert inhibitory/modulatory retrocontrol of NK cell function in allogeneic settings. Interaction of both resting and cytokine-activated NK cells with hCPC and IFN γ -hCPC in allogeneic context down-regulates their cytolytic activity and production of pro-inflammatory cytokines, but also their cytokine-induced cell proliferation. Down-regulation is documented by degranulation and cytolytic assays against both HLA I-negative and -positive target cells expressing multiple ligands for different NK activating receptors and is thoroughly cell-cell contact dependent. NK cell cytotoxic activity and cytokine production are regulated by a series of surface receptors that transduce either activating or inhibitory signals¹¹. The observed decrease in these NK cell effector function is likely related to the significant decrease in the expression level of several activating receptors that are involved in NK cell activation and target cell killing. Despite the fact that they express high level of inhibitory receptor ligands and have similar capacity to down-regulate activating receptors, IFN γ -hCPC were less effective than hCPC in decreasing NK cell effector functions. Moreover, the lower capacity of IFN γ -hCPC to form conjugates with NK cells could probably give details to their effect in downmodulating NK cell functions.

Yet, IFN γ -hCPC are more potent than hCPC in down-regulating cytokine-induced proliferation of NK cells indicating that mechanism(s) other than those involved in the down-regulation of NK cell effector functions are at play in the control of cytokine-induced NK cell proliferation. These mechanisms may include soluble factors derived from hCPC and/or produced upon recognition of hCPC by NK cells in allogeneic settings, and might be increased within an inflammatory microenvironment. Several soluble factors such as Indoleamine 2,3-dioxygenase, prostaglandin E2 and soluble HLA-G have been shown to have a role in various stem cells provoked inhibition of cytokine-induced NK cells proliferation and effector function^{21, 22}. Similar factors might operate in our model, although we did not determine their involvement in this study. Then again, HLA I/KIR interactions influence human NK cell proliferation in allogeneic setting and generate a population of "safe" alloreactive NK cells, which proliferate less when stimulated with IL2²³.

Upon interaction with hCPC in allogeneic settings, activated NK cells produce moderate levels of pro-inflammatory IFN γ and TNF α but high level of anti-inflammatory IL10 cytokines. The level of IL10 production is higher when NK cells interact with IFN γ -hCPC, which may support an eventual role for this cytokine in down-regulating cytokine-induced NK cell proliferation by hCPC. Upon interactions with hCPC, NK cells also produce IL13 at levels similar to those of NK cells that are in contact with conventional target, but they become higher after prolonged interactions. Even if we did not characterize the type of NK cells triggered by hCPC, the cytokinic profile, in particular the production of IL10 is in line with generation of NK cells with regulatory functions²⁴. Such subset might also participate in regulation of NK cell proliferation and effector function.

Acute MI represents a condition of acute inflammation that includes tissue damage and the presence of NK cell activity¹³. Early studies in patients after MI showed that peripheral NK cells display defective activity²⁵. Studies in animal models indicated that NK cells are involved in cardiac repair following MI probably through direct and indirect mechanisms²⁶. Our results on NK cell interactions with hCPC in allogeneic settings reinforce this notion. We showed that culturing NK cells with hCPC induces a switch in their cytotoxic/pro-inflammatory cytokines secretion status toward a modulatory/anti-inflammatory cytokines secreting profile. Recognition of allogeneic hCPC by NK might thus, eliminate some of them selecting perhaps those with a greater potential for repair (generating IL10-producing NK cells, NK cells with regulatory function...etc.) supporting subsequent regeneration of the tissue. Indeed, we showed that culturing NK cells with hCPC induces a switch in their cytotoxic/pro-inflammatory cytokines secretion status toward a modulatory/anti-inflammatory cytokines secreting profile. In support, animal studies suggesting that host regulatory immune response and IL10 production could be beneficial in attenuating adverse remodeling and cardiac repair^{27, 28}. *In vivo* studies using humanized mice are required to confirm the hCPC crosstalk with

immune cells. Nevertheless, given that our *in vitro* experimental assay model is a recognized pre-transplantation assay, it is conceivable to suggest that administration of allogeneic hCPC to injured inflamed myocardium and their interaction with innate NK cells would contribute to attenuating inflammation, preventing adverse cardiac remodeling and improving cardiac repair.

Collectively, interactions of hCPC with major composites of the adaptive³ and innate immune system effectors presented in this work, propose a model for hCPC behavior upon their administration to injured myocardium (Figure 7). Besides triggering and expanding regulatory anti-inflammatory rather than inflammatory immune cells, hCPC administration might engender a “crosstalk” between various actors of the immune response, whether cellular or humoral, which would ultimately emphasize an allogeneic beneficial over detrimental effect reinforcing cardiac repair. The mechanisms of action of cardiac-derived stem/progenitor cells remain only partially understood.

Acknowledgement

We would like to thank Dr Fawzi Aoudjit (Laval University, Quebec - Canada) for the critical reading of the manuscript and the Core Facility – Imagery and Cytometry Department of the Institut Universitaire d'Hématologie.

Funding

Work described in this article was supported in part by the European grant “FP7-HEALTH-2009-1.4-3”, LABEX TRANSPLANEX “ANR-11-LABX-0070”, “HLA et Médecine” and INSERM grants for UMRS940. The imagery department is supported by grants from the “Conseil Régional d'Ile-de-France” and the “Ministère de la Recherche” of France. L.L., R.H.H hold doctoral-fellowships from the “Ministère de l'Éducation et de la Recherche”, and J.S. from la Fondation pour la Recherche Médicale (FDT20130928395), France.

Conflict of Interest: None declared

References

1. Bolli R, Chugh AR, D'Amario D, Loughran JH, Stoddard MF, Ikram S, Beache GM, Wagner SG, Leri A, Hosoda T, Sanada F, Elmore JB, Goichberg P, Cappetta D, Solankhi NK, Fahsah I, Rokosh DG, Slaughter MS, Kajstura J, Anversa P. Cardiac stem cells in patients with ischaemic cardiomyopathy (SCIPIO): initial results of a randomised phase 1 trial. *Lancet* 2011;378:1847-1857.
2. Makkar RR, Smith RR, Cheng K, Malliaras K, Thomson LE, Berman D, Czer LS, Marban L, Mendizabal A, Johnston PV, Russell SD, Schuleri KH, Lardo AC, Gerstenblith G, Marban E. Intracoronary cardiosphere-derived cells for heart regeneration after myocardial infarction (CADUCEUS): a prospective, randomised phase 1 trial. *Lancet* 2012;379:895-904.
3. Lauden L, Boukouaci W, Borlado LR, Lopez IP, Sepulveda P, Tamouza R, Charron D, Al-Daccak R. Allogenicity of human cardiac stem/progenitor cells orchestrated by programmed death ligand 1. *Circ Res* 2013;112:451-464.
4. Malliaras K, Li TS, Luthringer D, Terrovitis J, Cheng K, Chakravarty T, Galang G, Zhang Y, Schoenhoff F, Van Eyk J, Marban L, Marban E. Safety and efficacy of allogeneic cell therapy in infarcted rats transplanted with mismatched cardiosphere-derived cells. *Circulation* 2012;125:100-112.
5. Tseliou E, Pollan S, Malliaras K, Terrovitis J, Sun B, Galang G, Marban L, Luthringer D, Marban E. Allogeneic cardiospheres safely boost cardiac function and attenuate adverse remodeling after myocardial infarction in immunologically mismatched rat strains. *J Am Coll Cardiol* 2013;61:1108-1119.
6. Campbell KS, Hasegawa J. Natural killer cell biology: an update and future directions. *J Allergy Clin Immunol* 2013;132:536-544.
7. Kroemer A, Xiao X, Degauque N, Edtinger K, Wei H, Demirci G, Li XC. The innate NK cells, allograft rejection, and a key role for IL-15. *J Immunol* 2008;180:7818-7826.
8. Hidalgo LG, Sis B, Sellares J, Campbell PM, Mengel M, Einecke G, Chang J, Halloran PF. NK cell transcripts and NK cells in kidney biopsies from patients with donor-specific antibodies: evidence for NK cell involvement in antibody-mediated rejection. *Am J Transplant* 2010;10:1812-1822.
9. Ruggeri L, Capanni M, Urbani E, Perruccio K, Shlomchik WD, Tosti A, Posati S, Rogaia D, Frassoni F, Aversa F, Martelli MF, Velardi A. Effectiveness of donor natural killer cell alloreactivity in mismatched hematopoietic transplants. *Science* 2002;295:2097-2100.
10. Sagoo P, Perucha E, Sawitzki B, Tomiuk S, Stephens DA, Miqueu P, Chapman S, Craciun L, Sergeant R, Brouard S, Rovis F, Jimenez E, Ballow A, Giral M, Rebollo-Mesa I, Le Moine A, Braudeau C, Hilton R, Gerstmayer B, Bourcier K, Sharif A, Krajewska M, Lord GM, Roberts I, Goldman M, Wood KJ, Newell K, Seyfert-Margolis V, Warrens AN, Janssen U, Volk HD, Soulillou JP, Hernandez-Fuentes MP, Lechler RI. Development of a cross-platform biomarker signature to detect renal transplant tolerance in humans. *J Clin Invest* 2010;120:1848-1861.
11. Long EO, Kim HS, Liu D, Peterson ME, Rajagopalan S. Controlling natural killer cell responses: integration of signals for activation and inhibition. *Annu Rev Immunol* 2013;31:227-258.
12. Brady J, Carotta S, Thong RP, Chan CJ, Hayakawa Y, Smyth MJ, Nutt SL. The interactions of multiple cytokines control NK cell maturation. *J Immunol* 2010;185:6679-6688.
13. Yan X, Anzai A, Katsumata Y, Matsushashi T, Ito K, Endo J, Yamamoto T, Takeshima A, Shinmura K, Shen W, Fukuda K, Sano M. Temporal dynamics of cardiac immune cell accumulation following acute myocardial infarction. *J Mol Cell Cardiol* 2013;62:24-35.
14. Cao LF, Krymskaya L, Tran V, Mi S, Jensen MC, Blanchard S, Kalos M. Development and application of a multiplexable flow cytometry-based assay to quantify cell-mediated cytotoxicity. *Cytometry A* 2010;77:534-545.
15. Alter G, Malenfant JM, Altfeld M. CD107a as a functional marker for the identification of natural killer cell activity. *J Immunol Methods* 2004;294:15-22.
16. Orange JS. Formation and function of the lytic NK-cell immunological synapse. *Nat Rev Immunol* 2008;8:713-725.
17. Moesta AK, Parham P. Diverse functionality among human NK cell receptors for the C1 epitope of HLA-C: KIR2DS2, KIR2DL2, and KIR2DL3. *Front Immunol* 2012;3:336.

18. Fildes JE, Shaw SM, Yonan N, Williams SG. The immune system and chronic heart failure: is the heart in control? *J Am Coll Cardiol* 2009;53:1013-1020.
19. Ma M, Ding S, Lundqvist A, San H, Fang F, Konoplyannikov M, Berry C, Beltran LE, Chen G, Kovacic JC, Boehm M. Major histocompatibility complex-I expression on embryonic stem cell-derived vascular progenitor cells is critical for syngeneic transplant survival. *Stem Cells* 2010;28:1465-1475.
20. Gotherstrom C, Lundqvist A, Duprez IR, Childs R, Berg L, le Blanc K. Fetal and adult multipotent mesenchymal stromal cells are killed by different pathways. *Cytotherapy* 2011;13:269-278.
21. Di Trapani M, Bassi G, Ricciardi M, Fontana E, Bifari F, Pacelli L, Giacomello L, Pozzobon M, Feron F, De Coppi P, Anversa P, Fumagalli G, Decimo I, Menard C, Tarte K, Krampera M. Comparative study of immune regulatory properties of stem cells derived from different tissues. *Stem Cells Dev* 2013;22:2990-3002.
22. Spaggiari GM, Moretta L. Cellular and molecular interactions of mesenchymal stem cells in innate immunity. *Immunol Cell Biol* 2013;91:27-31.
23. Rose MJ, Brooks AG, Stewart LA, Nguyen TH, Schwarzer AP. Killer Ig-like receptor ligand mismatch directs NK cell expansion in vitro. *J Immunol* 2009;183:4502-4508.
24. Fu B, Tian Z, Wei H. Subsets of human natural killer cells and their regulatory effects. *Immunology* 2013.
25. Klarlund K, Pedersen BK, Theander TG, Andersen V. Depressed natural killer cell activity in acute myocardial infarction. *Clin Exp Immunol* 1987;70:209-216.
26. Bouchentouf M, Forner KA, Cuerquis J, Michaud V, Zheng J, Paradis P, Schiffrin EL, Galipeau J. Induction of cardiac angiogenesis requires killer cell lectin-like receptor 1 and alpha4beta7 integrin expression by NK cells. *J Immunol* 2010;185:7014-7025.
27. Krishnamurthy P, Rajasingh J, Lambers E, Qin G, Losordo DW, Kishore R. IL-10 inhibits inflammation and attenuates left ventricular remodeling after myocardial infarction via activation of STAT3 and suppression of HuR. *Circ Res* 2009;104:e9-18.
28. Tang TT, Yuan J, Zhu ZF, Zhang WC, Xiao H, Xia N, Yan XX, Nie SF, Liu J, Zhou SF, Li JJ, Yao R, Liao MY, Tu X, Liao YH, Cheng X. Regulatory T cells ameliorate cardiac remodeling after myocardial infarction. *Basic Res Cardiol* 2012;107:1-17.

Legends to figures

Figure 1: Susceptibility of hCPC to allogeneic NK cells: **A)** Specific lysis of hCPC, IFN γ -hCPC, K562 or Raji cells by either allogeneic freshly-isolated (left panel) or IL15-activated (right panel) NK cells at the indicated effector:target (E:T) ratios. CFSE-labeled target cells were incubated with NK cells for 4 hours then stained with 7-AAD. Results are presented as specific mean lysis \pm SD from at least five independent experiments performed in triplicates. **B)** Representative dot plots (upper panel) showing percentages of CD107a surface expression on CD3 $^+$ CD56 $^+$ freshly-isolated (left panel) or IL15-activated (right panel) NK cells after overnight incubation with target cells at E:T ratio of 1:1. Histogram (lower panel) presenting mean values \pm SD of CD107a surface expression from five independent experiments performed in duplicates. ***p<0.001 compared to medium. p values between hCPC and IFN γ -hCPC are indicated.

Figure 2: IFN γ -hCPC are less prone than hCPC in setting NK cell function toward killing: **A)** CFSE-labeled freshly-isolated or IL15-activated NK cells were incubated with allogeneic CMRA-labeled hCPC or IFN-hCPC for 30 minutes and the percentage of conjugates were evaluated by the number of CMRA/CFSE double positive events in the total NK cell population. Results are presented as representative dot plots (left panel) and histograms showing mean values \pm SD from three independent experiments performed in triplicates (right panel). **B)** Representative images (left panel) of non-polarized and polarized NK-hCPC immune synapses (IS) with their zoomed counterparts. IS were considered polarized when both perforin granules and actin filaments of NK cell were oriented toward hCPC. Nuclei were stained with DAPI and images were taken under the 63X objective. Percentages of polarized IS were evaluated for either freshly-isolated or IL15-activated NK cells in contact with hCPC or IFN γ -hCPC. At least 150 conjugates were analyzed for each condition in three independent experiments. Mean values \pm SD of three independent experiments are presented (right panel). ***p<0.001 IL15-activated NK cells compared to freshly-isolated NK cells. p values between hCPC and IFN γ -hCPC are indicated.

Figure 3: HLA I protects IFN γ -hCPC from NK killing: **A)** Representative expression of ligands for inhibitory NK cell receptors (KIRs and NKG2A) by allogeneic hCPC (black histograms) or IFN γ -hCPC (red histograms) from a single donor against respective isotype controls (gray-filled histograms). The geometric means are indicated. **B)** Specific lysis of CFSE-labeled hCPC and IFN γ -hCPC by IL15-activated NK cells at E:T ratio of 10:1 in the presence or absence of specific blocking antibodies for HLA-I or HLA-E or their respective isotype controls. Specific lysis for all conditions was evaluated by staining with 7-AAD and results are presented as mean values \pm SD of three independent experiments performed in triplicates. **p<0.01 compared to isotype control.

Figure 4: hCPC down-regulate NK cell activities: **A)** IL15-activated NK cells were primed with allogeneic hCPC or IFN γ -hCPC at E:T ratio of 1:1 using direct contact or transwell systems, or cultured alone for 2 days. Cells were then harvested and cultured with K562 target at E:T ratio of 1:1. Representative dot plots show percentages of CD107a surface expression on CD3 $^+$ CD56 $^+$ NK cells under the different priming conditions (upper panel). CD107a surface expression on NK cells is also presented as mean values \pm SD of three independent experiments performed in triplicates (lower panel). Similar results were obtained when priming was conducted for 4 days (data not shown). **B)** Freshly-isolated CFSE-labeled NK cells were cultured alone or in the presence of allogeneic hCPC or IFN γ -hCPC at E:T ratio 4:1 and were simultaneously activated with IL15. Representative dot plots indicate the percentages of proliferating CD3 $^+$ CD56 $^+$ NK cells that have decreased CFSE under each condition (upper panel). Results are also presented as mean values \pm SD of three independent experiments performed in triplicates (lower panel). **p<0.01, ***p<0.001 compared to medium. p values between hCPC and IFN γ -hCPC are indicated.

Figure 5: Interaction of NK cells with hCPC down-regulates the expression of their activating receptors: **A)** Representative surface expression of activating NK receptors by IL15-activated NK cells after 4 days of culture alone (gray filled histograms) or in the presence of hCPC (black histograms) or IFN γ -hCPC (red histograms) from a single donor at E:T ratio of 1:1 against respective isotype controls (gray histograms). The geometric means are indicated. **B)** Surface expression of activating NK

receptors presented as relative geometric mean fluorescence intensity based on respective isotype controls geomeans. Values are means \pm SD from 10 different donors in separate experiments. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$ compared to NK cells cultured with medium alone.

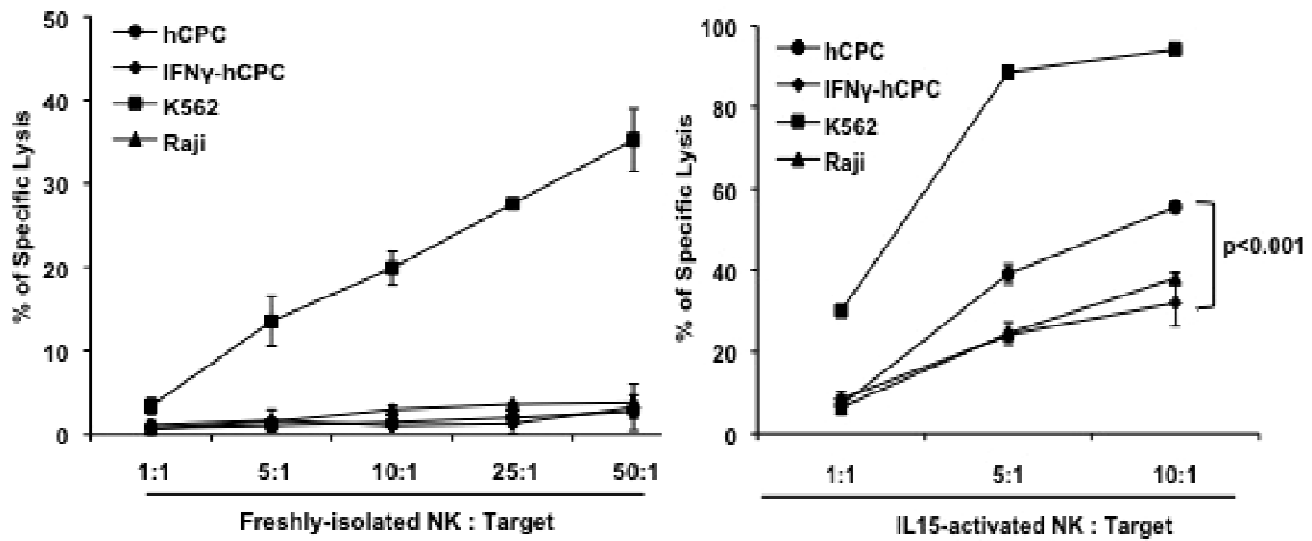
Figure 6: NK cells produce type II rather than type I cytokines upon their interaction with hCPC: IL15-activated NK cells were cultured for 24h alone or in the presence of hCPC, IFN γ -hCPC or K562 at E:T ratio of 1:1. **A)** Type I (IFN γ and TNF α) and **B)** type II (IL10, IL13) cytokines secretion by NK cells in co-cultures supernatants. **C)** Ratio of IL10 to TNF α (IL10/TNF α) and IL10 to IFN γ (IL10/IFN γ secretion. Results are presented as means \pm SD from three independent experiments. **D)** IL15-activated NK cells primed or not with hCPC or IFN γ -hCPC then cultured with K562 at 1:1 E:T ratio. Production of type I cytokines under each condition was then measured by Luminex and Elisa, and presented as mean values \pm SD from three independent experiments. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ compared to medium; $^\dagger p < 0.001$ compared to K562; p values between hCPC and IFN γ -hCPC are indicated.

Figure 7: Model of hCPC interactions with adaptive and innate immune cells

Schematic representation of how allogeneic hCPC crosstalk with host innate (NK cells) and adaptive (CD4 $^+$) immune effectors might contribute collectively to hCPC longevity and cardiac tissue repair. NK cell expressing high levels of activating receptors (NKR) form immune synapse with hCPC, secrete cytokines (IFN γ and TNF α) and cytolytic granules containing granzymes and perforin. But, inflammatory context (IFN γ) increases MHC I expression and renders hCPC resistant to NK cell lysis. The shift in NKR balance, the expression of inhibitory KIR (KIR-L) and secretion of IL10 might be in part responsible for the bias toward Treg phenotype. Vis versa the polarization of CD4 $^+$ T cells and the expansion of Treg producing high levels of IL10 might contribute to NK cell disarming. How increased MHC II expression besides promoting antigen-presentation and activation of Treg would contribute to the tolerogenic phenotype remains an open question.

