



**HAL**  
open science

# Rôle des cellules natural killer dans la transmission mère-foetus du virus Zika

Ana Espino

► **To cite this version:**

Ana Espino. Rôle des cellules natural killer dans la transmission mère-foetus du virus Zika. Virologie. Université Paul Sabatier - Toulouse III, 2022. Français. NNT : 2022TOU30181 . tel-04368445

**HAL Id: tel-04368445**

**<https://theses.hal.science/tel-04368445>**

Submitted on 1 Jan 2024

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

Université Fédérale



Toulouse Midi-Pyrénées

# THÈSE

En vue de l'obtention du  
**DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE TOULOUSE**

Délivré par l'Université Toulouse 3 - Paul Sabatier

---

Présentée et soutenue par

**Ana ESPINO**

Le 20 septembre 2022

**Rôle des cellules Natural Killer dans la transmission mère-foetus  
du virus Zika**

---

Ecole doctorale : **BSB - Biologie, Santé, Biotechnologies**

Spécialité : **IMMUNOLOGIE**

Unité de recherche :

**INFINITY - Institut Toulousain des Maladies Infectieuses et Inflammatoires**

Thèse dirigée par

**Nabila JABRANE-FERRAT**

Jury

**Mme Mireille LAFORGE**, Rapporteur

**Mme Ludivine DORIDOT**, Rapporteur

**M. Vincent VIEILLARD**, Rapporteur

**Mme Nabila JABRANE-FERRAT**, Directrice de thèse

**M. Jacques IZOPET**, Président



## - Table des matières -

<i>Remerciements</i> .....	5
<i>Liste des abréviations</i> .....	10
<i>Liste des figures</i> .....	18
<i>Résumés</i> .....	22
<b>I. Résumé Français</b> .....	<b>23</b>
<b>II. English Abstract</b> .....	<b>25</b>
<i>Introduction</i> .....	27
<b>Chapitre 1 : La grossesse humaine</b> .....	<b>28</b>
I. Le tractus reproducteur féminin .....	28
A. Les ovaires.....	28
B. L'utérus .....	29
II. Endomètre et Cycle menstruel .....	30
A. Phase folliculaire .....	31
B. Phase sécrétoire ou lutéale .....	32
III. Implantation de l'embryon .....	32
A. Phase d'apposition et d'adhésion.....	34
B. Phase d'invasion.....	35
IV. Les interfaces materno-foetales .....	35
A. Le placenta.....	36
a. Structure du placenta .....	36
b. Fonction du placenta.....	38
B. La decidua.....	40
a. Structure de la decidua.....	40
b. Fonction de la decidua.....	41
V. Complications de la grossesse .....	42
A. Complications non infectieuses.....	42
a. Défauts de placentation.....	42
b. Pré-éclampsie .....	43
c. Fausses couches répétées .....	45
d. Retard de croissance intra-utérin.....	46
B. Complications infectieuses, infections congénitales et TORCH.....	47
a. Toxoplasmose.....	47

b.	« Others » ou les autres.....	48
c.	Rubéole.....	51
d.	Cytomégalovirus Humain.....	52
e.	Virus de l'Herpès.....	53
<b>Chapitre 2 :</b>	<b>Le virus Zika .....</b>	<b>54</b>
I.	Historique et épidémiologie.....	54
II.	Transmission du ZIKV .....	56
A.	Transmission vectorielle par le moustique.....	56
B.	Transmission non vectorielle.....	57
a.	Transmission sexuelle .....	57
b.	Transmission sanguine.....	58
c.	Transmission materno-foétale.....	58
III.	Organisation génomique et structure de la particule virale .....	59
IV.	Cycle de réplication du ZIKV.....	62
A.	Tropisme .....	62
B.	Mécanisme d'entrée du ZIKV .....	63
C.	Cycle de réplication virale.....	66
V.	Physiopathologie liée à l'infection par le ZIKV .....	69
A.	Complications neurologiques chez l'adulte.....	69
B.	Pathogenèse du ZIKV à l'interface materno-foétale .....	70
VI.	Réponse immunitaire dans l'infection par le ZIKV .....	72
A.	Réponse immunitaire innée .....	72
a.	Induction de la réponse immunitaire .....	72
b.	La réponse ISG .....	74
c.	Production de facteurs solubles.....	75
B.	Réponse immunitaire adaptative.....	76
a.	La réponse médiée par les lymphocytes T .....	76
b.	Production d'anticorps neutralisants.....	77
c.	Implication des autres cellules du système immunitaire .....	78
C.	Mécanismes d'échappement à la réponse immunitaire.....	79
a.	Altération de la réponse immunitaire innée.....	79
b.	Altération de la réponse immunitaire adaptative.....	80
c.	Altération des voies métaboliques et de la lipogenèse.....	81
<b>Chapitre 3 :</b>	<b>Le système immunitaire .....</b>	<b>83</b>
I.	Présentation du système immunitaire en général .....	83
A.	Immunité Innée.....	84
B.	Immunité adaptative.....	86

II.	Les cellules Natural Killer (NK).....	86
A.	Caractéristiques générales des cellules NK .....	86
B.	Ontogénie des cellules NK.....	88
a.	Développement et maturation des cellules NK .....	88
b.	Education des cellules NK.....	90
c.	Contrôle du développement et de l'éducation des cellules NK.....	92
1.	Implication des facteurs solubles.....	93
2.	Implication des facteurs de transcription.....	94
3.	Implication des mi-ARN .....	96
4.	Implication des autres cellules du système immunitaire .....	97
i.	Les cellules dendritiques.....	97
ii.	Les lymphocytes.....	98
iii.	Les macrophages.....	98
C.	Récepteurs des cellules NK, leurs ligands et les voies de signalisation.....	99
a.	Les récepteurs de la superfamille des immunoglobulines .....	100
1.	Les récepteurs KIR.....	100
2.	Les LILR/ILT .....	101
3.	Les NCR.....	102
4.	DNAM-1 (CD226).....	103
5.	CD16 et Cytotoxicité à médiation Cellulaire Dépendante des anticorps (ADCC) .....	104
b.	Récepteurs de la superfamille des Lectines C.....	105
1.	Hétérodimère CD94/NKG2 .....	105
2.	NKG2D.....	106
3.	CD161.....	106
c.	Récepteurs aux cytokines, chimiokines et facteurs de croissance .....	107
d.	Récepteurs aux signaux de danger .....	107
e.	Autres récepteurs.....	108
1.	CD160.....	108
2.	2B4.....	108
f.	Signalisation après engagement des récepteurs des cellules NK.....	108
D.	Fonctions effectrices des cellules NK.....	110
a.	Fonction cytotoxique .....	111
1.	ADCC.....	111
2.	Synapse immunologique.....	112
3.	Système perforine/granzyme.....	113
4.	Les récepteurs de mort cellulaire.....	114
b.	Fonction de sécrétion .....	115
c.	Fonction de régulation.....	115

E.	Les cellules NK en contexte d'infections virales.....	116
a.	Infections aiguës et chroniques.....	116
b.	Adaptation et mémoire des cellules NK .....	118
III.	Les cellules NK déciduales.....	119
A.	Origine et développement des cellules dNK .....	120
B.	Caractéristiques phénotypiques des cellules dNK .....	121
C.	Fonctions des dNK dans la grossesse.....	123
a.	Contrôle de l'invasion des trophoblastes .....	123
b.	Contrôle du remodelage vasculaire.....	124
c.	Production de facteurs solubles.....	125
d.	Potentiel cytotoxique.....	126
e.	Mémoire dNK.....	127
D.	Défauts dans la réponse NK et complication de la grossesse.....	128
a.	Défaut d'implantation.....	128
b.	Défaut de placentation et pré-éclampsie.....	129
c.	Fausse couches répétées .....	130
d.	Retard de croissance intra-utérin.....	131
	<i>Objectifs</i> .....	132
	<i>Résultats</i> .....	135
	<i>Discussion</i> .....	171
A.	Perturbations du microenvironnement local lors de l'infection par le ZIKV.....	173
B.	Rôle des cellules dNK dans le contrôle des infections.....	179
C.	Mécanismes d'entrée du ZIKV.....	183
D.	Autres perspectives.....	185
a.	Modifications du phénotype des dNK en contexte d'infection par le ZIKV .....	185
b.	Interaction avec les macrophages déciduaux .....	187
c.	Métabolisme à l'interface mère -fœtus.....	190
d.	Souche Africaine du Virus Zika .....	192
	<i>Références Bibliographiques</i> .....	194
	<i>Annexes</i> .....	280

## Remerciements



Me voilà sur le point de clôturer quatre années d'une aventure enrichissante et fortifiante, parsemée de rencontres improbables, qui m'ont toutes aidée à la réalisation de mon projet.

Je voudrais tout d'abord remercier le Dr. Nabila Jabrane-Ferrat, ma directrice de thèse, de m'avoir accepté dans son équipe comme étudiante de thèse et de m'avoir fait confiance. Merci de m'avoir confié ce projet, qui m'a permis de découvrir les cellules NK et l'immunologie de la grossesse, tout en développant mes connaissances en virologie, domaine dans lequel je souhaitais en savoir plus.

Je voudrais également remercier le Pr. Jacques Izopet pour le soutien financier pour les trois premières années de mon doctorat ainsi que pour avoir accepté de présider mon jury de thèse. Merci à l'ensemble des membres de mon jury, qui m'ont fait l'honneur d'accepter d'évaluer mes travaux de thèse. Je remercie sincèrement mes rapporteurs, le Pr. Vincent Vieillard, le Dr. Mireille Laforge ainsi que le Dr. Ludivine Doridot, pour avoir évalué mon manuscrit de thèse et pour leurs nombreux commentaires positifs et encourageants sur l'ensemble de mes travaux.

Merci aussi à ma marraine de thèse, Anne Astier, ainsi qu'aux autres membres de mon comité de suivi de thèse, Eric Espinosa, Ludovic Martinet et Nicolas Blanchard, pour avoir suivi mes travaux de thèse et pour leur intérêt sur mon projet. Merci pour les remarques et les suggestions constructives qui ont participé à l'amélioration de mon travail.

Je voudrais ensuite remercier les personnes qui ont contribué à mon apprentissage tout au long de ces quatre années. Merci donc à Julie Tabiasco, Hicham El Costa et au Pr. Bahraoui pour les suggestions scientifiques et les divers conseils. Merci à Qian Chen pour toutes les discussions scientifiques que nous avons eues, pour les conseils que tu m'as donnés et pour les connaissances que tu m'as transmises. Cela a été un véritable plaisir de travailler à tes côtés.

Merci aussi à toutes les personnes avec qui j'ai été amenée à travailler, Marie, Mélanie, Quentin, Fanny, Eric ou Bénédicte, et aux membres de l'équipe DGD, Florent, Mathilde, Benjamin, Raphaël, Cécile, Elsa, Yamileth, Charlotte et Karine, pour leur écoute et leurs conseils.

Je remercie aussi les différents étudiants que j'ai côtoyé ou encadré : Lucille, Mélissa, Chloé, Julie, Alyssa et Yohan. Même si nous n'avons partagé un bureau que temporairement, merci Camille pour tes encouragements et ton soutien. Je suis certaine que tu réussiras dans tous tes projets personnels et professionnels. Bon courage pour la suite !

Merci à Natacha, pour ta bonne humeur, tes encouragements et ta positivité en toutes circonstances, pour ta joie de vivre et pour les moments où tu m'as remonté le moral. Je te souhaite sincèrement de réussir dans ton projet professionnel et de t'y épanouir pleinement.

Je tiens aussi à dire merci à Marina, avec qui j'ai partagé le bureau pendant 6 mois. J'ai adoré parler sciences avec toi, mais aussi mode, cuisine et tout le reste. Merci d'avoir été ma chauffeuse (préférée) pour les trajets Toulouse-Pau. Merci aussi pour tes encouragements, pour ta bonne humeur et ton sourire malgré les aléas de la vie, et pour ton tempérament de feu, qui m'aura souvent fait rire.

Il est aussi important pour moi de remercier Catherine Marques et Julien Hall. Vous êtes arrivés très récemment dans l'équipe mais partager ces quelques mois avec vous a été un réel plaisir. Merci Catherine pour ta positivité, ton sourire, ta bienveillance, tes petites attentions et ton soutien inconditionnel. Julien, merci pour les débats que tu as porté à ma connaissance. Travailler avec toi a été très instructif mais aussi très joyeux. Enfin, merci à Nour Ben Abda pour ton soutien, ta positive attitude, tes encouragements et ta bienveillance.

Merci à Sofiane, de m'avoir aidé dans mes expériences et dans les collections d'échantillons. Merci pour tes encouragements et tes blagues et surtout pour ton aide quand il s'agissait d'informatique. Je suis heureuse que tu aies rejoint l'équipe et je te souhaite sincèrement de réussir dans ton projet.

Merci à Vincent Cantaloube-Ferrieu, mon « partner in crime » de bureau, pour ton soutien inconditionnel, tes encouragements et tes précieux conseils. Merci pour ton agréable et incroyable compagnie les week-ends et le soir au labo. Merci aussi de m'avoir remonté le moral quand ça n'allait pas ! J'espère que je serais amenée à repartager un jour un bureau avec toi. Au pire, on pourra toujours partir élever des lamas au Pérou ou aller « juste sur une plage ».

Merci à Emilie qui a quitté l'équipe trop tôt. Merci pour ta gentillesse et ta bonne humeur, pour tes conseils et tes encouragements. Merci de m'avoir soutenu tous les jours depuis que je suis arrivée. Merci pour les soirées film-pizza qui m'ont changé les idées et d'avoir pris soin de ma plante fétiche quand je n'étais pas là.

Marie Descamps, merci pour ton soutien inconditionnel dans les meilleures comme dans les pires situations et ce depuis que l'on se connaît. Merci d'avoir cru en moi et de m'avoir supporté toutes ces années. Tu as toujours été de bon conseil lors de mon doctorat mais aussi dans tous mes projets personnels et je t'en serais encore une fois éternellement reconnaissante.

Ce paragraphe particulier est à présent dédié à Philippe Colin, sans qui tout cela aurait été « pfff... n'importe quoi ». Merci d'avoir géré mes différentes personnalités et t'inquiète, c'est moi le chef ! Plus sérieusement, merci pour tout ce que tu m'as appris sur le plan scientifique. Merci pour ta patience quand il a fallu m'expliquer encore, et encore, et encore, et encore, le FACS. Je me sens maintenant un peu plus à l'aise quand je fais les expériences de cytométrie en flux. Mais juste un peu plus ! Merci pour toute la confiance et le soutien dont tu as fait preuve, pour me remonter le moral et me pousser toujours plus loin, pour ne rien lâcher. Merci ainsi d'avoir été là dans les meilleures comme dans les pires situations, d'avoir écouté et de m'avoir conseillé. Peut-être serons-nous amenés à travailler ensemble à nouveau, quand tu m'embaucheras dans ta future équipe. Enfin, je suis convaincue que tu feras de grandes choses et que tu réussiras dans chacun des projets personnels et professionnels dans lesquels tu te lanceras.

Merci à l'ensemble des plateaux techniques du CPTP (cytométrie, imagerie, histologie) et des services communs, sans qui ces travaux de thèse n'auraient pas été possibles. Je les remercie pour leur professionnalisme, leur réactivité et leur savoir-faire. Je remercie tout particulièrement Francine et Caroline, qui m'ont sauvé la mise à maintes reprises. Enfin, je remercie l'ensemble du personnel de la maternité de l'hôpital Paule de Viguière pour nous avoir fourni régulièrement ces échantillons précieux, à l'origine de tout mon travail de thèse et sans lesquels rien de tout cela n'aurait été possible.

Et parce qu'il y a toujours une vie après le boulot, je remercie tous mes amis en dehors du labo qui m'ont permis de passer des soirées folles, dans des bars et des restaurants. Merci donc à Mona, Antoine, Pauline, Anna, Max, Lyvia et à tous les autres que j'oublie. Merci à Estelle de m'avoir encouragé et soutenu dans les moments les plus durs de mon doctorat. Merci de m'avoir écouté et de m'avoir aidé, tant sur le plan personnel que professionnel. Finalement, je souhaiterais remercier mes deux instructeurs, qui ont contribué au maintien de ma santé mentale durant les trois dernières années. Thierry, merci de m'avoir rendu plus forte et plus confiante. Merci d'avoir été là quand j'en ai eu besoin. Hippolyte, merci de m'avoir écouté, surtout les derniers temps, et de m'avoir encouragé à ne rien lâcher. Merci pour tes conseils !

Je remercie aussi ma famille, et tout particulièrement ma mère, Pascale, pour ses encouragements et son soutien inconditionnel et permanent, surtout ces dernières années. Tu as toujours été là pour moi, dans les meilleurs comme les pires moments et je t'en suis plus que reconnaissante. Je ne pense pas que je serais allée aussi loin sans toi. Je remercie aussi mon père, Luis, pour ses nombreux conseils pragmatiques. Merci de m'avoir écouté, d'avoir cru en

moi et de m'avoir toujours soutenu. Pour finir, un grand merci à ma grande soeur, Manuela, qui a toujours été pour moi une source infinie d'inspiration. Tu as toujours été là, au bout du fil, quand j'en avais besoin, et tes conseils ont été plus que précieux au cours de ces quatre dernières années.

Pour finir, je voudrais remercier Arii, qui m'a soutenu tous les jours dans mon projet depuis que l'on s'est rencontré. Merci d'avoir cru en moi et de m'avoir encouragé chaque jour. Merci de m'avoir poussé à continuer et à ne pas baisser les bras. Merci pour les conseils pragmatiques qui m'ont permis de garder confiance en moi et m'ont permis d'avancer. Merci pour toutes les attentions qui m'ont fait penser à autre chose en rentrant du travail. Merci de m'avoir fait garder le sourire et mes valeurs, même dans les moments les plus durs. Merci pour tout.

Un grand merci donc à vous tous !

## Liste des abréviations

- A -

ADCC	Antibody-Dependent Cell-mediated Cytotoxicity
AKT/PKB	Protein kinase B
AngII	Angiotensin II
ARN	Acide Ribonucléique
AS	Artère spiralée
ASR	Avortement Spontané Récurrent

- B -

BCL-2	B-cell lymphoma 2
BL	Blastocyte

- C -

CHIV	Virus Chikungunya
CLP	Progéniteur Lymphoïde Commun
CLR	C-type Lectine receptor
CMH	Complexe Majeur d'Histocompatibilité
CTB/CT	Cytotrophoblaste
CTEV	Cytotrophoblaste Extravilleux
CTL	Lymphocytes T Cytotoxiques

- D -

D	Décidua
DC	Cellule Dendritique
dDC	Cellule Dendritique déciduale
DENV	Virus de la Dengue
2DG	2-Désoxy-D-Glucose
DISC	Death-Inducing Signaling Complex
DNAM-1	DNAX Accessory Molecule-1
dNK	Cellule NK déciduale
DSC/CD	Cellule stromale déciduale

- E -

E4BP4	E4 promoter Binding Protein 4
EAT-2	EWS-FLI1-activated transcript 2
EB	Bouton Embryonnaire
EBV	Virus Epstein-Barr

ECAR	Extracellular Acidification Rate
EGF	Epidermal Growth Factors
EM	Mésoderme embryonnaire
Eng	Endoglin
Eomes	Eomésodermine
Ets-1	E26 transformation specific oncogene homolog-1
EU	Endothélium Utérin
EVT	Cellule trophoblastique extravilleuse

**- F -**

FADD	Fas-Associated protein with Death Domain
FcgR	Récepteurs humains pour les immunoglobulines
FGF-2	Fibroblast Growth Factor-2
Flt-1	Fms Related Receptor Tyrosine Kinase 1
FOXO1	Forkhead box protein O1
FSH	Hormone Folliculostimulante

**- G -**

GAPDH	Glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase
GATA3	Gata Binding Protein 3
GLUT	Transporteur de glucose
GM-CSF	Granulocyte Macrophage Colony Stimulating Factor
GPI	Glycosylphosphatidylinositol
Gzm	Granzyme

**- H -**

HBC	Cellule de Hofbauer
HB-EGF	Heparin Binding-Epithelial Growth Factor
hCG	Hormone Chorionique Gonadotrope
HCMV	Cytomégalovirus Humain
HIF-1a	Hypoxia Inducible Factor-1 alpha
HLA	Human Leukocyte Antigen
hMPV	Metapneumovirus Humain
HSV	Virus de l'Herpès Simplex

**- I -**

ICAM	Intercellular Adhesion Molecule
------	---------------------------------

IDO	Indoleamine 2,3-dioxygénase
IFI6	Interferon- $\alpha$ Inducible Gene 6
IFN-I	Interféron de type 1
IFN-II	Interféron de type 2
IFN-III	Interféron de type 3
IFN- $\alpha/\beta$	Interféron-alpha/beta
IFN- $\gamma$	Interféron-gamma
IFNAR	Interferon-alpha/beta receptor
IFITM	Protéine transmembranaire induite par l'interféron
IGF-1	Insulin-like Growth Factor-1
IKK $\epsilon$	Inhibiteur de la kappa-B kinase epsilon
IL	Interleukine
ILC	Cellule Innée Lymphoïde
ILT	Immunoglobulin Like Transcripts
iNK	Cellule NK immature
IRF	Interferon Regulatory Factor
IS	Synapse Immunologique
ISG	Interferon Stimulated Gene
ISRE	Elément de réponse stimulée par l'interféron
IST	Infection Sexuellement Transmissible
ITAM	Immunoreceptor Tyrosinebased Activation Motif
ITIM	Immunoreceptor Tyrosine-based Inhibitory Motif

**- J -**

JAK	Janus Kinase
KIR	Killer-cell Immunoglobulin-like Receptor
KLF	Krüppel-Like Factor

**- L -**

L	Lacune
LAMP-A	Lysosome-Associated Membrane Protein-1 / CD107a
LB	Lymphocyte B
LE	Epithélium luminal
LFA-1	Leukocyte Function-Associated antigen-1



LH	Hormone Lutéinisante
LIF	Leukemia Inhibitory Factor
LILR	Leucocyte Immunoglobulin-like Receptor
LLT1	Lectin-like Introduction 12 transcript-1
LT CD	Lymphocyte T

**- M -**

M	Myomètre
MAIT	Mucosal-Associated Invariant T cells
MAPK	Mitogen-Activated Protein Kinases
MAVS	Mitochondrial antiviral-signaling protein
MCMV	Cytomégalovirus Murin
MDA-5	Melanoma Differentiation-Associated protein 5
MEC	Matrice Extracellulaire
MIC	MHC class I Chain-related
MLL5	Mixed-Lineage Leukemia-5
MMP	Métalloprotéases matricielles
MTOC	Centre Organisateur des Microtubules
mTOR	Mammalian target of rapamycin

**- N -**

NCAM	Neural Cell Adhesion Molecule
NCR	Récepteur de cytotoxicité naturelle
NGS	Séquençage de Nouvelle Génération
NK	Cellule « Tueuse Naturelle » ou Cellule Natural Killer
NKR	Récepteurs des cellules NK
NO	Oxyde nitrique
NS	Protéine non structurale

**- O -**

OCR	Oxygen Consumption Rate
OMS	Organisation Mondiale de la Santé
ORF	Open Reading Frame
OXPPOS	Phosphorylation Oxydative

**- P -**

PAMP	Motif Moléculaire associé aux Agents Pathogènes
------	---

PCNA	Proliferating Cell Nuclear Antigen
PDGF-DD	Platelet-Derived Growth Factor-DD
PE	Pré-éclampsie
PE	Phosphatidyléthanolamine
PIGF	Phosphatidylinositol-glycan biosynthesis class F
PI3K	Phosphoinositide 3-Kinase
PKC $\gamma$	Protein Kinase C $\gamma$
PLC $\gamma$	Phospholipase C $\gamma$
pNK	Cellule NK périphérique
PRR	Récepteur de reconnaissance des motifs moléculaires
PS	Phosphatidylsérine
PVR	Poliovirus Receptor

**- R -**

RCIU	Retard de Croissance Intra-Utérin
RE	Réticulum Endoplasmique
RIF	Repeated Implantation Failure
RLR	RIG-1 like receptor
ROS	Espèce Réactive de l'Oxygène
RSV	Virus Respiratoire Syncytial

**- S -**

SAP	SLAM Associated Protein
SCF	Stem Cell Factor
SDRA	Syndrome de Détresse Respiratoire Aigüe
sfRNA	ARN subgénomique de Flavivirus
SGB	Syndrome de Guillain-Barré
SH2	sHSRC Homology 2
SHIP-1	SH2 domain-containing Inositol 5'-phosphatase-1
SHP-1	SH2 domain containing Phosphatase-1
SI	Système immunitaire
SMAC	Complexe Supramoléculaire d'Adhésion
SNC	Système Nerveux Central
SOCS	Suppressor of Cytokine Signaling
SRC	Syndrome de Rubéole Congénitale

STAT	Signal Transducer And Activator Of Transcription
STB/ST	Syncytiotrophoblaste
SVC	Syndrome de la Varicelle Congénitale
Syk	Spleen Tyrosine Kinase

- T -

TAM	Tyro3, Axl, Mertk
TAP2	Transporter 2, ATP Binding Cassette Subfamily B Member
TBK1	TANK binding kinase 1
<i>T. cruzi</i>	<i>Trypanosoma cruzi</i>
TGF-β	Transforming Growth Factor-β
<i>T. gondii</i>	<i>Toxoplasma gondii</i>
TIM	T-Cell Immunoglobulin and Mucin domain
TLR	Toll Like Receptor
TNF-α	Tumor Necrosis Factor
TORCH	Toxoplasma, Others, Rubella, Cytomegalovirus, Herpès
<i>T. pallidum</i>	<i>Treponema pallidum</i>
Treg	Lymphocyte T régulateur
trNK	Cellule NK résidente
TYK2	Tyrosine Kinase 2

- U -

ULBP	UL16 Binding Protein
UTR	Untranslated Regions

- V -

VA	Villosité Ancrée
VEE	Encéphalite Equine Vénézuélienne
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
VEGFR-1	Vascular Endothelial Growth Factor Receptor
VF	Villosité Flottante
VHB	Virus de l'Hépatite B
VHC	Virus de l'Hépatite C
VHE	Virus de l'Hépatite E
VIH	Virus de l'Immunodéficience Humaine
VLCM	Virus de la Chorioméningite Lymphocytaire

VNO Virus du Nil Occidental

VZV Virus Varicelle-zona

**- Z -**

ZAP70  $\zeta$  chain-associated protein of 70 kDa

ZIKV Virus Zika

## Liste des figures

**Figure 1.** Anatomie du tractus reproducteur féminin.

**Figure 2.** Modifications et Stades de Développement des follicules ovariens.

**Figure 3.** Structure de la paroi utérine humaine.

**Figure 4.** Cycle menstruel féminin, corrélé au cycle ovarien et à la production d'hormones.

**Figure 5.** De la fertilisation à l'implantation de l'embryon, premières étapes du développement humain.

**Figure 6.** Processus d'implantation du blastocyte.

**Figure 7.** Représentation schématique des interfaces materno-fœtales.

**Figure 8.** Représentation schématique des étapes du développement placentaire humain.

**Figure 9.** Processus de tolérance du fœtus semi-allogénique.

**Figure 10.** Subdivision de la decidua.

**Figure 11.** Défauts de placentation, les différents stades de la pathologie.

**Figure 12.** Physiopathologie et représentations cliniques de la pré-éclampsie.

**Figure 13.** Pathogenèse de la pré-éclampsie.

**Figure 14.** Effets d'une infection congénitale maternelle sur le développement fœtal.

**Figure 15.** Distribution historique mondiale du ZIKV entre 1947 et 2016.

**Figure 16.** Cycle Urbain et Sylvatique du ZIKV.

**Figure 17.** Phylogénie des Flavivirus et des Alphavirus.

**Figure 18.** Représentation du génome et des différentes protéines du ZIKV.

**Figure 19.** Récepteurs impliqués dans l'entrée du ZIKV dans la cellule hôte.

**Figure 20.** Voie de signalisation de l'interféron, induite après fixation d'AXL à son ligand.

**Figure 21.** Mécanismes d'entrée virale dans la cellule hôte.

**Figure 22. A.** Cycle de réplication du ZIKV.

**Figure 22. B.** Structures possibles des particules virales du ZIKV.

**Figure 23.** Stades de sévérité de la microcéphalie.

**Figure 24.** Reconnaissance de l'ARN viral, réponse immunitaire innée et voie d'induction des IFN-I.

**Figure 25. A.** Réponse immunitaire après une primo-infection par le ZIKV.

**Figure 25. B.** Réponse immunitaire après une seconde infection par le ZIKV.

**Figure 26.** Voies de signalisation induites par le ZIKV et mécanismes d'action des protéines virales non structurales.

**Figure 27.** Effet de l'infection par le ZIKV sur le métabolisme des cellules souches neuronales.

**Figure 28.** Cellules de l'immunité innée et adaptative.

**Figure 29.** Caractéristiques de cellules NK CD56<sup>bright</sup> et CD56<sup>dim</sup>.

**Figure 30.** Développement des cellules NK.

**Figure 31.** Modèle d'éducation des cellules NK.

**Figure 30.** Récepteurs des cellules NK (KIR et NKG2).

**Figure 31.** Interactions des NCR avec leurs ligands connus.

**Figure 32.** Les récepteurs des cellules NK.

**Figure 33.** Les récepteurs KIR et leurs ligands.

**Figure 34.** Structure des Récepteurs de Cytotoxicité Naturelle.

**Figure 35.** Interactions des NCR avec leurs ligands connus.

**Figure 36.** Ligands du récepteur NKG2D.

**Figure 37.** Signalisation induite par la molécule adaptatrice DAP12.

**Figure 38.** Signalisation médiée par les motifs ITIM.

**Figure 39.** Signalisation par le co-récepteur 2B4.

**Figure 40.** Cytotoxicité à médiation cellulaire dépendante des anticorps.

**Figure 41.** Mise en place de la synapse immunologique.

**Figure 42.** Sous-ensembles de cellules dNK au site d'implantation placentaire.

**Figure 43.** Rôle des cellules dNK et des macrophages dans le développement du lit placentaire.

**Figure 44.** Mise en place d'une réponse NK « mémoire » lors de la première grossesse.

**Figure 45.** Schéma récapitulatif des effets de l'infection par le ZIKV sur les fibroblastes de la decidua.

**Figure 46.** Effets de l'interaction du HLA-G avec son récepteur, exprimé à la surface des dNK lors de la grossesse.

**Figure 47.** Schéma récapitulatif des cellules dNK au cours d'une grossesse saine et d'une infection congénitale par le ZIKV.

**Figure 48.** Effet de l'inhibiteur d'Axl sur l'entrée du ZIKV et sa réplication virale.

**Figure 49.** Expression des récepteurs du ZIKV sur les DSC.

**Figure 50.** Contrôle de l'infection par le ZIKV en l'absence de macrophages déciduaux.

**Figure 51.** Schéma récapitulatif des interactions entre les cellules dNK et les macrophages.



## Résumés

## I. Résumé Français

Les premiers mois de la grossesse sont caractérisés par la mise en place du placenta, une barrière protectrice efficace. Il assure la communication materno-fœtale et permet les échanges qui contribuent au développement du fœtus, au niveau des interfaces materno-fœtales. Parmi ces interfaces, se trouve la *decidua basalis* (decidua), la muqueuse de la paroi utérine sur laquelle le placenta est ancré. Très riche en cellules immunitaires maternelles, la decidua constitue, avec le placenta, un site immunitaire privilégié, nécessaire à la tolérance du fœtus semi-allogénique ainsi qu'à la protection contre la transmission d'agents pathogènes. Néanmoins, malgré la protection robuste du placenta et la surveillance active des cellules immunitaires déciduales, certains pathogènes franchissent cette barrière et se disséminent jusqu'au fœtus. La famille des pathogènes TORCH (Toxoplasma, « Others », Rubéole, Cytomégalovirus, virus Herpès) est la plus connue pour être à l'origine d'infections congénitales. Plus récemment, d'autres virus émergents, capables d'infecter les interfaces mères-fœtus et de causer des complications graves pour la mère et le fœtus, ont été identifiés. Parmi ces virus, on retrouve notamment le virus Zika (ZIKV).

Dans ce contexte, l'objectif de mon doctorat a été de comprendre la pathogénèse de l'infection par le ZIKV à l'interface mère-fœtus et d'identifier le rôle des cellules immunitaires dans le contrôle de l'infection. Mes travaux de thèse se sont ainsi articulés en trois axes majeurs.

Dans la première partie de ma thèse, nous nous sommes intéressés à la pathogénèse du ZIKV à l'interface materno-fœtale en caractérisant l'effet du virus sur le microenvironnement local décidual. Nous avons mis en évidence que l'infection des cellules déciduales est associée à un schéma spécifique, qui peut conditionner la réponse immunitaire à l'interface materno-fœtale. Ainsi, dans une deuxième partie, nous nous sommes consacrés à l'étude de l'effet de l'infection sur la réponse immunitaire innée. Nous avons ainsi caractérisé la fonction des cellules Natural Killer déciduales (dNK). Lors d'une grossesse saine, ces cellules, qui représentent 30% des cellules déciduales, ne sont pas cytotoxiques mais produisent de nombreux facteurs solubles essentiels au développement placentaire et fœtal. Ces cellules sont néanmoins dotées d'une plasticité fonctionnelle et phénotypique qui leur permet d'adapter leurs fonctions effectrices et de devenir cytotoxiques lors d'une infection. De cette manière, nous avons découvert que les dNK sont capables de détecter et de limiter l'infection par le ZIKV des cellules déciduales et nous avons partiellement identifié les mécanismes cellulaires impliqués dans ce contrôle. Finalement, dans une dernière partie, nous avons cherché à déterminer les récepteurs impliqués

dans l'entrée du ZIKV dans les cellules déciduales afin d'identifier une cible thérapeutique potentielle.

En conclusion, mes travaux de thèse permettent de fournir des informations importantes sur la pathogenèse du ZIKV à l'interface materno-fœtale. De plus, ils présentent un nouveau modèle expérimental pour étudier les infections congénitales, caractériser la réponse immunitaire lors d'une infection virale et tester de nouvelles stratégies thérapeutiques limitant les infections lors de la grossesse.

Mots clés : Grossesse, Interfaces materno-fœtales, Virus Zika, Infection congénitale, Système immunitaire, Cellules Natural Killer déciduales.

## II. English Abstract

The first months of pregnancy are characterized by the establishment of the placenta, an effective protective barrier. It ensures maternal-fetal communication and allows exchanges that contribute to the development of the fetus, in specific areas called maternal-fetal interfaces. Among these interfaces, we can distinguish the *decidua basalis*, a uterine mucosa on which the placenta is anchored. Enriched with maternal immune cells, the decidua constitutes, with the placenta, a privileged immune site, necessary for the tolerance of the semi-allogenic fetus as well as for protecting against the transmission of pathogenic agents to the child. However, despite the robust protection of the placenta and the active surveillance of decidual immune cells, some pathogens cross this barrier and spread to the fetus. TORCH pathogens (Toxoplasma, Others, Rubella, Cytomegalovirus, Herpes virus) are the best known for causing congenital infections. More recently, other emerging viruses, like Zika virus, have been identified. They are capable of infecting mother-fetus interfaces and cause severe outcomes for both the mother and the fetus.

In this context, the main objective of my work was to understand ZIKV pathogenesis at the maternal-fetal interface and to identify the role of immune cells in the control of ZIKV infection. My thesis work was articulated around three main axes.

In the first part of my PhD, we focused on the pathogenesis of ZIKV at the maternal-fetal interface by characterizing the effect of ZIKV infection on the decidual local microenvironment. We showed that ZIKV infection is associated with a specific pattern, which may induce a specific immune response at the maternal-fetal interface. Thus, in a second part, our research led us to study the effect of ZIKV infection on the innate immune response. We characterized the function of decidual Natural Killer cells (dNK). During a healthy pregnancy, these cells, which represent 30% of the decidua cells, are not cytotoxic but secrete many soluble factors that are essential for placental and fetal development. These cells are endowed with a functional and phenotypic plasticity which allows them to adapt their effector functions and to become cytotoxic during infection. We discovered that dNK cells are able to detect and limit ZIKV infection of decidual cells, and we partially identified the cellular mechanisms involved in this control. Finally, in a last part, we investigated the receptors involved in ZIKV entry into decidual cells, in order to identify a potential therapeutic target.

In conclusion, my thesis work provides important information on the pathogenesis of ZIKV at the maternal-fetal interface. In addition, my project presents a new experimental model to study

congenital infections, characterize the immune response during viral infection and test new therapeutic strategies to limit infections during pregnancy.

Keywords: Pregnancy, Maternal-Fetal Interfaces, Zika Virus, Congenital infection, Immune System, Decidual Natural Killer Cells.

# *Introduction*

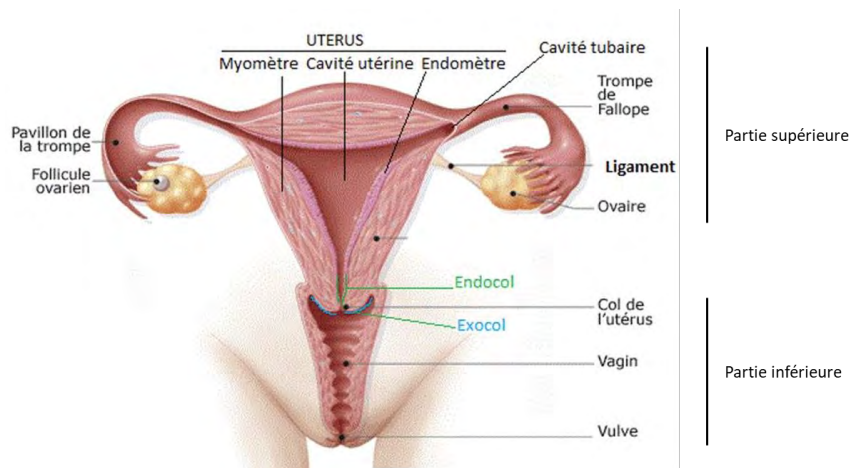
## Chapitre 1 : La grossesse humaine

« Chez la femme tout est une énigme. Mais il y a un mot à cette énigme. Ce mot est *grossesse*. » - Friedrich Nietzsche.

La grossesse humaine est une période très excitante dans la vie des futurs parents. C'est aussi la plus grande énigme scientifique puisqu'elle est associée à d'importants changements dans l'organisme maternel pour créer un environnement propice au développement fœtal. Le système immunitaire est par ailleurs mis à rude épreuve pour tolérer l'embryon puis le fœtus, mais également pour protéger ce dernier des pathogènes qui infectent la mère. Le succès de la grossesse dépend alors non seulement du tractus reproducteur féminin, qui s'est adapté au cours de l'évolution, mais également de structures mises en place spécifiquement lors du processus de placentation.

### I. Le tractus reproducteur féminin

Le tractus reproducteur féminin est composé d'une partie supérieure, qui comprend les ovaires, les trompes de Fallope, l'utérus et l'endocol, et d'une partie inférieure, qui comprend la vulve, le vagin et l'exocol (**Figure 1**). Il assure à la fois un rôle de reproduction et de protection. Le tractus génital possède en effet naturellement des systèmes de défense variés contre le risque infectieux, avec des défenses non immunes, pré-immunes et immunes (1).



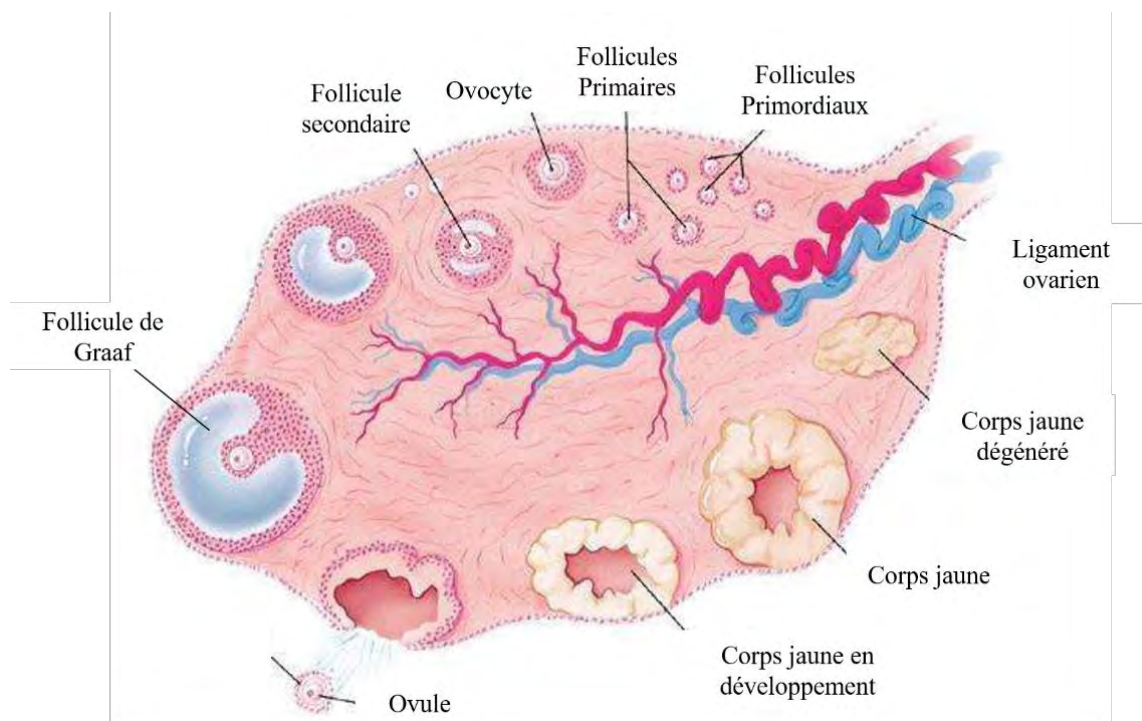
**Figure 1 : Anatomie du tractus reproducteur féminin.**  
Adaptée de <https://microbiologiemedical2e.fr/appareil-genital-feminin/>.

#### A. Les ovaires

Les ovaires sont de petits organes glandulaires mixtes situés sur les côtés opposés de l'utérus. Ils possèdent une région interne richement vascularisée et innervée, la médulla, et une région

périphérique, le cortex ovarien (2). Les ovaires font partie du système endocrinien en synthétisant de nombreuses hormones sexuelles, dont les œstrogènes, la progestérone et de petites quantités de testostérone. Cette production hormonale est contrôlée par les hormones folliculostimulantes (FSH) et lutéinisantes (LH), deux hormones hypophysaires. La fonction première des ovaires est la production des gamètes femelles, appelées les ovocytes.

Le développement et la maturation des ovocytes se produisent dans le cortex ovarien. Les follicules générés sont présents dans une large gamme de tailles représentant divers stades de la folliculogénèse (**Figure 2**). Les ovocytes primaires sont arrêtés à un stade précoce de la première méiose formant ainsi des follicules primordiaux. A la puberté, les nombreux follicules primaires formés sont soumis à la FSH et LH, favorisant leur développement et leur maturation (3). Alors que la majorité de ces follicules dégénère, un seul sera sélectionné pour l'ovulation : le follicule de Graaf. Après ovulation, l'ovule est libéré et le corps jaune est formé. Ce dernier joue alors un rôle clé dans l'implantation embryonnaire, en produisant des œstrogènes et de la progestérone.



**Figure 2 : Modifications et Stades de Développement des follicules ovariens.**

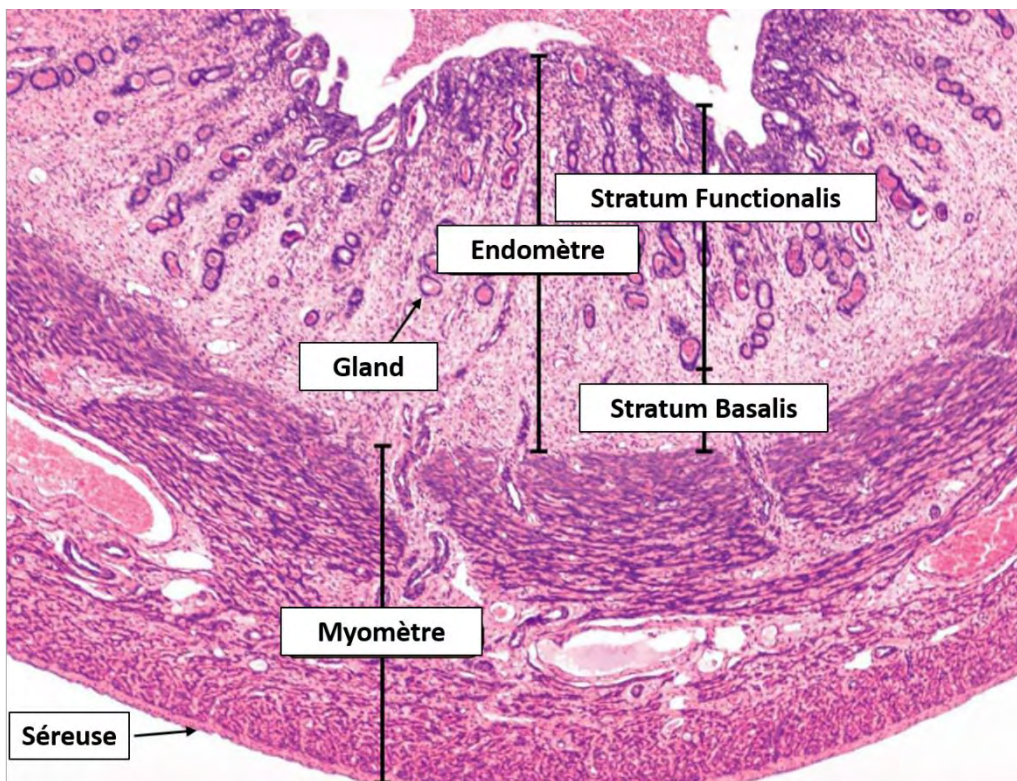
Source : <https://www.futura-sciences.com/sante/definitions/biologie-ovaire-4134/>.

## B. L'utérus

L'utérus est l'organe le plus grand et le plus important de l'appareil reproducteur féminin. Hormonalement sensible, il accueille l'implantation de l'embryon et favorise son



développement. La paroi utérine est composée de l'endomètre, un épithélium glandulaire hautement vascularisé, qui joue un rôle central dans l'implantation embryonnaire et le maintien de la grossesse. L'endomètre est divisé en deux couches : la couche fonctionnelle (*stratum functionalis*), la plus externe, et la couche basale (*stratum basalis*), en contact avec le myomètre. Le myomètre est une couche de cellules fibromusculaires lisses, impliquées dans les contractions musculaires pendant l'accouchement (**Figure 3**). Enfin, le myomètre est recouvert du périmètre, une couche séreuse composée de tissus conjonctifs lâches et de nombreux vaisseaux lymphatiques.

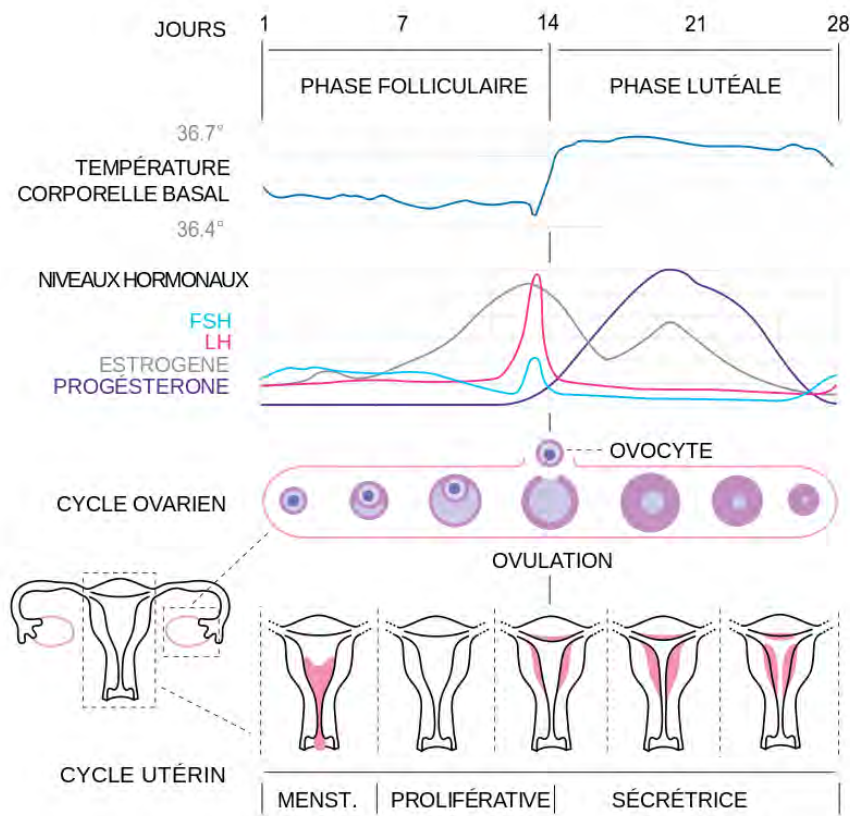


**Figure 3 : Structure de la paroi utérine humaine.** Coupe histologique marquée avec l'hématoxyline et l'éosine (H&E). Source : [http://medcell.med.yale.edu/histology/female\\_reproductive\\_system\\_lab.php](http://medcell.med.yale.edu/histology/female_reproductive_system_lab.php).

## II. Endomètre et Cycle menstruel

Chez la femme, le cycle menstruel dure en moyenne 28 jours et est sous contrôle de la production hormonale. Le développement cyclique des follicules ovariens et du corps jaune, associé à la production des gonadotrophines hypophysaires FSH et LH, entraîne des changements cycliques dans les taux des principales hormones ovariennes, les œstrogènes et la progestérone, ce qui déclenche les modifications structurelles cycliques de l'endomètre observées au cours du cycle menstruel (**Figure 4**). Le cycle menstruel peut être divisé en trois phases : la phase menstruelle, la phase proliférative et la phase sécrétoire. Les phases

menstruelle et proliférative sont regroupées en une phase dite folliculaire, alors que la phase sécrétoire est aussi appelée phase lutéale.



**Figure 4 :** Cycle menstruel féminin, corrélé au cycle ovarien et à la production d'hormones.

Source : <https://commons.wikimedia.org/w/index.php?curid=19070955>.

### A. Phase folliculaire

En l'absence de fécondation, le corps jaune dégénère par apoptose (4). La production hormonale est arrêtée et les niveaux circulants de progestérone et d'œstrogènes diminuent, déclenchant la phase menstruelle. Cette phase dure en moyenne entre trois et six jours et se caractérise par une dégénérescence et une régression de l'endomètre. De plus, une vasoconstriction des artères utérines se produit ainsi qu'une ischémie des glandes endométriales. Les écoulements menstruels contiennent alors l'endomètre dégénéré, mélangé à du sang de vaisseaux sanguins rompus (5,6). Après la phase menstruelle, la muqueuse utérine devient relativement mince.

La phase proliférative commence immédiatement après la phase menstruelle et dure environ une semaine, jusqu'à l'ovulation. La sécrétion active d'œstrogènes par les follicules ovariens en développement initie et contrôle cette phase. Les hormones agissent sur la prolifération des cellules endométriales et contribuent à la reconstitution et à l'épaississement de la couche fonctionnelle de l'endomètre, perdue lors de la phase menstruelle (7,8). De plus, les œstrogènes

stimulent la transcription de gènes codant pour différents facteurs de croissance tels que l'EGF (Epidermal Growth Factor) et l'IGF-1 (Insulin-like Growth Factor-1) et leurs récepteurs spécifiques (9). Ces facteurs participent à la prolifération cellulaire et à la reconstitution de l'épithélium.

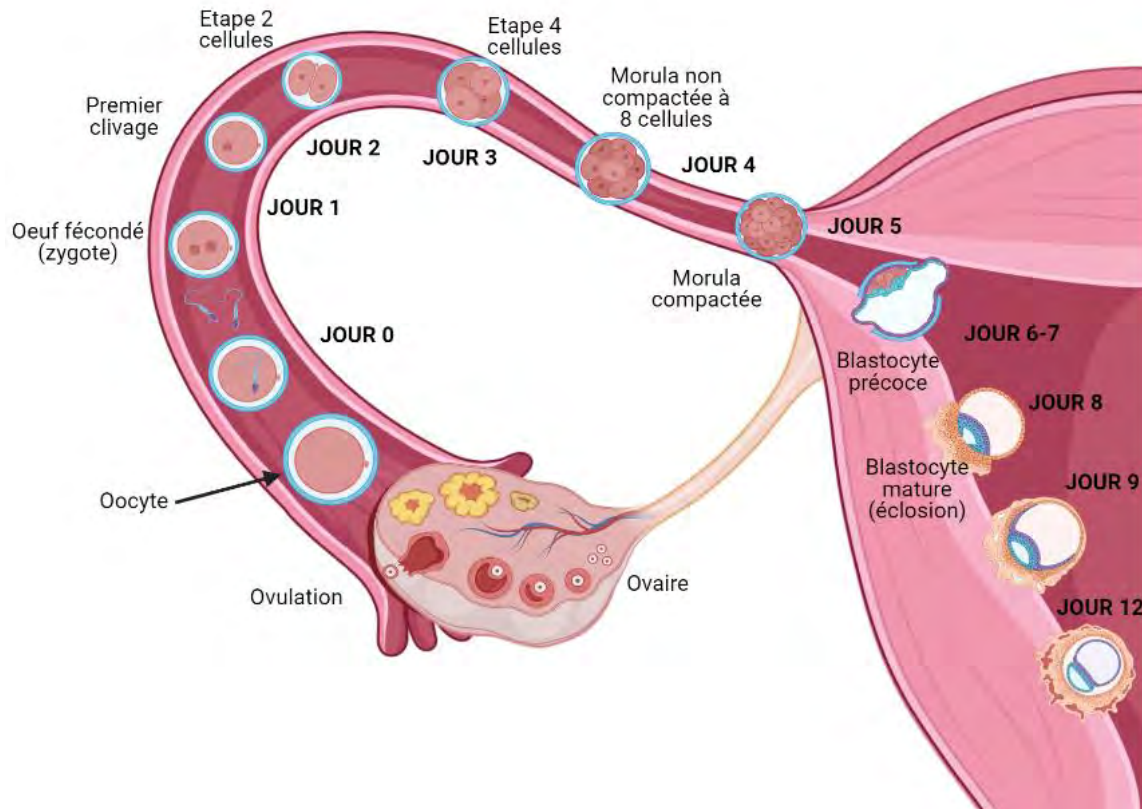
### *B. Phase sécrétoire ou lutéale*

La phase lutéale commence après l'ovulation et dure jusqu'à la fin du cycle. Cette phase est initiée par la progestérone, sécrétée par le corps jaune (10). La progestérone stimule les cellules épithéliales des glandes utérines formées lors de la phase proliférative. Par ailleurs, elle inhibe l'expression des récepteurs de l'œstrogène et la prolifération des cellules endométriales utérines, qui s'engagent dans un processus de différenciation, nommé décidualisation (11). Finalement, la progestérone induit l'expression de différentes chimiokines nécessaires au recrutement des cellules immunitaires, indispensables au phénomène de tolérance maternelle (12). A l'inverse, la progestérone augmente la production de VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor), un facteur de croissance qui stimule la prolifération des cellules endothéliales des artères utérines de l'endomètre. Les artères spiralées utérines se développent alors en parallèle des glandes endométriales et présentent d'importantes ramifications.

C'est lors de la phase lutéale que l'endomètre atteint son épaisseur maximale pour accueillir le blastocyste. En l'absence d'implantation et de fécondation, l'ovule descend vers l'utérus, le corps jaune dégénère et la sécrétion de progestérone chute brutalement, déclenchant la phase menstruelle et l'initiation d'un nouveau cycle.

### **III. Implantation de l'embryon**

A chaque cycle menstruel, un seul ovule est libéré de l'un des ovaires. Sa fécondation par un spermatozoïde s'effectue dans les trompes de Fallope, dans les 24 à 48 heures suivant l'ovulation (**Figure 5**). Le développement du zygote se produit alors au fur et à mesure que l'embryon progresse dans les trompes. De plus, l'embryon est entouré d'une couche de glycoprotéines, qui empêche les contacts avec les cellules des trompes et prévient ainsi les grossesses extra-utérines. Environ 5 jours après la fécondation, l'embryon atteint un stade de morula, puis de blastocyste. Sept jours après la fécondation, ce blastocyste atteint l'utérus où il est capable de s'implanter (13,14) (**Figure 5**).

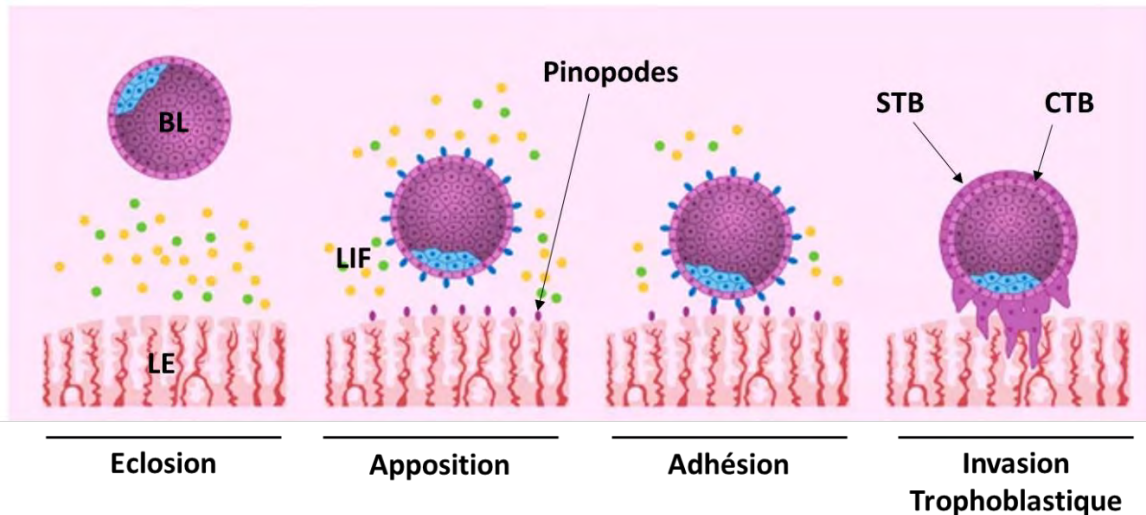


**Figure 5 : De la Fertilisation à l'implantation de l'embryon, premières étapes du développement humain.**  
 Source BioRender. Adaptée de : <https://embryology.med.unsw.edu.au/embryology/index.php/Implantation>.

L'implantation est une étape importante qui nécessite l'adhésion du blastocyste au tissu endométrial maternel (**Figure 6**). C'est au cours de ce processus que les trophoblastes du blastocyste se différencient en deux populations cellulaires distinctes : la couche cellulaire externe polarisée, qui donnera naissance au futur placenta, et la couche cellulaire interne qui se différencie en la masse cellulaire, et qui donnera l'embryon.

L'implantation dépend d'un endomètre réceptif. En effet, l'embryon ne peut être accueilli qu'au cours d'une courte période appelée « fenêtre implantatoire », estimée entre 8 et 10 jours après l'ovulation (15). En dehors de cette fenêtre, l'endomètre est totalement réfractaire à l'implantation embryonnaire. L'implantation dépend aussi de processus synchronisés entre les tissus maternels et embryonnaires (16,17). Ce synchronisme implique des molécules d'adhésion, des cytokines et des facteurs de croissance (16). Cette étape est fondamentale non seulement pour l'évolution future du blastocyste mais aussi pour la formation d'un placenta fonctionnel. Il a été observé que des anomalies génétiques, immunitaires ou métaboliques peuvent induire des défauts dans l'implantation des blastocystes (18,19).

Finalement, l'implantation de l'embryon est divisée en deux phases : l'adhésion du blastocyste, qui comprend l'apposition et l'attachement, et l'invasion (20).



**Figure 6 : Processus d'implantation du blastocyste.** BL : Blastocyste, LE : Epithélium luminal, LIF : Leukemia Inhibitory Factor, STB : Syncytiotrophoblaste, CTB : Cytotrophoblaste. Adaptée de <https://www.invitro.com/fr/implantation-embryonnaire/>.

#### A. Phase d'apposition et d'adhésion

L'apposition est la première phase de l'implantation embryonnaire. Le blastocyste entre en contact avec les cellules de l'épithélium endométrial (**Figure 6**). Les interactions sont alors favorisées par la présence de protrusions cytoplasmiques, les pinopodes, présents à l'extrémité apicale des cellules épithéliales (21). Ces projections, spécifiques de la « fenêtre implantatoire », apparaissent sous l'effet de la progestérone (22,23), produite après la sécrétion d'hormone Chorionique Gonadotrope (hCG) par les cellules trophoblastiques (24). De plus, l'apparition des pinopodes est associée à la suppression des protéines anti-adhésion (20,25).

Le renforcement des interactions entre l'embryon et l'endomètre a lieu lors de la phase d'adhésion, qui succède à la phase d'apposition. L'adhésion stable de l'embryon est directement liée aux cellules trophoblastiques qui entourent le blastocyste et dépend de la croissance et de la différenciation de ces cellules. De plus, l'adhésion est initiée par la sécrétion de LIF (Leukemia Inhibitory Factor), d'IL-1 (Interleukine-1) et de HB-EGF (Heparin Binding-Epithelial Growth Factor) par les cellules embryonnaires et endométriales (**Figure 6**). La liaison de ces ligands à leurs récepteurs induit alors l'expression des molécules d'adhésion cellulaire (intégrines, cadhérines et sélectines) (26), des protéines membranaires (CD9, CD44 et CD55) et des protéines de la matrice extra-cellulaire (fibronectine, laminine, ...) (27,28). L'ensemble de ces molécules et de ces protéines sont nécessaires pour établir de nouvelles interactions et pour renforcer l'adhésion de l'embryon (29,30).

## B. Phase d'invasion

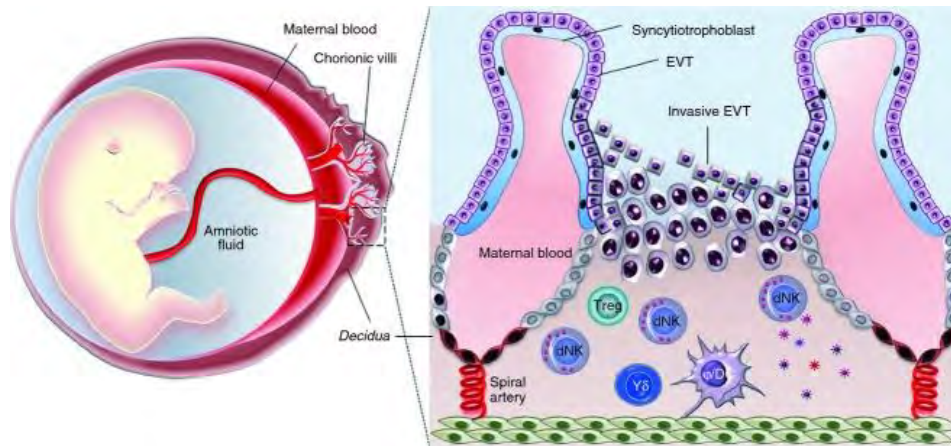
L'étape finale de l'implantation embryonnaire est l'invasion. Les interactions cellulaires et moléculaires mises en place entre le blastocyste et l'endomètre lors de l'adhésion induisent la prolifération et la différenciation des trophoblastes (20). Les cellules trophoblastiques différenciées envahissent alors le stroma endométrial et favorisent le remodelage utérin, notamment par le biais de leur activité protéolytique.

Plusieurs enzymes participent à ce processus invasif. Les métalloprotéases matricielles (MMP) jouent un rôle majeur dans la modification de la matrice extracellulaire (MEC) et de l'environnement immunosuppresseur (6,31). Les MMP-2 et MMP-9 sont les principales MMP sécrétées (32). Elles dégradent le collagène de type IV, principal constituant de la MEC, afin de faciliter l'invasion trophoblastique. Le processus est amplifié par l'apoptose des cellules épithéliales, la rupture des jonctions serrées de l'épithélium utérin et la dissociation des cellules endométriales (20,33). L'embryon pénètre alors l'endomètre jusqu'à un enterrement complet (**Figure 6**).

L'invasion reste un processus contrôlé dans l'espace et dans le temps, notamment par le dialogue qui existe entre les cellules déciduales, immunitaires, vasculaires et trophoblastiques (31). Ainsi, une dérégulation de l'ensemble de ces mécanismes peut être à l'origine de défauts de la grossesse, comme une invasion insuffisante (pré-éclampsie, retards de croissance ou avortements spontanés) ou démesurée (*placenta accreta*) (34,35).

## IV. Les interfaces materno-fœtales

La grossesse se caractérise par la mise en place d'interfaces materno-fœtales immuno-privilegiées (**Figure 7**). Les deux interfaces principales sont l'espace intervilloux, les villosités placentaires flottantes qui baignent dans le sang maternel, et la decidua, qui sert de point d'ancrage au placenta (36,37).



**Figure 7 : Représentation schématique des interfaces materno-fœtales.** Le trophoblaste, qui baigne dans le sang maternel, est composé d'une couche mononucléée de syncytiotrophoblastes, supplémentée d'une monocouche d'EVT. Les EVT sont capables d'envahir la decidua, où ils sont en contact direct avec le système immunitaire maternel. En sécrétant plusieurs cytokines/chimiokines et facteurs pro angiogéniques, les cellules immunitaires qui y sont présentes favorisent l'invasion des EVT, le remodelage vasculaire et aident à l'établissement de la tolérance fœtale (38).

L'existence de telles interfaces implique donc que le fœtus n'est jamais en contact direct avec les tissus maternels. Néanmoins, les échanges et la communication materno-fœtale sont toujours possibles afin de favoriser le développement du placenta et du fœtus et éviter le rejet fœtal. Les adaptations complexes des deux parties fonctionnent ensemble pour pousser le système immunitaire vers la tolérance plutôt que le rejet (39,40). La tolérance mise en place à l'encontre du fœtus s'explique par le fait que ces interfaces comprennent un grand nombre de cellules immunes maternelles et fœtales essentielles à la régulation du dialogue entre la mère et le fœtus (40–44). Le fœtus est alors complètement protégé contre les agressions immunitaires. Les principales populations immunes de l'interface materno-fœtale et leurs fonctions seront décrites plus en détail dans le Chapitre 3 de l'Introduction.

## A. Le placenta

### a. Structure du placenta

Le développement du placenta humain est essentiel pour le succès de la grossesse. Après l'implantation, des vacuoles apparaissent au sein de la masse embryonnaire et se développent progressivement pour former de véritables lacunes, remplies de sécrétions endométriales. Ces lacunes constituent l'ébauche de l'espace intervilloux du placenta et resteront jusqu'à la mise en place de la circulation utéro-placentaire caractéristique de la placentation hémochoriale. Plus tard, elles seront irriguées par le sang maternel qui apporte les nutriments nécessaires à la croissance fœtale jusqu'à l'accouchement.

En parallèle, les trophoblastes, formant la couche épithéliale la plus externe du blastocyste, donnent naissance aux cytotrophoblastes (CTB), qui se différencient alors selon deux programmes (41). Dans le premier programme, les CTB fusionnent pour former le syncytium/syncytiotrophoblaste (STB) primitif, une couche externe épithéliale multinucléée. Cette couche, continuellement régénérée par la différenciation et la fusion des CTB, constitue la face externe des villosités choriales placentaires flottantes (45). L'espace intervilloux est formé par les lacunes résultantes.

Dans le second programme, les CTB perdent progressivement leur potentiel prolifératif, acquièrent un phénotype invasif puis se différencient en cellules trophoblastiques extravillieuses (EVT). Les EVT traversent ensuite le STB primitif et envahissent la muqueuse utérine, ce qui permet la formation des villosités placentaires qui s'ancrent à l'endomètre. Ces premières villosités placentaires se transformeront par la suite en villosités secondaires et tertiaires, caractérisées par une invasion de cellules souches mésenchymateuses extra-embryonnaires, une ramification villositaire et une vascularisation (**Figure 8**) (46). Au stade tertiaire, les villosités ont acquis leur structure définitive et constituent l'unité structurale et fonctionnelle du placenta. De plus, si la villosité placentaire est libre dans l'espace intervilloux, elle est qualifiée de villosité flottante. Dans le cas contraire, elle est qualifiée de villosité ancrée.

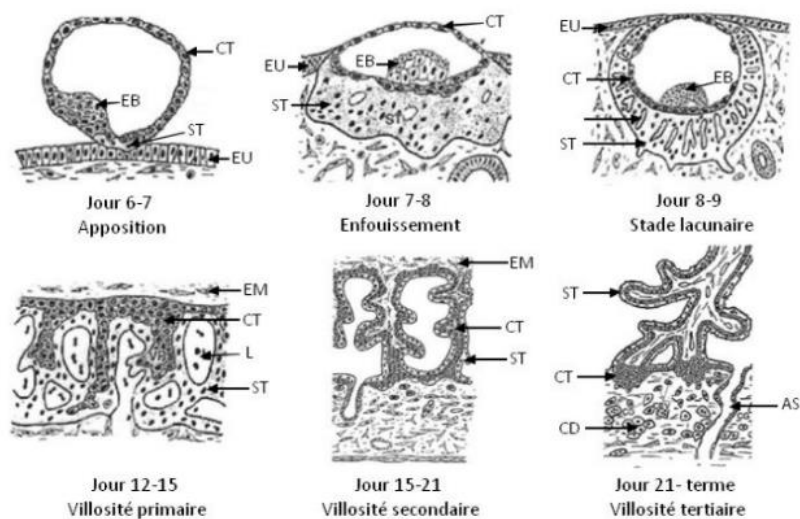
Dès le début de la grossesse, les artères déciduales maternelles subissent également un important remodelage. Au cours de l'invasion, les EVT orientent leur migration vers les artères utérines, s'y accumulent et s'organisent en « bouchons trophoblastiques » qui obstruent l'ouverture des vaisseaux et bloquent complètement l'entrée du sang maternel dans l'espace intervilloux (47). Le colmatage des artères maternelles empêche de cette manière un flux sanguin précoce vers l'espace intervilloux et crée un environnement hypoxique nécessaire au développement du placenta et du fœtus (48,49).

L'hypoxie stimule la production de facteurs de croissance pro-angiogéniques tels que le VEGF et le FGF-2 (Fibroblast Growth Factor-2) ainsi que l'expression des facteurs de transcription Ets-1 (E26 transformation specific oncogene homolog-1) et KLF8 (Krüppel-Like Factor 8), nécessaires à la mise en place du réseau sanguin embryo-placentaire (48–50). A l'inverse, l'hypoxie limite la formation d'espèces réactives de l'oxygène (ROS), une augmentation prématurée des niveaux d'oxygène pouvant provoquer des dommages oxydatifs de l'unité fœtale-placentaire (51). Enfin, l'hypoxie permet de stabiliser la protéine HIF-1 (Hypoxia Inducible Factor-1) et d'activer la sécrétion de TGF- $\beta$  (Transforming Growth Factor- $\beta$ ). Ces



facteurs stimulent la prolifération des CTB mais limitent leur différenciation et leur potentiel invasif au profit du développement placentaire (52,53). L'environnement hypoxique exerce donc une fonction protectrice en assurant un développement placentaire normal (54).

Finally, at the end of the first trimester of pregnancy, the EVT colonize the vascular wall and the trophoblastic plugs disintegrate (55). The placental villi bathe in the maternal blood that fills the intervillous space. The hemochorial placentalation is established. The vessels formed present a low resistance and a high blood flow, which allows to increase in an appropriate manner the blood flow in the intervillous space of the placenta in development and to favor the mother-fetus exchanges (47,56).



**Figure 8 :** Représentation schématique des étapes du développement placentaire humain. EB : Bouton Embryonnaire, CT : Cytotrophoblaste, ST : Syncytiotrophoblaste, EU : Endothélium Utérin, EM : Mésoderme embryonnaire, L : Lacune, AS : Artère Spiralee, CD : Cellule Déciduale. Adaptée de Benirschke et Kaufmann (57).

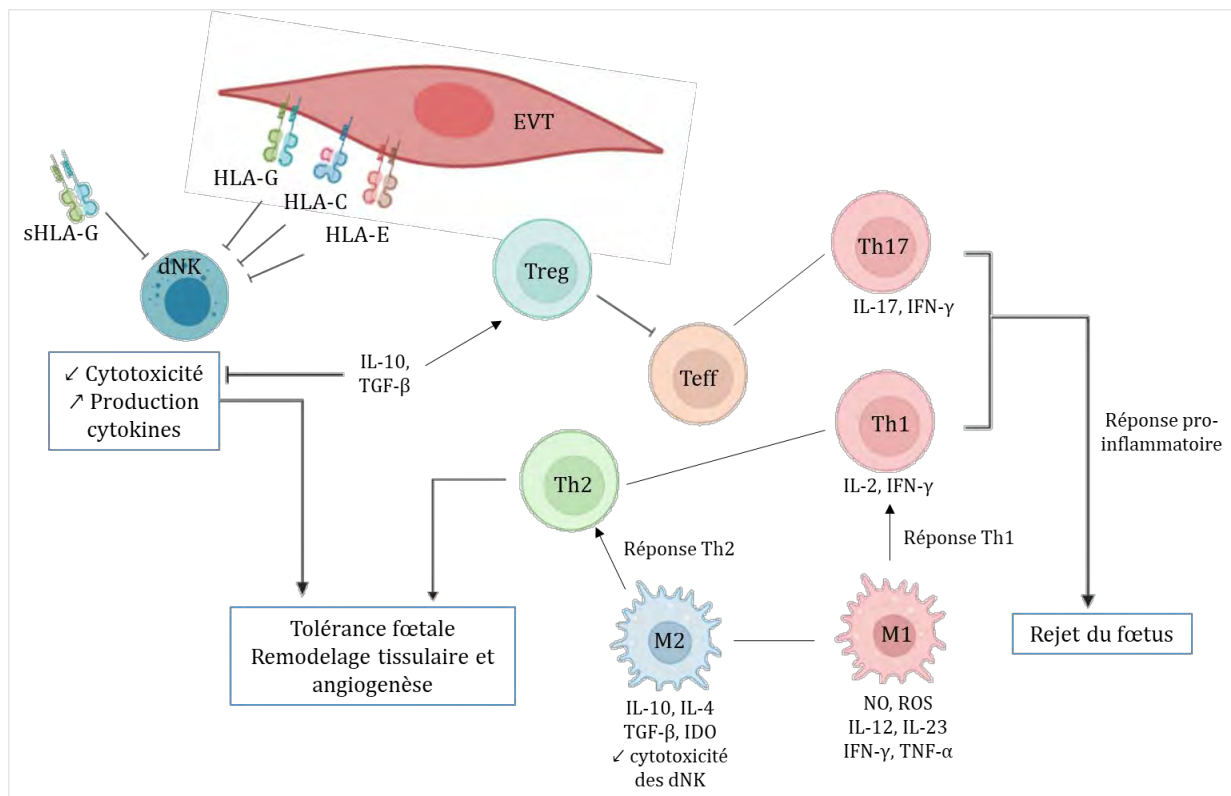
### b. Fonction du placenta

The placenta is composed of placental villi, bathed in maternal blood. Its primary function is the exchange of nutrients (carbohydrates, amino acids, lipids, vitamins and minerals), of gas (oxygen) and of substances necessary for the support of the developing embryo.