Figure 1

A



B

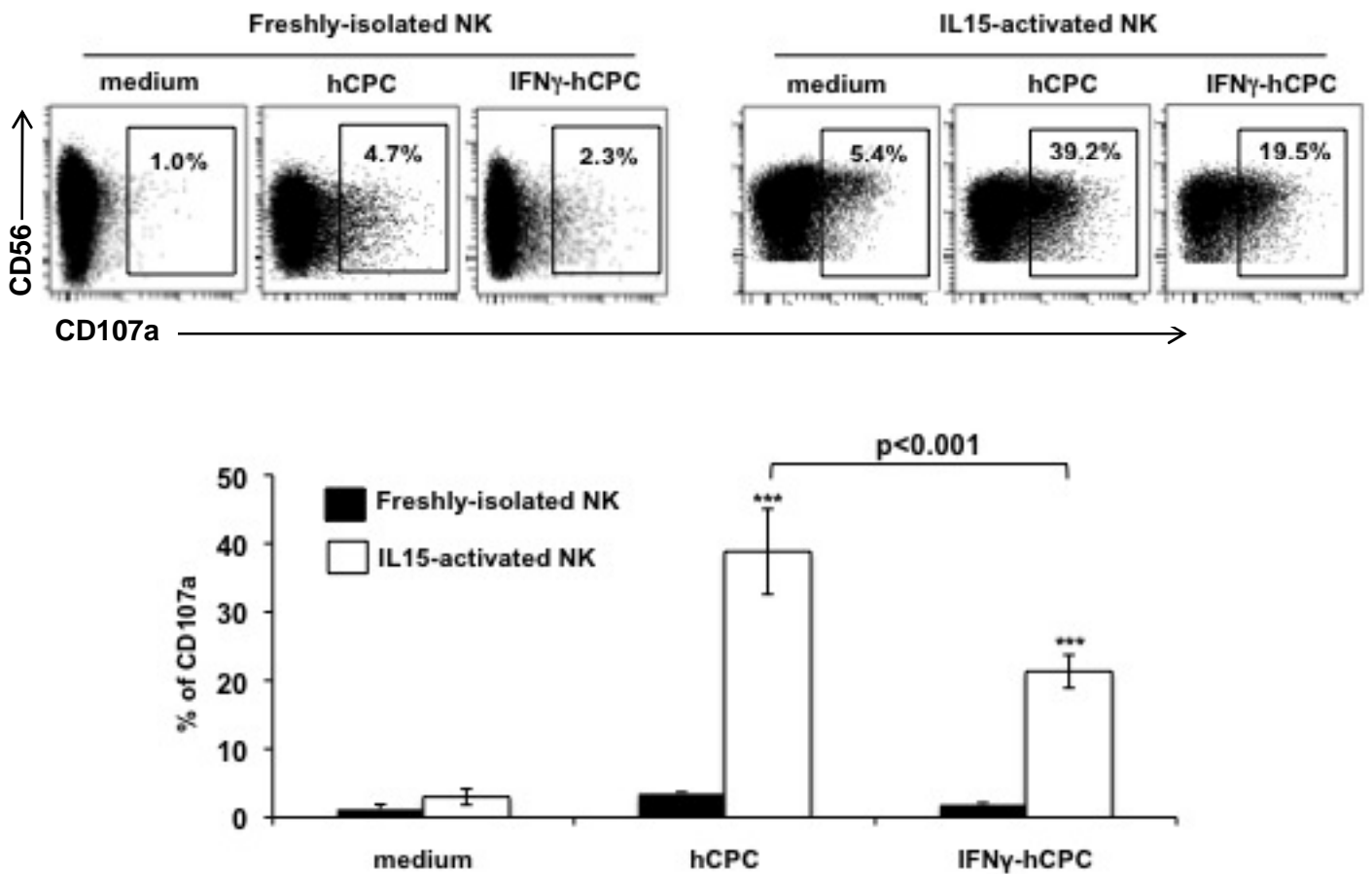


Figure 2

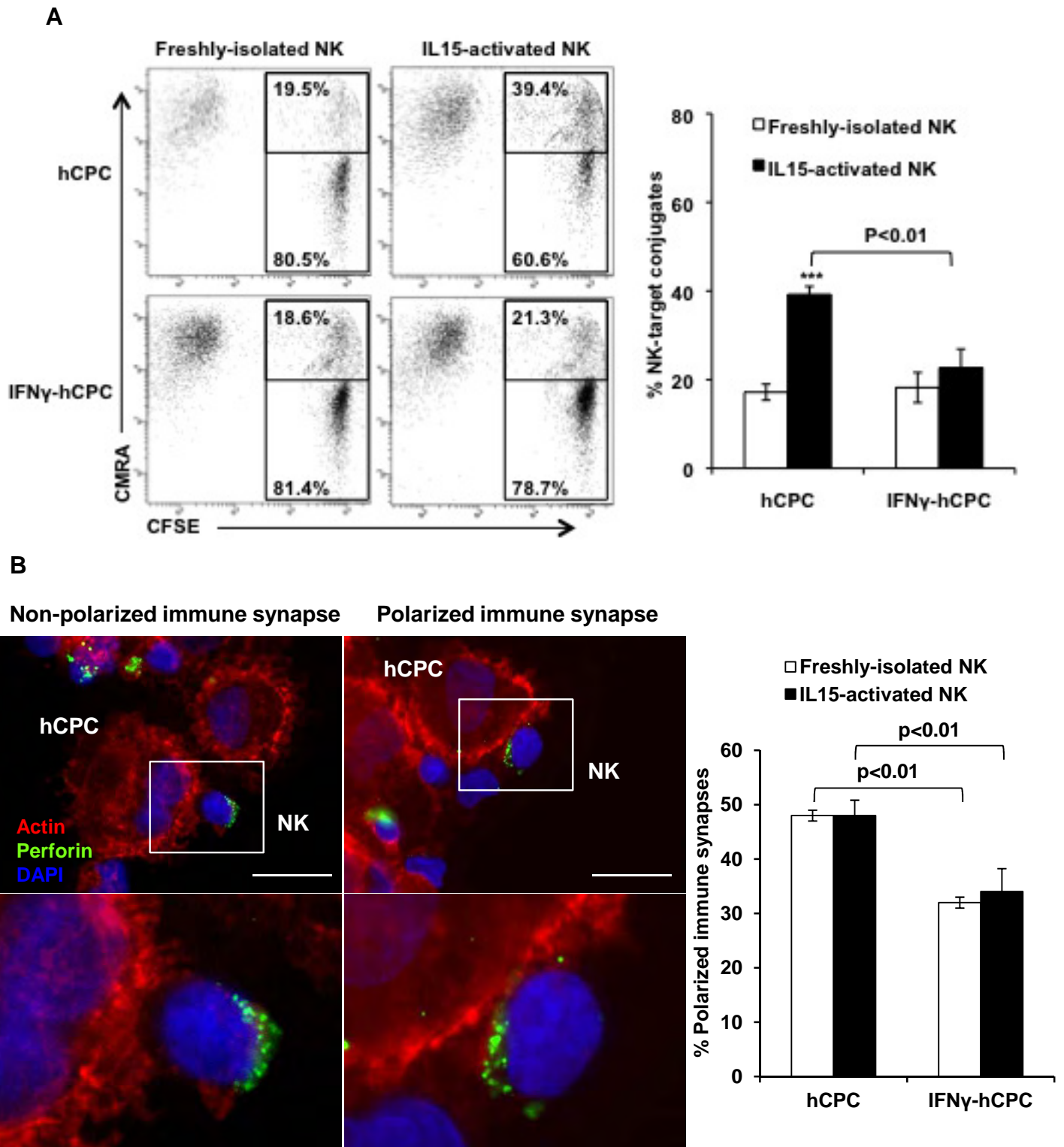
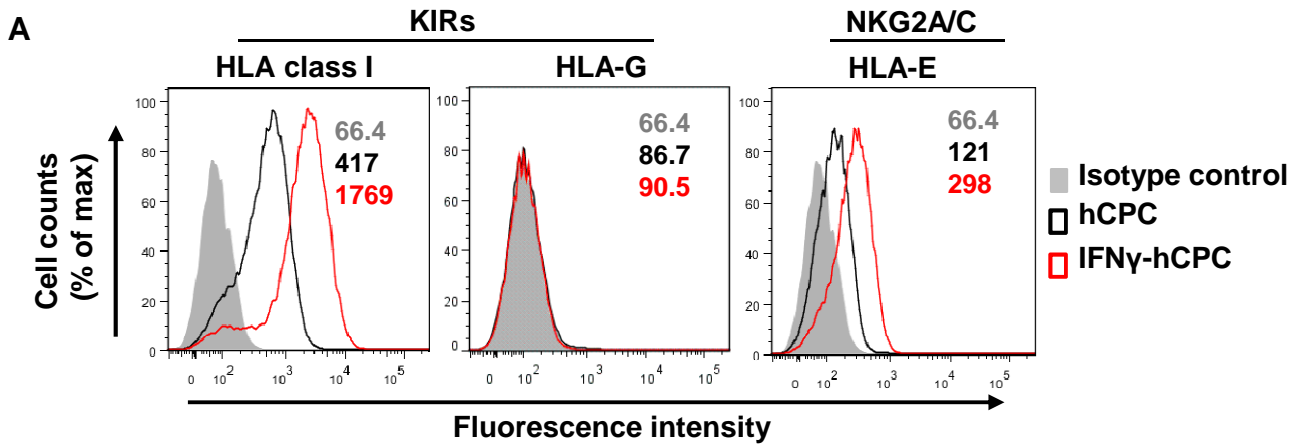


Figure 3



B

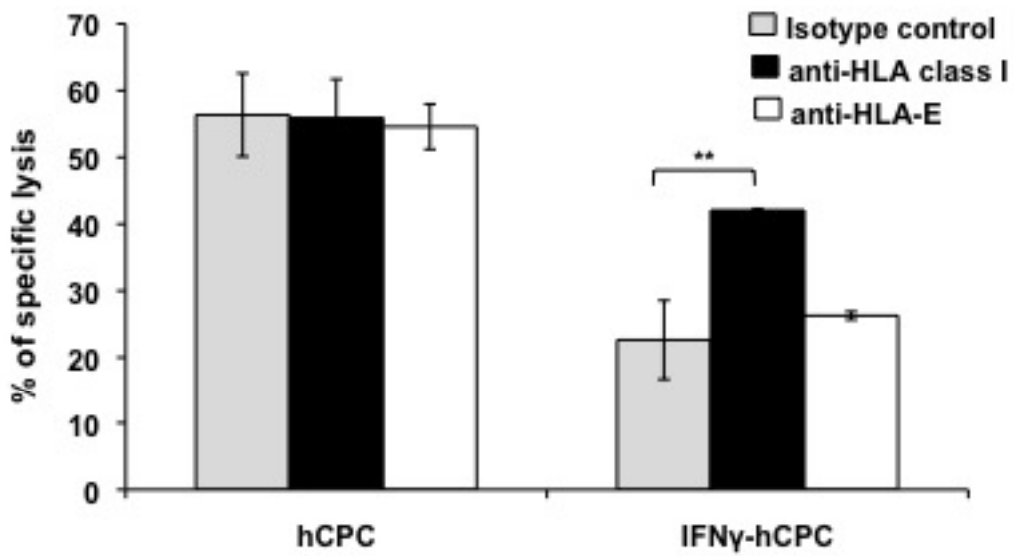


Figure 4

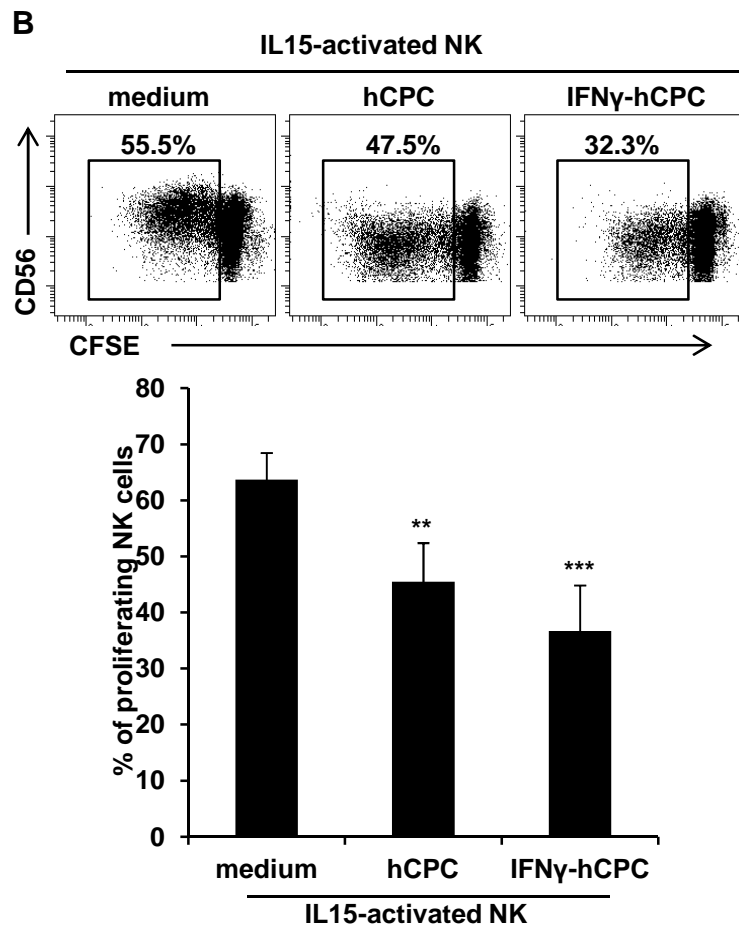
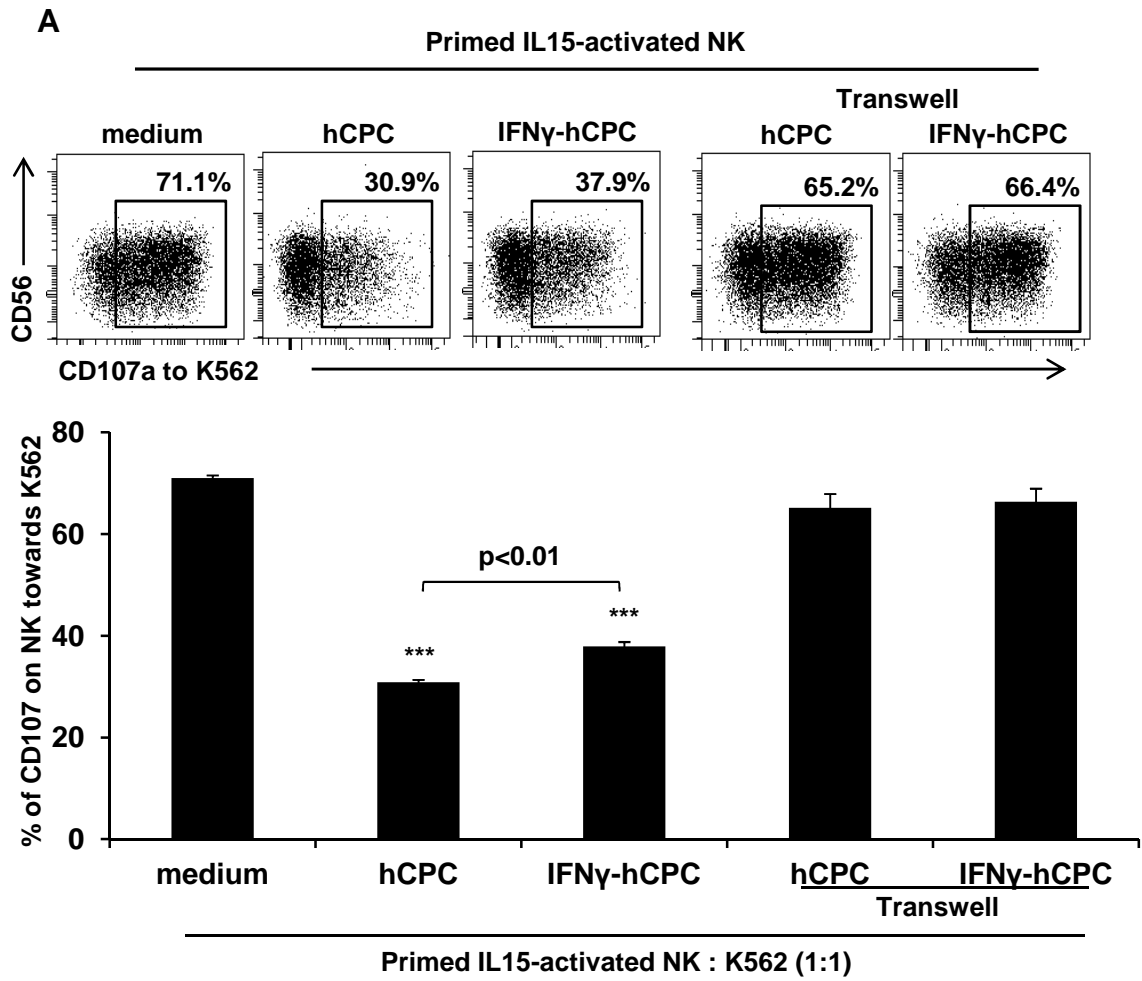


Figure 5

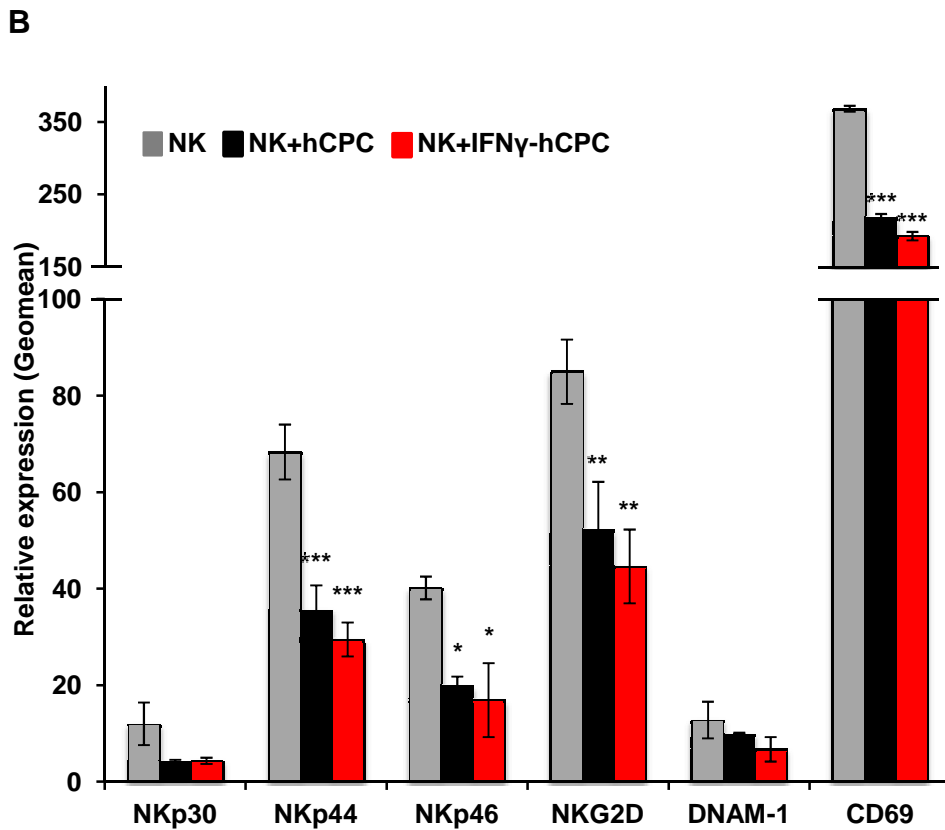
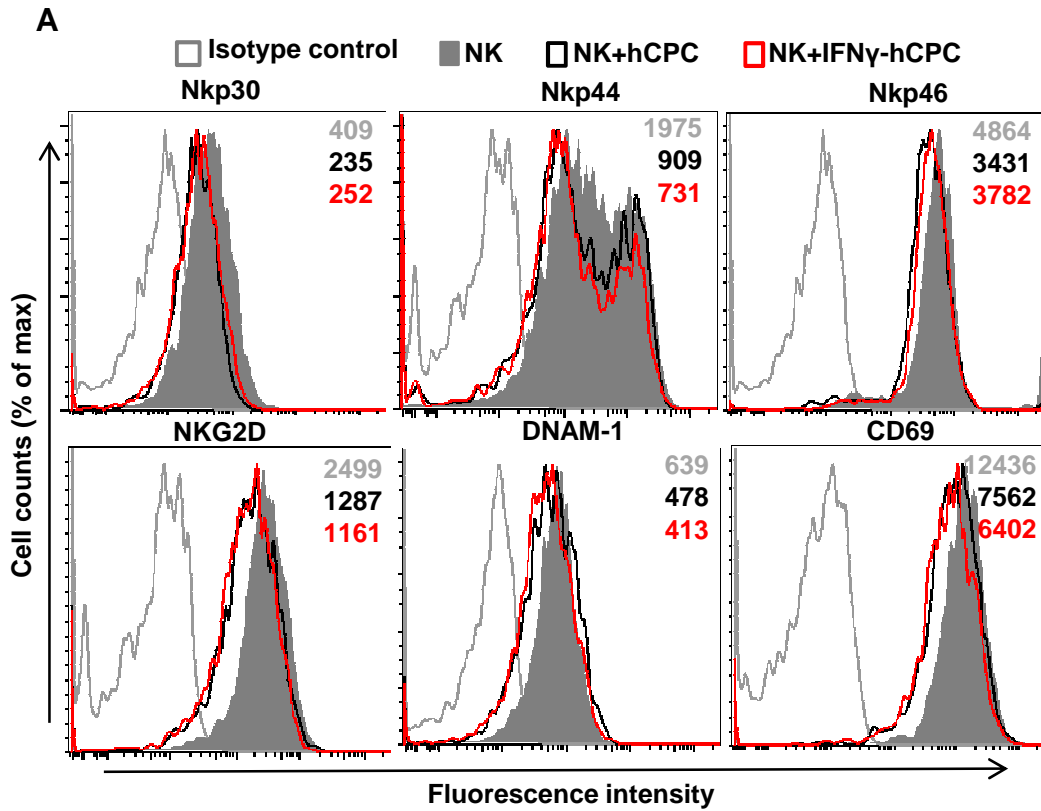