Moreover, the placenta also intervenes in the elimination of toxic maternal compounds, such as carbon dioxide. It metabolizes a certain number of substances and can release metabolic products in the maternal and/or fetal circulation. It helps in the protection of the fetus against infections and maternal diseases. It also releases hormones in the maternal and fetal circulations. These hormones contribute to the good

déroulement de la grossesse et de l'accouchement et participent au métabolisme et à la croissance fœtale (58,59).

Enfin, le placenta favorise, tout au long de la grossesse, le maintien de la tolérance fœtale, *via* une série de processus immunitaires actifs. La tolérance du fœtus passe alors par une interaction entre les CTB, les EVT, les cellules stromales déciduales (DSC) et les cellules immunitaires présentes au niveau du placenta (**Figure 9**) (40,42). La tolérance est tout d'abord médiée par l'expression des molécules de HLA-G par les EVT (60). Le HLA-G est reconnu par les récepteurs inhibiteurs ILT2 et KIR2DL4 exprimés par les cellules NK, majoritairement présentes au site d'implantation. La fixation du HLA-G à son récepteur inhibe alors leur fonction cytotoxique et protège les cellules trophoblastiques fœtales. De plus, le HLA-G soluble (sHLA-G) peut interagir avec les récepteurs de type immunoglobuline (KIR) des NK pour induire l'expression de diverses cytokines et de facteurs angiogéniques qui soutiennent l'invasion des trophoblastes et le remodelage vasculaire (61–63). Aussi, ce processus de tolérance est médié par les autres cellules immunitaires présentes dans la decidua. En effet, les Treg, les macrophages M1/M2 et les cellules Th17 remplissent différentes fonctions et interagissent activement les uns avec les autres afin d'assurer la tolérance du fœtus en devenir et par conséquent le succès de la grossesse. L'activité, la différenciation et l'expansion de ces cellules sont toutefois étroitement régulées par l'indolamine-2,3 dioxygénase (IDO), les récepteurs de mort Fas/FasL et des cytokines telles que l'IL-10, l'IL-4 et le TGF- $\beta$ , qui agissent principalement par voie ectopique. Un dérèglement de ces processus liés à la tolérance est alors associé à l'apparition de pathologies de la grossesse.



**Figure 9 : Processus de tolérance du fœtus semi-allogénique.** Les HLA non classiques exprimés par les EVT inhibent l'activité des cellules NK déciduales en interagissant avec leurs récepteurs inhibiteurs. De manière similaire, la sécrétion d'IDO (Indolamine 2,3-dioxygénase) par les EVT inhibe l'activité des dNK et induit la production de cytokines comme l'IL-10 et le TGF- $\beta$ , impliquées dans le recrutement des Treg. Les Treg peuvent alors induire la réponse Th2 *via* le facteur LIF et supprimer l'activité des lymphocytes T effecteurs. De plus, les cellules Th1 et Th17 produisent des facteurs pro-inflammatoires tels que l'IL-2, l'IL-17 et l'IFN- $\gamma$  qui interviennent dans la tolérance fœtale. L'équilibre entre les réponses Th1/Th2 et Treg/Th17 contribue également à la mise en place de ce microenvironnement immunotolérant. Finalement, les macrophages M1 et M2 affectent également la réponse immunitaire, en induisant les réponses Th2 et Th1, et agissent sur le remodelage de la structure des artères spiralées.  $\perp$  : inhibition ;  $\rightarrow$  : induction ;  $\uparrow$  : sécrétion. Adaptée de (40).

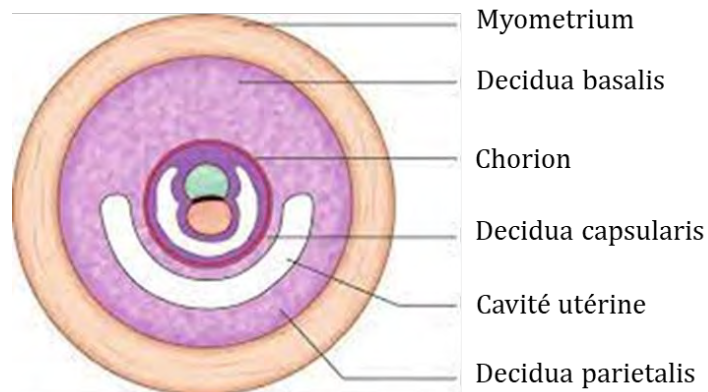
## B. La decidua

### a. Structure de la decidua

Le processus de mise en place du placenta est accompagné de la décidualisation de l'endomètre et de la formation de la decidua, qui se divise en trois tissus distincts (**Figure 10**) :

- la *decidua basalis* (ou decidua), principale interface materno-fœtale, est composée du stroma endométrial décidualisé. Elle est en contact direct avec les EVT et le placenta. Lors de l'implantation et de la transformation des vaisseaux sanguins, la decidua subit des modifications majeures dont le remodelage de la MEC ;
- la *decidua capsularis* recouvre l'embryon en développement, à mesure qu'il grandit et se dilate dans la cavité utérine ;

- la *decidua parietalis*, qui constitue le reste de la muqueuse de l'endomètre, à l'extérieur du site de l'implantation.



**Figure 10 : Subdivision de la decidua.**

Adaptée de Human Embryology, Inderbir Singh's, rédigé par V. Subhadra Devi.

#### b. Fonction de la decidua

La decidua est un tissu complexe, dynamique et hétérogène dont la fonction première est d'assurer l'ancrage du placenta. Elle participe également à la fonction nourricière de l'embryon au cours du premier trimestre de grossesse, lorsque le sang maternel n'a pas encore rempli l'espace intervillieux. Enfin, la decidua sécrète de nombreux facteurs solubles qui ont une action paracrine et régulent les fonctions endométriales.

Par ailleurs, ce tissu est composé de plusieurs types cellulaires dont la composition cellulaire change au cours du cycle menstruel et tout au long de la grossesse en réponse aux modifications des hormones systémiques et locales. Ainsi, au cours des 20 premières semaines, la decidua est particulièrement riche en macrophages et en cellules tueuses naturelles (Natural Killer NK) utérines (dNK). Au premier trimestre de grossesse, les dNK représentent plus de 70% des leucocytes déciduaux, contre environ 20% pour les macrophages déciduaux (64–66). Les fibroblastes, ou DSC, représentent le troisième type cellulaire le plus représenté à l'interface materno-fœtale, avec 10 à 30% des cellules déciduales au cours du premier trimestre et jusqu'à 60 à 70% des cellules en fin de grossesse.

Les cellules immunitaires qui composent la decidua jouent un rôle essentiel dans la médiation du processus de transformation des artères spiralées et, plus globalement, dans la mise en place de l'interface materno-fœtale. Ces cellules, en collaboration avec les EVT et les DSC, produisent de nombreuses cytokines et chimiokines qui contribuent aux changements

structurels nécessaire au développement du placenta. Enfin, les cellules immunitaires déciduales jouent un rôle majeur dans la protection du placenta et donc du fœtus, contre les pathogènes qui infectent la mère (67,68).

## V. Complications de la grossesse

### A. *Complications non infectieuses*

Un grand nombre de complications de la grossesse ont été liées à des insuffisances placentaires. Ainsi, une placentation anormale est une caractéristique de complications de la grossesse telles que les fausses couches, la mortalité prénatale, le retard de croissance intra-utérin, le travail prématuré, le décollement placentaire ou encore la pré-éclampsie (69,70).

#### a. Défauts de placentation

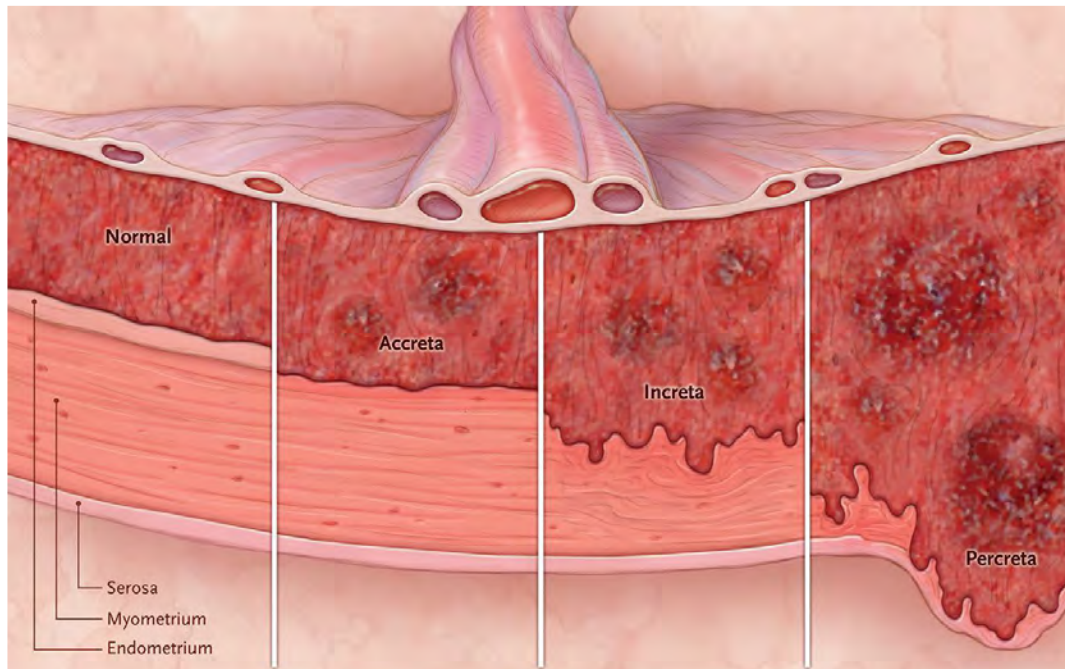
Les défauts de placentation peuvent entraîner des pathologies graves de la grossesse. Une invasion excessive du trophoblaste peut causer une adhésion anormale du placenta dans le myomètre. Cette placentation anormale est associée à de forts risques d'hémorragies lors de l'accouchement et à un taux de mortalité élevé, estimé à 7% dans la population mondiale (71,72). Il existe différents niveaux de sévérité en fonction du degré d'invasion des trophoblastes du blastocyte (**Figure 11**) (73–75).

Le placenta *accreta* (81% des cas) se définit par un défaut de décidualisation, associé à une adhésion anormale et excessive du trophoblaste au myomètre (72). Ainsi, une augmentation de la production de facteurs pro-invasifs et pro-angiogéniques a notamment été observée (76). La decidua altérée perd alors sa capacité à limiter l'invasion trophoblastique, ce qui pourrait participer à l'exacerbation de la pathologie (77).

Le placenta *increta* (12% des cas) correspond à une invasion modérée du myomètre par les villosités du placenta.

Enfin, le placenta *percreta* se caractérise par une invasion totale du myomètre et du périmètre. Bien que la séroprévalence soit la plus faible, avec seulement 7% de cas, le placenta *percreta* est le plus grave parmi les placentations anormales. Il provoque une mortalité et une morbidité maternelles très élevées pouvant atteindre les 10% (78). En effet, en plus d'envahir le myomètre, certains organes adjacents, tels que l'urètre, la vessie ou le colon sigmoïde, peuvent également être perforés. Par ailleurs, la pathologie peut entraîner d'importantes hémorragies et provoquer de multiples complications telles que le Syndrome de Détresse Respiratoire Aigüe

(SDRA), le syndrome de Sheehans, caractérisé par une insuffisance hypophysaire qui peut apparaître après un accouchement hémorragique, ou encore des insuffisances rénales (78,79).



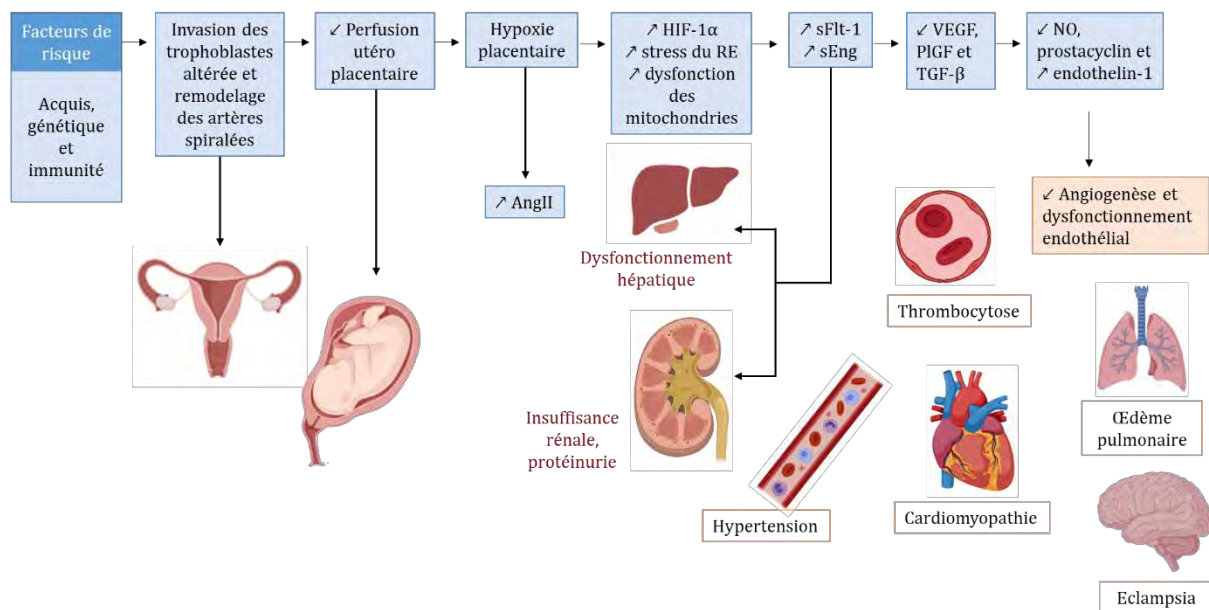
**Figure 11 : Défaits de placentation, les différents stades de la pathologie.** Source : [https://resident360.nejm.org/content\\_items/placenta-accreta-spectrum](https://resident360.nejm.org/content_items/placenta-accreta-spectrum).

## b. Pré-éclampsie

La pré-éclampsie (PE) est une pathologie qui affecte 2 à 8% des grossesses et constitue une source majeure de mortalité et de morbidité périnatale et maternelle (80,81). Si elle n'est pas traitée à temps, la pré-éclampsie peut évoluer, pour 10 à 15% des femmes enceintes, vers l'éclampsie qui se caractérise par des complications respiratoires (asphyxie), des contractions musculaires et des convulsions. Au stade le plus grave, l'éclampsie s'accompagne de crises cardiaques, d'insuffisances hépatiques et rénales, de complications neurologiques (accident vasculaire cérébral) ou hématologiques ainsi que d'œdèmes pulmonaires (82).

La pré-éclampsie est une physiopathologie complexe qui se caractérise par une augmentation de la pression artérielle (hypertension) et une protéinurie (>300 mg/jour) (83,84), qui touche principalement l'utérus mais qui peut atteindre d'autres organes (**Figure 12**). Le dysfonctionnement utéroplacentaire observé lors de la pré-éclampsie est aussi associé à une restriction de la croissance fœtale et à un accouchement prématuré. Les enfants nés de mères atteintes de pré-éclampsie présentent alors un risque accru de dysplasie broncho-pulmonaire et de paralysie cérébrale (85,86). Les mères atteintes de pré-éclampsie ont également un risque plus élevé de développer un diabète de type 2 ou une hypertension (87,88). Ainsi, la pré-

éclampsie représente une des causes principales de mortalité non seulement maternelle mais aussi foetale et infantile (89).

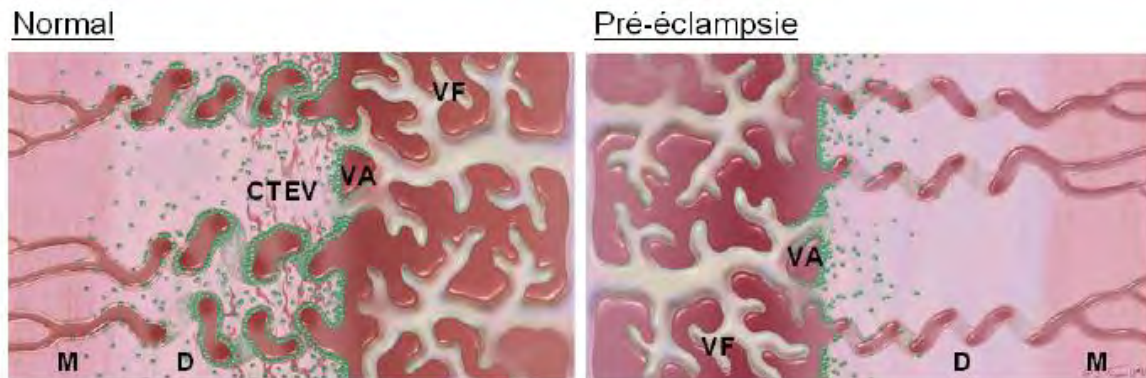


**Figure 12 : Physiopathologie et représentations cliniques de la pré-éclampsie.** De nombreux facteurs de risque, acquis, génétiques ou immunitaires contribuent au développement de la pathogenèse. Le dysfonctionnement placentaire est alors associé au relargage de multiples facteurs anti-angiogéniques, entraînant ultérieurement un dysfonctionnement multiorganique. Adaptée de (90).

La cause principale de la pré-éclampsie est une infiltration insuffisante des EVT lors de la formation du placenta, conduisant à une placentation anormale et un microenvironnement placentaire altéré (91–93). De plus, la pré-éclampsie se caractérise par l'absence de bouchons trophoblastiques. Il en résulte un défaut de remaniement des cellules musculaires lisses aboutissant à des artères utérines de plus faible calibre mais conservant toujours leur potentiel vasoconstricteur (94,95). Le placenta faiblement développé présente aussi un défaut de vascularisation, lié à un mauvais remodelage des artères spiralées (**Figure 13**). Ce défaut induit un afflux sanguin dans l'espace intervillieux insuffisant, causant alors une ischémie placentaire et un stress oxydatif (96). Cette ischémie est responsable de retards de croissance *in utero* et de mort intra-utérine alors que le stress oxydatif induit la production de radicaux libres, cytokines et facteurs de croissance qui déclenchent une apoptose cellulaire placentaire. Le système HLA (Human Leukocyte Antigen) semble également jouer un rôle dans l'invasion défectueuse des artères spiralées, d'autant plus que les femmes atteintes de pré-éclampsie présentent des taux réduits de HLA-G et HLA-E (97,98).

Le dysfonctionnement placentaire induit par ailleurs le relargage de facteurs supplémentaires qui, libérés dans la circulation maternelle, sont impliqués dans les lésions endothéliales maternelles. De nombreux facteurs sont ainsi suspectés mais deux semblent jouer un rôle

prépondérant dans la physiopathologie de la PE : le sVEGFR-1 (Vascular Endothelial Growth Factor Receptor) et l'endogline soluble (sEng) (99–101). De plus, les femmes atteintes de pré-éclampsie présentent des taux élevés de tyrosine kinase 1 de type fms (sFlt-1), un antagoniste du facteur de croissance endothélial vasculaire et du facteur de croissance placentaire, qui prévient l'interaction des cellules immunes avec le trophoblaste (102).



**Figure 13 : Pathogenèse de la pré-éclampsie.** Lors d'une placentation normale, les CTEV migrent dans l'endomètre et le myomètre décidua par invasion interstitielle. Certains CTEV envahissent aussi les artères spiralées maternelles afin de les remodeler, augmentant ainsi le flux sanguin vers le fœtus en développement. Lors d'une placentation pré-éclamptique, l'invasion interstitielle est peu profonde et limitée, les CTEV restant attachés aux villosités ancrées. L'invasion endovasculaire est donc presque absente et les artères spiralées restent « raides », limitant ainsi le flux sanguin vers le fœtus. M : Myomètre ; D : Decidua ; CTEV : Cytotrophoblaste Extravilleux ; VA : Villosité Ancrée ; VF : Villosité Flottante. Adaptée de (103).

De plus, une apoptose massive des trophoblastes et des EVT est observée (104). La mort des cellules déciduales entraîne une libération dans la circulation maternelle, de débris placentaires apoptotiques (ADN fœtal circulant, protéines cytoplasmiques, etc.) qui activent la réponse inflammatoire et sont impliqués dans l'activation et l'inflammation de l'endothélium maternel.

Enfin, la pré-éclampsie serait liée à une modification dans la composition des cellules immunitaires à l'interface materno-fœtale ainsi qu'à une activation massive des macrophages et des dNK, qui produisent excessivement le TNF- $\alpha$  (Tumor Necrosis Factor- $\alpha$ ) (105). Ainsi, la pré-éclampsie peut être perçue comme une altération du système immunitaire maternel qui l'empêche de reconnaître l'unité fœto-placentaire.

L'ensemble de ces anomalies est responsable d'un dysfonctionnement endothélial associé à une hyperperméabilité vasculaire, une thrombophilie et une hypertension (90).

### c. Fausses couches répétées

Une fausse couche est définie comme une grossesse intra-utérine non viable avec un sac gestationnel vide ou un sac gestationnel contenant un embryon ou un fœtus sans activité cardiaque fœtale au cours des premières semaines de gestation (106). Les fausses couches



surviennent dans 10% des grossesses cliniquement reconnues et environ 80% des cas de fausses couches surviennent au cours du premier trimestre (107–109). Une fausse couche répétée, ou avortement spontané récurrent (ASR), est définie comme deux fausses couches consécutives ou plus, avant 20 semaines de gestation (107,108).

Cette pathologie s'explique par un remodelage excessif des vaisseaux sanguins de la decidua au début de la grossesse, associé à un stress oxydatif local (110,111). L'entrée prématurée de sang maternel dans l'espace intervilloux déplace les villosités et perturbe de manière irréversible l'interface materno-embryonnaire, en induisant un stress oxydatif excessif.

Bien que le nombre de grossesses ultérieures, la santé ou l'âge de la mère constituent les facteurs majeurs en cause dans cette pathologie, il a été montré que de nombreux autres facteurs sont impliqués dans le risque de fausse couche. Ainsi, de nombreuses études démontrent le rôle de facteurs génétiques, anatomiques, infectieux, hormonaux, environnementaux ou encore métaboliques dans l'apparition de cette pathologie chez la femme enceinte. Les autres facteurs de risque, identifiés plus récemment, comprennent des facteurs immunologiques et des troubles d'origine auto-immune. Néanmoins, 50% des cas de fausses couches restent encore inexpliqués (112–114).

#### d. Retard de croissance intra-utérin

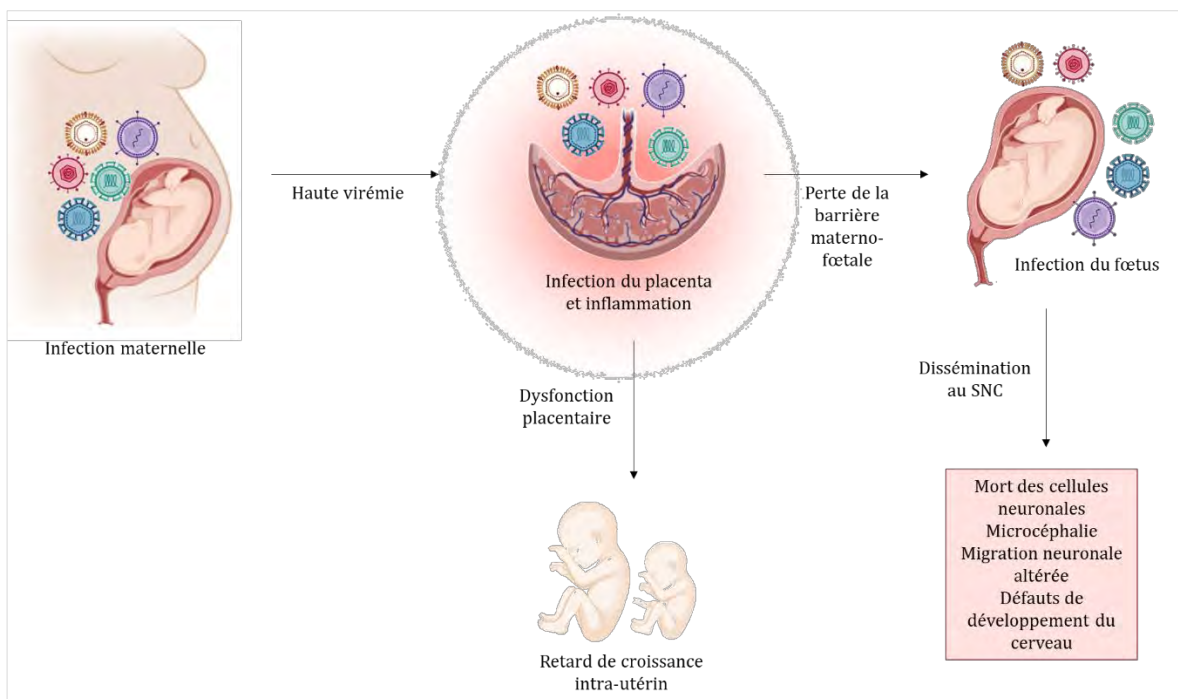
Les défauts de placentation sont très souvent liés à des retards de croissance intra-utérin du fœtus (RCIU). Le RCIU est une pathologie de la grossesse qui affecte 5 à 10% des grossesses humaines et qui se caractérise par une réduction voire un arrêt total de la croissance fœtale (115,116). Le fœtus n'atteint pas son potentiel de croissance et de développement intra-utérin et présente en conséquence une taille et un poids insuffisants. Par ailleurs, la pathologie est associée à un risque accru de morbidité et de mortalité périnatale élevé (117). Le RCIU représente en effet la deuxième cause de mortalité périnatale, avec près de 30% de décès chez les nouveau-nés. C'est aussi la cause la plus courante de naissances prématurées et d'asphyxie *intrapartum* (118).

En plus de graves conséquences sur le court terme (hypertensions, anomalies comportementales, ...), le RCIU est responsable d'effets à long terme tels que l'autisme, les retards mentaux ou encore les troubles moteurs. De plus, il prédispose à un grand nombre de pathologies à l'âge adulte telles que des maladies chroniques, cardiovasculaires ou endocriniennes, le diabète, l'obésité, les maladies neurodégénératives ou la schizophrénie (117).

La pathogenèse du RCIU s'explique tout d'abord par des altérations de la fonction placentaire. Le placenta de petite taille présente des défauts de vascularisation (remodelage vasculaire utérin diminué), associés à une apoptose excessive et à un défaut d'invasion trophoblastique (104,119). Le RCIU peut également s'expliquer par une diminution des échanges nutritionnels entre la mère et le fœtus.

### B. Complications infectieuses, infections congénitales et TORCH

Une infection congénitale survient lors de la transmission *in utero* ou néonatale d'un agent pathogène donné (virus, bactérie ou parasite) au fœtus (120). Les agents infectieux responsables de ces pathologies congénitales peuvent alors corrompre le développement fœtal, entraîner des séquelles graves et compromettre la santé des nouveau-nés, même après la naissance (120–123) (**Figure 14**). L'acronyme TORCH fait référence à la principale famille d'agents pathogènes responsables d'infections congénitales associées à des maladies fœtales sévères (124).



**Figure 14 :** Effets d'une infection congénitale maternelle sur le développement fœtal. Lors de la grossesse, un pathogène qui infecte la mère peut également infecter le placenta, provoquant ainsi son inflammation et un arrêt de sa fonction de barrière de protection. Le dysfonctionnement lié à l'infection peut alors être associé à des retards de croissance intra-utérins ainsi qu'à une dissémination du pathogène au fœtus. L'infection congénitale peut alors présenter un tropisme neurologique, expliquant l'apparition de pathologies graves dans le développement.

#### a. Toxoplasmose

*Toxoplasma gondii* (*T. gondii*) est un parasite intracellulaire obligatoire qui infecte la plupart des mammifères. Les félins, en particulier les chats domestiques, restent néanmoins les hôtes

définitifs et les principaux réservoirs du parasite (125–127). Ce dernier se transmet par l'ingestion d'eau ou d'aliments contaminés et par la consommation de viande insuffisamment cuite de porcs, moutons ou volailles infectés (125). La séroprévalence varie d'un continent à l'autre et cette différence dans les taux de séroprévalence peut s'expliquer à la fois par des facteurs alimentaires et socio-économiques. Comme le suggèrent les sérologies positives pour le parasite, un tiers de la population mondiale serait infecté de manière latente par le *T.gondii* (128).

Bien que l'infection soit très souvent latente, ses effets peuvent être délétères notamment chez les femmes enceintes. Aux États-Unis, entre 400 et 4000 cas de toxoplasmose congénitale se produisent chaque année (129). La transmission du parasite au fœtus résulte généralement d'une primo-infection de la mère qui n'a pas développé d'immunité protectrice contre le parasite, puis de la dissémination du pathogène dans le placenta et au fœtus. Les taux de toxoplasmose congénitale varient selon le moment de l'infection maternelle et le stade de la gestation. Au premier trimestre, le risque d'infection fœtale est de 5% à 25% alors qu'il peut s'élever jusqu'à 90% au deuxième et troisième trimestre (126,129,130). Cependant, les formes les plus sévères de la pathologie sont observées lorsque l'infection a lieu de manière précoce (131). La charge parasitaire peut être un facteur important contribuant au risque et à l'issue des infections congénitales (132). La transmission de *T. gondii* peut alors entraîner une mort fœtale et causer des avortements spontanés et des calcifications intracrâniennes responsables de déficits neurocognitifs et de chorioretinites (126,133).

#### b. « Others » ou les autres

Plusieurs agents pathogènes supplémentaires, principalement des virus, ont aussi été associés à des infections congénitales et peuvent représenter une menace potentielle pour le fœtus en développement. Ces pathogènes, regroupés sous le nom « Others », peuvent se transmettre au fœtus et causer des infections congénitales. Ce groupe comprend des pathogènes tels que le *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*), le virus de la chorioméningite lymphocytaire (VLCM), le virus de l'encéphalite équine vénézuélienne (VEE), le virus du Nil occidental (VNO), le virus varicelle-zona (VZV), le virus de l'immunodéficience humaine (VIH), le virus de l'Hépatite E (VHE), le parvovirus humain B19 et la bactérie *Treponema pallidum* (*T. pallidum*), responsable de la syphilis (123).

Le VLCM est un arénavirus à ARN transmis par des rongeurs qui induit une pathologie similaire à celle de la toxoplasmose ou du Cytomégalovirus Humain (134–136). Bien que des

cas sporadiques d'infection congénitale aient été signalés aux États-Unis et en Europe de l'Est, l'épidémiologie précise du VLCM congénital n'a pas été déterminée. Il est cependant connu qu'environ 5% de la population adulte américaine serait positive à une infection antérieure par le VLCM (preuves sérologiques) (136).

La syphilis, une infection sexuellement transmissible (IST), est causée par le spirochète *T.pallidum* et affecte des millions de personnes dans le monde (137). Les taux de syphilis congénitale varient de 7 à 11 cas pour 100.000 naissances vivantes au cours de la dernière décennie (138). Ainsi, dans le monde, 2 millions de naissances sont associées à une syphilis congénitale. Le parasite *T.pallidum* infecte le placenta et se transmet au fœtus principalement *via* la circulation sanguine intervilleuse mais également *via* les tissus de la decidua.

La transmission verticale du VIH survient le plus souvent pendant l'accouchement, mais environ 30% des cas de transmission surviennent plus tôt, *in utero*, à travers le placenta (139). Les souches maternelles de VIH à tropisme macrophagique semblent plus efficaces pour franchir la barrière placentaire (140). L'analyse des échantillons d'avortement thérapeutique au premier et deuxième trimestres de grossesse révèle par ailleurs que le virus est détecté dans les tissus fœtaux et que l'infection est associée à une nécrose de la decidua chez les mères infectées non traitées (141,142).

Lors de la grossesse, environ 1% à 2% des femmes présentent des infections primaires par le VZV, un herpès virus étroitement lié au virus de l'Herpès Simplex. La pathologie placentaire de la varicelle congénitale a rarement été décrite mais une villite chronique diffuse, nécrosante avec des zones d'inflammation granulomateuse a cependant été rapportée (143). Bien que la transmission de la mère au fœtus soit rare (<1%), le risque d'infection congénitale par le VZV est plus élevé lorsque la varicelle congénitale survient entre les 13 et 20 premières semaines de gestation (144). L'infection présente alors un risque aussi bien pour la mère que le fœtus. Chez la mère, le pathogène induit le développement de pneumopathies varicelleuses alors que le virus transmis au fœtus provoque un syndrome de la varicelle congénitale (SVC) ou néonatale, qui se développe les 10 premiers jours de la vie (145–147). L'infection par le VZV est alors associée à une morbidité et une mortalité maternelles et fœtales importantes. Après la 24<sup>ème</sup> semaine, le risque est négligeable, la transmission de la mère au fœtus étant inférieure à 1%. En 2007, environ 130 cas de SVC avaient été signalés dans la littérature médicale depuis 1947 (147,148).

*T. cruzi* est le protozoaire responsable de la maladie de Chagas, une maladie cardiovasculaire potentiellement mortelle (149). Ce pathogène provoque parfois une infection congénitale semblable à la toxoplasmose congénitale (150,151). Bien que le pathogène infecte de façon chronique jusqu'à 50% des femmes enceintes qui vivent dans les zones endémiques, la plupart de ces infections restent asymptomatiques. La transmission materno-fœtale survient chez près de 7% des femmes infectées et peut avoir lieu à n'importe quel stade de la grossesse maternelle et de la gestation. Bien que plusieurs milliers de nourrissons nés sont contaminés *in utero* chaque année, l'infection congénitale peut être prévenue par le traitement des femmes infectées (152,153).

Le VEE est un Alphavirus qui peut occasionnellement provoquer une infection congénitale humaine (154). Bien que le virus puisse être transmis au fœtus *in utero*, l'infection congénitale par le VEE semble être un événement rare (155).

Le parvovirus humain B19 est un virus à ADN de la famille des *Parvoviridae* qui peut se transmettre de la mère infectée au fœtus et peut provoquer une anémie intra-utérine. Une association entre la polymicrogyrie et l'infection congénitale par le parvovirus B19 a occasionnellement été observée (156–158).

Le VNO est un Flavivirus à ARN, apparenté au virus ZIKA (ZIKV) et au virus de la dengue (DENV), qui provoque chez l'adulte des encéphalites, méningites ou myélites. Un seul cas de transmission materno-fœtale a été rapporté en 2002 et suggère que le VNO pourrait provoquer une infection congénitale (159–161). Aucun cas similaire n'a été signalé depuis.

Plus récemment, le ZIKV et le VHE ont également été classés parmi les pathogènes « Others », causant des pathologies graves durant la grossesse (162).

Le VHE est un Hepevirus à ARN qui constitue un réel problème de santé publique, notamment dans les pays en développement. Bien qu'asymptomatique dans la plupart des cas, l'infection par le VHE, et notamment par le génotype 1, est associée à une fréquence plus importante d'hépatites fulminantes chez les populations à risque comme les personnes âgées, les patients immunodéprimés ou encore les femmes enceintes (163,164). De nombreuses études démontrent que la transmission verticale du virus de la mère vers le fœtus peut se produire dans 50 à 100% des cas (165–167). Transmis lors de la grossesse, l'infection par le VHE est responsable de complications graves affectant la mère (hépatites fulminantes, hémorragies, pré-éclampsie) mais aussi le fœtus (168). Un accouchement prématuré, un retard de croissance et la mort du

foetus ou du nouveau-né sont observés dans 25 à 50% des cas (169,170). Ainsi, le virus est responsable de plus de 3000 morts fœtales par an, additionnées à de nombreux cas de mort *in utero*, dus au décès de la mère (171). Chez la mère, il a été montré que l'infection par le VHE durant la grossesse est responsable d'un taux de mortalité de plus de 40% avec une prévalence d'hépatite fulminante très élevée (172,173). Ainsi, en fonction de la sévérité des symptômes et de la charge virale, une mortalité de fœtale et/ou maternelle peut survenir, en particulier durant le troisième trimestre de grossesse (174).

Durant ma thèse, nous nous sommes principalement intéressés au virus ZIKA, décrit en détails dans le Chapitre 2 de l'Introduction.

### c. Rubéole

La rubéole est causée par un virus à ARN simple brin de polarité positive enveloppé de la famille des *Togaviridae* isolé en culture cellulaire pour la première fois en 1962 (175,176). L'humain est l'unique réservoir de ce virus. Transmis par voie respiratoire, le virus provoque une maladie bénigne chez l'enfant ou l'adulte après une période d'incubation moyenne d'environ 18 jours. Bien que 50% des infections par le virus de la rubéole soient asymptomatiques, le virus peut néanmoins entraîner des complications plus sévères chez l'adulte et plus particulièrement chez la femme enceinte. Une infection au cours des 12 premières semaines de gestation aboutit pour 80 à 90% des cas, à une transmission transplacentaire et une infection persistante chez le fœtus (177,178). Le virus est en effet observé dans le cytoplasme des cellules déciduales, des trophoblastes extravilloux et des cellules endothéliales (179). L'infection peut alors être associée à une obstruction vasculaire fœtale, une nécrose villositaire, une inflammation vasculaire et une hypertrophie des cellules de Hofbauer (HBC) (180). De plus, le fœtus peut présenter diverses autres complications telles que la surdité, des retards mentaux, des défauts cardiaques ou des dommages hépatiques. A la naissance, 70% des nouveaux nés infectés développent un syndrome de rubéole congénitale (SRC) (177). Côté maternel, et pour 20% des cas, l'infection peut entraîner des fausses couches, une forte morbidité à la naissance, un travail prématuré ou encore des défauts de croissance fœtale (181,182). *A contrario*, le risque d'infection fœtale symptomatique tombe à environ 20% lorsque l'infection survient entre la 16<sup>ème</sup> et la 20<sup>ème</sup> semaine de gestation. En effet, la transmission intra-utérine peut se produire, mais le risque de SRC reste très faible (183).

#### d. Cytomégalovirus Humain

Le Cytomégalovirus humain (HCMV) est un virus à ADN de la famille des *Herpesviridae*. Strictement humain, le HCMV infecte un large spectre de personnes (184). Sa séroprévalence varie ainsi entre 30% et 70% dans les pays développés et peut monter jusqu'à 100% dans les pays en voie de développement (185). L'infection est cependant associée à des symptômes non spécifiques du virus (186).

Le HCMV est aussi la cause la plus fréquente d'infections congénitales (187,188). En effet, le virus peut également être transmis de la mère au fœtus si cette dernière est infectée. La transmission se produit majoritairement *in utero* et survient dans environ 30% à 40% des cas de primo-infection maternelle. Les fœtus infectés présentent alors un risque de 5 à 10% de développer des pathologies et symptômes liés aux HCMV (186). Les symptômes observés sont plus graves lorsque la transmission a lieu au cours du premier trimestre de grossesse. Le HCMV est en effet responsable de pathologies placentaires et développementales sévères.

A l'interface materno-fœtale, le HCMV infecte et se réplique dans les cellules stromales et endothéliales de la decidua, les trophoblastes extravilloux, les CTB et les cellules des villosités (189,190). L'infection, en plus d'induire une forte inflammation, des œdèmes et une augmentation des villosités vasculaires, altère également les capacités de migration et d'invasion des EVT (191). Ces défauts de migration causent un mauvais remodelage vasculaire et réduisent l'afflux sanguin maternel. L'accès aux nutriments du fœtus est alors diminué ce qui peut provoquer un retard de croissance *in utero* et une naissance prématurée. Dans 15% des cas, la primo-infection maternelle par le HCMV conduit à un avortement spontané précoce.

L'infection congénitale par le HCMV cause également, dans 5 à 10% des cas, des défauts irréversibles au niveau du système nerveux central. Le virus est alors responsable de surdités, de microcéphalies, d'encéphalites, de retards psychomoteurs et plus rarement de myopathies et de chorioretinites (188,192–195). Un suivi post-natal des fœtus infectés *in utero* a montré qu'environ 15% des enfants infectés nés asymptomatiques finissent par développer des séquelles irréversibles permanentes et tardives, telles que des défauts auditifs ou neuro-développementaux (196). La survenue de telles séquelles s'explique par le fait que le HCMV infecte les progéniteurs neuraux et inhibe leur différenciation (197).

L'infection congénitale par le HCMV reste une problématique majeure car l'immunité préexistante suite à une primo-infection offre une protection incomplète contre la transmission intra-utérine du HCMV et l'infection congénitale (198). Par ailleurs, aucun traitement ne peut

être administré à la femme enceinte sans avoir des effets néfastes sur le développement fœtal (199).

#### e. Virus de l'Herpès

Les virus de l'herpès simplex 1 et 2 (HSV-1 et HSV-2) sont des *Herpesviridae* de la sous-famille des *Alphaherpesvirinae* (200,201). Bien que la plupart des infections soient asymptomatiques, l'incidence globale de l'infection à HSV varie de 0,025 à 0,3 pour 100.000 naissances vivantes par an (202,203). Les infections congénitales par HSV-1 et HSV-2 sont rares, affectant environ 1 pour 100.000 à 300.0000 enfants nés vivants (203,204). Finalement, la plupart des études estiment que seulement 5 à 10% des infections à HSV identifiées au cours de la période néonatale résultent d'une infection intra-utérine (204,205).

C'est lors de l'accouchement vaginal que le risque de transmission au fœtus est le plus élevé avec un taux de 80% si la mère a une infection génitale active par un HSV (206). L'infection néonatale par le HSV peut alors causer des lésions de la peau, des yeux et de la bouche, une encéphalite, qui peut provoquer des morbidités neurologiques, et une pathologie disséminée qui touche de nombreux organes (cerveau, poumon, foie, cœur, peau, etc.). Sans traitement adéquat, l'infection est létale dans 80% des cas. La meilleure mesure préventive pour empêcher l'infection néonatale est de tester la mère pour le HSV. Si elle a une infection active au moment de la naissance, un accouchement par césarienne sera pratiqué, limitant alors l'infection néonatale (206).



## Chapitre 2 : Le virus Zika

« *Quand un cheval de Troie entre dans une ville, porteur d'un virus qui affole les esprits et paralyse les corps, on a intérêt à emprunter les seules portes encore ouvertes : celles de la poésie.* » *De l'immunologie.* Sylvain Tesson.

### I. Historique et épidémiologie

Le virus ZIKA (ZIKV) a été découvert en 1947 en Afrique, en Ouganda, dans la forêt Zika, d'où il tire son nom (**Figure 15**) (207), après avoir été isolé pour la première fois chez le singe macaque rhésus. Le ZIKV fut également détecté, à plusieurs reprises, chez d'autres primates, ce qui a conduit à suggérer que ces animaux peuvent constituer un réservoir viral (208,209). La prévalence du virus chez ces animaux reste encore cependant inconnue et des recherches supplémentaires sont nécessaires afin de mieux identifier le réservoir animal du virus (210). Il n'y a pas, à ce jour, de preuve de l'existence d'un réservoir non-primate (211).

En 1948, le virus est isolé une seconde fois, de nouveau dans la forêt Zika, chez le moustique *Aedes africanus*. Le moustique *Aedes* sera défini plus tard, en 1956, comme le vecteur compétent du virus (207,212). Le premier ZIKV isolé en dehors d'Afrique a été obtenu en 1966 chez le moustique *Aedes aegypti*, en Malaisie (213).

Chez l'Homme, des anticorps neutralisants dirigés contre le ZIKV sont détectés pour la première fois en 1952, chez une petite fille au Nigeria mais cette production d'anticorps ne sera associée à l'infection par le ZIKV qu'en 1964, en Ouganda (214,215). La première infection humaine en Asie est réellement rapportée en 1977, en Indonésie (216). Quelques rares cas d'infection par le ZIKV sont par la suite détectés et il faut attendre 2007 pour voir apparaître la première épidémie majeure, sur l'île de Yap, en Micronésie, dans le Pacifique (217). Près de 5.000 personnes sont alors infectées et présentent des symptômes proches de ceux induits par le DENV. Cependant, l'étiologie diffère avec un tableau clinique atypique. Les patients infectés présentent une fièvre modérée, associée à des céphalées, des rashes maculopapulaires, des arthromyalgies et des conjonctivites (217). L'analyse des prélèvements réalisés chez ces individus a permis de confirmer l'infection par le ZIKV, preuve de la réémergence du virus.

Six ans plus tard, en 2013, de nouveaux cas sont détectés en Polynésie Française avant de se disséminer vers d'autres îles du Pacifique en 2014 (218). L'épidémie cause alors plus de 32.000 infections. Les signes cliniques évoluent et les patients présentent alors des manifestations

neurologiques et auto-immunes sévères telles que le Syndrome de Guillain-Barré (SGB). Un premier lien de causalité entre le ZIKV et le SGB est alors suspecté (219).

L'épidémie devient pandémique en 2015, lorsque le virus est introduit au Brésil puis se propage sur le continent américain. Entre 500.000 et 1.500.000 personnes dans le monde entier sont infectées, le Brésil étant le pays le plus touché. C'est lors de cette épidémie que les complications neurologiques sévères sont identifiées et réellement associées à l'infection. Par ailleurs, des anomalies de la grossesse sont observées telles que des avortements, pré-éclampsies, retards de croissance et défauts neuro-développementaux comme la microcéphalie (220–223).

Au cours de l'année 2016, le virus se propage ensuite en Amérique du Nord, en Asie et en Europe (**Figure 15**). La présence des moustiques *Aedes* en France métropolitaine, en augmentation constante notamment ces dernières années, a conduit à sensibiliser la population au risque d'infections, comme ce fut le cas lors de l'identification de plusieurs cas autochtones courant 2020.



**Figure 15 : Distribution historique mondiale du ZIKV entre 1947 et 2016.** Identifié pour la première fois en Ouganda, en 1947 chez des singes, il est isolé chez le moustique en 1948. Les premiers cas chez l'Homme sont identifiés en 1952. Dans les années 70 – 80, la distribution géographique du ZIKV s'étend à l'Asie équatoriale, sans pour autant induire aucune épidémie. La maladie chez l'Homme est encore considérée rare, avec des symptômes bénins. En 2007, le ZIKV se propage en Afrique et en Asie, où il provoque la première épidémie chez l'Homme sur l'île pacifique de Yap. Entre 2013 et 2016, le virus provoque plusieurs épidémies en Polynésie Française, sur l'île de Pâques, les îles Cook, en Nouvelle Calédonie mais également au Brésil et aux Etats-Unis. L'infection fait l'objet d'enquêtes intensives et le virus est finalement classé comme une urgence de santé publique de portée internationale. Source : Organisation Mondiale de la Santé (OMS) – 2016.

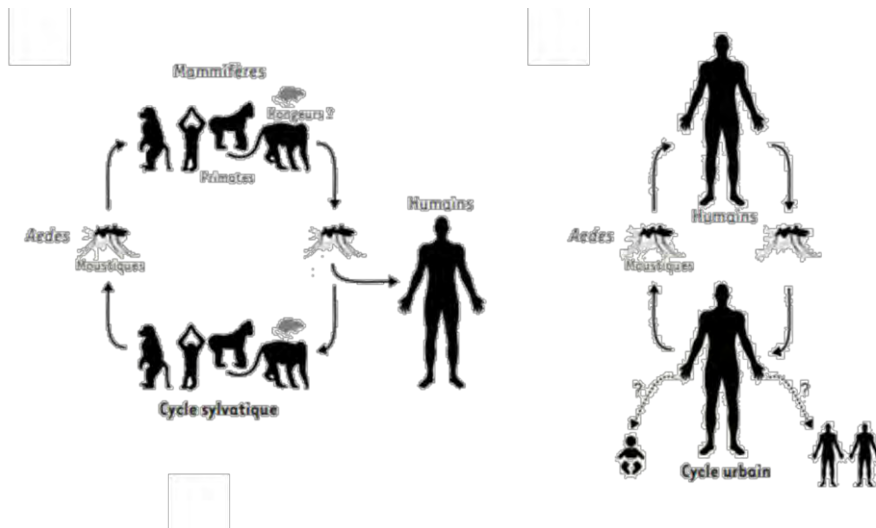
## II. Transmission du ZIKV

### A. Transmission vectorielle par le moustique

Nous savons que le moustique peut être le vecteur et le transmetteur de nombreux pathogènes comme le DENV ou le Chikungunya (CHIV), parfois même simultanément (224). De la même manière, la transmission du ZIKV à l'Homme est majoritairement liée aux piqûres des moustiques, principalement du genre *Aedes aegypti* et *albopictus*, infectés eux-mêmes par le virus (**Figure 16**). D'autres espèces d'*Aedes* (*polynesiensus*, *africanus* et *luteocephalus*) sont cependant susceptibles de transmettre le virus (225,226).

Le moustique se nourrit du sang d'une personne ou d'un animal infecté. Le virus va alors infecter l'épithélium de l'intestin moyen où il va se répliquer avant de passer dans l'hémolymphe *via* la lamina basale puis va se disséminer vers d'autres organes tels que les glandes salivaires à partir desquelles il pourra être relâché dans la salive lors de la piqûre du prochain hôte (227). Par ailleurs, la transmission verticale du virus chez le moustique est également possible, ce qui contribue à son maintien dans la nature (228). La période d'incubation extrinsèque du virus, c'est-à-dire le temps entre l'infection du vecteur et le moment où il devient capable de transmettre le virus, dure environ 14 jours. Lorsqu'un individu est piqué par un moustique infecté, ce dernier injecte sa salive dans le sang humain et transmet le virus, qui circule dans le sang puis pénètre les cellules humaines pour s'y répliquer. C'est la phase de virémie, qui dure environ 7 jours. Les symptômes de l'infection apparaissent ensuite entre 3 et 12 jours après piqûre par le moustique (211). Pendant cette phase de virémie, même si le patient ne présente pas de symptôme, le virus peut être retransmis lors d'une nouvelle piqûre. C'est cette capacité à se répliquer chez l'Homme puis à être transmis selon un cycle urbain qui cause les épidémies, notamment dans les régions où sont retrouvés ces moustiques. Les régions tropicales et subtropicales, ainsi que les régions urbaines fortement peuplées, sont donc les plus à même à voir se développer des épidémies (229). Ces éléments classent ainsi le ZIKV parmi une des urgences de santé sanitaire mondiale par l'OMS.

Néanmoins, même si cette transmission du virus est majoritairement liée à la piqûre de moustique, d'autres modes de transmission ont été identifiés (230).



**Figure 16 :** Cycles urbain et Sylvatique du ZIKV. Lors du cycle urbain, le virus se transmet d’Homme à Homme *via* des vecteurs du genre *Aedes*. A l’inverse, un cycle sylvatique implique un réservoir animal, notamment des primates non humains, et des vecteurs du genre *Aedes*. L’Homme n’est alors qu’« un hôte « accidentel » (231).

## B. Transmission non vectorielle

### a. Transmission sexuelle

L’hypothèse que le ZIKV est un pathogène sexuellement transmissible lors d’un rapport entre une personne infectée et son partenaire a été confirmée (232,233). En effet, un scientifique américain travaillant sur les moustiques au Sénégal a contracté le virus et présenté les symptômes communs du ZIKV. A son retour aux Etats-Unis, sa compagne, n’ayant pas voyagé avec lui, fut contaminée par le ZIKV et a développé quelques jours plus tard les symptômes liés à l’infection (230). Les relations sexuelles sont alors identifiées comme un facteur probable de transmission du virus. Des cas similaires ont été observés en 2016, lors de l’épidémie au Brésil (234). Deux femmes contractent le virus après que leurs partenaires soient revenus d’une région endémique. Aussi, un autre cas de transmission sexuelle du ZIKV de la femme à l’homme a été reporté aux Etats-Unis en 2016 (235). Il est désormais connu que la transmission sexuelle peut avoir lieu plus de 40 jours après l’infection et l’apparition des symptômes.

Par ailleurs, la présence du ZIKV dans le sperme n’avait jusque-là pas été investiguée ni documentée. Pourtant, il a été démontré que le virus persiste dans le sperme de 40 jusqu’à plus de 150 jours et qu’il a été retrouvé dans les spermatozoïdes (236–239). Ainsi, l’hypothèse de transmission sexuelle *via* ce fluide corporel est presque admise (240–242). De manière similaire, le ZIKV a été détecté dans le tractus génital féminin, confortant l’hypothèse de la transmission sexuelle du virus de la femme à l’homme. Ainsi, la transmission sexuelle est

possible par la voie orale, génitale ou anale et peut se faire d'homme à femme, de femme à homme et d'homme à homme (243,244).

En France métropolitaine, 11 cas de transmission par voie sexuelle ont été rapportés entre le 1<sup>er</sup> janvier et le 24 novembre 2016 (245).

#### **b. Transmission sanguine**

Le ZIKV peut également être transmis lors de transfusions sanguines (246,247). Cette voie de transmission a été identifiée lors de l'épidémie en Polynésie Française, au cours de laquelle 2,8% des échantillons de sang de donneurs, asymptomatiques au moment du don, ont été testés positifs pour l'ARN viral (248). De la même manière, une étude sur les échantillons de sang provenant de donneurs de Porto Rico, prélevés entre avril et juin 2016, a permis de déterminer que 0,5% de ces échantillons étaient positifs pour le ZIKV (249). Ce mode de transmission a ensuite été confirmé lors de l'épidémie de 2016 au Brésil. Deux patients ont reçu une transfusion d'un donneur infecté, qui a présenté les symptômes du ZIKV trois jours après avoir donné son sang. Après analyse sanguine, le virus a été retrouvé dans le sang du donneur et des receveurs (250).

Ces observations ont confirmé la nécessité de la mise en place de mesures sanitaires pour garantir la sécurité transfusionnelle dans les régions endémiques. Néanmoins, le risque reste cependant faible, du fait de la courte virémie de ce virus. Le virus n'est en effet détecté dans le sang que dans les premiers jours après le début des symptômes. Par ailleurs, de nombreuses stratégies sont disponibles et très efficaces pour inactiver les agents infectieux dans le sang (251).

#### **c. Transmission materno-foetale**

La transmission périnatale du ZIKV a été démontrée pour la première fois lors de l'épidémie en Polynésie Française (252). Le premier cas concernait une mère qui allaitait et qui présentait un rash cutané quelques jours avant et après l'accouchement. L'infection par ZIKV a été confirmée à la fois sur les échantillons de sang de la mère et du nouveau-né. Par ailleurs, le virus a été détecté par la suite dans le lait maternel, le sérum et la salive de la mère et du nourrisson. Le deuxième cas de transmission décrit a été rapporté chez une femme infectée dont le nouveau-né avait été diagnostiqué pour un retard de croissance intra-utérin. La femme a présenté des signes cliniques d'infection 3 jours après le début de l'allaitement et le ZIKV a été détecté dans le sang de la mère 1 jour après l'accouchement et dans le sang du nouveau-né 7

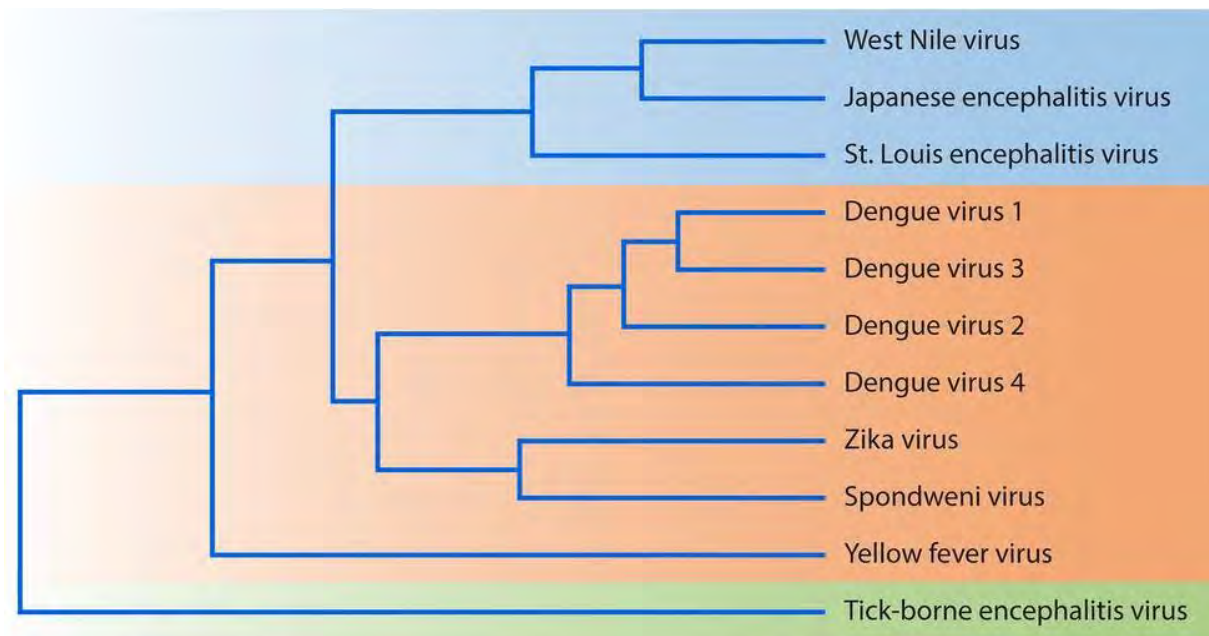
jours après. La transmission intra-utérine est observée de nouveau plus tard lors de l'épidémie au Brésil en 2016 (253,254).

Deux voies de transmission ont alors été décrites : 1) par passage du sang maternel vers le placenta ; 2) par passage des tissus maternels vers le placenta (voie transplacentaire). En effet, l'ARN viral a été détecté dans le liquide amniotique, les produits de fausses couches, le placenta et dans le tissu cérébral (222,223,254). Finalement, il a également été détecté dans le lait maternel (255,256).

La transmission verticale du ZIKV est décrite à tous les trimestres de grossesse (257). C'est néanmoins lorsqu'il est transmis au premier trimestre que l'infection est associée à de nombreuses séquelles (223,253,258). Le ZIKV est capable de se répliquer dans de nombreuses cellules fœtales et maternelles (259), dont nous reparlerons dans la suite de ce manuscrit, causant des lésions cellulaires qui pourraient expliquer, en partie, l'apparition de complications telles que la microcéphalie (220,223). Une infection à ZIKV près du terme pourrait potentiellement entraîner une transmission materno-fœtale lors de l'accouchement *intrapartum*, même si cela n'a pas été démontré à ce jour.

### III. Organisation génomique et structure de la particule virale

Le ZIKV est un virus qui appartient au genre des Flavivirus et à la famille des *Flaviviridae*. Cette famille regroupe d'autres virus comme le virus de la fièvre jaune, le VNO et le DENV, dont le ZIKV est phylogénétiquement proche (**Figure 17**). Des analyses phylogénétiques ont révélé qu'il existe deux lignées de génotypes pour le ZIKV : la souche africaine et la souche asiatique, qui à elle seule, est responsable des troubles neuro-développementaux affectant la grossesse (260). Cependant une étude récente s'est intéressée à des souches de ZIKV africaines plus récentes, à faibles passages, et a montré que ces dernières présentaient une meilleure transmissibilité par les moustiques et étaient plus létales chez les souris adultes ainsi que leurs fœtus en comparaison avec les souches asiatiques (261). Cela tend à suggérer un fort potentiel épidémique de ces souches africaines qui pourraient passer plus inaperçues par rapport aux souches asiatiques en raison de leur forte capacité à causer la mort du fœtus plutôt que d'induire des défauts à la naissance.



**Figure 17 : Phylogénie des Flavivirus.** Le ZIKV fait partie du groupe des virus Spondweni au sein du clade des Flavivirus. Il est étroitement lié aux quatre sérotypes du DENV, avec une identité d'acides aminés d'environ 43 % à travers la polyprotéine virale ainsi que l'ectodomaine de la protéine d'enveloppe E. Adaptée (262).

Le ZIKV est un virus enveloppé sphérique de 50nm de diamètre, qui comprend un génome ARN simple brin de polarité positive, d'environ 11kb (263,264). L'ARN comprend une ORF unique et flanquée de régions 5' et 3' non codantes (UTR) (265,266). On retrouve en 5'-UTR, une coiffe nucléotidique méthylée, nécessaire à l'initiation de la traduction et jouant un rôle majeur dans la réplication du virus ainsi que dans son évation aux facteurs de restriction induits par l'hôte lors de la réplication virale (267–269). Au niveau 3'-UTR, on note l'absence de queue polyadénylée, mais en revanche on observe une structure secondaire en forme de boucle permettant la formation d'un ARN subgénomique de Flavivirus (sfRNA) essentiel à la pathogénicité (270).

L'ORF unique est transcrite en une polyprotéine de 3423 acides aminés (**Figure 18**), qui est ensuite clivée en 10 domaines qui codent pour 3 protéines structurales (C, prM et E) et 7 protéines non structurales (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B et NS5) (266,269). Le clivage nécessite une combinaison de 4 protéases différentes, provenant du virus ou de l'hôte (**Figure 18**) :

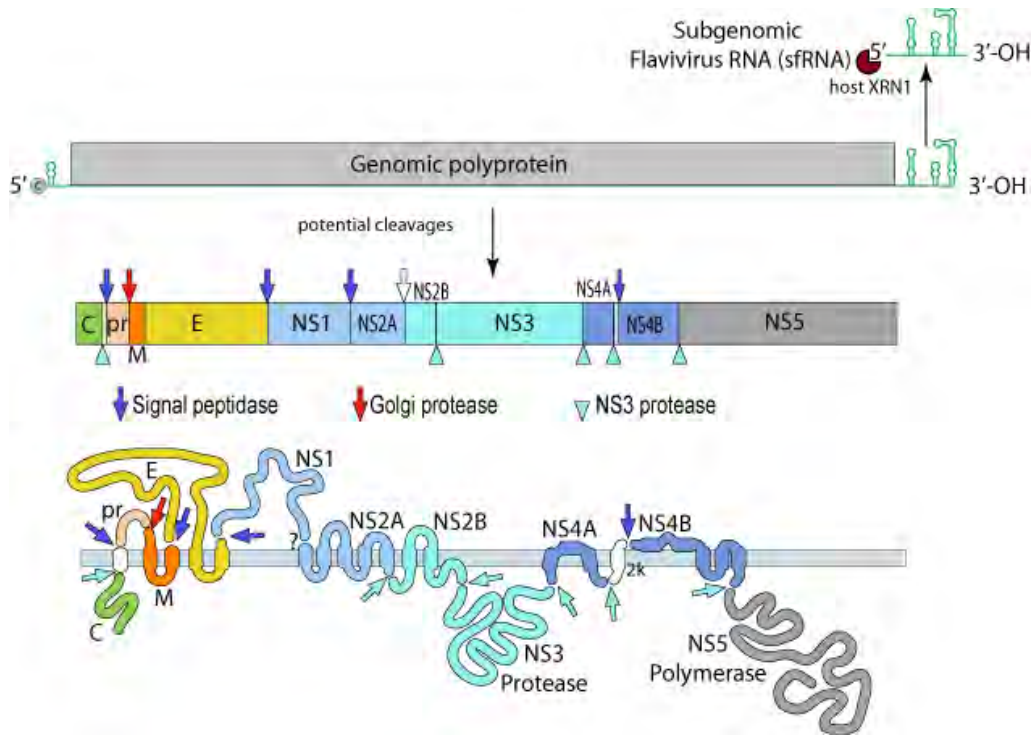
- Une peptidase de l'hôte, agissant aux jonctions C/prM, prM/E, E/NS1 et NS4A/NS4B (271–274) ;
- La serine protéase virale NS3, qui requiert NS2B comme co-facteur (275–279) ;
- Une protéase furine ou furine-like clivant prM en pr et M (280,281) ;
- Une protéase de l'hôte inconnue, qui agit à la jonction NS1/NS2A (282,283) ;

Les protéines structurales sont impliquées dans la formation des virions. La protéine C forme une nucléocapside pour s'associer avec le génome viral et le protéger (284). La protéine prM est un précurseur de la protéine M, qui s'insère dans l'enveloppe virale, et du peptide *pr*, relargué lors de la sortie du virus de la cellule hôte. De plus, prM est une protéine chaperonne qui prévient l'action prématurée de la protéine d'enveloppe E (285). Cette dernière, retrouvée dans la bicouche lipidique qui entoure la capsid, est notamment impliquée dans la reconnaissance des récepteurs d'entrée avant la fusion membranaire avec la cellule cible (285,286), comme décrit plus tard. Cette glycoprotéine E constitue ainsi un épitope intéressant pour la recherche d'anticorps anti-ZIKV ainsi que pour le design d'un vaccin (287–289).

En effet, la protéine E constitue aujourd'hui la principale cible des anticorps neutralisants dans les infections à Flavivirus, notamment lors d'une infection par le DENV. Il a par ailleurs été récemment démontré que les anticorps monoclonaux spécifiques de la protéine E du DENV neutralisaient également le ZIKV (290–292). Une exposition antérieure du patient au DENV influencerait donc le développement de la réponse immunitaire lors d'une infection *à posteriori* par le ZIKV (293,294).

Les protéines non structurales sont directement ou indirectement impliquées dans la réplication du génome viral et dans l'assemblage de nouveaux virions (295,296). De nombreuses activités enzymatiques ont été associées aux protéines NS3 et NS5. La protéine NS3, combinée à NS2B, possède une activité protéase hélicase, tandis que la protéine NS5 possède une activité ARN polymérase ARN-dépendante (297–301). Ces deux protéines sont donc indispensables pour la réplication du virus. Le rôle de la protéine NS1 dans l'infection par le ZIKV demeure encore inconnue. Néanmoins, il est admis qu'elle module la réponse immunitaire chez de nombreux Flavivirus ainsi que la pathogénèse virale en interagissant avec des composants des systèmes immunitaires inné et adaptatif (302,303). Finalement, les 4 protéines non structurales NS2A, NS2B, NS4A et NS4B participent au réarrangement des membranes cytoplasmiques et à l'assemblage des complexes de réplication virale (304–306). Ces protéines non structurales constituent donc aussi une piste intéressante pour l'élaboration de traitements contre l'infection par le ZIKV (307,308).





**Figure 18 : Représentation du génome et des différentes protéines du ZIKV.** Le ZIKV présente un génome ARN simple brin de polarité positive et d'une taille de 10794 pb. L'extrémité 5' présente une coiffe nucléotidique méthylée alors que l'extrémité 3' forme une structure en boucle non polyadénylée. Le génome code pour une polyprotéine clivée en 7 protéines non structurales et 3 protéines structurales, qui participent à la formation des virions et contribuent à l'infectiosité des particules virales. Source : Viral Zone <https://viralzone.expasy.org/6756>.

#### IV. Cycle de réplication du ZIKV

##### A. Tropisme

Les Flavivirus sont capables d'infecter un grand nombre de cellules humaines, de primates ou encore de rongeurs. De cette manière, il a été démontré que de nombreuses cellules humaines sont permissives au ZIKV (259,309,310). Les cellules du système nerveux central ou périphérique et les cellules de la rétine et du nerf optique sont particulièrement sensibles à l'infection, ce qui pourrait en partie expliquer les pathologies neurologiques observées chez certains patients (311–316).

Les cellules endothéliales et épithéliales du derme humain mais aussi les cellules de l'appareil reproducteur mâle et femelle sont également des cibles privilégiées du ZIKV (317–319).

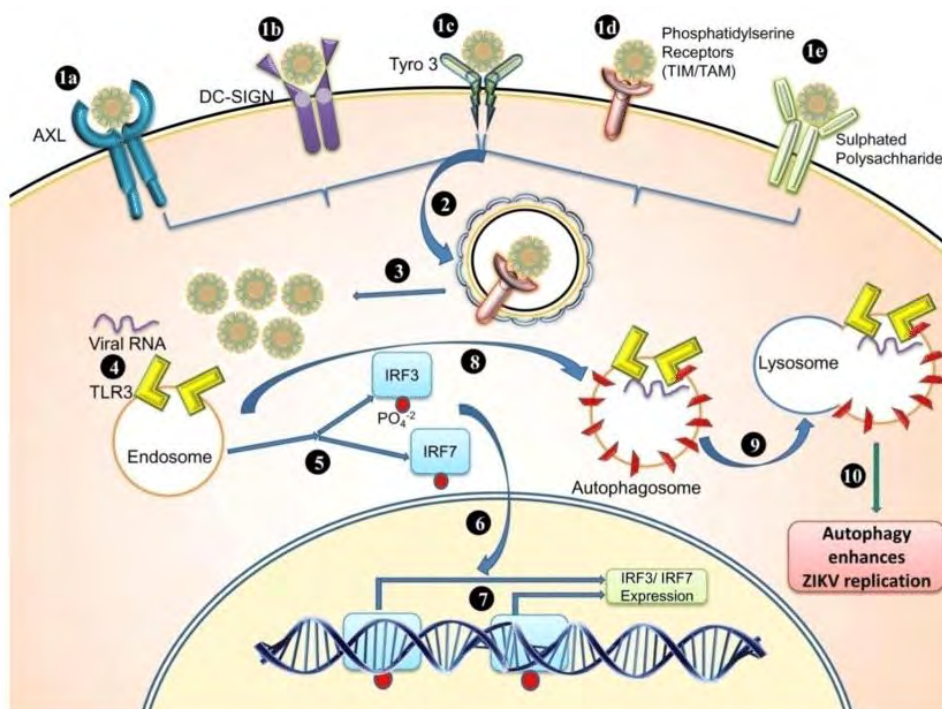
Lors de la grossesse, les différentes cellules du placenta, à savoir les fibroblastes, les CTB et les HBC, ainsi que les cellules épithéliales amniotiques et les cellules endothéliales et mésenchymateuses du cordon ombilical sont également des cibles du ZIKV (259,320,321). En

se répliquant et en infectant directement les cellules de l'interface materno-fœtale, le ZIKV perturbe la barrière placentaire et accède au compartiment fœtal.

Finalement, le ZIKV infecte également les macrophages placentaires, les neutrophiles et les cellules dendritiques (322–324).

### B. Mécanisme d'entrée du ZIKV

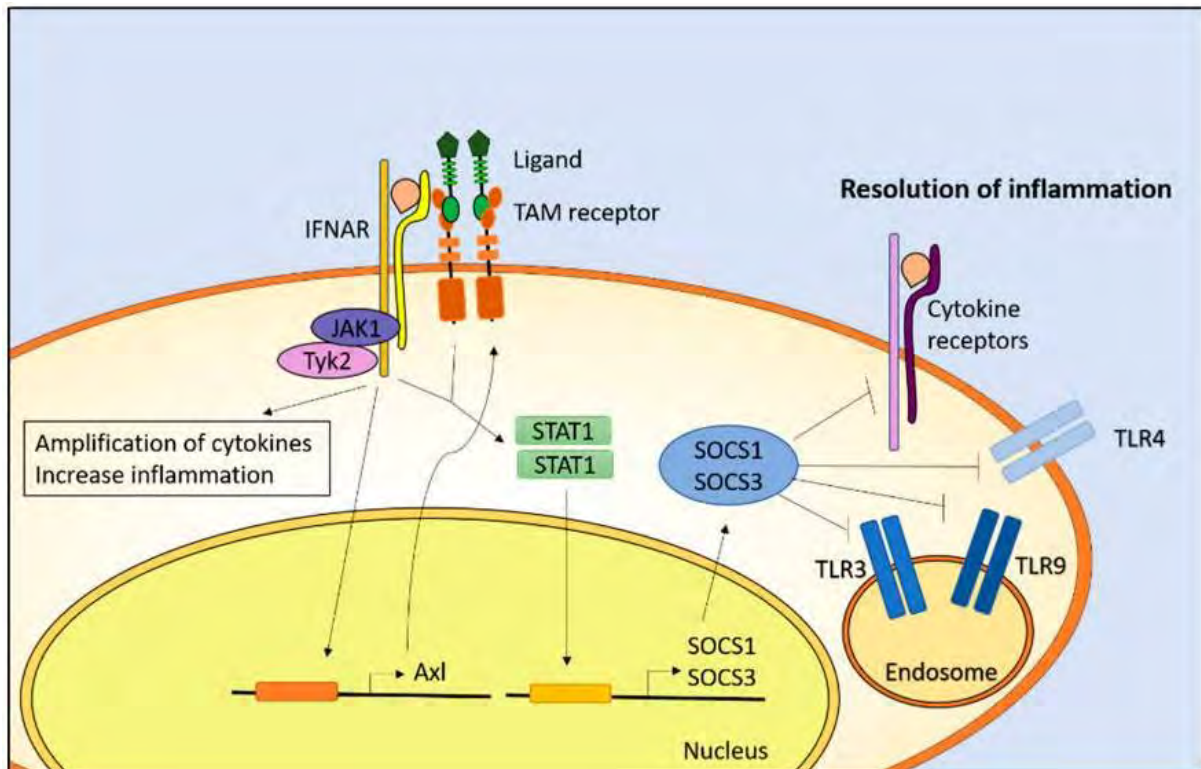
La plupart des Flavivirus se fixent à la surface des cellules cibles afin d'initier le cycle de réplication virale. Les virions se lient en particulier à des facteurs de l'hôte non spécifiques. De nombreux récepteurs, médiateurs d'entrée ou cofacteurs ont notamment été identifiés comme participant à l'entrée des Flavivirus (**Figure 19**) (325,326).