Figure 6

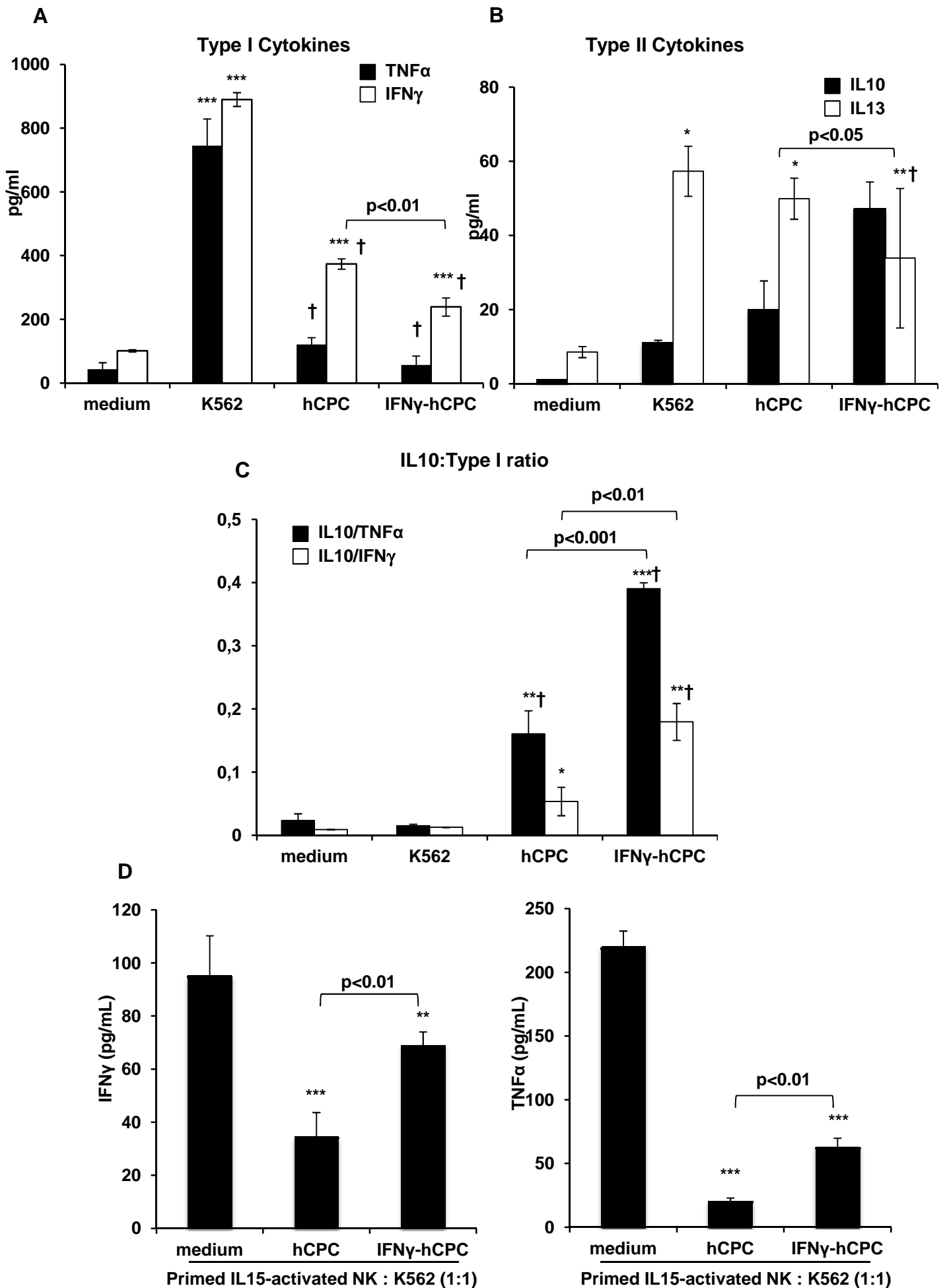
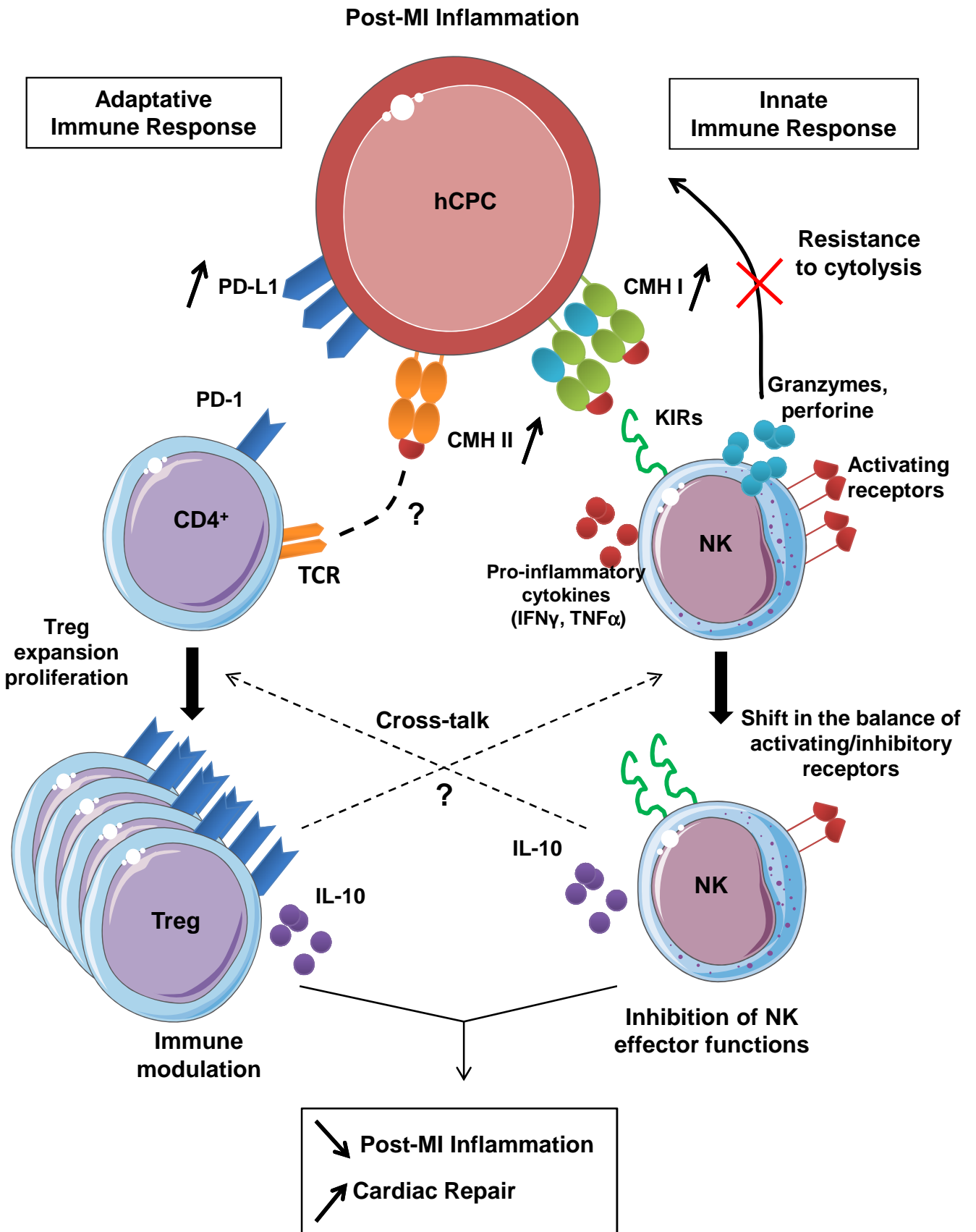


Figure 7



Annexe 3:

The up side of Decidual Natural killer cells.

Jabrane-Ferrat N, Siewiera J.

Immunology. 2014 Apr;141(4):490-7.

The up side of decidual natural killer cells: new developments in immunology of pregnancy

Nabila Jabrane-Ferrat^{1,2,3} and
Johan Siewiera^{1,2,3}

¹Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, UMR 1043, ²Centre National Recherche Scientifique, UMR 5282, and ³Université Toulouse III Paul Sabatier, Toulouse, France

doi:10.1111/imm.12218

Received 04 October 2013; revised 05 November 2013; accepted 17 November 2013.

Correspondence: Nabila Jabrane-Ferrat, Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, UMR 1043, Toulouse 31300, France.

Email: nabila.jabrane-ferrat@inserm.fr

Senior author: Nabila Jabrane-Ferrat

Natural killer (NK) cells are large granular lymphocytes of the innate immune system and represent the first line in the host defence against invading pathogens.^{1,2} Unlike T cells, NK cells do not express an antigen-specific receptor but rather they express a large repertoire of activating and inhibitory receptors. Mature NK cells recirculate in the blood (pNK) where their number varies anywhere from 5 to 20% of total lymphocytes. Natural killer cells are also present in lymphoid and non-lymphoid tissues including the uterus where they are mainly CD56^{bright} CD16^{neg}.³ Given the fact that these cells are fully armed with cytolytic granules that can cause great harm, their activation is regulated by germline-encoded inhibitory or activating cell surface receptors that recognize self-ligands or pathogen-induced and stress-induced ligands.⁴ The net balance between activating and inhibitory signals would determine the outcome of NK cell responses against various threats. Activation of NK cells is inhibited mainly after interaction of inhibitory receptors with MHC class I molecules. However, the loss of MHC class I expression is not sufficient to trigger NK cell responsiveness because additional activating signals are

Summary

Early phases of human pregnancy are associated with the accumulation of a unique subset of natural killer (NK) cells in the maternal decidua. Decidual NK (dNK) cells that are devoid of cytotoxicity play a pivotal role in successful pregnancy. By secreting large amounts of cytokines/chemokines and angiogenic factors, dNK cells participate in all steps of placentation including trophoblast invasion into the maternal endometrium and vascular remodelling. In this review, we summarize some of dNK cell features and discuss more recent exciting data that challenge the conventional view of these cells. Our new data demonstrate that dNK cells undergo fine tuning or even subvert their classical inhibitory machinery and turn into a real defence force in order to prevent the spread of viruses to fetal tissue. Today it is not clear how these phenotypic and functional adaptations impact cellular cross-talk at the fetal–maternal interface and tissue homeostasis. Ultimately, precise understanding of the molecular mechanisms that govern dNK cell plasticity during congenital human cytomegalovirus infection should lead to the design of more robust strategies to reverse immune escape during viral infection and cancer.

Keywords: cytomegalovirus; decidua; natural killer cells; pregnancy.

required.⁵ The NK cells can eliminate their target through different mechanisms, including direct cell cytotoxicity or cytokine production. Besides their role as effectors of innate immunity, NK cells play a pivotal role in bridging the innate and adaptive arms of the immune system. By secreting large amounts of cytokines and chemokines, NK cells impact dendritic cell maturation^{6,7} and antigen-specific adaptive immune responses.^{8,9} During pregnancy, a special population of NK cells accumulates within the endometrium, which constitutes one of the maternal–fetal interfaces or decidua.¹⁰ These NK cells, referred to as decidual NK cells (dNK), play a pivotal role in the tissue homeostasis and endometrial vasculature remodelling that are necessary for embryo implantation and successful pregnancy. This review focuses on dNK cells and will discuss the latest work on their characteristics and functions.

Immune cells at the fetal–maternal interfaces

Pregnancy is a striking immunological paradox. Under normal healthy pregnancy, the conceptus carrying paternal antigens from an immunological point of view is a

Abbreviations: NK, natural killer; MHC, major histocompatibility complex; NKR, natural killer cell receptors

semi-allogenic graft that should be automatically rejected in an immune competent host.^{11,12} Yet, the fetus is completely protected from immune assault, suggesting that fine-tuning and complex adaptations from both parties would probably work together to thrust the immune system towards tolerance rather than rejection.¹³

Although the fetus is never in contact with maternal tissues, direct contacts exist between maternally and fetal-derived placental tissues. In haemochorial placentation (as in human and mouse placentation), these contacts occur through two distinct fetal–maternal interfaces¹⁴ (Fig. 1). The first interface is represented by the maternal decidua, which can be divided in three parts: (i) the *decidua basalis* (called here after decidua) located at the implantation site is composed of the decidualized endometrial stroma, which directly contacts the invasive extravillous trophoblast (EVT); (ii) the *decidua parietalis* lines the remainder of uterine cavity and is in direct contact with the non-invasive chorionic trophoblast; (iii) the *decidua capsularis* enclosing the conceptus acts as attachment for the chorion. Even if all deciduas contact fetal tissue, the *decidua basalis* is the only site where contact occurs on the first day of implantation.

The second interface is the intervillous space where maternal blood bathes the floating chorionic villous tree. This second interface constitutes a privileged site where fetal antigen shedding into maternal blood occurs. It is unclear whether maternal effector T cells sense these anti-

gens, and whether specific adjustments are necessary to ensure systemic tolerance.¹⁵

During the process of implantation, the decidua is populated by a large variety of leucocytes, which account for > 40% of the total cellular content. The major leucocyte population is represented by a particular subset of CD56^{bright} CD16^{neg} non-cytotoxic NK cells (dNK). In the first trimester of pregnancy, dNK cells represent >70% of decidual leucocytes.^{15–19} The dNK cell number is very high throughout the first trimester and remains high through the second. However, it starts to decline from mid-gestation and reaches a normal endometrial number at term. Other immune cells are represented at much lower levels; human decidua contains 10% T cells, including CD8, CD4 and $\gamma\delta$ T cells,²⁰ as well as 20% monocytes/macrophages and 2% dendritic cells,^{21–24} but B cells are barely detectable. The total number of T cells varies through the course of pregnancy but can reach up to 80% at term. The majority of decidual CD8^{pos} and CD4^{pos} T cells show features of induced regulatory T (Treg) cells.^{25–28} The cellular cross-talk between decidual stroma, immune cells and fetal trophoblast is orchestrated by hormones/cytokines/chemokines/growth factors, and is a prerequisite for the development of the placenta.^{29–32} The high level of CD56^{bright} maternal dNK cells within the implantation site further highlights their importance in the immunology of pregnancy, which is far from being completely understood.

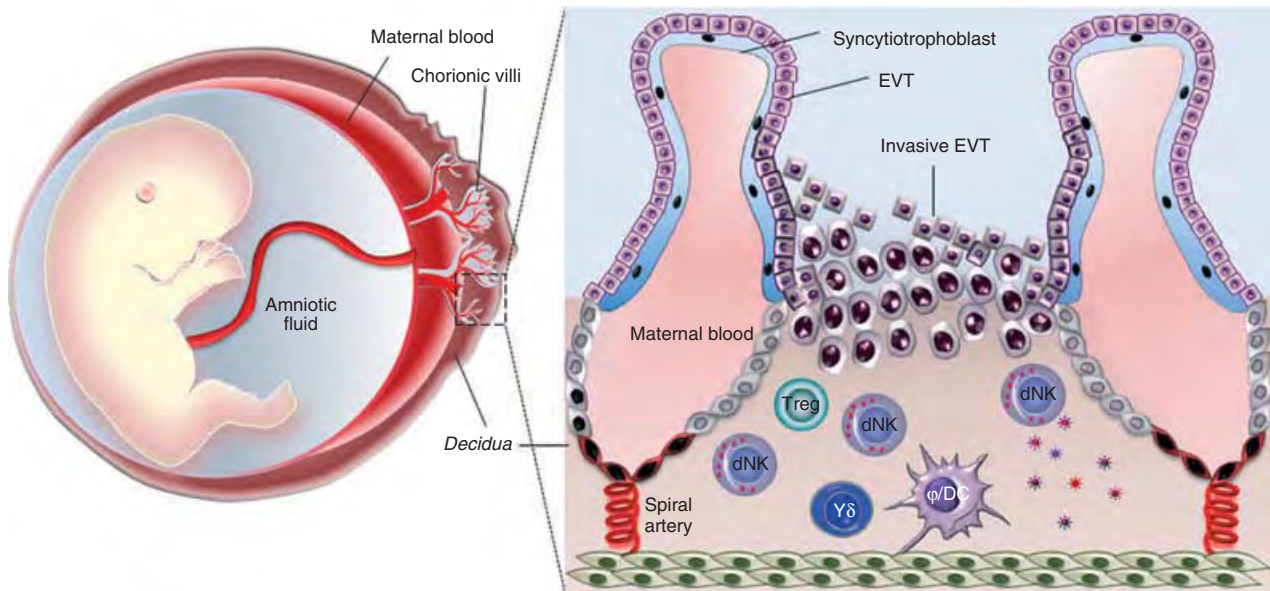


Figure 1. Fetal–maternal interface. Floating chorionic villous trophoblast tree carrying fetal blood vessels is bathed in maternal blood. Invasive extravillous trophoblasts (EVTs) invade the maternal decidua and are in direct contact with the maternal immune system. By secreting several cytokines/chemokines and proangiogenic factors, decidual natural killer (dNK) cells promote the invasion of EVT, vascular remodelling and help in the establishment of fetal tolerance. Other cells are present at the maternal decidua including regulatory T (Treg) cells, $\gamma\delta$ T cells and tolerogenic dendritic cells.

The origin of dNK cells

The origin of dNK cells is not yet clear. They could be generated *in situ* from early progenitors/precursors, which differentiate/proliferate in an environment enriched in steroid hormones and cytokines/chemokines to give rise to the dNK cell population.^{33–35} This theory is further supported by the presence of an immature population of NK cells in the uterus, even before conception. These uterine NK cells regulate the differentiation and decidualization of the endometrium and their number varies during the menstrual cycle due to the effect of elevated levels of interleukin-15 (IL-15).^{36,37}

Similar to other lymphoid tissues, CD34^{pos} precursors are present in the maternal decidua. These CD34^{pos} progenitors are probably committed to the NK cell lineage as they express high levels of *E4BP4* and *Id2* transcription factors. They also express the common β chain receptor (CD122) and the IL-7 receptor α chain (CD127) but do not express stem cell markers (i.e. c-kit). Interactions with other decidual cells in a microenvironment enriched in IL-15 can easily drive the differentiation of these CD34^{pos} progenitors into dNK cells.^{38,39}

It is also proposed that dNK cells derive from peripheral blood NK cells that migrate to the decidua through chemotaxis and acquire decidual phenotype within the local microenvironment.^{33,38,40,41} Studies demonstrating that decidual cells and invasive EVT produce large amounts of NK-attractant chemokines (CXCL10/IP-10, CXCL12/SDF-1, CCL2/MCP-1, CXCL8/IL-8, CX3CL1/fractalkine) and cytokines (IL-15) support this possibility.^{38,42–44} The dNK cells would originate from CD56^{bright} pNK cells that are recruited to the decidua following the axis CXCR3–CXCL10 or CXCR4–CXCL12.^{38,42,43}

However, dNK cells do not represent a homogeneous population as regards chemokine receptor expression; it is possible that they rise from several origins. Regardless of their origin as recruited or resident precursors/progenitors that mature locally, the decidual microenvironment conditions the education and the generation of dNK cells with unique phenotypical and functional properties to support healthy pregnancy.⁴⁵ Consistent with this notion of local adaptations, exposure of pNK cells to transforming growth factor- β (TGF- β) or a combination of TGF- β /IL-15 or TGF- β /5-aza-2'-deoxycytidine promotes the conversion of pNK cells into an NK cell subset with reduced cytotoxic functions that can promote the invasion of human trophoblast cells.^{41,46} Moreover, the invasive EVT does not express the highly polymorphic MHC class I molecules but expresses HLA-C and the non-classical HLA-G and HLA-E MHC class I molecules that are recognized by NK cell inhibitory receptors [CD94/NKG2A and specific killer immunoglobulin-like receptor (KIR) receptors] acquired within the uterine microenvironment.⁴⁷

Phenotypic similarities and differences between dNK and pNK cells

Despite some similarities, the first-trimester pregnancy dNK cells and their pNK cell counterparts from the same donor present fairly distinct properties. Peripheral blood NK cells constitute up to 20% of circulating lymphocytes and are represented by two subsets; the CD56^{dim} CD16^{pos} subset constituting 95% total pNK and the CD56^{bright} CD16^{neg} minor subset. CD56^{dim} pNK cells possess a high content of lytic granules and are highly cytotoxic while CD56^{bright} pNK cells produce a large amount of cytokines and chemokines and are poorly cytotoxic.¹⁶ The majority of CD56^{dim} CD16^{pos} pNK cells express members of the KIR family. In contrast, most CD56^{bright} CD16^{neg} cells lack KIR expression but express high levels of the CD94/NKG2A inhibitory receptor.⁴⁸ The expression of other activating and inhibitory receptors is also different in these two subsets.

On the other hand, dNK cells are largely composed of CD56^{bright} CD16^{neg} cells whereas CD56^{dim} CD16^{pos} subtype represents only a small fraction. The dNK cells display a unique repertoire of activating and inhibitory receptors that resembles the early differentiation stages of NK cells, distinguishing them from pNK cells.^{16,49–54} For instance, Nkp30, NKG2C and ILT2 receptors are expressed on 30–50% of first-trimester dNK cells but only a few pNK cells express these receptors. Unlike resting pNK cells, dNK cells express the CD69 activation marker and a large fraction express Nkp44 activating receptor. The expression levels of NKG2D and 2B4 (CD244) are similar for dNK and pNK cells. Like CD56^{bright} CD16^{neg} pNK cells, dNK cells express high levels of CD94/NKG2A inhibitory receptor (see Fig. 2). One striking difference concerns the granularity level. Even if they are poorly cytotoxic, dNK cells express much larger amounts of granzyme A, granzyme B and perforin enriched cytotoxic granules than CD56^{dim} cytotoxic pNK cells.^{18,35,51,54}

Fine analyses of the dNK cell gene expression profile further highlighted these unique features of dNK cells with distinct properties, such as the expression of NKG2E, Ly-49L and KIR receptors, adhesion molecules, galectin-1 or some members of the tetraspan family (CD9, CD151, CD53, CD63).¹⁷

Functions of dNK cells under normal pregnancy: mother's little helpers at play

The precise functions of dNK cells *in vivo* are not yet completely understood. Nonetheless, evidence exists for their pivotal contribution to the regulation of tissue homeostasis, a critical process for healthy pregnancy and optimal fetal development. At the same time, their endowment with huge plasticity and their susceptibility to external environmental stimuli should be taken into account for the success of pregnancy.

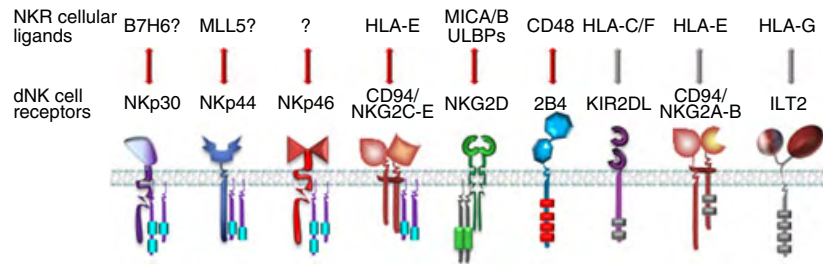


Figure 2. Natural killer cell receptors expressed on decidual natural killer (dNK) cells. Most dNK cells express high levels of activating receptors including the Natural Cytotoxicity Receptors (NKp30, NKp44, NKp46), NKG2D, CD94/NKG2C-E. They also express inhibitory receptors such as 2B4, NKG2A/B, KIR2DLs and ILT2. Known and unknown (?) cellular ligands are listed above each receptor. B7H6? And MLL5? are putative ligands for NKp30 and NKp44 activating receptors. NKp46 receptor recognizes a yet unidentified cellular ligand (?). Most of the activating receptors have a short intracytoplasmic tail and require the recruitment of adaptor molecules such as DAP10/12 or CD3 ζ in order to transduce the activating signals. Inhibitory receptors possess one or more inhibitory motifs in their intra-cytoplasmic domain.

Decidual NK cells are devoid of cytotoxicity

Natural killer cells are named after their spontaneous and natural ability to kill tumours and virus-infected cells without previous sensitization. They belong to the group I of innate lymphoid cells because they produce large amounts of type I cytokines but not type II cytokines. They also secrete a large array of chemokines and other growth factors. In the periphery, CD56^{dim} CD16^{pos} pNK cells are highly cytotoxic, whereas CD56^{bright} CD16^{neg} NK cells are cytokine producers. In the decidua, dNK cells are devoid of cytolytic activity. The lack of cell cytotoxicity has been linked to default in the polarization of the microtubule organizing centre to the immunological synapse or to failure of the 2B4 receptor to convey activating signals.^{54,55} However, induction of dNK cell cytotoxic function by cytokines, such as IL-15 and IL-18, or ligation of specific activating receptor suggests that the lytic machinery is tightly regulated in normal pregnancy but can be triggered by the appropriate stress signal.^{49,55,56} Our work and other's clearly suggest that cross-talk at the fetal–maternal interface upholds the cytotoxic function under strict control during healthy pregnancy. Inhibitory pathways involving the binding of the CD94/NKG2A inhibitory receptor to its natural ligand HLA-E expressed by the invasive fetal trophoblasts or the secretion of soluble factors such as HLA-G further comfort the tight regulation of dNK cell function during normal pregnancy.^{49,51,57}

Decidual NK cells direct trophoblast invasion

The presence of dNK cells in the vicinity of invasive fetal trophoblasts⁵⁸ and spiral arteries is suggestive of their active contribution to trophoblast attraction, which is necessary to promote decidualization and placental development. One particularity of dNK cells is their ability to produce a large range of cytokines and chemokines and angiogenic factors.^{18,50,51,59–61} Some of these soluble factors play a major role in the recruitment and attraction

of fetal trophoblasts (i.e. CXCL10/IP-10, CXCL8/IL-8, CXCL12/SDF-1 and CCL2/MCP-1).^{18,50,51,59,61} In contrast, invasive fetal trophoblasts can also help in the accumulation of dNK cells at the maternal decidua through the secretion of chemokines, such as SDF-1 and MIP-1 α .⁴³ Other factors, such as vascular endothelial growth factor (VEGF) C produced by dNK cells, can participate in immune tolerance by inducing TAP-1 expression, MHC class I molecule assembly and cell surface expression on trophoblasts.⁶⁰ The fact that this secretion profile can be modulated by the ligation of a specific NK cell receptor suggests that the cross-talk between dNK cells and the invasive trophoblast expressing NKR ligands can regulate the secretion abilities of dNK cells.⁶²

Decidual NK cells direct the remodelling of spiral arteries

Evidence for the contribution of uterine NK cells in early phases of decidual angiogenesis was first provided by B.A. Croy and her colleagues using several strains of immunodeficient mice.^{63–65} The picture is less clear in humans and the role of dNK cells in vascular remodelling is based on observations showing the presence of dNK cells in the vicinity of changing vessels. However, even if the role of human dNK cells in vasculature remodelling is not yet fully elucidated, these cells produce various pro-angiogenic and growth factors such as placental growth factor, VEGF A, and VEGF C, which can favour angiogenesis.^{50,60,66} Vascular remodelling occurs in two steps that result in loss of the musculo-elastic structure and formation of breaks in the endothelial layer, which is then followed by the attraction of EVT's that become endovascular trophoblasts and replace the endothelium lining deep into the endometrium and partly into the myometrium.^{67,68} Both steps have been linked to the presence of dNK cells at the vicinity of the changing vessels. Changes of uterine arteries are crucial for the success of pregnancy because they ensure minimal vessel

resistance and high blood flow of nutrients as well as oxygen to the conceptus.^{14,19} Immunohistochemical studies have demonstrated that the initial step of vasculature remodelling that takes place before the invasion of fetal trophoblasts is associated with significant accumulation of dNK cells and decidual macrophages within the vascular wall,^{69,70} and more recently R. Fraser and his colleagues confirmed the contribution of dNK cells to early phases of vascular remodelling in human pregnancy.⁷¹ Defaults in trophoblast invasion and/or vascular remodelling are hallmarks of pathological pregnancy, such as pre-eclampsia. Genetic studies suggested that special combinations of fetal HLA-C haplotypes and maternal dNK cell inhibitory KIRs increased the likelihood of pre-eclampsia.^{47,72–74} In a similar manner, the association of some HLA-C genotypes and maternal KIRs has been linked to defaults in trophoblast invasion. Hence, it is likely that the cross-talk between dNK cells and EVT either through ligation of activating and/or inhibitory KIR to their cognate ligands HLA-C and HLA-G or the secretion of a large panel of soluble factors by dNK cells contributes directly or indirectly to vasculature remodelling.^{45,75,76}

Decidual NK cells direct induction of fetal tolerance

Immunotolerance must play a pivotal role in providing the immune privilege during pregnancy. Fetal trophoblasts do not express the classical HLA-A or B or MHC-II molecules that clearly favour their protection from T-cell attack at the maternal decidua. The majority of CD8^{pos} and CD4^{pos} T cells found in the decidua show an induced Treg cell phenotype. However, the exact mechanism responsible for the induction of Treg cells is not yet clearly defined. It is possible that dNK cells and decidual DC participate actively in generating this tolerogenic status. Cellular cross-talks between dNK cells, decidual macrophages/DC and T cells at the fetal–maternal interface^{22,77} might result in Treg cell induction. The tolerant microenvironment can be installed through active mechanisms such as the interaction between cytotoxic T lymphocyte antigen-4 and its ligand or indirect mechanisms implicating immunoregulatory molecules such as indoleamine 2, 3-dioxygenase, TGF- β or IL-10. Significantly lower numbers of dNK cells and decidual CD4 Treg cells have been linked to spontaneous abortion, further supporting the implication of these cells in fetal tolerance.^{78–80}

Functional adaptations of NK cells during HCMV infection

Infection with human cytomegalovirus (HCMV), a member of the *Herpesviridae* family, is usually asymptomatic in healthy adults but can represent a real threat in immunocompromised patients. Primary HCMV infection is

usually followed by the establishment of lifelong latency and sporadic reactivation phases. The role of pNK cells in controlling viral infections was supported by findings that NK-cell-deficient patients are highly susceptible to viral infections.^{81,82} The pNK cells are able to recognize and kill virus-infected cells through secretion of lytic granules containing TNF-related apoptosis-inducing ligand perforin and granzymes, Fas ligand and tumour necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand.² Recent work both in healthy adults and immunocompromised patients demonstrated that HCMV infection/reactivation could imprint the NK cell receptor repertoire. HCMV infection was associated with an increased CD94/NKG2C and KIR-positive pNK cell population that expresses low levels of NKp30, NKp46 activating receptors and the CD94/NKG2A inhibitory receptor.^{83–88}

Congenital HCMV infection: role of dNK cells

Human cytomegalovirus infection is the commonest cause of congenital viral infection, affecting > 1% of live births. Primary maternal infection during the first trimester of pregnancy can lead to 40–50% of vertical transplacental transmission with permanent severe birth sequelae in almost 15% of congenitally infected newborns (i.e. neurodevelopmental abnormalities, deafness).⁸⁹ The pathogenesis and mechanisms involved in vertical transmission are still not completely understood. HCMV spreads from the infected mother's decidual cells to the fetus. Sites of viral replication include cytotrophoblast progenitor cells in chorionic villi and differentiating/invasive cytotrophoblasts.⁹⁰ Until recently, the role of dNK cells in controlling viral infection was not known. However, epidemiological studies indicate that the rate of congenital HCMV infection is often low in the first trimester of pregnancy, which coincides with high numbers of dNK cells within the decidua, which suggests that dNK cells might be involved in protection against congenital HCMV infection.

Decidual NK cells express all the receptors involved in the response to HCMV and they also contain the necessary arsenal for cell cytotoxicity (Fig. 2). In a recent work, we provided the first evidence for the involvement of dNK cells in the response against congenital HCMV infection (see Fig. 3 for visual summary). Interestingly, dNK cells can be found in the vicinity of infected cells within floating chorionic villi, suggesting that the functional plasticity of dNK cells in response to invading pathogens is associated with modulation of their migratory phenotype.⁹¹ Decidual NK cells respond to congenital HCMV infection by lowering the secretion of several soluble factors (CCL2, CCL4, CCL5, CXCL10, granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and CXCL8) that are involved in trophoblast invasion. By interfering with trophoblast invasion, dNK cells can participate actively in

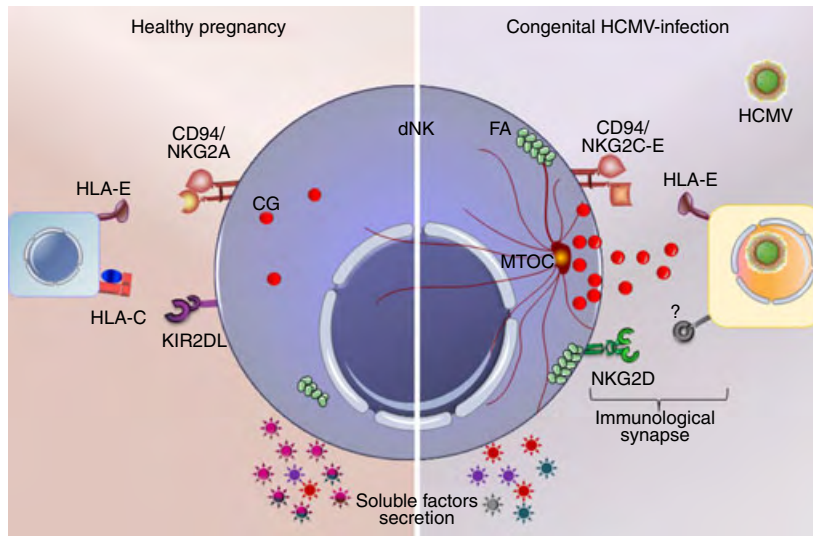


Figure 3. Decidual natural killer (dNK) cell adaptations during normal pregnancy and congenital cytomegalovirus infection: dNK cells are fully armed with cytotoxic granules enriched in granzymes and perforin (CG). During healthy pregnancy dNK cells secrete large amounts of soluble factors that participate in all processes necessary for placentation. NK cell cytotoxicity is under negative signals emanating from ligation of HLA-C and HLA-E and NKG2D ligand (?) represented by either MICA/B or ULBPs expressed on fetal trophoblast (cell in blue) to their respective inhibitory KIR and NKG2A receptors. In the case of human cytomegalovirus (HCMV) infection, dNK cells are able to recognize stress signals expressed on infected cells (yellow). They form immunological synapses, polarize their actin filament (FA), and orient their microtubule organizing centre (MTOC) and lytic granules to the synaptic area.

limiting viral spreading and congenital infection. Along the same lines, such changes within the microenvironment itself will not only limit trophoblast invasion but also induce inappropriate activation of other immune cells namely dendritic cells and T cells.

The ability to cross the placental barrier is one key determinant of invasive viruses and pathogens (hepatitis viruses, HIV, *Plasmodium*). Yet little is known about mechanisms underlying the fetal placenta tropism and the ability of dNK cells in the defence against these agents. Recent studies demonstrated that under certain conditions NK cells isolated from non-pregnant uterine mucosa and soluble factors secreted by decidual cells can control X4-tropic HIV-1 infection.^{92,93} Hence, it is conceivable that uterine NK and decidual NK cells act as local guardians against infection and their immune modulation might ensure efficient anti-viral protection.

Concluding remarks

During the first trimester of pregnancy dNK cells display unique phenotypic and functional properties that distinguish them from other peripheral blood or tissue NK cells. They orchestrate fetal trophoblast invasion and placental vasculature remodelling, which are necessary for the maintenance of a healthy pregnancy. Based on recent evidence, dNK cells may contribute to the protection of the fetus from congenital viral infections by eradicating local uterine viral infections and limiting the spreading of invading pathogens to fetal tissues. It is possible to specu-

late that defective dNK cell accumulation at the maternal decidua and/or impaired cross-talk within the local microenvironment may result in pregnancy failure. A major question is whether dNK cell response by itself is responsible for placental and fetal injuries observed in congenital infections. Future studies are necessary to unravel the molecular mechanisms controlling dNK cell functional plasticity and to understand the extent of dNK cell cross-talk with other immune cell populations and the global impact on the development of placenta and the outcome of pregnancy during congenital infections. A significant achievement in understanding the biology of NK cells was reached over the past decade. Today there is growing evidence indicating that NK cells may share more features with cells of the adaptive immune system including the development of memory in response to pathogens.^{83,84,94-96} Therefore, the challenge in the field of immunology of pregnancy would be to understand whether dNK cells share some similarities with adaptive immunity such as clonal expansion associated with the development of long-lasting 'memory-like' populations. Nonetheless, progress in our understanding of dNK cell plasticity might have larger impacts beyond pregnancy and might help in designing future immunotherapy.

Acknowledgements

This work was supported in part by the Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale and Centre National de Recherche Scientifique grants for the

UMR5282. J.S. is supported by a French PhD fellowship from the 'Ministère de l'enseignement Supérieur et de la Recherche' and the 'Fondation pour la Recherche Médicale' France. We would like to thank Dr Reem Al-Daccak (INSERM UMRS 940, Paris, France) for helpful discussions and comments on the manuscript and Dr Lounas Ferrat for critical reading of the manuscript.

Disclosures

The authors declare that they have no conflict of interest.

References

- Lanier LL. NK cell receptors. *Annu Rev Immunol* 1998; **16**:359–93.
- Lanier LL. Up on the tightrope: natural killer cell activation and inhibition. *Nat Immunol* 2008; **9**:495–502.
- Ferlazzo G, Thomas D, Lin SL, Goodman K, Morandi B, Muller WA, Moretta A, Munz C. The abundant NK cells in human secondary lymphoid tissues require activation to express killer cell Ig-like receptors and become cytolytic. *J Immunol* 2004; **172**:1455–62.
- Moretta L, Moretta A. Killer immunoglobulin-like receptors. *Curr Opin Immunol* 2004; **16**:626–33.
- Raulet DH, Vance RE. Self-tolerance of natural killer cells. *Nat Rev Immunol* 2006; **6**:520–31.
- Gerosa F, Baldani-Guerra B, Nisii C, Marchesini V, Carra G, Trinchieri G. Reciprocal activating interaction between natural killer cells and dendritic cells. *J Exp Med* 2002; **195**:327–33.
- Mocikat R, Braumuller H, Gumy A *et al*. Natural killer cells activated by MHC class II targets prime dendritic cells to induce protective CD8 T cell responses. *Immunity* 2003; **19**:561–9.
- Adam C, King S, Allgeier T *et al*. DC-NK cell cross talk as a novel CD4⁺ T-cell-independent pathway for antitumor CTL induction. *Blood* 2005; **106**:338–44.
- Piccioli D, Sbrana S, Melandri E, Valiante NM. Contact-dependent stimulation and inhibition of dendritic cells by natural killer cells. *J Exp Med* 2002; **195**:335–41.
- Kalkunte S, Chichester CO, Gotsch F, Sentman CL, Romero R, Sharma S. Evolution of non-cytotoxic uterine natural killer cells. *Am J Reprod Immunol* 2008; **59**:425–32.
- Karimi K, Arck PC. Natural killer cells: keepers of pregnancy in the turnstile of the environment. *Brain Behav Immun* 2010; **24**:339–47.
- Trowsdale J, Betz AG. Mother's little helpers: mechanisms of maternal–fetal tolerance. *Nat Immunol* 2006; **7**:241–6.
- Arck PC, Hecher K. Fetomaternal immune cross-talk and its consequences for maternal and offspring's health. *Nat Med* 2013; **19**:548–56.
- Moffett A, Loke C. Immunology of placentation in eutherian mammals. *Nat Rev Immunol* 2006; **6**:584–94.
- Erlebacher A, Vencato D, Price KA, Zhang D, Glimcher LH. Constraints in antigen presentation severely restrict T cell recognition of the allogeneic fetus. *J Clin Invest* 2007; **117**:1399–411.
- Cooper MA, Fehniger TA, Caligiuri MA. The biology of human natural killer-cell subsets. *Trends Immunol* 2001; **22**:633–40.
- Koopman LA, Kopcow HD, Rybalov B *et al*. Human decidual natural killer cells are a unique NK cell subset with immunomodulatory potential. *J Exp Med* 2003; **198**:1201–12.
- Moffett-King A. Natural killer cells and pregnancy. *Nat Rev Immunol* 2002; **2**:656–63.
- Pearson H. Reproductive immunology: immunity's pregnant pause. *Nature* 2002; **420**:265–6.
- Munoz-Suano A, Hamilton AB, Betz AG. Gimme shelter: the immune system during pregnancy. *Immunol Rev* 2011; **241**:20–38.
- Bulmer JN, Pace D, Ritson A. Immunoregulatory cells in human decidua: morphology, immunohistochemistry and function. *Reprod Nutr Dev* 1988; **28**:1599–613.
- Kammerer U, Eggert AO, Kapp M, McLellan AD, Geijtenbeek TB, Dietl J, van Kooyk Y, Kamppen E. Unique appearance of proliferating antigen-presenting cells expressing DC-SIGN (CD209) in the decidua of early human pregnancy. *Am J Pathol* 2003; **162**:887–96.
- Palucka KA, Taquet N, Sanchez-Chapuis F, Gluckman JC. Dendritic cells as the terminal stage of monocyte differentiation. *J Immunol* 1998; **160**:4587–95.
- Rieger L, Honig A, Sutterlin M, Kapp M, Dietl J, Ruck P, Kammerer U. Antigen-presenting cells in human endometrium during the menstrual cycle compared to early pregnancy. *J Soc Gynecol Invest* 2004; **11**:488–93.
- Aluvihare VR, Kallikourdis M, Betz AG. Regulatory T cells mediate maternal tolerance to the fetus. *Nat Immunol* 2004; **5**:266–71.
- Samstein RM, Arvey A, Josefowicz SZ *et al*. Foxp3 exploits a pre-existent enhancer landscape for regulatory T cell lineage specification. *Cell* 2012; **151**:153–66.
- Tilburgs T, Roelen DL, van der Mast BJ, de Groot-Swings GM, Kleijburg C, Scherjon SA, Claas FH. Evidence for a selective migration of fetus-specific CD4⁺ CD25^{bright} regulatory T cells from the peripheral blood to the decidua in human pregnancy. *J Immunol* 2008; **180**:5737–45.
- Tilburgs T, Roelen DL, van der Mast BJ *et al*. Differential distribution of CD4⁺ CD25^{bright} and CD8⁺ CD28⁻ T-cells in decidua and maternal blood during human pregnancy. *Placenta* 2006; **27**(Suppl. A):S47–53.
- Knofler M. Critical growth factors and signalling pathways controlling human trophoblast invasion. *Int J Dev Biol* 2010; **54**:269–80.
- Jones RL, Stoikos C, Findlay JK, Salamonsen LA. TGF- β superfamily expression and actions in the endometrium and placenta. *Reproduction* 2006; **132**:217–32.
- Lunghi L, Ferretti ME, Medici S, Biondi C, Vesce F. Control of human trophoblast function. *Reprod Biol Endocrinol* 2007; **5**:6.
- Audus KL, Soares MJ, Hunt JS. Characteristics of the fetal/maternal interface with potential usefulness in the development of future immunological and pharmacological strategies. *J Pharmacol Exp Ther* 2002; **301**:402–9.
- Bulmer JN, Lash GE. Human uterine natural killer cells: a reappraisal. *Mol Immunol* 2005; **42**:511–21.
- Kane N, Kelly R, Saunders PT, Critchley HO. Proliferation of uterine natural killer cells is induced by human chorionic gonadotropin and mediated via the mannose receptor. *Endocrinology* 2009; **150**:2882–8.
- Vacca P, Moretta L, Moretta A, Mingari MC. Origin, phenotype and function of human natural killer cells in pregnancy. *Trends Immunol* 2011; **32**:517–23.
- Bilinski MJ, Thorne JG, Oh MJ, Leonard S, Murrant C, Tayade C, Croy BA. Uterine NK cells in murine pregnancy. *Reprod Biomed Online* 2008; **16**:218–26.
- Manaster I, Mandelboim O. The unique properties of human NK cells in the uterine mucosa. *Placenta* 2008; **29**(Suppl. A):S60–6.
- Carlino C, Stabile H, Morrone S *et al*. Recruitment of circulating NK cells through decidual tissues: a possible mechanism controlling NK cell accumulation in the uterus during early pregnancy. *Blood* 2008; **111**:3108–15.
- Vacca P, Vitale C, Montaldo E *et al*. CD34⁺ hematopoietic precursors are present in human decidua and differentiate into natural killer cells upon interaction with stromal cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2011; **108**:2402–7.
- Eriksson M, Meadows SK, Wira CR, Sentman CL. Unique phenotype of human uterine NK cells and their regulation by endogenous TGF- β . *J Leukoc Biol* 2004; **76**:667–75.
- Keskin DB, Allan DS, Rybalov B, Andzelm MM, Stern JN, Kopcow HD, Koopman LA, Strominger JL. TGF β promotes conversion of CD16⁺ peripheral blood NK cells into CD16⁻ NK cells with similarities to decidual NK cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007; **104**:3378–83.
- Drake PM, Gunn MD, Charo IF, Tsou CL, Zhou Y, Huang L, Fisher SJ. Human placental cytotrophoblasts attract monocytes and CD56^{bright} natural killer cells via the actions of monocyte inflammatory protein 1 α . *J Exp Med* 2001; **193**:1199–212.
- Hanna J, Wald O, Goldman-Wohl D *et al*. CXCL12 expression by invasive trophoblasts induces the specific migration of CD16⁻ human natural killer cells. *Blood* 2003; **102**:1569–77.
- Kunkel EJ, Butcher EC. Chemokines and the tissue-specific migration of lymphocytes. *Immunology* 2002; **16**:1–4.
- Parham P, Guethlein LA. Pregnancy immunogenetics: NK cell education in the womb? *J Clin Invest* 2010; **120**:3801–4.
- Cerdeira AS, Rajakumar A, Royle CM *et al*. Conversion of peripheral blood NK cells to a decidual NK-like phenotype by a cocktail of defined factors. *J Immunol* 2013; **190**:3939–48.
- Male V, Sharkey A, Masters L, Kennedy PR, Farrell LE, Moffett A. The effect of pregnancy on the uterine NK cell KIR repertoire. *Eur J Immunol* 2011; **41**:3017–27.
- Ferlazzo G, Pack M, Thomas D *et al*. Distinct roles of IL-12 and IL-15 in human natural killer cell activation by dendritic cells from secondary lymphoid organs. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004; **101**:16606–11.
- El Costa H, Casemayou A, Aguerre-Girr M *et al*. Critical and differential roles of Nkp46- and Nkp30-activating receptors expressed by uterine NK cells in early pregnancy. *J Immunol* 2008; **181**:3009–17.
- Hanna J, Goldman-Wohl D, Hamani Y *et al*. Decidual NK cells regulate key developmental processes at the human fetal–maternal interface. *Nat Med* 2006; **12**:1065–74.
- Le Bouteiller P, Siewiera J, Casart Y, Aguerre-Girr M, El Costa H, Berrebi A, Tabiasco J, Jabrane-Ferrat N. The human decidual NK-cell response to virus infection: what can we learn from circulating NK lymphocytes? *J Reprod Immunol* 2011; **88**:170–5.
- Male V, Trundley A, Gardner L, Northfield J, Chang C, Apps R, Moffett A. Natural killer cells in human pregnancy. *Methods Mol Biol* 2010; **612**:447–63.
- Male V, Hughes T, McClory S, Colucci F, Caligiuri MA, Moffett A. Immature NK cells, capable of producing IL-22, are present in human uterine mucosa. *J Immunol* 2010; **185**:3913–8.