**Figure 19 : Récepteurs impliqués dans l'entrée du ZIKV dans la cellule hôte** De nombreux récepteurs sont impliqués dans l'entrée du ZIKV, parmi lesquels AXL, DC-SIGN, Tyro3, les récepteurs de la phosphatidylsérine (TIM) et les récepteurs polysaccharidiques sulfatés. L'endocytose est médiée par la clathrine ce qui permet la libération du virus dans le cytoplasme où il se réplique. L'ARN viral est reconnu par le TLR3 et le complexe récepteur active la phosphorylation d'IRF3 et IRF7, qui après phosphorylation se déplacent dans le noyau. Ils se lient alors aux éléments génétiques antiviraux pour exprimer OAS2, ISG5 et Mx1. Le complexe TLR3-ZIKV est ensuite dégradé par formation d'autophagosome, qui fusionne au lysosome. Finalement, l'autophagie améliore la réplication du ZIKV (327).

Ainsi, il a été démontré que le DENV se lie aux récepteurs de la famille des tyrosines kinases TAM (Tyro3, Axl et Mertk) (328). Ces récepteurs sont impliqués dans l'élimination des cellules apoptotiques mais aussi dans la régulation de la réponse antivirale innée (328–332). Deux mécanismes définis sont impliqués. Premièrement, les récepteurs TAM colocalisent avec la sous-unité 1 (IFNAR1) du récepteur d'interféron alpha/bêta (IFN- $\alpha/\beta$ ) pour former un complexe

TAM-IFNAR qui subvertit et redirige efficacement la fonction canonique IFNAR (**Figure 20**) (331). Deuxièmement, cette interaction TAM-IFNAR, de concert avec la liaison au ligand TAM, conduit à la phosphorylation des homodimères STAT1 (Signal Transducer And Activator Of Transcription 1) qui transloquent dans le noyau et initient l'expression du suppresseur de la signalisation des cytokines 1 (SOCS1) et SOCS3 (331,333). Les protéines SOCS1 et SOCS3 inhibent la signalisation des Janus kinases (JAK) et des récepteurs de type Toll (TLR) et suppriment la production d'IFN de type I (IFN-I) (334–337).



**Figure 20 :** Voie de signalisation de l'interféron, induite après fixation d'AXL à son ligand. La fixation du ligand d'AXL sur son récepteur entraîne une association avec le récepteur IFNAR et conduit à la transcription des facteurs SOCS1 et SOCS3 qui inhibent les voies TLR3, TLR4 et TLR9 ainsi que les récepteurs des cytokines impliqués dans la résolution de l'inflammation. TLR: Toll Like receptor ; JAK: Janus kinases ; STAT: transducteur de signal et activateur de la protéine de transcription ; SOCS: suppresseur de la signalisation des cytokines (338).

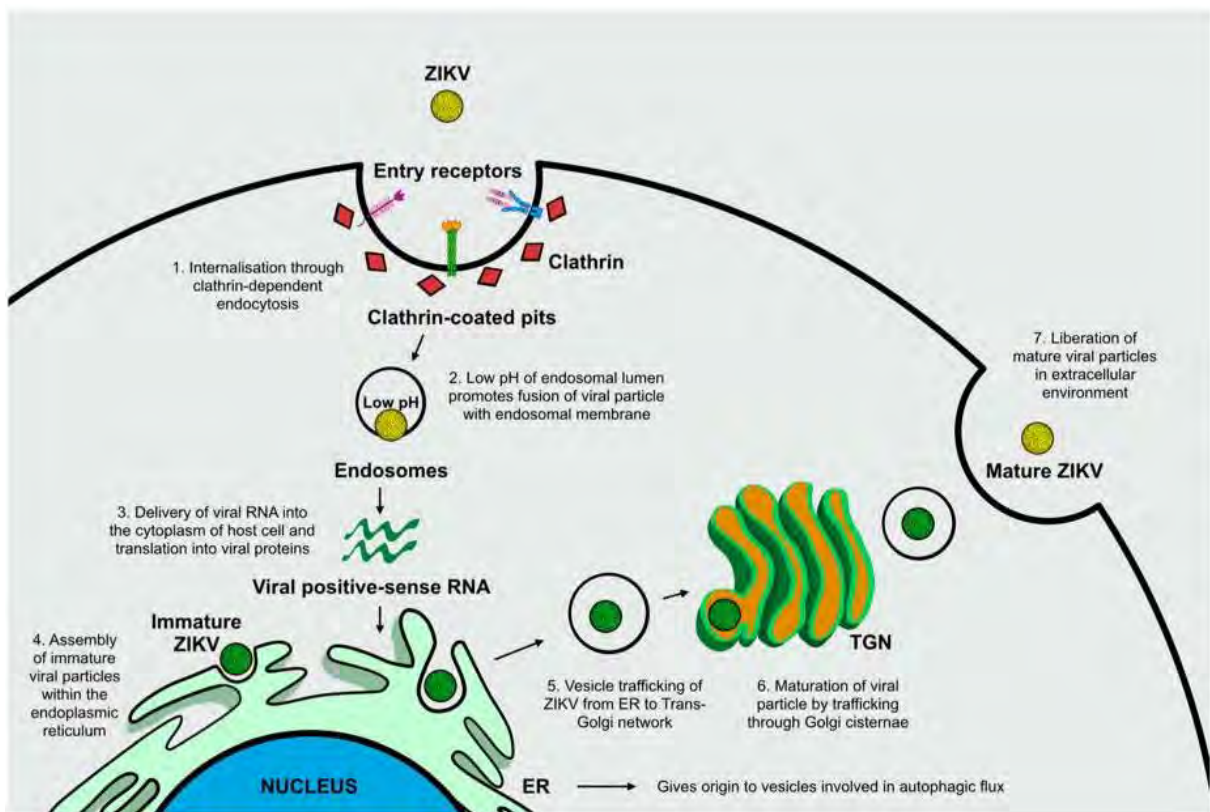
Le DENV se lie également à TIM1, un membre de la famille des protéines du domaine des immunoglobulines et de la mucine des lymphocytes T (T-Cell Immunoglobulin and Mucin domain), qui régule les fonctions immunitaires innées et adaptatives et la survie des cellules (339,340). Enfin, DC-SIGN a également été identifié comme un récepteur d'entrée pour certains Flavivirus (341,342).

Dans le cas de l'infection par le ZIKV, il a été démontré que TIM1, AXL, Tyro 3 et DC-SIGN facilitent l'entrée du virus dans les cellules de la peau (314,317,320). Des expériences de *silencing* dirigées contre TIM1, révèlent une diminution de l'infection dans les cellules de la

peau. Cet effet est d'autant plus visible quand AXL est inhibé simultanément, ce qui suggère un rôle tout particulier du récepteur AXL dans l'entrée du ZIKV dans les cellules cibles (343).

Activés par leurs ligands respectifs, ces récepteurs se lient directement aux phosphatidylsérines (PS) et à la phosphatidyléthanolamine (PE) des lipides chargés négativement, présents dans l'enveloppe des virions (344,345). Les récepteurs forment alors des ponts avec les virions. Pour certains récepteurs, dont AXL, la fixation sur les PS est cependant indirecte et est réalisée par l'intermédiaire de ligands solubles, les protéines Gas6 ou ProS (346,347). L'infection est alors facilitée par la séquestration de ces ligands par les PS, exposées sur la membrane d'enveloppe du ZIKV. Ce processus est appelé mimétisme apoptotique viral (348).

Cette étape d'attachement précède une interaction spécifique de la glycoprotéine virale E avec les récepteurs cellulaires (325,326). L'entrée virale est alors possible *via* une endocytose médiée par la clathrine (**Figure 21**) (349–351). Lors de l'internalisation, les virus sont transportés vers les endosomes, où le pH bas provoque des changements conformationnels spécifiques dans les glycoprotéines E exprimées à leur surface (352). Les hétérodimères sont dissociés, exposant les boucles de fusion du domaine DII de la protéine E. L'insertion est suivie par un réarrangement structurel global et conduit à la fusion des membranes virales et endosomales, permettant le désassemblage de la nucléocapside et le passage, à travers un pore, du génome viral dans le cytoplasme de la cellule (353–355).



**Figure 21 : Mécanismes d'entrée virale dans la cellule hôte.** La liaison des glycoprotéines structurales ZIKV aux récepteurs d'entrée cellulaire déclenche l'internalisation virale par endocytose dépendante de la clathrine. Le pH acide des endosomes induit des changements conformationnels des glycoprotéines virales de surface permettant ainsi la fusion de l'enveloppe virale avec la membrane endosomale, provoquant la libération d'ARN viral dans le cytosol. L'ARN viral cytosolique est ensuite traduit en protéines virales. Les particules virales immatures s'assemblent dans le RE et le trafic des vésicules permet le passage du ZIKV vers l'appareil de Golgi, où le virus subit une maturation. Les particules de ZIKV matures sont finalement délivrées et libérées dans l'environnement extracellulaire (356).

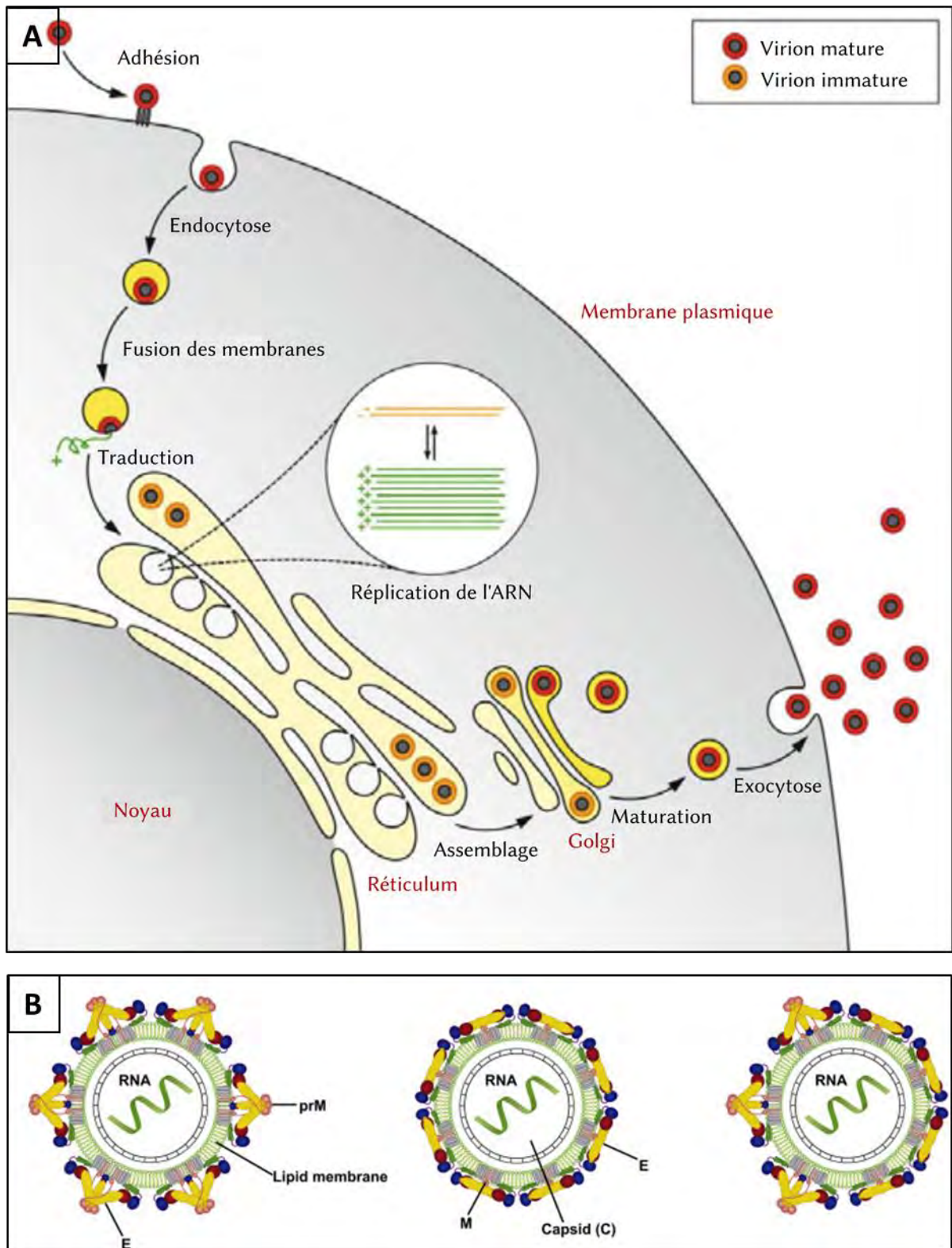
A l'interface materno-fœtale, peu de données sont connues concernant les récepteurs impliqués dans l'infection par le ZIKV. Tabata *et al.* ont cependant démontré que TIM1 joue un rôle majeur dans l'entrée du virus au niveau du placenta. Des expériences de déplétion réalisées avec un inhibiteur pharmacologique non spécifique, la duramycine, montrent une inhibition de l'infection du placenta par le ZIKV et confirment que TIM-1 est un récepteur putatif pour l'entrée du ZIKV dans le placenta (320).

### C. Cycle de répllication virale

La répllication virale du ZIKV a lieu dans des complexes de répllication cytoplasmiques, trouvés d'abord à la surface du réticulum endoplasmique (RE), puis invaginés lors du processus (**Figure 22.A**) (357). En effet, la membrane virale fusionne avec les membranes endosomales de la cellule hôte, ce qui induit le relargage du génome viral dans le cytoplasme (358). Puis, l'ARN est dirigé vers le RE où il sera répliqué (359–361).

Une fois dans le RE, l'ARN viral est d'abord transcrit en polyprotéine, qui est ensuite clivée, afin de fournir les protéines structurales et non structurales nécessaires à la réplication. L'ARN de polarité positive est transcrit en ARN de polarité négative qui sert de modèle pour l'amplification du génome viral. Un génome ARN double brin est formé. Ce processus nécessite l'activité de l'ARN polymérase ARN dépendante de NS5 et l'activité hélicase de la protéine NS3. L'ARN de polarité négative du double brin est ensuite répliqué et transcrit, afin de fournir de nouveaux ARN simple brin de polarité positive (362,363).

L'assemblage du virus se poursuit toujours dans le RE. Comme indiqué précédemment, la protéine C s'associe avec le génome viral pour former la nucléocapside (284). Cette nucléocapside est entourée d'une bicouche lipidique qui provient de la cellule hôte et dans laquelle s'insèrent les protéines virales prM/M et E (364–366). Ce processus protéolytique induit lors de la formation de la bicouche lipidique provoque des changements structurels majeurs des protéines M et E (366,367). Les nouveaux virions ainsi formés sont cependant immatures et les particules virales non infectieuses (**Figure 22.B**) (368,369). Ils sont alors transportés dans l'appareil de Golgi où la protéine prM est clivée en protéine mature M par une protéase de type furine (280,281). Le clivage induit la maturation du virion qui devient compétent pour la fusion. Les virions matures sont alors transportés à la surface de la cellule et relargués par exocytose (370,371). Les glycoprotéines E présentes dans la bicouche lipidique permettent alors la fusion de ZIKV avec la prochaine cellule cible et un nouveau cycle commence.



**Figure 22 :** **A. Cycle de réplication du ZIKV.** La réplication du ZIKV s'organise en huit étapes majeures : fixation, endocytose, fusion membranaire, traduction, réplication de l'ARN, assemblage, maturation et libération des particules virales (372). **B. Structures possibles des particules virales du ZIKV.** La figure représente les différents degrés de maturation des particules du virus. Les particules immatures affichent des projections trimériques prM-E, en raison du pH neutre du RE. Une particule mature affiche en revanche les homodimère E et M après clivage par les protéases virales et de l'hôte. Au dernier stade de maturation, les particules virales présentent une structure particulaire hétérogène (373).

## V. Physiopathologie liée à l'infection par le ZIKV

Le diagnostic de l'infection par le ZIKV est de nos jours difficile à établir et cette difficulté s'explique par de nombreux facteurs. Comme indiqué précédemment, la durée d'incubation du virus est de 3 à 12 jours (211). Les symptômes peuvent alors apparaître très tardivement. Par ailleurs, 70 à 80% des cas d'infection par le ZIKV sont asymptomatiques (217). Les patients peuvent également présenter des symptômes bénins qui passent inaperçus. De cette manière, les premiers cas importés peuvent ne pas avoir été détectés lors des premières épidémies. Dans plusieurs pays, l'alerte n'avait été donnée que suite au signalement de cas groupés présentant une éruption cutanée et une fièvre modérée. Enfin, les signes cliniques de l'infection sont très variables et peu spécifiques, ce qui augmente la difficulté du diagnostic (217). Ainsi, le ZIKV peut être confondu avec le DENV ou le CHIV, du fait de la similarité des symptômes observés lors de ces infections.

Dans 20 à 30% des cas, l'infection par le ZIKV se traduit par une forme classique symptomatique, associée à des symptômes pseudo-grippaux tels que la fièvre, les céphalées, les arthralgies, les myalgies, les conjonctivites ou les éruptions maculo-papuleuses (215). Les patients présentent également des éruptions cutanées (rash). La guérison chez ces patients est le plus souvent rapidement favorable, avec un rétablissement spontané en 2 à 7 jours.

Néanmoins, la survenue d'un certain nombre de complications chez les personnes infectées explique la gravité de l'infection par le ZIKV. Ces complications ont été observées et décrites lors des épidémies en Polynésie Française et au Brésil. Il s'agit principalement de défaillances d'organes (374), de complications neuro-immunologiques, dont le SGB, et de malformations néonatales lors de la grossesse, induisant des anomalies congénitales, des microcéphalies et des avortements spontanés (220–223,375,376).

### A. *Complications neurologiques chez l'adulte*

Le SGB est une pathologie auto-immune dans laquelle le système immunitaire du patient attaque les nerfs périphériques (377,378). C'est actuellement la principale cause de paralysie aiguë généralisée non-traumatique d'origine périphérique. Les symptômes varient par ailleurs selon les nerfs atteints. Dans la forme classique, l'atteinte des nerfs périphériques est caractérisée par une faiblesse musculaire et une paralysie symétrique des membres, qui provoque des difficultés à marcher. Les patients présentent également une diminution des



réflexes ou encore une paralysie faciale. Par ailleurs, ce syndrome peut se révéler sous plusieurs formes cliniques, plus ou moins sévères (378).

Jusqu'aux épidémies en Polynésie et au Brésil, les complications neurologiques observées après infection par le ZIKV n'avaient jamais été décrites dans la littérature et aucune corrélation entre le virus et la pathologie SGB n'avait été établie. Néanmoins, une augmentation du nombre de cas de SGB a été observée lors de ces épidémies. En effet, entre 2013 et 2014, l'incidence des cas de SGB est augmentée de 20 fois par rapport à l'incidence habituelle, rendant l'implication de l'infection par le ZIKV dans cette pathologie plus que probable (378). 42 patients sur 73 ayant des manifestations neurologiques ou auto-immunes sévères présentaient en plus un SGB. Le synchronisme entre le pic d'incidence de SGB et l'épidémie de ZIKV suggère un lien de causalité.

La corrélation est finalement établie en 2016 à la suite de la publication des deux études suivantes. Dans la première, 42 patients présentant un SGB sont comparés à un groupe de 98 patients contrôle et à un groupe de 70 patients testés positivement pour le ZIKV. Le diagnostic de l'infection est réalisé par mesure des IgM et IgG anti-ZIKV dans le sang des patients. 98% des patients atteints d'un SGB sont positifs pour les IgM/G anti-ZIKV contre seulement 36% dans les patients du premier groupe contrôle. Ces patients présentent par ailleurs une réponse immunitaire optimale par comparaison avec les patients contrôles. L'association entre le SGB et l'infection par le ZIKV est ainsi établie avec force. De la même manière, dans la seconde étude, les échantillons provenant de 68 patients atteints de SGB ont été étudiés. 97% des patients ont présenté des signes compatibles à une infection à ZIKV. Le diagnostic d'infection a été confirmé pour 17 des cas et suspecté pour 18 des cas.

Par ailleurs, lors de l'épidémie en Polynésie Française, en 2013, l'infection par le ZIKV fut également associée pour la première fois à des atteintes neurologiques, telles que des méningites, méningoencéphalites ou myélites, des défauts ophtalmiques ainsi que des atteintes auto-immunes (379–381).

### *B. Pathogenèse du ZIKV à l'interface materno-fœtale*

Les épidémies en Polynésie française et au Brésil ont également permis d'associer l'infection par le ZIKV à de nombreuses pathologies congénitales telles que des avortements spontanés, des pré-éclampsies, des retards dans la croissance des fœtus et des défauts neurodéveloppementaux, tels que la microcéphalie (220,223,376).

La microcéphalie est une des complications majeures de la grossesse. Il s'agit d'une malformation fœtale ou néonatale rare et irréversible. Elle est la conséquence d'une croissance anormale et insuffisante du cerveau du nouveau-né. En d'autres termes, le nouveau-né présente un volume crânien de taille inférieure à la normale (**Figure 23**). Cette pathologie peut induire des troubles du développement, causant à terme un déficit intellectuel, des retards mentaux et des troubles de l'apprentissage. Les enfants affectés présentent également des troubles du comportement, de la motricité, de la vision et de l'audition et peuvent souffrir de convulsions (382).

Bien que la cause à l'origine de la microcéphalie reste le plus souvent inconnue, différentes étiologies sont suspectées telles que des anomalies génétiques, un déficit nutritionnel sévère pendant la vie fœtale ou encore une exposition maternelle à des agents toxiques (métaux lourds, drogues, ...) lors de la grossesse (382,383).



**Figure 23 : Stades de sévérité de la microcéphalie.** Crédit d'Image : Centres pour le contrôle et la prévention des maladies, centre national des anomalies congénitales et invalidités de développement. Source : [https://www.news-medical.net/health/Microcephaly-Complications-\(French\).aspx](https://www.news-medical.net/health/Microcephaly-Complications-(French).aspx).

Des études récentes ont émis l'hypothèse que des infections congénitales lors du premier trimestre de grossesse (rubéole, toxoplasmose ou cytomégalovirus) sont aussi une des causes du développement de la microcéphalie chez le nouveau-né. De manière similaire, le ZIKV pouvait potentiellement être impliqué dans l'apparition de cette malformation congénitale. En effet, malgré l'absence de corrélation directe, un premier lien entre l'infection par le ZIKV et l'augmentation des bébés nés avec une microcéphalie est suspecté, un nombre croissant de malformations du système nerveux central ayant été signalé chez les fœtus et les nouveau-nés lors de l'épidémie en Polynésie française. 95 cas de microcéphalie ont été détectés pour 10.000 fœtus, dont les mères étaient infectées.

De la même manière, en octobre 2015, le ministère brésilien de la Santé signale une augmentation inhabituelle du nombre de bébés nés avec une microcéphalie (384). Fin 2016, 29% des fœtus présentaient des anomalies de croissance (220). 1.248 cas de microcéphalie

ont été signalés à travers le Brésil. La moyenne annuelle du nombre de cas de microcéphalie a donc été multipliée par 20 lors de l'épidémie, par rapport à l'année précédente. De plus, une infection antérieure au ZIKV a été notée chez des femmes ayant des nourrissons atteints de microcéphalie. Plus tard, de nouvelles études démontrent que le ZIKV est détecté dans le sang et les tissus neurologiques et que le ZIKV peut traverser la barrière placentaire (252).

L'OMS a donc conclu par une déclaration du 28 janvier 2016 qu' « une relation causale entre l'infection à ZIKV, les malformations congénitales et les syndromes neurologiques n'a pas été établie, mais est fortement suspectée ». Des études supplémentaires sont susceptibles de fournir des preuves définitives de la relation entre l'infection à ZIKV pendant la grossesse et la microcéphalie et peut-être d'autres défauts neurologiques chez ces bébés.

## VI. Réponse immunitaire dans l'infection par le ZIKV

### A. Réponse immunitaire innée

Les réponses immunitaires liées à l'infection par le ZIKV ont été évaluées dans de nombreux modèles animaux, mais il existe très peu d'études publiées sur le système immunitaire chez l'Homme (385–387). Ainsi, les mécanismes immunologiques impliqués dans la protection ou *a contrario* dans la pathologie lors de l'infection par le ZIKV n'ont été entièrement identifiés chez l'Homme que récemment.

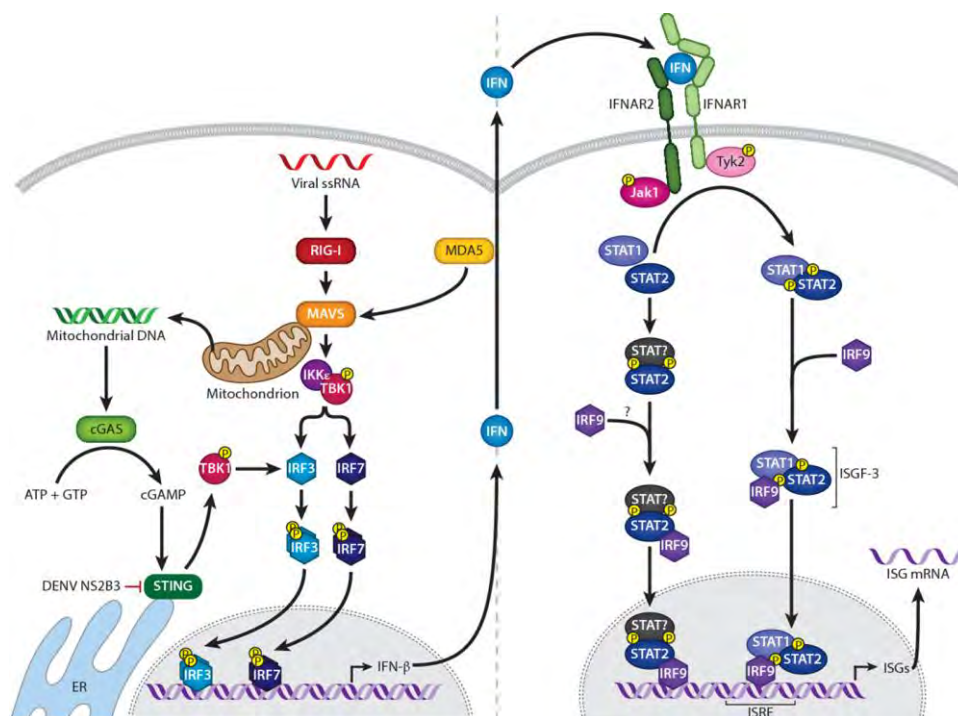
#### a. Induction de la réponse immunitaire

La réponse immunitaire innée est la première ligne de défense de l'hôte contre l'infection virale. Les PRR (récepteurs de reconnaissance des motifs moléculaires) sont indispensables dans la reconnaissance des pathogènes viraux et dans l'activation et la modulation de la réponse immunitaire innée. Ils reconnaissent les motifs moléculaires associés aux agents pathogènes (PAMP), afin de les internaliser et de les conduire aux endosomes pour y initier le processus de présentation de l'antigène et l'élimination des pathogènes (388).

Une infection aiguë par le ZIKV est aussi associée à une augmentation de l'expression des PRR membranaires, les récepteurs TLR (TLR3, TLR4 et TLR8), impliqués dans la reconnaissance des ARN viraux (389–392). L'infection est également corrélée à une augmentation de l'expression des récepteurs CLR (C-type Lectine receptor) et des RLR (RIG-1 like receptor), tels que RIG-1 et MDA-5 (Melanoma differentiation associated protein 5) (393–396). RIG-1 agit à un stade précoce, tandis que MDA-5 fonctionne à un stade tardif des réponses

immunitaires, de manière dépendante du virus. Une fois l'ARN viral cytoplasmique détecté, RIG-I ou MDA5 changent de conformation pour exposer leur fonction caspase et recruter le domaine CARD (**Figure 24**). Ce domaine interagit directement avec la protéine adaptatrice antivirale mitochondriale (MAVS) (397–399). Par ailleurs, RIG-1 forme des oligomères pour convertir le MAVS en polymères de type prion, afin de recruter les ligases d'ubiquitine E3 TRAF2, TRAF5 et TRAF6 impliquées dans la synthèse des chaînes de polyubiquitine (400–402). Ces chaînes d'ubiquitines recrutent et activent les kinases IKK $\epsilon$  (Inhibiteur de la kappa-B kinase epsilon) et TBK1 (TANK binding kinase 1) (**Figure 24**) (403).

Les kinases recrutées phosphorylent ensuite le facteur de transcription NF- $\kappa$ B et les facteurs régulateurs de l'interféron 3 et 7 (IRF3 et IRF7) (**Figure 24**) (404,405). Ces facteurs activés/phosphorylés se dissocient des protéines adaptatrices et des kinases pour se transloquer dans le noyau. Ils y induisent la transcription des gènes de l'IFN-I, essentiels à la protection de l'hôte (406–408). Les IFN-I sécrétés (IFN- $\alpha$  et IFN- $\beta$ ) se lient au récepteur IFN de manière autocrine et paracrine, pour activer la voie de signalisation JAK, la tyrosine kinase 2 (TYK2) et les STAT1 et STAT2 (409,410). STAT1 et STAT2 sont phosphorylés et forment un hétérodimère qui rejoint IRF9 pour former le complexe ISGF-3 (**Figure 24**). ISGF-3 se lie ensuite aux ISRE (Elément de réponse stimulée par les interférons) dans le génome pour favoriser l'expression des gènes stimulés par l'IFN (ISG) (411,412). Ces ISG conduisent alors à l'activation de l'immunité innée des cellules de l'hôte (**Figure 24**) (413).



**Figure 24 : Reconnaissance de l'ARN viral, réponse immunitaire innée et voie d'induction des IFN-I.** Après infection par un Flavivirus, l'ARN viral est détecté par les PRR, dont les RLR, qui induisent de multiples facteurs de transcription, dont les IRF et NF- $\kappa$ B, conduisant à la transcription des IFN. Sécrété, l'IFN se lie à son récepteur pour activer la voie de transduction du signal JAK-STAT. STAT1 et STAT2 sont phosphorylés et forment un hétérodimère qui se lie ensuite à IRF9. Le complexe formé fixe ensuite les ISRE génomiques pour induire l'expression des ISG. Les Flavivirus mettent néanmoins en place divers mécanismes pour échapper aux systèmes interféron. Par exemple, le DENV cible la dégradation de STAT2, le blocage de la phosphorylation de TBK1 ou encore le blocage de la liaison MAVS-RIG1. ER : réticulum endoplasmique, IRF : facteur de régulation de l'interféron, ISGF : facteur génique stimulé par l'interféron, ISRE : élément de réponse stimulé par l'interféron, MAVS : protéine de signalisation antivirale mitochondriale, RLR : récepteur de type RIG-I (310).

## b. La réponse ISG

Les ISG possèdent d'importantes propriétés antivirales, qui influencent plusieurs activités cellulaires telles que le traitement de l'ARN (dégradation, transcription, traduction), la stabilité des protéines et la viabilité cellulaire (310,414). Certains ISG, dont les protéines transmembranaires 1 et 3 induites par l'interféron (IFITM1 et IFITM3), sont tout particulièrement impliqués dans le contrôle de la pathogenèse des Flavivirus. Il a été montré que ces protéines antivirales transmembranaires modulent la réplication virale des Flavivirus et réduisent la mort cellulaire, notamment en agissant directement sur les premières étapes de l'entrée virale (inhibition de l'interaction avec les récepteurs d'entrée, inhibition de l'endocytose et de la fusion membranaire) (415). De cette manière, ces protéines contribuent au contrôle de l'infection par le ZIKV, en agissant comme des facteurs de restriction pour inhiber la réplication virale (416–418).

De la même manière, la vipérine, une protéine inhibitrice associée au RE, inductible par l'IFN, a été identifiée comme un ISG majeur dans l'immunité antivirale (419,420). En effet, cet ISG exerce une activité antivirale contre une large gamme de virus, dont les Flavivirus, y compris le ZIKV (421–423), notamment en bloquant l'entrée des virus dans les cellules cibles et en inhibant leur réplication virale. Des données révèlent que l'infection par le ZIKV induit une augmentation des niveaux de vipérine, qui influe négativement sur les niveaux d'ARNm de ZIKV *et vice versa* (424,425).

D'autres ISG ont par ailleurs été récemment identifiés dans l'immunité anti-ZIKV dont ISG15, Mx1, l'Interferon- $\alpha$  Inducible Gene 6 (IFI6) et C19orf66 (426–428). Contrairement à d'autres ISG induits lors d'infections virales, ces ISG vont conférer à la cellule infectée un haut niveau de protection, et ce dès les premiers stades de l'infection.

Bien que le rôle antiviral d'IFI6 soit encore peu connu, Richardson *et al.* ont démontré qu'il agit directement sur la réplication virale en empêchant l'invagination de la membrane du RE par le virus (427,429). Par ailleurs, il a été démontré que cet ISG participe à la réduction de la

mort cellulaire induite par l'infection (430). IFI6, qui est aussi une protéine mitochondriale, bloque la libération du cytochrome C des mitochondries et retarde ainsi la mort cellulaire programmée – l'apoptose – initiée par la voie TRAIL/Caspase-8 liée au TNF (431,432). IFI6 est donc considéré comme un facteur pro-survie (433).

Mx1 est aussi un élément clé dans la lutte contre un large éventail de virus (434). En effet, cet ISG va piéger les composants viraux essentiels, notamment en bloquant le trafic endocyttaire des particules virales entrantes et en inhibant la fusion, ne permettant pas ainsi le désassemblage de la ribonucléocapside (411,434).

Aussi, la surexpression de C19orf66 inhibe la réplication du ZIKV alors que sa désactivation conduit à une augmentation significative de la réplication virale. Il a en effet été démontré que C19orf66 co-localise et interagit avec la protéine non structurale NS3 afin d'induire spécifiquement sa dégradation *via* une voie dépendante du lysosome (426).

Enfin, il a démontré que la désactivation de l'ISG15 augmente l'infectivité du ZIKV alors que la supplémentation à l'aide d'un ISG15 recombinant réduit l'infection, notamment par inactivation directe du ZIKV et par inhibition de son entrée (435). *A contrario*, certaines études suggèrent que l'ISG15 pourrait contribuer à l'infection par le ZIKV en favorisant sa réplication virale (317). En effet, la désactivation de l'ISG15 a aussi été associée à une inhibition de la réplication du virus (436). L'ISG15 aurait alors un effet immunomodulateur en agissant comme régulateur négatif de la signalisation IFN-I pendant la réplication virale (437,438).

### c. Production de facteurs solubles

La translocation des protéines virales dans le noyau induit également la transcription des gènes des interférons de type II et III (408,439,440). L'IFN de type II (INF- $\gamma$ ) a des effets antiviraux directs limités, mais il peut moduler l'action des cellules immunitaires, pour favoriser une réponse adaptative et innée. Il a été démontré que l'INF- $\gamma$  peut non seulement diminuer l'infectiosité du ZIKV *in vitro*, mais également réguler positivement la transcription de cytokines inflammatoires (IRF1) et de molécules chimioattractives innées (CXCL-10/IP-10) (439).

De manière similaire, il a été montré que les cellules trophoblastiques primaires résistent à l'infection en sécrétant de l'IFN de type III (INF-III). L'IFN III se divise en 4 sous types (INF- $\lambda$  1–4), qui provoquent une forte réponse antivirale, transmise par effet paracrine aux cellules non placentaires (441).

Les cytokines contribuent également à la mise en place d'une immunité efficace. Par exemple, l'infection par le ZIKV a été associée à une augmentation de la production de cytokines pro-inflammatoires comme l'IL-6, IL1- $\beta$ , l'IL-10 ou le TNF- $\alpha$  (424,442). Les patients infectés présentent également des niveaux plus élevés de molécules chimiomotactiques, comme le CCL-5, le CXCL-8, le CXCL-10 ou le MCP-1, qui vont permettre d'attirer au niveau des sites d'infection les différentes cellules immunitaires (310,317,443,444). Enfin, d'autres cytokines sont détectées dans le sang des patients, telles que l'IL-2, l'IL-12a ou l'IL-15 (442). L'augmentation de l'expression de l'ensemble de ces cytokines est le témoin d'une réponse immunitaire antivirale forte.

## ***B. Réponse immunitaire adaptative***

### **a. La réponse médiée par les lymphocytes T**

Des études récentes sur modèles animaux suggèrent un rôle de la réponse immunitaire adaptative, et plus particulièrement un rôle des cellules T, dans l'immunité au ZIKV.

Bien que les souris ne puissent pas être infectées par le ZIKV, le modèle murin reste le plus couramment utilisé pour étudier *in vivo* l'infection. Pour que le virus puisse s'y répliquer, les souris sont alors déplétées de la voie IFN. Dans ce modèle, il a ainsi été démontré que les lymphocytes T CD8 (LT CD8) jouent un rôle majeur dans la protection contre l'infection par le ZIKV (445,446). Ces lymphocytes présentent une forte cytotoxicité *in vivo* comme le montre l'expression du marqueur de dégranulation CD107a et la production de granzyme B. Sur le même modèle animal, lors de la grossesse, il a cependant été démontré que les LT CD8 sont plus faiblement activés, ce qui pourrait faciliter la transmission verticale (447).

De la même manière, les lymphocytes T CD4 (LT CD4) murins sont également essentiels pour contrôler la gravité de l'infection par le ZIKV (448). En effet, des études menées par Lucas *et al.* ont prouvé qu'une déplétion des LT CD4 murins entrave la génération d'anticorps neutralisants qui limitent la prolifération du ZIKV (449). Chez l'Homme, dans un modèle *ex vivo*, à partir d'échantillons de plasma et PBMC de patients infectés par le ZIKV, les LT CD4 se différencient en Th1 et produisent de l'INF- $\gamma$ , du TNF- $\alpha$  et de l'IL-2, pour agir directement contre l'épitope (450).

La réponse médiée par les lymphocytes T a également été étudiée chez des primates non humains infectés par le ZIKV (385,386). Le pic d'activation de ces cellules est en corrélation avec la réduction de l'ARN viral du ZIKV et le contrôle de sa réplication, suggérant des rôles

protecteurs pour les LT CD4 et CD8 (451). L'infection par le ZIKV induirait donc une immunité protectrice complète chez les macaques.

Par ailleurs, il a été démontré qu'une infection préalable par le DENV affecte également la réponse T (452,453). Les cellules T CD8 spécifiques au ZIKV agissent alors en coopération avec les T CD8 activés préalablement par le DENV (292,454–457). On parle de lymphocytes T CD8 à réaction croisée DENV/ZIKV.

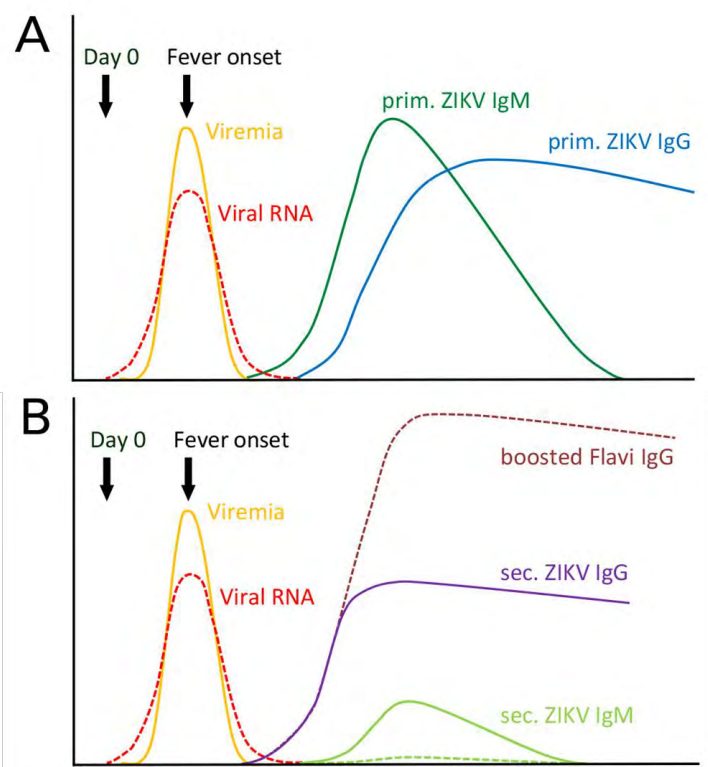
#### b. Production d'anticorps neutralisants

La réponse immunitaire adaptative, induite par les LT CD4 et LT CD8, est aussi associée à la sécrétion d'anticorps neutralisants, produits essentiellement par les lymphocytes B. Ces derniers participent à l'élimination des agents pathogènes en ciblant notamment les protéines virales pour empêcher la réplication virale (447,458).

L'infection par le ZIKV est associée à une augmentation du nombre de plasmablastes, un sous-ensemble de lymphocyte B (LB). Ces cellules peuvent constituer jusqu'à 63% du compartiment des LB périphériques chez les patients infectés par le ZIKV (459). Après infection par le ZIKV, Lai *et al.* ont montré que les cellules B sécrètent des anticorps IgM, IgG et quelques IgA, spécifiques du ZIKV (453) (**Figure 25.A**). Ces anticorps, présents à des concentrations élevées, sont principalement dirigés, avec une forte affinité, contre les protéines structurales virales E et prM et la protéine non structurale NS1, afin de restreindre l'infection par le ZIKV (452).

Il a par ailleurs été montré qu'une seconde exposition au ZIKV ou une exposition antérieure à d'autres Flavivirus, dont le DENV, sont associées à une plus grande réactivité sérologique croisée, grâce à la production d'anticorps de faible affinité dirigés contre le ZIKV par les LB mémoires préexistants (**Figure 25.B**). Ainsi, la mémoire immunologique induite après une seconde infection ou une infection antérieure par d'autres Flavivirus, peut produire des anticorps de faible affinité en réponse à une infection ultérieure, afin d'inhiber plus rapidement la réplication virale (459). Par conséquent, la façon dont l'immunité antérieure aux Flavivirus affecte l'infection par le ZIKV est maintenant une question importante pour la compréhension de l'impact d'une réactivité croisée sur la pathogenèse de l'infection par le ZIKV (460,461). Une meilleure compréhension de ce processus permettrait d'ouvrir de nouvelles pistes pour l'élaboration d'un potentiel vaccin ou de nouvelles thérapies (462,463).





**Figure 25 : A. Réponse immunitaire après une primo-infection par le ZIKV.** Les IgM sont produits dans les trois à cinq jours après infections et restent détectables dans le sang jusqu'à plusieurs semaines. A partir du huitième jour, l'infection est associée à la production d'anticorps IgG, qui développent une affinité croissante pour l'antigène, qu'ils éliminent efficacement. C'est la réponse primaire. **B. Réponse immunitaire après une seconde infection par le ZIKV.** Après une primo-infection, les anticorps IgG persistent généralement pendant des mois voire même des années. Ainsi, lors d'un second contact avec le même virus, la synthèse d'IgG est directement et rapidement stimulée. La concentration d'IgG augmente aussi fortement dès les premiers jours d'infection. A l'inverse, les anticorps IgM spécifiques ne se forment qu'en quantités faibles ou sont parfois même non détectables. Source : <https://www.euroimmunblog.com/euroimmun-anti-zika-virus-elisa-iga-closes-a-diagnostic-gap-in-zika-virus-infections/>.

### c. Implication des autres cellules du système immunitaire

Chez l'Homme, malgré le large tropisme du ZIKV, la réponse immunitaire reste suffisamment efficace pour combattre l'infection (464). Il a en effet été démontré que les monocytes CD14<sup>+</sup> CD16<sup>+</sup> participent au recrutement massif des cellules de l'immunité adaptative, telles que les plasmablastes et les cellules T spécifiques aux ZIKV, afin de contrôler l'infection (465–468).

Enfin, Costa *et al.* ont démontré que les cellules Natural Killer (NK) sont activées par les cellules dendritiques infectées par le DENV (469). De cette manière, les cellules NK pourraient contribuer au contrôle de l'infection par le ZIKV, notamment en produisant des taux élevés d'INF- $\gamma$ . Néanmoins, peu d'informations sont connues à ce jour concernant les cellules NK et leur rôle lors de l'infection par le ZIKV.

Ainsi, étudier le rôle des cellules immunitaires innées et adaptatives lors de l'infection par le ZIKV et identifier la nature de leurs interactions avec le virus constitue un axe de recherche

important pour le développement de nouvelles stratégies thérapeutiques vaccinales. En effet, les réactions immunitaires de l'hôte peuvent contenir l'infection virale ou, *à contrario*, favoriser sa dissémination.

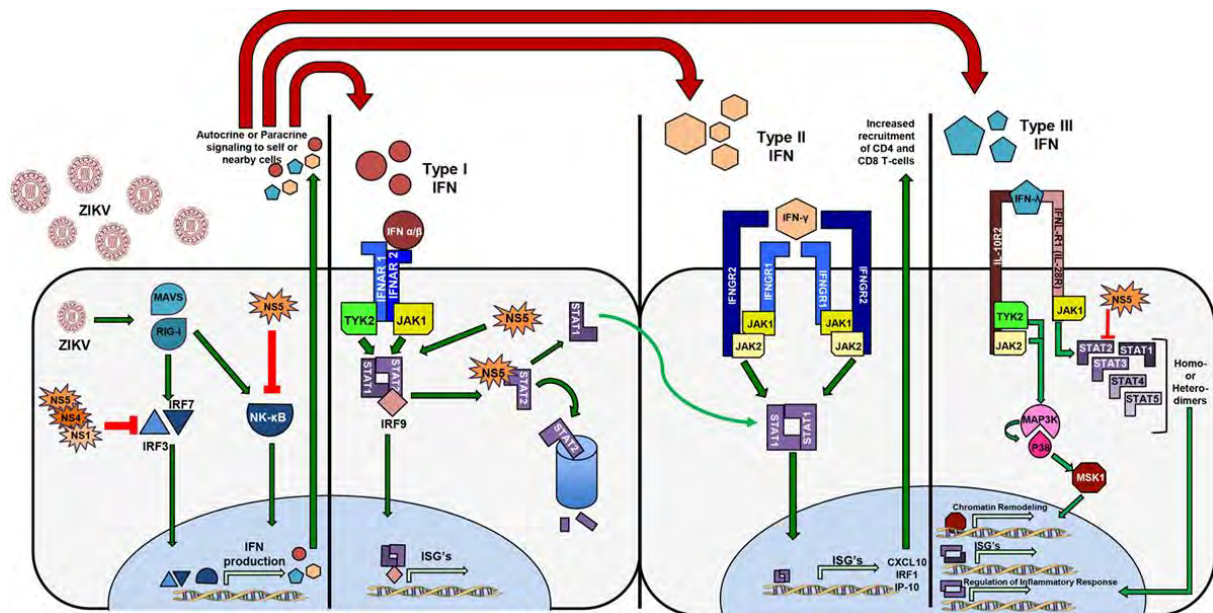
### C. Mécanismes d'échappement à la réponse immunitaire

#### a. Altération de la réponse immunitaire innée

Différents Flavivirus ont cependant développé des stratégies pour échapper aux réponses immunitaires de l'hôte et plus particulièrement à la réponse IFN (425,470,471). Pour le ZIKV, il a été montré que les protéines non structurales participent à la réplication virale et à l'assemblage des virions mais également à l'échappement du virus au système immunitaire. En effet, les 7 protéines non structurales virales sont directement ou indirectement impliquées dans l'évasion du virus au système immunitaire inné (418,472–474).

Tout d'abord, les protéines virales non structurales inhibent la production des IFN de type I induits par RIG-1. Différents mécanismes sont impliqués comme l'action des protéines virales NS2A, NS2B et NS4B sur la phosphorylation de TBK1 (418,425,475) (**Figure 26**). NS4A régule négativement les RLR mais également les composants en aval de la voie de signalisation MDA-5/RIG-I (476). Cette protéine agit également directement sur la fonctionnalité des IRF3 et 7 en inhibant leur phosphorylation, bloquant ainsi la production d'IFN. De manière similaire, la protéine virale NS1 régule négativement MDA5, RIG-I, MAVS, TBK1 et IKK $\epsilon$ , empêchant ainsi l'oligomérisation des IRF3 et IRF7 (477–479). Enfin, NS5 agit similairement, bloquant l'action de ces facteurs régulateurs.

Il a également été démontré que NS5 favorise la dégradation de STAT2 *via* le protéasome. En conséquence, la production de cytokines anti-inflammatoires est régulée positivement (**Figure 26**) (480,481). De plus, la production d'IFN-I (IFN- $\beta$ ) et III et des cytokines pro-inflammatoires, telles que l'IL-6 ou CCL5 est également réduite (464). Enfin, la dégradation de STAT2 est aussi associée à une réduction dans les niveaux d'ISG (471).



**Figure 26 : Voies de signalisation induites par le ZIKV et mécanismes d'action des protéines virales non structurales.** Le ZIKV active les voies de signalisation qui favorisent la transcription des gènes de l'IFN. La protéine NS5 de la lignée africaine se lie et empêche la fonction NF-κB. Les protéines non structurales de la lignée asiatique NS5, NS4 et NS1 agissent pour inhiber la fonctionnalité IRF3 et IRF7, inhibant ainsi la production d'IFN. NS5 agit également en ciblant STAT2, qui est dégradé par le protéasome. L'action de NS5 entraîne alors une augmentation du taux d'homodimérisation de STAT et une régulation positive des cytokines anti-inflammatoires (287).

## b. Altération de la réponse immunitaire adaptative

L'altération de la réponse immunitaire adaptative réside dans le large tropisme du ZIKV. Comme indiqué plus haut, ce virus est capable d'infecter un grand nombre de cellules immunitaires, dont les macrophages cérébraux et placentaires, les neutrophiles et les cellules dendritiques (317,322–324). *A contrario*, aucune donnée ne suggère que les lymphocytes T pourraient être des acteurs dans la transmission du ZIKV après infection.

Aussi, de nombreuses études ont démontré que l'infection par le ZIKV est associée à une augmentation de l'expression des molécules du Complexe Majeur d'Histocompatibilité (CMH) de classe I. Alors que cette stratégie permet un échappement à la reconnaissance par les cellules NK, elle favorise l'action des LT CD8 et la mise en place de la réponse immunitaire adaptative (482). Ainsi, les LT constituent la meilleure piste dans l'élaboration d'un vaccin anti-ZIKV.

De plus, comme indiqué plus haut, la conservation entre les épitopes du ZIKV et d'autres Flavivirus, en particulier le DENV, induit l'activation des LT à réaction croisée. Néanmoins, cette cross-réactivité des LT semble contribuer à la mise en place d'une réponse immune nocive, impliquée dans les mécanismes conduisant au syndrome de Guillain-Barré induit par le ZIKV (483). Plusieurs études suggèrent que les réponses immunitaires croisées induites par le

virus peuvent cibler des antigènes sur les tissus neuronaux de l'hôte (221,484). En conséquence, les peptides communs entre le ZIKV et les protéines humaines associées au SGB et à des malformations cérébrales congénitales ont été trouvées, indiquant l'implication des LT dans l'immunopathogenèse (485).

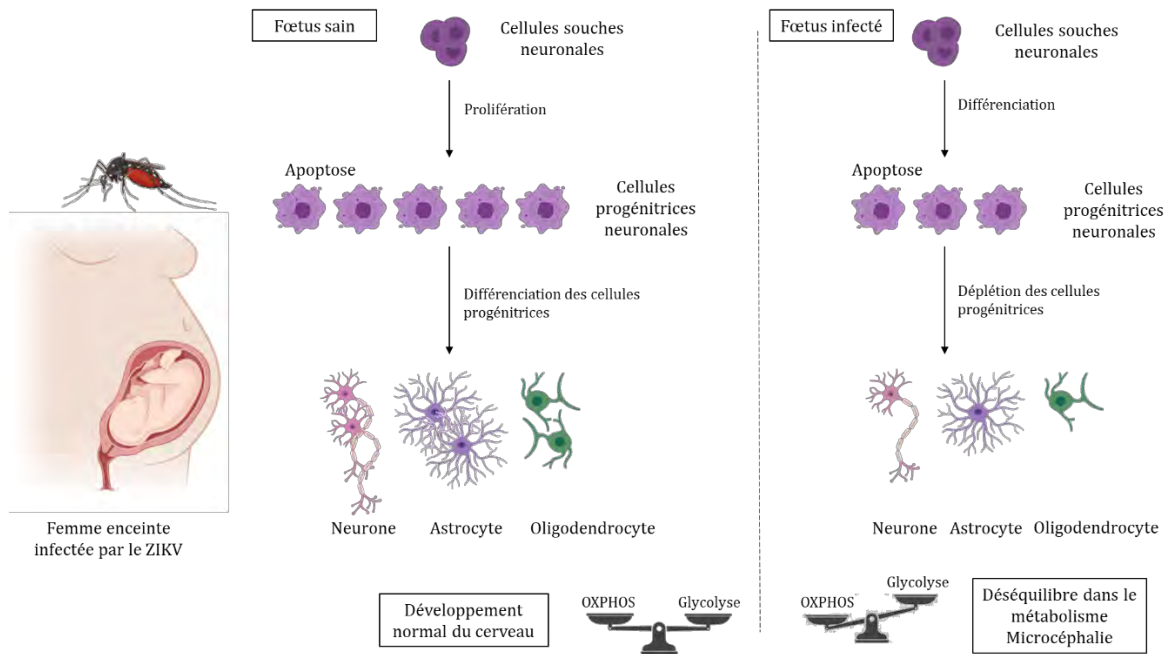
C'est donc en détournant le système immunitaire et en activant l'auto-immunité que le ZIKV contrebalance la réponse immune de l'hôte et échappe aux mécanismes antiviraux afin de faciliter sa réplication virale.

### c. Altération des voies métaboliques et de la lipogenèse

De nombreuses études démontrent que les virus sont capables de manipuler le métabolisme cellulaire pour favoriser leur réplication virale (486,487). Par exemple, le DENV induit des altérations majeures du métabolisme cellulaire en augmentant la consommation de glucose (488,489). La glycolyse est alors exploitée comme source d'énergie et de métabolites, au cours de l'infection (488). D'ailleurs, il a été montré que la protéine NS1 agit directement sur la glycolyse, en interférant avec la fonction de la glyceraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase (GAPDH), pour induire une production d'énergie plus importante (489).

De manière similaire, des études récentes sur les cellules souches neuronales montrent que l'infection par le ZIKV est associée à l'activation du facteur de transcription P53 et à l'inhibition de la voie mTOR (490–492). La reprogrammation de ces composantes du métabolisme induit alors un passage précoce de la glycolyse à la phosphorylation oxydative (OXPHOS), maintenant les cellules dans un état immature et conduisant à l'arrêt de la prolifération cellulaire, à une apoptose prématurée accentuée et à leur épuisement (**Figure 27**).

Ainsi, les changements dans le métabolisme cellulaire des cellules neuronales, observés aux premiers stades de la différenciation, pourraient expliquer le développement de microcéphalies chez le nouveau-né, observées lors de l'infection materno-fœtale.



**Figure 27 :** Effet de l’infection par le ZIKV sur le métabolisme des cellules souches neuronales. L’infection par le ZIKV induit des changements métaboliques au stade précoce de la différenciation des cellules souches neuronales. Ces modifications conduisent à l’arrêt de la prolifération cellulaire et induisent une différenciation et une apoptose prématurées. De plus, une altération du métabolisme aux stades matures des cellules neuronales induit un dysfonctionnement cellulaire et des troubles neurologiques. Adaptée de (313).

Dans d’autres modèles d’étude, Lin *et al.* ont démontré que les voies d’utilisation du glucose sont nécessaires à la propagation du ZIKV (493). Fait intéressant, l’infection par le ZIKV est associée à une augmentation significative de l’expression des transporteurs de glucose (GLUT) et ainsi de l’absorption de glucose (424). Ainsi, une altération de l’absorption du glucose inhibe la répllication virale tandis que l’induction de l’expression de GLUT1 favorise l’infection par le ZIKV (493).

Enfin, nous avons récemment démontré que le ZIKV reprogramme également le lipidome placentaire afin d’établir un environnement propice à la répllication du génome viral et à l’assemblage des virions infectieux (494). L’infection par le ZIKV provoque aussi une perte de l’homéostasie métabolique, associée à un dysfonctionnement mitochondrial et à un déséquilibre dans la production des facteurs pro- ou anti-inflammatoires. Les dommages au réseau mitochondrial observés fournissent alors une boucle d’amplification pour la réponse inflammatoire placentaire. Finalement, la perturbation métabolique peut également interférer avec les mécanismes de défense intrinsèques placentaires permettant au virus de surmonter la fonction barrière du placenta et d’atteindre le fœtus.

## Chapitre 3 : Le système immunitaire

*« Une minute de colère affaiblit le système immunitaire pour 4 à 5 heures. Une minute de rire augmente le système immunitaire pour 24 heures. » Inconnu.*

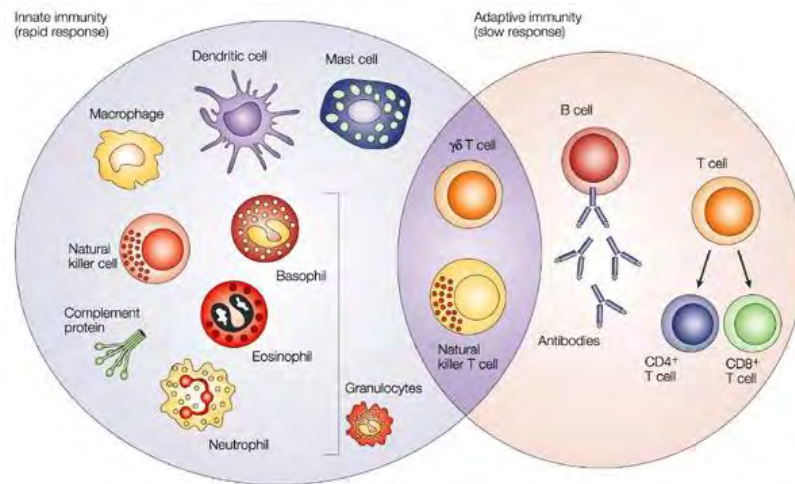
### I. Présentation du système immunitaire en général

Le système immunitaire (SI) correspond aux mécanismes de défenses de l'organisme contre les menaces extérieures. On appelle réponse immunitaire le déclenchement du SI face à une maladie. Ce dernier comprend un ensemble complexe de cellules, tissus, organes lymphoïdes, facteurs humoraux et cytokines qui agissent non seulement afin de permettre une défense efficace contre les menaces potentielles qui infectent l'hôte, mais également pour réparer les tissus, maintenir l'homéostasie et cohabiter avec les micro-organismes bénéfiques du microbiote.

Les défenses mises en place par le système immunitaire comprennent en premier lieu des stratégies non immunes passives, telles que la synthèse de mucus, la variation de pH ou encore l'étanchéité et l'épaisseur de la barrière épithéliale. Les stratégies immunes peuvent aussi être actives, avec l'induction d'une réaction inflammatoire, la sécrétion de facteurs humoraux innés. Bien que l'ensemble de ces stratégies soit efficace pour limiter l'inoculum infectieux, des stratégies de défense pré-immunes offrent une protection rapide à toute stimulation antigénique. Historiquement, le système immunitaire peut être divisé en deux composantes, l'immunité « innée » et « adaptative » (**Figure 28**), particulièrement importantes lorsque les premières lignes non immunes de défense ont échoué. Ces deux composantes du SI sont capables de distinguer les molécules du « soi » qui constituent l'organisme, les molécules du « non-soi », telles que les pathogènes, et les molécules du « soi modifié » qui sont altérées ou transformées. Elles se justifient alors par leur rapidité, leur spécificité, leur durée et leurs fonctions effectrices, impliquées dans la mise en place de la réponse immunitaire. En effet, la réponse adaptative, ou à médiation cellulaire, spécifique à l'agent pathogène, se met en place progressivement et supplémente la réponse innée induite en premier lieu. Cette dernière se caractérise par la production d'anticorps IgA et IgM sécrétés par les muqueuses, et d'IgG synthétisés localement.

La différence entre l'immunité innée et adaptative tend cependant à s'amenuiser. Les développements récents ont montré que la frontière entre le SI inné et adaptatif n'est pas si nette et que des cellules dites innées sont capables d'acquérir des capacités qui étaient jusque-là réservées aux cellules adaptatrices. Certaines cellules de l'immunité innée disposent de

fonctions adaptatives alors que certaines cellules immunes adaptatives disposent de fonctions innées (495). Enfin, certaines cellules immunes, dont les cellules NKT, les MAIT et les  $LT\gamma\delta$ , se trouvent à l'interface entre ces deux composantes.



Nature Reviews | Cancer

**Figure 28 : Cellules de l'immunité innée et adaptative.** La réponse immunitaire innée fonctionne comme la première ligne de défense contre l'infection. Elle se compose de facteurs solubles, tels que les protéines du complément, et de divers composants cellulaires, dont les granulocytes (basophiles, éosinophiles et neutrophiles), les mastocytes, les macrophages, les cellules dendritiques et les cellules NK. La réponse immunitaire adaptative est plus lente à se développer, mais se manifeste par une augmentation de la spécificité antigénique et de la mémoire. Cette réponse est composée d'anticorps, de lymphocytes B et de lymphocytes T  $CD4^+$  et  $CD8^+$ . Les NKT et les lymphocytes T  $\gamma\delta$  sont des lymphocytes cytotoxiques qui appartiennent aussi bien à l'immunité innée qu'adaptative (496).

### A. Immunité Innée

L'immunité innée constitue une première ligne de défense efficace contre les divers pathogènes qui infectent un individu. Elle comprend tout d'abord des barrières physico-biochimiques qui constituent le premier obstacle rencontré par les agents pathogènes. Les cellules épithéliales à jonctions serrées, qui composent divers tissus dont la peau et les muqueuses, ainsi que la sécrétion de mucus s'opposent efficacement à l'entrée et participent à l'élimination des pathogènes. La sécrétion de peptides et de protéines à activité lytique constitue aussi une barrière chimique.

La réponse immunitaire innée fait intervenir des cellules spécialisées dont les neutrophiles, les monocytes, les cellules dendritiques (DC) et des cellules résidentes des différents tissus comme les macrophages ou les mastocytes. Ces cellules reconnaissent des signaux de danger d'origine pathogénique, les PAMP, grâce à des récepteurs hautement conservés, les PRR membranaires ou cytoplasmiques. Les PRR exprimés par toutes les cellules de l'immunité innée regroupent plusieurs familles de récepteurs qui discernent le soi du non-soi (497). La détection des signaux

de dangers par les PRR initie des cascades de signalisation intracellulaires qui déclenchent la phagocytose et conduisent à la production rapide de cytokines pro-inflammatoires et immunostimulantes. Par exemple, la reconnaissance des PAMP par les cellules présentes dans le tissu lésé ou infecté, induit la production d'IL-1 $\beta$ , de TNF- $\alpha$  et d'IL-6, qui stimulent la réponse inflammatoire. La production d'IL-12 participe à l'activation des cellules « tueuses naturelles » (Natural Killer) qui mettent en place leurs fonctions effectrices et produisent de l'IFN- $\gamma$ . Il est également connu que les infections virales sont associées à une production des IFN-I,  $\alpha$  et  $\beta$ , qui agissent par effet bystander pour empêcher la propagation de l'infection aux cellules attenantes.

Les cellules de la lignée myéloïde présentent également un rôle majeur dans la réponse immunitaire innée. Les tissus contiennent en effet une grande proportion de granulocytes dont les éosinophiles et les basophiles. Ces cellules agissent par libération d'enzymes, afin d'éliminer les pathogènes, et participent à l'activation de l'inflammation. L'expression des récepteurs pour les parties Fc des IgE leur permet également d'être impliqué dans les réponses d'hypersensibilité et d'allergie. Les mastocytes retrouvés dans les tissus possèdent les mêmes fonctions.

Une infection tissulaire est aussi associée à la migration d'autres cellules immunitaires. Les neutrophiles, qui représentent 90% des cellules du sang, migrent par chimiotactisme vers le lieu de l'infection afin de phagocyter les éléments du non-soi. De manière similaire, les monocytes circulants migrent dans les tissus, où ils deviennent des macrophages tissulaires. Ils y sont alors capables de phagocytose et produisent de multiples médiateurs solubles dont des cytokines et chimiokines, qui conditionnent la mise en place d'un environnement inflammatoire. Les molécules solubles contribuent non seulement au recrutement d'autres cellules de l'immunité adaptative afin qu'elles inhibent la croissance des pathogènes et contribuent à leur élimination des tissus mais également au renforcement de l'activation des cellules effectrices, afin de favoriser leur action à l'encontre des pathogènes.

Plus récemment, de nouvelles populations lymphoïdes innées (ILC) ont été caractérisées et divisées en trois sous catégories (ILC1, ILC2 et ILC3) (498). Ces cellules jouent un rôle majeur lors d'infections, mais aussi dans la formation de tissu lymphoïde et dans le remodelage tissulaire après des dommages liés à une blessure ou à l'homéostasie cellulaire (499).

Bien que l'immunité innée soit généralement suffisante pour éliminer la majorité des pathogènes, il est nécessaire, si la menace persiste, que l'immunité adaptative se mette en place.



## *B. Immunité adaptative*

L'immunité adaptative fait appel à des médiateurs cellulaires particuliers qui répondent spécifiquement à l'antigène. La reconnaissance spécifique d'un antigène rencontré s'explique par l'expression d'un large panel de récepteurs cellulaires générés par recombinaison génique aléatoire au cours du processus de développement des cellules effectrices. Ainsi, contrairement à l'immunité innée immédiate, le système immunitaire adaptatif nécessite un délai et une phase de latence avant son activation, en raison de la reconnaissance préalable de l'antigène. De plus, la mise en place de la réponse adaptative est directement dépendante des cellules de l'immunité innée, notamment des DC, qui présentent l'antigène. Les DC phagocytent en effet les pathogènes et migrent vers les organes lymphoïdes où elles présentent l'antigène et activent les cellules effectrices.

La réponse adaptative est composée d'une réponse cellulaire médiée par les LT CD8<sup>+</sup> cytotoxiques et d'une réponse humorale basée sur la production d'immunoglobulines et d'anticorps par les LB (500). Les lymphocytes T CD4<sup>+</sup>, qui apportent une aide aux LT CD8<sup>+</sup> et aux LB, sont qualifiés d'auxiliaires et contribuent à leur expansion et leur différenciation en cellules effectrices, notamment en sécrétant des cytokines.

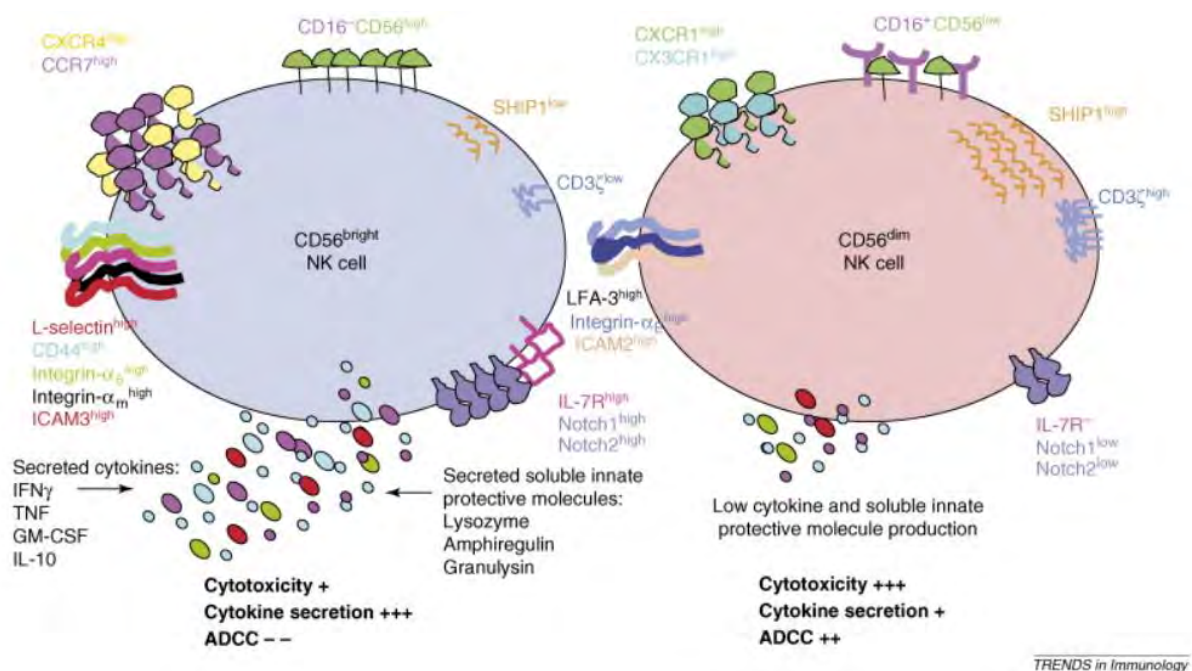
Enfin, cette réponse s'accompagne de la mise en place d'une mémoire immunitaire. L'immunité adaptative permet de conserver l'antigène en mémoire, grâce à la persistance d'une petite proportion de lymphocytes, même après élimination du pathogène. Une infection répétée avec le même pathogène permet ensuite une réponse plus efficace, plus rapide et plus importante, appelée « réponse secondaire ».

### **II. Les cellules Natural Killer (NK)**

#### *A. Caractéristiques générales des cellules NK*

Les cellules « tueuses naturelles » (ou NK) sont des cellules lymphoïdes cytotoxiques connues pour leur rôle actif dans la régulation de l'activation des leucocytes et la surveillance des infections microbiennes et des tumeurs malignes, sans stimulation spécifique par un antigène (501). En raison du manque d'expression de récepteurs spécifiques de l'antigène, ces cellules NK sont considérées comme des cellules du système immunitaire inné. Elles représentent 5 à 20% du total des lymphocytes du sang périphérique mais sont également présentes dans les organes lymphoïdes, les poumons, les intestins, les amygdales, le foie et l'utérus lors de la grossesse (502).

Ces cellules sont phénotypiquement définies par l'expression de la molécule CD56 ou NCAM (Neural Cell Adhesion Molecule) et l'absence d'expression du CD3 (503,504). Deux sous-populations de cellules NK matures principales ont ainsi été définies chez l'Homme, en se basant sur l'expression du CD56 : les cellules CD56<sup>dim</sup> (expression intermédiaire) et CD56<sup>bright</sup> (forte expression) (**Figure 29**).



**Figure 29 :** Caractéristiques des cellules NK CD56<sup>bright</sup> et CD56<sup>dim</sup>. Les deux sous-populations présentent des répertoires moléculaires bien distincts. Les molécules exprimées de manière différentielle à la surface de ces deux sous-populations englobent les récepteurs de surface cellulaire, les molécules d'adhésion, les protéines sécrétées ou encore les régulateurs du cycle cellulaire (505).

En périphérie, les cellules NK CD56<sup>bright</sup> représentent seulement 10% des cellules NK alors qu'elles sont majoritaires dans les tissus. Leur localisation tissulaire peut s'expliquer par l'expression de la L-sélectine (CD62L) et du récepteur aux chimiokines CCR7 (506). Elles sont peu cytotoxiques et exercent une activité immunomodulatrice, majoritairement pro-inflammatoire, en sécrétant un large panel de cytokines (IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , GM-CSF et IL-10) après stimulation *in vitro* par l'IL-12 et l'IL-15 (507–509).

En revanche, les cellules NK CD56<sup>dim</sup> sont minoritaires dans les tissus mais elles représentent 90% des cellules NK présentes en périphérie. Elles expriment des récepteurs aux chimiokines CXCR1 et CX3CR1 qui permettent leur recrutement au niveau des sites inflammatoires (506,510). Les NK CD56<sup>dim</sup>, fortement cytotoxiques, exercent alors leur fonction en sécrétant de l'IFN- $\gamma$  et en lysant les cellules cibles. Ces cellules expriment en effet fortement des

molécules associées à la cytotoxicité telles que la perforine et les granzymes mais également le récepteur de faible affinité du fragment Fc des IgG (FcγRIII) ou CD16, qui est impliqué dans la cytotoxicité cellulaire dépendante des anticorps ou ADCC (Antibody-Dependent Cell-mediated Cytotoxicity) (508). Sur la base de l'expression de la molécule d'adhésion CD57, les cellules CD56<sup>dim</sup> peuvent être subdivisées en différentes sous populations (511).

Cependant, les développements récents dans le domaine de l'immunologie concernant les connaissances sur les cellules NK et la diversification des récepteurs des cellules NK (NKR) en réponse aux pathogènes, ainsi que le développement de capacités de type mémoire, suggèrent l'existence de plus de deux sous-ensembles de cellules NK (512). Des sous-ensembles distincts de cellules NK résidentes (trNK) ont par exemple été trouvés dans les organes lymphoïdes (rate, ganglions lymphatiques) et dans de nombreux tissus y compris le foie, le pancréas, le cerveau, les reins et l'utérus (513–517). De manière similaire aux cellules T résidant dans les tissus, ces trNK expriment des niveaux élevés des marqueurs résidents y compris le CD69, le CD103 et le CD49a (518–520).

## **B. Ontogénie des cellules NK**

### **a. Développement et maturation des cellules NK**

Le développement des cellules NK se déroule principalement dans la moelle osseuse (521). Il a ainsi été montré qu'une altération de la moelle osseuse chez la souris induit un défaut majeur dans le compartiment NK (522). Néanmoins, les cellules NK peuvent se différencier *in vitro* à partir de précurseurs CD34<sup>+</sup>, ce qui prouve que la moelle osseuse n'est pas le site exclusif de différenciation des NK (523). Il est désormais admis que le thymus, les ganglions lymphatiques, le foie ou encore la rate constituent aussi des sites de développement des cellules NK (524).

Le développement des cellules NK peut être divisé en cinq étapes différentes qui sont définies sur la base de l'expression de marqueurs et de récepteurs membranaires, de facteurs de transcription et de cytokines (**Figure 30**) (521).

Dans un premier temps, les progéniteurs NK (ou pro-NK), retrouvés dans la moelle osseuse et les organes lymphoïdes secondaires, sont phénotypiquement proches du progéniteur lymphoïde commun (CLP) (521,525). Les cellules pro-NK sont caractérisées par l'expression du CD34, du CD10, du CD127 et du CD45RA mais par l'absence de CD94, CD117 et CD122. En raison de l'absence du CD122, les pro-NK sont donc non réactives à l'IL-15 à ce stade-là.