- 54 Vacca P, Pietra G, Falco M *et al.* Analysis of natural killer cells isolated from human decidua: evidence that 2B4 (CD244) functions as an inhibitory receptor and blocks NK-cell function. *Blood* 2006; **108**:4078–85.
- 55 Kopcow HD, Allan DS, Chen X, Rybalov B, Andzelm MM, Ge B, Strominger JL. Human decidua NK cells form immature activating synapses and are not cytotoxic. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005; **102**:15563–8.
- 56 El Costa H, Tabiasco J, Berrebi A, Parant O, Aguerre-Girr M, Piccinni MP, Le Bouteiller P. Effector functions of human decidua NK cells in healthy early pregnancy are dependent on the specific engagement of natural cytotoxicity receptors. *J Reprod Immunol* 2009; **82**:142–7.
- 57 King A, Allan DS, Bowen M *et al.* HLA-E is expressed on trophoblast and interacts with CD94/NKG2 receptors on decidua NK cells. *Eur J Immunol* 2000; **30**:1623–31.
- 58 Helige C, Hagendorfer G, Smolle J, Dohr G. Uterine natural killer cells in a three-dimensional tissue culture model to study trophoblast invasion. *Lab Invest* 2001; **81**:1153–62.
- 59 Hanna J, Mandelboim O. When killers become helpers. *Trends Immunol* 2007; **28**:201–6.
- 60 Kalkunte SS, Mselle TF, Norris WE, Wira CR, Sentman CL, Sharma S. Vascular endothelial growth factor C facilitates immune tolerance and endovascular activity of human uterine NK cells at the maternal–fetal interface. *J Immunol* 2009; **182**:4085–92.
- 61 Moffett A, Hiby SE. How does the maternal immune system contribute to the development of pre-eclampsia? *Placenta* 2007; **28**(Suppl. A):S51–6.
- 62 Vacca P, Cantoni C, Prato C, Fulcheri E, Moretta A, Moretta L, Mingari MC. Regulatory role of NKP44, NKP46, DNAM-1 and NKG2D receptors in the interaction between NK cells and trophoblast cells. Evidence for divergent functional profiles of decidua versus peripheral NK cells. *Int Immunol* 2008; **20**:1395–405.
- 63 Croy BA, Esadeg S, Chantakru S *et al.* Update on pathways regulating the activation of uterine Natural Killer cells, their interactions with decidua spiral arteries and homing of their precursors to the uterus. *J Reprod Immunol* 2003; **59**:175–91.
- 64 Croy BA, He H, Esadeg S *et al.* Uterine natural killer cells: insights into their cellular and molecular biology from mouse modelling. *Reproduction* 2003; **126**:149–60.
- 65 Hofmann AP, Gerber SA, Croy BA. Uterine natural killer cells pace early development of mouse decidua basalis. *Mol Hum Reprod* 2013; doi: 10.1093.
- 66 Lash GE, Schiessl B, Kirkley M, Innes BA, Cooper A, Searle RF, Robson SC, Bulmer JN. Expression of angiogenic growth factors by uterine natural killer cells during early pregnancy. *J Leukoc Biol* 2006; **80**:572–80.
- 67 Harris LK. Review: trophoblast–vascular cell interactions in early pregnancy: how to remodel a vessel. *Placenta* 2010; **31**(Suppl):S93–8.
- 68 Harris LK, Smith SD, Keogh RJ *et al.* Trophoblast- and vascular smooth muscle cell-derived MMP-12 mediates elastolysis during uterine spiral artery remodeling. *Am J Pathol* 2010; **177**:2103–15.
- 69 Craven CM, Morgan T, Ward K. Decidua spiral artery remodelling begins before cellular interaction with cytotrophoblasts. *Placenta* 1998; **19**:241–52.
- 70 Hazan AD, Smith SD, Jones RL, Whittle W, Lye SJ, Dunk CE. Vascular–leukocyte interactions: mechanisms of human decidua spiral artery remodeling *in vitro*. *Am J Pathol* 2010; **177**:1017–30.
- 71 Fraser R, Whitley GS, Johnstone AP, Host AJ, Sebire NJ, Thilaganathan B, Cartwright JE. Impaired decidua natural killer cell regulation of vascular remodelling in early human pregnancies with high uterine artery resistance. *J Pathol* 2012; **228**:322–32.
- 72 Hiby SE, Apps R, Sharkey AM *et al.* Maternal activating KIRs protect against human reproductive failure mediated by fetal HLA-C2. *J Clin Invest* 2010; **120**:4102–10.
- 73 Hiby SE, Ashrafian-Bonab M, Farrell L, Single RM, Balloux F, Carrington M, Moffett A, Ebrahimi Z. Distribution of killer cell immunoglobulin-like receptors (KIR) and their HLA-C ligands in two Iranian populations. *Immunogenetics* 2010; **62**:65–73.
- 74 Hiby SE, Regan L, Lo W, Farrell L, Carrington M, Moffett A. Association of maternal killer-cell immunoglobulin-like receptors and parental HLA-C genotypes with recurrent miscarriage. *Hum Reprod* 2008; **23**:972–6.
- 75 Chazara O, Xiong S, Moffett A. Maternal KIR and fetal HLA-C: a fine balance. *J Leukoc Biol* 2011; **90**:703–16.
- 76 Rajagopalan S, Long EO. KIR2DL4 (CD158d): an activation receptor for HLA-G. *Front Immunol* 2012; **3**:258.
- 77 Vacca P, Cantoni C, Vitale M *et al.* Crosstalk between decidua NK and CD14⁺ myelomonocytic cells results in induction of Tregs and immunosuppression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010; **107**:11918–23.
- 78 Quack KC, Vassiliadou N, Pudney J, Anderson DJ, Hill JA. Leukocyte activation in the decidua of chromosomally normal and abnormal fetuses from women with recurrent abortion. *Hum Reprod* 2001; **16**:949–55.
- 79 Saito S, Nakashima A, Shima T, Ito M. Th1/Th2/Th17 and regulatory T-cell paradigm in pregnancy. *Am J Reprod Immunol* 2010; **63**:601–10.
- 80 Wallace AE, Fraser R, Cartwright JE. Extravillous trophoblast and decidua natural killer cells: a remodelling partnership. *Hum Reprod Update* 2012; **18**:458–71.
- 81 Biron CA, Byron KS, Sullivan JL. Severe herpesvirus infections in an adolescent without natural killer cells. *N Engl J Med* 1989; **320**:1731–5.
- 82 Orange JS. Human natural killer cell deficiencies and susceptibility to infection. *Microbes Infect* 2002; **4**:1545–58.
- 83 Foley B, Cooley S, Verneris MR *et al.* Cytomegalovirus reactivation after allogeneic transplantation promotes a lasting increase in educated NKG2C⁺ natural killer cells with potent function. *Blood* 2012; **119**:2665–74.
- 84 Lopez-Verges S, Milush JM, Schwartz BS *et al.* Expansion of a unique CD57⁺ NKG2C^{hi} natural killer cell subset during acute human cytomegalovirus infection. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2011; **108**:14725–32.
- 85 Marcus A, Raulet DH. Evidence for natural killer cell memory. *Curr Biol* 2013; **23**:R817–20.
- 86 Muntasell A, Vilches C, Angulo A, Lopez-Botet M. Adaptive reconfiguration of the human NK-cell compartment in response to cytomegalovirus: a different perspective of the host–pathogen interaction. *Eur J Immunol* 2013; **43**:1133–41.
- 87 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**:3664–71.
- 88 Guma M, Budt M, Saez A, Brckalo T, Hengel H, Angulo A, Lopez-Botet M. Expansion of CD94/NKG2C⁺ NK cells in response to human cytomegalovirus-infected fibroblasts. *Blood* 2006; **107**:3624–31.
- 89 Whitley RJ. Congenital cytomegalovirus infection: epidemiology and treatment. *Adv Exp Med Biol* 2004; **549**:155–60.
- 90 Maidji E, Genbacev O, Chang HT, Pereira L. Developmental regulation of human cytomegalovirus receptors in cytotrophoblasts correlates with distinct replication sites in the placenta. *J Virol* 2007; **81**:4701–12.
- 91 Siewiera J, El Costa H, Tabiasco J, Berrebi A, Cartron G, Le Bouteiller P, Jabrane-Ferrat N. Human cytomegalovirus infection elicits new decidua natural killer cell effector functions. *PLoS Pathog* 2013; **9**:e1003257.
- 92 Marlin R, Nugeyre MT, Duriez M, Cannou C, Le Breton A, Berkane N, Barre-Sinoussi F, Menu E. Decidua soluble factors participate in the control of HIV-1 infection at the maternofetal interface. *Retrovirology* 2011; **8**:58.
- 93 Mselle TF, Howell AL, Ghosh M, Wira CR, Sentman CL. Human uterine natural killer cells but not blood natural killer cells inhibit human immunodeficiency virus type 1 infection by secretion of CXCL12. *J Virol* 2009; **83**:11188–95.
- 94 Sun JC, Beilke JN, Lanier LL. Immune memory redefined: characterizing the longevity of natural killer cells. *Immunol Rev* 2010; **236**:83–94.
- 95 Sun JC, Lanier LL. Versatility in NK cell memory. *Immunol Cell Biol* 2011; **89**:327–9.
- 96 Vivier E, Raulet DH, Moretta A, Caligiuri MA, Zitvogel L, Lanier LL, Yokoyama WM, Ugolini S. Innate or adaptive immunity? The example of natural killer cells. *Science* 2011; **331**:44–9.

Annexe 4:

The human decidual NK-cell response to virus infection: what can we learn from circulating NK lymphocytes?

Le Bouteiller P, Siewiera J, Casart Y, Aguerre-Girr M, El Costa H, Berrebi A, Tabiasco J, Jabrane-Ferrat N.

J Reprod Immunol. 2011 Mar;88(2):170-5.



The human decidual NK-cell response to virus infection: what can we learn from circulating NK lymphocytes?

Philippe Le Bouteiller^{a,b,*}, Johan Siewiera^{a,b}, Ysabel Casart^{a,b}, Maryse Aguerre-Girr^{a,b}, Hicham El Costa^{a,b}, Alain Berrebi^{a,c}, Julie Tabiasco^{a,b}, Nabila Jabrane-Ferrat^{a,b,*}

^a Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, UMR 1043, Toulouse 31300, France

^b Université de Toulouse, Centre National de la Recherche Scientifique, Toulouse, France

^c Service de Gynécologie-Obstétrique, Centre Hospitalo-Universitaire de Toulouse, Hôpital Paule de Viguière, 31059 Toulouse, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 24 September 2010

Received in revised form

19 November 2010

Accepted 14 December 2010

Keywords:

Decidual NK cells

NK cell receptors

Virus infection

Pregnancy

ABSTRACT

NK cells present in the peripheral blood respond rapidly to pathogens or pathogen-infected cells by various means including cytotoxicity and production of cytokines. Whether decidual NK (dNK) cells are able to play a similar role when the pregnant uterus is infected by viruses is still largely unknown. Decidual NK cells are generally considered as poorly cytotoxic when compared to their peripheral blood counterparts. However, we have recently demonstrated that freshly isolated dNK cells from healthy early pregnant uterus do have a cytotoxic potential mediated by the specific engagement of NKp46 activating receptor. We further found that the co-engagement of CD94/NKG2A inhibiting receptor drastically inhibits the cytolytic function of dNK. This latter observation suggests that *in situ* the CD94/NKG2A receptor interaction with its HLA-E specific ligand is a dominant negative regulatory mechanism that prevents unwanted dNK cell cytotoxicity in non-infected pregnant uterus. How do dNK cells behave when they are activated by virus-infected cells present at the maternal–fetal interface? Largely based on data obtained from circulating NK cells, this review briefly discusses the following questions: Does uterine viral infection promote decidual NK cell proliferative capacity *in situ*? Are dNK cells able to kill virus-infected autologous decidual target cells and thus limit the virus spreading to the fetus? Which viral-mediated signal(s) and molecular interactions may subvert inhibition of dNK cytotoxic potential? Does uterine viral infection promote decidual NK cell secretion of cytokines and chemokines that boost the anti-viral immune response?

© 2011 Elsevier Ireland Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Peripheral blood natural killer (PB-NK) cells express a repertoire of activating and inhibitory cell surface receptors (Lanier, 2005). Activation of effector functions in PB-NK cells results from a combination of positive and negative

signals arising from engagement of these receptors with their specific physiological ligands (Tabiasco et al., 2006; Saito et al., 2008). In contrast to PB-NK cells, decidual NK (dNK) cells taken from the same individuals at the same time express an identical receptor repertoire in all women tested (Moffett-King, 2002; El Costa et al., 2008, 2009). The major differences observed between dNK freshly isolated from the placental bed (*decidua basalis*) of 1st or 3rd trimester pregnancy and PB-NK deal with CD16, CD160, NKp44 and ILT2 expression (El Costa et al., 2008, 2009; Williams et al., 2009). The major subset of dNK cells in early pregnancy is CD16^{neg} and CD160^{neg}, in contrast with PB-NK which are mostly CD16^{pos} and CD160^{pos} (El Costa

* Corresponding authors at: Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, UMRS 1043; Hôpital Purpan, Bât. A, BP 3028, 31024 Toulouse Cedex 3, France. Tel.: +33 562 748 374; fax: +33 562 744 558.

E-mail addresses: philippe.le-bouteiller@inserm.fr (P. Le Bouteiller), nabila.jabrane-ferrat@inserm.fr (N. Jabrane-Ferrat).

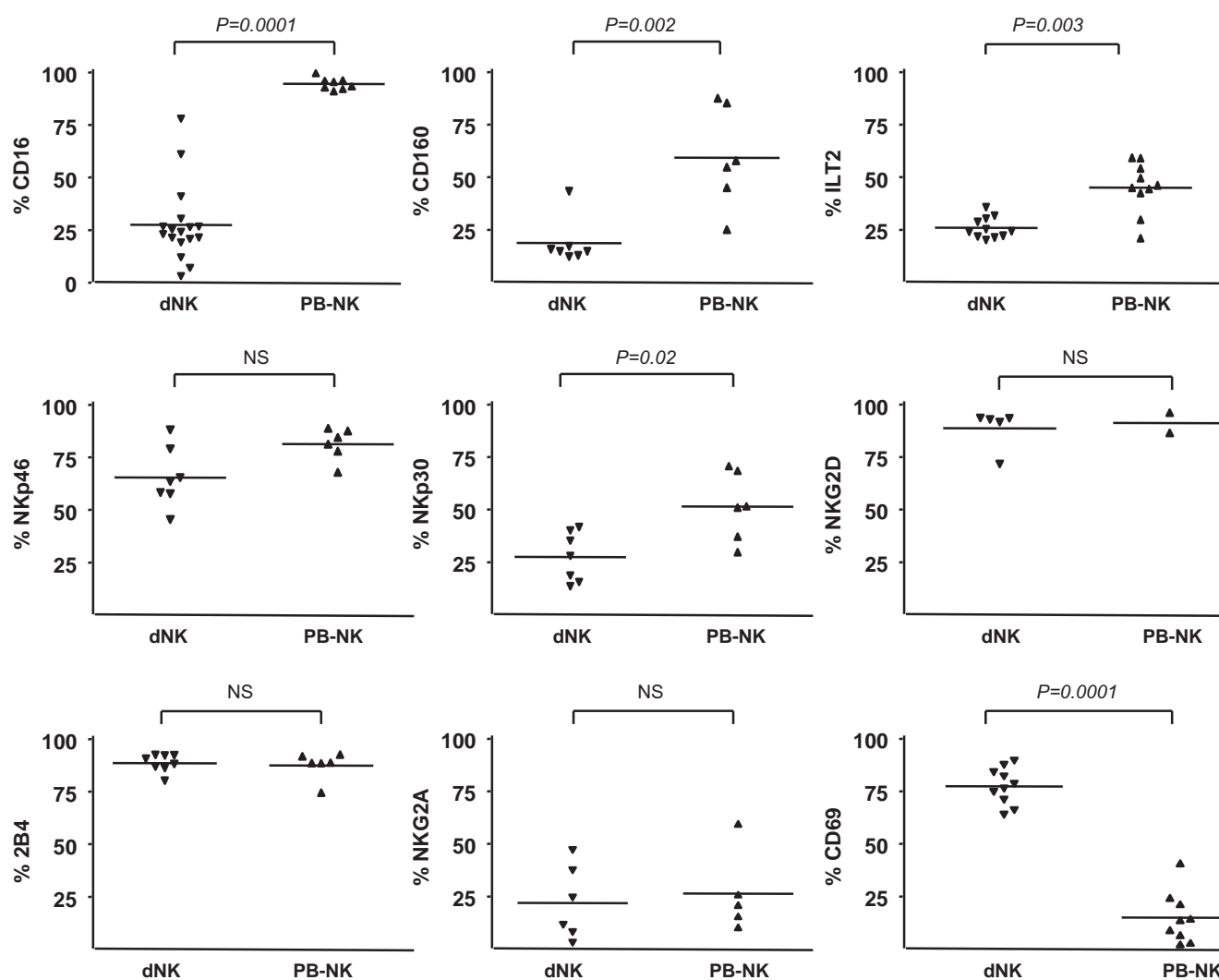


Fig. 1. Comparative frequencies of activating (CD16, CD160, NKp46, and NKp30) and inhibitory (ILT2) receptors as well as CD69 activation marker expression in freshly isolated decidual NK cells (dNK) from term *decidua basalis* and peripheral blood NK cells (PB-NK) from the same pregnant women: flow cytometry analysis. The percentages of CD3^{neg} CD56^{pos} gated NK cells expressing the indicated markers (x -axis) are shown. Each data point represents one individual (three-color staining). Lines indicate median values. Purity of dNK and PB-NK was >96%. Statistical differences were determined using the Mann–Whitney test. NS, not significant.

et al., 2008). At term, the frequency of CD16^{pos}/CD160^{pos} dNK increases but never reaches the level of corresponding PB-NK from the same pregnant women (Fig. 1). A subset of dNK (~25%) is NKp44^{pos} whereas PB-NK cells always remain NKp44^{neg}. Finally, ~40% of dNK from 1st trimester and ~10% from 3rd trimester pregnancies express ILT2, whereas 20–25% of PB-NK express this receptor (El Costa et al., 2009). NKG2D and 2B4 (CD244) are expressed on 100% of the dNK and PB-NK (Kopcow et al., 2005; Vacca et al., 2006; El Costa et al., 2008). NKG2C and NKp30 are present on ~30% of dNK from early or term pregnancy. NKG2A and KIR2DL4 inhibitory receptors are similarly expressed on both dNK and PB-NK from 1st trimester or term pregnancy (El Costa et al., 2009). Decidual NK also exhibit an activated CD69^{pos} phenotype contrasting with PB-NK (El Costa et al., 2009).