Les progéniteurs pro-NK se différencient ensuite en précurseurs NK (pré-NK), sous l'effet de facteurs de croissance et de cytokines. Ces cellules sont caractérisées par l'acquisition du CD117 et la diminution de l'expression de CD34. Par ailleurs, les pré-NK expriment à leur surface de forts taux de LFA-1 (Leukocyte Function-Associated antigen-1), de L-sélectine et d'intégrines  $\alpha 4\beta 7$ . Ces molécules favoriseraient l'extravasation des cellules pré-NK du sang vers les organes lymphoïdes secondaires ou la moelle osseuse, suggérant l'hypothèse que les cellules NK proviendraient du sang périphérique.

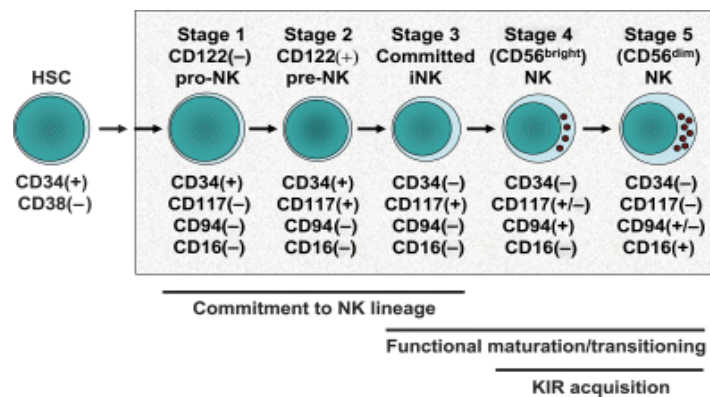
Au troisième stade du développement, les pré-NK se différencient en cellules NK immatures (iNK). Ces cellules se caractérisent par la perte de l'expression du CD34, du CD10 et des intégrines. En revanche, l'expression de la chaîne  $\alpha$  du récepteur à l'IL-7, ou CD127, est augmentée, de même que le co-récepteur CD2, le CD56, le CD161, 2B4 et NKp44. Les récepteurs CD94/NKG2, NKG2D, NKp46, CD16 ou KIR (Killer-cell Immunoglobulin-like Receptor) ne sont pas encore exprimés. Ainsi, à ce stade, les cellules NK immatures présentent un défaut fonctionnel caractérisé par l'absence de production d'IFN- $\gamma$  et l'incapacité des cellules à lyser les cibles déficientes en molécules du CMH-I.

Jusqu'à ce stade-là, les cellules peuvent s'engager dans la lignée des cellules NK ou bien se différencier en d'autres types cellulaires dont les LT ou les DC. Les deux derniers stades signent l'entrée définitive des pré-NK dans la lignée des cellules NK.

Le développement des cellules NK est alors marqué par l'acquisition du récepteur inhibiteur CD94/NKG2A, du NKG2D, du CD122, du récepteur activateur NKp46 et des molécules effectrices telles que FasL et les granules de perforine. L'expression du CD56 est également forte. L'acquisition du CD122 est essentielle pour l'engagement dans la lignée NK. Les cellules deviennent dépendantes de l'IL-15 pour poursuivre leur développement (526). A l'inverse, l'expression du CD117, CD127 et du CD33 est réduite. Les cellules n'expriment par ailleurs pas encore ou très peu le CD16 et les récepteurs KIR. Dès ce stade-là, l'expression des ligands des récepteurs à domaine de mort TRAIL et FAS leur permet d'exercer une activité lytique, en combinaison avec les molécules effectrices telles que l'IFN- $\gamma$  et la perforine (527).

Finalement, la dernière étape du développement des NK se caractérise par l'acquisition du CD16 et des KIR ainsi que par la diminution de l'expression du CD94/NKG2A (528). C'est également lors de ces dernières étapes du développement que les cellules NK migrent en périphérie pour se spécialiser et acquérir leurs fonctions effectrices, en exprimant définitivement les molécules effectrices (perforine, granzymes et IFN- $\gamma$ ). Une fois en

périphérie, il est par ailleurs admis que les cellules NK CD56<sup>bright</sup> des organes lymphoïdes secondaires sont les précurseurs des cellules NK circulantes, majoritairement CD56<sup>dim</sup> (529,530).



**Figure 30 : Développement des cellules NK.** Au fur et à mesure que les cellules NK progressent du stade 1 au stade 3, elles s'engagent dans la lignée NK et perdent leur capacité de développement en cellules T ou en DC. Aux stades 3 à 5, la maturation des cellules NK se produit ainsi qu'une transition fonctionnelle, de sorte qu'elles peuvent produire du GM-CSF et potentiellement des cytokines de type 2. Au stade 4, les cellules NK CD56<sup>bright</sup> produisent préférentiellement de l'IFN- $\gamma$  alors que les cellules CD56<sup>dim</sup> NK de stade 5 induisent la cytotoxicité cellulaire. L'acquisition du KIR se produit dans les stades 4 et/ou 5 (521).

La maturation des cellules NK fait intervenir de multiples processus physiologiques. Par exemple, pour atteindre une taille optimale de population de cellules NK, le processus de maturation nécessite une sortie optimale des cellules NK de la moelle osseuse et un équilibre finement réglé entre la survie, la prolifération et l'apoptose. L'état fonctionnel des NK dépend également d'un programme de transcription dicté par un large panel de facteurs de transcription.

### b. Education des cellules NK

Après leur développement et leur maturation, les cellules NK subissent également une phase « d'éducation » qui sélectionne les cellules NK utiles et rend anergiques celles potentiellement dangereuses pour l'organisme. L'éducation des cellules NK est tributaire de la signalisation *via* les récepteurs inhibiteurs et activateurs qu'elles expriment à leur surface, capables de reconnaître les molécules du soi. Par exemple, l'interaction entre un récepteur inhibiteur et une molécule du CMH-I du soi constitue un garde-fou et prévient l'activation des cellules NK contre les cellules autologues saines.

Ainsi, en contexte physiologique, les cellules autologues saines expriment les molécules de CMH-I et sont protégées des cellules NK. *A contrario*, il a récemment été décrit que les cellules NK exercent leur activité cytotoxique contre des cellules qui n'expriment pas des molécules CMH-I. En l'absence de liaison de cette molécule à un récepteur inhibiteur, les cellules NK

sont activées et acquièrent leurs fonctions effectrices (508). C'est le modèle du « missing-self » ou « soi manquant » (531). Cependant, certaines cellules de l'organisme, comme les globules rouges, n'expriment pas le CMH-I mais ne sont pas détruites par les cellules NK autologues. Autre exemple, les patients qui souffrent d'un déficit en TAP2 (Transporter 2, ATP Binding Cassette Subfamily B Member), une protéine intervenant dans le transport des peptides, ne peuvent pas exprimer les molécules du CMH-I mais présentent un maintien de la tolérance au soi des cellules NK (532). Ces études suggèrent l'intervention de récepteurs spécifiques et la mise en place de mécanismes de reconnaissance indépendants du CMH-I (532).

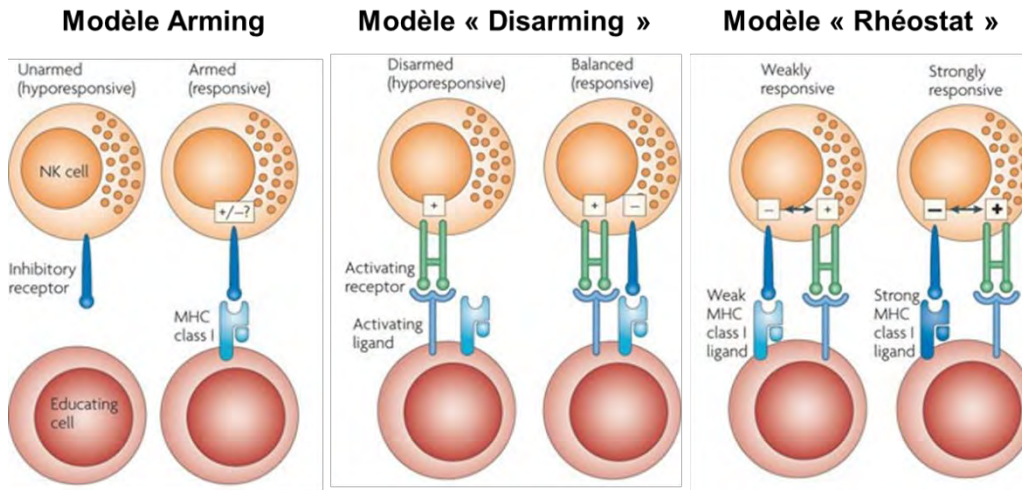
Un autre modèle a été proposé selon lequel les cellules NK expriment au moins un récepteur inhibiteur qui reconnaît le CMH-I du soi et suffit à protéger les cellules de la réactivité des cellules NK (533). Toutefois, certaines cellules NK n'expriment aucun de ces récepteurs inhibiteurs. Elles restent non agressives mais deviennent hypo-fonctionnelles et hypo-réactives avec un potentiel lytique réduit (508,534–536). Elles sont alors appelées « unlicensed ». Cet état « unlicensed » n'est pas associé à un défaut dans la maturité et la fonctionnalité des cellules NK. En effet, après stimulation, elles sont toujours capables de produire de l'IFN- $\gamma$ , montrant un certain niveau de maturité. De plus, les marqueurs phénotypiques de surface ne sont pas altérés, ce qui confirme leur niveau de maturité (508,534). Par opposition, les cellules NK « licensed » sont capables d'entrer en contact avec les molécules du CMH-I et présentent la capacité de réagir à divers signaux, notamment en tuant les cellules cibles. C'est le processus de « licensing » (537,538).

Trois modèles d'éducation des cellules NK sont actuellement proposés (**Figure 31**) :

- Le modèle « arming », selon lequel les cellules NK sont hypo-réactives par défaut. L'engagement d'au moins un récepteur inhibiteur par les molécules du CMH-I est suffisant pour induire les signaux d'éducation, les armer et leur octroyer le droit de tuer. Les cellules NK sont alors compétentes et fonctionnelles. En l'absence de liaison à une molécule de CMH-I, les cellules NK restent anergiques et tolérogènes (537).
- Le modèle « disarming », selon lequel les cellules NK ne sont pas initialement hypo-réactives. Au cours de leur développement, ce modèle suggère que les cellules NK entrent en contact avec les cellules environnantes, en engageant simultanément leurs récepteurs activateurs et inhibiteurs. En l'absence d'interaction avec les récepteurs inhibiteurs et les molécules du CMH-I, les signaux activateurs sont constitutivement transduits dans les cellules NK en développement ce qui conduit à un état d'anergie, qui se traduit par l'hypo-réactivité des cellules NK, qui deviennent « unlicensed » et

tolérantes au soi (539,540). La liaison à une molécule de CMH-I s'oppose à ces signaux et prévient l'anergie des cellules NK excessivement activées (541,542).

- Le modèle du « rhéostat », selon lequel l'amplitude de la réponse des cellules NK dépend du nombre de récepteurs inhibiteurs engagés par le CMH-I ainsi que de l'affinité de chaque récepteur pour son ligand (539,543). Ainsi, plus une cellule exprime de récepteurs inhibiteurs, plus elle sera réactive (544).



**Figure 31 : Modèle d'éducation des cellules NK.** Dans le modèle d'armement, la signalisation par un récepteur inhibiteur conduit à la compétence fonctionnelle des NK ; en l'absence d'armement, la cellule NK reste hypo-réactive. Dans le modèle de désarmement, la cellule NK est activée par défaut ; en l'absence d'un récepteur inhibiteur pour les molécules de CMH-I, la cellule NK devient anergique ou hypo-réactive ; la présence d'un récepteur inhibiteur prévient l'anergie et permet à la NK d'être réactive. Dans le modèle de rhéostat, sur la base de la force du signal inhibiteur, la cellule NK équilibre son seuil d'activation, ce qui favorise une maturation optimale. Adaptée de (545).

### c. Contrôle du développement et de l'éducation des cellules NK

Le développement des cellules NK à partir des progéniteurs est sous contrôle d'une combinaison de divers facteurs de transcription et facteurs solubles sécrétés par les cellules de la moelle osseuse (546,547), qui assurent le choix du lignage et régulent la différenciation des cellules NK ainsi que l'acquisition de leurs fonctions effectrices (548–554).

Un défaut dans la maturation des cellules NK peut être associé à de graves conséquences lors d'infections, notamment virales. Il a effectivement été démontré que les patients présentant une déficience en cellules NK circulantes sont plus susceptibles aux infections virales, notamment contre le VZV, le HCMV, le virus Epstein-Barr (EBV) et le HSV, et ont un risque plus élevé de décès en raison de ces infections (555). De manière similaire, une mutation dans le récepteur à l'IL-15, JAK-3 ou STAT5 chez l'Homme entraîne un défaut dans le développement et la maturation des cellules NK et augmente le risque d'infection virale (555). De plus, les infections

virales chroniques peuvent contribuer à l'épuisement des NK ou à leur dysfonctionnement cellulaire, caractérisé par une diminution de leur nombre et de leur prolifération, de l'activité et de l'expression des récepteurs activateurs, ainsi qu'une augmentation de l'apoptose et de l'expression des récepteurs inhibiteurs (556).

### 1. Implication des facteurs solubles

Il est désormais admis que de multiples cytokines, constituant le microenvironnement local, sont impliquées dans le développement et l'éducation des cellules NK, permettant ainsi leur activation de façon CMH-I indépendante.

Tout d'abord, il a été montré que la préculture des cellules NK avec l'IL-7, le SCF (Stem Cell Factor) et le FLT3L est nécessaire pour leur développement (557). Il est désormais admis que l'IL-7 favorise la survie des cellules NK CD56<sup>bright</sup> en augmentant l'expression de BCL-2 (B-cell Lymphoma 2), un facteur anti-apoptotique (558). De manière similaire, des défauts dans l'expression du SCF réduit la génération de cellules NK à partir de précurseurs hépatiques fœtaux (559). De plus, une déficience en cellules NK a été observée dans la rate de souris déplétées en FLT3L (560). En effet, FLT3L induit non seulement la réactivité de l'IL-15 chez les progéniteurs, mais peut également étendre considérablement les cellules NK en augmentant le nombre de DC présentant l'IL-15, indiquant que le FLT3L est important pour la différenciation précoce de cellules NK ainsi que pour leur expansion (557). Bien que les précurseurs des cellules NK expriment les récepteurs de ces facteurs solubles, leur niveau d'expression est progressivement perdu au cours du processus de maturation des cellules NK. Par ailleurs, l'action de ces médiateurs ne permet pas de promouvoir la cytotoxicité des cellules NK, l'expression des marqueurs d'activation ou encore la production d'IFN- $\gamma$  (558).

Certaines cytokines présentent un rôle déterminant dans l'orientation du développement des cellules NK. Par exemple, bien qu'elle n'intervient pas aux stades les plus précoces, l'IL-15 joue un rôle majeur dans l'homéostasie et la maturation terminale des cellules NK. Elle soutient également la survie des cellules NK matures et favorise leur expansion. Ainsi, il a été démontré que des souris transgéniques pour l'IL-15 ou qui surexpriment cette cytokine, présentent une augmentation du nombre de cellules NK matures (561). Néanmoins, les effets de l'IL-15 sur le développement et la maturation des cellules NK nécessitent une trans-présentation de cette cytokine, notamment par les DC activées (562–565). En l'absence d'expression des récepteurs à l'IL-15, il a été observé une perte complète des cellules NK (566–568).



De manière similaire, l'IL-2 joue un rôle fondamental dans la fonctionnalité des cellules NK. Elle est connue pour amorcer la fonction cytotoxique des cellules NK envers les cellules cancéreuses et pour leur activation en contexte d'infection (564,569). Lorsqu'elle est associée à l'IL-15, l'IL-2 conditionne la différenciation, la prolifération et l'activation des cellules NK. Finalement, la synergie avec l'IL-12 et l'IL-18, sécrétées notamment lors d'infections virales, est essentielle pour une acquisition optimale des fonctions effectrices des cellules NK à savoir la production d'IFN- $\gamma$  et des molécules cytotoxiques (570–574).

A l'inverse, il a été démontré que l'IL-17 régule négativement la maturation et la fonction des cellules NK. La production d'IFN- $\gamma$  et l'activité cytolytique des cellules NK, ainsi que l'activité immunitaire antitumorale et antivirale des cellules NK, sont en effet améliorées chez les souris déficientes en IL-17A (575). Mécaniquement, la signalisation IL-17A supprime la phosphorylation de STAT5 induite par l'IL-15 *via* la régulation positive de SOCS-3, conduisant à l'inhibition de la maturation terminale des cellules NK (575).

De manière similaire, le TGF- $\beta$  est une cytokine immunosuppressive majeure qui participe au contrôle de l'activité des cellules cytotoxiques des cellules NK. La signalisation constitutive du TGF- $\beta$  inhibe en effet la maturation des cellules NK, en maintenant les cellules NK aux stades les moins matures et intermédiaires et en limitant la transition vers le stade de maturité terminale (576). *A contrario* la suppression de la sous-unité du récepteur au TGF- $\beta$  augmente l'activité de mTOR et contribue à l'activation des cellules NK ainsi qu'à l'acquisition de leurs fonctions cytotoxiques, en réponse à l'IL-15 (576).

## 2. Implication des facteurs de transcription

Le développement des cellules NK est également finement régulé par l'activité séquentielle et coordonnée de facteurs de transcription, qui influencent l'acquisition des fonctions effectrices. Par exemple, des facteurs de transcription tels que E4BP4 (E4 promoter Binding Protein 4) et ID2 sont requis pour l'engagement de la lignée cellulaire NK, tandis que les facteurs T-bet, Eomes (Eomesodermine) et Zeb2 sont requis pour la maturation des cellules NK et pour la régulation des fonctions effectrices (577–579). Ces facteurs de transcription favorisent également l'expression de gènes codant pour les molécules effectrices. Ainsi, un défaut dans ces facteurs est généralement associé à une altération dans le développement des cellules NK et dans l'acquisition de leurs fonctions cytotoxiques.

E4BP4 est un facteur de transcription exprimé par les précurseurs des cellules NK (580). Les données de la littérature suggèrent que E4BP4 agit au stade précoce et régule l'engagement des précurseurs dans la lignée cellulaire NK. En effet, dans le modèle murin, une déplétion en E4BP4 est associée à une accumulation des pré-NK dans la moelle osseuse et à une déficience dans la maturation des cellules NK, qui restent à un stade pré-NK et immature, non sensible à l'IL-15 (581,582). Il a également été démontré que E4BP4 régule l'expression d'autres facteurs de transcription, dont ID2 et Eomes, qui interviennent comme régulateurs de transcription dans le processus de développement et de maturation des cellules NK (548,580).

ID2 est exprimé à des niveaux élevés après engagement des précurseurs dans la lignée cellulaire NK et à tous les stades ultérieurs (583). Ce facteur de transcription a été signalé pour la première fois comme jouant un rôle essentiel dans la génération de cellules NK grâce à l'utilisation de souris déficientes en ID2 (584). En effet, la déplétion de ce facteur est associée à une réduction du nombre de cellules NK et une altération dans leur niveau de maturation (548,583). De plus, ID2 supprime un large panel de gènes nécessaires à la maturation des cellules NK ainsi que l'expression de SOCS-3 et participe à la signalisation du récepteur IL-15.

Eomes joue un rôle non redondant dans la prolifération des cellules NK. Chez la souris, il a été démontré qu'une déplétion de ce facteur de transcription entraîne une réduction substantielle du nombre de cellules NK dans la rate et le sang, et dans une moindre mesure dans le foie, les ganglions lymphatiques et la moelle osseuse. Par ailleurs, il est également connu que ce facteur joue un rôle majeur dans la différenciation et la fonctionnalité des cellules NK (578,585).

Tbet est un facteur de transcription principalement exprimé par les cellules T et les cellules NK. Une déplétion en Tbet est associée, chez la souris, à une diminution significative du nombre de cellules NK dans la rate, le foie et le sang périphérique, et à une augmentation dans la moelle osseuse (586). Ces défauts résulteraient d'une altération dans la capacité des cellules NK à sortir de la moelle osseuse. De plus, il a également été observé que les cellules NK déficientes en Tbet expriment des niveaux inférieurs de marqueurs de maturation et des niveaux plus élevés de c-Kit, ce qui reflète l'immaturité des cellules NK (586). Par conséquent, Tbet est essentiel pour la maturation des cellules NK.

Malgré les rôles critiques d'Eomes et de Tbet dans la maturation des cellules NK, la perte de l'un ou l'autre des facteurs de transcription n'altère pas de manière marquée les fonctions effectrices des cellules NK, ce qui confirme que ces facteurs ont un rôle dans la maturation des cellules NK, mais pas dans l'identité des cellules NK.

De plus, il a récemment été démontré que l'expression de certains de ces facteurs de transcription est sous contrôle direct du facteur de transcription Ets-1. Son expression est contrôlée par l'IL-2 et de l'IL-15, qui agissent *via* la voie de signalisation ERK1/2 dans les cellules humaines (587). Ces observations suggèrent qu'Ets-1 est essentiel dans le développement des cellules NK, et participe à la maturation des cellules NK ainsi qu'à l'acquisition de leurs fonctions effectrices (551,588).

Alors que l'IL-15 joue un rôle majeur dans le développement des cellules NK, la fixation à son récepteur induit l'association de JAK-1/3 aux récepteurs de l'IL-2, conduisant à la phosphorylation de STAT3 et STAT5 (589). La voie JAK-1/3-STAT5 a été identifiée comme étant essentielle à la maturation des cellules NK. En effet, la délétion de JAK1 ou STAT5 entraîne une réduction marquée des niveaux de cellules NK, ainsi qu'une inhibition de leur maturation aussi bien dans la moelle osseuse qu'en périphérie (590,591). Une mutation dans STAT5 est également associée à un défaut de maturation des cellules NK humaines et une altération de la fonction lytique (592). Ces observations indiquent que la voie JAK-1/3-STAT5 est critique pour la maturation des cellules NK.

Finalement, d'autres facteurs de transcription comme Hélios, KLF4 (Krüppel-Like Factor 4), SMAD3/4, GATA3 (Gata Binding Protein 3), TOX, Zeb2 ou encore FOXO1 (Forkhead box protein O1) ont également été décrits comme essentiels dans la régulation de la différenciation et des fonctions effectrices des cellules NK (550,552-554).

### 3. Implication des mi-ARN

Plusieurs études ont également révélé que les mi-ARN sont importants dans la régulation des processus fondamentaux tels que l'activation, la cytotoxicité, la prolifération, le développement et la maturation des cellules NK en ciblant les récepteurs ou les facteurs impliqués dans l'expression transcriptionnelle (593-596). Ainsi, il a été démontré que les cellules NK expriment de nombreux mi-ARN (>300) (597,598). Aussi, une déficience dans la synthèse des mi-ARN est associée à des anomalies dans le développement des cellules NK (593,595).

Par exemple, il a été montré qu'une déficience en miR-150, qui cible le facteur pro-survie et pro-prolifératif c-Myb, cause une diminution du nombre de cellules NK matures en périphérie (599). Des études antérieures ont révélé que le miR-150 conditionne la différenciation des pré-NK en iNK puis en mNK en ciblant le gène c-Myb (599). miR-150 réprime également la voie de signalisation PI3K-AKT et régule à la hausse Bim et p53 afin d'induire l'apoptose cellulaire

des NK et contrôler leur prolifération (600). miR-150 a également été proposé comme régulateur négatif des capacités cytotoxiques des cellules NK, en ciblant spécifiquement la perforine (601).

*A contrario*, miR-155 améliore les fonctions des cellules NK. En particulier, l'IL-2, IL-15 et IL-21 régulent à la hausse ce mi-ARN, qui à son tour, améliore la cytotoxicité des cellules NK (602). miR-155 est également impliqué dans la régulation du seuil d'activation des cellules NK, en régulant les molécules impliquées dans leur activation et la libération d'IFN- $\gamma$  (603). Ce miRNA module en effet l'expression de la phosphatase SHIP-1 (SH2 domain-containing Inositol 5'-Phosphatase-1), en inhibant T-bet/Tim-3, et en diminuant l'activation de plusieurs voies de signalisation impliquant PI3K et NF- $\kappa$ B (604,605).

Finalement, des études réalisées dans des souris déficientes pour les enzymes impliquées dans la synthèse des miRNA (Dicer ou Dcgr8) ont révélé des anomalies dans le développement des cellules NK (593).

#### 4. Implication des autres cellules du système immunitaire

Enfin, d'autres études suggèrent qu'une interaction des cellules NK avec d'autres cellules du système immunitaire est nécessaire pour assurer leur développement et l'activation de leurs fonctions.

##### *i. Les cellules dendritiques*

Les DC sont les principales cellules présentatrices du système immunitaire. Première ligne du système immunitaire, elles jouent un rôle de sentinelle nécessaire à l'initiation et la régulation des réponses immunitaires innées et adaptatives. La production de cytokines leur permet de participer à l'inflammation et de contribuer à la maturation des lymphocytes B et l'orientation des lymphocytes T naïfs vers un profil mature et fonctionnel. Des données plus récentes suggèrent que les DC interagissent aussi avec les cellules NK (606).

L'activation des cellules NK par les DC nécessite l'engagement de molécules de surface telles que le CD40L, NKG2D, NKp46 ou CD28 chez les NK et le CD40, MICA/B et les molécules de la famille B7 chez les DC (607,608). De plus, les DC activées produisent un large panel de cytokines, dont l'IFN-I, l'IL-12, l'IL-2 et l'IL-18, qui contribuent à l'activation des cellules NK et soutiennent l'acquisition de leurs fonctions effectrices (609–613). L'IL-2 favorise la sécrétion d'IFN- $\gamma$  et la prolifération des cellules NK tandis que les IFN-I contribuent à l'amélioration de leur cytotoxicité (614,615). Les DC sont également de grandes productrices

d'IL-15, cytokine majeure dans le maintien et la survie des cellules NK (616–618). De plus, les DC activées soutiennent la sécrétion d'IFN- $\gamma$  et de TNF- $\alpha$ , constituant ainsi une boucle auto-amplificatrice de la réponse immune (501,619).

### *ii. Les lymphocytes*

D'une manière similaire aux DC, il a été montré qu'un rétrocontrôle est mis en place par les lymphocytes. En effet, les LT, notamment régulateurs (Treg), influencent également l'activation des cellules NK. Le TGF- $\beta$  membranaire, exprimé sur les Treg, permet tout d'abord d'inhiber les NK lors d'un contact cellulaire. Ces cellules participent également à la déprivation en IL-2, nécessaire aux NK, en inhibant sa production par les LT CD4<sup>+</sup> ou en entrant en compétition avec les cellules NK (620).

### *iii. Les macrophages*

Les macrophages sont des cellules de l'immunité innée qui participent au nettoyage des débris cellulaires (apoptotique et nécrotique) par leur propriété de phagocytose. Ils produisent un large panel de cytokines immunomodulatrices (IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  et TGF- $\beta$ 1), qui contribuent à la réponse antibactérienne et influencent l'activation des lymphocytes T mémoires.

Il a été récemment démontré que les macrophages interagissent aussi avec les cellules NK. Lors du processus de remodelage des artères spiralées, il a été démontré que les macrophages inhibent la cytotoxicité des cellules dNK *via* un mécanisme TGF- $\beta$ 1 dépendant (621). Le cross-talk macrophage-dNK est donc associé à un rétrocontrôle de la fonction des dNK, et notamment de leur potentiel cytotoxique. Néanmoins, d'autres études suggèrent que l'interaction des cellules NK avec des macrophages non polarisés ou polarisés entraîne des résultats différents dans la fonctionnalité de ces cellules (622). Vacca *et al.* ont par exemple démontré que l'interaction des cellules dNK avec des cellules CD14<sup>+</sup> conduit à la production d'INF- $\gamma$ , qui régule l'IDO dans les cellules CD14<sup>+</sup> (623). De plus, les macrophages déciduaux sont des régulateurs importants des cellules dNK, en produisant de l'IL-15, qui contribue à la différenciation des cellules dNK quiescentes en cellules activées (624).

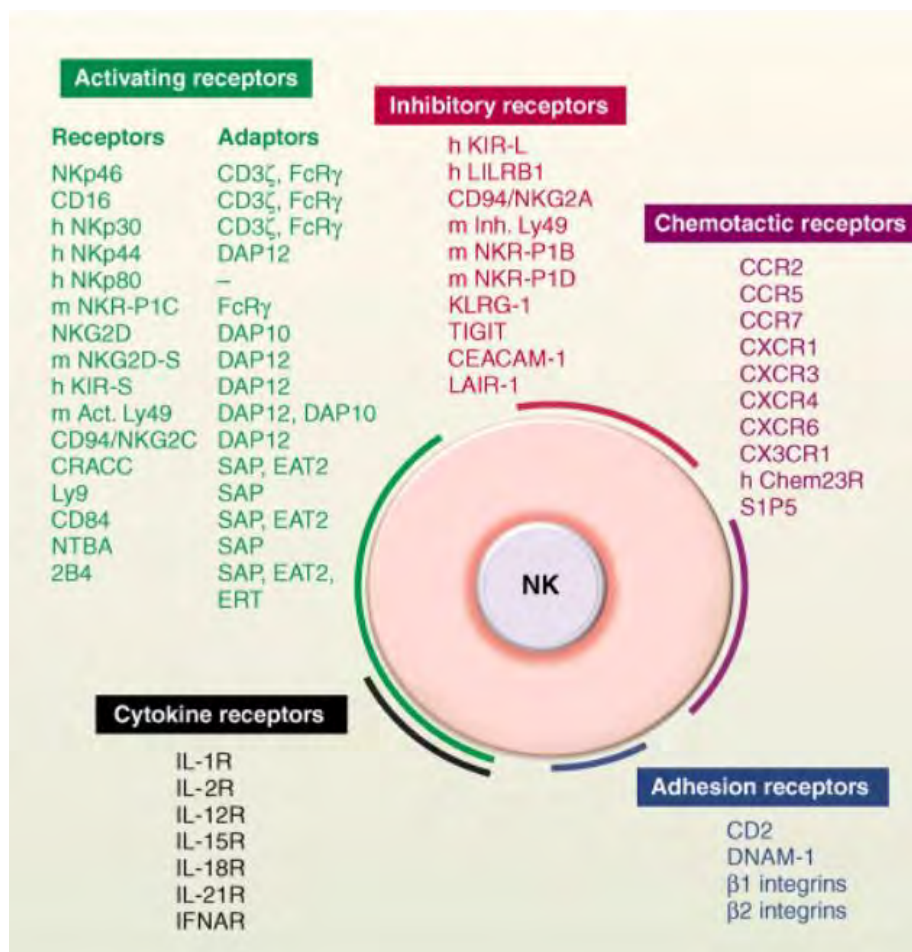
Finalement, les cellules NK interagissent de manière bidirectionnelle avec d'autres cellules du système immunitaire, dont les neutrophiles et les éosinophiles. Une étude a démontré qu'un contact cellule NK-neutrophile est important pour que les NK deviennent fonctionnelles (625).

### *C. Récepteurs des cellules NK, leurs ligands et les voies de signalisation*

La réactivité des cellules NK est régie par la diversité des récepteurs activateurs et inhibiteurs qu'elles expriment à leur surface (NKR). Ce répertoire complexe de récepteurs permet une régulation fine de l'activation et/ou de l'inhibition de la fonction des cellules NK, afin qu'elles puissent protéger l'hôte quand c'est nécessaire, tout en évitant une sur-activation potentiellement délétère (626,627).

C'est la combinaison des signaux activateurs et inhibiteurs des récepteurs de surface cellulaire qui détermine si les cellules NK vont tuer ou non les cellules cibles et/ou produire des cytokines pendant leur phase effectrice d'activation (626,627). Alors que les récepteurs activateurs peuvent transmettre des signaux plus ou moins forts, il est admis que les signaux émis par les récepteurs inhibiteurs sont dominants et bloquent les signaux activateurs (628). Ces signaux peuvent également agir en synergie ou n'avoir que très peu d'effets sur les niveaux d'activation des cellules NK.

Les récepteurs des cellules NK appartiennent soit à la superfamille des immunoglobulines, soit à celle des lectines de type C (629). Les cellules NK expriment également des récepteurs à diverses cytokines et chimiokines ainsi que des récepteurs à certains signaux de dangers (630) (**Figure 32**).



**Figure 32 : Les récepteurs des cellules NK.** Les cellules NK expriment de nombreux récepteurs de surface cellulaire qui peuvent être regroupés en récepteurs activateurs (vert), inhibiteurs (rouge), d'adhésion (bleu), de cytokines (noir) ou de chimiokines (violet). En plus des récepteurs spécifiques du CMH-I, d'autres récepteurs inhibiteurs des cellules NK spécifiques des ligands non-CMH régulent également la réactivité des cellules NK. Les molécules adaptatrices associées aux récepteurs activateurs (vert) sont également indiquées (631).

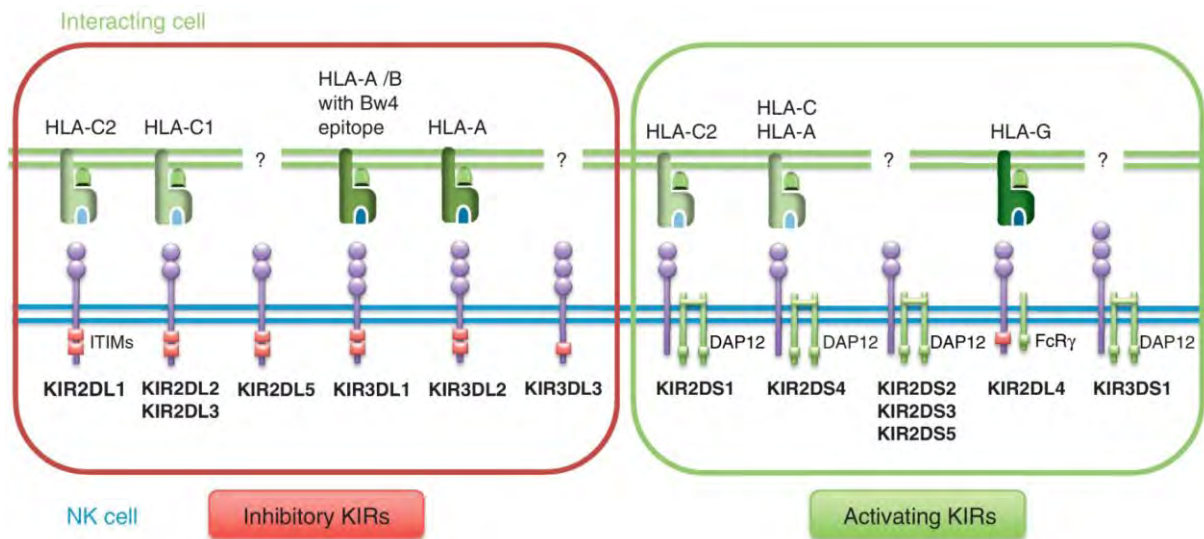
### a. Les récepteurs de la superfamille des immunoglobulines

Cette superfamille comprend les récepteurs KIR, les récepteurs « leucocyte immunoglobulin-like » ou « immunoglobulin like transcripts » (LILRs/ ILTs), les récepteurs de cytotoxicité naturelle (NCR), le récepteur DNAM-1 et les récepteurs au fragment Fc des immunoglobulines Fc $\gamma$ RIIIa (ou CD16).

#### 1. Les récepteurs KIR

Les KIR sont des glycoprotéines transmembranaires exprimées surtout sur les cellules NK CD56<sup>dim</sup> (Figure 33). Ils sont classés en fonction de la longueur de leur domaine intracytoplasmique, qui peut être long (L) ou court (S), et du nombre de domaines Ig dans leur région extracellulaire (2 ou 3) (632). La taille de la région intracellulaire définit par ailleurs si le récepteur est activateur ou inhibiteur. Ainsi, les KIR-L comprennent un domaine

intracellulaire contenant des motifs ITIM (Immunoreceptor Tyrosine-based Inhibitory Motif), qui leur confèrent une activité inhibitrice (633). *A contrario*, les KIR-S ne possèdent pas de motifs ITIM mais présentent la capacité de se lier à un adaptateur, DAP12, porteur d'un motif ITAM (Immunoreceptor Tyrosinebased Activation Motif) (634,635). C'est ce dernier qui permet aux récepteurs KIR-S, dont les NCR, d'être activateurs. Néanmoins, il est admis que certains récepteurs n'ont pas besoin d'adaptateurs pour la transduction du signal.



Current Opinion in Immunology

**Figure 33 : Les récepteurs KIR et leurs ligands.** La famille KIR comprend des récepteurs inhibiteurs, à longue queue cytoplasmique contenant des ITIM, et des récepteurs activateurs qui s'associent à des molécules adaptatrices activatrices (DAP12 ou FcR $\gamma$ ). Par exemple, les KIR2DL1/2/3 sont des récepteurs inhibiteurs exprimant des ITIM, qui se lient au HLA-C exprimés sur les cellules EVT. KIR2DS1 interagit également avec HLA-C et s'active en aval par combinaison avec un adaptateur activateur DAP12. KIR2DL4, qui présente les caractéristiques d'un récepteur activateur et inhibiteur, reconnaît le HLA-G, tout comme le récepteur LILRB1. Les cellules NK expriment également les NKG2, qui forment un hétérodimère avec le CD94 et reconnaissent le ligand HLA-E. Alors que le NKG2A/CD94 est un récepteur inhibiteur, le NKG2C/E, associé au DAP12, est un récepteur activateur. Adaptée de (636).

## 2. Les LILR/ILT

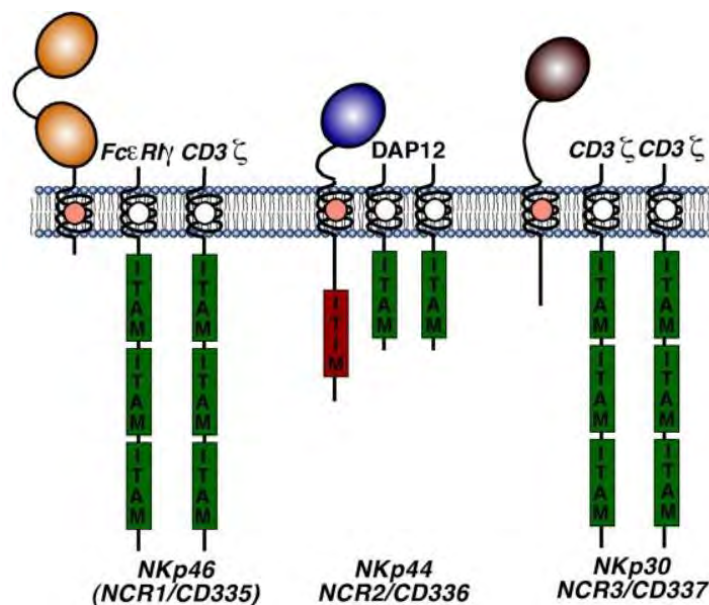
Les LILR, ou CD85, partagent des homologies structurales avec les KIR (637). De manière similaire aux KIR, les LILR peuvent être activateurs, avec des régions intracellulaires courtes, ou inhibiteurs, avec des régions intracellulaires longues (638). Bien que de nombreux membres de cette famille sont exprimés par les cellules NK en contexte d'inflammation (639), ILT2 (ou LILRB1) est le récepteur inhibiteur principalement exprimé par les cellules NK CD56<sup>dim</sup>. Son activation induit un signal inhibiteur qui bloque la réorganisation du cytosquelette d'actine et inhibe la polarisation des granules lytiques ainsi que la sécrétion d'IFN- $\gamma$  (640,641).



Les LILR se lient avec une faible affinité à presque toutes les molécules du CMH-I classiques (A, B et C) mais également non classiques (E, F et G) (638). Il est aussi capable de reconnaître avec une très forte affinité des protéines virales présentant des homologies avec les molécules de CMH-I, telles que la protéine UL-18 produite par le CMV (642,643).

### 3. Les NCR

A ce jour, la famille des NCR comporte trois membres : NKp46, NKp44 et NKp30 (644–647) (**Figure 34**). Alors que NKp46 et NKp30 sont exprimés constitutivement par les cellules NK, NKp44 n'est détecté qu'après activation préalable (648,649). L'ensemble de ces récepteurs existe sous différentes isoformes qui peuvent conférer aux divers récepteurs des fonctions très différentes (650). Leur niveau d'expression reste important dans la transmission de signaux activateurs et dans la régulation des fonctions des cellules NK après engagement par leurs ligands. Il est en effet étroitement lié à leur potentiel cytotoxique (651). Par exemple, un faible niveau d'expression des NCR est associé à une résistance des cellules tumorales à la lyse par les cellules NK chez des patients leucémiques (652). La signalisation par ces récepteurs passe finalement par l'association avec les protéines adaptatrices CD3 $\zeta$  et Fc $\epsilon$ RI $\gamma$  pour les NKp30 et NKp46 et DAP12 pour le NKp44 (653,654).

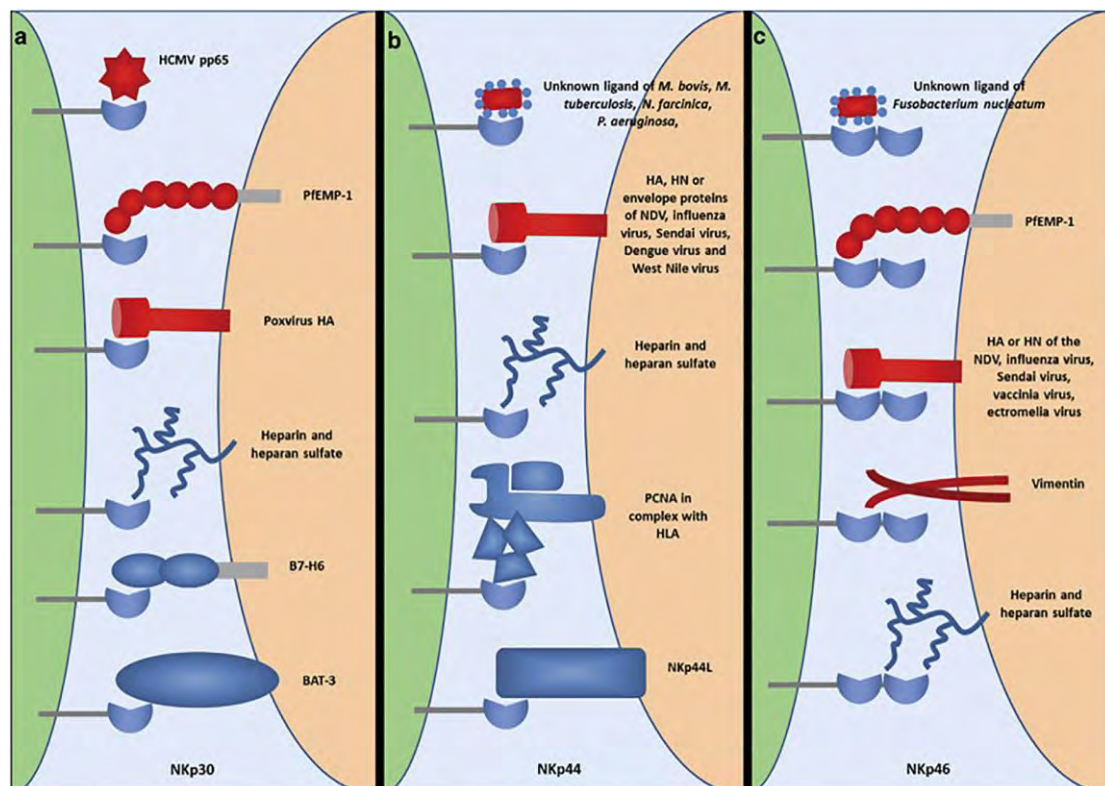


**Figure 34 : Structure des Récepteurs de Cytotoxicité Naturelle.** Schématisation représentative des structures moléculaires du NKp46, NKp30 et NKp44. Y est montré la présence des domaines extracellulaires et leur nombre et le type de molécules adaptatrices recrutées. ITAM, motif d'activation basé sur la tyrosine des immunorécepteurs ; ITIM, motif d'inhibition basé sur la tyrosine des immunorécepteurs (655).

Les ligands des NCR n'ont à ce jour que partiellement été identifiés (**Figure 35**). Le facteur P du complément a été récemment identifié comme le ligand de NKp46 (656). NKp44 peut quant

à lui reconnaître des protéines exprimées à la surface des cellules transformées à savoir PCNA (Proliferating Cell Nuclear Antigen) et MLL5 (Mixed-Lineage Leukemia-5) (657,658), qui induisent des réponses opposées après fixation à leur récepteur. NKp44 peut également interagir avec le PDGF-DD (Platelet-Derived Growth Factor-DD), un facteur sécrété par les tumeurs (659). Finalement, il est connu que NKp30 reconnaît les protéines d'origine tumorale B7-H6 et BAT3 (660,661).

Les NCR peuvent également reconnaître les molécules du « non-soi » induites lors d'infections virales (662–664). Ainsi, NKp46 et NKp30 reconnaissent l'hémagglutinine des Poxvirus (665). Cette reconnaissance, qui active les fonctions effectrices des cellules NK, peut aussi constituer un nouveau mécanisme d'évasion virale. En effet, la liaison des glycoprotéines d'enveloppe des virus ou des hémagglutinines à leur récepteur constitue un mécanisme d'évasion virale (666). Autre exemple, NKp30 est également capable de reconnaître la protéine pp65 du HCMV, qui inhibe la fonction des cellules NK (667).



**Figure 35 : Interactions des NCR avec leurs ligands connus.** Les différents ligands de NKp30 (a), NKp44 (b) et NKp46 (c) sont montrés. Les ligands cellulaires sont représentés en bleu et les ligands dérivés de pathogènes sont représentés en rouge (647).

#### 4. DNAM-1 (CD226)

DNAM-1 (DNAX Accessory Molecule-1) est une glycoprotéine non spécifique des cellules NK, qui intervient dans leur cytotoxicité et la production de cytokines (668). Pour ce faire, il

agit en synergie avec d'autres récepteurs activateurs tels que CD16, NKp46 ou NKG2D afin de potentialiser leur activation (669,670). Finalement, DNAM-1 est aussi impliqué dans l'éducation et la maturation des cellules NK (671). Il a notamment été montré, dans un modèle d'infection par le Cytomégalo virus murin (MCMV), qu'il est nécessaire à la différenciation des cellules NK (672).

Les ligands de ce récepteur sont les molécules CD112 (PVR, Poliovirus Receptor) et CD155 (Nectine 2), souvent surexprimées par les cellules cancéreuses (673,674).

#### 5. CD16 et Cytotoxicité à médiation Cellulaire Dépendante des anticorps (ADCC)

Les récepteurs humains pour les immunoglobulines (FcγR) sont divisés en trois classes, appelées FcγRI (CD64), FcγRII (CD32) et FcγRIII (CD16) (675). Le CD16 est un récepteur de faible affinité, exprimé par un large panel de cellules immunitaires (676). Son expression dépend des capacités cytotoxiques des cellules qui l'expriment plus ou moins fortement. De plus, ce récepteur existe sous deux isoformes, CD16a et CD16b, différenciellement exprimées chez l'Homme. L'isoforme A est un récepteur transmembranaire, exprimé par les lymphocytes T, les monocytes, les macrophages et les cellules NK. Il est impliqué dans l'ADCC, la phagocytose, l'endocytose et la sécrétion de cytokines. A l'inverse, l'isoforme B est ancrée dans la couche externe de la membrane plasmique des neutrophiles par un motif glycosylphosphatidylinositol (GPI). Ce récepteur est impliqué dans la dégranulation (677).

Les cellules NK expriment majoritairement le CD16a (678,679). Il est constitué de deux domaines Ig extracellulaires, d'une courte queue cytoplasmique et d'un domaine transmembranaire qui permet son association avec les chaînes CD3ζ et FcεRIγ. Ces sous-unités, qui contiennent un motif ITAM (680,681), connectent le récepteur aux voies de transduction intracellulaires, qui coordonnent la réorganisation du cytosquelette d'actine et des microtubules ainsi que l'activation de plusieurs facteurs de transcription (634,680–682). De plus, le CD16 contribue à l'induction de l'ADCC, qui se caractérise par la libération ciblée des granules cytotoxiques et par l'engagement des ligands des récepteurs de mort Fas et TRAIL (683–685). Ce récepteur est également capable d'induire une activité cytotoxique en l'absence d'autres signaux (669).

La liaison du CD16 à ses ligands affecte également la survie et la prolifération des cellules NK (686) et induit la libération de cytokines et de chimiokines, qui favorisent le recrutement et

l'activation des autres cellules immunitaires (682,687–689). À cet égard, l'interféron produit par les cellules NK est un facteur immunorégulateur clé bien reconnu dans l'induction des réponses immunitaires adaptatives en favorisant l'activation des macrophages et des DC, ainsi que la génération des lymphocytes T helper 1 et la réponse des lymphocytes T cytotoxiques (CTL) (690–692).

## b. Récepteurs de la superfamille des Lectines C

Cette superfamille de récepteurs transmembranaires comprend de nombreux membres dont NKG2A, C, E et F ainsi que deux variants (NKG2B et H). NKG2D et CD161 appartiennent aussi à cette famille. Alors que certains de ces récepteurs sont activateurs, d'autres présentent une fonction d'inhibiteur.

### 1. Hétérodimère CD94/NKG2

Cette famille de glycoprotéines transmembranaires comporte sept membres nommés NKG2A, B, C, D, E, F et H. Parmi ces récepteurs, cinq molécules NKG2 (NKG2A, NKG2B, NKG2C, NKG2E et NKG2F) se lient à une chaîne invariante CD94 par des ponts disulfures (693). Cette liaison permet aux NKG2 d'être présents de manière fonctionnelle à la surface des cellules NK.

Le récepteur NKG2A est un récepteur inhibiteur qui possède deux motifs ITIM dans son domaine intracellulaire (694). Bien qu'il soit exprimé majoritairement par les cellules NK de phénotype CD56<sup>bright</sup>, il est aussi trouvé sur les cellules NK CD56<sup>dim</sup>. Les autres récepteurs associés à CD94, dont le NKG2C, sont activateurs. Il est à noter que le NKG2C n'est que faiblement exprimé sur les cellules NK des individus sains (695). En revanche, son expression est fortement augmentée lors d'infections virales (696,697). La particularité des hétérodimères CD94/NKG2 est leur capacité à lier selon une affinité différente de leur ligand. Il est connu que l'hétérodimère CD94/NKG2A se lie plus fortement à ses ligands que le CD94/NKG2C, induisant par conséquent une prédominance des signaux inhibiteurs (698,699).

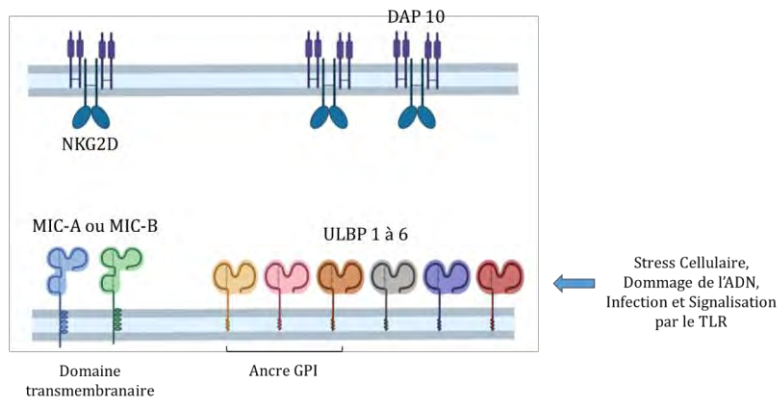
HLA-E, une molécule peu polymorphe du CMH-I non classique, est reconnu comme le ligand majeur de l'hétérodimère CD94/NKG2 (700,701). HLA-E présente des peptides dérivés des molécules HLA-I conventionnelles et de HLA-G (702). Son expression à la surface des cellules cibles est donc dépendante des autres molécules du CMH-I. De plus, certains de ces récepteurs, dont le NKG2C, ne présentent pas de domaine intracellulaire et doivent s'associer à une molécule adaptatrice (DAP12) afin de transmettre les signaux activateurs par le biais des motifs ITAM (703).

## 2. NKG2D

Bien que le NKG2D appartienne à la famille des NKG2, il ne présente que très peu d'homologie avec les autres récepteurs. Les données de la littérature suggèrent qu'il forme un homodimère avec une autre molécule NKG2D par l'intermédiaire de ponts disulfures, plutôt que de s'associer avec le CD94 (704).

Son niveau d'expression, non spécifique des cellules NK, est dépendante du microenvironnement cytokinique. Ainsi, les cytokines pro-inflammatoires telles que l'IL-15, l'IL-2, l'IL-12 ou l'IL-7 induisent son expression (705–707), alors que les cytokines anti-inflammatoires telles que le TGF- $\beta$ , l'IFN- $\beta$ 1 et l'IL-21 l'inhibent (705,708–711).

Le NKG2D reconnaît une large famille de molécules de stress, induites notamment en contexte infectieux ou tumoral (**Figure 36**) (712,713). Ces ligands, peu exprimés en conditions physiologiques, sont induits en réponse à des stress cellulaires qui compromettent l'intégrité de l'ADN (choc thermique, stress oxydatif, irradiation par des rayonnements ultraviolets). Ainsi, NKG2D est capable de se lier aux protéines MIC-A et MIC-B (MHC class I Chain-related A and B) et aux protéines ULBP-1 à 6 (UL16 Binding Protein) (713–717). Après fixation des ligands et recrutement des adaptateurs, le NKG2D participe à l'acquisition des fonctions effectrices des cellules NK et contribue à la survie cellulaire (704).



**Figure 36 : Ligands du récepteur NKG2D.** Les ligands présentent tous des domaines  $\alpha 1\alpha 2$  liés au CMH de classe I. Les protéines MIC-A et MIC-B présentent par ailleurs un domaine supplémentaire  $\alpha 3$ . Les protéines 1 de liaison du cytomégalo virus UL16 (ULBP1), ULBP2 et ULBP3 sont des récepteurs ancrés au GPI. En revanche, MICA, MICB et ULBP4 possèdent des domaines transmembranaires et des queues cytoplasmiques. Les ligands NKG2D sont exprimés à la surface cellulaire à la suite d'un stress cellulaire, tel que la réponse aux dommages à l'ADN, à l'infection et à la suite de la signalisation du récepteur Toll-like (TLR). Adaptée de (718).

## 3. CD161

Le CD161 est un récepteur homodimérique non spécifique des cellules NK, exprimé lors des étapes précoces du développement des cellules NK (719). Bien que certains travaux suggèrent

un rôle activateur (720), CD161 est considéré comme un récepteur inhibiteur (721,722). Lorsqu'il se lie à son ligand LLT1 (Lectin-like Introduction 12 transcript-1), il est notamment impliqué dans les défenses antivirales et anti-tumorales (723).

#### c. Récepteurs aux cytokines, chimiokines et facteurs de croissance

Les cellules NK expriment un large panel d'autres récepteurs, qui participent au processus de développement, de prolifération et de différenciation des cellules NK ainsi qu'à l'acquisition de leurs fonctions effectrices (629). Par exemple, les cellules NK expriment les récepteurs de l'IL-1, IL-2, IL-12, IL-15, IL-18, IL-21 et aux IFN-I, cytokines produites par les autres cellules du système immunitaire. Après liaison de leurs ligands respectifs, ces récepteurs sont impliqués dans la prolifération, la cytotoxicité et la production de cytokines par les cellules NK (629,724,725).

De plus, les cellules NK expriment de nombreux récepteurs aux chimiokines, dont CCR2, CCR5, CCR7, CXCR1, CXCR3, CXCR4, CXCR6, CX3CR1 et S1PR5 (726). Après fixation à leurs ligands, différenciellement exprimés dans les tissus, ces récepteurs permettent la migration des cellules NK vers les sites inflammatoires, les vaisseaux sanguins ou les organes lymphoïdes. La migration des cellules NK nécessite alors l'expression de molécules d'adhésion telles que les sélectines (CD62L) et les intégrines (LFA-1 et ICAM-1) (629).

#### d. Récepteurs aux signaux de danger

Les TLR appartiennent à la famille des récepteurs PRR. Ils reconnaissent des molécules ou protéines PAMP dont l'expression est conservée dans de nombreux micro-organismes, notamment les bactéries ou les parasites.

Ces récepteurs, exprimés par un large panel de cellules immunitaires, contribuent à la mise en place de la réponse innée ainsi qu'à son efficacité. Chez les cellules NK, la présence d'ARNm des TLR 1 à 10 a été reportée mais le nombre de TLR fonctionnels est plus limité (727). Ainsi, il est admis que les cellules NK expriment le TLR2, TLR3, TLR5, TLR7/8 et TLR9 (727,728). Après stimulation par leurs ligands respectifs, les TLR induisent la production de cytokines dont l'IFN- $\gamma$  et le TNF- $\alpha$  (630,728–730). De plus, l'activité cytotoxique et les fonctions effectrices des cellules NK sont accrues. Enfin, leur activation permet par la suite une meilleure stimulation de l'immunité adaptative (630,728).

## e. Autres récepteurs

### 1. CD160

Le CD160 est un récepteur activateur exprimé par les cellules NK, et plus particulièrement par les cellules NK CD56<sup>dim</sup> non activées (731). Après activation des cellules NK, le récepteur subit un clivage protéolytique qui conduit à la diminution de son expression (732). Lorsque ce récepteur interagit avec des molécules de HLA-I classiques et non classiques, telles que le HLA-C et la forme soluble de HLA-G, il participe aux fonctions effectrices des cellules NK (cytotoxicité et production d'IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  et IL-6) (733–735).

### 2. 2B4

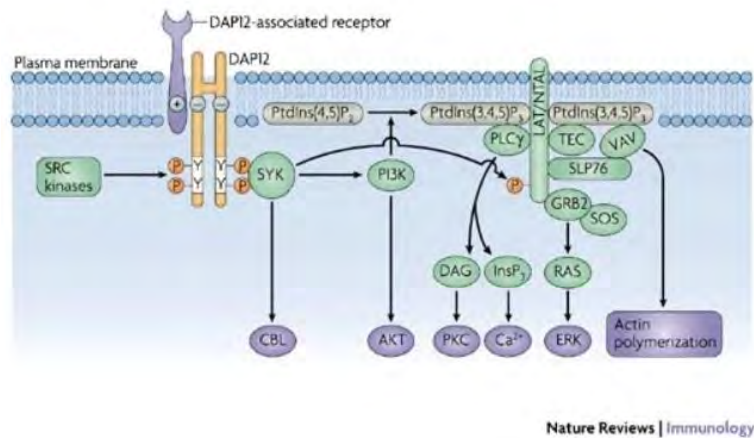
2B4 est un co-récepteur exprimé par les cellules NK (736,737). Tout comme DNAM-1, il n'est pas capable d'induire les fonctions effectrices des cellules NK seul (669). Selon l'adaptateur recruté, ses fonctions sont alors très variables (738). Néanmoins, il est admis qu'après liaison avec son ligand, il induit la prolifération des cellules NK et empêche la lyse des cellules NK (739).

## f. Signalisation après engagement des récepteurs des cellules NK

Après fixation des ligands sur leurs récepteurs respectifs, de nombreuses voies de signalisation sont induites. Les récepteurs activateurs des cellules NK ont une région intracytoplasmique courte qui nécessite, comme indiqué plus haut, le recrutement de protéines adaptatrices transmembranaires qui permettent la transduction du signal. Ces adaptateurs sont le CD3 $\zeta$ , Fc $\epsilon$ RI $\gamma$ , DAP12 et DAP10.

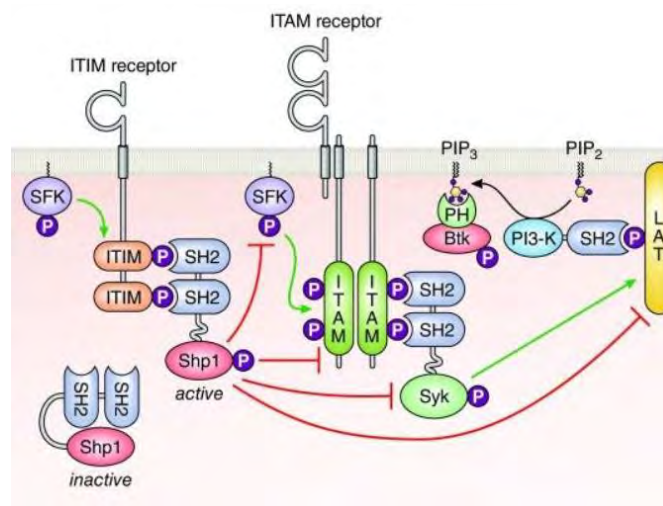
Les molécules adaptatrices CD3 $\zeta$ , Fc $\epsilon$ RI $\gamma$  et DAP12 sont recrutées au niveau du récepteur activateur après engagement par son ligand et permettent la transduction du signal (**Figure 37**). Ces molécules possèdent un ou plusieurs motifs ITAM qui comprennent des tyrosines kinases de la famille Src. Après fixation du ligand, les ITAM sont phosphorylées par les tyrosines kinases ce qui facilite leur liaison au domaine SH2 (SRC Homology 2) des protéines kinases Syk (Spleen Tyrosine Kinase) et de ZAP70 ( $\zeta$  chain-associated protein of 70 kDa) de la famille Syk (740). Syk et ZAP70 vont notamment enclencher deux voies d'activation majeures à savoir la PLC $\gamma$  (Phospholipase C $\gamma$ ) et PI3K (Phosphoinositide 3-Kinase) (741,742). Plusieurs voies sont ensuite induites telles que la voie calcique, des MAPK (Mitogen-Activated Protein Kinases) et PKC $\gamma$  (Protéine Kinase C $\gamma$ ), qui sont respectivement impliquées dans la transcription des gènes codant pour les cytokines, l'activation cellulaire et l'induction de NF-

$\kappa$ B (626,743). En parallèle, PI3K active la voie AKT, qui régule la prolifération et la survie cellulaire. Elle participe également au réarrangement du cytosquelette ainsi qu'à l'acquisition de la cytotoxicité (743,744). La cascade de signalisation initiée par ces kinases déclenche donc la cytotoxicité des cellules NK et la libération des cytokines/chimiokines (745).



**Figure 37 :** Signalisation induite par la molécule adaptatrice DAPI2. De manière analogue à d'autres protéines adaptatrices contenant un motif ITAM, le recrutement de la molécule adaptatrice DAPI2 conduit à la phosphorylation de plusieurs voies de signalisation (746).

A l'inverse, les récepteurs inhibiteurs possèdent une région cytoplasmique plus longue contenant des motifs ITIM phosphorylables, leur permettant d'agir sans le recrutement de molécules adaptatrices (747). Ces motifs ITIM recrutent les phosphatases SHP-1 (SH2 domain-containing Phosphatase-1) ou SHIP-1, qui déphosphorylent les substrats des kinases recrutées par les récepteurs activateurs (**Figure 38**). Les phosphatases bloquent ainsi l'activation des cellules NK en inhibant les fonctions effectrices des cellules NK (748).

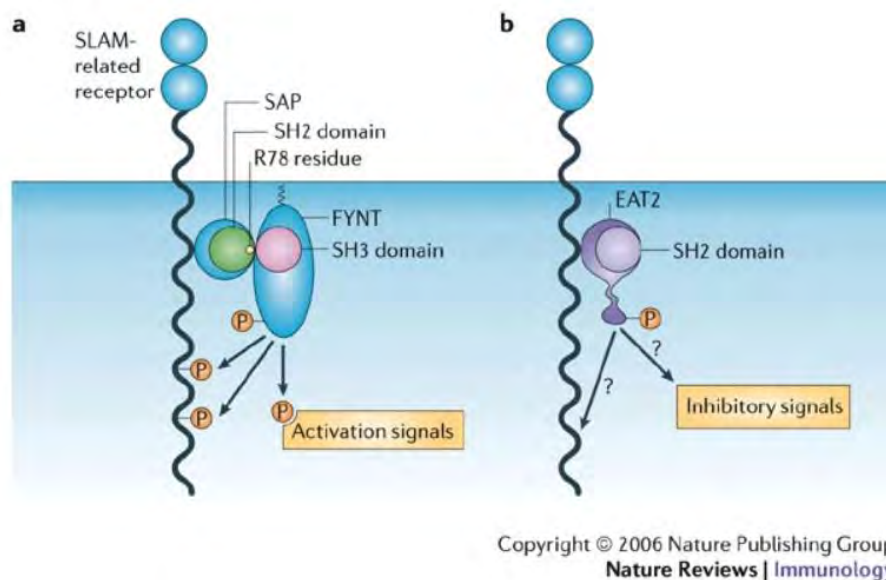


**Figure 38 :** Signalisation inhibitrice médiée par les motifs ITIM. La signalisation des récepteurs contenant des motifs ITAM est inhibée par le recrutement par le motif ITIM des récepteurs inhibiteurs, des phosphatases SHP-1 et SHP-2, contenant le domaine SH2, ou de SHIP-1, contenant le domaine SH2 (749).



Cas particulier, la molécule adaptatrice DAP10, qui n'agit qu'avec le récepteur activateur NKG2D. Après interaction du NKG2D avec ses ligands, DAP10 favorise non seulement la stabilisation de NKG2D à la membrane plasmique mais également l'induction d'une signalisation activatrice (704,750). Après engagement du récepteur, DAP10 est phosphorylé, ce qui permet le recrutement de la PI3K et de l'adaptateur Grb2 et l'activation de PLC $\gamma$  (751,752). Alors que les autres molécules adaptatrices sont impliquées dans la production de cytokines, DAP10 intervient seulement dans l'activation de la fonction cytotoxique des cellules NK (753).

Enfin, le récepteur 2B4 se lie à des molécules adaptatrices spécifiques de la famille SAP (SLAM-associated protein), à savoir SAP et EAT-2 (EWS-FLI1-activated transcript 2) (754,755). Alors que SAP transmet un signal activateur, EAT-2 induit un signal inhibiteur (756). Ainsi, 2B4 peut induire une signalisation activatrice ou inhibitrice en fonction de l'adaptateur recruté (**Figure 39**).



**Figure 39: Signalisation par le co-récepteur 2B4.** La protéine SAP agit en couplant simultanément les récepteurs de la famille SLAM au FYNT. Ce mécanisme est crucial pour la phosphorylation des tyrosines et pour le recrutement des effecteurs en aval. A l'inverse, EAT-2 couple les récepteurs de la famille SLAM à des signaux inhibiteurs *via* les tyrosines C-terminales, qui se phosphorylent (738).

#### D. Fonctions effectrices des cellules NK

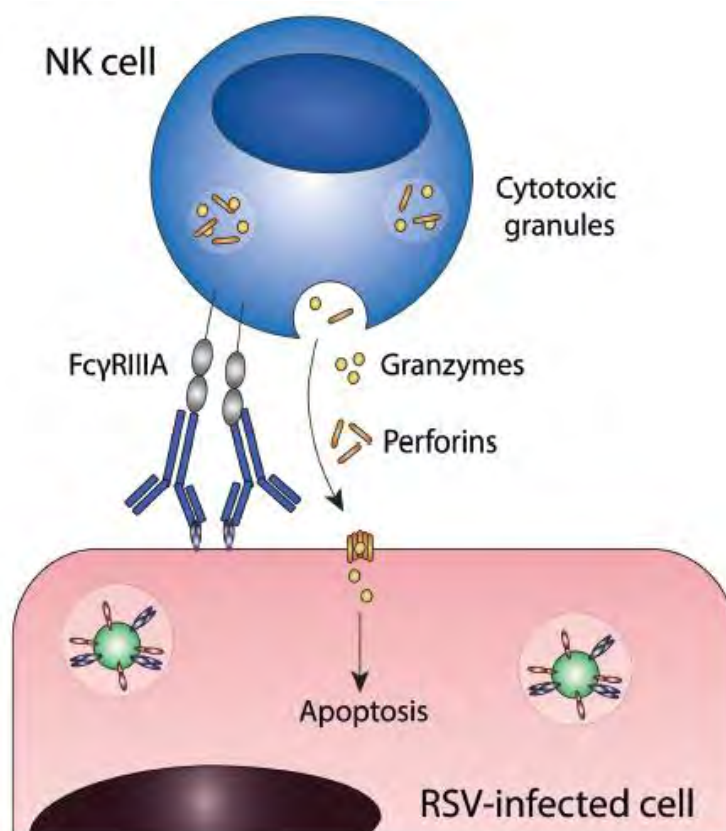
Les cellules NK ont deux grandes fonctions contre les cellules infectées ou tumorales :

- 1) Une fonction cytotoxique ;
- 2) Une fonction sécrétrice de cytokines, chimiokines et facteurs de croissance.

## a. Fonction cytotoxique

### 1. ADCC

L'ADCC est un des mécanismes mis en place lors de la réponse immunitaire innée par de nombreuses cellules effectrices innées dont les neutrophiles, les monocytes et les macrophages. Les cellules NK restent cependant les contributeurs les plus importants à l'ADCC *in vivo* en raison de l'expression du FcγRIIIA. L'ADCC est alors induit lorsque les récepteurs Fc gamma exprimés par les cellules effectrices innées sont engagés par le domaine Fc des anticorps liés aux protéines virales présentes à la surface des cellules infectées par un pathogène (**Figure 40**). Cette interaction induit alors la libération de granules cytotoxiques, contenant des perforines et des granzymes, ce qui conduit à la lyse puis à la mort des cellules cibles infectées (684). De plus, la fixation du fragment Fc par le CD16 induit la sécrétion de cytokines, telles que l'IFN- $\gamma$ , qui participe aussi à l'apoptose des cellules cibles.



**Figure 40 : Cytotoxicité à médiation cellulaire dépendante des anticorps.** Les récepteurs gamma Fc, exprimés par les cellules NK, se lient par le biais d'anticorps aux cellules infectées. Elles induisent alors la mort des cellules cibles par libération de granules cytotoxiques. FcγRIIIA : récepteur Fc gamma IIIA ; RSV : virus respiratoire syncytial (757).

Il est désormais admis que l'ADCC constitue un élément essentiel dans une immunité efficace contre le VIH. En effet, il a été démontré que les personnes infectées par le VIH qui contrôlent

le virus sans traitement antirétroviral présentent une réponse immunitaire humorale polyfonctionnelle plus large, y compris une activité ADCC, par rapport aux individus virémiques (758–760). Les anticorps anti-VIH impliqués dans l'ADCC participent à la protection antivirale induite lors de la vaccination et inhibent la réplication virale (761–763).

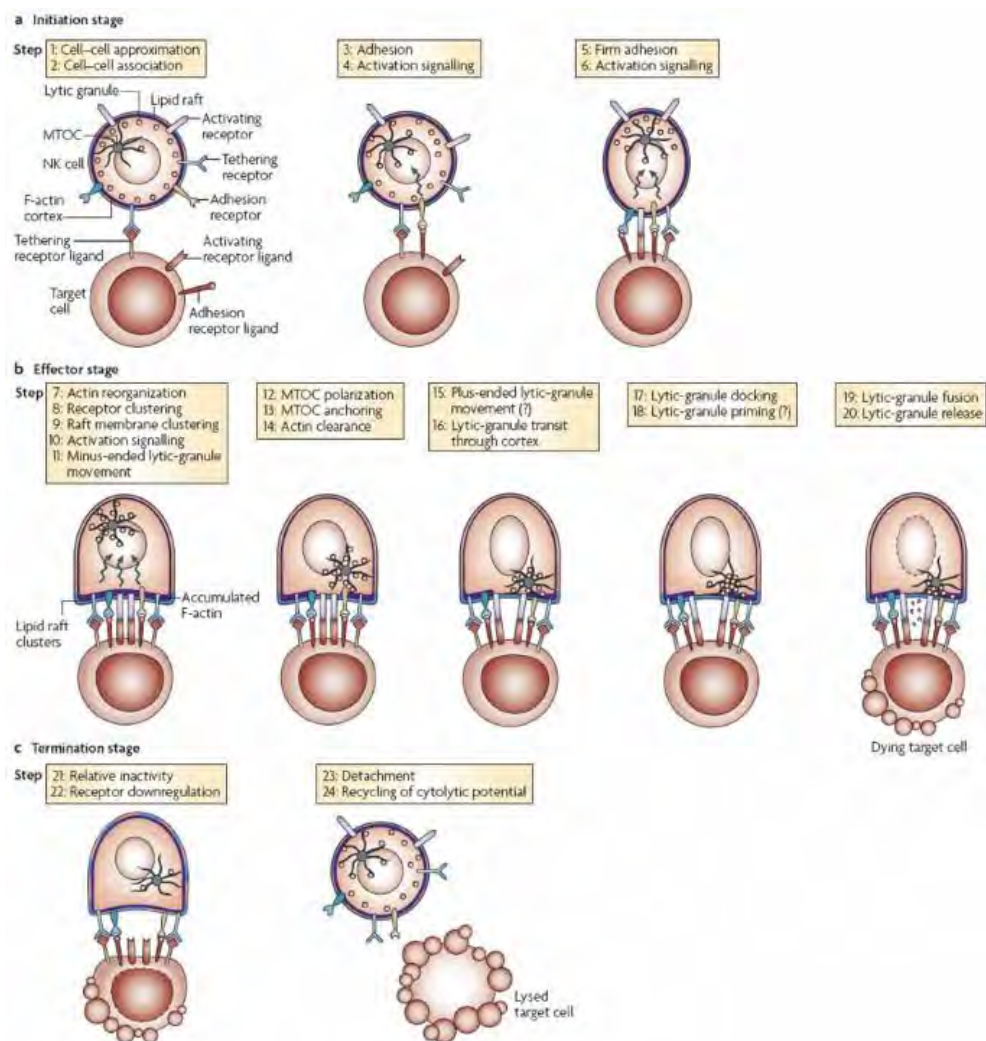
A l'inverse, alors que certaines études soulignent la capacité protectrice des anticorps de l'ADCC lors d'une infection par le virus de la grippe (764–766), certaines recherches tendent à dire que les NK contribueraient à l'exagération de la réponse immunitaire en accentuant l'ADCC et la protection médiée par les anticorps (767,768).

## 2. Synapse immunologique

La synapse immunologique (IS) est une structure dynamique qui permet la reconnaissance des cellules cibles par les cellules NK. Ce processus commence tout d'abord par une étape d'initiation où la cellule NK entre en contact avec la cellule cible *via* un récepteur activateur (**Figure 41**) (769). Cette étape d'adhésion est fondamentale pour la signalisation par les récepteurs activateurs, qui conditionnent le déclenchement des fonctions effectrices des cellules NK (770). Les signaux activateurs induits après adhésion sont par ailleurs renforcés par les molécules d'adhésion recrutées. Par exemple, l'intégrine LFA-1 interagit avec ses ligands, les molécules ICAM-1 ou ICAM-2 (Intercellular Adhesion Molecule-1 et -2) (771,772). Les récepteurs activateurs engagés se clustérisent et un anneau de F-actine se forme pour amplifier le signal. Le complexe de signalisation SMAC (Complexe Supramoléculaire d'Adhésion) se forme (773).

La phase d'adhésion est ensuite suivie d'une étape effectrice, caractérisée par le transport des granules lytiques à la zone de contact avec la cellule cible, où ils seront libérés (**Figure 41**). Lors de cette étape, la cellule NK réorganise son réseau de microtubules et oriente son MTOC (Centre Organisateur des Microtubules) vers la synapse (774). C'est par ce réseau de microtubules que les granules lytiques, contenant les facteurs solubles, sont acheminés au niveau de la synapse. Le désassemblage local du réseau de F-actine et la fusion des vésicules contenant les molécules lytiques à la membrane plasmique permettent la libération des granules dans le milieu (775). La dégranulation des cellules NK est aussi associée à l'externalisation de la protéine lysosomale CD107a (LAMP-A ou Lysosome-Associated Membrane Protein-1), qui permet de protéger les cellules NK contre les effets néfastes de ses propres granules (776). Le CD107a peut donc servir de marqueur pour évaluer l'activité cytotoxique des cellules NK (777).

Après la libération des molécules effectrices, la cellule NK rompt le contact, se sépare de la cellule cible et renouvelle ses granules lytiques (**Figure 41**).



**Figure 41 : Mise en place de la synapse immunologique.** La formation d'une synapse lytique fonctionnelle peut être divisée en trois étapes principales : la phase d'initiation, la phase effectrice et la phase terminale. Chacune de ces étapes est subdivisée en plusieurs étapes. L'étape d'initiation comprend l'adhésion et la signalisation initiale, qui conditionnent l'activation cellulaire. La phase effectrice comprend la réorganisation de l'actine, le regroupement des récepteurs, la polarisation du MTOC et des granules lytiques, et la fusion des granules lytiques avec la membrane plasmique. La phase terminale inclut une période d'inactivité et de détachement. Le temps spécifique nécessaire pour progresser de l'une étape à l'autre varie et est susceptible d'être une caractéristique de la cellule cible donnée et de l'état d'activation de la cellule NK (769).

### 3. Système perforine/granzyme

Les granules lytiques sont des lysosomes sécrétoires dans lesquels sont stockés de grandes quantités de molécules cytotoxiques, à savoir la perforine, les granzymes A et B, la granulysine et les ligands des récepteurs à domaine de mort (778,779). Ces enzymes sont maintenues inactives jusqu'à leur libération à la SI, où le pH des lysosomes change. La perforine est la première protéine à agir. Elle est capable de former des pores, qui permettent l'entrée des

molécules lytiques dans le cytosol des cellules cibles (780,781). Les granzymes (Gzm) sont des protéases exprimées par les lymphocytes cytotoxiques (NK et LT CD8). Les cellules NK humaines expriment majoritairement le GzmA et le GzmB, qui dépendent de la perforine pour exercer leurs fonctions (782).

Le GzmA est une enzyme avec une activité tryptase qui induit une perte du potentiel transmembranaire des mitochondries, ce qui augmente la production de ROS (783,784). Ces ROS induisent des dommages à l'ADN et participent à la fragmentation nucléaire ainsi qu'à la mort de la cellule par apoptose (785). De plus, le GzmA favorise la mise en place d'un microenvironnement pro-inflammatoire en clivant le propeptide de l'IL-1 $\beta$  (786).

De manière similaire, le GzmB augmente la dépolarisation de la membrane mitochondriale et favorise la production de ROS, afin d'induire l'apoptose de la cellule cible (787). Le GzmB induit également l'apoptose par une voie dépendante des caspases 3, 7, 8 et 10 (788). Ces caspases dégradent le cytosquelette cellulaire, fragmentent l'ADN et endommagent les mitochondries (789).

Enfin, la granulysine, spécifiquement exprimée chez l'Homme, est une protéine pro-inflammatoire de la famille des saponines (790,791). Lorsqu'elle rentre dans la cellule cible, la granulysine cause une variation des niveaux de calcium et de potassium, ce qui conduit à des dommages mitochondriaux, à une libération du cytochrome C, associés à l'apoptose et à l'activation des caspases cytoplasmiques (792–794).

#### 4. Les récepteurs de mort cellulaire

En plus de la libération de granules lytiques, la mort des cellules cibles peut être liée à l'expression des ligands des récepteurs à domaine de mort cellulaire. Les granules lytiques des cellules NK matures expriment ainsi constitutivement les ligands FasL et TRAIL, des molécules pro-apoptotiques (795). Au moment de la dégranulation, ils se retrouvent exposés à la surface des cellules NK où leur domaine intracellulaire subit un changement morphologique (796). Cette modification induit le recrutement de FADD (Fas-Associated protein with Death Domain) et de la procaspase 8, qui permettent la formation d'un complexe de signalisation DISC (Death-Inducing Signaling Complex) (797,798). La procaspase 8, activée par clivage, peut induire directement l'apoptose des cellules cibles en activant les autres caspases 3, 6 et 7 et provoquer des dommages aux mitochondries, en stimulant la libération du cytochrome C qui déclenche aussi la voie de l'apoptose (799).

Les cellules NK produisent également du TNF- $\alpha$ , une cytokine pro-inflammatoire, qui induit la mort cellulaire par des mécanismes similaires. Lorsque le TNF- $\alpha$  se fixe sur son récepteur, une réponse pro-inflammatoire est déclenchée ainsi que l'activation cellulaire, par le biais de NF- $\kappa$ B et des JAK (800). Après internalisation, le récepteur intègre le DISC et active la caspase 8 qui déclenche la voie de l'apoptose par la voie des caspases et la voie mitochondriale (801). L'internalisation peut également déclencher la nécrose programmée, ou nécroptose, des cellules cibles (802).

#### **b. Fonction de sécrétion**

Les cellules NK sont capables de sécréter un large panel de cytokines telles que le GM-CSF (Granulocyte Macrophage Colony Stimulating Factor), l'IL-6, l'IL-10 ou encore l'IL-17 (803,804). Ces cytokines permettent tout d'abord l'activation et la maturation des DC, qui contribuent à la mise en place de la réponse immunitaire innée (612,805). Par exemple, les DC matures augmentent l'expression de la molécule de costimulation CD86 et sécrètent de l'IL-12, pour activer et polariser les LT (806,807). De plus, les DC produisent de l'IL-15, qui permet une rétro-activation des cellules NK (616,806).

Lors de la reconnaissance de cellules infectées ou transformées, les NK sécrètent également de l'IFN- $\gamma$  et du TNF- $\alpha$  qui participent à la mise en place d'une réponse immunitaire complète et optimale. La production d'IFN- $\gamma$  agit directement sur la mise en place de la réponse Th1, et l'activation et la polarisation des macrophages (691,808).

Finalement, les cellules NK sécrètent également des chimiokines qui contribuent à leur recrutement sur le site de l'inflammation. Elles produisent notamment du CCL-2, CCL-3, CCL-4, CCL-5, CXCL-8 et CXCL-10 (724,809,810).

#### **c. Fonction de régulation**

Au même titre que les cellules du système immunitaire interagissent avec les cellules NK pour contribuer à leur développement et à l'activation de leurs fonctions, les cellules NK sont capables d'établir un rétrocontrôle qui conditionne la réponse immunitaire innée et adaptative.

Les cellules NK activées produisent du TNF- $\alpha$  et de l'IFN- $\gamma$  qui conditionnent l'expression des molécules d'activation des DC (CD80, CD83, CD86, HLA-DR, CCR7) et la sécrétion d'IL-12, participant ainsi à l'activation et la maturation des DC (612,806). L'activation des DC dépend également d'un contact cellulaire, qui implique la formation d'une IS particulière, qui met en

jeu le CX3CR1, DC-SIGN, LFA-3 chez les DC et ICAM et CX3CL1, chez les NK (617,811,812). D'autres récepteurs sont également impliqués, dont le NKp30, NKp46 et DNAM-1 (813,814). Ce type d'interaction peut alors conduire soit à leur maturation, soit à leur lyse par les cellules NK activées (814,815). La lyse des DC est contournée par les DC matures puisque ces dernières expriment une plus grande quantité de HLA-E, qui en se liant sur son récepteur CD94/NKG2A, réprime les fonctions NK (816). L'élimination des DC immatures contribue à leur homéostasie ainsi qu'à la mise en place d'une réponse immunitaire tolérogène (814,815). Finalement, l'activation des DC par les cellules NK contribue à la présentation croisée des antigènes par les DC et optimise la mise en place d'une réponse immune adaptative efficace, spécifique de l'antigène (817,818).

Les cellules NK régulent les fonctions des LT de deux manières. Tout d'abord, les cellules NK secrètent plusieurs facteurs solubles tel que l'IFN- $\gamma$  et le CXCL-8 qui permettent d'activer et de recruter les lymphocytes T. De plus, les cellules NK participent à la maturation des DC et favorisent la présentation croisée des antigènes, permettant ainsi l'initiation d'une réponse immune adaptative orientée vers un type Th1 sous l'action de l'IFN- $\gamma$  (501,619). Par ailleurs, la production d'IL-10 par les cellules NK est également associée à un phénotype immunosuppresseur dirigé contre les LT CD8<sup>+</sup> (784).

Enfin, les cellules NK exercent un rétrocontrôle négatif, notamment *via* le NKG2D, en tuant les macrophages fortement activés. De cette manière, les cellules NK participent à prévenir les pathologies inflammatoires liées aux macrophages.

### *E. Les cellules NK en contexte d'infections virales*

#### **a. Infections aiguës et chroniques**

Plusieurs exemples viennent illustrer le rôle majeur des cellules NK dans le contrôle des infections virales et dans la lutte antivirale. Il a clairement été démontré que les cellules NK contrôlent efficacement de nombreuses infections virales telles que les virus de la famille des herpès (HCMV, EBV, HSV), le VIH, le VHC (Virus de l'hépatite C) ou encore le virus Influenza (819). Une déplétion ou une absence de cellules NK, qu'elles soient le résultat de mutations génétiques ou de déplétions expérimentales, est associée à une plus grande susceptibilité aux infections virales ainsi qu'au développement de pathologies plus sévères (820–822).

Le modèle de réponse NK contre une infection virale le mieux étudié aujourd'hui est le modèle murin d'infection par le MCMV. Ainsi, il a été décrit que la reconnaissance directe et spécifique de la protéine virale m157 codée par le MCMV est associée à la prolifération des cellules NK, qui contrôlent l'infection par la production d'IFN- $\gamma$  et/ou la lyse des cellules infectées. Chez l'homme, l'infection par le HCMV affecte directement le phénotype des cellules NK. En effet, il a été montré qu'une population de cellules NKG2C<sup>+</sup> est amplifiée en réponse au HCMV et peut représenter jusqu'à 25% des cellules NK (823,824). L'infection est aussi caractérisée par la forte expression du CD57, l'augmentation de l'expression des KIR activateurs et la diminution de l'expression des récepteurs NKG2A, NKp30 et NKp46 (697,824–826).

De manière similaire, lors de l'infection par EBV, il a été montré que la proportion de cellules NK est augmentée dans le sang de patients durant la phase symptomatique (827). L'infection est également associée à une diminution des molécules de HLA-I et à une augmentation des ligands des récepteurs activateurs (828). Aussi, les cellules NK jouent un rôle crucial dans le contrôle du virus de la grippe. La déplétion des cellules NK dans un modèle murin est associée à une létalité plus importante (829). Les récepteurs NKp46 et NKG2D participent activement à la réponse au virus, aussi bien chez l'Homme que chez la souris (608,664). Lors d'une infection par le VIH, les cellules NK participent directement à la lyse des LT CD4<sup>+</sup> infectés *via* la reconnaissance, par le récepteur activateur NKp44, de la protéine gp41 (830). Enfin, les cellules NK semblent également jouer un rôle crucial dans le contrôle de l'infection par le VHC (831–833), le DENV ou de la fièvre jaune (663,834).

Néanmoins, de nombreux mécanismes sont mis en place par les virus afin d'inhiber l'activation des cellules NK. Le virus Influenza peut échapper à la réponse NK en modifiant le profil de glycosylation des hémagglutinines, qui ne sont plus reconnues par le NKp46 (835). En cas d'infection par le VHC ou par le VIH, bien que le nombre de cellules NK augmente, le ratio CD56<sup>bright</sup>/CD56<sup>dim</sup> est profondément altéré et associé à l'émergence d'une population de cellules NK qui exprime plus faiblement le CD56 (836,837). Par ailleurs, les infections virales peuvent être associées à une perte de fonctionnalité des cellules NK. C'est le résultat d'une diminution de l'expression des KIR activateurs et des NCR, et d'une augmentation de l'expression des KIR et des récepteurs inhibiteurs, associés à une diminution de la sécrétion d'IFN- $\gamma$ , de TNF- $\alpha$  et de GM-CSF (838). Par exemple, une infection par les virus de la famille des *Herpesviridae* est associée à une diminution de l'expression de ligands de NKG2D à la surface des cellules infectées. L'inhibition de la reconnaissance du soi par les NK et de l'acquisition de leurs fonctions effectrices constitue un mécanisme courant d'immuno-évasion



utilisé par les virus (839,840). Les infections virales sont en effet caractérisées par une augmentation de l'expression des ligands des récepteurs inhibiteurs et activateurs.

Finalement, il a été observé que les infections virales sont associées à l'expression d'homologues des molécules du CMH-I codées par les virus, à la modulation de l'expression des molécules du CMH-I par des protéines virales, à la production de protéines virales se liant aux cytokines ou encore à la production d'antagonistes (chimiokines virales) se liant aux récepteurs des cytokines. Le virus peut également avoir un effet direct sur les cellules NK.

#### **b. Adaptation et mémoire des cellules NK**

Alors qu'il a longtemps été considéré que les cellules NK appartenaient à l'immunité innée, des études plus récentes ont ébranlé ce postulat en attribuant des fonctions adaptatives aux cellules NK.

La première preuve de l'existence des fonctions adaptatives des cellules NK a été révélée dans un modèle murin. Après infection par le MCMV, les cellules NK murines acquièrent des traits d'immunité adaptative tels que l'expansion de sous-ensembles de cellules NK spécifiques du virus et des réponses secondaires de longue durée améliorées, y compris une protection optimisée contre le MCMV (697,823–826). Ces cellules NK, préalablement sensibilisées, peuvent exercer une mémoire spécifique de l'antigène d'une manière indépendante des cellules T/B (841). Aussi, il a été démontré que des souris déficientes en cellules T et B peuvent quand même acquérir une réponse mémoire spécifique de l'antigène. Le support de cette mémoire immunitaire serait une sous-population de cellules NK hépatiques, qui peuvent développer une réponse mémoire dirigée contre les antigènes de plusieurs virus dont le virus Influenza ou le VIH (841,842). La réponse NK mémoire hépatique serait cependant dépendante du récepteur CXCR6, exprimé par une grande majorité de cellules NK (495,843).

De manière similaire, une population de cellules mémoires a également été caractérisée chez la souris dans un modèle d'infection par le ZIKV (844). Ces cellules expriment fortement le CD27 et présentent des caractéristiques similaires aux cellules souches. Elles ont par ailleurs un plus grand potentiel antiviral que les cellules NK CD27<sup>-</sup> ou CD27<sup>+</sup> naïves lorsqu'elles sont transférées à des souris infectées par le ZIKV.

L'ensemble de ces études suggèrent que les cellules NK « mémoires » chez la souris ressemblent à la mémoire immunologique classique et spécifique à l'antigène des cellules T et B, avec des phases d'expansion et de contraction (845–847). De plus, un transfert de cette

population dans des souris non immunisées permet une réponse plus importante et plus efficace après re-stimulation.

Les récepteurs d'activation participent également à l'induction d'une fonctionnalité de type mémoire des cellules NK. Ainsi, l'engagement du récepteur murin Ly49H médie l'expansion des cellules NK mémoires spécifiques et durables (495). Chez l'Homme, une population de cellules NK mémoires spécifiques du HCMV a également été identifiée chez les patients ayant des antécédents d'infection par le HCMV. Des cellules NK « adaptatives », qui expriment fortement le récepteur activateur NKG2C, sont largement amplifiées durant l'infection par le HCMV et participent au contrôle de l'infection (823,825,826). Le rôle des cellules NK mémoires a également été démontré dans de nombreuses autres infections (848).

Le microenvironnement joue également un rôle majeur dans la mise en place de la réponse NK mémoire (849–851). Cooper *et al.* ont démontré que les cellules NK de souris pré-activées avec un cocktail de cytokines IL-12, IL-15 et IL-18 persistent davantage dans le modèle murin. De plus, ces NK produisent des niveaux plus élevés d'IFN- $\gamma$  lors de la re-stimulation *ex vivo* par rapport aux cellules NK témoins (850,851). Après transfert, les cellules NK pré-activées montrent également une réponse antitumorale plus robuste et de plus longue durée (852,853). Chez l'Homme, la pré-activation de cellules NK humaines avec le cocktail IL-12/18/15 confère une fonctionnalité de type mémoire après une remise en culture *in vitro* dans l'IL-15 ou l'IL-2 pendant plusieurs jours. La re-stimulation est également associée à une production plus importante d'IFN- $\gamma$  (851,852,854) et à une cytotoxicité indépendante des anticorps plus puissante que les cellules NK seulement activées par l'IL-15 (855). Cette différence dans la fonctionnalité des cellules NK pré-stimulées ou non pourrait être expliquée par la réduction de l'expression inhibitrice des KIR (856).

En plus d'être représentées en grand nombre dans la circulation, les cellules NK peuvent résider dans certains tissus périphériques, tels que le foie, les poumons et la peau. Ce sont les cellules NK résidentes (trNK). Elles sont également trouvées dans l'utérus, où elles varient en nombre à chaque cycle et lors de la grossesse.

### III. Les cellules NK déciduales

Lors de la grossesse, la *decidua basalis* est composée de cellules stromales, de cellules endothéliales et de cellules épithéliales. Ce tissu est également enrichi en cellules immunitaires qui représentent jusqu'à 40% des cellules totales déciduales (67,857). L'ensemble de ces

cellules immunitaires est recruté par des chimiokines produites par des DSC et les trophoblastes qui composent l'interface mère-fœtus (858–862).

Parmi les populations immunes, on retrouve une large proportion de cellules NK déciduales (dNK), qui représentent près de 70% du total des leucocytes tissulaires (66,857,863). Outre les cellules dNK, d'autres ILC se trouvent au lit d'implantation, y compris un sous-ensemble d'ILC1 non-NK, ainsi que des ILC3 NCR<sup>+</sup> et NCR<sup>-</sup> (519,864,865). Ces ILC déciduales partagent des similitudes avec les ILC tissulaires. En effet, lors d'une stimulation *in vitro*, les ILC1 déciduales sont capables de produire de l'IFN- $\gamma$  alors que les ILC3 NCR<sup>+</sup> produisent de l'IL-22 et de l'IL-8 et les ILC3 NCR<sup>-</sup> sécrètent du TNF- $\alpha$  et de l'IL-17 (864,865). Leur rôle fonctionnel exact lors de la grossesse reste encore obscur.

D'autres cellules immunes sont présentes au niveau du tissu décidual maternel, à savoir des macrophages CD14<sup>pos</sup>, des cellules dendritiques et des cellules T, qui représentent respectivement ~20% et ~5 à 10% des leucocytes totaux. La muqueuse utérine du premier trimestre de grossesse contient également une petite fraction de cellules T invariantes associées à la muqueuse, ou cellules MAIT (866). *A contrario*, il est observé une quasi-absence de cellules B ou de plasmocytes, ce qui assure l'invasion des EVT, sans intervention de la réponse anticorps (867–870).

#### A. Origine et développement des cellules dNK

Bien que l'origine des cellules dNK reste encore aujourd'hui un sujet à controverse, de nombreuses hypothèses ont été avancées pour expliquer leur origine et leur développement (871).

La découverte de précurseurs hématopoïétiques utérins CD34<sup>+</sup> dans la decidua maternelle, suggère tout d'abord que les cellules dNK proviennent de progéniteurs CD34<sup>+</sup> locaux auto-renouvelés (872). Cette perspective est soutenue par la capacité de ces progéniteurs CD34<sup>+</sup> de la decidua à se différencier en précurseurs de type dNK, en présence de DSC épithéliales et dans un microenvironnement enrichi en IL-15 (624,871,872).

La deuxième explication possible serait que les cellules dNK proviennent de précurseurs NK immatures de l'utérus (624). Une population hétérogène de précurseurs de cellules NK CD34<sup>neg</sup> CD117<sup>pos</sup> CD94<sup>neg</sup> est en effet présente dans la muqueuse utérine (873). Cette population pourrait être recrutée à la périphérie et se différencier en cellules dNK distinctes sous l'effet du microenvironnement (871,873).

Enfin, les cellules dNK pourraient provenir de cellules NK du sang (pNK), recrutées depuis la périphérie par chimiotaxie (860–862). Cette dernière hypothèse est étayée par une double argumentation. Tout d’abord, les cellules déciduales et les EVT invasifs produisent de grandes quantités de facteurs solubles, y compris CXCL-10, CXCL-12, CCL-2, CXCL-8, CX3CL-1 et IL-15 (858–862). Ces divers chémoattractants pourraient favoriser le recrutement des pNK vers le lit d’implantation. Ensuite, les dNK proviendraient de la conversion des pNK, sous l’effet du microenvironnement décidual. Il a été démontré que le TGF- $\beta$  peut convertir les cellules pNK CD16<sup>+</sup> en cellules CD16<sup>-</sup> (874). De manière similaire, il est connu que les pNK peuvent être converties par un cocktail d’IL-15, IL-18 et TGF- $\beta$ , enrichi dans l’environnement décidual (874–876). Aujourd’hui, il est indéniablement admis que la pression du microenvironnement au sein de la decidua conditionne l’éducation et la génération de cellules dNK avec des caractéristiques phénotypiques et fonctionnelles uniques, à savoir une grande capacité à produire un large panel de facteurs solubles et une fonction cytotoxique finement régulée, qui sont toutes deux nécessaires pour une grossesse réussie.

### *B. Caractéristiques phénotypiques des cellules dNK*

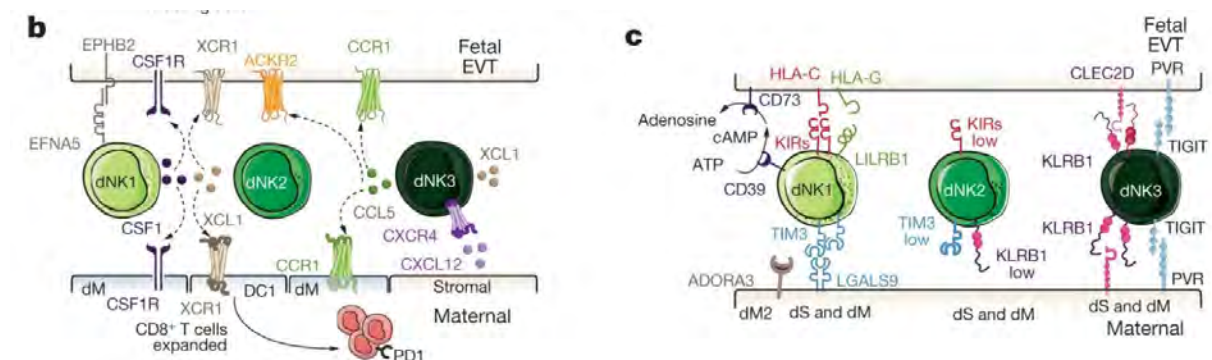
Comme indiqué plus haut, les cellules dNK constituent une des populations les plus importantes au sein du tissu décidual. En effet, les dNK représentent 70% des lymphocytes et 30% des cellules déciduales globales. Ce sont des cellules lymphoïdes innées qui jouent un rôle important dans les réponses antivirales et antitumorales.

À l’origine, les cellules NK étaient classées en fonction de l’expression à la surface cellulaire de la molécule d’adhésion CD56 et du récepteur Fc, Fc $\gamma$ RIIIA CD16. Ainsi, la majorité des cellules dNK (~95%) dans l’utérus sont CD56<sup>bright</sup> CD16<sup>-</sup>. Ces cellules présentent un phénotype unique caractérisé tout d’abord par l’expression de marqueurs de résidence tissulaire, à savoir le CD69, le CD49a, l’intégrine  $\beta$ 7 et le CD9, un membre de la famille des tétraspanines (874,877–879). Les dNK expriment par ailleurs un répertoire unique de NKR activateurs (NKp46, NKp44, NKp30, NKG2C, NKG2D et 2B4) et inhibiteurs (NKG2A, KIR2DL1, KIR2DL2/3, KIR2DL4, KIR3DL2 et ILT2) (877,880–882). De plus, plusieurs récepteurs de chimiokines, dont le CXCR3, CXCR4, CCR1 et CCR9, sont exprimés par ces cellules (61,877,882).

Cependant, plusieurs de ces NKR ne sont exprimés que par une fraction de cellules, ce qui suggère que les cellules dNK peuvent avoir différentes fonctions. A titre d’exemple, la majorité des cellules dNK expriment le marqueur de résidence CD49a et le récepteur de chimiokine CXCR3, alors qu’une fraction importante de cellules dNK n’exprime ni le CD103 ni le CXCR4

(879,883,884). De manière similaire, il a été prouvé que l'hétérodimère CD94/NKG2C et le récepteur NKp44 se trouvent seulement sur une fraction de cellules dNK (877,880,881,885).

Plusieurs sous-ensembles de cellules dNK avec des profils immunomodulateurs différents ont été identifiés dans la decidua maternelle du premier trimestre (**Figure 42**). Vento-tormo *et al.* ont ainsi démontré que les cellules dNK se divisent en trois sous-types cellulaires, dNK1 à dNK3 (883). Les dNK1 expriment l'ecto-ATPase CD39 régulatrice, impliquée dans l'induction d'un environnement immunosuppresseur, le CYP26A1 et B4GALNT. De plus, ce sous-type présente des niveaux élevés des KIR activateurs et inhibiteurs (KIR2DL1, KIR2DL2, KIR2DL3, KIR2DS1 et KIR2DS4). La forte expression de ces KIR, qui peuvent se lier aux molécules HLA-C, suggère leur implication dans la reconnaissance des cellules trophoblastiques fœtales envahissantes (883,886). Le sous-ensemble dNK2 est caractérisé par l'expression d'ANXA1 et ITGB2. Similairement aux dNK1, les dNK2 expriment les récepteurs activateurs NKG2C et NKG2E et inhibiteur NKG2A. Enfin, le troisième sous-ensemble exprime le CD160, CD161, TIGIT, ITGB2, KLRB1 et le CD103 (883).



**Figure 42 : Sous-ensembles de cellules dNK au site d'implantation placentaire.** Reproduction schématique des principaux récepteurs exprimés sur trois des sous-ensembles de cellules dNK et de leurs ligands présents sur les EVT et les DSC (883).

Plus récemment, cinq sous-types de cellules dNK ont été identifiés (884). Les dNKp, qui expriment le MCM5, STMN1 et PCNA, présentent des propriétés prolifératives. Les dNK1, caractérisées par l'expression du CD39, CSF1 et KI2DL1, montrent une phosphorylation oxydative et une activité glycolytique. Alors que les marqueurs définissant les dNK2 incluent XCL1, XCL2 et ZNF683, les cellules dNK3 ont été définies par le CD103, le CD160 et KLRB1. De plus, elles présenteraient des propriétés cytotoxiques. Enfin, les dNK4, qui expriment le CD16 et PLAC8, présentent une cytotoxicité active. Contrairement aux autres sous-types de dNK, les dNK4 n'expriment pas le CD94A, marqueur de résidence.

Il est bien connu que les cellules dNK reconnaissent les molécules de HLA. Ainsi, il a été montré que les dNK1 expriment KIR2DL3, KIR2DL1 et LILRB1, qui lient respectivement le HLA-C et HLA-G. L'expression de ce dernier ligand suggère que cette sous-population de dNK intervient dans la reconnaissance et la protection des trophoblastes. Les cellules dNK2, comme les dNK1, expriment modérément le NKG2C, NKG2E et NKG2A, qui lient le HLA-E. Ces récepteurs ne sont que faiblement exprimés par les dNK3. A l'inverse, les cellules dNK4 présentent des niveaux élevés de LILRB1, NKG2C et NKG2E.

### *C. Fonctions des dNK dans la grossesse*

La découverte de cellules dNK au site d'implantation, avant même l'implantation du blastocyste, a conduit à l'idée que ces cellules jouent un rôle crucial dans la placentation et le succès de la grossesse (887). En effet, l'utérus présente la fréquence la plus élevée de NK. Après l'ovulation, la production d'IL-15 et de prolactine, déclenchée par l'exposition des cellules stromales à la progestérone, induit un programme rapide de prolifération et de différenciation des cellules NK utérines (888). Ces chiffres augmentent encore lorsque l'implantation est réussie et sont maintenus tout au long du deuxième trimestre. Le nombre de cellules dNK diminue à partir du milieu de la gestation pour atteindre un niveau à peine détectable à terme (66). Malgré des travaux approfondis sur les cellules dNK, peu de données sont connues sur leurs fonctions exactes.

#### *a. Contrôle de l'invasion des trophoblastes*

L'invasion du tissu maternel par les trophoblastes constitue un processus majeur dans la mise en place des interfaces materno-fœtales. Néanmoins, la régulation de l'invasion des EVT dans la decidua maternelle est essentielle pour un développement correct du placenta et l'issue de la grossesse. En effet, une invasion inadéquate des trophoblastes peut avoir des conséquences désastreuses et entraîner des pathologies de la grossesse telle que la pré-éclampsie, le retard de croissance fœtal, le travail prématuré ou encore les fausses couches à répétition.

La présence de cellules dNK à proximité des trophoblastes fœtaux invasifs et des artères spiralées maternelles suggère que ces cellules immunitaires pourraient jouer un rôle central dans la mise en place d'un microenvironnement décidéal bien équilibré pour permettre le développement et le fonctionnement du placenta, tout en régulant l'invasion des trophoblastes (41,889,890).

Plusieurs études suggèrent l'intervention de programmes d'éducation spécifiques dans la mise en place d'une invasion appropriée des trophoblastes, à savoir l'engagement direct des récepteurs avec leurs ligands (891–893). Par exemple, les trophoblastes invasifs expriment les ligands des récepteurs NKp46, NKp44 et NKp30 et l'interaction avec ces récepteurs induit la sécrétion de facteurs solubles par les cellules dNK (61). La production d'un large panel de cytokines/chimiokines et facteurs pro-angiogéniques contribue alors à la régulation de l'invasion des trophoblastes (894). Par exemple, le CXCL-8 et le CXCL-10 favorisent la migration des trophoblastes, tandis que Ang-2, TNF- $\alpha$  et TGF- $\beta$  inhibent leur invasion (61,895–898). De manière similaire, le VEGF produit par les dNK dirige la migration des trophoblastes (61). De plus, en modulant le facteur de réponse à l'hypoxie, HIF-1, le VEGF-C contribue à la différenciation des trophoblastes (899).

A l'inverse, les cellules trophoblastiques exercent un rétrocontrôle négatif sur les cellules dNK et leur activité, en engageant le récepteur NKG2A *via* l'expression de HLA-E (900).

#### b. Contrôle du remodelage vasculaire

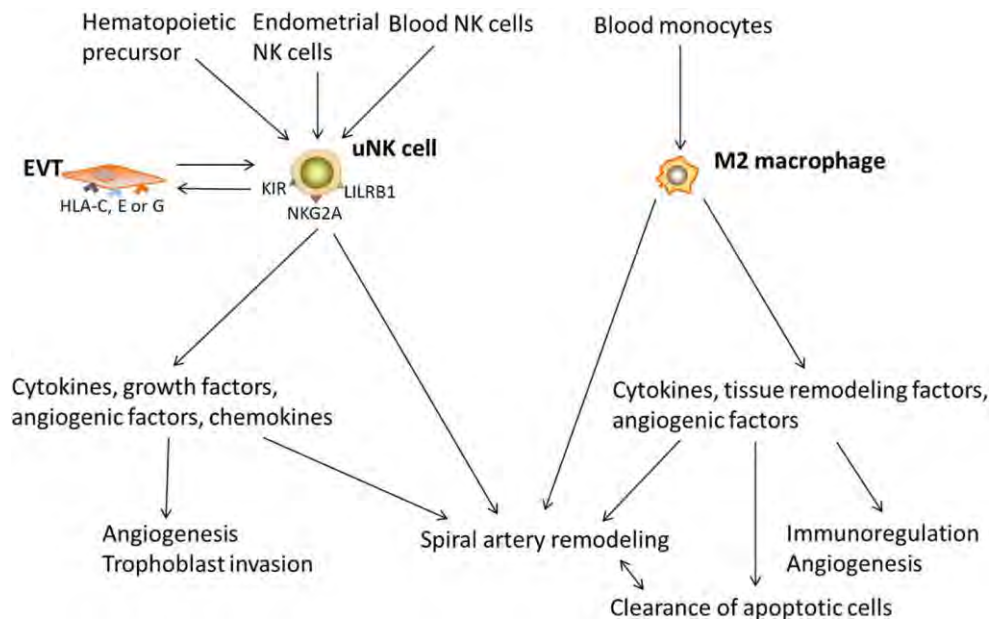
Le succès de la grossesse dépend également en grande partie du processus de remodelage du tissu maternel, à savoir la mise en place de vaisseaux résistants qui assurent un apport élevé de nutriments et d'oxygène au fœtus en croissance (505,888).

Les cellules dNK présentes à l'interface mère-fœtus jouent également un rôle actif dans le processus d'angiogenèse et de remodelage vasculaire, comme le suggère leur accumulation le long de la paroi vasculaire des vaisseaux avant l'invasion endovasculaire (889,890). Les cellules dNK modifient le système vasculaire décidual par des interactions directes et indirectes (**Figure 43**).

L'interaction directe comprend des interactions cellulaires avec des cellules musculaires lisses vasculaires, des cellules endothéliales et des cellules trophoblastiques. L'engagement direct des récepteurs des cellules dNK, dont les KIR, avec leurs ligands contribue donc fortement au remodelage vasculaire utérin. Par exemple, HLA-G, en se liant à ses récepteurs ILT2 et KIR2DL4, régule l'activité des cellules NK et favorise la sécrétion de cytokines (**Figure 43**) (901).

La production de ces facteurs solubles contribue aussi à la régulation de l'angiogenèse et du remodelage des vaisseaux (47,890,902). De plus, les dNK sécrètent également de nombreuses

MMP qui digèrent la matrice extracellulaire endothéliale (890,902). Cette digestion diminue la cohésion cellulaire et induit l'apoptose des cellules endothéliales.



**Figure 43 : Rôle des cellules dNK et des macrophages dans le développement du lit placentaire.** Sous l'effet du microenvironnement, les cellules NK utérines produisent de nombreux facteurs solubles (cytokines, chimiokines, facteurs angiogéniques et facteurs de croissance) qui contribuent à l'angiogenèse, à l'invasion des trophoblastes mais aussi au remodelage des artères spiralées. Ce dernier processus est également sous le contrôle étroit des macrophages, qui sécrètent aussi un large panel de molécules solubles impliquées dans l'élimination des cellules apoptotiques et des débris cellulaires (903).

Plus récemment, des données indiquent que les cellules dNK sont également impliquées dans le processus de tolérance fœtale, qui nécessite la mise en place de plusieurs mécanismes d'inhibition de la réponse immunitaire. On pense que la production de cytokines et de facteurs de croissance par les dNK a un rôle majeur dans la promotion de la tolérance immunitaire par l'induction de ligands inhibiteurs sur les trophoblastes fœtaux (61,880,904,905). De plus, il a été rapporté que Tim-3 est exprimé sur plus de 60% des cellules dNK. Les cellules dNK Tim-3<sup>+</sup> produisent davantage d'IL-4 et de TNF- $\alpha$  et présentent des taux de perforine plus faibles, suggérant un rôle dans la tolérance fœtale. Ainsi, il a été démontré que l'expression de Tim-3 par les dNK est diminuée dans les fausses couches humaines, indiquant l'importance des cellules Tim-3<sup>+</sup> dNK dans le maintien d'une grossesse normale. Enfin, la production d'INF- $\gamma$  par les dNK contribue au maintien de la tolérance fœtale en supprimant l'inflammation et la différenciation des Th17.

### c. Production de facteurs solubles

Bien que les cellules dNK fraîchement isolées et non stimulées produisent à peine de l'INF- $\gamma$  ou du VEGF-A, une analyse du transcriptome et du sécrétome des cellules dNK a révélé



qu'après stimulation par l'IL-2 et l'IL-15, les cellules dNK produisent un large panel de cytokines dont l'IFN- $\gamma$ , le TNF- $\alpha$ , le GM-CSF, le TGF- $\beta$  et l'IL-10 (61,906,907). Ces cytokines sont impliquées dans la mise en place d'un environnement pro-inflammatoire et pro-apoptotique, qui induit la mort des cellules endothéliales et des cellules du muscle lisse de la paroi vasculaire.

De surcroît, il a été montré que les dNK sécrètent des chimiokines dont le CXCL-8, le CCL-3, le CCL-4, le CCL5, le CXCL-10 ou le CXCL-12, et des facteurs angiogéniques incluant Ang-2, PLGF, EGF, VEGF-A, mais aussi VEGF-C qui peuvent induire l'expression de ligands inhibiteurs sur les trophoblastes (904,908). Enfin, les cellules dNK produisent le MMP-2 et le MMP-9, essentiels dans le remodelage placentaire (909).

#### d. Potentiel cytotoxique

Bien que ces cellules expriment des récepteurs activateurs fonctionnels et un panel complet de molécules cytotoxiques (granzymes, granulysine et perforine), les cellules dNK sont dépourvues de cytotoxicité dans le contexte d'une grossesse saine.

L'absence de cytotoxicité est tout d'abord attribuée à une polarisation défectueuse du MTOC, entraînant la formation d'une IS immature (910).

Il a également été démontré que le récepteur 2B4, présent à la surface des cellules dNK, échoue dans l'induction des signaux d'activation en raison de l'absence de la molécule adaptatrice SAP, qui intervient dans la signalisation activatrice (911).

Le contrôle de la fonction cytotoxique des cellules dNK s'explique également par l'engagement du récepteur inhibiteur CD94/NKG2A avec son ligand HLA-E, exprimé constitutivement par les trophoblastes (900). La liaison de NKG2A avec son ligand inhibe les signalisations activatrices tandis que les signalisations inhibitrices dominantes maintiennent les dNK dans un état non-cytolytique (881).

La sécrétion du facteur pro-angiogénique VEGF par les cellules dNK exerce également un rétrocontrôle négatif sur la réponse des cellules dNK. Le VEGF a 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 des molécules de CMH-I à la surface des cellules cibles inhibe l'activation des cellules dNK et l'acquisition de leurs fonctions lytiques en engageant les récepteurs inhibiteurs (912,913). Enfin, les trophoblastes expriment des

inhibiteurs d'apoptose tels que le XIAP et les serpinines, qui inhibent l'activité des granzymes et protègent les cellules cibles contre la lyse induite par les cellules dNK (914,915).

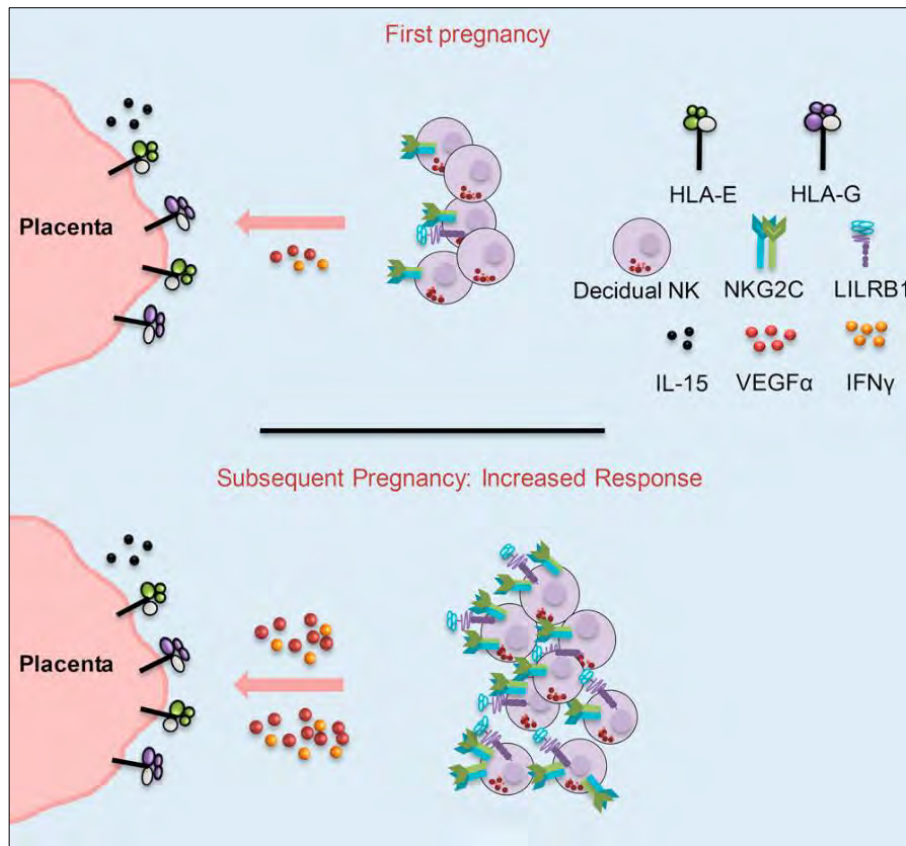
Néanmoins, des études récentes ont permis de démontrer, par des tests de lyse redirigée, que les cellules dNK ont bien un potentiel cytotoxique. L'engagement des récepteurs NKp46 et NKG2C ou la stimulation par des cytokines telles que l'IL-15, l'IL-2 ou l'IL-6, peut induire l'expression des NCR activateurs, mobiliser la machinerie lytique, déclencher des fonctions cytotoxiques des cellules dNK et induire leur dégranulation (910). De manière similaire, il a été démontré qu'en contexte infectieux les dNK présentent une grande plasticité fonctionnelle qui leur permet d'acquérir leurs fonctions effectrices et de devenir cytotoxiques (877,885).

#### e. Mémoire dNK

Alors que les cellules NK ont été considérées comme des cellules à vie courte pendant de nombreuses années, de plus en plus d'études suggèrent que les pNK développent un phénotype de mémoire de longue durée, notamment pour les virus induisant une forte cytotoxicité. « L'entraînement » des cellules dNK lors de la grossesse ainsi que le développement d'un type mémoire n'a que peu été décrit et est toujours sujet à débat (847).

Pourtant, l'existence d'une immunité utérine « entraînée » et le développement de cellules dNK « de type mémoire » au cours des grossesses ultérieures pourrait expliquer pourquoi une placentation déficiente est moins fréquente (**Figure 44**).

Ainsi, des études récentes rapportent l'existence d'une population spécifique de cellules NKG2C<sup>high</sup> LIRB1<sup>+</sup> dNK dans la decidua de femmes ayant déjà eu un premier enfant (916). La co-expression de NKG2C et du récepteur de haute affinité pour le dimère HLA-G suggèrent que ces cellules dNK « entraînées » appartiennent au sous-ensemble dNK1 (884). La capacité des cellules dNK « de type mémoire » amorcées par l'IL-15 à produire des quantités élevées d'IFN- $\gamma$  et de VEGF-A lors de la liaison aux récepteurs NKG2C/E et LIRB1 est une différence majeure avec les autres cellules NK « à mémoire » qui produisent seulement de l'IFN- $\gamma$  (916).



**Figure 44 :** Mise en place d'une réponse dNK « mémoire » lors de la première grossesse. Un sous-ensemble unique de cellules dNK, dont la réponse est plus spécifique et plus rapide, existe dans les grossesses postérieures. Ces cellules expriment des quantités accrues de NKG2C et LILRB1 et sécrètent des niveaux plus importants d'IFN- $\gamma$  et de VEGF- $\alpha$ , ce dernier favorisant la vascularisation (916).

Ainsi, élucider le rôle potentiel de l'immunité des cellules dNK « entraînées » constitue une nouvelle étape vers une meilleure compréhension de la physiopathologie des troubles de la grossesse et le développement de nouvelles interventions thérapeutiques.

#### *D. Défauts dans la réponse NK et complication de la grossesse*

Des défauts de l'invasion de l'endomètre par les EVT induisent des pathologies parfois sévères de la grossesse, qui peuvent conduire à l'échec de cette dernière et à la mort de la mère et/ou du fœtus. La forte proportion de cellules dNK au premier trimestre de grossesse ainsi que leur rôle essentiel dans le contrôle de l'invasion trophoblastique en fait des candidates naturelles pour expliquer ces pathologies. Leur hypo-réactivité lors des premières grossesses pourrait expliquer une placentation déficiente et les troubles de la grossesse (917).

##### *a. Défaut d'implantation*

Le défaut d'implantation embryonnaire récurrent (RIF) est un trouble associé à des manifestations physiologiques et psychologiques potentiellement dévastatrices pour les

personnes affectées. Bien que sa prévalence ne soit pas rare, les mécanismes impliqués dans la pathologie sont encore peu connus. Alors qu'un grand nombre d'études suggère que seuls l'embryon et l'endomètre sont impliqués dans le processus d'implantation, des études plus récentes indiquent que l'auto-immunité systémique et spécifique à un organe est associée à une prévalence accrue des défauts de placentation, faisant du rôle du système immunologique maternel un concept clé dans la pathogenèse.

Il est connu que l'équilibre délicat entre les cytokines Th1 et Th2 contribue à la tolérance immunitaire fœto-maternelle pendant la grossesse. En sécrétant des cytokines pro-inflammatoires telles que l'IL-2 et l'INF- $\gamma$ , les cellules Th1 améliorent la fonction de cytotoxicité des cellules NK, inhibant ainsi l'implantation embryonnaire et ses développements ultérieurs. *A contrario*, les cellules Th2 maintiennent l'équilibre et protègent l'embryon contre les attaques du système en produisant des cytokines anti-inflammatoires dont l'IL-4 et l'IL-10, qui suppriment les réponses Th1 (918).

Un défaut dans l'équilibre Th1/Th2 est associé à une augmentation dans la proportion de cellules NK dans l'utérus (919–921). Les cellules NK utérines présentent par ailleurs un profil modifié activé, caractérisé par une augmentation de leur potentiel cytotoxique et une dérégulation dans la production de cytokines (922,923). Un nombre plus important de dNK dans l'endomètre favorise le processus de vascularisation, induisant ainsi un contact prématuré avec la circulation maternelle et un stress oxydatif excessif (924,925).

Il est cependant admis qu'un nombre élevé de cellules dNK n'est qu'une partie d'un ensemble complexe d'anomalies immunitaires et vasculaires trouvées dans l'endomètre des femmes présentant des défauts d'implantation (923).

#### **b. Défaut de placentation et pré-éclampsie**

Des études génétiques ont établi que l'interaction entre les récepteurs NK et leurs ligands est un facteur essentiel dans la bonne collaboration entre cellules dNK et EVT (917). Ainsi, une modification dans l'équilibre entre les signaux activateurs et inhibiteurs peut contribuer à des défauts de placentation et à l'apparition de la pathologie (926,927). En effet, une altération des interactions entre les EVT et les dNK peut conduire à l'induction de forts signaux inhibiteurs qui altèrent les fonctions des dNK, à savoir la sécrétion de facteurs pro-angiogéniques et de chimiokines, impliqués dans le processus de remodelage vasculaire (928).

C'est donc un défaut dans la fonction et l'interaction entre les cellules dNK, les cellules trophoblastiques et les autres cellules immunes déciduales qui provoquerait une invasion insuffisante des cellules trophoblastiques, entraînant un remodelage inadéquat des artérioles spirales utérines et une formation placentaire défectueuse, associé à l'apparition de la pré-éclampsie (929).

Le rôle des dNK dans la pré-éclampsie est cependant encore sujet à controverse. En effet, alors que certaines études ont démontré des concentrations plus élevées de ce type cellulaire (930), d'autres ont observé une expression plus faible des cellules dNK dans les grossesses pré-éclamptiques (931–933). De plus, une modification dans les niveaux de diverses cytokines produites par les dNK contribuerait à une perturbation du microenvironnement décidual et à l'apparition de la pathologie (930,934–936). Par exemple, une perturbation dans la production d'IL-15 modifie la maturation des cellules NK utérines et stimule la production d'INF- $\gamma$ , délétère dans l'invasion des trophoblastes (937). Autre exemple, une variation dans les niveaux de TGF- $\beta$ 1 supprime la fonction des cellules dNK (938).

De manière similaire, il a également été démontré que les pathologies de placentas *increta* ou *accreta* observées lors de certaines grossesses sont aussi liées à une réduction dans le nombre de cellules dNK (939).

Ces données suggèrent que les cellules dNK jouent un rôle majeur dans le processus d'invasion placentaire anormale, sans pour autant influencer le site d'implantation placentaire. Elles permettent aux EVT d'envahir profondément le tissu utérin, tout en prévenant leur invasion démesurée dans la paroi utérine.

### c. Fausses couches répétées

Très récemment, il a été admis que des facteurs immunologiques pourraient contribuer à l'apparition de cette pathologie chez la femme enceinte. Une étude récente a démontré qu'un déséquilibre dans la réponse lymphocytaire Th1/Th2 a un lien avec cette pathologie. Lors d'une grossesse saine, les cellules dNK sécrètent diverses cytokines de type Th1, telles que le TNF- $\alpha$ , l'INF- $\gamma$  et l'IL-12, qui agissent en synergie à l'interface materno-fœtale. De plus, les cytokines de type Th2 qu'elles produisent, jouent un rôle dominant dans la protection de l'embryon semi-allogène du rejet (940–942). A l'inverse, dans cette pathologie, la réponse Th1/Th2 est déséquilibrée vers la voie Th1 et l'augmentation des cytokines Th1 entraîne l'activation et la

prolifération des dNK, comme cela a été observé chez les femmes présentant cette pathologie (943–947).

De plus, il a été montré que la pathologie est associée à une modification dans le phénotype des cellules dNK  $CD56^{\text{bright}} CD16^-$  qui deviennent  $CD56^{\text{dim}} CD16^+$  (948). Les cellules dNK présentent alors une cytotoxicité plus élevée envers les cellules fœtales, ce qui contribue à l'avortement spontané (944,949,950). Enfin, un autre sous-ensemble de cellules NK utérines, les dNK productrices d'IL-22, s'est avéré être régulé différemment chez les femmes atteintes d'ASR. Une augmentation de la proportion de cellules produisant l'IL-22 a en effet été détectée dans l'endomètre des patientes (951,952). Les cytokines déciduales contribuent donc largement à l'apparition de la pathogenèse (953).

#### d. Retard de croissance intra-utérin

Alors que certaines études indiquent qu'une augmentation de la population de cellules dNK est responsable de cette pathologie associée à la grossesse, des travaux plus récents suggèrent que la réduction du nombre de cellules dNK à l'interface materno-fœtale induit une cascade d'événements contribuant à une altération de l'invasion des trophoblastes et du remodelage vasculaire (931,954), entraînant finalement une transformation des artères spiralées et une modification de la vasoconstriction, deux caractéristiques du retard de croissance (955,956).

De plus, d'autres études ont rapporté que la modification dans la proportion des cellules dNK est associée à une altération de leur phénotype, de leur profil cytotoxique et de leur production de facteurs solubles (929,957). Un changement du phénotype des cellules NK  $CD56^+ CD16^-$  vers un phénotype  $CD56^+ CD16^+$ , plus cytotoxique, a en effet été observé. Aussi, une augmentation de la production de cytokines a été rapportée dans les lymphocytes déciduaux (957).

## Objectifs

Durant la grossesse, le fœtus est séparé de la mère par les interfaces materno-fœtales dont, la decidua, sur laquelle vient s'implanter le placenta. Bien que ces interfaces constituent des barrières protectrices efficaces, elles ne sont pas totalement imperméables. En effet, elles permettent de nombreux échanges (nutriments, oxygène, hormones, déchets, ...) essentiels au développement du fœtus. Néanmoins, malgré la protection robuste de ces interfaces *via* les multiples cellules immunitaires qui les composent, certains pathogènes qui infectent la mère peuvent atteindre la decidua, franchir la barrière placentaire et se disséminer au fœtus, pour causer des infections congénitales. Ces infections sont alors associées à une grande mortalité maternelle et fœtale lors de la grossesse. Parmi ces virus, on trouve notamment le virus ZIKA (ZIKV), responsable de l'épidémie majeure en 2016 au Brésil. La réémergence du virus a rapidement été associée à de nombreux cas de transmission verticale lors de la grossesse, à des malformations chez le nouveau-né (microcéphalie) et à des pathologies placentaires.

Après l'épidémie de 2016, mon équipe a rapidement eu accès à la souche endémique d'Amérique latine (souche asiatique), afin de développer un modèle très pertinent de culture *in vitro* d'infection par le ZIKV. Ce modèle, combiné à des techniques développées et optimisées au sein de mon équipe, a tout d'abord permis de définir le large tropisme du ZIKV à l'interface mère-fœtus durant le premier trimestre de grossesse, mais également de caractériser la pathogenèse du virus à l'interface materno-fœtale. De plus, mon équipe a œuvré pour identifier les conséquences de l'infection par le ZIKV sur la fonction sécrétrice du placenta. Nous avons ainsi été les premiers à décrire l'interaction entre le ZIKV et la machinerie métabolique de la cellule hôte, révélant ainsi une nouvelle voie d'immunométabolisme actif lors d'une infection virale. Enfin, mon équipe et moi-même avons cherché à caractériser l'effet du virus sur la réponse immunitaire maternelle locale de l'utérus gestant.

Compte tenu de ces premières données, nous avons émis l'hypothèse que l'infection par le ZIKV est aussi associée à une perturbation du microenvironnement cytokinique decidual, qui conditionnerait la mise en place d'une réponse immunitaire innée efficace. Aussi, mon projet de thèse a consisté à aller plus loin dans la caractérisation de la réponse immune au premier trimestre de grossesse. Nous avons ainsi étudié la réponse interféron/ISG en contexte d'infection par le ZIKV. Un autre objectif de ma thèse a été de caractériser l'effet de l'infection sur la régulation des fonctions effectrices des cellules dNK. Les résultats préliminaires suggéraient en effet que les cellules dNK, présentes en grand nombre dans la decidua, participaient au contrôle de l'infection par le ZIKV. Nous avons ainsi émis l'hypothèse que les cellules dNK limitaient la transmission verticale du virus et protégeaient le fœtus de l'infection



congénitale. Finalement, nous avons cherché à identifier les récepteurs impliqués dans l'infection des cellules déciduales, afin d'élaborer une stratégie thérapeutique antivirale innovante, qui limiterait l'infection par le ZIKV en inhibant les premières étapes de l'entrée virale.

## Résultats

Le virus ZIKA (ZIKV) a ré-émergé en 2015-2016 en Amérique Centrale et du Sud et l'épidémie a été associée à de graves complications à la fois chez la mère infectée (pathologies placentaires) et chez le fœtus en développement (syndrome congénital, défauts dans le neuro-développement) (220,223). Ces défauts de la grossesse et ces malformations fœtales ont par ailleurs des répercussions plus graves lors d'une infection au premier trimestre de grossesse.

Ainsi, mon projet de thèse a pour but de comprendre la pathogenèse du ZIKV à l'interface materno-fœtale au cours des premiers mois de la grossesse. Pour ce faire, en mars 2016, la souche asiatique de ZIKV a été isolée au laboratoire de virologie du CHU de Toulouse à partir d'un don de sperme d'un patient infecté et le virus a été amplifié dans notre laboratoire. De plus, les prélèvements utilisés pour réaliser cette étude ont été obtenus en collaboration étroite avec les obstétriciens et le personnel hospitalier de l'hôpital Paule de Viguière.

Ces échantillons ont constitué la principale difficulté technique de ce projet de thèse, du fait de leur rareté, de leur exploitabilité, de la variabilité dans le terme d'interruption de la grossesse et finalement des conditions d'obtention, dépendantes de l'autorisation et de la signature du consentement médical. De plus, les dNK, purifiées depuis ces prélèvements et utilisées dans notre modèle *in vitro* de co-culture, constituent un sous-type cellulaire de la *decidua basalis* à courte durée de vie, difficiles à maintenir en culture après purification. Finalement, la variabilité inter-donneurs existante a constitué une barrière technique majeure, notamment pour les expériences d'infection *in vitro*.

Dans un premier axe de mon projet de thèse, nous avons cherché à caractériser l'effet de l'infection sur le microenvironnement déciduel. Les résultats obtenus par le précédent doctorant, Jordi Gouilly, suggéraient que l'infection par le ZIKV modifiait le microenvironnement déciduel et induisait une altération dans l'expression des ligands de certains récepteurs des cellules NK. Ainsi, nous avons observé que le ZIKV impacte de manière significative la sécrétion de divers facteurs solubles par les cellules déciduales (cytokines pro-inflammatoires, molécules d'adhésion, chimiokines, etc.), mais également l'expression des ligands des récepteurs NK (ligands de stress, ligands des NKR, HLA-ABC et HLA-E) et la réponse interféron.

En parallèle, nous nous sommes intéressés au rôle du système immunitaire de la *decidua basalis* dans le contrôle de l'infection. Des études précédentes ont permis de prouver que les cellules déciduales permettent une répllication efficace du ZIKV (259). Cependant, la transmission *in vivo* du ZIKV au fœtus n'est pas systématique. Ces données suggèrent donc l'existence de

mécanismes antiviraux qui limitent l'infection à l'interface materno-fœtale. Le premier trimestre de la grossesse étant caractérisé par la présence d'un nombre élevé de cellules dNK (30% des cellules déciduales totales) (38), ces cellules ont constitué donc un candidat idéal pour expliquer le contrôle de l'infection.

Les résultats obtenus nous ont permis d'émettre l'hypothèse que les cellules dNK pouvaient être impliquées dans le contrôle de l'infection par le ZIKV afin de limiter la dissémination du virus au fœtus. Afin de tester cette hypothèse, nous avons co-cultivé des dNK avec des cellules stromales déciduales (DSC) infectées autologues et nous avons mis en évidence que les dNK inhibent la production virale dans les DSC, notamment lorsqu'elles sont présentes à des temps précoces de l'infection. Afin d'identifier les mécanismes moléculaires et cellulaires impliqués dans ce contrôle, nous avons réalisé des expériences de co-culture en chambre double. Ces expériences nous ont permis de montrer que le contrôle de l'infection nécessite un contact cellulaire direct entre les dNK et les cellules cibles, tandis que les facteurs solubles présents dans les surnageants de culture ne sont pas impliqués dans ce contrôle.

Après avoir caractérisé la réponse anti-ZIKV à l'interface materno-fœtale, nous avons poursuivi nos travaux en identifiant les récepteurs impliqués dans l'entrée du virus dans les DSC. Nous avons mis en évidence le rôle majeur et exclusif du récepteur TAM Axl et de son ligand Gas6 dans l'infection par le ZIKV des DSC. De plus, nous avons mis en évidence que l'inhibition de la fonction d'Axl, par blocage compétitif de son ligand naturel, pourrait protéger les cellules de l'interface materno-fœtale de l'infection et réduire la charge virale.

Nos résultats, associés à d'autres articles publiés durant la même période, ont permis de caractériser la pathogenèse du ZIKV à l'interface materno-fœtale durant le premier trimestre de grossesse, ainsi que la réponse immunitaire associée (958). Ces travaux, dont je suis co-premier auteure, seront soumis pour publication.

# First Trimeter Decidua Cells Contribute to Controlling Zika Virus Infection at the Maternal-Fetal Interface

Ana Espino<sup>1</sup>, Jordi Gouilly<sup>1, 2</sup>, Qian Chen<sup>3</sup>, Philippe Colin<sup>4</sup>, Paul Guerby<sup>5, 4</sup>, Jacques Izopet<sup>4, 6</sup>, Ali Amara<sup>7</sup>, Julie Tabiasco<sup>8</sup>, Reem Al-Daccak<sup>9</sup>, Hicham El Costa<sup>4</sup>, Nabila Jabrane-Ferrat<sup>4, 2\*</sup>

<sup>1</sup>INSERM U1043 Centre de Physiopathologie de Toulouse Purpan, France, <sup>2</sup>Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS), France, <sup>3</sup>Boston Children's Hospital, Harvard Medical School, United States, <sup>4</sup>INSERM UMR1291 Institut Toulousain des Maladies Infectieuses et Inflammatoires, France, <sup>5</sup>Purpan, Centre Hospitalier Universitaire de Toulouse, France, <sup>6</sup>Hôpital Purpan, France, <sup>7</sup>INSERM U944 Laboratoire Pathologie et Virologie Moléculaire (PVM), France, <sup>8</sup>Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM), France, <sup>9</sup>INSERM U976 Immunologie, Dermatologie, Oncologie, France

**Submitted to Journal:**  
Frontiers in Immunology

**Specialty Section:**  
NK and Innate Lymphoid Cell Biology

**Article type:**  
Original Research Article

**Manuscript ID:**  
1000861

**Received on:**  
22 Jul 2022

**Journal website link:**  
[www.frontiersin.org](http://www.frontiersin.org)

### ***Conflict of interest statement***

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

### ***Author contribution statement***

A.E. and J.G. conducted the experiments, analyzed data and drafted the manuscript; Q.C., P.C., H.E.C. and J.T. contributed to data analysis; P.G. provided clinical samples; A.A. provided Axl inhibitor; J. I. provided financial support and critical discussion of the manuscript; N.J.F. designed and supervised the research; R.A.D. and N.J.F. revised and approved the paper.

### ***Keywords***

NK cells, Zika virus, Infection, congenital infection, maternal-fetal interface

### ***Abstract***

Word count: 224

Decidual NK (dNK) cells account for 70% of leukocytes in the first trimester decidua, where they produce an array of soluble factors that are mandatory for successful placentation and for the development of the semi-allogenic fetus but also can limit the dissemination of pathogens to the fetal compartment thanks to their functional plasticity. We previously revealed that Zika virus (ZIKV) can replicate in a broad range of maternal and fetal cells from first-trimester placenta. Even though the maternal-to-fetal transmission of ZIKV is not systematic, keeping the rate of congenital infection low is quite challenging. Within this notion, we investigated in this study how the maternal decidua can act as a natural barrier of ZIKV infection. Our study reveals that whether through their interactions with dNK cells or their production of large array of proinflammatory cytokines, decidual stromal cells (DSCs) are main regulators of ZIKV infection during pregnancy. We also validate the functional role of Axl as a crucial receptor for ZIKV entry in DSCs and demonstrate that targeting it at the early stage of the infection is efficient to drastically reduce virus pathogenesis at the maternal-fetal interface. Collectively, our results provide insights into the mechanisms through which ZIKV infection and spreading could be limited, and suggest that circumventing virus entry at the maternal-fetus interface as potential strategy to limit virus dissemination to fetal tissues.

### ***Contribution to the field***

The study provides insights into the maternal immune response and defensive mechanism(s) against Zika virus infection during pregnancy and suggests that circumventing virus entry at the maternal-fetus interface is a potential strategy to limit virus dissemination to fetal tissues.

### ***Ethics statements***

#### ***Studies involving animal subjects***

Generated Statement: No animal studies are presented in this manuscript.

#### ***Studies involving human subjects***

Generated Statement: No human studies are presented in this manuscript.

#### ***Inclusion of identifiable human data***

Generated Statement: No potentially identifiable human images or data is presented in this study.

### ***Data availability statement***

Generated Statement: The datasets presented in this article are not readily available because No. Requests to access the datasets should be directed to [nabila.jabrane-ferrat@inserm.fr](mailto:nabila.jabrane-ferrat@inserm.fr).

## **First Trimeter Decidua Cells Contribute to Controlling Zika Virus Infection at the Maternal-Fetal Interface**

**Ana Espino<sup>1,\*</sup>, Jordi Gouilly<sup>1,\*</sup>, Qian Chen<sup>1</sup>, Philippe Colin<sup>1</sup>, Paul Guerby<sup>2</sup>, Jacques Izopet<sup>3</sup>, Ali Amara<sup>4</sup>, Julie Tabiasco<sup>1</sup>, Reem Al-Daccak<sup>5</sup>, Hicham El Costa<sup>1#</sup>, Nabila Jabrane-Ferrat<sup>1,#,\$</sup>**

<sup>1</sup>Toulouse Institute for infectious and inflammatory diseases (Infinity), CNRS UMR5051, INSERM UMR1291, University of Toulouse III, 31024 Toulouse, France.

<sup>2</sup>Department of Obstetrics and Gynecology, Paule de Viguier Hospital, 31059 Toulouse, France.

<sup>3</sup>Department of Virology, Institut Fédératif de Biologie (IFB), 31059 Toulouse, France

<sup>4</sup>CNRS 7212, INSERM U944, University of Paris, Hôpital Saint-Louis, 75010 Paris, France

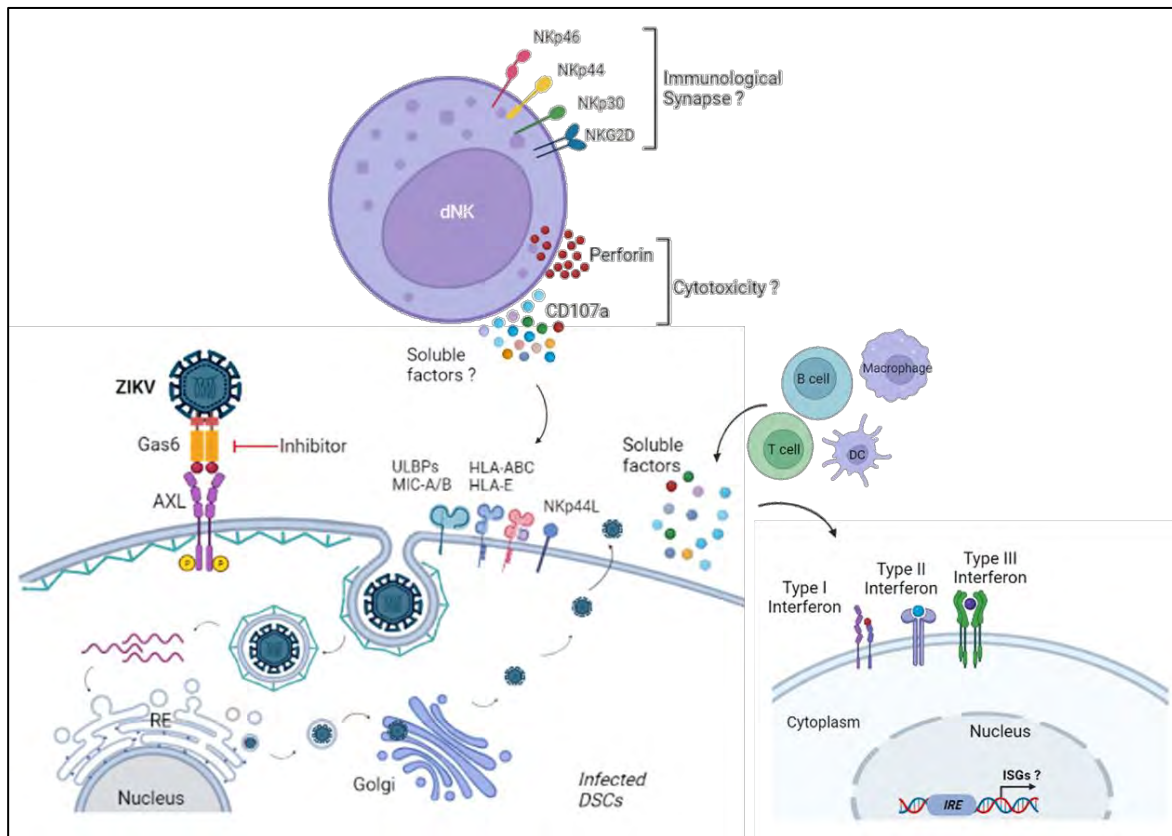
<sup>5</sup>INSERM UMRS976, University of Paris, Hôpital Saint-Louis, 75010 Paris, France.

\*Shared first authorship

#Shared senior authorship

\$Corresponding author Dr Nabila Jabrane-Ferrat: [nabila.jabrane-ferrat@inserm.fr](mailto:nabila.jabrane-ferrat@inserm.fr)

## Graphical Abstract



## Abstract

Decidual NK (dNK) cells account for 70% of leukocytes in the first trimester *decidua*, where they produce an array of soluble factors that are mandatory for successful placentation and for the development of the semi-allogenic fetus but also can limit the dissemination of pathogens to the fetal compartment thanks to their functional plasticity. We previously revealed that Zika virus (ZIKV) can replicate in a broad range of maternal and fetal cells from first-trimester placenta. Even though the maternal-to-fetal transmission of ZIKV is not systematic, keeping the rate of congenital infection low is quite challenging. Within this notion, we investigated in this study how the maternal decidua can act as a natural barrier of ZIKV infection. Our study reveals that whether through their interactions with dNK cells or their production of large array of proinflammatory cytokines, decidual stromal cells (DSCs) are main regulators of ZIKV infection during pregnancy. We also validate the functional role of Axl as a crucial receptor for ZIKV entry in DSCs and demonstrate that targeting it at the early stage of the infection is efficient to drastically reduce virus pathogenesis at the maternal-fetal interface. Collectively, our results provide insights into the mechanisms through which



ZIKV infection and spreading could be limited, and suggest that circumventing virus entry at the maternal-fetus interface as potential strategy to limit virus dissemination to fetal tissues.

## Introduction

The establishment of immune-privileged fetal-maternal interfaces, including the implantation site also called *decidua basalis* (decidua), is a main hallmark of pregnancy. During the first trimester of pregnancy, the maternal decidua hosts a large number of innate lymphoid cells, mainly tissue resident NK cells and some recruited cells from the peripheral NK cell pool. Decidual NK (dNK) cells account for 70% of leukocytes in the first trimester *decidua* (4–6). The majority of these tissue resident cells are CD56<sup>bright</sup> CD16<sup>neg</sup> and express most of the activating and inhibitory NK cell receptor repertoire (7–10). During healthy pregnancy, dNK cell responses are finely regulated through interactions with maternal decidual stromal cells (DSCs), as well as other immune cells and fetal trophoblast cells that invade the maternal decidua. Although dNK cells own functional lytic machinery, they are not cytotoxic under healthy conditions and rather produce an array of soluble factors that are mandatory for successful placentation and for the development of the semi-allogenic fetus (11,12). Yet, dNK cells are also endowed with

functional plasticity that allows them to unleash their cytotoxic function and limit the dissemination of pathogens to the fetal compartment (13,14).

Zika Virus (ZIKV) is a single-strand positive-sense RNA virus that belongs to the *Flaviviridae* family. ZIKV infection manifests with mild symptoms in healthy adults, but it can cause Guillain-Barré syndrome (GBS) and life-threatening congenital abnormalities referred to as Congenital Zika Syndrome (CZS) in fetuses and offspring born to expectant mothers infected in early pregnancy. Major developmental abnormalities including the devastating microcephaly occur when ZIKV crosses the placenta in early pregnancy, but, the mechanisms involved are far from being fully elucidated (1,2). Our previous studies, and others, revealed that ZIKV can replicate in a broad range of maternal and fetal cells from first trimester placenta (3). Nonetheless, maternal-to-fetal transmission is not systematic, emphasizing the effectiveness of the placenta as a natural barrier and suggesting the existence of efficient antiviral mechanisms during pregnancy.

Little is known about how ZIKV infection can be contained during pregnancy although understanding the mechanisms by which this control occurs is fundamental for developing strategies that could prevent maternal-fetal transmission. By using first trimester samples and an *ex vivo* cell culture model, we aimed at furthering this fundamental knowledge. Our findings revealed that ZIKV infection shapes the inflammatory environment of the maternal-fetal interface inducing major phenotypic and functional changes in decidual cells enabling dNK cells to sense and limit early ZIKV dissemination to fetal cells. Importantly, our results disclose Axl as a main ZIKV entry receptor and propose its targeting as an eventual strategy that could prevent congenital infection.