NK cells are an important component of the innate first line of defence against viral infections, in particular the Herpes viridae family members such as herpes simplex virus, Epstein Bar virus (EBV) and cytomegalovirus

(CMV) (Cerwenka and Lanier, 2001; Lanier, 2005). PB-NK cells are activated and proliferate during the early stages of viral infections, thus limiting the magnitude and duration of viral persistence. PB-NK cells also respond to virus infections by up regulating their cytotoxic potential and the production of inflammatory cytokines, including interferon- γ , and various chemokines (Vivier et al., 2008). Such NK cell activation is mediated by specific engagement of activating receptors including NKp46, NKp30, NKp44, designated as natural cytotoxicity receptors, CD16 (Fc γ RIII), a low affinity receptor for IgG, that all signal through immunoreceptor tyrosine-based activation motifs (ITAM), CD94/NKG2C associated with the ITAM-containing DAP12 (Vivier et al., 2008), CD160 (Le Bouteiller et al., 2002; Barakonyi et al., 2004) that signals through phosphatidylinositol 3-kinase (Rabot et al., 2007) and KIR2DL4 that utilizes a new mode of endosomal signaling after binding its physiological ligand, soluble HLA-G (Rajagopalan et al., 2010). 2B4 is a coreceptor that synergizes with NKp46 and NKG2D (Bryceson et al., 2006). In normal non-pathologic

conditions, activation of NK cells is impaired by inhibitory NK cell receptors such as killer cell immunoglobulin-like receptors containing immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motifs (ITIM), CD94/NKG2A lectin-like receptor as well as ILT2/LILRB1 (Cerwenka and Lanier, 2001; Vivier et al., 2008). All of these inhibitory receptors are specific for various major histocompatibility (MHC) class I molecules (Cerwenka and Lanier, 2001; Vivier et al., 2008). Whereas the anti-viral function of PB-NK has been largely explored, much less is known about the role of dNK cells to limit viral replication and spreading in the pregnant uterus. The fetus is indeed highly susceptible to viral infections (Pereira et al., 2005). A number of viruses including CMV, HIV, and respiratory syncytial virus may cause severe congenital infections, including neurological. The spreading of viruses during pregnancy can be prevented by a number of non-exclusive mechanisms (Marlin et al., 2009), including $\gamma\delta$ T cell response *in utero* (Vermijlen et al., 2010). Whereas the role of dNK cells to control trophoblast invasion and uterine vascular remodeling in normal pregnancy has been recently reported (Hanna et al., 2006; Le Bouteiller and Tabiasco, 2006; Zhang et al., 2010), fewer reports deal with the anti-viral function dNK cells could exert (Markel et al., 2002; Hanna et al., 2004; Mselle et al., 2009).

Several NK cell receptors are implicated in the recognition of virally infected cells. Knowing that the pattern of expression of activating and inhibitory receptor repertoire of dNK differs from the PB-NK counterparts, this review will raise a number of questions about the anti-viral immune effector function which could be exerted by dNK cells in infected pregnant uterus.

2. Does uterine viral infection promote decidual NK cell proliferative capacity *in situ*?

In studies using PB-NK cells, contradictory results have been reported to date. PB-NK cell subsets that preferentially expand during human CMV (hCMV) infection have been documented in several studies (Guma et al., 2004; Kuijpers et al., 2008; van Stijn et al., 2008). A decrease in PB-NK cell numbers has also been reported during infection of humans with HIV or hepatitis C virus (Lee et al., 2009). In mice, activating receptors promote PB-NK cell expansion during viral infection to regulate an efficient adaptive immune response (Lee et al., 2009). Decidual NK cells were shown to proliferate only after *in vitro* stimulation with high concentrations of IL-15 (Verma et al., 2000; Marlin et al., 2009). However, it remains to be demonstrated whether virus-infected decidual cells can provide efficient stimulation signals to trigger *in situ* dNK proliferation.

3. Which viral-mediated signal(s) and molecular interactions may subvert inhibition of decidual NK cell cytolytic function?

One hallmark of dNK cells in normal early pregnancy is that they are poorly cytotoxic despite their content of perforin, granzymes A and B and granulysin (Rukavina and Podack, 2000; Kopcow et al., 2005; Vacca et al., 2008; Bulmer et al., 2010). Such dNK cells fail to polarize their

microtubules and perforin granules to the immunological synapse (Kopcow et al., 2005). A recent report further indicates that dNK cells at term lose their lytic granules (Williams et al., 2009). However, dNK are able to acquire full cytotoxic effector function (King et al., 1989; Koopmann et al., 1997; Saito, 2000; El Costa et al., 2008; Kalkunte et al., 2009). What happens in the context of virus-infected decidua? Integration of inhibitory and activating receptor signals determines the NK cell anti-viral response. NK cell effector functions are triggered by the dominant engagement of activating receptors with specific cell surface ligands expressed by the infected host cells or by the virus itself. Modulation of expression of both inhibitory and activating dNK receptors and/or of their specific physiological ligands should thus determine whether infected decidual target cells in the *decidua basalis* will be killed or not by dNK cells.

We found that freshly isolated dNK cells from 1st trimester pregnancy have the potential to kill P815 target cells after specific engagement of either NKp46 or, to a lesser extent, CD94/NKG2C activating receptors (El Costa et al., 2008, 2009). We further demonstrated that co-engagement of NKG2A inhibitory receptor abolished the NKp46-mediated cytolytic activity of dNK cells, suggesting that the poor cytolytic activity of dNK *in situ* could be due to specific interactions between the CD94/NKG2A dominant inhibitory receptor and HLA-E ligand expressed by trophoblast and other decidual cells (Le Bouteiller and Sargent, 2000; Moffett-King, 2002; El Costa et al., 2008; Williams et al., 2009). In line with this observation, decreased expression of CD94/NKG2A receptor has been observed on the PB-NK cells of patients infected with HIV-1 (Mela et al., 2005). Whether the level of NKG2A expression is also down-modulated on dNK cells after viral infection remains to be demonstrated.

The generation of 2B4-deficient mice has demonstrated an inhibitory function for this receptor on PB-NK cells both *in vitro* and *in vivo* (Waggoner et al., 2010). 2B4 also functions as an inhibitory receptor on human dNK cells (Vacca et al., 2006): cross-linking of 2B4 resulted in inhibition of both cytolytic activity and IFN γ production. The 2B4 inhibitory function is related to the deficient expression of signaling lymphocyte activation molecule (SLAM)-associated protein (SAP) mRNA. According to Vacca et al. (2006) “this might suggest that dNK cells, although potentially capable of killing, are inhibited in their function when interacting with cells expressing CD48”. Since the CD48 ligand of 2B4 is expressed by decidual leukocytes (Apps et al., 2008), it remains to be determined whether the level of CD48 expression is decreased on virally infected decidual target cells. After influenza virus infection, the binding of the KIR2DL1 and ILT2 inhibitory receptors to the infected cells is increased (Achdout et al., 2008). Furthermore, it has been shown that unlicensed murine NK cells lacking MHC class I inhibitory receptors are very efficient at eliminating *in vivo* CMV infection (Wilkinson et al., 2008; Orr et al., 2010). In contrast to a possible decrease of expression of dNK inhibitory receptors and/or of their physiological ligands, dNK activating receptors may also be affected after uterine viral infection.

Studies in both human and mice show that the frequencies of NK cell subsets expressing a particular activating receptor change during viral infection. Epidemiologic and functional studies have demonstrated a specific interaction between KIR3DS1 activating NK cell receptor and HLA-Bw4801 in the NK cell response to HIV-1 (Yokoyama et al., 2010). NK cell interaction with HIV-1-infected dendritic cells modifies NK cell repertoire expression: a strong decrease in ILT2 (which can exhibit activating properties) and a significant increase in CD161 expression were observed on PB-NK cells co-cultured with HIV-1 infected dendritic cells (Scott-Algara et al., 2008). The same study further demonstrated that the ILT2^{POS} NK cell subset controlled HIV-1 replication in autologous dendritic cells by specific interaction between ILT2 and an unknown dendritic cell surface ligand that is distinct from HLA class I molecules (Scott-Algara et al., 2008). Cohort studies have demonstrated that natural cytotoxicity receptor profile on NK cells is imprinted by CMV infection (Guma et al., 2004). An increased proportion of CD94/NKG2C activating receptor was observed among PB-NK in healthy hCMV seropositive individuals (Guma et al., 2006). A CD94/NKG2C subset of PB-NK preferentially expands after co-culture with hCMV-infected fibroblasts (Guma et al., 2006). Increase of PB-NK cells expressing the NKp30 activating receptor has also been reported during chronic HCV infection (De Maria et al., 2007).

Viral infection may expose pathogen-encoded ligands for dNK cell activating receptors on the cell surface. Some viruses provide cellular viral ligands for NK cell activating receptors that reduce NK cell cytotoxicity (Cerwenka and Lanier, 2001) and/or down-modulate HLA class I ligands for NK cell inhibitory receptors such as KIRs or CD94/NKG2A (Ulbrecht et al., 2000; Cerwenka and Lanier, 2001). Expression of NKG2D ligands has also been reported to be triggered by virus infection. NKG2D-deficient mice have an enhanced NK cell-mediated resistance to mouse CMV infection (Zafirova et al., 2009). Adenovirus as well as hCMV immediate early proteins are potent activators of NK cells (Wilkinson et al., 2008). Flavivirus proteins engagement of NKp44 activating receptor, following interaction with the flavivirus or flavivirus-infected cells results in NK cell activation, i.e., IFN γ secretion, NK cell degranulation and augmented lysis of flavivirus-infected cells (Hershkovitz et al., 2009). Up-regulation of NKp44 in CD3^{POS} T cells after hCMV infection was also observed. Many viruses down regulate cell surface expression of HLA class I molecules (Cerwenka and Lanier, 2001). However, some viruses enhance HLA-class I expression levels on infected target cells, reducing susceptibility of virus-infected cells to NK lysis by a better interaction of KIR inhibitory receptors with their HLA specific ligands (Hershkovitz et al., 2008). Immuno-evasive strategies have been described to date to down-modulate the level of expression of these ligands (Griffin et al., 2010). A down-modulation of NKG2D ligands has been reported after viral infection (Jonjic et al., 2008). However, the observation that hCMV infection up-regulates the CD94/NKG2C subset suggests that the level of HLA-E specific ligand of this activating receptor on infected cells is not affected (Guma et al., 2006).

4. Does uterine viral infection promotes decidual NK cell secretion of cytokines and chemokines that boost the anti-viral immune response?

The communication between dNK cells and other virus-infected decidual cells may result in the modulation of dNK migratory phenotype. dNK indeed express a distinct repertoire of adhesion molecules and chemokine receptors compared with PB-NK counterpart (Santoni et al., 2007; Carlino et al., 2008). CXCL12 secretion by extravillous trophoblast induces the specific migration of CD16^{neg} NK cells (Hanna et al., 2003). In line of this latter observation, a recent study demonstrates that dNK but not PB-NK cells inhibit HIV-1 infection by secretion of CXCL12 (Mselle et al., 2009). PB-NK cells are efficient against HIV infection by producing other chemokines including MIP-1 α and MIP-1 β which are natural ligands of CCR5, thus blocking viruses that use this co-receptor for cell entry (Choe et al., 1996; Derrien et al., 2005; Fauci et al., 2005). PB-NK cells also secrete GM-CSF which contributes to the suppression of HIV replication by recruiting other immune effector cells (Fauci et al., 2005).

In normal pregnancy, dNK cells produce a large array of cytokines, chemokines and growth factors after interacting with specific ligands of NKp44 and NKp30 activating receptors expressed by trophoblast and decidual stromal cells (Saito, 2000; Moffett-King, 2002; Moffett et al., 2004; Hanna et al., 2006; Le Bouteiller and Tabiasco, 2006; El Costa et al., 2009; Lash et al., 2010). We have demonstrated that dNK cells produce MIP1 α , MIP1 β , and GM-CSF after specific engagement of the NKp30 activating receptor (El Costa et al., 2008, 2009). Alteration in the secretion profile of dNK may occur during uterine viral infection, impacting the level of local innate immune response against pathogens. Such secretions indeed favour the recruitment of several maternal immune cells including dendritic cells and T cells (Moffett-King, 2002; Moffett et al., 2004; Hanna et al., 2006). It was further shown that specific engagement of KIR2DL4 receptor expressed by dNK results in IFN γ secretion (Goodridge et al., 2009; Rajagopalan et al., 2010), known to activate the NK killing properties.

5. Conclusions

Emerging evidence suggests that dNK cells may contribute in early pregnancy to eradicating local uterine viral infections. Further studies are needed to provide definitive proof that this is the case and to unravel the molecular mechanisms controlling this dNK effector function.

Acknowledgements

This research was supported by grants from the Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale and Université Paul Sabatier-Toulouse III. H.E.C. was supported by the Centre National de la Recherche scientifique libanaise and Fondation pour la Recherche Médicale, Y.C. by a fellowship from the Ambassade de France Venezuela/Fundayacucho, J.S. by the French Ministère de la recherche. N.J.F. is supported by the Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS).

References

- Achdout, H., Manaster, I., Mandelboim, O., 2008. Influenza virus infection augments NK cell inhibition through reorganization of major histocompatibility complex class I proteins. *J. Virol.* 82, 8030–8037.
- Apps, R., Gardner, L., Traherne, J., Male, V., Moffett, A., 2008. Natural-killer cell ligands at the maternal-fetal interface: UL-16 binding proteins, MHC class-I chain related molecules. HLA-F and CD48. *Hum. Reprod.* 23, 2535–2548.
- Barakonyi, A., Rabot, M., Marie-Cardine, A., Aguerre-Girr, M., Polgar, B., Schiavon, V., Bensussan, A., Le Bouteiller, P., 2004. Cutting edge: engagement of CD160 by its HLA-C physiological ligand triggers a unique cytokine profile secretion in the cytotoxic peripheral blood NK cell subset. *J. Immunol.* 173, 5349–5354.
- Bryceson, Y.T., March, M.E., Ljunggren, H.G., Long, E.O., 2006. Synergy among receptors on resting NK cells for the activation of natural cytotoxicity and cytokine secretion. *Blood* 107, 159–166.
- Bulmer, J.N., Williams, P.J., Lash, G.E., 2010. Immune cells in the placental bed. *Int. J. Dev. Biol.* 54, 281–294.
- Carlino, C., Stabile, H., Morrone, S., Bulla, R., Soriani, A., Agostinis, C., Bossi, F., Mocchi, C., Sarazani, F., Tedesco, F., Santoni, A., Gismondi, A., 2008. Recruitment of circulating NK cells through decidual tissues: a possible mechanism controlling NK cell accumulation in the uterus during early pregnancy. *Blood* 111, 3108–3115.
- Cerwenka, A., Lanier, L., 2001. Natural killer cells, viruses and cancer. *Nat. Rev. Immunol.* 1, 41–49.
- Choe, H., Farzan, M., Sun, Y., Sullivan, N., Rollins, B., Ponath, P.D., Wu, L., Mackay, C.R., LaRosa, G., Newman, W., Gerard, N., Gerard, C., Sodroski, J., 1996. The beta-chemokine receptors CCR3 and CCR5 facilitate infection by primary HIV-1 isolates. *Cell* 85, 1135–1148.
- De Maria, A., Fogli, M., Mazza, S., Basso, M., Picciotto, A., Costa, P., Congia, S., Mingari, M.C., Moretta, L., 2007. Increased natural cytotoxicity receptor expression and relevant IL-10 production in NK cells from chronically infected viremic HCV patients. *Eur. J. Immunol.* 37, 445–455.
- Derrien, M., Faye, A., Dolcini, G., Chaouat, G., Barre-Sinoussi, F., Menu, E., 2005. Impact of the placental cytokine-chemokine balance on regulation of cell-cell contact-induced human immunodeficiency virus type 1 translocation across a trophoblastic barrier in vitro. *J. Virol.* 79, 12304–12310.
- El Costa, H., Casemayou, A., Aguerre-Girr, M., Rabot, M., Berrebi, A., Parant, O., Clouet-Delannoy, M., Lombardelli, L., Jabrane-Ferrat, N., Rukavina, D., Bensussan, A., Piccinni, M.-P., Le Bouteiller, P., Tabiasco, J., 2008. Critical and differential roles of Nkp46- and Nkp30-activating receptors expressed by uterine NK cells in early pregnancy. *J. Immunol.* 181, 3009–3017.
- El Costa, H., Tabiasco, J., Berrebi, A., Parant, O., Aguerre-Girr, M., Piccinni, M.P., Le Bouteiller, P., 2009. Effector functions of human decidual NK cells in healthy early pregnancy are dependent on the specific engagement of natural cytotoxicity receptors. *J. Reprod. Immunol.* 82, 142–147.
- Fauci, A.S., Mavilio, D., Kottlilil, S., 2005. NK cells in HIV infection: paradigm for protection or targets for ambush. *Nat. Rev. Immunol.* 5, 835–843.
- Goodridge, J.P., Lathbury, L.J., John, E., Charles, A.K., Christiansen, F.T., Witt, C.S., 2009. The genotype of the NK cell receptor, KIR2DL4, influences INF γ secretion by decidual natural killer cells. *Mol. Hum. Reprod.* 15, 489–497.
- Griffin, B.D., Verweij, M.C., Wiertz, E.J., 2010. Herpesviruses and immunity: the art of evasion. *Vet. Microbiol.* 143, 89–100.
- Guma, M., Angulo, A., Vilches, C., Gomez-Lozano, N., Malats, N., Lopez-Botet, M., 2004. Imprint of human cytomegalovirus infection on the NK cell receptor repertoire. *Blood* 104, 3664–3671.
- Guma, M., Budt, M., Saez, A., Brckalo, T., Hengel, H., Angulo, A., Lopez-Botet, M., 2006. Expansion of CD94/NKG2C⁺ NK cells in response to human cytomegalovirus-infected fibroblasts. *Blood* 107, 3624–3631.
- Hanna, J., Goldman-Wohl, D., Hamani, Y., Avraham, I., Greenfield, C., Natanson-Yaron, S., Prus, D., Cohen-Daniel, L., Arnon, T.I., Manaster, I., Gazit, R., Yutkin, V., Benharroch, D., Porgador, A., Keshet, E., Yagel, S., Mandelboim, O., 2006. Decidual NK cells regulate key developmental processes at the human fetal-maternal interface. *Nat. Med.* 12, 1065–1074.
- Hanna, J., Gonen-Gross, T., Fitchett, J., Rowe, T., Daniels, M., Arnon, T.I., Gazit, R., Joseph, A., Schjetne, K.W., Steinle, A., Porgador, A., Mevorach, D., Goldman-Wohl, D., Yagel, S., LaBarre, M.J., Buckner, J.H., Mandelboim, O., 2004. Novel APC-like properties of human NK cells directly regulate T cell activation. *J. Clin. Invest.* 114, 1612–1623.
- Hanna, J., Wald, O., Goldman-Wohl, D., Prus, D., Markel, G., Gazit, R., Katz, G., Haimov-Kochman, R., Fujii, N., Yagel, S., Peled, A., Mandelboim, O., 2003. CXCL12 expression by invasive trophoblasts induces the specific migration of CD16-human natural killer cells. *Blood* 102, 1569–1577.
- Hershkovitz, O., Rosental, B., Rosenberg, L.A., Navarro-Sanchez, M.E., Jivov, S., Zilka, A., Gershoni-Yahalom, O., Brient-Litzler, E., Bedouelle, H., Ho, J.W., Campbell, K.S., Rager-Zisman, B., Despres, P., Porgador, A., 2009. Nkp44 receptor mediates interaction of the envelope glycoproteins from the West Nile and dengue viruses with NK cells. *J. Immunol.* 183, 2610–2621.
- Hershkovitz, O., Zilka, A., Bar-Ilan, A., Abutbul, S., Davidson, A., Mazzon, M., Kummerer, B.M., Monsoengo, A., Jacobs, M., Porgador, A., 2008. Dengue virus replicon expressing the nonstructural proteins suffices to enhance membrane expression of HLA class I and inhibit lysis by human NK cells. *J. Virol.* 82, 7666–7676.
- Jonjic, S., Babic, M., Polic, B., Krmptic, A., 2008. Immune evasion of natural killer cells by viruses. *Curr. Opin. Immunol.* 20, 30–38.
- Kalkunte, S.S., Mselle, T.F., Norris, W.E., Wira, C.R., Sentman, C.L., Sharma, S., 2009. Vascular endothelial growth factor C facilitates immune tolerance and endovascular activity of human uterine NK cells at the maternal-fetal interface. *J. Immunol.* 182, 4085–4092.
- King, A., Birkby, C., Loke, Y.W., 1989. Early human decidual cells exhibit NK activity against the K562 cell line but not against first trimester trophoblast. *Cell Immunol.* 118, 337–344.
- Koopmann, J.O., Hammerling, G.J., Momburg, F., 1997. Generation, intracellular transport and loading of peptides associated with MHC class I molecules. *Curr. Opin. Immunol.* 9, 80–88.
- Kopcow, H.D., Allan, D.S., Chen, X., Rybalov, B., Andzelm, M.M., Ge, B., Strominger, J.L., 2005. Human decidual NK cells form immature activating synapses and are not cytotoxic. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 102, 15563–15568.
- Kuijpers, T.W., Baars, P.A., Dantin, C., van den Burg, M., van Lier, R.A., Roosnek, E., 2008. Human NK cells can control CMV infection in the absence of T cells. *Blood* 112, 914–915.
- Lanier, L.L., 2005. NK cell recognition. *Annu. Rev. Immunol.* 23, 225–274.
- Lash, G.E., Robson, S.C., Bulmer, J.N., 2010. Review: Functional role of uterine natural killer (uNK) cells in human early pregnancy decidua. *Placenta* 31 (Suppl.), S87–92.
- Le Bouteiller, P., Barakonyi, A., Giustiniani, J., Lenfant, F., Marie-Cardine, A., Aguerre-Girr, M., Rabot, M., Hilgert, I., Mami-Chouaib, F., Tabiasco, J., Boumsell, L., Bensussan, A., 2002. Engagement of CD160 receptor by HLA-C is a triggering mechanism used by circulating natural killer (NK) cells to mediate cytotoxicity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 99, 16963–16968.
- Le Bouteiller, P., Sargent, I., 2000. HLA class I molecules in the placenta: Which ones? Where? and What for? A workshop report. *Placenta* 21 (Suppl. A), S93–S96.
- Le Bouteiller, P., Tabiasco, J., 2006. Killers become builders during pregnancy. *Nat. Med.* 12, 991–992.
- Lee, S.H., Kim, K.S., Fodil-Cornu, N., Vidal, S.M., Biron, C.A., 2009. Activating receptors promote NK cell expansion for maintenance, IL-10 production, and CD8 T cell regulation during viral infection. *J. Exp. Med.* 206, 2235–2251.
- Markel, G., Wolf, D., Hanna, J., Gazit, R., Goldman-Wohl, D., Lavy, Y., Yagel, S., Mandelboim, O., 2002. Pivotal role of CEACAM1 protein in the inhibition of activated decidual lymphocyte functions. *J. Clin. Invest.* 110, 943–953.
- Marlin, R., Nugeyre, M.T., de Truchis, C., Berkane, N., Gervaise, A., Barre-Sinoussi, F., Menu, E., 2009. Antigen-presenting cells represent targets for R5 HIV-1 infection in the first trimester pregnancy uterine mucosa. *PLoS One* 4, e5971.
- Mela, C.M., Burton, C.T., Imami, N., Nelson, M., Steel, A., Gazzard, B.G., Gotch, F.M., Goodier, M.R., 2005. Switch from inhibitory to activating NKG2 receptor expression in HIV-1 infection: lack of reversion with highly active antiretroviral therapy. *Aids* 19, 1761–1769.
- Moffett-King, A., 2002. Natural killer cells and pregnancy. *Nat. Rev. Immunol.* 2, 656–663.
- Moffett, A., Regan, L., Braude, P., 2004. Natural killer cells, miscarriage, and infertility. *Br. Med. J.* 329, 1283–1285.
- Mselle, T.F., Howell, A.L., Ghosh, M., Wira, C.R., Sentman, C.L., 2009. Human uterine natural killer cells but not blood natural killer cells inhibit human immunodeficiency virus type 1 infection by secretion of CXCL12. *J. Virol.* 83, 11188–11195.
- Orr, M.T., Murphy, W.J., Lanier, L.L., 2010. 'Unlicensed' natural killer cells dominate the response to cytomegalovirus infection. *Nat. Immunol.* 11, 321–327.
- Pereira, L., Maidji, E., McDonagh, S., Tabata, T., 2005. Insights into viral transmission at the uterine-placental interface. *Trends Microbiol.* 13, 164–174.
- Rabot, M., El Costa, H., Polgar, B., Marie-Cardine, A., Aguerre-Girr, M., Barakonyi, A., Valitutti, S., Bensussan, A., Le Bouteiller, P., 2007.

- CD160-activating NK cell effector functions depend on the phosphatidylinositol 3-kinase recruitment. *Int. Immunol.* 19, 401–409.
- Rajagopalan, S., Moyle, M.W., Joosten, I., Long, E.O., 2010. DNA-PKcs controls an endosomal signaling pathway for a proinflammatory response by natural killer cells. *Sci. Signal.* 3, ra14.
- Rukavina, D., Podack, E.R., 2000. Abundant perforin expression at the maternal-fetal interface: guarding the semiallogeneic transplant? *Immunol. Today* 21, 160–163.
- Saito, S., 2000. Cytokine network at the feto-maternal interface. *J. Reprod. Immunol.* 47, 87–103.
- Saito, S., Nakashima, A., Myojo-Higuma, S., Shiozaki, A., 2008. The balance between cytotoxic NK cells and regulatory NK cells in human pregnancy. *J. Reprod. Immunol.* 77, 14–22.
- Santoni, A., Zingoni, A., Cerboni, C., Gismondi, A., 2007. Natural killer (NK) cells from killers to regulators: distinct features between peripheral blood and decidual NK cells. *Am. J. Reprod. Immunol.* 58, 280–288.
- Scott-Algara, D., Arnold, V., Didier, C., Kattan, T., Pirozzi, G., Barre-Sinoussi, F., Pancino, G., 2008. The CD85j+ NK cell subset potently controls HIV-1 replication in autologous dendritic cells. *PLoS One* 3, e1975.
- Tabiasco, J., Rabot, M., Aguerre-Girr, M., El Costa, H., Berrebi, A., Parant, O., Laskarin, G., Juretic, K., Bensussan, A., Rukavina, D., Le Bouteiller, P., 2006. Human decidual NK cells: unique phenotype and functional properties—a review. *Placenta* 27 (Suppl. A), S34–39.
- Ulbrecht, M., Martinozzi, S., Grzeschik, M., Hengel, H., Ellwart, J.W., Pla, M., Weiss, E.H., 2000. Cutting edge: the human cytomegalovirus UL40 gene product contains a ligand for HLA-E and prevents NK cell-mediated lysis. *J. Immunol.* 164, 5019–5022.
- Vacca, P., Cantoni, C., Prato, C., Fulcheri, E., Moretta, A., Moretta, L., Mingari, M.C., 2008. Regulatory role of NKp44, NKp46, DNAM-1 and NKG2D receptors in the interaction between NK cells and trophoblast cells. Evidence for divergent functional profiles of decidual versus peripheral NK cells. *Int. Immunol.* 20, 1395–1405.
- Vacca, P., Pietra, G., Falco, M., Romeo, E., Bottino, C., Bellora, F., Prefumo, F., Fulcheri, E., Venturini, P.L., Costa, M., Moretta, A., Moretta, L., Mingari, M.C., 2006. Analysis of natural killer cells isolated from human decidua: evidence that 2B4 (CD244) functions as an inhibitory receptor and blocks NK-cell function. *Blood* 108, 4078–4085.
- van Stijn, A., Rowshani, A.T., Yong, S.L., Baas, F., Roosnek, E., ten Berge, I.J., van Lier, R.A., 2008. Human cytomegalovirus infection induces a rapid and sustained change in the expression of NK cell receptors on CD8+ T cells. *J. Immunol.* 180, 4550–4560.
- Verma, S., Hiby, S.E., Loke, Y.W., King, A., 2000. Human decidual natural killer cells express the receptor for and respond to the cytokine interleukin 15. *Biol. Reprod.* 62, 959–968.
- Vermijlen, D., Brouwer, M., Donner, C., Liesnard, C., Tackoen, M., Van Ryselberge, M., Twite, N., Goldman, M., Marchant, A., Willems, F., 2010. Human cytomegalovirus elicits fetal gammadelta T cell responses in utero. *J. Exp. Med.* 207, 807–821.
- Vivier, E., Tomasello, E., Baratin, M., Walzer, T., Ugolini, S., 2008. Functions of natural killer cells. *Nat. Immunol.* 9, 503–510.
- Waggoner, S.N., Taniguchi, R.T., Mathew, P.A., Kumar, V., Welsh, R.M., 2010. Absence of mouse 2B4 promotes NK cell-mediated killing of activated CD8+ T cells, leading to prolonged viral persistence and altered pathogenesis. *J. Clin. Invest.* 120, 1925–1938.
- Wilkinson, G.W., Tomasec, P., Stanton, R.J., Armstrong, M., Prod'homme, V., Aicheler, R., McSharry, B.P., Rickards, C.R., Cochrane, D., Llewellyn-Lacey, S., Wang, E.C., Griffin, C.A., Davison, A.J., 2008. Modulation of natural killer cells by human cytomegalovirus. *J. Clin. Virol.* 41, 206–212.
- Williams, P.J., Searle, R.F., Robson, S.C., Innes, B.A., Bulmer, J.N., 2009. Decidual leucocyte populations in early to late gestation normal human pregnancy. *J. Reprod. Immunol.* 82, 24–31.
- Yokoyama, W.M., Altfeld, M., Hsu, K.C., 2010. Natural killer cells: tolerance to self and innate immunity to viral infection and malignancy. *Biol. Blood Marrow Transpl.* 16, S97–S105.
- Zafirova, B., Mandaric, S., Antulov, R., Krmpotic, A., Jonsson, H., Yokoyama, W.M., Jonjic, S., Polic, B., 2009. Altered NK cell development and enhanced NK cell-mediated resistance to mouse cytomegalovirus in NKG2D-deficient mice. *Immunity* 31, 270–282.
- Zhang, J., Chen, Z., Smith, G.N., Croy, B.A., 2010. Natural killer cell-triggered vascular transformation: maternal care before birth? *Cell. Mol. Immunol.*, doi:10.1038/cmi.2010.38.

Annexe 5:

CD160: a unique activating NK cell receptor.

Le Bouteiller P, Tabiasco J, Polgar B, Kozma N, Giustiniani J, Siewiera J, Berrebi A, Aguerre-Girr M, Bensussan A, Jabrane-Ferrat N.

Immunol Lett. 2011 Aug 30;138(2):93-6.



Review

CD160: A unique activating NK cell receptor

Philippe Le Bouteiller^{a,b,c,*}, Julie Tabiasco^{a,b,c}, Beata Polgar^{a,b,c,1}, Noemi Kozma^{a,b,c}, Jérôme Giustiniani^d, Johan Siewiera^{a,b,c}, Alain Berrebi^e, Maryse Aguerre-Girr^{a,b,c}, Armand Bensussan^f, Nabila Jabrane-Ferrat^{a,b,c,*}

^a Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, UMR1043, Toulouse F-31300, France

^b CNRS, U5282, Toulouse F-31300, France

^c Université de Toulouse, UPS, Centre de Physiopathologie de Toulouse Purpan (CPTP), Toulouse F-31300, France

^d Institut Jean Godinot, 51056 Reims Cedex, France

^e CHU Toulouse, Hôpital P. de Viguière, Service de Gynécologie-Obstétrique, Toulouse F-31300, France

^f Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale UMR 976, Equerre Bazin, Hôpital Saint-Louis, 75475 Paris Cedex 10, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 28 December 2010

Received in revised form 3 February 2011

Accepted 4 February 2011

Available online 13 February 2011

Keywords:

CD160

NK cell

NK cell receptor

Cell killing

Cytokines

ABSTRACT

Here we discuss CD160 an essential NK cell activating receptor that remains poorly understood. CD160 receptor exhibits a number of unique structural and functional characteristics that are not common to other killer immunoglobulin-like receptors that recognize major histocompatibility complex (MHC) class I molecules: (1) In addition to humans and mice, the *cd160* gene is conserved in several other mammalian species; (2) *cd160* is located outside the NK gene complex and the Leukocyte Receptor Complex in humans; (3) CD160 expression is associated to the CD56^{dim} CD16⁺ cytotoxic NK cell phenotype; (4) both human and mouse CD160 recognize MHC class Ia and Ib molecules; (5) unlike the other MHC class I-dependent activating NK receptors, CD160 is a glycosylphosphatidylinositol-anchored molecule with a single immunoglobulin-like domain, and does not bear immunoreceptor tyrosine-based activation motifs. Consequently, CD160 cannot signal by itself, requiring the recruitment of adaptor proteins. CD160 recruits phosphoinositide-3 kinase to trigger cytotoxicity and cytokine secretion; (6) specific engagement of NK CD160 receptor expressed by circulating NK cells produces proinflammatory cytokines IFN- γ , TNF- α , and, most notably, IL-6 and IL-8 as well as MIP1- β chemokine. The level of CD160-mediated IFN- γ production is always higher than the one observed after engagement of the CD16 receptor.

© 2011 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

The first description of CD160 (also known as BY55) was published 17 years ago [1], its activating function in human peripheral blood (PB)-NK cells was demonstrated a few years later [2,3]. Similar functional observations have been made in mice where different NK cell subsets express CD160 [4]. Despite these functional insights, the CD160 NK cell receptor remains largely unknown [5]. *cd160* gene is conserved in various mammalian species including human [6], mouse [4,7], rabbit [8], canine [9] and *Macaca mulatta* (Gene ID: 696832, updated on 20th July, 2010). The *cd160* gene is the only human NK cell activating receptor that is located on human

chromosome 1 [6]. The major form of CD160 is a glycosylphosphatidylinositol (GPI)-anchored cell surface molecule with a single immunoglobulin (Ig)-like domain that is weakly homologous to the KIR2DL4 receptor [6]. This Ig-like domain contains six cysteine residues allowing the formation of multimers tightly linked by disulphide bonds [6]. In contrast to the GPI-anchored isoform, a transmembrane CD160 isoform has been recently reported to be selectively expressed by activated PB-NK cells and NK cell lines [14]. Murine CD160 is also a GPI-anchored receptor devoid of cytoplasmic tail [4]. CD160 is expressed by human circulating cytolytic lymphocytes, including the major CD16⁺ NK cell subset, $\gamma\delta$ T cells, a minor CD8^{bright}, CD95⁺, CD28^{neg} $\alpha\beta$ T cell subpopulation expressing granzyme B and perforin and most intestinal intraepithelial CD8⁺ T cells [5,6]. CD160 is also present in subsets of human CD4⁺ T cells [10], including those infiltrating inflammatory lesions of the skin [12] and, unexpectedly, in activated endothelial cells [8]. In mice, CD160 is expressed on NKT cell subsets, intestinal intraepithelial CD8⁺ T cells, and ~20% of splenic NK cells [4,7]. A soluble form of CD160 can be secreted by activated human PB-NK cells [13], and murine splenic CD8⁺ T cells [7]. The presence of a secreted isoform might explain why the expression of the CD160 GPI form on

* Corresponding authors at: INSERM UMR1043, Université de Toulouse, Hôpital Purpan, Bât. A, BP 3028, 31024 Toulouse Cedex 3, France. Tel.: +33 562 748 374; fax: +33 562 744 558.

E-mail addresses: philippe.le-bouteiller@inserm.fr (P. Le Bouteiller), nabila.jabrane-ferrat@inserm.fr (N. Jabrane-Ferrat).

¹ Present address: Dept. of Medical Microbiology and Immunology, Pecs University, Medical School H-7643 Pecs, Hungary.

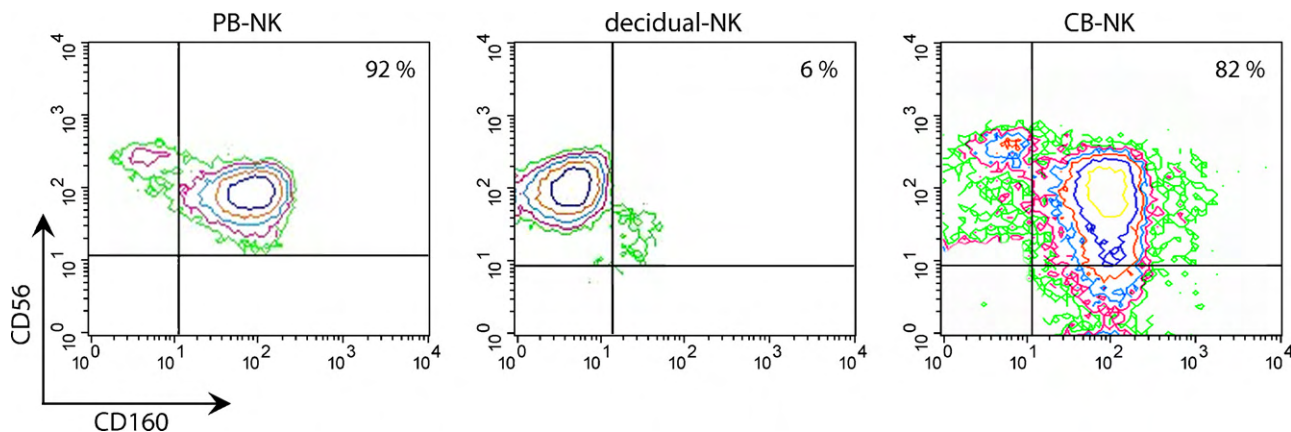


Fig. 1. Flow cytometry analysis of CD56/CD160 expressing NK cell subsets from peripheral blood and *decidua basalis* from early gestation showing that the CD160⁺ subsets are associated with the CD56^{dim} phenotype. CD3^{neg} CD56⁺ gated NK cells are shown. Cells were stained with the following antibodies: anti-human CD3-phycoerythrin-Cy7 (BioLegend), anti-human CD56-allophycocyanin (Pharmingen), and CL1-R2 anti-human CD160 [8], followed by goat anti-mouse-R-phycoerythrin (Southern Biotech).

PB-NK cells is often down-modulated after activation. Both human and mouse CD160 have a broad but weak specificity for major histocompatibility complex (MHC) class Ia and class Ib molecules [4,15], although multimers bind more efficiently than monomers. In human, CD160 binds preferentially to HLA-C [2,3], soluble HLA-G [8] and to a lesser extent to HLA-A2, HLA-B7 and HLA-E [2,3,7,15]. In mouse, CD160 was the first Ig-like NK cell receptor that was identified to engage MHC class I [4]. The CD160-Fc fusion protein was shown to bind to H2D^d, H2D^b, H2K^b, Qa-1^b, and CD1d to varying degrees [6], but interaction between murine CD160 and mouse MHC class I is weaker than other NK cell receptors [4]. Both activating and inhibitory functions have been attributed to CD160 [2–4,7,8,11,12]. CD160 expressed on CD4⁺ T cells was shown to interact with the herpes virus entry mediator (HVEM) resulting in the inhibition of T cell activation [11,16]. This review will highlight the structural and functional characteristics that underlie the biological role of the GPI-anchored CD160 NK cell receptor.

2. CD160 expression is associated with the CD56^{dim} CD16⁺ cytolytic NK cell phenotype

Soon after its discovery, CD160 (BY55) was found to delineate a distinct NK cell subset mediating cytotoxicity [1]. CD160 is expressed on the cell surface of the CD56^{dim} NK cell in the peripheral blood where it constitutes the major NK cell subpopulation (Fig. 1). In contrast, in the pregnant uterus (*decidua basalis*) where NK cells are massively present and poorly cytotoxic [17], this CD56^{dim} CD160⁺ cell subset represents a minor subpopulation (Fig. 1). In cord blood, the CD56^{dim} CD160⁺ subpopulation represents the major NK cell subset (Fig. 1). The CD56^{dim} PB-NK cell subpopulation is characterized by the co-expression of IgG1 and IgG3 low binding affinity receptor CD16 and is highly cytotoxic as compared to the CD56^{bright} NK subset that do not express CD16 [16]. Thus, the coexpression of CD160 is a useful marker to further define the cytotoxic population within NK cells [18,19]. Similarly, murine CD160 expressing NK cells were shown to be more cytotoxic than NK cells that lack CD160 expression [4].

3. CD160 NK cell receptor engagement activates the cytolytic response and triggers a unique profile and high production of cytokines

When agonist anti-CD160 mAbs are used to cross-link the CD160 receptor on freshly isolated PB-NK, prior to IL-2 or IL-15 stimulation, CD160 is able to elicit cytolytic activity [3] and cytokine secretion [2,4]. We also found that CD160 NK cell receptor trig-

gered cytotoxic activity against HLA-C expressing target cells [3]. The level of CD160-mediated cytotoxicity is quite variable from one blood donor to another (personal observation of the authors). The CD160-mediated cytotoxic function is independent of the cross-linking of other co-activating receptors [21]. CD160 thus differs from several other activating NK cell receptors including the KIRs and CD94/NKG2C [22]. CD160 seems to trigger NK cell activation in a similar manner to CD16. It would be interesting to assess the relative contribution to cytotoxicity of CD160 among the multiple, structurally distinct NK cell activation receptors, and more importantly to determine precisely how the activating signal, mediated through self-MHC, is controlled by NK cell inhibitory receptors. Upon specific engagement of CD160 by its physiological ligand HLA-C, or by mAb cross-linking, CD160⁺ PB-NK cells produce significant levels of IFN- γ , TNF- α , IL-6 [2] as well as IL-8 and MIP-1 β (Fig. 2A), but marginal amounts of IL-4 or IL-10 (Fig. 2A). Other cytokines such as IL-1 β , IL-5, IL-7, IL-12, IL-13, IL-17, G-CSF and MCP-1 production by PB-NK cells remain undetectable (unpublished data). In contrast to killing activity, the production of IFN- γ by CD160 engagement of human NK cells is always very high regardless of blood donors (personal observation of the authors). Moreover, upon CD160 cross-linking, PB-NK cells secreted significantly more IFN- γ and IL-6 than after CD16 engagement (Fig. 2B). CD160 mAb cross-linking of cord blood NK cells induced 10-fold less IFN- γ production than PB-NK (Fig. 2C) although ~70% of CB-NK express CD160 [23] (Fig. 1). In contrast to PB-NK, CD160 cross-linking of CB-NK did not trigger a significant production of TNF- α , and IL-6 whereas CD16 cross linking of CB-NK did (Fig. 2). Further studies are needed to understand the mechanisms that prevent CB-NK to produce the other cytokines secreted by CD160 engagement on PB-NK. Thus the CD160⁺ CD56^{dim} CD16⁺ PB-NK cell subset is not only cytotoxic but also secretes large amounts of IFN- γ as well as other cytokines. Thus, in humans the classical division of NK cells into CD56^{dim} (cytotoxic) and CD56^{bright} (cytokine producers) subsets could be refined by using the CD160 surface expression marker.