## Results

### **ZIKV infects first-trimester maternal decidual stromal cells and alters their NK cell receptor ligands**

During pregnancy, dNK cell response is finely regulated through interactions with maternal decidual stromal cells (DSCs). Therefore, to determine the eventual contribution of dNK cells in controlling ZIKV infection during pregnancy, we analyzed the ability of the ZIKV Asian strain to infect freshly isolated first trimester DSCs. Cells were infected with

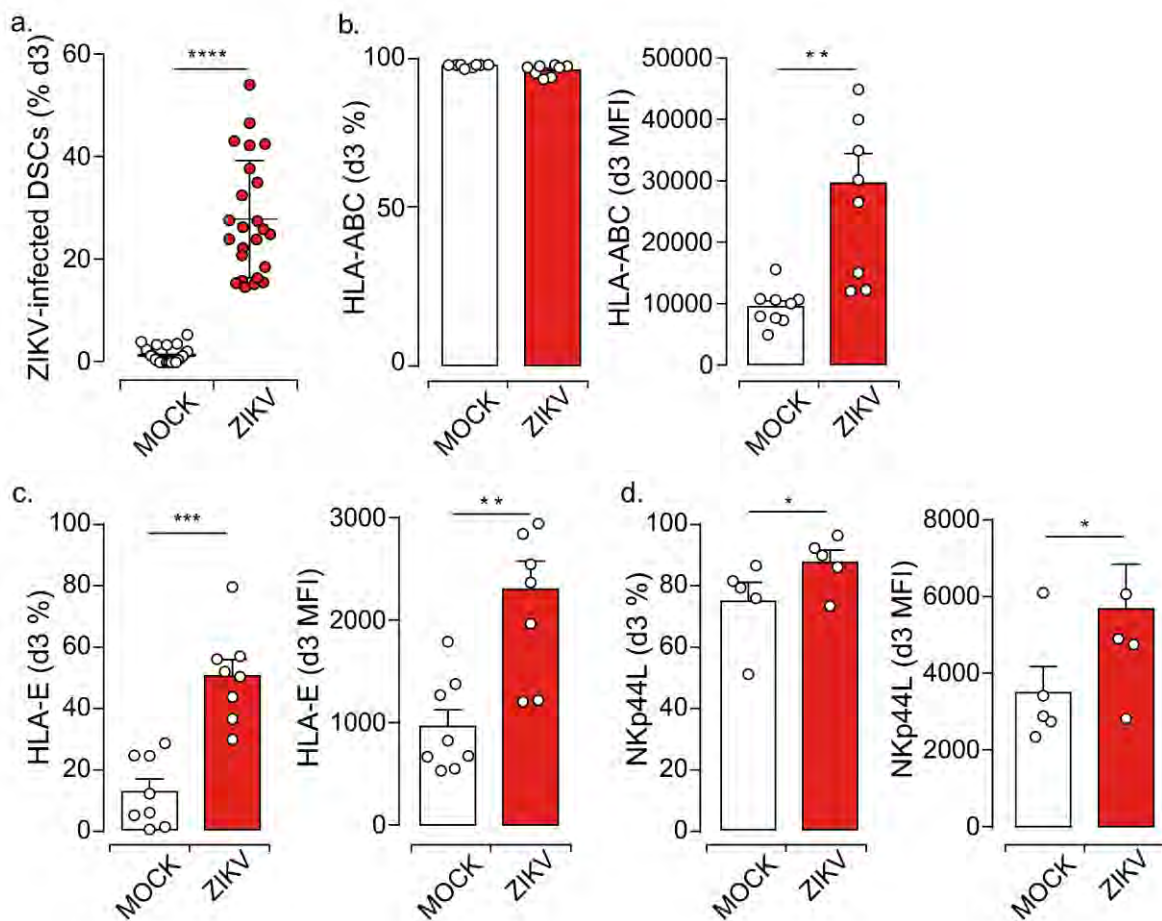
ZIKV at  $6 \times 10^{10}$  RNA copies/ml (equivalent to a MOI of 1), and the percentage of infected DSCs was evaluated at different days post-infection (dpi). Analysis of the NS3 viral protein expression revealed a progressive rising of infection, with approximately 30-60% of infected DSCs at 3 dpi (Figure 1a). A slight decline in the number of infected cells was observed at 5 dpi probably due to the virus cytopathic effect (Figure S1a).

Major histocompatibility complex (HLA in humans) class I antigens are expressed in the maternal *decidua* and play a central role in fine-tuning dNK cell functions (22). *Flaviviruses*, including ZIKV, are known to interfere with the expression of these HLA antigens as well as with the stress ligands, both considered as major regulators of NK cell function. We, therefore, investigated the impact of ZIKV infection on HLA class I and NK cell receptor ligands expression by DSCs. ZIKV infection induced a significant increase in the expression levels of the constitutive classical HLA-A/B/C as evidenced by increased mean fluorescent intensity (MFI) at 3 dpi (Figure 1b), while it significantly increased both the percentage and the expression level of the non-classical HLA-E antigens (Figure 1c). Similar

results were observed at 5 dpi (Figure S1b).

Although at variable levels, DSCs constitutively express several ligands of NK cell receptors including ligands for NKG2D (NKG2DL), NKp46 (NKp46L), NKp44 (NKp44L), and NKp30 (NKp30L). While ZIKV infection significantly

increased the expression level of NKp44L (Figure 1d), it did not alter the expression of other ligands of NK cell receptors (Figure S1d and S2). Taken together, these results suggest that ZIKV infection increases the levels of some specific stress ligands that could trigger engagement of NKR and NK cell activation at the maternal-fetal interface.



**Figure 1. ZIKV infection of decidual stroma cells modulates the expression of key NK cell receptor ligands.** **a.** DSCs were challenged with ZIKV at a MOI of 1. ZIKV viral production determined 3 d.p.i by flow cytometry using anti-NS3 antibody, followed by fluorochrome-conjugated secondary antibody staining. Uninfected (white dots), ZIKV-infected (red dots) DSCs. **b-d.** Cell surface expression of specific NK cell receptor ligands at 3 dpi determined by FACS on live cells on uninfected (white) and infected (red) DSCs. Percentage and mean

fluorescence intensity for the expression of HLA-ABC (b), HLA-E molecules (c) and NKp44 ligands, NKp44L (d). Data sets represent mean values  $\pm$  SEM determined from at least five independent donors. *P* values are computed using paired two-tailed Student's *t* test. \**p*<0.05, \*\**p*<0.01, \*\*\**p*<0.001.

### **Decidual NK cells control decidual early ZIKV infection**

We then investigated within an autologous co-culture model, whether the interaction of dNK cells with ZIKV-infected DSCs could trigger their activation and cytolytic functions to control viral infection. DSCs were infected at a MOI of 1, and co-cultured with purified autologous dNK cells at a 1:5 ratio for 3 and 5 days. Viral replication was monitored over time in culture supernatants by qRT-PCR. After 3 days of co-culture, dNK cells efficiently controlled ZIKV replication in autologous DSCs (Figure 2a). Viral load did not increase over time and was similar to the residual  $10^7$  RNA copies/ml observed at day 0 post exposure to ZIKV, compared to infected DSCs cultured in the absence of dNK cells (Figure 2a). The control was less efficient when dNK cells were added at later time post-infection, dropping to less than 50 % at 3 dpi and was lost at 5 dpi (Figure 2a).

We next determined whether viral control is mediated through direct cell-to-cell contact or production of soluble mediators. The ability of dNK cells to

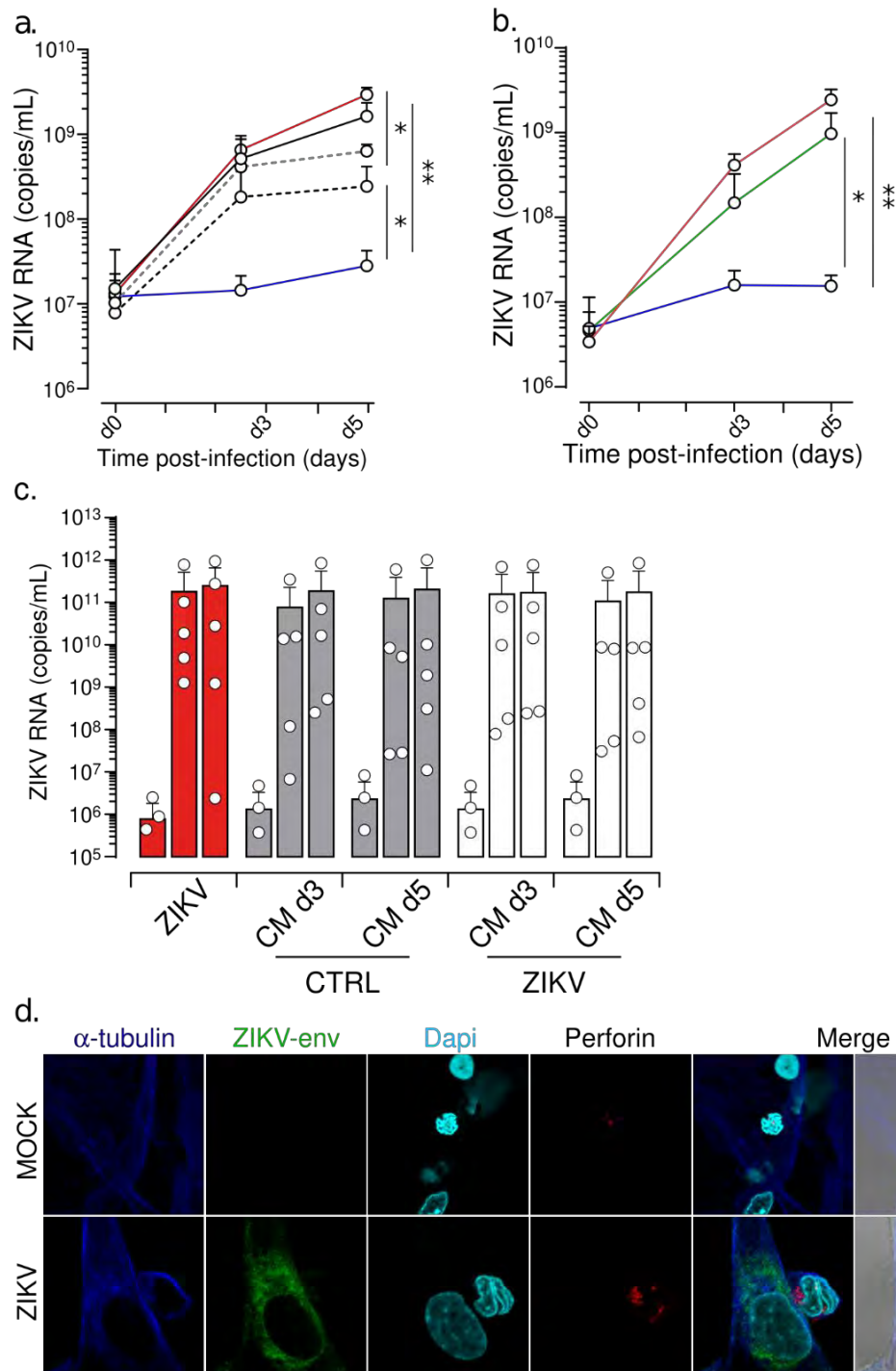
control viral infection drastically dropped when co-culturing was performed within double-chamber system, which prevented their physical interaction, indicating that the control of the infection occurs mainly through cell-to-cell contact (Figure 2b). To further confirm, we evaluated the capacity of conditioned media (CM) collected from dNK cells-DSCs cocultures to control ZIKV replication. Fresh DSCs were then cultured in UV-inactivated CM before and after exposure to ZIKV inoculum, to avoid infection bias, and viral genome replication was monitored overtime. CM also failed to restrict viral replication in DSCs (Figure 2c), further confirming that the soluble factors produced by dNK cells do not play an active role in dNK-mediated control of ZIKV replication.

Cellular contact between NK cells and their targets proceeds through the formation of dynamic structures called immune synapses (IS) to deliver the lethal hit through the secretion of lytic granules containing perforin (29). To confirm that dNK-mediated control of ZIKV occurs through cell-cell interactions, we therefore, evaluated the

capacity of dNK to form IS with autologous ZIKV-infected DSCs. Conjugate formation between dNK cells and uninfected or ZIKV-infected autologous DSCs was analyzed after 20 min of interaction by monitoring perforin localization and polarization to the immune synapse using confocal microscopy. Even though we observed dNK cells forming conjugates with both uninfected and ZIKV-infected target

cells, polarization of perforin to the IS only occurred in conjugates with ZIKV-infected cells (Figure 2d).

Thus, dNK cells in the decidua can efficiently control and limit ZIKV dissemination through direct cellular interactions with infected DSCs, yet, this control occurs only at early time of infection.



**Figure 2. dNK cells efficiently control DSCs infection.** DSCs were infected with ZIKV at a MOI of 1 and co-cultured with autologous dNK cells at a ratio 1:5. **a.** ZIKV-infected DSCs cultured alone (red line) or with autologous dNK cells added at day 0 (blue line), day 1 (dotted black line), day 2 (dotted grey line) or day 3 (black line) post-infection. **b.** ZIKV-infected DSCs cultured alone (red), with autologous dNK cells in the same well (blue) or separately by a 0.4 $\mu$ M porous membrane in transwell system (green). **c.** Fresh DSCs cultured in the presence of UV-inactivated conditioned media (CM) collected at 3 and 5 dpi from cocultures of dNK cells

with uninfected (grey) and ZIKV-infected DSCs (white). ZIKV-infected DSCs (red) are used as a positive control for ZIKV infection. **a-c.** Viral loads are determined by qRT-PCR in cell-free culture supernatants, collected following the indicated time points d0, d3 and d5. Data sets are presented as mean values  $\pm$ SEM from at least three independent donors. *P* values are computed using paired two-tailed Student's *t* test. \**p*<0.05, \*\**p*<0.01. **d.** Uninfected and ZIKV-infected DSCs plated on glass coverslips incubated with autologous dNK cells for 20 min at 37°C. Representative images of conjugates with maximum intensity projection are shown. Lytic granules containing perforin (red), ZIKV-env protein (green),  $\alpha$ -tubulin (blue) and DAPI nuclei (cyan). Scale bar, 10  $\mu$ m.

### **Microenvironment of infected decidua contributes to limiting ZIKV dissemination**

Beyond their interaction with dNK cells, DSCs produce various soluble factors and contribute actively to the decidua microenvironment which is mandatory to ensuring immune tolerance of semi-allogenic conceptus, trophoblast attraction, and vasculature remodeling (11). Because our results demonstrated that the contribution of dNK cells to restraining congenital ZIKV infection is limited to early phases of infection, we investigated whether DSCs through miscellaneous secreted factors, could contribute to controlling ZIKV propagation during pregnancy. Within this notion, we analyzed the secretion profile of uninfected and ZIKV-infected DSCs. ZIKV infection of DSCs was associated with a significant increase in the level of IL-6, sICAM-1, CCL2 and CCL5 as well as the CXCL1, CXCL8 and CXCL10 chemokines (Figure 3a-c),

whereas other analytes, either showed variable tendency to increase without reaching significance (IL-1RA, LAP, CCL4, sFasL, TRAIL, M-CSF, and VEGF-A) or did not vary (metalloproteases) upon exposure of DSCs to ZIKV (Figure S3).

Importantly, DSC infection by ZIKV also altered the level of the well-known first line of defense against invading pathogen infections, the interferons (IFNs) (23). Namely, ZIKV infection was associated with a significant increase in the level of IFN- $\gamma$ , variable tendency to increase the level of IFN- $\lambda$ 1 and IFN- $\lambda$ 2/3, but did not genuinely affect the level of neither IFN- $\alpha$  nor  $\beta$  (Figure 3d). These observations prompted us to test whether ZIKV regulate the IFN- $\gamma$  and IFN- $\lambda$  at the transcriptional level by qRT-PCR. As depicted in figure 3e, ZIKV infection significantly increased mRNA level of both type II and type III IFNs in DSCs. Because IFNs activate signal transduction cascade(s) leading to the

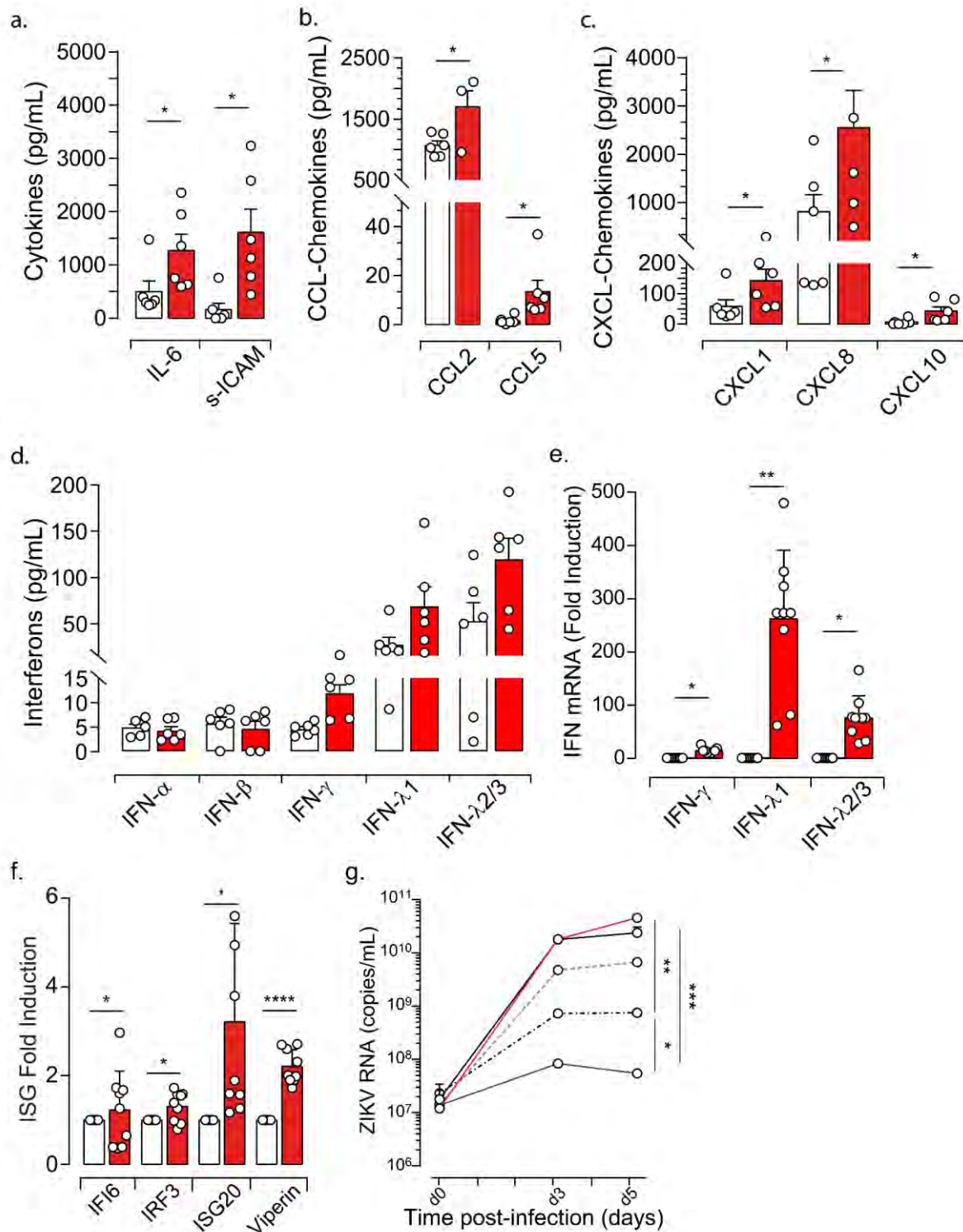
induction of hundreds of interferon-stimulated genes (ISGs), that are critical for controlling viral pathogenesis through a variety of mechanisms (24,25), we then assessed the effects of ZIKV infection on downstream IFN signaling pathways, by measuring different ISGs expression. We selected a set of model genes (IRF3, IRF7, ISG15, ISG20, Mx1, Viperin and IFI6) (Table 1) and used a qRT-PCR-based expression analysis. In comparison with our housekeeping gene, we observed that IRF3, ISG20, Viperin and IFI6 genes were significantly activated at levels ranging from 2- to >4 fold (Figure 3f). No significant differences were observed for IRF7, ISG15 and Mx1 (Figure S3). Thus, our results suggest that ZIKV infection is associated with a robust IFN and ISG response.

To provide a meaningful breadth to DSC response to ZIKV infection, we determined the antiviral potency of IFNs during ZIKV infection. We choose IFN- $\gamma$  as a representative IFN, since it can be

produced not only by the DSCs but also by other cells including NK and T cells. ZIKV-infected DSCs were treated with recombinant human IFN- $\gamma$ , and viral replication was monitored in culture supernatants by qRT-PCR. IFN- $\gamma$  strongly controlled the infection when DSCs were treated concomitantly to their exposure to ZIKV particles. The inhibition rate of ZIKV genome replication reached almost 95% at 3 dpi and 5 dpi. This control was progressively lost when the antiviral cytokine was added later in the infection (Figure 3g).

Taken together, our results demonstrate that ZIKV infection increase the production of key chemokines (CCL2, CCL5, CXCL1, CXCL8 and CXCL10) recognized as major chemoattractant for various immune cell types to the inflamed or infected sites, but also elicits a robust type II and type III IFN response that can efficiently contribute to controlling early steps of ZIKV infection.





**Figure 3. ZIKV infection modulates the decidual environment and the interferon response.** DSCs were infected with ZIKV at a MOI of 1 for 24 hours. **a.** Cytokines, **b.** CCL-chemokines, **c.** CXCL-chemokines, **d.** IFN- $\alpha$ , IFN- $\beta$ , IFN- $\gamma$ , IFN- $\lambda$ 1 and IFN- $\lambda$ 2/3, quantified in the supernatant using a 42-multi-plexed cytokine assay. **e-f.** Total mRNA extracted 3 dpi and transcripts quantified using qRT-PCR and specific primers for IFN- $\gamma$ , IFN- $\lambda$ 1, IFN- $\lambda$ 2/3, IFI6,

IRF3, ISG20 and Viperin. Histograms showing significant differences between uninfected (white bars) and ZIKV-infected DSCs (red bars) are presented. **g.** ZIKV-infected DSCs cultured with or without recombinant human IFN- $\gamma$  (100ng/ml). IFN- $\gamma$  was added at day 0 (d0, blue line), d1 (dotted black line), d2 (dotted grey line) or d3 (black line) post-infection. Non treated ZIKV-infected DSCs (red line) are used as positive control. Culture supernatants were collected from the different conditions following the indicated time points and viral loads were determined by qRT-PCR. All data sets are normalized and presented as mean values  $\pm$ SEM from at least five independent donors. Statistical comparisons were performed between uninfected and ZIKV-infected DSCs using a Student t-test. \* $p$ <0.05, \*\* $p$ <0.01, \*\*\* $p$ <0.001.

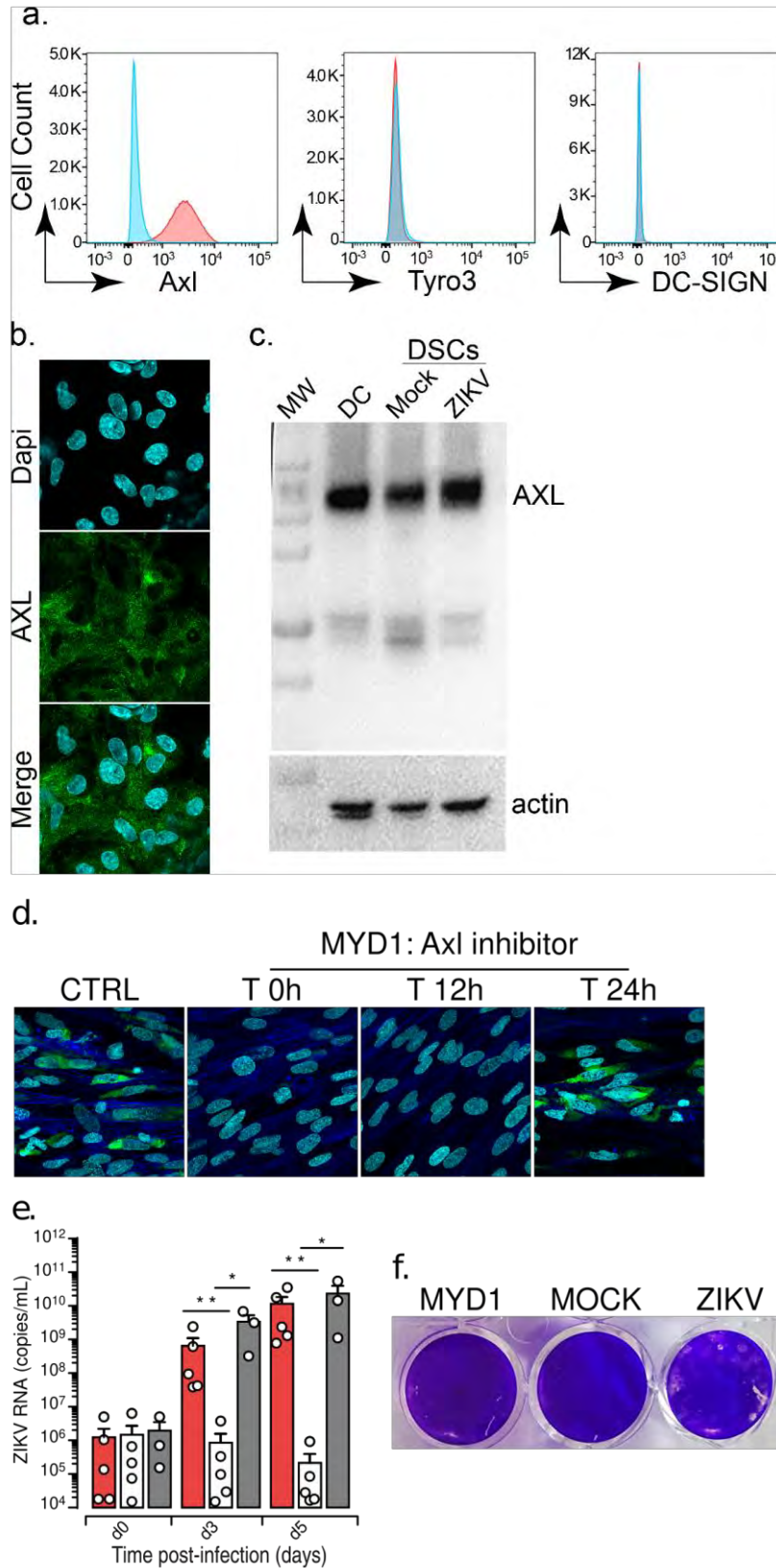
### **ZIKV employs Axl co-receptor to enter the maternal *decidua***

Whether through their interactions with dNK or their secreted cytokines, DSCs at the maternal decidua appear as main regulator of ZIKV infection during pregnancy. Therefore, we decided to determine how ZIKV may enter the maternal decidua and DSCs. Several studies have identified the TAM (Tyro3, Axl, and Mer) receptor tyrosine kinase family and DC-SIGN as genuine *Flavivirus* receptors (15–17). During ZIKV infection, Axl has been identified as one of the main receptors involved in virus entry to target cells (15–17). We first determined which ZIKV receptors are expressed on DSCs. Figure 4a shows that Axl is strongly expressed in DSCs whereas no expression of Tyro 3 or DC-SIGN in those cells was observed. By immunofluorescence and western blot, we further confirmed the expression of Axl and that the protein level was not affected by ZIKV infection (Figure 4b,c).

Axl recognizes the externalized phosphatidylserine, its natural ligand, on apoptotic cells, indirectly and requires the use of a soluble mediator GAS6 (Growth Arrest Specific 6). The assembly of the three partite complex and the resulting receptor kinase activation act as a pleiotropic antagonist of innate inflammatory immune response, down-modulating type I interferon signalling pathway and further facilitating infection (18,19). To validate the role of Axl in ZIKV infection of DSCs and explore strategies that might be developed to limit congenital infection, we assessed the effects of an engineered Axl decoy receptor MYD1 which interferes with ligand-receptor interaction by sequestering human GAS6 (20,21). Immunofluorescence using an anti-NS3 antibody demonstrated that binding of MYD1 to GAS6 efficiently inhibits ZIKV entry to DSCs, when added concomitantly or 12h post-infection, confirming the importance of Axl for the

viral entry (Figure 4d). Viral replication was also monitored over time by qRT-PCR in culture supernatants from five DSCs' donors. After 3 days of co-culture, we showed efficient control of ZIKV replication with the Axl inhibitor. Indeed, the viral RNA production was completely blocked when ZIKV virions were pre-incubated with MYD1 or when the decoy receptor was added during the virus adsorption time (less than 1h) (Figure 4e). Similar results were observed after 5 days of co-culture. But, no blockade was

observed when MYD1 was added at later time points post-viral entry (24h post-infection). To further confirm the critical role of Axl in ZIKV infection, we collected supernatant from all conditions and determined the production of infectious particles using a plaque assay. In agreement with our findings, sequestering GAS6 prevented the production of infectious particles, compared to the untreated condition (Figure 4f).



**Figure 4. Axl receptor is essential for ZIKV infection of DSCs.** a. DSCs stained for surface expression of the indicated receptor using specific antibodies, followed by fluorochrome-conjugated secondary antibody staining. Representative FACS histograms are shown.

Unstained (blue) and stained DSCs (pink). **b.** Representative images of maximum intensity projection of DSCs. Axl (green), DAPI nuclei (cyan). Scale bar, 10  $\mu$ m. Data are representative of at least five independent experiments from five independent donors. **c.** Western blot analysis of Axl expression.  $\beta$ -actin as the loading control, DC (Dendritic cells) expressing Axl protein as positive control. **d.** Representative images of maximum intensity projection of ZIKV-infected DSCs. ZIKV-DSCs incubated with or without MYD1 decoy receptor, added at different time (during infection T0h or 12 and 24 hours post-infection). Immunostaining performed 5 dpi in the presence of MYD1 treatment. NS3 (green),  $\alpha$ -tubulin (blue) and DAPI nuclei (cyan). Scale bar, 10  $\mu$ m. Data are representative of at least three independent experiments. **e.** Kinetic of ZIKV replication in MYD1 non-treated DSCs (red), early-treated DSCs (during infection, in white) or late-treated DSCs (12 hours post infection, in grey). Viral loads were determined by qRT-PCR and bar graph represents the mean values  $\pm$ SEM determined from five independent donors. **f.** Monolayer uninfected or ZIKV-infected Vero cells, treated (MYD1) or not (MOCK and ZIKV wells) with MYD1 Axl inhibitor were used for plaque assay. Plaques were observed at 5 dpi.

Altogether, our data validate the functional role of Axl in the pathogenesis of ZIKV at the maternal-fetal interface, acting as a crucial receptor for ZIKV entry in DSCs and targeting it at the early stage of the infection is efficient to drastically reduce ZIKV infection during pregnancy.

## Discussion

Due to the association between ZIKV infection and serious illnesses during pregnancy, both in the infected mother and in the developing fetus, World Health Organization (WHO) declared ZIKV to be a public health concern (1,2). These birth defects were even more serious when the mother was infected with ZIKV in the first trimester of pregnancy. Despite the large tropism of this virus (3), clinical

studies demonstrated that mother-to-fetus transmission only occurs in 4% of the cases, suggesting the existence of antiviral defense mechanisms that limit viral transmission and infection. Within this context, our findings revealed the critical contribution of DSCs in controlling ZIKV maternal-fetal transmission through their interaction with dNK cells that can sense and control the infection but also through shaping the inflammatory environment of the maternal-fetal interface to limit ZIKV dissemination to fetal cells. Importantly, we disclose Axl as a main ZIKV entry receptor and propose its targeting as an eventual strategy that could prevent congenital infection.

Previous investigations demonstrated that viral infections can be associated with dysregulations in the expression of NKR ligands by decidual cells, that can enhance the immune response or promote virus evasion strategies (13,32). We demonstrated that both classical (HLA-A/B/C) and non-classical (HLA-E) MHC-I molecules were targeted by ZIKV. ZIKV-infection resulted in increased expression of HLA-A/B/C and HLA-E (Figure 1b-c). The observation of HLA-E upregulation by ZIKV prompted us to consider this ligand as essential in the control or the facilitation of ZIKV infection, since HLA-E is a ligand for both inhibitory and activating receptors, which can transmit opposing signals (33,34). A positive balance between the two opposing signals might trigger the recognition of infected DSCs and promote their killing through engagement of activating receptors. Therefore, as reported in previous studies, viral infections can enhance or dampen HLA-E expression (13,35,36). These differences might be explained by the fact that MHC-I expression on the surface of the target cells is dependent on the infected cell type, the pathogen and the viral strain (37).

Using NKR-Fc chimeric receptors, we analysed the expression of NKR ligands

on DSCs (Figure 1c-f and Figure S2). Although some variations were observed amongst donors, we found that DSCs constitutively express NKp44L and NKG2DL, while they barely express NKp30L or NKp46L. ZIKV infection induced an increase in NKp44L expression but did not affect the expression of NKp46L, NKp30L and NKG2DL. These findings suggest that ZIKV infection interferes with the expression level of activating receptor ligands. Even if we did not detect any changes using Fc-NKG2D chimeric receptor, the NKG2D receptor can recognize several ligands (ULPB1-6, MIC-A/B), so further studies are still needed to identify the effect of ZIKV infection on specific NKG2D ligands, as some of these stress ligands can be either enhanced or dampened during viral infections (38,39). NKp44 can mediate both activating and inhibitory signals (40–42). Although not yet fully investigated, because DSC up regulated NKp44L expression upon ZIKV infection and their interaction with dNK limited the early phases of ZIKV infections, it is likely that NKp44 receptor-ligand binding during ZIKV infection, similar to West Nile Virus infection (43), contributes to activating NK cells.

The interaction of dNK with ZIKV-infected DSC led to SI formation, which is a crucial step for the delivery of lethal hits by NK cells. Although we did not characterize the exact architecture of IS structure, high recruitment of perforin-polarized dNK cells toward ZIKV-infected DSCs was observed. Thus, dNK cells were able to control in a cell-cell contact manner the replication of ZIKV at early stages of the infection. Our findings are in agreement with the previously established notion of dNK cells playing a critical role in the control of maternal viral infection and spreading to the fetus (13,14). However, in our ZIKV infection model dNK cells control preferentially due to cytotoxic process rather than to production of soluble factors although further studies are warranted proof that dNK IS with DSCs is lytic. Understanding this mechanism is of major importance, as prolonged exposure to these lytic molecules could potentially become deleterious and participate in the development of placental pathologies observed during ZIKV infection (58,59).

We demonstrated that ZIKV infection of first trimester DSCs is also associated with alterations of local microenvironment. ZIKV infection was associated with an increased secretion of various chemokines (CCL5, CXCL1,

CXCL8, CXCL10 and CXCL2) directly linked to the recruitment of immune cells, including T cells, macrophages and NK cells, known to actively contribute to the uterine vascular remodelling and the maintenance of fetal tolerance. Chemokines are also essential for trophoblasts migration and invasion during vascular remodelling as well as for angiogenesis regulation. ZIKV infection also induces IL-6 secretion, most probably through the activation of the IL-6/STAT3 signalling pathway, which plays a key role in regulating inflammatory host immune responses during infections. However, several studies have reported differential regulation of STAT3 in viral infections (55). STAT3 role in viral replication is complex, as this transcription factor appears to exhibit both pro- or anti-viral functions. Interferons play a critical role in the antiviral immune response (44,45), and their production by infected cells can help preventing the viral propagation. In the context of our study, ZIKV infection was associated with IFN- $\beta$ , IFN- $\lambda$  and IFN- $\gamma$  production by DSCs, and treatment with recombinant IFN- $\gamma$ , as IFN model, lowered DSCs viral load. Thus, production of IFNs may also contribute to limiting ZIKV infection during pregnancy, consistent with previously reported studies (16, 46–50). We also found that

ZIKV infection enhances ISGs production, which is consistent with recent studies demonstrating that viral infections have been associated with the induction of hundreds of ISGs, including OAS2, ISG15 and MX1 (46,53). ISGs then could contribute to the inhibition of viral replication inhibition (24,25). IFNs could therefore constitute a warning signal to other uninfected cells in order to prevent viral transmission. Nonetheless, a massive deregulation of all of DSCs-secreted soluble factors may also have dramatic consequences during the course of pregnancy which may explain, at least in part, why in some cases ZIKV infection is associated with tissue damage (54).

Given the aetiology associated with ZIKV infection during pregnancy, the identification of virus entry receptors in decidual cells is critical to understand ZIKV pathogenesis but also to develop strategies that constraint the congenital infection. In agreement with previous studies identifying Axl as one of the main receptors involved in virus entry to target cells during ZIKV infection (15–17), our study showed that revealed that Axl is also the main ZIKV entry receptor in first trimester DSCs. That engineered Axl decoy receptor MYD1, which interferes with ligand-receptor interaction by

sequestering human GAS6, prevented ZIKV infection of first trimester DSCs under score a potential strategy that might constraint congenital infection and thus, the development of the devastating ZIKV congenital syndrome.

In conclusion, our study provided new insights into the maternal immune response and defensive mechanism(s) upon ZIKV infection during pregnancy, and opened new perspective for the development of antiviral strategies in pregnant women, to prevent devastating sequelae of pregnancy and congenital ZIKV.

## **Material and Methods**

### Patient samples and ethic statement

This study was approved by the Research Ethical Comity Haute-Garonne and Agence de Biomédecine (PFS08-022). All the patients included in our study signed the informed consent before samples were taken, in accordance with the Declaration of Helsinki guidelines. All the experiments were performed in accordance with these guidelines.

### Cell purification, cell lines

First-trimester *decidua samples* (7–12 weeks of pregnancy) were processed according to previously described



protocols (13). Briefly, minced samples were subjected to collagenase IV (Sigma-Aldrich, France) and DNase I (Roche) digestion for 45 min at 37 °C under gentle stirring followed by Ficoll-Hypaque density gradient (Amersham Biotech) separation. Cell suspension was then allowed to adhere in tissue culture plates overnight. dNK cells were purified from the non-adherent cell fraction using a CD56 MACS negative selection kit (Miltenyi Biotech). Cell purity was assessed by CD56, CD14 and CD3 staining and the dNK cells (CD3<sup>neg</sup>, CD14<sup>neg</sup> and CD56<sup>pos</sup>) represented at least 90% of the purified cells. dNK cells were kept at 4°C in conditioned media containing 20% heat-inactivated fetal calf serum (FCS) for subsequent experiments. Low passage autologous DSCs from the adherent fraction were trypsin treated and processed for subsequent experiments. DSCs were maintained in DMEM:F12 (v:v) culture medium (Invitrogen) supplemented with 10% FCS and penicillin-streptomycin 100 U/ml each, under a 5% CO<sub>2</sub> atmosphere at 37°C (3).

#### Virus production and infection of primary cells

The Asian strain of ZIKV isolated in January 2016 from semen collected from an infected symptomatic French traveler

returning from Brazil (63) was used in all experiments. High titer stocks were obtained by passaging the virus in Vero cells, as previously described (3,54). Vero cells were inoculated with seminal fluid for 2 h (1:10 dilution) in PBS containing 2% BSA. The viral inoculum was removed and cells were cultured in DMEM medium supplemented with 10% FCS. Medium was changed 24 h post inoculation. Supernatant was collected from infected cells 5 dpi. Viral stocks were stored in single use aliquots at -80 °C for subsequent infections, after titration using plaque-forming assay.

Primary DSCs were infected overnight with ZIKV particles to a MOI of 1 in DMEM:F12 containing 2% FCS. After several washes in PBS, primary cells were cultured in DMEM:F12 10% FCS-medium for one to five days, depending on the experiment.

For co-culture assays, DSCs were cultured with dNK cells at a 1:5 ratio either through direct co-culture or through double-chamber co-culture system (Corning Incorporated Costar). dNK cells were added at different times post-infection. For some conditions, culture supernatants were collected from DSCs-dNK cell co-cultures and inactivated under DUV-LED lamp at working distance of 20 mm during 10

minutes (Conditioned media: CM). After inactivation, CM were added to uninfected DSCs to assess their antiviral properties. Non-UV-treated virus inoculum was used as a positive control.

In some experiments, ZIKV-infected DSCs were cultured in the presence of IFN- $\gamma$  (100ng/ml, R&D System), which was added either during the inoculation or at different time post-infection. ZIKV-infected DSCs were also treated with an Axl decoy receptor (MYD1, 1:1,000 dilution) as previously described (20,21), added either before infection, as a pre-treatment, or after infection. Culture supernatants were finally collected and either stored at -80°C or used directly for subsequent analysis.

### Quantification of ZIKV RNA

Viral RNA was extracted from 140 $\mu$ l of culture supernatants collected at different dpi (QIAmp Viral RNA kit, Qiagen). Purified RNA was then reverse transcribed using the SuperScript III first-strand synthesis system kit (Invitrogen) and viral genome was quantified by quantitative RT-PCR (qRT-PCR, Table 1) on a Light Cycler 480 instrument (Roche Molecular Systems) according to the manufacturer's instructions. Internal standards were included to correct for potential variations in the amount of input material. qRT-PCR values were further normalized and are given as viral RNA copy numbers/ml. Kinetic of viral genome replication was determined as RNA copy numbers/ml, calculated based on a standard curve.

**Table 1. Primer sequences**

Target gene	Primer sequence	
	Forward	Reverse
ZIKV	TTGGTCATGATACTGCTGATTGC	CCTTCCACAAACTCCCTATTGC
IFN- $\gamma$	GAGTGTGGAGACCATCAAGGAAG	TGCTTTGCGTTGGACATTCAAGTC
IFN- $\lambda$ 1	GAGGCCCCCAAAAAGGAGTC	AGGTTCCCATCGGCCACATA
IFN- $\lambda$ 2/3	ACACCCTGCACCATATCCTCTC	CGGAAGAGGTTGAAGGTGACAG
HPRT	TGACACTGGCAAACAATGCA	GGTCCTTTTCACCAGCAAGCT
ISG20	AGTGAGCGCCTCCTACACAAG	ACCAGCTTGCCTTTCAGGAG
ISG15	CGCAGATCACCCAGAAGATCG	TTCGTCGATTTGTCCACCA
IRF3	TACCTTCACGGAAGGAAGCG	GCACAACCTTGACCATCACG
IRF7	CAGAGCCGTACCTGTCACC	GGGGCCGTATAGGAACGTG
Mx1	CAGAGAGAAGGAGCTGGAAGAA	GCTGGCCTCCTGGTGATA
Viperin	CAAGACCGGGGAGAATACCTG	GCGAGAATGTCCAAATACTCACC
IFI6	AGCTGGTCTGCGATCCTGAATG	TTACCTATGACGACGCTGCTGC

### Quantification of IFN and ISG transcripts

Total RNA from MOCK- or ZIKV-infected samples were extracted using the RNeasy Kit (Qiagen) according to the manufacturer's instructions. Purified RNA was subjected to a reverse transcription using the SuperScript III first-strand synthesis system kit (Invitrogen). Gene expression was quantified by qRT-PCR using Light Cycler 480 SYBR green I master mix (Roche) and specific primers (Table 1). qRT-PCR were performed in 96-well plates and run on a Light Cycler 480 instrument (Roche). The housekeeping hypoxanthine-guanine phosphoribosyl transferase (*HPRT*) was used as control. The results are presented as fold change from matched mock-infected controls calculated using the  $2^{-\Delta\Delta CT}$  method.

### Flow cytometry analysis

After 3 to 5 days of co-culture, cell conjugates were disrupted mechanically by repeated pipetting. Cell viability was checked using the LIVE/DEAD™ Fixable Yellow Dead Cell Stain Kit, according to the manufacturer's procedure (Invivogen, L34959).  $5 \times 10^5$  live cells were stained for each condition/experiment. The following antibodies CD3-Vioblue, CD14-FITC, CD56-APC (Miltenyi), CD4-PE, CD8-PerCp, CD45-PeCy7 (Sysmex) were

used to characterize dNK cells. The expression of NCR-ligands on DSCs was analysed by binding of specific Receptor-Fc chimera followed by immunostaining with the APC-coupled mouse anti-human IgG1 secondary Ab (R&D System, France). The following chimeras were used: NKp30-Fc, NKp44-Fc, NKp46-Fc and NKG2D-Fc (R&D Systems, France). The expression of the major histocompatibility complex (MHC) was measured using the following mAbs: anti-human HLA-A/B/C-PE (BD Pharmingen) and HLA-E-APC (Miltenyi). Non-specific binding was blocked by preincubating the cells for 30 min in 2% FCS and 1% BSA containing buffer. Axl and DC-SIGN expression were determined using the anti-CD209-APC-Cy7 (Miltenyi) and anti-Axl (7E10, Abcam) monoclonal antibodies. Samples subjected to immunostaining were analysed on a BD LSR-FORTESSA cytometer and acquired data were further analyzed using FlowJo™ software 10.1.

### Plaque assay

To quantify the infectious virus particles, supernatants harvested at indicated time points were titrated on Vero E6 cells by a standard plaque titration assay. Briefly,  $1 \times 10^6$  Vero E6 cells were seeded in 6-well plate a day before performing the

plaque assay. The culture media was removed and cells are washed with PBS to remove traces of FCS. Viral stocks were diluted in DMEM 2% FCS and the appropriate dilution was added to the corresponding well and incubated for 2 h at 37°C with constant agitation. After removing the inoculum, the adherent cell layer was overlaid with a mixture of 2% of low-melting agarose (Cat 15517-022; Invitrogen) and DMEM (Invitrogen) supplemented with 2% of FCS and 2% penicillin and streptomycin (P/S). After 5 days, cells were fixed with Formol overnight and stained with 0.5g crystal violet solution. Plaques were counted and titers are calculated as PFU/ml.

#### Fluorescent microscopy

ZIKV-infected or uninfected DSCs were seeded into 24-well plates containing 0.12mm glass coverslips. After 24 h of adhesion, dNK cells were added at a 1:5 ratio and conjugates were allowed to form for 20 min at 37°C. Cells were washed briefly with PBS and fixed with 4% paraformaldehyde (PFA) for 20 min. After two washes, cells were permeabilized with PBS 0.3% Triton X-100 and 10% FCS for 90 min and stained overnight with primary antibodies, followed by incubation for 2 hours with specific fluorescent secondary antibodies. The following primary

antibodies were used to analyze the cell structure, perforin polarization and ZIKV infection: anti-human  $\alpha$ -Tubulin (DM1A, 1:250 dilution, Sigma-Aldrich, UK), anti-human perforin (1:250 dilution, BD Biosciences Pharmingen) and anti-Dengue virus NS3 (1:100 dilution, abm). Alexa fluor-conjugated 633 (AF-633), AF-555 and AF-488 (Invitrogen) conjugated antibodies were used at 1:400 dilutions, respectively. Nuclei were visualized with 4,6-diamidino-2-phenylindole (Dapi, 1:1000 dilution, Sigma) staining. After extensive washing, coverslips were mounted with Vectashield mounting medium (Vector Laboratories).

Large field microscopy was performed with Leica DM4000B microscope (Leica, Solms, Germany, LAS version 3.7.0). Confocal z-stacks were captured using Zeiss LSM710 confocal microscope (Carl Zeiss AG, Jena, Germany). 10 $\times$ , 20 $\times$  or 63 $\times$  oil objectives were used for all acquisitions. Images were processed using Imaris software (Bitplane AG, Switzerland) and Zen software to obtain maximum intensity projection along the z-axis. The quantification values of infection were obtained by calculating the percentage of infected cells over total cells.

## Western Blot

5x10<sup>6</sup> cells were lysed in RIPA buffer in the presence of a protease inhibitor cocktail (ThermoFisher) for 30 min at 4°C. Protein concentration was determined by Bradford assay (ThermoFisher). Equal amounts of protein were resolved on 4-20% Mini Protean gradient gels (Bio-Rad Laboratories) then transferred to nitrocellulose membranes (ThermoFisher). Protein expression were analyzed using anti-Axl (C89E7) or anti-DC-SIGN (D7F5C) antibodies followed by HRP-conjugated secondary antibodies (mouse or rabbit, Jackson ImmunoResearch). Blots were developed by chemiluminescence assay (Bio-Rad Laboratories). Anti-β-actin (Sigma Aldrich) was used to confirm protein loading.

## Multiplex cytokine and chemokine arrays

Decidual fibroblasts were infected with ZIKV and controls experiments were performed using uninfected fibroblasts. Cleared supernatants from 5 different experiments were collected after 24 hours of culture and stored at - 80°C. Cytokines, chemokines and growth factors levels were measured using a multiplexed Affymetrix cytokine assay according to the manufacturer protocol

(Procarta/Ozyme). The following cytokines and chemokines were analyzed: IL-1β, IL-1, IL-6, CXCL8, IL-10, IL-12, IL-1RA, TNF-α, IFN-α, IFN-β, IFN-γ, IFN-λ, CCL2, CCL3, CCL4, CCL5, CXCL1, CXCL10, CXCL12, G-CSF, GM-CSF, M-CSF, FGF2, VEGF-A, sFasL, sICAM-1, TRAIL, Granzyme B, MMP-2, MMP-9 and LAP. Measurement and analysis were performed using the BioRad Bio-Plex System (BioRad, France).

## Statistical analysis

Unpaired Student *t*-test were calculated using GraphPad Prism 7.0 (GraphPad Software). Unless indicated otherwise, all data are represented as mean ± S.E.M. from at least five independent experiments. *p* values < 0.05 were considered significant. \**p* < 0.05, \*\**p* < 0.01, \*\*\**p* < 0.001.

## **Author contributions**

A.E. and J.G. conducted the experiments, analyzed data and drafted the manuscript; Q.C., P.C., H.E.C. and J.T. contributed to data analysis; P.G. provided clinical samples; A.A. provided Axl inhibitor; J. I. provided financial support and critical discussion of the manuscript; N.J.F. designed and supervised the research; R.A.D. and N.J.F. revised and approved the paper.

## Acknowledgments

We are grateful to the clinical staff from Paule de Viguié maternity hospital for placenta collection and, to the cell imaging and cytometry core facilities for technical assistance. We thank Prof E. Bahraoui for critical comments on the manuscript. This work was supported by recurrent funds from the INSERM-CNRS-University Toulouse III, the Région Occitanie and the Fondation pour la Recherche Médicale (FRM).

## Competing Interests

The authors have declared that no competing interests exist.

## References

1. Mlakar J, Korva M, Tul N, Popović M, Poljšak-Prijatelj M, Mraz J, Kolenc M, Resman Rus K, Vesnaver Vipotnik T, Fabjan Vodusek V, et al. Zika Virus Associated with Microcephaly. *N Engl J Med* (2016) 374:951–958. doi: 10.1056/NEJMoa1600651
2. Brasil P, Pereira JP, Moreira ME, Nogueira RMR, Damasceno L, Wakimoto M, Rabello RS, Valderramos SG, Halai U-A, Salles TS, et al. Zika Virus Infection in Pregnant Women in Rio de Janeiro. *N Engl J Med* (2016) 375:2321–2334. doi: 10.1056/NEJMoa1602412
3. El Costa H, Gouilly J, Mansuy J-M, Chen Q, Levy C, Cartron G, Veas F, Al-Daccak R, Izopet J, Jabrane-Ferrat N. ZIKA virus reveals broad tissue and cell tropism during the first trimester of pregnancy. *Sci Rep* (2016) 6:35296. doi: 10.1038/srep35296
4. Manaster I, Mandelboim O. The unique properties of uterine NK cells. *Am J Reprod Immunol* (2010) 63:434–444. doi: 10.1111/j.1600-0897.2009.00794.x
5. Whitelaw PF, Croy BA. Granulated lymphocytes of pregnancy. *Placenta* (1996) 17:533–543. doi: 10.1016/s0143-4004(96)80070-1
6. Moffett A, Loke C. Immunology of placentation in eutherian mammals. *Nat Rev Immunol* (2006) 6:584–594. doi: 10.1038/nri1897
7. Jabrane-Ferrat N, Siewiera J. The up side of decidual natural killer cells: new developments in immunology of pregnancy. *Immunology* (2014) 141:490–497. doi: 10.1111/imm.12218
8. Costa HE, Casemayou A, Aguerre-Girr M, Rabot M, Berrebi A, Parant O, Clouet-Delannoy M, Lombardelli L, Jabrane-Ferrat N, Rukavina D, et al. Critical and Differential Roles of NKp46- and NKp30-Activating Receptors Expressed by Uterine NK Cells in Early Pregnancy. *The Journal of Immunology* (2008) 181:3009–3017. doi: 10.4049/jimmunol.181.5.3009
9. El Costa H, Tabiasco J, Berrebi A, Parant O, Aguerre-Girr M, Piccinni M-P, Le Bouteiller P. Effector functions of human decidual NK cells in healthy early pregnancy are dependent on the specific engagement of natural cytotoxicity receptors. *Journal of Reproductive Immunology* (2009) 82:142–147. doi: 10.1016/j.jri.2009.06.123
10. Male V, Sharkey A, Masters L, Kennedy PR, Farrell LE, Moffett A. The effect of pregnancy on the uterine NK cell KIR repertoire.

- European Journal of Immunology* (2011) 41:3017–3027. doi: 10.1002/eji.201141445
11. Hanna J, Goldman-Wohl D, Hamani Y, Avraham I, Greenfield C, Natanson-Yaron S, Prus D, Cohen-Daniel L, Arnon TI, Manaster I, et al. Decidual NK cells regulate key developmental processes at the human fetal-maternal interface. *Nat Med* (2006) 12:1065–1074. doi: 10.1038/nm1452
  12. Moffett A, Colucci F. Uterine NK cells: active regulators at the maternal-fetal interface. *J Clin Invest* (2014) 124:1872–1879. doi: 10.1172/JCI68107
  13. Siewiera J, El Costa H, Tabiasco J, Berrebi A, Cartron G, Le Bouteiller P, Bouteiller P, Jabrane-Ferrat N. Human cytomegalovirus infection elicits new decidual natural killer cell effector functions. *PLoS Pathog* (2013) 9:e1003257. doi: 10.1371/journal.ppat.1003257
  14. Quillay H, El Costa H, Duriez M, Marlin R, Cannou C, Madec Y, de Truchis C, Rahmati M, Barré-Sinoussi F, Nugeyre MT, et al. NK cells control HIV-1 infection of macrophages through soluble factors and cellular contacts in the human decidua. *Retrovirology* (2016) 13:39. doi: 10.1186/s12977-016-0271-z
  15. Perera-Lecoin M, Meertens L, Carnec X, Amara A. Flavivirus entry receptors: an update. *Viruses* (2013) 6:69–88. doi: 10.3390/v6010069
  16. Hamel R, Dejarnac O, Wichit S, Ekchariyawat P, Neyret A, Luplertlop N, Perera-Lecoin M, Surasombatpattana P, Talignani L, Thomas F, et al. Biology of Zika Virus Infection in Human Skin Cells. *J Virol* (2015) 89:8880–8896. doi: 10.1128/JVI.00354-15
  17. Tabata T, Pettitt M, Puerta-Guardo H, Michlmayr D, Wang C, Fang-Hoover J, Harris E, Pereira L. Zika Virus Targets Different Primary Human Placental Cells Suggesting Two Routes for Vertical Transmission. *Cell Host Microbe* (2016) 20:155–166. doi: 10.1016/j.chom.2016.07.002
  18. Rothlin CV, Ghosh S, Zuniga EI, Oldstone MBA, Lemke G. TAM receptors are pleiotropic inhibitors of the innate immune response. *Cell* (2007) 131:1124–1136. doi: 10.1016/j.cell.2007.10.034
  19. Anderson HA, Maylock CA, Williams JA, Paweletz CP, Shu H, Shacter E. Serum-derived protein S binds to phosphatidylserine and stimulates the phagocytosis of apoptotic cells. *Nat Immunol* (2003) 4:87–91. doi: 10.1038/ni871
  20. Kariolis MS, Miao YR, Jones DS, Kapur S, Mathews II, Giaccia AJ, Cochran JR. An engineered Axl ‘decoy receptor’ effectively silences the Gas6/Axl signaling axis. *Nat Chem Biol* (2014) 10:977–983. doi: 10.1038/nchembio.1636
  21. Meertens L, Labeau A, Dejarnac O, Cipriani S, Sinigaglia L, Bonnet-Madin L, Le Charpentier T, Hafirassou ML, Zamborlini A, Cao-Lormeau V-M, et al. Axl Mediates ZIKA Virus Entry in Human Glial Cells and Modulates Innate Immune Responses. *Cell Rep* (2017) 18:324–333. doi: 10.1016/j.celrep.2016.12.045
  22. Moffett-King A. Natural killer cells and pregnancy. *Nat Rev Immunol* (2002) 2:656–663. doi: 10.1038/nri886
  23. Carty M, Guy C, Bowie AG. Detection of Viral Infections by Innate Immunity. *Biochem*

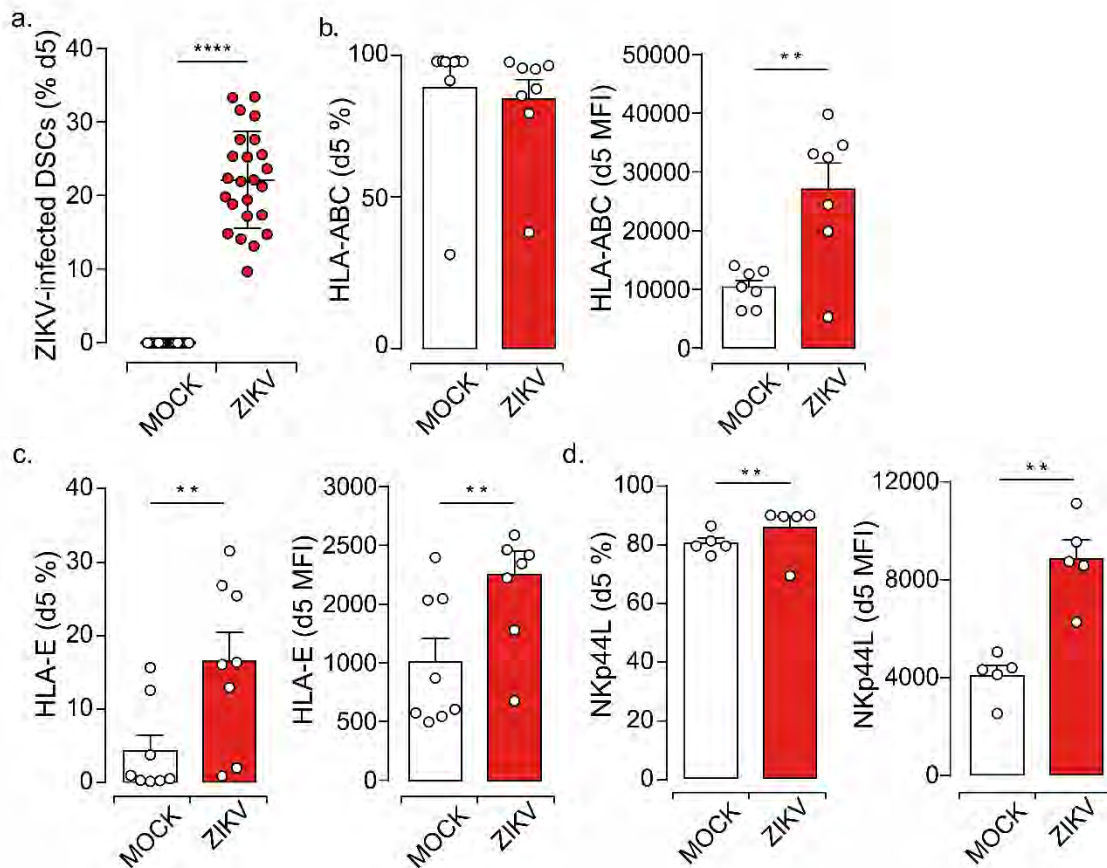
- Pharmacol* (2021) 183:114316. doi: 10.1016/j.bcp.2020.114316
24. Schoggins JW. Interferon-stimulated genes: roles in viral pathogenesis. *Curr Opin Virol* (2014) 6:40–46. doi: 10.1016/j.coviro.2014.03.006
  25. Schoggins JW. Interferon-Stimulated Genes: What Do They All Do? *Annu Rev Virol* (2019) 6:567–584. doi: 10.1146/annurev-virology-092818-015756
  26. Vacca P, Pietra G, Falco M, Romeo E, Bottino C, Bellora F, Prefumo F, Fulcheri E, Venturini PL, Costa 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) 108:4078–4085. doi: 10.1182/blood-2006-04-017343
  27. Kopcow HD, Allan DSJ, Chen X, Rybalov B, Andzelm MM, Ge B, Strominger JL. Human decidual NK cells form immature activating synapses and are not cytotoxic. *Proc Natl Acad Sci U S A* (2005) 102:15563–15568. doi: 10.1073/pnas.0507835102
  28. Siewiera J, Gouilly J, Hocine H-R, Cartron G, Levy C, Al-Daccak R, Jabrane-Ferrat N. Natural cytotoxicity receptor splice variants orchestrate the distinct functions of human natural killer cell subtypes. *Nat Commun* (2015) 6:10183. doi: 10.1038/ncomms10183
  29. Orange JS. Formation and function of the lytic NK-cell immunological synapse. *Nature Reviews Immunology* (2008) 8:713–725. doi: 10.1038/nri2381
  30. Amara A, Mercer J. Viral apoptotic mimicry. *Nat Rev Microbiol* (2015) 13:461–469. doi: 10.1038/nrmicro3469
  31. Meertens L, Carnec X, Lecoin MP, Ramdasi R, Guivel-Benhassine F, Lew E, Lemke G, Schwartz O, Amara A. The TIM and TAM families of phosphatidylserine receptors mediate dengue virus entry. *Cell Host Microbe* (2012) 12:544–557. doi: 10.1016/j.chom.2012.08.009
  32. Golden-Mason L, Cox AL, Randall JA, Cheng L, Rosen HR. Increased NK cytotoxicity and NKp30 expression protects against HCV infection in high-risk individuals and inhibits replication in vitro. *Hepatology* (2010) 52:1581–1589. doi: 10.1002/hep.23896
  33. Braud VM, Allan DSJ, O’Callaghan CA, Söderström K, D’Andrea A, Ogg GS, Lazetic S, Young NT, Bell JI, Phillips JH, et al. HLA-E binds to natural killer cell receptors CD94/NKG2A, B and C. *Nature* (1998) 391:795–799. doi: 10.1038/35869
  34. Kaiser BK, Barahmand-pour F, Paulsene W, Medley S, Geraghty DE, Strong RK. Interactions between NKG2x Immunoreceptors and HLA-E Ligands Display Overlapping Affinities and Thermodynamics. *The Journal of Immunology* (2005) 174:2878–2884. doi: 10.4049/jimmunol.174.5.2878
  35. Nattermann J, Nischalke HD, Hofmeister V, Kupfer B, Ahlenstiel G, Feldmann G, Rockstroh J, Weiss EH, Sauerbruch T, Spengler U. HIV-1 infection leads to increased HLA-E expression resulting in impaired function of natural killer cells. *Antivir Ther* (2005) 10:95–107.
  36. Jun Y, Kim E, Jin M, Sung HC, Han H, Geraghty DE, Ahn K. Human cytomegalovirus gene products US3 and US6 down-regulate trophoblast class I MHC molecules. *J Immunol*



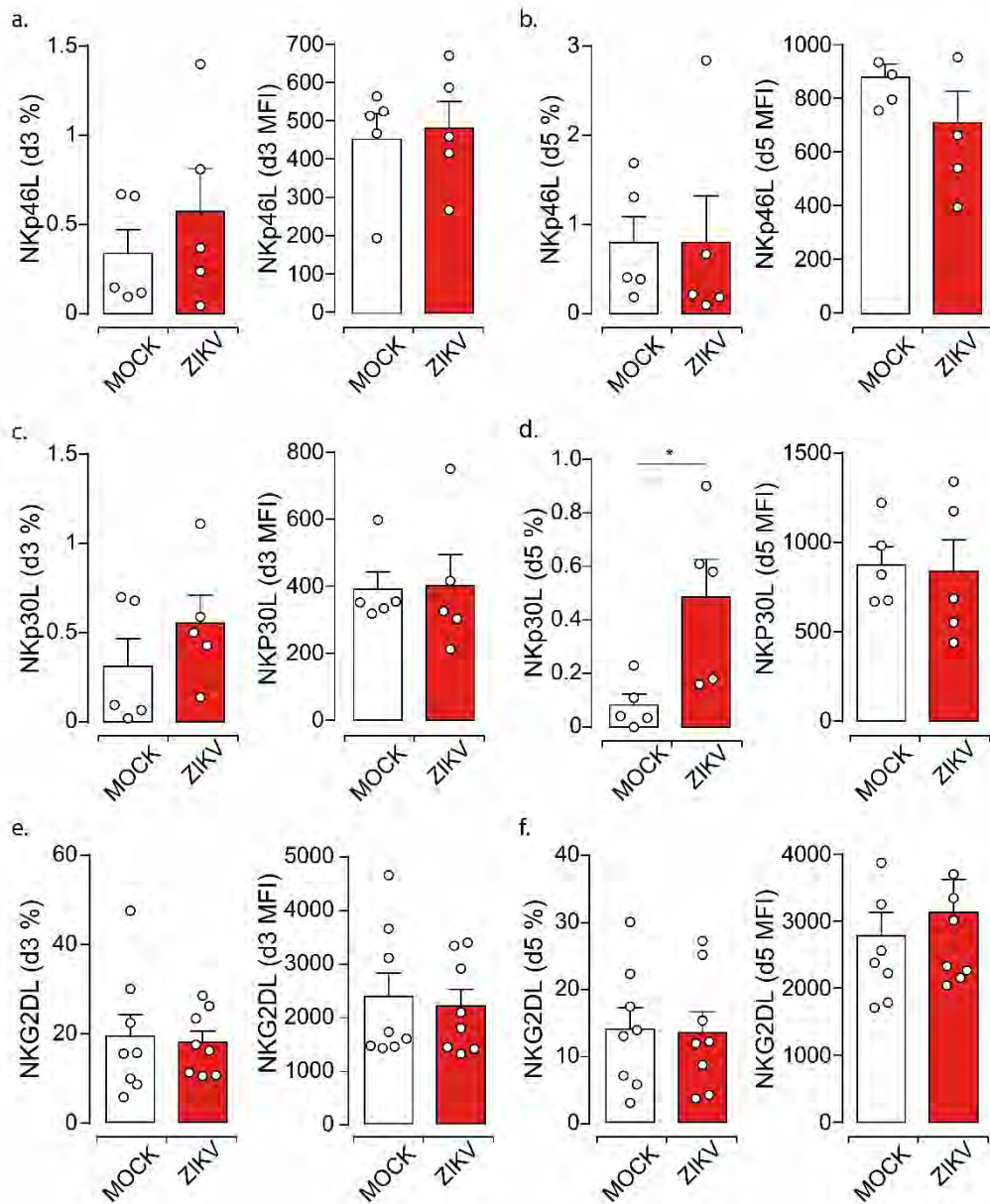
- (2000) 164:805–811. doi: 10.4049/jimmunol.164.2.805
37. Sen Santara S, Crespo AC, Mulik S, Ovies C, Boulenouar S, Strominger JL, Lieberman J. Decidual NK cells kill Zika virus–infected trophoblasts. *Proceedings of the National Academy of Sciences* (2021) 118:e2115410118. doi: 10.1073/pnas.2115410118
  38. Bennett NJ, Ashiru O, Morgan FJE, Pang Y, Okecha G, Eagle RA, Trowsdale J, Sissons JGP, Wills MR. Intracellular Sequestration of the NKG2D Ligand ULBP3 by Human Cytomegalovirus. *The Journal of Immunology* (2010) 185:1093–1102. doi: 10.4049/jimmunol.1000789
  39. Zingoni A, Molfetta R, Fionda C, Soriani A, Paolini R, Cippitelli M, Cerboni C, Santoni A. NKG2D and Its Ligands: “One for All, All for One.” *Front Immunol* (2018) 9: doi: 10.3389/fimmu.2018.00476
  40. Lanier LL, Corliss BC, Wu J, Leong C, Phillips JH. Immunoreceptor DAP12 bearing a tyrosine-based activation motif is involved in activating NK cells. *Nature* (1998) 391:703–707. doi: 10.1038/35642
  41. Bruhns P, Marchetti P, Fridman WH, Vivier E, Daëron M. Differential Roles of N- and C-Terminal Immunoreceptor Tyrosine-Based Inhibition Motifs During Inhibition of Cell Activation by Killer Cell Inhibitory Receptors. *The Journal of Immunology* (1999) 162:3168–3175.
  42. Wu J, Cherwinski H, Spies T, Phillips JH, Lanier LL. Dap10 and Dap12 Form Distinct, but Functionally Cooperative, Receptor Complexes in Natural Killer Cells. *J Exp Med* (2000) 192:1059–1068.
  43. Hershkovitz O, Rosental B, Rosenberg LA, Navarro-Sanchez ME, Jivov S, Zilka A, Gershoni-Yahalom O, Brient-Litzler E, Bedouelle H, Ho JW, et al. NKp44 receptor mediates interaction of the envelope glycoproteins from the West-Nile and dengue viruses with Natural Killer cells. *J Immunol* (2009) 183:2610–2621. doi: 10.4049/jimmunol.0802806
  44. Ngono AE, Shrestha S. Immune Response to Dengue and Zika. *Annu Rev Immunol* (2018) 36:279–308. doi: 10.1146/annurev-immunol-042617-053142
  45. Samuel CE. Antiviral Actions of Interferons. *Clin Microbiol Rev* (2001) 14:778–809. doi: 10.1128/CMR.14.4.778-809.2001
  46. Gao D, Ciancanelli MJ, Zhang P, Harschnitz O, Bondet V, Hasek M, Chen J, Mu X, Itan Y, Cobat A, et al. TLR3 controls constitutive IFN- $\beta$  antiviral immunity in human fibroblasts and cortical neurons. *J Clin Invest* 131:e134529. doi: 10.1172/JCI134529
  47. Patel MV, Hopkins DC, Barr FD, Wira CR. Sex Hormones and Aging Modulate Interferon Lambda 1 Production and Signaling by Human Uterine Epithelial Cells and Fibroblasts. *Front Immunol* (2021) 12:718380. doi: 10.3389/fimmu.2021.718380
  48. Ank N, West H, Bartholdy C, Eriksson K, Thomsen AR, Paludan SR. Lambda Interferon (IFN- $\lambda$ ), a Type III IFN, Is Induced by Viruses and IFNs and Displays Potent Antiviral Activity against Select Virus Infections In Vivo. *J Virol* (2006) 80:4501–4509. doi: 10.1128/JVI.80.9.4501-4509.2006
  49. Jagger BW, Miner JJ, Cao B, Arora N, Smith AM, Kovacs A, Mysorekar IU, Coyne CB, Diamond MS. Gestational stage and IFN- $\lambda$

- signaling regulate ZIKV infection in utero. *Cell Host Microbe* (2017) 22:366-376.e3. doi: 10.1016/j.chom.2017.08.012
50. Casazza RL, Lazear HM, Miner JJ. Protective and Pathogenic Effects of Interferon Signaling During Pregnancy. *Viral Immunol* (2020) 33:3–11. doi: 10.1089/vim.2019.0076
  51. Jena MK, Nayak N, Chen K, Nayak NR. Role of Macrophages in Pregnancy and Related Complications. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)* (2019) 67:295–309. doi: 10.1007/s00005-019-00552-7
  52. Bulmer JN, Williams PJ, Lash GE. Immune cells in the placental bed. *Int J Dev Biol* (2009) 54:281–294. doi: 10.1387/ijdb.082763jb
  53. Dukhovny A, Lamkiewicz K, Chen Q, Fricke M, Jabrane-Ferrat N, Marz M, Jung JU, Sklan EH. A CRISPR Activation Screen Identifies Genes That Protect against Zika Virus Infection. *J Virol* (2019) 93: doi: 10.1128/JVI.00211-19
  54. Chen Q, Gouilly J, Ferrat YJ, Espino A, Glaziou Q, Cartron G, El Costa H, Al-Daccak R, Jabrane-Ferrat N. Metabolic reprogramming by Zika virus provokes inflammation in human placenta. *Nat Commun* (2020) 11: doi: 10.1038/s41467-020-16754-z
  55. Kuchipudi SV. The Complex Role of STAT3 in Viral Infections. *J Immunol Res* (2015) 2015:272359. doi: 10.1155/2015/272359
  56. Stinchcombe JC, Majorovits E, Bossi G, Fuller S, Griffiths GM. Centrosome polarization delivers secretory granules to the immunological synapse. *Nature* (2006) 443:462–465. doi: 10.1038/nature05071
  57. Kuhn JR, Poenie M. Dynamic Polarization of the Microtubule Cytoskeleton during CTL-Mediated Killing. *Immunity* (2002) 16:111–121. doi: 10.1016/S1074-7613(02)00262-5
  58. Szekeres-Bartho J. Regulation of NK cell cytotoxicity during pregnancy. *Reprod Biomed Online* (2008) 16:211–217. doi: 10.1016/s1472-6483(10)60576-7
  59. Zhang X, Wei H. Role of Decidual Natural Killer Cells in Human Pregnancy and Related Pregnancy Complications. *Front Immunol* (2021) 12:728291. doi: 10.3389/fimmu.2021.728291
  60. Vento-Tormo R, Efremova M, Botting RA, Turco MY, Vento-Tormo M, Meyer KB, Park J-E, Stephenson E, Polański K, Goncalves A, et al. Single-cell reconstruction of the early maternal–fetal interface in humans. *Nature* (2018) 563:347–353. doi: 10.1038/s41586-018-0698-6
  61. Wang F, Jia W, Fan M, Shao X, Li Z, Liu Y, Ma Y, Li Y-X, Li R, Tu Q, et al. Single-cell Immune Landscape of Human Recurrent Miscarriage. *Genomics, Proteomics & Bioinformatics* (2021) doi: 10.1016/j.gpb.2020.11.002
  62. Fauriat C, Long EO, Ljunggren H-G, Bryceson YT. Regulation of human NK-cell cytokine and chemokine production by target cell recognition. *Blood* (2010) 115:2167–2176. doi: 10.1182/blood-2009-08-238469
  63. Mansuy JM, Pasquier C, Daudin M, Chapuy-Regaud S, Moinard N, Chevreau C, Izopet J, Mengelle C, Bujan L. Zika virus in semen of a patient returning from a non-epidemic area. *Lancet Infect Dis* (2016) 16:894–895. doi: 10.1016/S1473-3099(16)30153-0

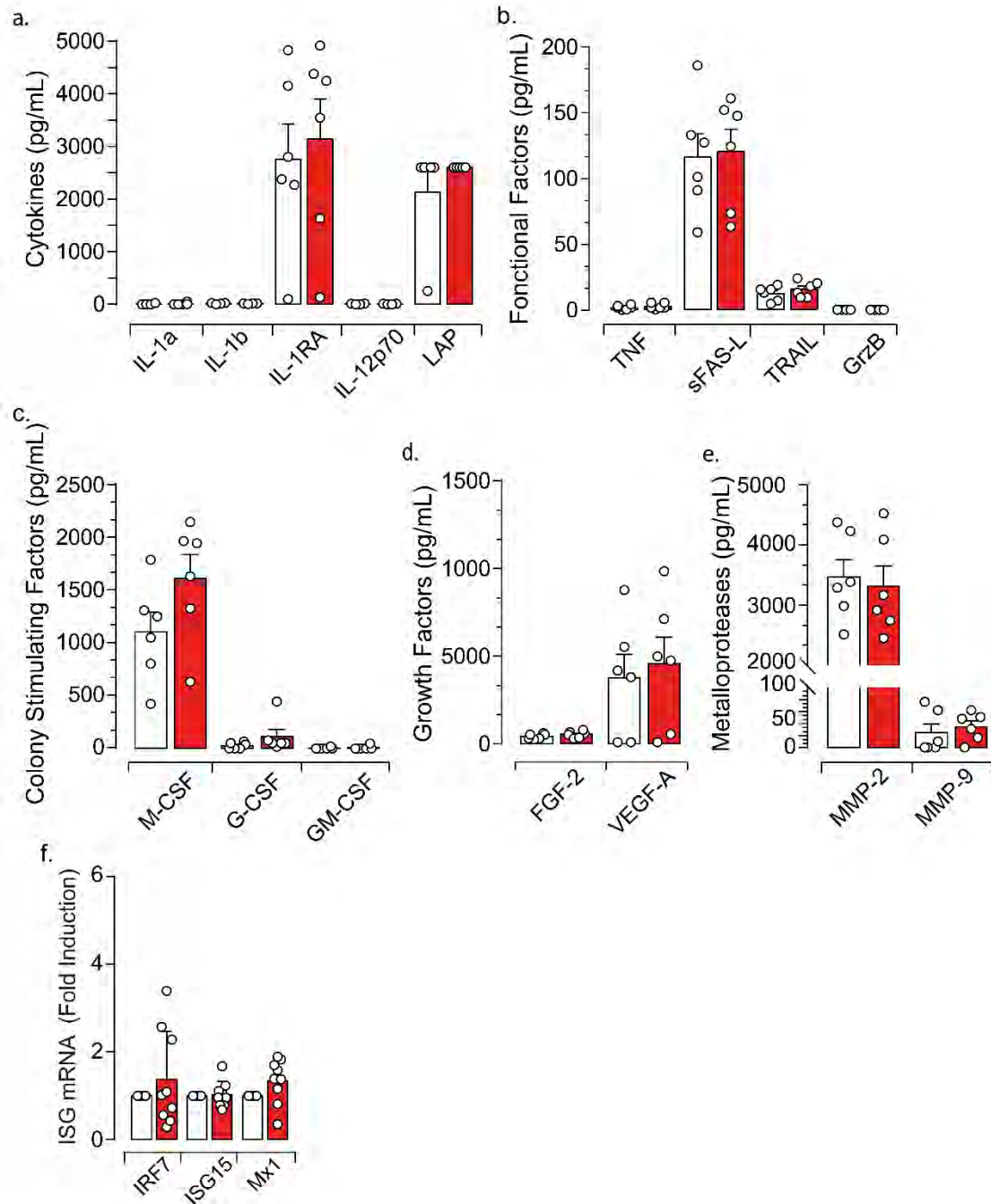
## Supplemental Figures and Figure Legend



**Supplemental Figure 1. ZIKV infection modulates the expression of the classical and non-classical MHC and NKR ligands.** **a.** DSCs were challenged with ZIKV at a MOI of 1. Viral production determined at 5 dpi by flow cytometry using anti-NS3 antibody, followed by fluorochrome-conjugated secondary antibody staining. Uninfected (white dots), ZIKV-infected (red dots) DSCs. **b-d.** Cell surface expression of specific NK cell receptor ligands at 5 dpi determined by FACS on live cells on uninfected (white) and infected (red) DSCs. Percentage and mean fluorescence intensity for the expression of HLA-ABC (b), HLA-E molecules (c) and NKp44 ligands, NKp44L (d). Data sets represent mean values  $\pm$ SEM determined from at least five independent decidua donors. *P* values are computed using paired two-tailed Student's *t*-test. \**p*<0.05, \*\**p*<0.01, \*\*\**p*<0.001.