4. CD160-mediated signaling in NK cells requires PI3K

CD160 is unique among other activating receptors which have short cytoplasmic tails that associate with adaptor proteins expressing Fc ϵ RI- γ , CD3- ζ or DAP1 or DAP12 type I transmembrane anchored proteins containing the ITAM motifs [24]. The mechanism whereby the GPI-anchored CD160 receptor, which lacks both transmembrane and cytoplasmic domains transduces signals across the cell membrane is poorly understood. CD160 is

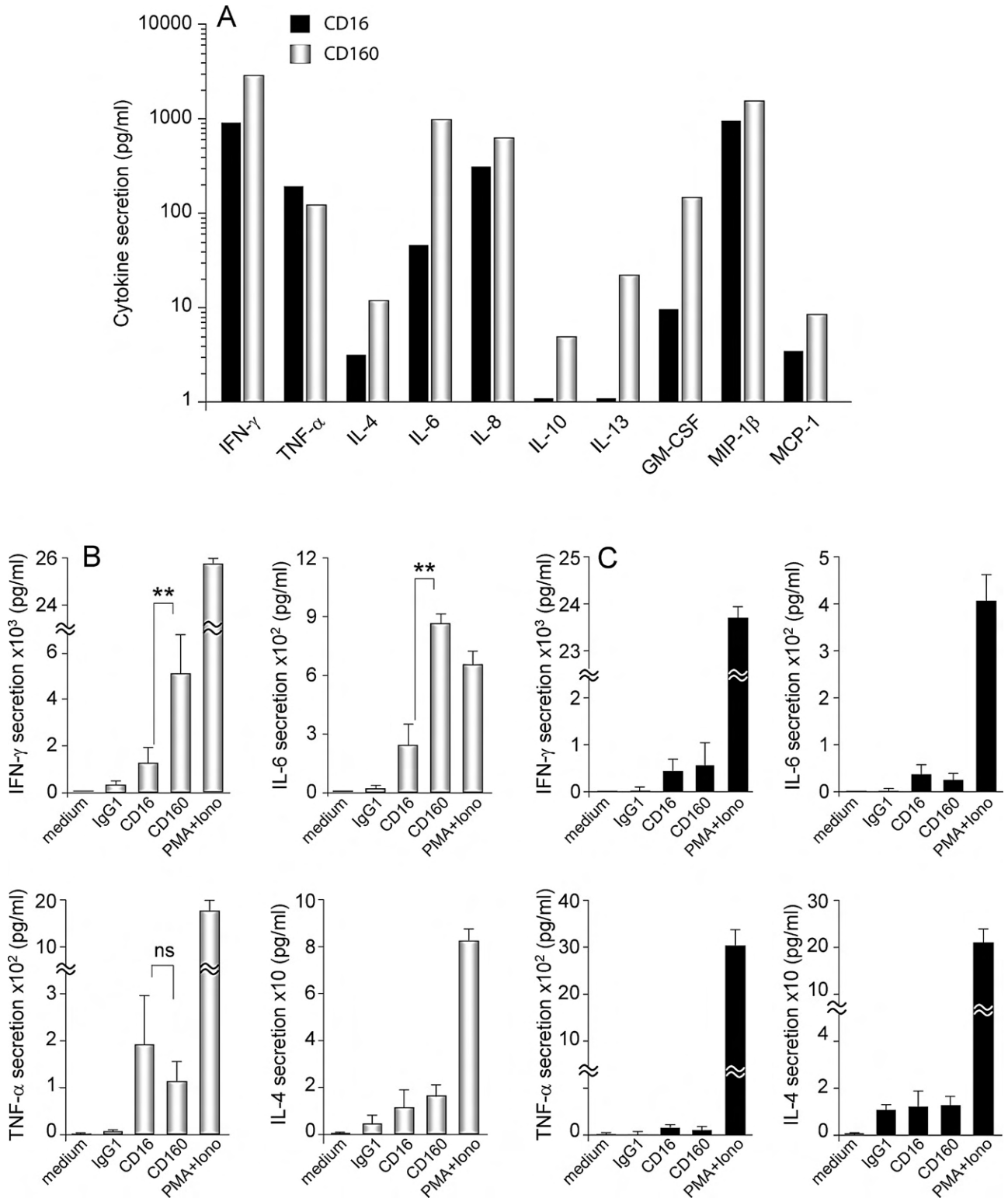


Fig. 2. (A), CD160 mAb cross-linking of peripheral blood NK (PB-NK) cells triggers IFN- γ , TNF- α , IL-6, IL-8, GM-CSF and MIP-1 β but limited amount of IL-4, IL-10 and IL-13 production: comparison with CD16 mAb cross-linking (one representative experiment). (B), CD160 mAb cross-linking of PB-NK cells triggers more IFN- γ and IL-6 production than cross-linking with CD16 mAb. (C), CD160 mAb cross-linking of cord blood NK (CB-NK) cells triggers very low levels of IFN- γ production, but no IL-6, IL-4 or TNF- α . After cross-linking of CD160 or CD16 by specific mAbs or isotypic controls or after phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA)/ionomycin treatment of PB-NK or CB-NK cells ($\geq 95\%$ purified CD3^{neg} CD56⁺) during 16 h incubation, sample supernatants were analyzed by cytometric bead array (BD Biosciences). Cytokine concentrations were calculated relative to the appropriate calibration curves with standard dilutions for each cytokine. B and C: results (means \pm SD) are representative of 4 to 9 independent experiments performed on different donors (PB-NK: $n=4$; CB-NK: $n=9$). ** $p < 0.01$.

likely to signal through interactions with other receptors present in the lipid rafts [25]. The CD2 co-activating receptor, present in the lipid raft and physically associated with CD160 in PB-NK cells, might be one candidate [26]. In human PB-NK cells, the specific engagement of CD160 recruits phosphoinositide-3 kinase (PI3K) and induces phosphorylation of Akt and extracellular signal-related kinase downstream signaling [27]. The events that occur downstream in the CD160 signaling pathway have not been characterized. It should be noted that CD160 expressing B-cell derived from chronic lymphocytic leukemia (CLL) use a similar CD160-mediated pathway to enhance their survival and cellular activation leading to IL-6 production [28].

5. Concluding remarks

We have reviewed the unique structural, biochemical and functional features of the CD160 GPI-anchored NK cell receptor which differ in many ways from the other activating NK cell receptors. How this receptor and their specific ligands regulate the behaviour of NK cells *in vivo* in healthy and pathologic inflamed organs and tissues [5] which are challenging issues to be investigated.

Acknowledgements

The authors express their gratitude for their respective contributions to the CD160 work to the past PhD students, post-doctoral fellows and visiting professors in PLB's lab, including Aliz Barakonyi, Magali Rabot, Hicham El Costa, Steve P. Schwendeman, and Ysabel Casart. We thank Lennart T. Mars for editing and comments. This work was supported by INSERM, Université Paul Sabatier (to PLB), Ligue Régionale contre le cancer Midi Pyrénées (to NJ-F). BP and NK were supported by Association pour la recherche contre le cancer, JS by Ministère de la Recherche, and NJF by CNRS.

References

- [1] Maiza H, Leca G, Mansur IG, Schiavon V, Boumsell L, Bensussan A. A novel 80-kD cell surface structure identifies human circulating lymphocytes with natural killer activity. *J Exp Med* 1993;178:1121–6.
- [2] Barakonyi A, Rabot M, Marie-Cardine A, Aguerre-Girr M, Polgar B, Schiavon V, et al. Cutting edge: engagement of CD160 by its HLA-C physiological ligand triggers a unique cytokine profile secretion in the cytotoxic peripheral blood NK cell subset. *J Immunol* 2004;173:5349–54.
- [3] Le Bouteiller P, Barakonyi A, Giustiniani J, Lenfant F, Marie-Cardine A, Aguerre-Girr M, et al. Engagement of CD160 receptor by HLA-C is a triggering mechanism used by circulating natural killer (NK) cells to mediate cytotoxicity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002;99:16963–8.
- [4] Maeda M, Carpetino C, Russell R, Dasanjh J, Veinotte L, Ohta H, et al. Murine CD160 Ig-like receptor on NK cells and NKT cells, recognizes classical and non classical MHC class I and regulates NK cell activation. *J Immunol* 2005;175:4426–32.
- [5] Vivier E, Tomasello E, Baratin M, Walzer T, Ugolini S. Functions of natural killer cells. *Nat Immunol* 2008;9:503–10.
- [6] Anumantha A, Bensussan A, Boumsell L, Christ A, Blumberg R, Voss S, et al. Cloning of BY55, a novel Ig superfamily member expressed on NK cells, CTL, and intestinal intraepithelial lymphocytes. *J Immunol* 1998;161:2780–90.
- [7] Tsujimura K, Obata Y, Matsudaira Y, Nishida K, Akatsuka Y, Ito Y, et al. Characterization of murine CD160⁺ CD8⁺ T lymphocytes. *Immunol Lett* 2006;106:48–56.
- [8] Fons P, Chabot S, Cartwright JE, Lenfant F, L'Faqihi F, Giustiniani J, et al. Soluble HLA-G1 inhibits angiogenesis through an apoptotic pathway and by direct binding to CD160 receptor expressed by endothelial cells. *Blood* 2006;108:2608–15.
- [9] Huang J, Hung S, Jan T, Liao K, Cheng C, Wang Y, et al. CD5-low expression lymphocytes in canine peripheral blood show characteristics of natural killer cells. *J Leukoc Biol* 2008;84:1501–10.
- [10] Nikolova M, Marie-Cardine A, Boumsell L, Bensussan A. BY55/CD160 acts as a co-receptor in TCR signal transduction of a human circulating cytotoxic effector T lymphocyte subset lacking CD28 expression. *Int Immunol* 2002;14:445–51.
- [11] Cai G, Anumanthan A, Brown JA, Greenfield EA, Zhu B, Freeman GJ. CD160 inhibits activation of human CD4⁺ T cells through interaction with herpesvirus entry mediator. *Nat Immunol* 2008;9:176–85.
- [12] Abecassis S, Giustiniani J, Meyer N, Schiavon V, Ortonne N, Campillo JA, et al. Identification of a novel CD160⁺ CD4⁺ T-lymphocyte subset in the skin: a possible role for CD160 in skin inflammation. *J Invest Dermatol* 2007;127:1161–6.
- [13] Giustiniani J, Marie-Cardine A, Bensussan A. A soluble form of the MHC class I-specific CD160 receptor is released from human activated NK lymphocytes and inhibits cell-mediated cytotoxicity. *J Immunol* 2007;178:1293–300.
- [14] Giustiniani J, Bensussan A, Marie-Cardine A. Identification and characterization of a transmembrane isoform of CD160 (CD160-TM), a unique activating receptor selectively expressed upon human NK cell activation. *J Immunol* 2009;182:63–71.
- [15] Agrawal S, Marquet J, Freeman GJ, Tawab A, Le Bouteiller P, Roth P, et al. Cutting edge: MHC class I triggering by a novel cell surface ligand costimulates proliferation of activated human T cells. *J Immunol* 1999;162:1223–6.
- [16] Cai G, Freeman GJ. The CD160, BTLA LIGHT/HVEM pathway: a bidirectional switch regulating T-cell activation. *Immunol Rev* 2009;229:244–58.
- [17] Le Bouteiller P, Tabiasco J. Killers become builders during pregnancy. *Nat Med* 2006;12:991–2.
- [18] El Costa H, Casemayou A, Aguerre-Girr M, Rabot M, Berrebi A, Parant O, et al. Critical and differential roles of NKp46- and NKp30-activating receptors expressed by uterine NK cells in early pregnancy. *J Immunol* 2008;181:3009–17.
- [19] Tabiasco J, Rabot M, Aguerre-Girr M, El Costa H, Berrebi A, Parant O, et al. Human decidua NK cells: unique phenotype and functional properties – a review. *Placenta* 2006;27(Suppl. A):S34–9.
- [20] Bryceson YT, March ME, Ljunggren HG, Long EO. Activation, coactivation, and costimulation of resting human natural killer cells. *Immunol Rev* 2006;214:73–91.
- [21] Stanitsky N, Mandelboim O. Paired NK cell receptors controlling NK cytotoxicity. *FEBS Lett* 2010;584:4895–900.
- [22] Bensussan A, Gluckman E, el Marsafy S, Schiavon V, Mansur IG, Dausset J, et al. BY55 monoclonal antibody delineates within human cord blood and bone marrow lymphocytes distinct cell subsets mediating cytotoxic activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994;91:9136–40.
- [23] Lanier LL. Up on the tightrope: natural killer cell activation and inhibition. *Nat Immunol* 2008;9:495–502.
- [24] MacFarlane IAW, Campbell KS. Signal transduction in natural killer cells. *Curr Top Microbiol Immunol* 2006;298:23–57.
- [25] Rabot M, Bensussan A, Le Bouteiller P. Engagement of the CD160 activating NK cell receptor leads to its association with CD2 in circulating human NK cells. *Transpl Immunol* 2006;17:36–8.
- [26] Rabot M, El Costa H, Polgar B, Marie-Cardine A, Aguerre-Girr M, Barakonyi A, et al. CD160-activating NK cell effector functions depend on the phosphatidylinositol 3-kinase recruitment. *Int Immunol* 2007;19:401–9.
- [27] Liu FT, Giustiniani J, Farren T, Jia L, Bensussan A, Gribben JG, et al. CD160 signaling mediates PI3K-dependent survival and growth signals in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2010;115:3079–88.

Remerciements

Voilà, nous sommes arrivés au bout d'une aventure de 3 ans et demi. Viens donc le moment de remercier tous ceux que j'aurai croisé, et qui auront participé de près ou de loin à la réalisation de ce projet.

Tout d'abord, merci aux rapporteurs, Thierry Walzer et Julie Dechanet-Merville, qui ont accepté de juger ce travail, et plutôt positivement visiblement, ce qui encourage beaucoup à continuer dans cette voie.

Merci au Pr. van Meerwijk, pour deux raisons. La première étant d'avoir accepté de présider le jury, la seconde et la plus importante étant d'être en grande partie le « responsable » de tout ce qui a suivi, lorsqu'à la sortie d'un cours en M1, il m'a dit de contacter une certaine Nabila Jabrane-Ferrat, qui avait peut-être besoin d'un stagiaire pour l'année en cours. L'entretien qui a suivi m'a permis d'intégrer le CPTP, c'était en janvier 2009, et je n'en suis pas reparti depuis.

Un grand merci bien sûr à ma directrice de thèse, Nabila, pour le soutien indéfectible dont tu auras fait preuve à mon égard durant ces cinq années de travail commun. Merci pour tout le côté professionnel et les petits à côtés qui font que l'on apprécie de venir travailler tous les jours. J'aurai beaucoup appris grâce à toi, et je sais que cela me servira par la suite.

Merci à ma première équipe, l'équipe de P. Le Bouteiller, qui m'a confié ce projet, et à tous ceux que j'aurai côtoyé là-bas. Il y aura tout de même eu de bons moments. Merci plus particulièrement à Hicham, qui m'aura appris et les expériences, et des techniques de survie au CPTP.

Merci à Christian Davrinche de nous avoir si généreusement accueilli dans son équipe en cours de projet, et de nous avoir permis d'en développer d'autres. Et merci également à tous les membres de son équipe, ce n'est pas toujours évident de s'intégrer, et chacun a contribué pour que tout se passe bien lors de notre arrivée.

Et enfin, merci à toutes les équipes du centre avec lesquelles j'ai interagi durant toutes ces années, les personnels des plateaux (cytométrie, imagerie, technique), et les services communs. Merci aux équipes médicales de l'hôpital Paule de Viguier et de la clinique Sarrus-Teinturier, ainsi qu'à leurs généreuses patientes, pour m'avoir abreuvé de tous ces prélèvements, toujours au dernier moment, souvent le soir, très souvent le vendredi (adieu le samedi), mais sans lesquelles je n'aurai rien pu faire.

A tous les collègues du M2 Immunologie et Maladies Infectieuses, merci beaucoup. La bonne entente qui régnait dans cette promotion a permis de surmonter les moments difficiles des examens, et après les examens. Mine de rien, quand la compétition n'a lieu que 3 jours dans l'année, les creux sont plus faciles à supporter.

Au cours de cette année, j'ai notamment rencontré cinq personnes avec qui passer toutes ces journées, et aussi pas mal de soirées, a été un réel plaisir. Sébastien, pour m'avoir fait découvrir les séances d'aquaponey juste aux heures de réunion (mince alors, je vais encore la rater). Aurore, dommage que tu n'aies pas pu rester parmi nous, les joies du CPTP, plus on est de fous à les partager...

Caro, que te dire... rien finalement, de quoi te rappeler à quel point je suis désagréable. Et de toute façon j'ai presque tout oublié après ta soirée de thèse.

Gavin, quelques conversations scientifiques, beaucoup de conversations cinéma ou séries télé, la Plage et toutes ses facettes... ça n'a pas de valeur.

Laurent, le café, les pauses chocolats, le café, rends moi mes clopes, encore un café, même le samedi. Heureusement tu ne te résumes pas à ça, mais je ne sais pas si je peux tout révéler ici. Que diraient les deux femmes de ta vie, Nadège et Sylvie. En tout cas, merci pour tout.

A tous les moments de la vie, on rencontre des gens qui vous tirent vers le haut... et d'autres qui vous enfoncent. Merci Karim, tu ne fais pas partie de la deuxième catégorie.

Et puis il y a tous les autres étudiants du CPTP rencontrés de-ci, de-là... Mr Svetoslav, tant de fous rires à entendre tes histoires, mais ce n'est pas ce que je retiendrai le plus. Jérôme, au moins un médecin auquel je ferais confiance, ce qui n'est pas peu dire. Pascal, merci pour le mazout, découverte inestimable. Le Thiault, qu'est-ce que j'ai ri en t'écoutant parfois. Et tous les autres sur lesquels je ne m'étalerai pas : Lise, Céline, Assia (une fan), Jérémy Le Dall, comme quoi les bretons ne sont pas que des..., le poisson rouge du CRCT, Jean-Yves et tant d'autres, pardon pour les oublis. Des post-docs, notamment Rita, Nathalie... et d'autres encore, comme Nicolas Beton. Tes précisions m'ont bien aidé pour rédiger la partie grosse de du présent manuscrit.

On en arrive à mon équipe. Khaddouj et Jordi, merci de m'avoir appris à encadrer, et la tâche ardue que cela représente, mais il est vrai que je n'ai jamais apprécié les weekends sans travailler sur les rapports des autres, donc...

A mes collègues thésards de l'équipe 8, je peux dire que ça fait du bien de ne pas être le seul jeune d'une équipe. J'apprécie notamment la convergence de points de vue lorsqu'il s'agit de ne pas présenter en réunion d'équipe. Emeline, garde la foi, comme toutes les manips, la thèse se finit un jour. J'ai beaucoup apprécié toutes ces digressions dans le bureau, autour de tout et n'importe quoi. Charline, ne change surtout pas. Si tout le monde avait ton caractère, la vie serait beaucoup plus agréable. Maude, surtout, change. Ou pas, de toute façon tu n'écoutes rien de ce que je te dis. Rémy, je te souhaite de revenir un jour de la lointaine planète où tu t'es exilé, visiblement les communications longues distances ne sont pas encore au point.

Et à mes jeunes collègues non thésards, quelques conseils pour réussir dans la vie : Frédérique, parle un peu moins fort quand les gens travaillent dans le bureau, et évite les ascenseurs. Morgane, essaie un jour de translater de ton ordinateur (qui ne sert pas qu'à préparer ses vacances) vers un endroit magique appelé L2, là-bas les choses avancent parfois... Juré. En plus ton chef retiendra ton nom.

Aux membres séniors de l'équipe, El Mostafa merci pour les conseils et pour avoir dit à Nabila qu'elle faisait le bon choix de stagiaire il y a déjà plusieurs années ; Eric, qui nous distrait par ses facéties ; Stéphane pour me rappeler qu'il n'y a pas que l'immuno (c'est de la ...hein, bon) et Hélène, qui aide à mettre les M2 au pas.

Priscillia, la seule qui me supporte au quotidien, la seule à qui je pouvais tout confier, la colère comme le reste, qui prenait même par ricochets parfois, sans rien dire (ou presque). Je te jure que je ne pouvais pas faire autrement que travailler tard le vendredi soir. Je ne dirai qu'une chose pour finir : je l'ai eu avant toi !

Et enfin les soutiens extérieurs au domaine, en premier lieu mes parents, un vendeur de poisson dans les alpes, et un type exilé dans une contrée abandonnée, du nom de Castres si je ne me trompe pas.

Résumé

Au début de la grossesse, des cellules Natural Killer (NK) sont massivement recrutées au niveau de l'utérus et constituent la population immunitaire maternelle majoritaire au niveau du site d'implantation embryonnaire, la *decidua basalis*. Les cellules NK déciduales (dNK) présentent des propriétés uniques par rapport aux autres populations de cellules NK. Leur fonction principale est l'aide à l'implantation embryonnaire et au bon déroulement de la grossesse. Les fonctions des cellules NK sont contrôlées par les nombreux récepteurs activateurs et inhibiteurs qu'elles expriment. Les récepteurs de cytotoxicité naturels (NCR) NKp30, NKp44 et NKp46 sont exprimés aussi bien par les cellules dNK que les cellules NK du sang périphérique (pNK). Toutefois, leur fonction diffère entre les deux populations. Ainsi, bien que les cellules NK soient des cellules cytotoxiques, ce potentiel est parfaitement contrôlé dans la decidua, afin d'éviter des dommages aux cellules fœtales semi-allogéniques. Pourtant le fœtus est susceptible d'être infecté *in utero* par des pathogènes de la mère.

Durant la première partie de ma thèse, nous avons analysé l'implication des cellules dNK dans la protection du fœtus contre les infections congénitales par le cytomégalo virus humain (HCMV). Nous avons mis au point un nouveau modèle d'infection de cellules stromales de decidua *in vitro*, afin d'étudier les mécanismes mis en jeu lors d'une réponse immune protectrice dans l'utérus gestant. Nous avons montré que les cellules dNK forment des synapses immunologiques activatrices avec des cellules cibles autologues infectées par le HCMV. Elles acquièrent un potentiel cytotoxique et sont capables de lyser les cibles infectées après engagement de récepteurs activateurs, notamment NKG2D et NKG2C. En réponse aux cellules infectées par le HCMV, les cellules dNK modifient leur profil de sécrétion de cytokines et de chimiokines. Cette première partie nous a permis de suggérer que les cellules dNK sont capables d'apporter une protection au fœtus contre les transmissions verticales de certains pathogènes.

Durant la seconde partie de ma thèse, je me suis intéressé aux mécanismes moléculaires responsables des différences fonctionnelles entre cellules dNK et cellules pNK, notamment en ce qui concerne les NCR. Les gènes qui codent les trois NCR subissent un épissage alternatif qui donne naissance à plusieurs variants. Les protéines issues de cet épissage sont très proches en termes de séquence mais elles présentent des différences fonctionnelles. Nous avons ainsi pu montrer que les cellules dNK expriment différemment les transcrits alternatifs de *NKp30* et *NKp44* par rapport aux cellules pNK. Nous avons également pu démontrer que l'épissage « sélectif » des transcrits des NCR est sous l'influence de l'environnement cytokinique particulier de la *decidua basalis*. En effet, des cellules pNK cultivées dans des cocktails de cytokines définis modifient le profil d'épissage des ARNm de *NKp30* et *NKp44*. L'environnement de la grossesse pourrait donc influencer sur l'expression et la fonction des récepteurs des cellules NK, pour les adapter à leur rôle dans le bon déroulement de la grossesse.