**Supplemental Figure 2. Modulation of the expression of NKR ligands by ZIKV infection of decidual stroma cells.** a-f. Cell surface expression of specific NK cell receptor ligands at 3 and 5 dpi determined by FACS on live cells on uninfected (white) and infected (red) DSCs. Percentage and mean fluorescence intensity for the expression of NKp46 ligands, NKp46L (a-b), NKp30 ligands, NKp30L (c-d) and NKG2D ligands, NKG2DL (e-f). Data sets represent mean values  $\pm$ SEM determined from at least five independent donors. *P* values are computed using paired two-tailed Student's *t*-test. \**p*<0.05.



**Supplemental Figure 3. Modulation of DSC secretome by ZIKV infection.** DSCs were infected with ZIKV at a MOI of 1 for 24 hours. **a.** Cytokines, **b.** Functional factors, **c.** Colony Stimulating Factors, **d.** Growth Factors and **e.** Metalloproteases quantified in the supernatant using a 42-multi-plexed cytokine assay. **f.** IRF7, ISG15 and Mx1 transcripts quantified using qRT-PCR and specific primers. Representative histograms showing significant differences between secretions of uninfected (white bars) and ZIKV-infected DSCs (red bars) are presented. All data sets were normalized and presented as mean values  $\pm$ SEM from at least six independent donors. Statistical comparisons were performed between uninfected and ZIKV-infected DSCs using a Student's t-test.

## *Discussion*

Les infections congénitales constituent aujourd'hui un des problèmes majeurs de santé publique lors de la grossesse. Induites principalement après rupture de la fonction de protection de la barrière placentaire par les pathogènes de la famille des TORCH, ces infections peuvent être liées à l'apparition de pathologies placentaires et fœtales, qui peuvent avoir des conséquences dévastatrices sur la mère et son enfant et entraîner une mortalité maternelle et fœtale. Les nouveau-nés qui survivent à des grossesses compliquées sont notamment très susceptibles d'être confrontés à des problèmes de développement tout au long de leur vie.

Un des meilleurs exemples pour illustrer cela est la récente épidémie de ZIKV en Polynésie Française et au Brésil, considérée alors comme une urgence de santé publique mondiale. En effet, l'infection par le ZIKV pendant la grossesse a été corrélée à une augmentation inattendue du nombre de cas de microcéphalies congénitales (220,223). Aussi, il a été suggéré que le virus est tératogène pendant la grossesse et il a été rattaché, à ce titre, aux autres pathogènes de la famille des TORCH (162).

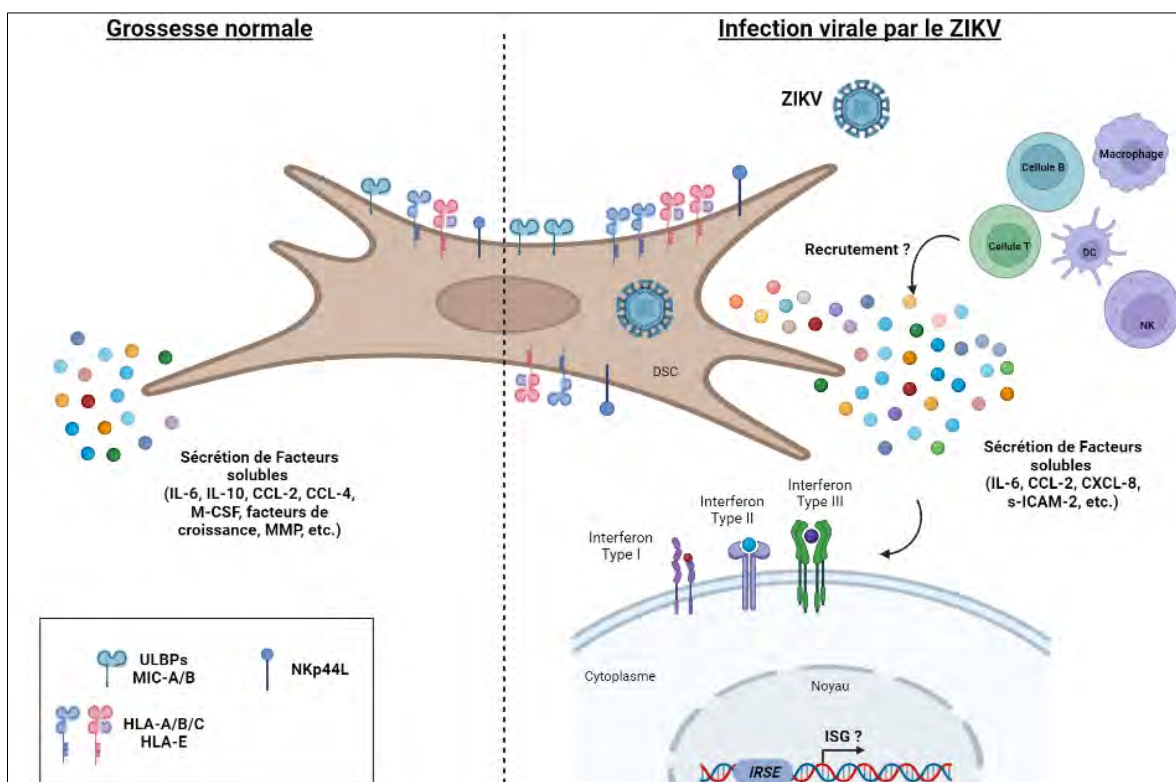
Néanmoins, le taux de transmission du ZIKV de la mère au fœtus lors de la grossesse reste relativement faible, suggérant ainsi le maintien de la fonction de barrière de protection du placenta mais aussi l'existence de mécanismes antiviraux efficaces lors de l'infection. Comme il n'existe aujourd'hui aucune option de traitement disponible pour prévenir les infections congénitales, il est urgent de démêler les mécanismes moléculaires et cellulaires sous-jacents au contrôle de l'infection lors de la grossesse.

Ainsi, mon travail de thèse a consisté à étudier les mécanismes impliqués dans le contrôle de la propagation du ZIKV de la mère au fœtus lors de la grossesse. Nous avons tout d'abord développé un modèle de culture pertinent, qui nous a permis de modéliser l'infection par le ZIKV et d'étudier la réponse dNK *in vitro*. En combinant des approches interdisciplinaires de culture cellulaire, de virologie et d'immunologie, mon travail de doctorat a abordé trois objectifs de recherche clés :

- A. Caractérisation des perturbations du microenvironnement local en contexte d'infection par le ZIKV
- B. Etude du rôle des cellules NK déciduales dans le contrôle de l'infection par le ZIKV
- C. Caractérisation des mécanismes d'entrée du ZIKV

### A. Perturbations du microenvironnement local lors de l'infection par le ZIKV

De nombreuses cellules sont permissives au ZIKV mais les DSC restent les cellules cibles privilégiées. Ainsi, nos résultats indiquent tout d'abord que l'infection de ces cellules par le ZIKV s'accompagne d'une augmentation progressive de l'expression de molécules de CMH-I classiques (HLA-A/B/C) et non classiques (HLA-E) (**Figure 45**). De manière similaire, nous avons démontré que l'infection est associée à une augmentation dans les niveaux d'expression des ligands du récepteur NKp44 (**Figure 45**). En revanche, aucune variation n'est observée dans l'expression des ligands du NKG2D, un récepteur pourtant essentiel dans la résolution des infections par les cellules NK. Nous avons élargi notre étude à la mesure de l'expression des autres ligands des récepteurs NK, notamment le NKp30 et NKp46, impliqués eux aussi dans le contrôle d'autres infections par les Flavivirus (833,959). De la même manière que pour les ligands du NKG2D (ULBPs et MIC-A/B) et du NKp44, cette étude a été réalisée en utilisant des récepteurs chimériques qui se fixent à l'ensemble des ligands correspondant, exprimés par les DSC (885). Contrairement aux ligands du NKG2D et NKp44, les ligands du NKp30 et NKp46 ne sont que faiblement exprimés dans les fibroblastes déciduaux non infectés. De plus, l'infection par le ZIKV n'a pas induit de modifications majeures dans leur expression (**Figure 45**).



**Figure 45 :** Schéma récapitulatif des effets de l'infection par le ZIKV sur les fibroblastes de la decidua. L'infection congénitale est associée à une modification de l'expression des molécules de HLA-I et des ligands de



stress (ligand du NKG2D) et du NKp44 par les fibroblastes. Ces cellules produisent également de nombreux facteurs solubles, qui contribueraient au recrutement des autres cellules du système immunitaire et à la mise en place d'une réponse antivirale médiée par les ISG.

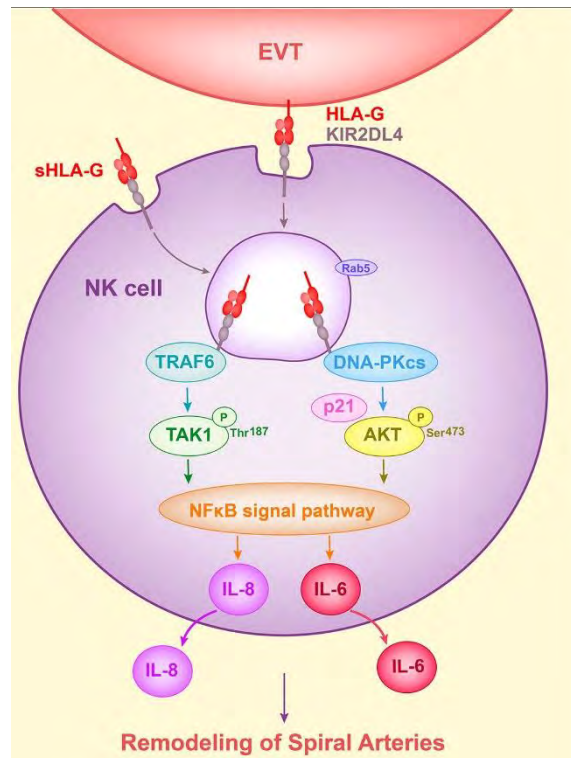
Ces résultats sont en accord avec la plupart des données de la littérature concernant d'autres types cellulaires et d'autres infections virales (482,960,961). Par exemple, il a été démontré que les infections par le VHC ou le VIH sont également liées à une augmentation de l'expression du HLA-E (962,963). Néanmoins, une étude récente, réalisée dans un autre modèle de culture, contredit nos travaux. En effet, cette étude décrit que l'infection par différentes souches du ZIKV n'impacte que très peu l'expression du CMH-I, et plus particulièrement du HLA-E, à la surface des cellules JEG-3 (958). De manière similaire, l'infection par le HCMV est associée à une diminution dans l'expression du HLA-E et plus globalement dans l'expression des molécules de CMH-I (885,964). Ainsi, l'hypothèse privilégiée pour expliquer ces différences serait que l'expression du CMH-I à la surface des cellules cibles serait dépendante du type cellulaire infecté, du pathogène et de la souche virale. Nous envisageons à présent d'utiliser ces cellules JEG-3, pour confirmer cette hypothèse avec notre souche virale.

Aussi, les données de la littérature corroborent en grande partie les observations faites concernant les ligands des récepteurs des cellules NK. Malgré les rôles respectifs du NKp30 et NKp46 dans l'induction de la production de cytokines par les cellules NK et l'induction de leur cytotoxicité, l'absence d'expression des ligands de ces récepteurs en contexte d'infection par le ZIKV suggérerait que ces récepteurs ne sont pas impliqués dans l'acquisition des fonctions effectrices des cellules dNK (881,885). Bien que son expression ne soit pas augmentée en contexte d'infection, le NKG2D est, avec le NKp44, un récepteur plus qu'intéressant dans l'infection par le ZIKV. En effet, alors que certaines études suggèrent que les ligands de ces récepteurs, notamment les ligands de stress, sont massivement induits en condition d'infection (965), d'autres recherches démontrent que l'expression des ligands du NKp44 et du NKG2D est significativement diminuée en contexte d'infection par le HCMV (885). De plus, il est désormais admis que le récepteur NKp44 existe sous différentes isoformes (1 à 3). Or, l'isoforme 1 a le potentiel de double fonction de signalisation, soit *via* le motif ITIM qui agit en envoyant des signaux inhibiteurs à la cellule NK, soit *via* son association avec l'adaptateur DAP12, liant le motif ITAM, qui potentialise l'activation des cellules NK (635,747,748,753). De cette manière, il a été démontré que la fixation du récepteur NKp44 à ses ligands, exprimés par les cellules infectées par le VNO, un autre Flavivirus, stimule la dégranulation des cellules NK et leur sécrétion d'IFN- $\gamma$  (663). Ainsi, l'expression des ligands de ce récepteur pourrait conditionner le profil d'activation des cellules dNK.

Pour conclure, l'expression de l'ensemble de ces ligands pourrait tout d'abord expliquer l'activation des cellules NK et le déclenchement de leurs fonctions effectrices ; mais pourrait aussi constituer un mécanisme d'échappement viral (482). Par exemple, l'augmentation de l'expression du CMH-I, et plus particulièrement des molécules de HLA-E, sur les cellules cibles conditionne la réponse NK. En effet, en se fixant sur NKG2C ou NKG2A, le HLA-E peut aussi bien induire des signaux activateurs qu'inhibiteurs. De plus, il a été montré que le récepteur inhibiteur NKG2A fixe avec une plus grande affinité HLA-E (698,699). Ainsi, on pourrait envisager que les signaux inhibiteurs induits surpassent les signaux activateurs, qui ne sont pas assez forts pour déclencher les fonctions des cellules NK, favorisant ainsi la réplication virale (966).

Il sera également important d'étudier le rôle des autres molécules de HLA dans l'infection par le ZIKV. En effet, il a été démontré que l'interaction du HLA-F avec le récepteur activateur KIR3DS1 permet le contrôle de l'infection par le VHC (967). A l'inverse, le HLA-G pourrait jouer un rôle majeur dans l'induction de l'infection par le ZIKV. Il a notamment été démontré que le HLA-G contribue à la régulation de la réponse immunitaire NK, en se fixant sur son récepteur ILT2 (968,969). L'interaction ILT2/HLA-G inhibe la polarisation des granules lytiques des cellules NK et du MTOC ainsi que l'accumulation de l'actine filamenteuse (F-actine) au niveau de la zone de contact. Ainsi, la fixation d'HLA-G à son ligand limite le potentiel cytotoxique des cellules NK.

De plus, l'expression d'HLA-G est directement corrélée à l'expression du HLA-E à la surface des cellules cibles. En fait, la fonction de HLA-E est de lier des peptides dérivés d'autres molécules HLA de classe I, dont le HLA-G, et de les présenter aux cellules NK. Le HLA-E peut alors interagir soit avec le récepteur inhibiteur CD94/NKG2A, inhibant ainsi la fonction des cellules NK, soit avec le récepteur activateur CD94/NKG2C, permettant ainsi la lyse des cellules cibles par les NK (700,970). Cette dernière fonctionnalité est par exemple utilisée pour activer la lyse des trophoblastes HLA-G<sup>+</sup> par les cellules NK lors de l'invasion placentaire. Le HLA-G participe donc à la protection du fœtus, notamment en contrôlant l'invasion des trophoblastes, en modulant le remodelage tissulaire et en favorisant la mise en place d'un environnement immunosuppresseur (**Figure 46**) (971,972).



**Figure 46 :** Effets de l'interaction du HLA-G avec son récepteur, exprimé à la surface des NK lors de la grossesse. L'interaction du HLA-G avec son récepteur induit leur endocytose dans les endosomes Rab5+ des cellules NK. La voie de signalisation NF- $\kappa$ B est alors induite à la hausse et elle conditionne la mise en place d'un microenvironnement, riche en cytokines, qui contribue à la perméabilité vasculaire, l'angiogenèse et l'invasion des EVT (972).

Nous avons ensuite porté notre attention sur les conséquences de l'infection par le ZIKV sur le microenvironnement local. Nous avons ainsi étudié la sécrétion de différentes cytokines, chimiokines, facteurs de croissance et MMP. Nos travaux suggèrent que l'infection par le ZIKV est associée à de grandes différences dans le microenvironnement à l'interface mère-fœtus.

En effet, l'étude du sécrétome des DSC lors de l'infection par le ZIKV montre que le virus a un impact majeur sur la fonction sécrétrice de ces cellules (**Figure 45**). Tout d'abord, nous avons démontré que l'infection est associée à une augmentation de la sécrétion de nombreuses chimiokines et récepteurs aux chimiokines (CCL-5, CXCL-1, CXCL-8, CXCL-10 et CXCL-2) et de facteurs d'adhésion (s-ICAM-1). L'expression de la plupart des chimiokines est directement liée au recrutement des autres cellules du système immunitaire (LT, macrophages et NK), qui contribuent au remodelage vasculaire utérin et au maintien de la tolérance fœtale. Les chimiokines sont aussi essentielles à la migration et à l'invasion des trophoblastes lors du remodelage vasculaire ainsi qu'à la régulation de l'angiogenèse. Une dérégulation massive de l'ensemble de ces facteurs solubles pourrait donc avoir des conséquences dramatiques sur le bon déroulement de la grossesse, notamment en influençant la survie des cellules trophoblastiques.

Aussi, nous avons démontré que les niveaux d'IL-6 augmentent lors de l'infection par le ZIKV. Ces observations sont en corrélation avec les données que la littérature, qui suggèrent que cette cytokine est davantage produite en contexte d'infections, notamment par le HCMV (973). De plus, l'augmentation des niveaux d'expression de l'IL-6 est associée à une activation de la voie STAT3, un facteur de transcription impliqué dans la régulation de diverses fonctions biologiques, notamment la croissance cellulaire, la différenciation et l'apoptose (974,975). STAT3 joue également un rôle clé dans la régulation des réponses immunitaires et inflammatoires de l'hôte et dans la pathogenèse de nombreuses infections. Plusieurs études ont rapporté une régulation différentielle de STAT3 dans diverses infections virales (975). Par exemple, l'EBV, le VIH, le VHB (virus de l'hépatite B) et le VHC activent la phosphorylation de STAT3 et contribuent à la mise en place d'un microenvironnement pro-inflammatoire ; alors que le virus de la grippe et le métapneumovirus humain (hMPV) inhibent sa phosphorylation. Aussi, le rôle de STAT3 dans la réplication virale est complexe, car STAT3 semble présenter aussi bien des rôles proviraux qu'antiviraux. Finalement, une altération dans la fonction de STAT3 peut entraîner une perturbation de la réponse immunitaire adaptative et de la fonction des lymphocytes T, régulée par ce même facteur (975).

Finalement, nous avons également étudié l'effet de l'infection par le ZIKV sur la production d'interférons par les DSC (**Figure 45**). Dans le contexte de notre étude, il semblerait que l'infection des DSC soit liée à la production d'IFN- $\beta$ , d'IFN- $\lambda$  et d'IFN- $\gamma$ . Ces résultats sont en accord avec les données de la littérature, qui démontrent que l'infection par le ZIKV des cellules de la peau est associée à une augmentation dans l'expression des gènes de l'IFN- $\alpha$  et de l'IFN- $\beta$  (317), ce qui explique l'effet inhibiteur observé sur la réplication virale, effet retrouvé dans d'autres modèles d'étude (976,977).

Par ailleurs, Patel *et al.* ont démontré que les fibroblastes utérins sécrètent de l'IFN- $\lambda 1$  après stimulation par un agoniste viral (978). Ainsi, il a été montré, dans plusieurs études, que l'IFN- $\lambda$  fait partie intégrante de la réponse immunitaire innée aux agents pathogènes viraux (979–981). Par exemple, l'IFN- $\lambda 1$  et l'IFN- $\lambda 2$  réduisent l'infection par le VIH des macrophages et des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> du sang périphérique (980,982–984). De manière similaire, cet interféron joue un rôle antiviral confirmé dans l'infection par le HSV-2. En effet, l'IFN- $\lambda$  endogène et exogène inhibe la réplication virale alors que le blocage de la signalisation des IFN-III entraîne une augmentation de l'infection par le HSV-2 (985). Finalement, la fonction antivirale de l'IFN- $\lambda$  a aussi été montrée lors d'une infection par le ZIKV, dans l'endomètre utérin (986,987).

Finally, the production of IFN- $\gamma$  has also been demonstrated in a culture *in vitro* of DSC (988). The data from the literature show elsewhere that the secretion of IFN- $\gamma$  confers to the placenta of the third trimester an increased resistance to infection by ZIKV (440). In a mouse model, it has been demonstrated that IFN- $\gamma$  induces a long-term antiviral state by blocking the replication of the virus of the vaccine. In mouse fibroblasts, IFN- $\gamma$  hinders the viral replication cycle at the level of the late transcription of genes, acting notably *via* the signaling pathways of JAK2 and STAT1 (989).

These data suggest that IFN products could protect cells, limit the consequences of infection or inhibit viral replication, for example by recruiting immune cells. In addition, it has been shown that the production of most of these interferons is associated with a regulation of the expression of PRRs, such as TLR3, and several ISGs, notably OAS2, ISG15 and MX1 (428,977). The set of ISGs produced in the context of infection, directly linked to antiviral immunity, inhibits then viral replication (317,428,990–993). IFNs could thus constitute, by effect bystander, an alert signal for other non-infected cells in order to prevent viral transmission.

Produced in the pregnant woman, notably by the trophoblasts of the first trimester of pregnancy, the different types of IFN are essential in the limitation of congenital infections as well as in the physiology of healthy pregnancies (987,994). Thus, the use of exogenous interferons in the pregnant woman could allow limiting the pathogenesis associated with infection by ZIKV, bringing it back to a level that would have no harmful effect during pregnancy. It has also been shown that IFN-I are not associated with deleterious consequences during pregnancy (995).

Nevertheless, other studies suggest that IFNs could be harmful in placentation, notably in the context of infection (987,996). For example, the production of IFN- $\gamma$ , associated with a pro-inflammatory immune response of the Th1 type, can contribute to placental lesions at the maternal-fetal interface, and to fetal death observed during congenital infection by ZIKV (987). In addition, the secretion of IFN by the target cells of the virus could constitute a viral escape mechanism. In fact, it has been demonstrated that the secretion of IFN- $\beta$  leads to an increase in the levels of classical HLA molecules, which inhibit the function of NK cells (482). Finally, Santara *et al.* recently demonstrated in a *in vitro* model of infection of JEG-3, highly permissive to ZIKV, that infection is not associated with the secretion of IFN- $\beta$  and consequently with the induction of ISGs,

OAS et Mx1 (958). Ainsi, sous réserve de nouvelles études, il faudra confirmer l'innocuité et l'utilité de ce traitement durant la grossesse (997,998).

### *B. Rôle des cellules dNK dans le contrôle des infections*

L'ensemble de mes travaux de thèse apporte également un nouvel éclairage sur les capacités et les fonctions des cellules dNK dans l'infection par le ZIKV. Nous avons montré, pour la première fois, dans notre modèle *in vitro* d'infection, que les dNK permettent de limiter la production virale dans les DSC autologues infectées par le ZIKV. Ce contrôle de l'infection s'observe à la fois lorsque les dNK établissent un contact direct avec les DSC infectées, mais également en l'absence de contact. Cela suggère que le contrôle passe aussi par la sécrétion de facteurs solubles, constitutivement produits par les cellules dNK. Cependant, nous avons observé que le contrôle de l'infection était optimal lors d'un contact DSC-dNK, ce qui pourrait suggérer que ce mécanisme favoriserait la production des facteurs solubles. Aussi, des expériences supplémentaires sont nécessaires afin de déterminer si le contact cellulaire est associé à une sécrétion plus importante de divers facteurs solubles. Un tel mécanisme pourrait tout d'abord s'expliquer, après contact entre les DSC et les dNK, par la stimulation du récepteur NKp30 reconnu comme le promoteur majeur de la production de cytokines par les cellules NK (809,881) ou encore par l'induction de voies de signalisation impliquées dans la sécrétion de cytokines, dont la voie JAK-STAT, essentielle dans la signalisation d'un grand nombre de cytokines et facteurs de croissance participant à diverses fonctions cellulaires, notamment la réaction immunitaire (999,1000).

Cependant, ce rôle protecteur exercé par les dNK doit s'effectuer de manière précoce. En effet, les dNK ne sont pas capables de contrôler l'infection par le ZIKV lorsqu'elles sont ajoutées plus tardivement au cours de l'infection. Ainsi, la réponse effectrice des dNK empêcherait l'infection de s'installer et de devenir suffisamment forte pour échapper à tout contrôle par le système immunitaire. Ces résultats permettraient aussi d'expliquer le faible taux de transmission du ZIKV de la mère au fœtus lors de la grossesse.

Nous avons alors voulu identifier les mécanismes mis en place dans le contrôle de la réplication virale. Il est connu que lors de l'infection par le HCMV, les cellules dNK sont capables de mettre en place une synapse immunologique, qui déclenche leurs fonctions effectrices, à savoir la production de facteurs solubles et de molécules cytotoxiques (885). Nos résultats indiquent que les dNK, en contact avec des DSC infectées, présentent une réorganisation du cytosquelette d' $\alpha$ -tubuline et une polarisation des granules lytiques, qui forment des conjugués avec les DSC

infectées. Ces données suggèrent ainsi que les dNK sont capables de reconnaître les cellules cibles. Toutefois, il nous reste encore à déterminer si les dNK sont capables d'engager une synapse immunologique avec les cibles, pour ensuite les lyser. Cette réponse cytotoxique peut cependant être délétère et influencer sur le bon déroulement de la grossesse. En effet, les cellules dNK cytotoxiques sont capables de sécréter de grandes quantités de perforine et de granzymes dans leur environnement et une exposition prolongée à ces molécules lytiques peut infliger des dégâts aux cellules fœtales trophoblastiques et conduire à l'apparition de pathologies graves de la grossesse, telles que les avortements spontanés (1001–1003). Ainsi, même si les cellules dNK permettent un contrôle efficace de l'infection et protègent de la transmission verticale, les conséquences de leur réponse effectrice pourraient potentiellement devenir délétères et participer au développement de la pathologie placentaire.

Nous avons également démontré que les facteurs solubles produits de manière constitutive par les dNK pouvaient être un des mécanismes impliqués dans l'inhibition de la propagation du ZIKV à l'interface mère-fœtus. Parmi les candidats potentiels, nous avons porté une attention toute particulière pour l'IFN- $\gamma$ , produit majoritairement par les pNK mais également par les dNK (61,906,1004,1005). Cette cytokine a notamment été montrée comme étant essentielle au contrôle du VIH par les NK (1006). Ainsi, nos résultats suggèrent que l'ajout d'IFN- $\gamma$  dans la culture permet un contrôle efficace de la réplication virale du ZIKV dans les DSC. Néanmoins, nous avons pu déterminer que le contrôle de l'infection par ajout d'IFN- $\gamma$  n'est possible que lorsque la cytokine est ajoutée aux temps précoces de l'infection des DSC. En effet, la réplication virale du ZIKV est maintenue lorsque l'IFN- $\gamma$  est ajouté plus tardivement à la culture, après plusieurs jours d'infection.

De plus, nos premières données montrent aussi que la coculture des dNK avec les fibroblastes autologues infectés par le ZIKV, n'induit pas la sécrétion d'IFN- $\gamma$  par les cellules dNK. Il est donc possible que des mécanismes de rétrocontrôle soient exercés, empêchant la mise en place partielle d'une réponse immune délétère sur le développement placentaire et pour le devenir du fœtus. L'IFN- $\gamma$  est également nécessaire dans les premières étapes de modification du réseau vasculaire utérin. Ainsi, sa sécrétion dans l'utérus gestant doit être étroitement contrôlée. En effet, il a été démontré, dans un modèle souris, que l'excès d'IFN- $\gamma$  aboutit à des avortements spontanés (937).

Nous avons voulu par la suite étudier le potentiel des cytokines produites à contrôler l'infection par le ZIKV. Nous avons montré que l'utilisation de surnageants de coculture inactivés ne permet pas un contrôle efficace de l'infection, suggérant que les facteurs solubles ne constituent

pas un mécanisme clé dans le contrôle de la réplication virale du ZIKV par les dNK. A présent, nous proposons tout d'abord de vérifier que l'infection par le ZIKV est bien associée à l'induction d'une réponse cytokinique. En l'absence de sécrétion de facteurs solubles par les cellules dNK, le contrôle de l'infection en condition de chambre double pourrait s'expliquer par un biais dans notre modèle. En effet, le diamètre des cellules NK est d'environ 6 à 7 $\mu$ M, soit une taille inférieure au filtre utilisé. Le contrôle de l'infection observé s'expliquerait par le passage des dNK dans la chambre double et par un contact modéré des cellules dNK avec les DSC. Aussi, il sera important d'évaluer l'effet de l'inactivation des surnageants sur la fonctionnalité des facteurs solubles. Un dysfonctionnement de ces molécules, du fait de l'inactivation par les UV, pourrait partiellement expliquer l'absence de contrôle de l'infection.

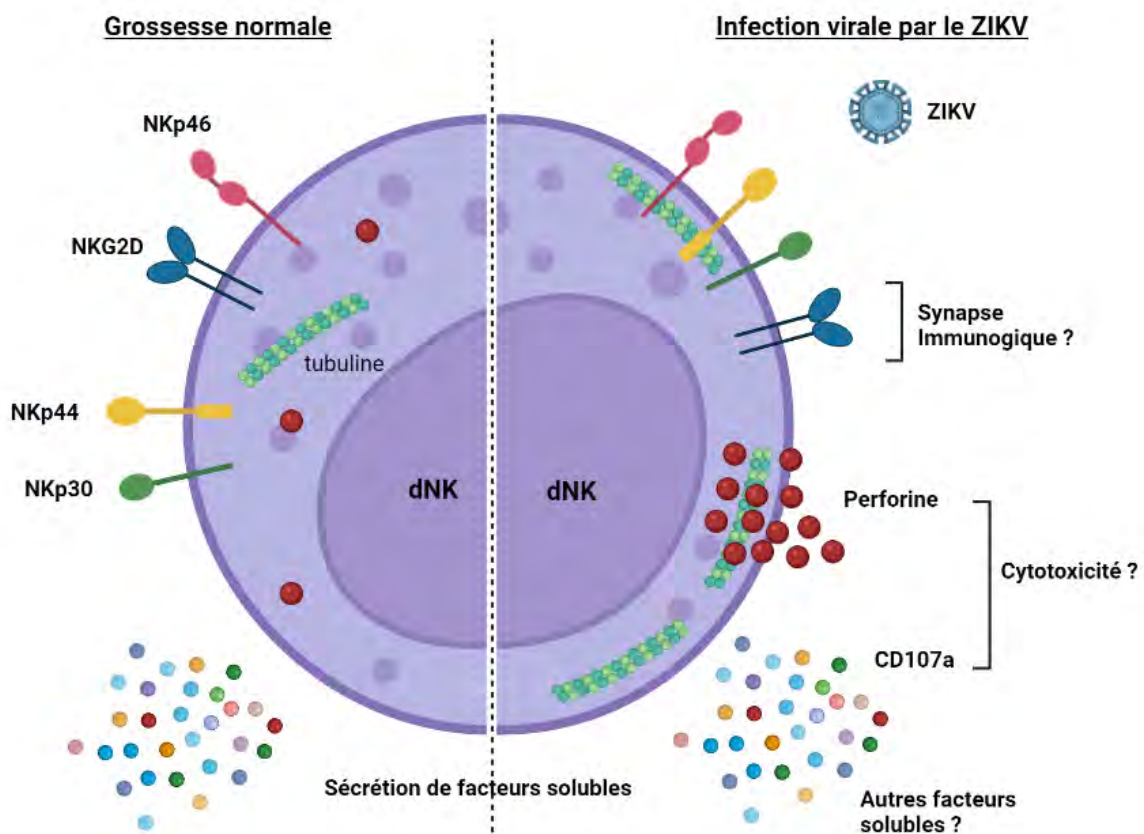
Enfin, nous pouvons émettre l'hypothèse que ces molécules solubles ne participent pas à la réponse effectrice NK en elle-même mais contribuent seulement à l'amplification de la réponse immunitaire totale à l'interface materno-fœtale. En effet, les signaux cytokiniques additionnels induits par l'infection pourraient permettre de potentialiser la réponse des cellules NK, à défaut de l'activer et de la rendre protectrice, notamment en assurant le recrutement d'autres cellules du système immunitaire. En effet, certains de nos résultats montrent que l'infection des DSC par le ZIKV s'accompagne d'une augmentation de la sécrétion de CCL-2, une molécule chimioattractante impliquée dans le recrutement de certaines cellules du système immunitaire, notamment en contexte pathologique ou infectieux (1007,1008). Ainsi, l'infection par le ZIKV pourrait s'accompagner par un recrutement, à l'interface materno-fœtale, de cellules immunes qui renforceraient le contrôle de l'infection.

La prochaine étape consistera à caractériser l'ensemble des facteurs solubles (screening par Luminex) sécrétés par les dNK afin d'identifier les autres cellules immunitaires potentiellement recrutées sur le site de l'infection à l'interface materno-fœtale. L'identification de ces facteurs solubles permettrait également de déterminer si l'infection par le ZIKV est associée à l'induction et la mise en place de voies de signalisation spécifiques, qui faciliteraient ou inhiberaient l'infection par le ZIKV. Par exemple, la production d'IL-6 est associée à la stimulation de STAT3, une voie de signalisation qui présente, selon le contexte viral, des fonctions pro- ou anti-virale (974,975). Aussi, il a été montré que la stimulation des dNK avec une concentration croissante d'anticorps anti-NKp30 est associée à la production d'IFN- $\gamma$  et de TNF- $\alpha$ , deux cytokines qui jouent un rôle majeur dans la clairance virale (1009–1011). De plus, la stimulation des dNK est associée à la sécrétion de CCL-3, CCL-4 et GM-CSF (881). Ainsi, l'étude de ces facteurs solubles serait d'autant plus intéressante puisqu'elle pourrait donner des



indications supplémentaires sur les fonctions particulières de ces cellules lors d'une grossesse pathologique. En effet, il est désormais admis que les chimiokines sécrétées par les cellules dNK sont importantes pour l'attraction du trophoblaste dans la decidua et le remodelage du réseau vasculaire utérin (889,890,908). Ainsi, une modification des quantités de chimiokines sécrétées par les dNK en réponse au ZIKV pourrait indirectement influencer sur le développement foetal et l'apparition des pathologies placentaires telles que l'avortement spontané ou les pré-éclampsies.

Ainsi, malgré l'importance des dNK dans le bon déroulement de la grossesse, dans l'aide à la placentation et dans la protection contre d'autres infections congénitales, leur rôle dans le contrôle de l'infection maternelle par le ZIKV et de la transmission du virus au foetus n'est pas encore pleinement compris (**Figure 47**). Bien qu'il semble que les dNK soient capables de détecter l'infection des cellules déciduales par le ZIKV et de contrôler efficacement la réplication virale, les mécanismes impliqués dans ce contrôle n'ont pas encore totalement été identifiés.



**Figure 47 :** Schéma récapitulatif des cellules dNK au cours d'une grossesse saine et d'une infection congénitale par le ZIKV. 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 foetale, par l'engagement des récepteurs qu'elles expriment à leur surface. Au cours d'une infection congénitale par le ZIKV, les cellules infectées modulent l'expression des ligands des récepteurs des cellules dNK. Les cellules

dNK présentent un changement dans leur répertoire de récepteurs cellulaires et exercent leur activité cytotoxique contre les cellules infectées pour limiter la propagation du virus.

### C. Mécanismes d'entrée du ZIKV

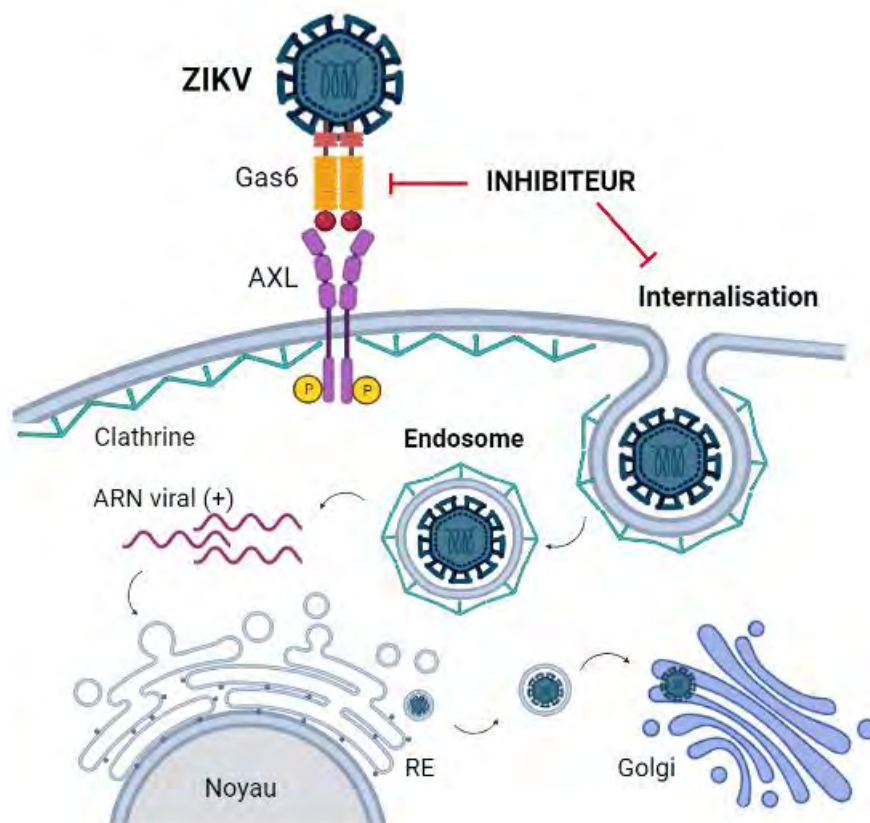
L'infection par le ZIKV a été liée à plusieurs troubles neurologiques, dont le SGB, la méningo-encéphalite et la myélite (221,378–380). Chez la femme enceinte, l'infection est aussi associée à des anomalies fœtales, à une microcéphalie congénitale et à des avortements spontanés (220,223). Ainsi, le ZIKV a été détecté dans les tissus cérébraux fœtaux et dans le liquide amniotique (223,254), preuve de la transmission verticale du ZIKV. Ces observations pourraient donc expliquer partiellement les anomalies fœtales et les défauts de développement cérébral chez le nouveau-né (1012,1013). Compte tenu de l'étiologie associée à l'infection par le ZIKV, l'identification des facteurs d'entrée du virus représente ainsi un défi majeur dans la compréhension de sa pathogenèse et de son large tropisme.

Il est désormais admis que plusieurs récepteurs, dont DC-SIGN et les récepteurs de la famille des TAM, jouent un rôle majeur dans l'entrée virale des Flavivirus (317,320,325). De plus, il a été démontré que ces récepteurs contribuent à l'infection par le ZIKV des cellules placentaires de l'interface materno-fœtale (320). Ainsi, pour déterminer si les cellules de l'interface materno-fœtale, dont les fibroblastes déciduaux, expriment l'ensemble de ces récepteurs, nous avons mesuré les niveaux d'expression des récepteurs Tyro 3, DC-SIGN et Axl à la surface des DSC. Nous avons pu déterminer que les fibroblastes expriment de manière endogène Axl mais pas DC-SIGN ni Tyro 3. De cette manière, Axl, dont l'expression a été confirmée par Western Blot et microscopie confocale, pourrait contribuer à l'infection des fibroblastes déciduaux par le ZIKV et participer à la pathogenèse du virus à l'interface materno-fœtale.

Nous avons pu vérifier l'implication d'Axl dans l'entrée du ZIKV à l'interface materno-fœtale, en utilisant un inhibiteur neutralisant qui entre spécifiquement en compétition avec le virus, en fixant la protéine adaptatrice Gas6 (**Figure 48**) (1014). En effet, le ZIKV se lie indirectement à Axl *via* Gas6, son ligand naturel, qui reconnaît la PS exposée à la surface de l'enveloppe virale et relie la particule virale au récepteur Axl (348). L'utilisation de cet inhibiteur réduit considérablement l'infection des DSC, ce qui nous a permis de démontrer le rôle crucial d'Axl dans l'entrée du ZIKV dans les DSC. Ces résultats sont en accord avec des données de la littérature concernant d'autres types cellulaires. Il a en effet été démontré que l'expression ectopique d'Axl après transfection confère une sensibilité au ZIKV dans des cellules habituellement peu sensibles (317). De plus, il a été montré que les cellules progénitrices neurales humaines, qui soutiennent l'infection du ZIKV, expriment également Axl, tout comme

les cellules gliales radiales, les astrocytes et les cellules microgliales (312,1012,1013,1015,1016). Ainsi, le tropisme du ZIKV pourrait expliquer son étiologie, et notamment l'apparition de nombreuses pathologies neurodégénératives.

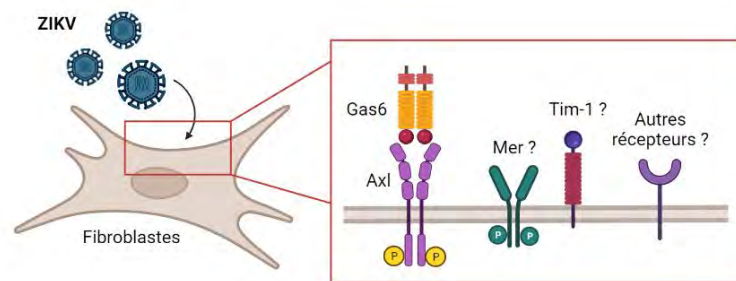
Néanmoins, nous avons pu déterminer que le contrôle de l'infection par blocage du récepteur d'entrée n'est possible que lorsque l'inhibiteur est ajouté avant infection des DSC par le ZIKV ou à des temps précoces de l'infection. En effet, la réplication virale du ZIKV est maintenue lorsque l'inhibiteur est ajouté plus tardivement à la culture, après infection. Ces résultats sont cohérents avec la biologie de l'inhibiteur, qui agit directement sur l'entrée virale en entrant en compétition avec l'adaptateur Gas6. Ainsi, un blocage précoce de ce récepteur d'entrée empêcherait donc l'infection des cellules cibles.



**Figure 48 :** Effet de l'inhibiteur d'Axl sur l'entrée du ZIKV et sa réplication virale. L'inhibiteur agit en compétition avec Gas6. En conséquence, le ZIKV n'est plus capable de lier Axl, ce qui limite son entrée médiée par les clathrines, dans les cellules cibles. L'inhibiteur agit donc directement sur l'entrée virale mais également sur la réplication du virus et sa propagation aux autres cellules.

Par ailleurs, l'absence d'expression des autres récepteurs à la surface des DSC confirme les résultats obtenus avec l'inhibiteur compétiteur de Gas6, qui suggèrent le rôle exclusif du récepteur Axl dans l'entrée du ZIKV à l'interface materno-fœtale, sans qu'aucun autre récepteur ne puisse permettre de rendre la cellule permissive. Il faudra maintenant élargir cette

étude pour pouvoir identifier l'expression sur les DSC des autres récepteurs de la famille des TAM (Mer) et des TIM (Tim-1), dont le rôle dans l'entrée virale a été démontrée pour de nombreux autres virus de la famille des Flavivirus, dont le DENV et le ZIKV (**Figure 49**) (320,325,328). Nous proposons à présent de contrôler l'expression des divers récepteurs à la surface des DSC et de confirmer leur rôle dans l'entrée du ZIKV en bloquant ces protéines sur les différentes cellules cibles et en mesurant l'infection de cellules non permissives dans lesquelles nous exprimerons les différents récepteurs.



**Figure 49 : Expression des récepteurs du ZIKV sur les DSC.** Il est admis que le récepteur Axl est fondamental dans l'entrée virale du ZIKV. Néanmoins, les récepteurs de la famille des TAM (Mer) et TIM (Tim-1) pourraient aussi être impliqués dans l'entrée du ZIKV dans les cellules de l'interface materno-fœtale.

#### D. Autres perspectives

##### a. Modifications du phénotype des dNK en contexte d'infection par le ZIKV

En plus d'appréhender le rôle des dNK dans l'infection par le ZIKV, nous avons cherché à caractériser les conséquences de la reconnaissance des cellules infectées sur le phénotype et la fonctionnalité des cellules dNK.

Au niveau du site d'implantation et à l'état basal, la majorité des cellules dNK, qui sont CD56<sup>bright</sup>, partagent des similitudes phénotypiques avec les cellules NK du sang périphérique (pNK) (61,880). En effet, les cellules dNK expriment la plupart des récepteurs activateurs et inhibiteurs des cellules NK, notamment les récepteurs de cytotoxicité naturelle (NCR) NKp44, NKp30 et NKp46, les récepteurs NKG2C, NKG2D, NKG2A, et les KIR tels que KIR2DL1, KIR2DL2/3, KIR2DL4, KIR3DL2 (38,881,1017,1018). Ces récepteurs transduisent en permanence des signaux qui modulent et régulent leurs fonctions effectrices (881,885). Les cellules dNK expriment également des niveaux élevés de marqueurs de résidence tissulaire tels que le CD18, CD103 et CD39 ainsi que plusieurs récepteurs de chimiokines (CXCR3, CXCR4, CCR1 et CCR9) qui leur confèrent une grande mobilité, justifiant ainsi le dialogue qu'elles établissent avec d'autres cellules de l'interface materno-fœtale (882–884).

Les différences fonctionnelles observées entre les cellules dNK et pNK peuvent donc s'expliquer par l'expression et l'engagement de récepteurs aux fonctions différentes. Ainsi, alors que ces dNK disposent de toute la machinerie cellulaire nécessaire à la cytotoxicité, elles n'en restent pas moins non cytotoxiques lors d'une grossesse saine. L'absence de cytotoxicité est attribuée à une polarisation défectueuse du MTOC, entraînant la formation d'une synapse immunologique immature (910), mais également au recrutement des récepteurs inhibiteurs 2B4 et CD94/NKG2A (881,900,911). La sécrétion de VEGF par les cellules dNK exerce également un rétrocontrôle négatif sur la réponse dNK, augmentant l'expression des molécules de CMH-I à la surface des cellules cibles, inhibant ainsi l'activation des dNK et l'acquisition de leurs fonctions lytiques après engagement de récepteurs inhibiteurs (912,913). Enfin, les trophoblastes expriment des inhibiteurs d'apoptose tels que le XIAP et les serpinines, qui inhibent l'activité des granzymes et protègent les cellules cibles contre la lyse induite par les cellules dNK (914,915).

Des travaux précédents sur le HCMV ont néanmoins permis de démontrer une grande plasticité fonctionnelle des cellules dNK ainsi que divers changements dans leur répertoire (38,885). De plus, il est admis que de nombreuses infections virales, notamment par le ZIKV, sont associées à une perturbation dans le microenvironnement cytokinique local, qui pourrait impacter directement le répertoire des cellules dNK. L'altération du répertoire pourrait alors constituer un mécanisme d'échappement viral, comme suggéré dans la littérature (961). Par exemple, l'infection par le VHC est associée à une diminution dans l'expression et la capacité d'activation des cellules NK *via* le récepteur NKp30 (961,1019,1020). De manière similaire, l'infection par le VHB est caractérisée par une diminution dans l'expression des récepteurs NKG2D et 2B4 (1021). La modulation du répertoire NK serait donc pathogène-dépendant et pourrait favoriser aussi bien la clairance virale que la persistance du virus et le passage vers la chronicité.

Nos expériences préliminaires ne nous permettent pour l'instant pas de déterminer si la réplication virale du ZIKV dans les DSC est associée ou non à des modifications dans la fonctionnalité et le phénotype des cellules dNK. En effet, les variations observées pour les différents marqueurs étudiés peuvent être liées soit au stress des cellules dNK au contact des fibroblastes autologues infectés ou non, soit à l'infection en elle-même par le ZIKV. Nos données semblent néanmoins suggérer qu'il existe des disparités dans la fonction des différentes sous-populations de dNK lors de l'infection par le ZIKV. Il faudra cependant reproduire ces

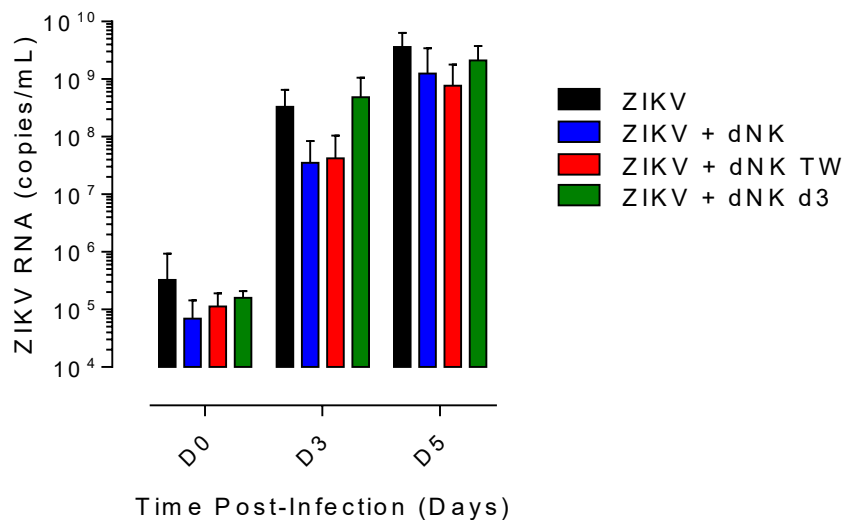
expériences en testant un panel de donneurs plus large afin d'établir un profil plus clair pour chacune des sous-populations de cellules dNK en contexte d'infection par le ZIKV.

L'augmentation de l'expression de ces divers récepteurs constituerait une piste solide dans l'induction et la régulation de la fonction des cellules dNK lors de l'infection par le ZIKV, d'autant plus que les ligands de ces récepteurs sont constitutivement exprimés par les DSC et le sont plus encore en contexte d'infection (809,961,1022). Or, pour certains donneurs, nous avons pu noter que les dNK ne contrôlent pas l'infection par le ZIKV. Ainsi, une étude comparative entre donneurs permettrait de déterminer si ce défaut dans la fonctionnalité des dNK pourrait s'expliquer par une différence dans l'expression des récepteurs des dNK ou encore de leurs ligands.

De plus, la modification du répertoire dNK pourrait également modifier le dialogue qui s'établit entre les cellules dNK et les cellules trophoblastiques. Les cellules dNK reconnaîtraient alors les cellules trophoblastiques comme dangereuses, ce qui impacterait leur capacité à envahir la decidua. Cette hypothèse semble être confirmée lors de l'infection par le HCMV, pendant laquelle le virus module l'expression des KIR (696). Or la reconnaissance des molécules HLA exprimées sur les cellules fœtales par les KIR maternels est nécessaire au succès de l'implantation et de la placentation. Ainsi, des défauts dans la liaison récepteurs-ligands peuvent expliquer les pathologies de la grossesse, telles que la pré-éclampsie, des avortements spontanés, ou des retards de croissance intra-utérin (1023).

#### b. Interaction avec les macrophages décidaux

Bien que les cellules dNK représentent les cellules immunes maternelles majoritaires dans la decidua au premier trimestre de grossesse, d'autres cellules immunitaires y sont retrouvées. Par exemple, les macrophages décidaux comptent pour environ 20% des leucocytes présents au niveau du lit placentaire, représentant ainsi la deuxième population majeure à l'interface materno-fœtale. Il serait donc intéressant d'étudier l'apport de ces macrophages dans la réponse immune anti-ZIKV, tant dans l'aide qu'elles peuvent apporter aux cellules NK qu'au contrôle de leur réponse. En effet, nos données préliminaires semblent suggérer que le contrôle de l'infection par le ZIKV est optimal lorsque les dNK ont été pré-cultivées avec les macrophages décidaux (**Figure 50**).

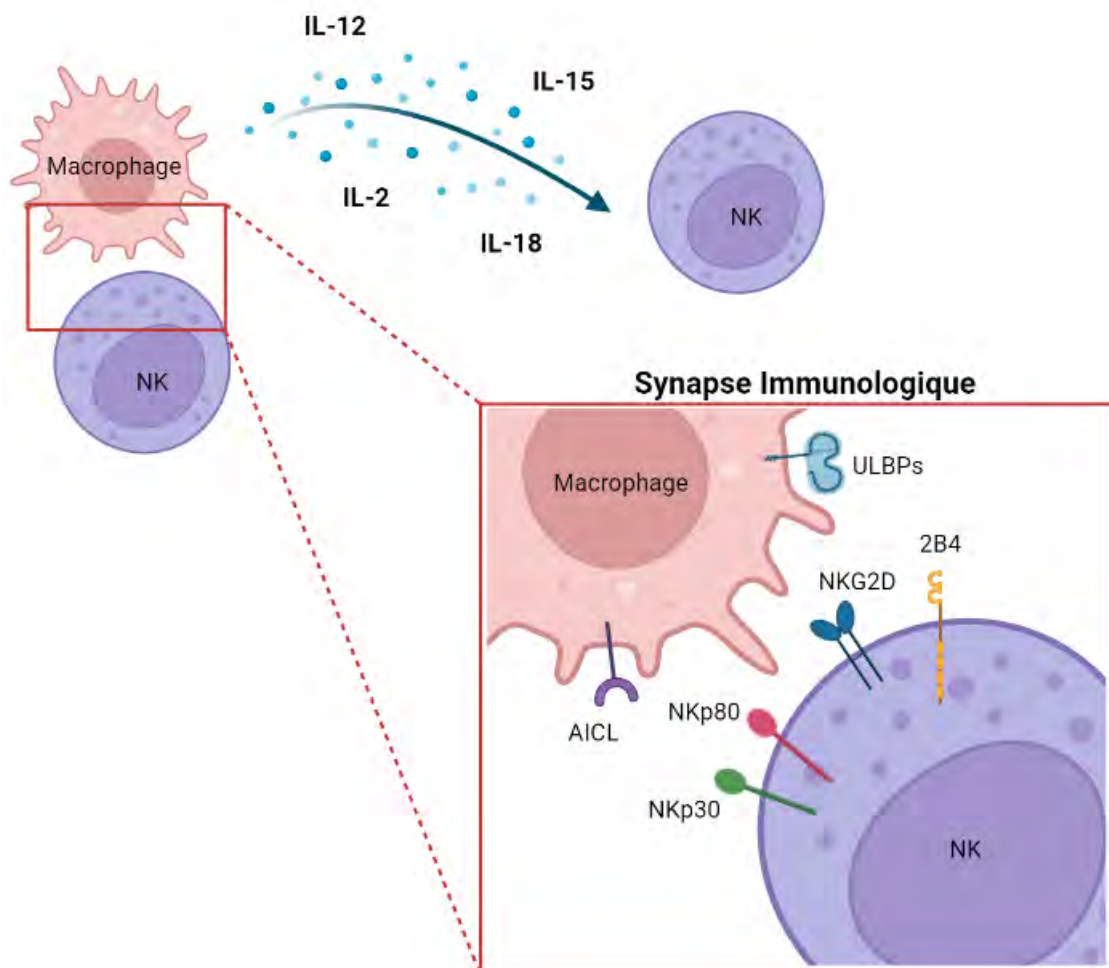


**Figure 50 : Contrôle de l'infection par le ZIKV en l'absence de macrophages déciduaux.** Les DSC ont été infectées par le ZIKV à une MOI de 1. Après l'infection, les cellules ont été lavées et remises en culture seules (en noir) ou en présence de cellules dNK autologues déplétées au préalable des macrophages déciduaux autologues. Les cellules dNK ont été rajoutées en co-culture directe (en bleu), séparées des DSC par un transwell (en rouge) ou ajoutées plus tardivement à la culture, après 3 jours d'infection (en vert). La cinétique de production virale du ZIKV a ensuite été déterminée par qRT-PCR. n=4 donneurs.

Ces résultats sont en accord avec des données de la littérature, qui suggèrent que les macrophages jouent un rôle majeur dans le « priming » et l'activation des cellules NK (**Figure 51**). Il a en effet été démontré que les macrophages sécrètent de nombreuses cytokines et facteurs solubles qui sont essentiels à la maturation des cellules NK ainsi qu'à l'acquisition de leurs fonctions effectrices. Le « priming » des NK par les macrophages s'explique également par l'établissement entre les deux types cellulaires d'une synapse immunologique, caractérisée par une accumulation de NKG2D et son adaptateur DAP10. Aussi, les macrophages expriment à leur surface les ULPBs, les ligands du NKG2D, notamment en contexte d'infection, qui conditionnent l'activation et la fonctionnalité des cellules NK (1024). De manière similaire, il a été montré que l'interaction entre le Nkp80 et AICL, un récepteur exprimé sur les macrophages, module également l'activation des NK. Cette modification dans le statut d'activation des NK pourrait donc s'expliquer en partie par une augmentation dans l'expression de leurs récepteurs activateurs (1025). L'activation des NK par les macrophages a également été associée à une stimulation de leur cytotoxicité, induisant leur dégranulation. Le récepteur principalement mis en jeu est le Nkp80 (1025,1026). Finalement, les macrophages activent la prolifération des cellules NK et leur production de cytokines, dont l'IFN- $\gamma$ , en fixant le récepteur 2B4 exprimé par les NK (1025).

En contexte d'infection par le VIH, il a été démontré que l'interaction macrophages-dNK est fondamentale pour la mise en place d'un contrôle optimal de l'infection (1006). En effet, les dNK exercent un rétrocontrôle sur les macrophages et favorisent un switch vers un phénotype M1 de ces cellules qui sont alors plus aptes à contrôler l'infection.

Malgré l'ensemble de ces données, le rôle des macrophages dans l'infection par le ZIKV n'est pas encore pleinement compris. En effet, notre équipe a démontré que ce type cellulaire était hautement permissif au ZIKV (259). Ainsi les macrophages pourraient davantage contribuer à la propagation de l'infection à l'interface materno-fœtale plutôt qu'à son contrôle, favorisant ainsi la transmission congénitale au fœtus.



**Figure 51 : Schéma récapitulatif des interactions entre les cellules dNK et les macrophages.** L'activation des cellules NK et l'acquisition de leurs fonctions effectrices dépend du « priming » par les macrophages. Ce « priming » requiert la sécrétion de facteurs solubles spécifiques (interleukines) ainsi que la mise en place d'une synapse immunologique, qui met en jeu le complexe NKG2D-DAP10-ULPBs ainsi que les récepteurs NKp30, NKp80 et 2B4.

D'autres cellules sont également présentes à l'interface materno-fœtale, telles que les ILC, les LT ou les DC. Néanmoins, compte tenu de leur faible proportion lors de la grossesse (inférieur



à 5%), leur rôle dans la fonctionnalité des dNK, et par conséquent dans l'infection par le ZIKV, n'est pas encore pleinement compris.

L'interaction des dNK avec les cellules dendritiques déciduals (dDC) pourrait cependant contribuer à la réponse immunitaire anti-ZIKV observée à l'interface materno-fœtale. En effet, de nombreuses études démontrent que les DC jouent un rôle majeur dans l'activation des cellules NK périphériques. Le « priming » des NK par les DC requiert l'engagement de molécules de surface (607,608) mais également la sécrétion de facteurs solubles, qui participent notamment à l'acquisition de leurs fonctions effectrices (609–613).

De manière similaire, lors de la grossesse, il est largement admis que les dDC contribuent à l'activation des cellules dNK. Il a en effet été démontré que la production d'IL-15, IL-12 et IL-18 par les dDC induit le recrutement des dNK, leur maturation et leur prolifération ainsi que l'acquisition de leurs fonctions effectrices, dont la production d'IFN- $\gamma$  (623,1027,1028). Karsten *et al.* ont ainsi démontré que les sites d'implantation dépourvus de dDC sont caractérisés par des niveaux d'IL-15 plus faibles et par une diminution du nombre de cellules NK, qui sécrètent également moins d'IFN- $\gamma$  (1029). A l'inverse, en contexte d'infection, Liu *et al.* ont démontré que la production accrue d'IFN- $\gamma$  par les NK après interaction avec les dDC est associée à l'augmentation de l'expression du NKG2D sur les NK, qui deviennent davantage cytotoxiques (1030).

### c. Métabolisme à l'interface mère -fœtus

Une autre piste dans la régulation de la fonction des cellules NK de la decidua serait le métabolisme cellulaire, qui conditionne une réponse immunitaire réussie. Il est connu que le métabolisme joue un rôle majeur dans l'acquisition des fonctions effectrices des cellules immunes, notamment en contexte d'infection (1031,1032). Par exemple, Mah *et al.* ont démontré le rôle central de la glycolyse dans la défense contre l'infection par le MCMV, une inhibition de la glycolyse étant liée à une inhibition de la clairance des cellules infectées par le MCMV par les cellules NK et une perte dans le contrôle de la virémie, associées à une diminution dans la survie des souris (1033). Les données de la littérature démontrent par ailleurs que les changements de microenvironnement, induits notamment en contexte d'infection, provoquent une altération de la machinerie métabolique et l'acquisition d'une configuration métabolique spécifique d'un état d'activation, à savoir une expression plus importante de marqueurs spécifiques, des enzymes glycolytiques et des transporteurs de glucose (486,487).

De plus, la masse mitochondriale est augmentée. En conséquence, une augmentation simultanée de la glycolyse et de l'OXPHOS se produit.

A l'état basal, les cellules NK quiescentes ont un faible métabolisme, caractérisé par l'activation de l'OXPHOS. Pour activer leurs fonctions effectrices, il a été démontré que les NK utilisent simultanément la glycolyse et la respiration mitochondriale. En effet, l'induction de ces deux voies du métabolisme est associée à la synthèse des molécules effectrices/cytotoxiques et, par conséquent, à l'augmentation de la cytotoxicité des cellules immunes. De la même manière, une augmentation de la glycolyse et une stimulation de la voie mitochondriale sont associées à la production de cytokines dont l'IFN- $\gamma$  (1034). Les NK qui ne peuvent pas maintenir des taux élevés de glycolyse ou de l'OXPHOS présentent des réponses effectrices altérées.

Alors que la plupart des études métaboliques ont été réalisées sur les cellules pNK du sang, il a été démontré très récemment que ces observations dans les changements métaboliques peuvent également être étendus aux cellules NK tissulaires résidentes (1035). De manière similaire, il est désormais admis que le métabolisme joue un rôle majeur dans le développement, la différenciation et la maturation des cellules NK, ainsi que dans l'établissement d'une mémoire NK (1031,1032,1036,1037).

A l'interface materno-fœtale, peu de données ont été établies concernant le profil métabolique des dNK. Des études récentes suggèrent néanmoins que les NK CD56<sup>bright</sup> sont plus susceptibles aux changements métaboliques. De plus, le sous-type cellulaire dNK1 des cellules NK de la decidua présenterait un métabolisme glycolytique actif, associé à des taux élevés de glycolyse ou de l'OXPHOS (883,884).

Ainsi, dans l'optique de mieux caractériser le métabolisme des cellules dNK lors d'une infection par le ZIKV, nous caractériserons par PCR par exemple l'expression de gènes de la glycolyse et de la voie mitochondriale. Nous confirmerons ces résultats par Seahorse, en étudiant les paramètres clés de la fonction mitochondriale et de la glycolyse. Nous mesurerons directement le taux de consommation d'oxygène (OCR) et le taux d'acidification extracellulaire (ECAR). Nous utiliserons ensuite des inhibiteurs spécifiques de ces voies de signalisation afin de confirmer leur rôle dans l'acquisition des fonctions effectrices chez les dNK. Le 2-Désoxy-D-Glucose (2DG) et l'oligomycine seront utilisés respectivement pour bloquer la glycolyse et la voie mitochondriale.

#### d. Souche Africaine du Virus Zika

L'émergence mondiale du ZIKV a révélé la capacité sans précédent d'un virus transmis par les moustiques à provoquer des infections congénitales et induire des malformations notamment chez le fœtus. Un aspect déroutant de l'émergence du ZIKV est que toutes les épidémies humaines et malformations congénitales ont été exclusivement associées à la lignée asiatique du ZIKV (1038,1039), malgré un nombre croissant de preuves indiquant une transmissibilité et une pathogénicité plus élevées de la souche africaine par rapport à son homologue asiatique (1038). Il a été montré que l'infection *in vitro* de cellules humaines par diverses souches africaines du ZIKV provoque des infections plus productives et plus mortelles que les souches asiatiques (1040–1042). De plus, de nombreuses études ont fourni des preuves expérimentales claires indiquant que les souches africaines récentes sont plus transmissibles *via* le moustique (1043–1047). Aussi, dans un modèle murin, l'infection par les diverses souches africaines est associée à une pathologie plus grave pour les souris adultes immunodéprimées. De manière similaire, l'infection provoque une mort embryonnaire massive chez les embryons de souris immunocompétentes infectées *in utero* par injection intraplacentaire (261,1048–1053). Finalement, des résultats équivalents ont été observés dans un modèle porcin d'infection par le ZIKV (1054).

Ainsi, bien que les souches africaines de ZIKV n'aient jusqu'à présent jamais été associées à des épidémies humaines de ZIKV, ces résultats suggèrent qu'elles peuvent avoir un plus grand potentiel épidémique que les souches asiatiques si elles sont exportées vers des régions endémiques. De plus, l'infection par les souches africaines de ZIKV peut échapper plus facilement aux systèmes de surveillance compte tenu du fait qu'elle peut être associée à des caractéristiques cliniques distinctes, à savoir l'induction d'une létalité fœtale plutôt que des malformations congénitales. Une implication importante de cette étude est que la lignée africaine du ZIKV devrait être considérée comme une menace majeure pour la santé publique. En effet, bien que l'émergence mondiale du ZIKV a sensibilisé la communauté internationale, ce qui a permis d'améliorer la surveillance de ce virus, il n'existe encore à ce jour aucun traitement préventif, vaccin ou traitement de fond qui pourrait éviter la transmission ou encore soigner la maladie associée à l'infection. Par conséquent, il devient plus urgent de mieux caractériser la pathogenèse des différentes souches du virus afin de mieux appréhender les futures épidémies.

Considérant l'ensemble des données expérimentales et bien qu'aucune étude ne démontre un effet de l'infection par les souches africaines sur la grossesse humaine, il sera intéressant de caractériser la pathogenèse du ZIKV africain à l'interface materno-fœtale afin de la comparer à son homologue asiatique. Nous proposons tout d'abord de déterminer si les souches africaines du ZIKV utilisent également le récepteur Axl dans leur processus d'entrée virale. Nous pourrions ainsi envisager d'utiliser le peptide inhibiteur comme une thérapie potentielle pour limiter l'infection des cellules déciduales. De plus, nous chercherons à identifier l'effet de l'infection sur le microenvironnement décidual afin de caractériser son impact sur le recrutement des cellules du système immunitaire et plus particulièrement des cellules NK déciduales. Finalement, nous identifierons, de manière similaire à la souche asiatique, le rôle des cellules dNK dans le contrôle et/ou l'induction de l'infection par le ZIKV. Les mécanismes impliqués dans le contrôle de la réplication virale seront également caractérisés à l'interface materno-fœtale. De cette manière, nous pourrions fournir une étude comparative de l'infection par deux différentes souches du ZIKV à l'interface materno-fœtale.

### ***Conclusion***

Pour conclure, cette thèse représente un intérêt à la fois sur le plan fondamental et clinique pour établir de nouvelles stratégies thérapeutiques pour limiter l'infection par le ZIKV. Nous avons pu identifier un nouveau mécanisme immunitaire, médié par les dNK, impliqué dans le contrôle de l'infection par le ZIKV. Compte tenu de nos résultats, nous pourrions également étendre notre modèle à d'autres virus, afin de prévenir les infections congénitales lors de la grossesse.

## *Références Bibliographiques*

1. Bélec L. [Defenses of the female genital tract against infection]. *J Gynecol Obstet Biol Reprod (Paris)* (2002) 31:4S45-44S59.
2. Clement PB. Histology of the ovary. *Am J Surg Pathol* (1987) 11:277–303. doi: 10.1097/00000478-198704000-00006
3. McGee EA, Hsueh AJW. Initial and Cyclic Recruitment of Ovarian Follicles\*. *Endocrine Reviews* (2000) 21:200–214. doi: 10.1210/edrv.21.2.0394
4. Stocco C, Telleria C, Gibori G. The Molecular Control of Corpus Luteum Formation, Function, and Regression. *Endocrine Reviews* (2007) 28:117–149. doi: 10.1210/er.2006-0022
5. Maybin JA, Critchley HOD. Menstrual physiology: implications for endometrial pathology and beyond. *Hum Reprod Update* (2015) 21:748–761. doi: 10.1093/humupd/dmv038
6. Grzechocińska B, Dąbrowski F, Cyganek A, Panek G, Wielgoś M. The role of metalloproteinases in endometrial remodelling during menstrual cycle. *Ginekologia Polska* (2017) 88:337–342. doi: 10.5603/GP.a2017.0063
7. da Costa e Silva R de CP, Moura KKV de O, Ribeiro Júnior CL, Guillo LA. Estrogen signaling in the proliferative endometrium: implications in endometriosis. *Rev Assoc Med Bras (1992)* (2016) 62:72–77. doi: 10.1590/1806-9282.62.01.72
8. Gielen SCJP, Santegoets LAM, Kühne LCM, Van IJcken WFJ, Boers-Sijmons B, Hanifi-Moghaddam P, Helmerhorst TJM, Blok LJ, Burger CW. Genomic and Nongenomic Effects of Estrogen Signaling in Human Endometrial Cells: Involvement of the Growth Factor Receptor Signaling Downstream AKT Pathway. *Reprod Sci* (2007) 14:646–654. doi: 10.1177/1933719107306872
9. Kleinstein J, Westermann W, Mennenga K, Gustmann C, Gips H. Estrogen Induces Expression of Endometrial Epidermal Growth Factor Receptors Before Implantation. *American Journal of Reproductive Immunology* (1993) 30:58–62. doi: <https://doi.org/10.1111/j.1600-0897.1993.tb00602.x>
10. ECKERT RL, KATZENELLENBOGEN BS. Human Endometrial Cells in Primary Tissue Culture: Modulation of the Progesterone Receptor Level by Natural and Synthetic Estrogens in Vitro\*. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* (1981) 52:699–708. doi: 10.1210/jcem-52-4-699
11. Kurita T, Young P, Brody JR, Lydon JP, O'Malley BW, Cunha GR. Stromal Progesterone Receptors Mediate the Inhibitory Effects of Progesterone on Estrogen-Induced Uterine Epithelial Cell Deoxyribonucleic Acid Synthesis\*\*This work was supported by NIH Grants AG-13784 and HD-07857. *Endocrinology* (1998) 139:4708–4713. doi: 10.1210/endo.139.11.6317
12. Park D-W, Yang K-M. Hormonal regulation of uterine chemokines and immune cells. *Clin Exp Reprod Med* (2011) 38:179–185. doi: 10.5653/cerm.2011.38.4.179
13. Kim S-M, Kim J-S. A Review of Mechanisms of Implantation. *Dev Reprod* (2017) 21:351–359. doi: 10.12717/DR.2017.21.4.351

14. Cha J, Sun X, Dey SK. Mechanisms of implantation: strategies for successful pregnancy. *Nat Med* (2012) 18:1754–1767. doi: 10.1038/nm.3012
15. Wilcox AJ, Baird DD, Weinberg CR. Time of Implantation of the Conceptus and Loss of Pregnancy. <http://dx.doi.org.proxy.insermbiblio.inist.fr/101056/NEJM199906103402304> (2008) doi: 10.1056/NEJM199906103402304
16. Dimitriadis E, White CA, Jones RL, Salamonsen LA. Cytokines, chemokines and growth factors in endometrium related to implantation. *Human Reproduction Update* (2005) 11:613–630. doi: 10.1093/humupd/dmi023
17. Simón C, Martín JC, Pellicer A. Paracrine regulators of implantation. *Baillieres Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol* (2000) 14:815–826. doi: 10.1053/beog.2000.0121
18. Quenby S, Vince G, Farquharson R, Aplin J. Recurrent miscarriage: a defect in nature's quality control? *Human Reproduction* (2002) 17:1959–1963. doi: 10.1093/humrep/17.8.1959
19. Rubio C, Pehlivan T, Rodrigo L, Simón C, Remohí J, Pellicer A. Embryo Aneuploidy Screening for Unexplained Recurrent Miscarriage: A Minireview. *American Journal of Reproductive Immunology* (2005) 53:159–165. doi: <https://doi.org/10.1111/j.1600-0897.2005.00260.x>
20. Aplin JD, Ruane PT. Embryo–epithelium interactions during implantation at a glance. *J Cell Sci* (2017) 130:15–22. doi: 10.1242/jcs.175943
21. Nardo LG, Sabatini L, Rai R, Nardo F. Pinopode expression during human implantation. *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology* (2002) 101:104–108. doi: 10.1016/S0301-2115(01)00523-1
22. Stavreus-Evers A, Nikas G, Sahlin L, Eriksson H, Landgren B-M. Formation of pinopodes in human endometrium is associated with the concentrations of progesterone and progesterone receptors. *Fertility and Sterility* (2001) 76:782–791. doi: 10.1016/S0015-0282(01)01993-8
23. Aghajanova L, Stavreus-Evers A, Nikas Y, Hovatta O, Landgren B-M. Coexpression of pinopodes and leukemia inhibitory factor, as well as its receptor, in human endometrium. *Fertility and Sterility* (2003) 79:808–814. doi: 10.1016/S0015-0282(02)04830-6
24. Cole LA. Biological functions of hCG and hCG-related molecules. *Reprod Biol Endocrinol* (2010) 8:102. doi: 10.1186/1477-7827-8-102
25. Achache H, Revel A. Endometrial receptivity markers, the journey to successful embryo implantation. *Human Reproduction Update* (2006) 12:731–746. doi: 10.1093/humupd/dml004
26. Fukuda MN, Sugihara K. Signal Transduction in Human Embryo Implantation. *Cell Cycle* (2007) 6:1153–1156. doi: 10.4161/cc.6.10.4266
27. Carson DD, Bagchi I, Dey SK, Enders AC, Fazleabas AT, Lessey BA, Yoshinaga K. Embryo Implantation. *Developmental Biology* (2000) 223:217–237. doi: 10.1006/dbio.2000.9767

28. Salleh N, Giribabu N. Leukemia inhibitory factor: roles in embryo implantation and in nonhormonal contraception. *ScientificWorldJournal* (2014) 2014:201514. doi: 10.1155/2014/201514
29. Aplin JD, Kimber SJ. Trophoblast-uterine interactions at implantation. *Reprod Biol Endocrinol* (2004) 2:48. doi: 10.1186/1477-7827-2-48
30. Kimber SJ, Spanswick C. Blastocyst implantation: the adhesion cascade. *Seminars in Cell & Developmental Biology* (2000) 11:77–92. doi: 10.1006/scdb.2000.0154
31. Zhu J-Y, Pang Z-J, Yu Y. Regulation of Trophoblast Invasion: The Role of Matrix Metalloproteinases. *Rev Obstet Gynecol* (2012) 5:e137–e143.
32. Staun-Ram E, Goldman S, Gabarin D, Shalev E. Expression and importance of matrix metalloproteinase 2 and 9 (MMP-2 and -9) in human trophoblast invasion. *Reprod Biol Endocrinol* (2004) 2:59. doi: 10.1186/1477-7827-2-59
33. Preston AM, Lindsay LA, Murphy CR. Desmosomes in uterine epithelial cells decrease at the time of implantation: An ultrastructural and morphometric study. *Journal of Morphology* (2006) 267:103–108. doi: <https://doi.org/10.1002/jmor.10390>
34. Ball E, Bulmer JN, Ayis S, Lyall F, Robson SC. Late sporadic miscarriage is associated with abnormalities in spiral artery transformation and trophoblast invasion. *The Journal of Pathology* (2006) 208:535–542. doi: <https://doi.org/10.1002/path.1927>
35. Kadyrov M, Kingdom JCP, Huppertz B. Divergent trophoblast invasion and apoptosis in placental bed spiral arteries from pregnancies complicated by maternal anemia and early-onset preeclampsia/intrauterine growth restriction. *American Journal of Obstetrics and Gynecology* (2006) 194:557–563. doi: 10.1016/j.ajog.2005.07.035
36. Smith SK. Angiogenesis and implantation. *Hum Reprod* (2000) 15 Suppl 6:59–66.
37. Torry DS, Leavenworth J, Chang M, Maheshwari V, Groesch K, Ball ER, Torry RJ. Angiogenesis in implantation. *J Assist Reprod Genet* (2007) 24:303–315. doi: 10.1007/s10815-007-9152-7
38. Jabrane-Ferrat N, Siewiera J. The up side of decidual natural killer cells: new developments in immunology of pregnancy. *Immunology* (2014) 141:490–497. doi: 10.1111/imm.12218
39. Arck PC, Hecher K. Fetomaternal immune cross-talk and its consequences for maternal and offspring's health. *Nature Medicine* (2013) 19:548–556. doi: 10.1038/nm.3160
40. Li X, Zhou J, Fang M, Yu B. Pregnancy immune tolerance at the maternal-fetal interface. *International Reviews of Immunology* (2020) 39:247–263. doi: 10.1080/08830185.2020.1777292
41. Jabrane-Ferrat N. Features of Human Decidual NK Cells in Healthy Pregnancy and During Viral Infection. *Front Immunol* (2019) 10:1397. doi: 10.3389/fimmu.2019.01397



42. Yang F, Zheng Q, Jin L. Dynamic Function and Composition Changes of Immune Cells During Normal and Pathological Pregnancy at the Maternal-Fetal Interface. *Front Immunol* (2019) 10:2317. doi: 10.3389/fimmu.2019.02317
43. Moffett A, Loke C. Immunology of placentation in eutherian mammals. *Nat Rev Immunol* (2006) 6:584–594. doi: 10.1038/nri1897
44. Shechter R, London A, Schwartz M. Orchestrated leukocyte recruitment to immune-privileged sites: absolute barriers versus educational gates. *Nature Reviews Immunology* (2013) 13:206–218. doi: 10.1038/nri3391
45. Aplin JD. Developmental cell biology of human villous trophoblast: current research problems. *Int J Dev Biol* (2009) 54:323–329. doi: 10.1387/ijdb.082759ja
46. Demir R, Kaufmann P, Castellucci M, Erben T, Kotowski A. Fetal vasculogenesis and angiogenesis in human placental villi. *Acta Anat (Basel)* (1989) 136:190–203. doi: 10.1159/000146886
47. Pijnenborg R, Vercruyse L, Hanssens M. The uterine spiral arteries in human pregnancy: facts and controversies. *Placenta* (2006) 27:939–958. doi: 10.1016/j.placenta.2005.12.006
48. Soares MJ, Iqbal K, Kozai K. HYPOXIA AND PLACENTAL DEVELOPMENT. *Birth Defects Res* (2017) 109:1309–1329. doi: 10.1002/bdr2.1135
49. Fajersztajn L, Veras MM. Hypoxia: From Placental Development to Fetal Programming. *Birth Defects Research* (2017) 109:1377–1385. doi: 10.1002/bdr2.1142
50. Wang K, Jiang Y -z, Chen D -b, Zheng J. Hypoxia enhances FGF2- and VEGF-stimulated human placental artery endothelial cell proliferation: roles of MEK1/2/ERK1/2 and PI3K/AKT1 pathways. *Placenta* (2009) 30:1045–1051. doi: 10.1016/j.placenta.2009.10.007
51. Pereira RD, De Long NE, Wang RC, Yazdi FT, Holloway AC, Raha S. Angiogenesis in the Placenta: The Role of Reactive Oxygen Species Signaling. *Biomed Res Int* (2015) 2015: doi: 10.1155/2015/814543
52. Hu R, Jin H, Zhou S, Yang P, Li X. Proteomic Analysis of Hypoxia-Induced Responses in the Syncytialization of Human Placental Cell Line BeWo. *Placenta* (2007) 28:399–407. doi: 10.1016/j.placenta.2006.07.005
53. Genbacev O, Zhou Y, Ludlow JW, Fisher SJ. Regulation of Human Placental Development by Oxygen Tension. *Science* (1997) 277:1669–1672. doi: 10.1126/science.277.5332.1669
54. Lunghi L, Ferretti ME, Medici S, Biondi C, Vesce F. Control of human trophoblast function. *Reprod Biol Endocrinol* (2007) 5:6. doi: 10.1186/1477-7827-5-6
55. Whitley GSTJ, Cartwright JE. Cellular and Molecular Regulation of Spiral Artery Remodelling: Lessons from the Cardiovascular Field. *Placenta* (2010) 31:465–474. doi: 10.1016/j.placenta.2010.03.002

56. Red-Horse K, Rivera J, Schanz A, Zhou Y, Winn V, Kapidzic M, Maltepe E, Okazaki K, Kochman R, Vo KC, et al. Cytotrophoblast induction of arterial apoptosis and lymphangiogenesis in an in vivo model of human placentation. *J Clin Invest* (2006) 116:2643–2652. doi: 10.1172/JCI27306
57. Benirschke K, Driscoll SG. “The Pathology of the Human Placenta.” In: Strauss F, Benirschke K, Driscoll SG, editors. *Placenta*. Handbuch der Speziellen Pathologischen Anatomie und Histologie. Berlin, Heidelberg: Springer (1967). p. 97–571 doi: 10.1007/978-3-662-38455-8\_2
58. Maltepe E, Fisher SJ. Placenta: The Forgotten Organ. *Annu Rev Cell Dev Biol* (2015) 31:523–552. doi: 10.1146/annurev-cellbio-100814-125620
59. Growth and function of the normal human placenta. *Thrombosis Research* (2004) 114:397–407. doi: 10.1016/j.thromres.2004.06.038
60. Amodio G, Mugione A, Sanchez AM, Viganò P, Candiani M, Somigliana E, Roncarolo MG, Panina-Bordignon P, Gregori S. HLA-G expressing DC-10 and CD4+ T cells accumulate in human decidua during pregnancy. *Hum Immunol* (2013) 74:406–411. doi: 10.1016/j.humimm.2012.11.031
61. Hanna J, Goldman-Wohl D, Hamani Y, Avraham I, Greenfield C, Natanson-Yaron S, Prus D, Cohen-Daniel L, Arnon TI, Manaster I, et al. Decidual NK cells regulate key developmental processes at the human fetal-maternal interface. *Nat Med* (2006) 12:1065–1074. doi: 10.1038/nm1452
62. Apps R, Gardner L, Sharkey AM, Holmes N, Moffett A. A homodimeric complex of HLA-G on normal trophoblast cells modulates antigen-presenting cells via LILRB1. *Eur J Immunol* (2007) 37:1924–1937. doi: 10.1002/eji.200737089
63. Rajagopalan S. HLA-G-mediated NK cell senescence promotes vascular remodeling: implications for reproduction. *Cell Mol Immunol* (2014) 11:460–466. doi: 10.1038/cmi.2014.53
64. Manaster I, Mandelboim O. The unique properties of uterine NK cells. *Am J Reprod Immunol* (2010) 63:434–444. doi: 10.1111/j.1600-0897.2009.00794.x
65. Whitelaw PF, Croy BA. Granulated lymphocytes of pregnancy. *Placenta* (1996) 17:533–543. doi: 10.1016/s0143-4004(96)80070-1
66. Moffett-King A. Natural killer cells and pregnancy. *Nat Rev Immunol* (2002) 2:656–663. doi: 10.1038/nri886
67. Erlebacher A. Immunology of the maternal-fetal interface. *Annu Rev Immunol* (2013) 31:387–411. doi: 10.1146/annurev-immunol-032712-100003
68. Ng S-W, Norwitz GA, Pavlicev M, Tilburgs T, Simón C, Norwitz ER. Endometrial Decidualization: The Primary Driver of Pregnancy Health. *Int J Mol Sci* (2020) 21:4092. doi: 10.3390/ijms21114092
69. Smith GCS. First-trimester determination of complications of late pregnancy. *JAMA* (2010) 303:561–562. doi: 10.1001/jama.2010.102

70. Brosens I, Pijnenborg R, Vercruyssen L, Romero R. The “Great Obstetrical Syndromes” are associated with disorders of deep placentation. *American Journal of Obstetrics and Gynecology* (2011) 204:193–201. doi: 10.1016/j.ajog.2010.08.009
71. Baldwin HJ, Nippita TA, Torvaldsen S, Ibiebele I, Ford JB, Patterson JA. Outcomes of Subsequent Births After Placenta Accreta Spectrum. *Obstetrics & Gynecology* (2020) 136:745–755. doi: 10.1097/AOG.0000000000004051
72. Garmi G, Salim R. Epidemiology, Etiology, Diagnosis, and Management of Placenta Accreta. *Obstet Gynecol Int* (2012) 2012: doi: 10.1155/2012/873929
73. Silver RM, Barbour KD. Placenta Accreta Spectrum: Accreta, Increta, and Percreta. *Obstetrics and Gynecology Clinics of North America* (2015) 42:381–402. doi: 10.1016/j.ogc.2015.01.014
74. Wortman AC, Alexander JM. Placenta Accreta, Increta, and Percreta. *Obstetrics and Gynecology Clinics of North America* (2013) 40:137–154. doi: 10.1016/j.ogc.2012.12.002
75. Baldwin HJ, Patterson JA, Nippita TA, Torvaldsen S, Ibiebele I, Simpson JM, Ford JB. Antecedents of Abnormally Invasive Placenta in Primiparous Women: Risk Associated With Gynecologic Procedures. *Obstetrics & Gynecology* (2018) 131:227–233. doi: 10.1097/AOG.0000000000002434
76. Differential Expression of Growth-, Angiogenesis- and Invasion-Related Factors in The Development of Placenta Accreta. *Taiwanese Journal of Obstetrics and Gynecology* (2006) 45:100–106. doi: 10.1016/S1028-4559(09)60205-9
77. Garmi G, Goldman S, Shalev E, Salim R. The Effects of Decidual Injury on the Invasion Potential of Trophoblastic Cells. *Obstetrics & Gynecology* (2011) 117:55–59. doi: 10.1097/AOG.0b013e31820094f3
78. Hudon L, Belfort MA, Broome DR. Diagnosis and management of placenta percreta: a review. *Obstet Gynecol Surv* (1998) 53:509–517. doi: 10.1097/00006254-199808000-00024
79. Price FV, Resnik E, Heller KA, Christopherson WA. Placenta previa percreta involving the urinary bladder: a report of two cases and review of the literature. *Obstet Gynecol* (1991) 78:508–511.
80. Duley L. The Global Impact of Pre-eclampsia and Eclampsia. *Seminars in Perinatology* (2009) 33:130–137. doi: 10.1053/j.semperi.2009.02.010
81. ACOG Practice Bulletin No. 202: Gestational Hypertension and Preeclampsia. *Obstet Gynecol* (2019) 133:1. doi: 10.1097/AOG.0000000000003018
82. Souza JP, Gülmezoglu AM, Vogel J, Carroli G, Lumbiganon P, Qureshi Z, Costa MJ, Fawole B, Mugerwa Y, Nafiou I, et al. Moving beyond essential interventions for reduction of maternal mortality (the WHO Multicountry Survey on Maternal and Newborn Health): a cross-sectional study. *The Lancet* (2013) 381:1747–1755. doi: 10.1016/S0140-6736(13)60686-8

83. Mol BWJ, Roberts CT, Thangaratinam S, Magee LA, de Groot CJM, Hofmeyr GJ. Pre-eclampsia. *The Lancet* (2016) 387:999–1011. doi: 10.1016/S0140-6736(15)00070-7
84. Ananth CV, Keyes KM, Wapner RJ. Pre-eclampsia rates in the United States, 1980-2010: age-period-cohort analysis. *BMJ* (2013) 347: doi: 10.1136/bmj.f6564
85. Hansen AR, Barnés CM, Folkman J, McElrath TF. Maternal Preeclampsia Predicts the Development of Bronchopulmonary Dysplasia. *The Journal of Pediatrics* (2010) 156:532–536. doi: 10.1016/j.jpeds.2009.10.018
86. Strand KM, Heimstad R, Iversen A-C, Austgulen R, Lydersen S, Andersen GL, Irgens LM, Vik T. Mediators of the association between pre-eclampsia and cerebral palsy: population based cohort study. *BMJ* (2013) 347: doi: 10.1136/bmj.f4089
87. Gestational Hypertension and Preeclampsia: ACOG Practice Bulletin Summary, Number 222. *Obstetrics & Gynecology* (2020) 135:1492–1495. doi: 10.1097/AOG.0000000000003892
88. Weissgerber TL, Mudd LM. Preeclampsia and Diabetes. *Curr Diab Rep* (2015) 15:579. doi: 10.1007/s11892-015-0579-4
89. Saleem S, McClure EM, Goudar SS, Patel A, Esamai F, Garces A, Chomba E, Althabe F, Moore J, Kodkany B, et al. A prospective study of maternal, fetal and neonatal deaths in low- and middle-income countries. *Bull World Health Organ* (2014) 92:605–612. doi: 10.2471/BLT.13.127464
90. Ives CW, Sinkey R, Rajapreyar I, Tita ATN, Oparil S. Preeclampsia—Pathophysiology and Clinical Presentations: JACC State-of-the-Art Review. *Journal of the American College of Cardiology* (2020) 76:1690–1702. doi: 10.1016/j.jacc.2020.08.014
91. Cartwright JE, James-Allan L, Buckley RJ, Wallace AE. The role of decidual NK cells in pregnancies with impaired vascular remodelling. *Journal of Reproductive Immunology* (2017) 119:81–84. doi: 10.1016/j.jri.2016.09.002
92. Brosens IA, Robertson WB, Dixon HG. The role of the spiral arteries in the pathogenesis of preeclampsia. *Obstet Gynecol Annu* (1972) 1:177–191.
93. Redman CW. Immunology of preeclampsia. *Semin Perinatol* (1991) 15:257–262.
94. James JL, Whitley GS, Cartwright JE. Shear stress and spiral artery remodelling: the effects of low shear stress on trophoblast-induced endothelial cell apoptosis. *Cardiovascular Research* (2011) 90:130–139. doi: 10.1093/cvr/cvq396
95. James JL, Saghian R, Perwick R, Clark AR. Trophoblast plugs: impact on utero-placental haemodynamics and spiral artery remodelling. *Human Reproduction* (2018) 33:1430–1441. doi: 10.1093/humrep/dey225
96. Uzan J, Carbonnel M, Piconne O, Asmar R, Ayoubi J-M. Pre-eclampsia: pathophysiology, diagnosis, and management. *Vasc Health Risk Manag* (2011) 7:467–474. doi: 10.2147/VHRM.S20181

97. Wedenoja S, Yoshihara M, Teder H, Sariola H, Gissler M, Katayama S, Wedenoja J, Häkkinen IM, Ezer S, Linder N, et al. Fetal HLA-G mediated immune tolerance and interferon response in preeclampsia. *EBioMedicine* (2020) 59:102872. doi: 10.1016/j.ebiom.2020.102872
98. Djuriscic S, Hviid TVF. HLA Class Ib Molecules and Immune Cells in Pregnancy and Preeclampsia. *Front Immunol* (2014) 5:652. doi: 10.3389/fimmu.2014.00652
99. Chaiworapongsa T, Romero R, Espinoza J, Bujold E, Mee Kim Y, Gonçalves LF, Gomez R, Edwin S. Evidence supporting a role for blockade of the vascular endothelial growth factor system in the pathophysiology of preeclampsia: Young Investigator Award. *American Journal of Obstetrics and Gynecology* (2004) 190:1541–1547. doi: 10.1016/j.ajog.2004.03.043
100. Venkatesha S, Toporsian M, Lam C, Hanai J, Mammoto T, Kim YM, Bdolah Y, Lim K-H, Yuan H-T, Libermann TA, et al. Soluble endoglin contributes to the pathogenesis of preeclampsia. *Nat Med* (2006) 12:642–649. doi: 10.1038/nm1429
101. Kalkunte S, Lai Z, Tewari N, Chichester C, Romero R, Padbury J, Sharma S. In vitro and in vivo evidence for lack of endovascular remodeling by third trimester trophoblasts. *Placenta* (2008) 29:871–878. doi: 10.1016/j.placenta.2008.07.009
102. Maynard SE, Min J-Y, Merchan J, Lim K-H, Li J, Mondal S, Libermann TA, Morgan JP, Sellke FW, Stillman IE, et al. Excess placental soluble fms-like tyrosine kinase 1 (sFlt1) may contribute to endothelial dysfunction, hypertension, and proteinuria in preeclampsia. *J Clin Invest* (2003) 111:649–658. doi: 10.1172/JCI200317189
103. Pennington KA, Schlitt JM, Jackson DL, Schulz LC, Schust DJ. Preeclampsia: multiple approaches for a multifactorial disease. *Dis Model Mech* (2012) 5:9–18. doi: 10.1242/dmm.008516
104. Sharp AN, Heazell AEP, Crocker IP, Mor G. Placental Apoptosis in Health and Disease. *American Journal of Reproductive Immunology* (2010) 64:159–169. doi: <https://doi.org/10.1111/j.1600-0897.2010.00837.x>
105. Bauer S, Pollheimer J, Hartmann J, Husslein P, Aplin JD, Knöfler M. Tumor Necrosis Factor- $\alpha$  Inhibits Trophoblast Migration through Elevation of Plasminogen Activator Inhibitor-1 in First-Trimester Villous Explant Cultures. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* (2004) 89:812–822. doi: 10.1210/jc.2003-031351
106. Ectopic pregnancy and miscarriage: diagnosis and initial management | Guidance | NICE. <https://www.nice.org.uk/guidance/cg154> [Accessed November 10, 2021]
107. ACOG Practice Bulletin No. 200: Early Pregnancy Loss. *Obstetrics & Gynecology* (2018) 132:e197. doi: 10.1097/AOG.0000000000002899
108. Wilcox AJ, Weinberg CR, O'Connor JF, Baird DD, Schlatterer JP, Canfield RE, Armstrong EG, Nisula BC. Incidence of Early Loss of Pregnancy. <http://dx.doi.org.proxy.insermbiblio.inist.fr/101056/NEJM198807283190401> (2010) doi: 10.1056/NEJM198807283190401

109. Wang X, Chen C, Wang L, Chen D, Guang W, French J. Conception, early pregnancy loss, and time to clinical pregnancy: a population-based prospective study. *Fertility and Sterility* (2003) 79:577–584. doi: 10.1016/S0015-0282(02)04694-0
110. Jauniaux E, Hempstock J, Greenwold N, Burton GJ. Trophoblastic Oxidative Stress in Relation to Temporal and Regional Differences in Maternal Placental Blood Flow in Normal and Abnormal Early Pregnancies. *The American Journal of Pathology* (2003) 162:115–125. doi: 10.1016/S0002-9440(10)63803-5
111. Hustin J, Jauniaux E, Schaaps JP. Histological study of the materno-embryonic interface in spontaneous abortion. *Placenta* (1990) 11:477–486. doi: 10.1016/S0143-4004(05)80193-6
112. Kuon RJ, Strowitzki T, Sohn C, Daniel V, Toth B. Immune profiling in patients with recurrent miscarriage. *Journal of Reproductive Immunology* (2015) 108:136–141. doi: 10.1016/j.jri.2015.01.007
113. Branch DW, Gibson M, Silver RM. Recurrent Miscarriage. <http://dx.doi.org.proxy.insermbiblio.inist.fr/101056/NEJMcp1005330> (2010) doi: 10.1056/NEJMcp1005330
114. Pinar MH, Gibbins K, He M, Kostadinov S, Silver R. Early Pregnancy Losses: Review of Nomenclature, Histopathology, and Possible Etiologies. *Fetal and Pediatric Pathology* (2018) 37:191–209. doi: 10.1080/15513815.2018.1455775
115. Nardoza LMM, Caetano ACR, Zamarian ACP, Mazzola JB, Silva CP, Marçal VMG, Lobo TF, Peixoto AB, Araujo Júnior E. Fetal growth restriction: current knowledge. *Arch Gynecol Obstet* (2017) 295:1061–1077. doi: 10.1007/s00404-017-4341-9
116. American College of Obstetricians and Gynecologists Committee on Practice Bulletins—Obstetrics, Society for Maternal-Fetal Medicine Publications Committee. Fetal Growth Restriction: ACOG Practice Bulletin, Number 227. *Obstet Gynecol* (2021) 137:e16–e28. doi: 10.1097/AOG.0000000000004251
117. Sharma D, Shastri S, Sharma P. Intrauterine Growth Restriction: Antenatal and Postnatal Aspects. *Clin Med Insights Pediatr* (2016) 10:67–83. doi: 10.4137/CMPed.S40070
118. Frøen JF, Gardosi JO, Thurmann A, Francis A, Stray-Pedersen B. Restricted fetal growth in sudden intrauterine unexplained death. *Acta Obstetrica et Gynecologica Scandinavica* (2004) 83:801–807. doi: <https://doi.org/10.1111/j.0001-6349.2004.00602.x>
119. Kaufmann P, Black S, Huppertz B. Endovascular Trophoblast Invasion: Implications for the Pathogenesis of Intrauterine Growth Retardation and Preeclampsia. *Biology of Reproduction* (2003) 69:1–7. doi: 10.1095/biolreprod.102.014977
120. Pereira L. Congenital Viral Infection: Traversing the Uterine-Placental Interface. *Annu Rev Virol* (2018) 5:273–299. doi: 10.1146/annurev-virology-092917-043236
121. Kourtis AP, Read JS, Jamieson DJ. Pregnancy and infection. *N Engl J Med* (2014) 370:2211–2218. doi: 10.1056/NEJMra1213566

122. Leeper C, Lutzkanin A. Infections During Pregnancy. *Primary Care: Clinics in Office Practice* (2018) 45:567–586. doi: 10.1016/j.pop.2018.05.013
123. Bale JF. Fetal Infections and Brain Development. *Clinics in Perinatology* (2009) 36:639–653. doi: 10.1016/j.clp.2009.06.005
124. Neu N, Duchon J, Zachariah P. TORCH Infections. *Clinics in Perinatology* (2015) 42:77–103. doi: 10.1016/j.clp.2014.11.001
125. Halonen SK, Weiss LM. TOXOPLASMOSIS. *Handb Clin Neurol* (2013) 114:125–145. doi: 10.1016/B978-0-444-53490-3.00008-X
126. Jones JL, Lopez A, Wilson M, Schulkin J, Gibbs R. Congenital toxoplasmosis: a review. *Obstet Gynecol Surv* (2001) 56:296–305. doi: 10.1097/00006254-200105000-00025
127. Harker KS, Ueno N, Lodoen MB. Toxoplasma gondii dissemination: a parasite’s journey through the infected host. *Parasite Immunology* (2015) 37:141–149. doi: <https://doi.org/10.1111/pim.12163>
128. Pappas G, Roussos N, Falagas ME. Toxoplasmosis snapshots: Global status of Toxoplasma gondii seroprevalence and implications for pregnancy and congenital toxoplasmosis. *International Journal for Parasitology* (2009) 39:1385–1394. doi: 10.1016/j.ijpara.2009.04.003
129. Swisher CN, Boyer K, McLeod R. Congenital toxoplasmosis. The Toxoplasmosis Study Group. *Semin Pediatr Neurol* (1994) 1:4–25.
130. Goldstein EJC, Montoya JG, Remington JS. Management of Toxoplasma gondii Infection during Pregnancy. *Clinical Infectious Diseases* (2008) 47:554–566. doi: 10.1086/590149
131. Singh S. Congenital toxoplasmosis: Clinical features, outcomes, treatment, and prevention. *Trop Parasitol* (2016) 6:113–122. doi: 10.4103/2229-5070.190813
132. Yamamoto L, Targa LS, Sumita LM, Shimokawa PT, Rodrigues JC, Kanunfre KA, Okay TS. Association of Parasite Load Levels in Amniotic Fluid With Clinical Outcome in Congenital Toxoplasmosis. *Obstet Gynecol* (2017) 130:335–345. doi: 10.1097/AOG.0000000000002131
133. Olariu TR, Remington JS, McLeod R, Alam A, Montoya JG. Severe congenital toxoplasmosis in the United States: clinical and serologic findings in untreated infants. *Pediatr Infect Dis J* (2011) 30:1056–1061. doi: 10.1097/INF.0b013e3182343096
134. Barton LL, Peters CJ, Ksiazek TG. Lymphocytic choriomeningitis virus: an unrecognized teratogenic pathogen. *Emerg Infect Dis* (1995) 1:152–153.
135. Wright R, Johnson D, Neumann M, Ksiazek TG, Rollin P, Keech RV, Bonthius DJ, Hitchon P, Grose CF, Bell WE, et al. Congenital Lymphocytic Choriomeningitis Virus Syndrome: A Disease That Mimics Congenital Toxoplasmosis or Cytomegalovirus Infection. *Pediatrics* (1997) 100:e9–e9. doi: 10.1542/peds.100.1.e9

136. Bonthius DJ. Lymphocytic choriomeningitis virus: An under-recognized cause of neurologic disease in the fetus, child, and adult. *Semin Pediatr Neurol* (2012) 19:89–95. doi: 10.1016/j.spn.2012.02.002
137. Bowen V, Su J, Torrone E, Kidd S, Weinstock H. Increase in incidence of congenital syphilis - United States, 2012-2014. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* (2015) 64:1241–1245. doi: 10.15585/mmwr.mm6444a3
138. Satterwhite CL, Torrone E, Meites E, Dunne EF, Mahajan R, Ocfemia MCB, Su J, Xu F, Weinstock H. Sexually transmitted infections among US women and men: prevalence and incidence estimates, 2008. *Sex Transm Dis* (2013) 40:187–193. doi: 10.1097/OLQ.0b013e318286bb53
139. Chouquet C, Burgard M, Richardson S, Rouzioux C, Costagliola D. Timing of mother-to-child HIV-1 transmission and diagnosis of infection based on polymerase chain reaction in the neonatal period by a non-parametric method. *AIDS* (1997) 11:1183–1184. doi: 10.1097/00002030-199709000-00015
140. van't Wout AB, Kootstra NA, Mulder-Kampinga GA, Albrecht-van Lent N, Scherpbier HJ, Veenstra J, Boer K, Coutinho RA, Miedema F, Schuitemaker H. Macrophage-tropic variants initiate human immunodeficiency virus type 1 infection after sexual, parenteral, and vertical transmission. *J Clin Invest* (1994) 94:2060–2067.
141. Maury W, Potts BJ, Rabson AB. HIV-1 infection of first-trimester and term human placental tissue: a possible mode of maternal-fetal transmission. *J Infect Dis* (1989) 160:583–588. doi: 10.1093/infdis/160.4.583
142. Heerema-McKenney A. Defense and infection of the human placenta. *APMIS* (2018) 126:570–588. doi: <https://doi.org/10.1111/apm.12847>
143. Altshuler G, Russell P. The human placental villitides: a review of chronic intrauterine infection. *Curr Top Pathol* (1975) 60:64–112.
144. Enders G, Bolley I, Miller E, Cradock-Watson J, Ridehalgh M. Consequences of varicella and herpes zoster in pregnancy: prospective study of 1739 cases. *The Lancet* (1994) 343:1548–1551. doi: 10.1016/S0140-6736(94)92943-2
145. Prober CG, Gershon AA, Grose C, McCracken GH, Nelson JD. Consensus: varicella-zoster infections in pregnancy and the perinatal period. *Pediatr Infect Dis J* (1990) 9:865–869.
146. Sauerbrei A. Varicella-Zoster Virus Infections in Pregnancy. *INT* (1998) 41:191–196. doi: 10.1159/000024935
147. Sauerbrei A, Wutzler P. Herpes simplex and varicella-zoster virus infections during pregnancy: current concepts of prevention, diagnosis and therapy. Part 1: Herpes simplex virus infections. *Med Microbiol Immunol* (2007) 196:89–94. doi: 10.1007/s00430-006-0031-0
148. Sauerbrei A, Wutzler P. Herpes simplex and varicella-zoster virus infections during pregnancy: current concepts of prevention, diagnosis and therapy. Part 2: Varicella-zoster



- virus infections. *Med Microbiol Immunol* (2007) 196:95–102. doi: 10.1007/s00430-006-0032-z
149. Stanaway JD, Roth G. The burden of Chagas disease: estimates and challenges. *Glob Heart* (2015) 10:139–144. doi: 10.1016/j.gheart.2015.06.001
150. Henao-Martínez AF. Acute Chagas Disease and Risk of Congenital Infection. *Clinical Infectious Diseases* (2016) 62:407–408. doi: 10.1093/cid/civ863
151. Moretti E, Basso B, Castro I, Carrizo Paez M, Chaul M, Barbieri G, Canal Feijoo D, Sartori MJ, Carrizo Paez R. Chagas' disease: study of congenital transmission in cases of acute maternal infection. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* (2005) 38:53–55. doi: 10.1590/S0037-86822005000100010
152. Carlier Y, Sosa-Estani S, Luquetti AO, Buekens P. Congenital Chagas disease: an update. *Mem Inst Oswaldo Cruz* (2015) 110:363–368. doi: 10.1590/0074-02760140405
153. Carlier Y, Altcheh J, Angheben A, Freilij H, Luquetti AO, Schijman AG, Segovia M, Wagner N, Albajar Vinas P. Congenital Chagas disease: Updated recommendations for prevention, diagnosis, treatment, and follow-up of newborns and siblings, girls, women of childbearing age, and pregnant women. *PLoS Negl Trop Dis* (2019) 13:e0007694. doi: 10.1371/journal.pntd.0007694
154. Wenger F. Venezuelan equine encephalitis. *Teratology* (1977) 16:359–362. doi: 10.1002/tera.1420160317
155. García-Tamayo J. [Teratogenic effect of the Venezuelan equine encephalitis virus: a review of the problem]. *Invest Clin* (1992) 33:81–86.
156. Pistorius LR, Smal J, Haan TR de, Page-Christiaens GCML, Verboon-Macielek M, Oepkes D, Vries LS de. Disturbance of Cerebral Neuronal Migration following Congenital Parvovirus B19 Infection. *FDT* (2008) 24:491–494. doi: 10.1159/000180119
157. Schulert GS, Walsh WF, Weitkamp J-H. Polymicrogyria and Congenital Parvovirus B19 Infection. *AJP Rep* (2011) 1:105–110. doi: 10.1055/s-0031-1285984
158. Courtier J, Schauer GM, Parer JT, Regenstein AC, Callen PW, Glenn OA. Polymicrogyria in a fetus with human parvovirus B19 infection: a case with radiologic–pathologic correlation. *Ultrasound in Obstetrics & Gynecology* (2012) 40:604–606. doi: <https://doi.org/10.1002/uog.11121>
159. Alpert SG, Ferguson J, Noël L-P. Intrauterine West Nile virus: ocular and systemic findings. *American Journal of Ophthalmology* (2003) 136:733–735. doi: 10.1016/S0002-9394(03)00452-5
160. Bakri SJ, Kaiser PK. Ocular manifestations of West Nile Virus. *Current Opinion in Ophthalmology* (2004) 15:537–540. doi: 10.1097/01.icu.0000143687.45232.fl
161. Pridjian G, Sirois PA, McRae S, Hinckley AF, Rasmussen SA, Kissinger P, Buekens P, Hayes EB, O'Leary D, Kuhn S, et al. Prospective Study of Pregnancy and Newborn Outcomes in Mothers with West Nile Illness during Pregnancy. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol* (2016) 106:716–723. doi: 10.1002/bdra.23523

162. Coyne CB, Lazear HM. Zika virus — reigniting the TORCH. *Nature Reviews Microbiology* (2016) 14:707–715. doi: 10.1038/nrmicro.2016.125
163. Acharya SK, Dasarathy S, Kumer TL, Sushma S, Prasanna KS, Tandon A, Sreenivas V, Nijhawan S, Panda SK, Nanda SK, et al. Fulminant hepatitis in a tropical population: Clinical course, cause, and early predictors of outcome. *Hepatology* (1996) 23:1448–1455. doi: <https://doi.org/10.1002/hep.510230622>
164. Aziz AB, Hamid S, Iqbal S, Islam W, Karim SA. Prevalence and severity of viral hepatitis in Pakistani pregnant women: a five year hospital based study. *J Pak Med Assoc* (1997) 47:198–201.
165. Sharma S, Kumar A, Kar P, Agarwal S, Ramji S, Husain SA, Prasad S, Sharma S. Risk factors for vertical transmission of hepatitis E virus infection. *Journal of Viral Hepatitis* (2017) 24:1067–1075. doi: <https://doi.org/10.1111/jvh.12730>
166. Khuroo MS, Kamili S, Jameel S. Vertical transmission of hepatitis E virus. *Lancet* (1995) 345:1025–1026. doi: 10.1016/s0140-6736(95)90761-0
167. Kumar A, Beniwal M, Kar P, Sharma J b., Murthy N s. Hepatitis E in pregnancy. *International Journal of Gynecology & Obstetrics* (2004) 85:240–244. doi: 10.1016/j.ijgo.2003.11.018
168. Navaneethan U, Mohajer MA, Shata MT. Hepatitis E and Pregnancy- Understanding the pathogenesis. *Liver Int* (2008) 28:1190–1199. doi: 10.1111/j.1478-3231.2008.01840.x
169. Khaskheli M-N, Baloch S, Sheeba A, Baloch S. Acute Hepatitis E Viral Infection in Pregnancy and Maternal Morbidity. *J Coll Physicians Surg Pak* (2015) 25:734–737. doi: 10.2015/JCPSP.734737
170. Chaudhry SA, Verma N, Koren G. Hepatitis E infection during pregnancy. *Can Fam Physician* (2015) 61:607–608.
171. Patra S, Kumar A, Trivedi SS, Puri M, Sarin SK. Maternal and fetal outcomes in pregnant women with acute hepatitis E virus infection. *Ann Intern Med* (2007) 147:28–33. doi: 10.7326/0003-4819-147-1-200707030-00005
172. Hussaini SH, Skidmore SJ, Richardson P, Sherratt LM, Cooper BT, O’Grady JG. Severe hepatitis E infection during pregnancy. *Journal of Viral Hepatitis* (1997) 4:51–54. doi: <https://doi.org/10.1046/j.1365-2893.1997.00123.x>
173. Dilawari JB, Singh K, Chawla YK, Ramesh GN, Chauhan A, Bhusnurmath SR, Sharma TR, Sokhey CS. Hepatitis E virus: epidemiological, clinical and serological studies of north Indian epidemic. *Indian J Gastroenterol* (1994) 13:44–48.
174. Bose PD, Das BC, Kumar A, Gondal R, Kumar D, Kar P. High viral load and deregulation of the progesterone receptor signaling pathway: Association with Hepatitis E-related poor pregnancy outcome. *Journal of Hepatology* (2011) 54:1107–1113. doi: 10.1016/j.jhep.2010.08.037
175. Mushahwar IK. “Rubella Virus: Molecular Composition, Pathogenesis, Diagnosis, and Control.,” In: Mushahwar IK, editor. *Perspectives in Medical Virology*. Congenital and

- Other Related Infectious Diseases of the Newborn. Elsevier (2006). p. 211–221 doi: 10.1016/S0168-7069(06)13011-6
176. Dudgeon JA. Congenital rubella. *The Journal of Pediatrics* (1975) 87:1078–1086. doi: 10.1016/S0022-3476(75)80119-3
177. Best JM. Rubella. *Seminars in Fetal and Neonatal Medicine* (2007) 12:182–192. doi: 10.1016/j.siny.2007.01.017
178. Miller E, Cradock-Watson JohnE, Pollock ThomasM. CONSEQUENCES OF CONFIRMED MATERNAL RUBELLA AT SUCCESSIVE STAGES OF PREGNANCY. *The Lancet* (1982) 320:781–784. doi: 10.1016/S0140-6736(82)92677-0
179. Bittencourt AL, Garcia AGP. The placenta in hematogenous infections. *Pediatr Pathol Mol Med* (2002) 21:401–432. doi: 10.1080/152279502760157768
180. Ornoy A, Segal S, Nishmi M, Simcha A, Polishuk WZ. Fetal and placental pathology in gestational rubella. *American Journal of Obstetrics and Gynecology* (1973) 116:949–956. doi: 10.1016/S0002-9378(16)33842-X
181. Shukla S, Maraqa NF. “Congenital Rubella.” *StatPearls*. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing (2021) <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK507879/> [Accessed March 29, 2021]
182. Leung AKC, Hon KL, Leong KF. Rubella (German measles) revisited. *Hong Kong Med J* (2019) 25:134–141. doi: 10.12809/hkmj187785
183. Ueda K, Nishida Y, Oshima K, Shepard TH. Congenital rubella syndrome: Correlation of gestational age at time of maternal rubella with type of defect. *The Journal of Pediatrics* (1979) 94:763–765. doi: 10.1016/S0022-3476(79)80148-1
184. Sijmons S, Thys K, Mbong Ngwese M, Van Damme E, Dvorak J, Van Loock M, Li G, Tachezy R, Busson L, Aerssens J, et al. High-Throughput Analysis of Human Cytomegalovirus Genome Diversity Highlights the Widespread Occurrence of Gene-Disrupting Mutations and Pervasive Recombination. *J Virol* (2015) 89:7673–7695. doi: 10.1128/JVI.00578-15
185. Pomeroy C, Englund JA. Cytomegalovirus: epidemiology and infection control. *Am J Infect Control* (1987) 15:107–119. doi: 10.1016/0196-6553(87)90164-7
186. Demmler GJ. Infectious Diseases Society of America and Centers for Disease Control. Summary of a workshop on surveillance for congenital cytomegalovirus disease. *Rev Infect Dis* (1991) 13:315–329. doi: 10.1093/clinids/13.2.315
187. Colugnati FA, Staras SA, Dollard SC, Cannon MJ. Incidence of cytomegalovirus infection among the general population and pregnant women in the United States. *BMC Infect Dis* (2007) 7:71. doi: 10.1186/1471-2334-7-71
188. Enders G, Daiminger A, Bäder U, Exler S, Enders M. Intrauterine transmission and clinical outcome of 248 pregnancies with primary cytomegalovirus infection in relation to gestational age. *J Clin Virol* (2011) 52:244–246. doi: 10.1016/j.jcv.2011.07.005

189. Pereira L, Pettit M, Fong A, Tsuge M, Tabata T, Fang-Hoover J, Maidji E, Zydek M, Zhou Y, Inoue N, et al. Intrauterine Growth Restriction Caused by Underlying Congenital Cytomegalovirus Infection. *J Infect Dis* (2014) 209:1573–1584. doi: 10.1093/infdis/jiu019
190. Weisblum Y, Panet A, Haimov-Kochman R, Wolf DG. Models of vertical cytomegalovirus (CMV) transmission and pathogenesis. *Semin Immunopathol* (2014) 36:615–625. doi: 10.1007/s00281-014-0449-1
191. Rauwel B, Mariamé B, Martin H, Nielsen R, Allart S, Pipy B, Mandrup S, Devignes MD, Evain-Brion D, Fournier T, et al. 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* (2010) 84:2946–2954. doi: 10.1128/JVI.01779-09
192. Goderis J, Leenheer ED, Smets K, Hoecke HV, Keymeulen A, Dhooge I. Hearing Loss and Congenital CMV Infection: A Systematic Review. *Pediatrics* (2014) 134:972–982. doi: 10.1542/peds.2014-1173
193. Foulon I, Naessens A, Foulon W, Casteels A, Gordts F. Hearing loss in children with congenital cytomegalovirus infection in relation to the maternal trimester in which the maternal primary infection occurred. *Pediatrics* (2008) 122:e1123-1127. doi: 10.1542/peds.2008-0770
194. Maltezou P-G, Kourlaba G, Kourkouni E, Luck S, Blázquez-Gamero D, Ville Y, Lilleri D, Dimopoulou D, Karalexi M, Papaevangelou V. Maternal type of CMV infection and sequelae in infants with congenital CMV: Systematic review and meta-analysis. *Journal of Clinical Virology* (2020) 129:104518. doi: 10.1016/j.jcv.2020.104518
195. Martinez-Gomez E, Perez-Carpena P, Flook M, Lopez-Escamez JA. A Systematic Review on the Association of Acquired Human Cytomegalovirus Infection with Hearing Loss. *J Clin Med* (2020) 9: doi: 10.3390/jcm9124011
196. Cannon MJ. Congenital cytomegalovirus (CMV) epidemiology and awareness. *J Clin Virol* (2009) 46 Suppl 4:S6-10. doi: 10.1016/j.jcv.2009.09.002
197. Rolland M, Li X, Sellier Y, Martin H, Perez-Berezo T, Rauwel B, Benchoua A, Bessières B, Aziza J, Cenac N, et al. PPAR $\gamma$  Is Activated during Congenital Cytomegalovirus Infection and Inhibits Neuronogenesis from Human Neural Stem Cells. *PLoS Pathog* (2016) 12: doi: 10.1371/journal.ppat.1005547
198. Britt W. Controversies in the natural history of congenital human cytomegalovirus infection: the paradox of infection and disease in offspring of women with immunity prior to pregnancy. *Med Microbiol Immunol* (2015) 204:263–271. doi: 10.1007/s00430-015-0399-9
199. Gandhi MK, Khanna R. Human cytomegalovirus: clinical aspects, immune regulation, and emerging treatments. *The Lancet Infectious Diseases* (2004) 4:725–738. doi: 10.1016/S1473-3099(04)01202-2
200. Whitley RJ, Roizman B. Herpes Simplex Viruses. *Clinical Virology, Fourth Edition* (2017)415–445. doi: 10.1128/9781555819439.ch20

201. Whitley RJ, Roizman B. Herpes simplex virus infections. *The Lancet* (2001) 357:1513–1518. doi: 10.1016/S0140-6736(00)04638-9
202. Kimberlin DW. Herpes Simplex Virus Infections of the Newborn. *Seminars in Perinatology* (2007) 31:19–25. doi: 10.1053/j.semperi.2007.01.003
203. James SH, Kimberlin DW. Neonatal Herpes Simplex Virus Infection. *Infectious Disease Clinics of North America* (2015) 29:391–400. doi: 10.1016/j.idc.2015.05.001
204. Marquez L, Levy ML, Munoz FM, Palazzi DL. A Report of Three Cases and Review of Intrauterine Herpes Simplex Virus Infection. *Pediatr Infect Dis J* (2011) 30:153–157. doi: 10.1097/INF.0b013e3181f55a5c
205. Hutto C, Arvin A, Jacobs R, Steele R, Stagno S, Lyrene R, Willett L, Powell D, Andersen R, Werthammer J, et al. Intrauterine herpes simplex virus infections. *The Journal of Pediatrics* (1987) 110:97–101. doi: 10.1016/S0022-3476(87)80298-6
206. Anzivino E, Fioriti D, Mischitelli M, Bellizzi A, Barucca V, Chiarini F, Pietropaolo V. Herpes simplex virus infection in pregnancy and in neonate: status of art of epidemiology, diagnosis, therapy and prevention. *Virol J* (2009) 6:40. doi: 10.1186/1743-422X-6-40
207. Dick GWA, Kitchen SF, Haddow AJ. Zika virus. I. Isolations and serological specificity. *Trans R Soc Trop Med Hyg* (1952) 46:509–520. doi: 10.1016/0035-9203(52)90042-4
208. Vorou R. Zika virus, vectors, reservoirs, amplifying hosts, and their potential to spread worldwide: what we know and what we should investigate urgently. *Int J Infect Dis* (2016) 48:85–90. doi: 10.1016/j.ijid.2016.05.014
209. Wolfe ND, Kilbourn AM, Karesh WB, Rahman HA, Bosi EJ, Cropp BC, Andau M, Spielman A, Gubler DJ. Sylvatic transmission of arboviruses among Bornean orangutans. *Am J Trop Med Hyg* (2001) 64:310–316. doi: 10.4269/ajtmh.2001.64.310
210. Zika Virus. CDC (2014) <https://www.cdc.gov/zika/transmission/qa-animals.html> [Accessed April 4, 2020]
211. Iosifidis S, Mallet H-P, Leparac Goffart I, Gauthier V, Cardoso T, Herida M. Current Zika virus epidemiology and recent epidemics. *Med Mal Infect* (2014) 44:302–307. doi: 10.1016/j.medmal.2014.04.008
212. Boorman JP, Porterfield JS. A simple technique for infection of mosquitoes with viruses; transmission of Zika virus. *Trans R Soc Trop Med Hyg* (1956) 50:238–242. doi: 10.1016/0035-9203(56)90029-3
213. Marchette NJ, Garcia R, Rudnick A. Isolation of Zika virus from *Aedes aegypti* mosquitoes in Malaysia. *Am J Trop Med Hyg* (1969) 18:411–415. doi: 10.4269/ajtmh.1969.18.411
214. Macnamara FN. Zika virus: a report on three cases of human infection during an epidemic of jaundice in Nigeria. *Trans R Soc Trop Med Hyg* (1954) 48:139–145. doi: 10.1016/0035-9203(54)90006-1

215. Simpson DI. ZIKA VIRUS INFECTION IN MAN. *Trans R Soc Trop Med Hyg* (1964) 58:335–338.
216. Olson JG, Ksiazek TG, Suhandiman null, Triwibowo null. Zika virus, a cause of fever in Central Java, Indonesia. *Trans R Soc Trop Med Hyg* (1981) 75:389–393. doi: 10.1016/0035-9203(81)90100-0
217. Duffy MR, Chen T-H, Hancock WT, Powers AM, Kool JL, Lanciotti RS, Pretrick M, Marfel M, Holzbauer S, Dubray C, et al. Zika virus outbreak on Yap Island, Federated States of Micronesia. *N Engl J Med* (2009) 360:2536–2543. doi: 10.1056/NEJMoa0805715
218. Cao-Lormeau V-M, Roche C, Teissier A, Robin E, Berry A-L, Mallet H-P, Sall AA, Musso D. Zika virus, French polynesia, South pacific, 2013. *Emerging Infect Dis* (2014) 20:1085–1086. doi: 10.3201/eid2006.140138
219. SPF. Bilan de l'épidémie à virus Zika survenue en Polynésie française entre octobre 2013 et mars 2014. De la description de l'épidémie aux connaissances acquises après l'évènement. /maladies-et-traumatismes/maladies-a-transmission-vectorielle/zika/bilan-de-l-epidemie-a-virus-zika-survenue-en-polynesie-francaise-entre-octobre-2013-et-mars-2014.-de-la-description-de-l-epidemie-aux-connaissances [Accessed February 14, 2021]
220. Brasil P, Pereira JP, Moreira ME, Ribeiro Nogueira RM, Damasceno L, Wakimoto M, Rabello RS, Valderramos SG, Halai U-A, Salles TS, et al. Zika Virus Infection in Pregnant Women in Rio de Janeiro. *N Engl J Med* (2016) 375:2321–2334. doi: 10.1056/NEJMoa1602412
221. Cao-Lormeau V-M, Blake A, Mons S, Lastère S, Roche C, Vanhomwegen J, Dub T, Baudouin L, Teissier A, Larre P, et al. Guillain-Barré Syndrome outbreak associated with Zika virus infection in French Polynesia: a case-control study. *Lancet* (2016) 387:1531–1539. doi: 10.1016/S0140-6736(16)00562-6
222. Driggers RW, Ho C-Y, Korhonen EM, Kuivanen S, Jääskeläinen AJ, Smura T, Rosenberg A, Hill DA, DeBiasi RL, Vezina G, et al. Zika Virus Infection with Prolonged Maternal Viremia and Fetal Brain Abnormalities. *N Engl J Med* (2016) 374:2142–2151. doi: 10.1056/NEJMoa1601824
223. Mlakar J, Korva M, Tul N, Popović M, Poljšak-Prijatelj M, Mraz J, Kolenc M, Resman Rus K, Vesnaver Vipotnik T, Fabjan Vodusek V, et al. Zika Virus Associated with Microcephaly. *N Engl J Med* (2016) 374:951–958. doi: 10.1056/NEJMoa1600651
224. Rückert C, Weger-Lucarelli J, Garcia-Luna SM, Young MC, Byas AD, Murrieta RA, Fauver JR, Ebel GD. Impact of simultaneous exposure to arboviruses on infection and transmission by *Aedes aegypti* mosquitoes. *Nat Commun* (2017) 8:15412. doi: 10.1038/ncomms15412
225. Amraoui F, Atyame-Nten C, Vega-Rúa A, Lourenço-de-Oliveira R, Vazeille M, Failloux AB. *Culex* mosquitoes are experimentally unable to transmit Zika virus. *Euro Surveill* (2016) 21: doi: 10.2807/1560-7917.ES.2016.21.35.30333

226. Guo X-X, Li C-X, Deng Y-Q, Xing D, Liu Q-M, Wu Q, Sun A-J, Dong Y, Cao W-C, Qin C-F, et al. *Culex pipiens quinquefasciatus*: a potential vector to transmit Zika virus. *Emerg Microbes Infect* (2016) 5:e102. doi: 10.1038/emi.2016.102
227. Rückert C, Ebel GD. How do virus-mosquito interactions lead to viral emergence? *Trends Parasitol* (2018) 34:310–321. doi: 10.1016/j.pt.2017.12.004
228. Lai Z, Zhou T, Zhou J, Liu S, Xu Y, Gu J, Yan G, Chen X-G. Vertical transmission of zika virus in *Aedes albopictus*. *PLoS Negl Trop Dis* (2020) 14:e0008776. doi: 10.1371/journal.pntd.0008776
229. Gubler DJ. Dengue, Urbanization and Globalization: The Unholy Trinity of the 21(st) Century. *Trop Med Health* (2011) 39:3–11. doi: 10.2149/tmh.2011-S05
230. Foy BD, Kobylinski KC, Chilson Foy JL, Blitvich BJ, Travassos da Rosa A, Haddow AD, Lanciotti RS, Tesh RB. Probable non-vector-borne transmission of Zika virus, Colorado, USA. *Emerg Infect Dis* (2011) 17:880–882. doi: 10.3201/eid1705.101939
231. Salinas S, Foulongne V, Loustalot F, Fournier-Wirth C, Molès J-P, Briant L, Nagot N, Perre PV de, Simonin Y. Le virus Zika - L'émergence d'une menace. *Med Sci (Paris)* (2016) 32:378–386. doi: 10.1051/medsci/20163204016
232. Hills SL, Russell K, Hennessey M, Williams C, Oster AM, Fischer M, Mead P. Transmission of Zika Virus Through Sexual Contact with Travelers to Areas of Ongoing Transmission - Continental United States, 2016. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* (2016) 65:215–216. doi: 10.15585/mmwr.mm6508e2
233. Musso D, Roche C, Robin E, Nhan T, Teissier A, Cao-Lormeau V-M. Potential sexual transmission of Zika virus. *Emerg Infect Dis* (2015) 21:359–361. doi: 10.3201/eid2102.141363
234. D'Ortenzio E, Matheron S, Yazdanpanah Y, de Lamballerie X, Hubert B, Piorkowski G, Maquart M, Descamps D, Damond F, Leparac-Goffart I. Evidence of Sexual Transmission of Zika Virus. *N Engl J Med* (2016) 374:2195–2198. doi: 10.1056/NEJMc1604449
235. Davidson A, Slavinski S, Komoto K, Rakeman J, Weiss D. Suspected Female-to-Male Sexual Transmission of Zika Virus - New York City, 2016. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* (2016) 65:716–717. doi: 10.15585/mmwr.mm6528e2
236. Mansuy J-M, El Costa H, Gouilly J, Mengelle C, Pasquier C, Martin-Blondel G, Izopet J, Jabrane-Ferrat N. Peripheral Plasma and Semen Cytokine Response to Zika Virus in Humans. *Emerg Infect Dis* (2019) 25:823–825. doi: 10.3201/eid2504.171886
237. Mansuy JM, Suberbielle E, Chapuy-Regaud S, Mengelle C, Bujan L, Marchou B, Delobel P, Gonzalez-Dunia D, Malnou CE, Izopet J, et al. Zika virus in semen and spermatozoa. *Lancet Infect Dis* (2016) 16:1106–1107. doi: 10.1016/S1473-3099(16)30336-X
238. Mansuy JM, Pasquier C, Daudin M, Chapuy-Regaud S, Moinard N, Chevreau C, Izopet J, Mengelle C, Bujan L. Zika virus in semen of a patient returning from a non-epidemic area. *Lancet Infect Dis* (2016) 16:894–895. doi: 10.1016/S1473-3099(16)30153-0

239. Musso D, Richard V, Teissier A, Stone M, Lanteri MC, Latoni G, Alsina J, Reik R, Busch MP, Recipient Epidemiology and Donor Evaluation Study (REDS-III) ZIKV Study Group. Detection of Zika virus RNA in semen of asymptomatic blood donors. *Clin Microbiol Infect* (2017) 23:1001.e1-1001.e3. doi: 10.1016/j.cmi.2017.07.006
240. Medina FA, Torres G, Acevedo J, Fonseca S, Casiano L, De León-Rodríguez CM, Santiago GA, Doyle K, Sharp TM, Alvarado LI, et al. Duration of the Presence of Infectious Zika Virus in Semen and Serum. *J Infect Dis* (2019) 219:31–40. doi: 10.1093/infdis/jiy462
241. Turmel JM, Abgueguen P, Hubert B, Vandamme YM, Maquart M, Le Guillou-Guillemette H, Leparac-Goffart I. Late sexual transmission of Zika virus related to persistence in the semen. *Lancet* (2016) 387:2501. doi: 10.1016/S0140-6736(16)30775-9
242. Paz-Bailey G, Rosenberg ES, Doyle K, Munoz-Jordan J, Santiago GA, Klein L, Perez-Padilla J, Medina FA, Waterman SH, Adams LE, et al. Persistence of Zika Virus in Body Fluids — Final Report. *New England Journal of Medicine* (2018) 379:1234–1243. doi: 10.1056/NEJMoa1613108
243. Oster AM, Brooks JT, Stryker JE, Kachur RE, Mead P, Pesik NT, Petersen LR. Interim Guidelines for Prevention of Sexual Transmission of Zika Virus - United States, 2016. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* (2016) 65:120–121. doi: 10.15585/mmwr.mm6505e1
244. Moreira J, Peixoto TM, Siqueira AM, Lamas CC. Sexually acquired Zika virus: a systematic review. *Clin Microbiol Infect* (2017) 23:296–305. doi: 10.1016/j.cmi.2016.12.027
245. Zika page web. /maladies-et-traumatismes/maladies-a-transmission-vectorielle/zika [Accessed February 13, 2021]
246. Motta IJF, Spencer BR, Cordeiro da Silva SG, Arruda MB, Dobbin JA, Gonzaga YBM, Arcuri IP, Tavares RCBS, Atta EH, Fernandes RFM, et al. Evidence for Transmission of Zika Virus by Platelet Transfusion. *N Engl J Med* (2016) 375:1101–1103. doi: 10.1056/NEJMc1607262
247. Magnus MM, Espósito DLA, Costa VA da, Melo PS de, Costa-Lima C, Fonseca BAL da, Addas-Carvalho M. Risk of Zika virus transmission by blood donations in Brazil. *Hematol Transfus Cell Ther* (2018) 40:250–254. doi: 10.1016/j.htct.2018.01.011
248. Musso D, Nhan T, Robin E, Roche C, Bierlaire D, Zisou K, Shan Yan A, Cao-Lormeau VM, Broult J. Potential for Zika virus transmission through blood transfusion demonstrated during an outbreak in French Polynesia, November 2013 to February 2014. *Euro Surveill* (2014) 19: doi: 10.2807/1560-7917.es2014.19.14.20761
249. Kuehnert MJ, Basavaraju SV, Moseley RR, Pate LL, Galel SA, Williamson PC, Busch MP, Alsina JO, Climent-Peris C, Marks PW, et al. Screening of Blood Donations for Zika Virus Infection - Puerto Rico, April 3-June 11, 2016. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* (2016) 65:627–628. doi: 10.15585/mmwr.mm6524e2
250. Barjas-Castro ML, Angerami RN, Cunha MS, Suzuki A, Nogueira JS, Rocco IM, Maeda AY, Vasami FGS, Katz G, Boin IFSF, et al. Probable transfusion-transmitted Zika virus in Brazil. *Transfusion* (2016) 56:1684–1688. doi: 10.1111/trf.13681



251. Kleinman S. Pathogen inactivation: emerging indications. *Curr Opin Hematol* (2015) 22:547–553. doi: 10.1097/MOH.0000000000000186
252. Besnard M, Lastere S, Teissier A, Cao-Lormeau V, Musso D. Evidence of perinatal transmission of Zika virus, French Polynesia, December 2013 and February 2014. *Euro Surveill* (2014) 19:
253. Oliveira Melo AS, Malinger G, Ximenes R, Szejnfeld PO, Alves Sampaio S, Bispo de Filippis AM. Zika virus intrauterine infection causes fetal brain abnormality and microcephaly: tip of the iceberg? *Ultrasound Obstet Gynecol* (2016) 47:6–7. doi: 10.1002/uog.15831
254. Calvet G, Aguiar RS, Melo ASO, Sampaio SA, de Filippis I, Fabri A, Araujo ESM, de Sequeira PC, de Mendonça MCL, de Oliveira L, et al. Detection and sequencing of Zika virus from amniotic fluid of fetuses with microcephaly in Brazil: a case study. *Lancet Infect Dis* (2016) 16:653–660. doi: 10.1016/S1473-3099(16)00095-5
255. Blohm GM, Lednicky JA, Márquez M, White SK, Loeb JC, Pacheco CA, Nolan DJ, Paisie T, Salemi M, Rodríguez-Morales AJ, et al. Evidence for Mother-to-Child Transmission of Zika Virus Through Breast Milk. *Clin Infect Dis* (2018) 66:1120–1121. doi: 10.1093/cid/cix968
256. Dupont-Rouzeyrol M, Biron A, O’Connor O, Huguon E, Descloux E. Infectious Zika viral particles in breastmilk. *Lancet* (2016) 387:1051. doi: 10.1016/S0140-6736(16)00624-3
257. Johansson MA, Mier-y-Teran-Romero L, Reefhuis J, Gilboa SM, Hills SL. Zika and the Risk of Microcephaly. *N Engl J Med* (2016) 375:1–4. doi: 10.1056/NEJMp1605367
258. van der Eijk AA, van Genderen PJ, Verdijk RM, Reusken CB, Mögling R, van Kampen JJA, Widagdo W, Aron GI, GeurtsvanKessel CH, Pas SD, et al. Miscarriage Associated with Zika Virus Infection. *N Engl J Med* (2016) 375:1002–1004. doi: 10.1056/NEJMc1605898
259. El Costa H, Gouilly J, Mansuy J-M, Chen Q, Levy C, Cartron G, Veas F, Al-Daccak R, Izopet J, Jabrane-Ferrat N. ZIKA virus reveals broad tissue and cell tropism during the first trimester of pregnancy. *Sci Rep* (2016) 6:35296. doi: 10.1038/srep35296
260. Haddow AD, Schuh AJ, Yasuda CY, Kasper MR, Heang V, Huy R, Guzman H, Tesh RB, Weaver SC. Genetic characterization of Zika virus strains: geographic expansion of the Asian lineage. *PLoS Negl Trop Dis* (2012) 6:e1477. doi: 10.1371/journal.pntd.0001477
261. Aubry F, Jacobs S, Darmuzey M, Lequime S, Delang L, Fontaine A, Jupatanakul N, Miot EF, Dabo S, Manet C, et al. Recent African strains of Zika virus display higher transmissibility and fetal pathogenicity than Asian strains. *Nat Commun* (2021) 12:916. doi: 10.1038/s41467-021-21199-z
262. Lazear HM, Diamond MS. Zika Virus: New Clinical Syndromes and Its Emergence in the Western Hemisphere. *Journal of Virology* (2016) 90:4864–4875. doi: 10.1128/JVI.00252-16

263. Barreto-Vieira DF, Barth OM, Silva MAN da, Santos CC, Santos A da S, F JB, Filippis AMB de. Ultrastructure of Zika virus particles in cell cultures. *Mem Inst Oswaldo Cruz* (2016) 111:532–534. doi: 10.1590/0074-02760160104
264. Yun S-I, Song B-H, Frank JC, Julander JG, Polejaeva IA, Davies CJ, White KL, Lee Y-M. Complete Genome Sequences of Three Historically Important, Spatiotemporally Distinct, and Genetically Divergent Strains of Zika Virus: MR-766, P6-740, and PRVABC-59. *Genome Announc* (2016) 4: doi: 10.1128/genomeA.00800-16
265. Dong H, Fink K, Züst R, Lim SP, Qin C-F, Shi P-Y. Flavivirus RNA methylation. *J Gen Virol* (2014) 95:763–778. doi: 10.1099/vir.0.062208-0
266. Göertz GP, Abbo SR, Fros JJ, Pijlman GP. Functional RNA during Zika virus infection. *Virus Research* (2018) 254:41–53. doi: 10.1016/j.virusres.2017.08.015
267. Dong H, Zhang B, Shi P-Y. Flavivirus methyltransferase: a novel antiviral target. *Antiviral Res* (2008) 80:1–10. doi: 10.1016/j.antiviral.2008.05.003
268. Daffis S, Szretter KJ, Schriewer J, Li J, Youn S, Errett J, Lin T-Y, Schneller S, Züst R, Dong H, et al. 2'-O methylation of the viral mRNA cap evades host restriction by IFIT family members. *Nature* (2010) 468:452–456. doi: 10.1038/nature09489
269. Klema VJ, Padmanabhan R, Choi KH. Flaviviral Replication Complex: Coordination between RNA Synthesis and 5'-RNA Capping. *Viruses* (2015) 7:4640–4656. doi: 10.3390/v7082837
270. Clarke BD, Roby JA, Slonchak A, Khromykh AA. Functional non-coding RNAs derived from the flavivirus 3' untranslated region. *Virus Research* (2015) 206:53–61. doi: 10.1016/j.virusres.2015.01.026
271. Castle E, Nowak T, Leidner U, Wengler G, Wengler G. Sequence analysis of the viral core protein and the membrane-associated proteins V1 and NV2 of the flavivirus West Nile virus and of the genome sequence for these proteins. *Virology* (1985) 145:227–236. doi: 10.1016/0042-6822(85)90156-4
272. Wengler G, Castle E, Leidner U, Nowak T, Wengler G. Sequence analysis of the membrane protein V3 of the flavivirus West Nile virus and of its gene. *Virology* (1985) 147:264–274. doi: 10.1016/0042-6822(85)90129-1
273. Lobigs M. Flavivirus premembrane protein cleavage and spike heterodimer secretion require the function of the viral proteinase NS3. *Proc Natl Acad Sci USA* (1993) 90:6218–6222. doi: 10.1073/pnas.90.13.6218
274. Stocks CE, Lobigs M. Signal peptidase cleavage at the flavivirus C-prM junction: dependence on the viral NS2B-3 protease for efficient processing requires determinants in C, the signal peptide, and prM. *J Virol* (1998) 72:2141–2149. doi: 10.1128/JVI.72.3.2141-2149.1998
275. Chambers TJ, McCourt DW, Rice CM. Production of yellow fever virus proteins in infected cells: identification of discrete polyprotein species and analysis of cleavage kinetics using region-specific polyclonal antisera. *Virology* (1990) 177:159–174. doi: 10.1016/0042-6822(90)90470-c

276. Speight G, Coia G, Parker MD, Westaway EG. Gene mapping and positive identification of the non-structural proteins NS2A, NS2B, NS3, NS4B and NS5 of the flavivirus Kunjin and their cleavage sites. *J Gen Virol* (1988) 69 ( Pt 1):23–34. doi: 10.1099/0022-1317-69-1-23
277. Lin C, Amberg SM, Chambers TJ, Rice CM. Cleavage at a novel site in the NS4A region by the yellow fever virus NS2B-3 proteinase is a prerequisite for processing at the downstream 4A/4B signalase site. *J Virol* (1993) 67:2327–2335. doi: 10.1128/JVI.67.4.2327-2335.1993
278. Amberg SM, Nestorowicz A, McCourt DW, Rice CM. NS2B-3 proteinase-mediated processing in the yellow fever virus structural region: in vitro and in vivo studies. *J Virol* (1994) 68:3794–3802. doi: 10.1128/JVI.68.6.3794-3802.1994
279. Yamshchikov VF, Compans RW. Processing of the intracellular form of the west Nile virus capsid protein by the viral NS2B-NS3 protease: an in vitro study. *J Virol* (1994) 68:5765–5771. doi: 10.1128/JVI.68.9.5765-5771.1994
280. Stadler K, Allison SL, Schalich J, Heinz FX. Proteolytic activation of tick-borne encephalitis virus by furin. *J Virol* (1997) 71:8475–8481.
281. Elshuber S, Allison SL, Heinz FX, Mandl CW. Cleavage of protein prM is necessary for infection of BHK-21 cells by tick-borne encephalitis virus. *J Gen Virol* (2003) 84:183–191. doi: 10.1099/vir.0.18723-0
282. Falgout B, Markoff L. Evidence that flavivirus NS1-NS2A cleavage is mediated by a membrane-bound host protease in the endoplasmic reticulum. *J Virol* (1995) 69:7232–7243.
283. Hori H, Lai CJ. Cleavage of dengue virus NS1-NS2A requires an octapeptide sequence at the C terminus of NS1. *J Virol* (1990) 64:4573–4577. doi: 10.1128/JVI.64.9.4573-4577.1990
284. Jones CT, Ma L, Burgner JW, Groesch TD, Post CB, Kuhn RJ. Flavivirus capsid is a dimeric alpha-helical protein. *J Virol* (2003) 77:7143–7149. doi: 10.1128/jvi.77.12.7143-7149.2003
285. Guirakhoo F, Bolin RA, Roehrig JT. The Murray Valley encephalitis virus prM protein confers acid resistance to virus particles and alters the expression of epitopes within the R2 domain of E glycoprotein. *Virology* (1992) 191:921–931. doi: 10.1016/0042-6822(92)90267-s
286. Cosset F-L, Lavillette D. Cell entry of enveloped viruses. *Adv Genet* (2011) 73:121–183. doi: 10.1016/B978-0-12-380860-8.00004-5
287. Beaver JT, Lelutiu N, Habib R, Skountzou I. Evolution of Two Major Zika Virus Lineages: Implications for Pathology, Immune Response, and Vaccine Development. *Front Immunol* (2018) 9:1640. doi: 10.3389/fimmu.2018.01640
288. Zhao H, Fernandez E, Dowd KA, Speer SD, Platt DJ, Gorman MJ, Govero J, Nelson CA, Pierson TC, Diamond MS, et al. Structural basis of Zika virus specific antibody protection. *Cell* (2016) 166:1016–1027. doi: 10.1016/j.cell.2016.07.020

289. Wang Q, Yang H, Liu X, Dai L, Ma T, Qi J, Wong G, Peng R, Liu S, Li J, et al. Molecular determinants of human neutralizing antibodies isolated from a patient infected with Zika virus. *Sci Transl Med* (2016) 8:369ra179. doi: 10.1126/scitranslmed.aai8336
290. Dejnirattisai W, Supasa P, Wongwiwat W, Rouvinski A, Barba-Spaeth G, Duangchinda T, Sakuntabhai A, Cao-Lormeau V-M, Malasit P, Rey FA, et al. Dengue virus sero-cross-reactivity drives antibody-dependent enhancement of infection with Zika virus. *Nat Immunol* (2016) 17:1102–1108. doi: 10.1038/ni.3515
291. Barba-Spaeth G, Dejnirattisai W, Rouvinski A, Vaney M-C, Medits I, Sharma A, Simon-Lorière E, Sakuntabhai A, Cao-Lormeau V-M, Haouz A, et al. Structural basis of potent Zika-dengue virus antibody cross-neutralization. *Nature* (2016) 536:48–53. doi: 10.1038/nature18938
292. Swanstrom JA, Plante JA, Plante KS, Young EF, McGowan E, Gallichotte EN, Widman DG, Heise MT, de Silva AM, Baric RS. Dengue Virus Envelope Dimer Epitope Monoclonal Antibodies Isolated from Dengue Patients Are Protective against Zika Virus. *mBio* (2016) 7: doi: 10.1128/mBio.01123-16
293. Dussupt V, Sankhala RS, Gromowski GD, Donofrio G, De La Barrera RA, Larocca RA, Zaky W, Mendez-Rivera L, Choe M, Davidson E, et al. Potent Zika and dengue cross-neutralizing antibodies induced by Zika vaccination in a dengue-experienced donor. *Nat Med* (2020) 26:228–235. doi: 10.1038/s41591-019-0746-2
294. Collins MH, McGowan E, Jadi R, Young E, Lopez CA, Baric RS, Lazear HM, de Silva AM. Lack of Durable Cross-Neutralizing Antibodies Against Zika Virus from Dengue Virus Infection. *Emerg Infect Dis* (2017) 23:773–781. doi: 10.3201/eid2305.161630
295. Lindenbach BD, Thiel H-J, Rice CM. Flaviviridae: The Viruses and Their Replication. (2006)52.
296. Roby JA, Funk A, Khromykh AA. Flavivirus replication and assembly. *Molecular Virology and Control of Flaviviruses* (2012) <https://researchoutput.csu.edu.au/en/publications/flavivirus-replication-and-assembly-2> [Accessed February 13, 2021]
297. Wengler G, Wengler G. The NS 3 nonstructural protein of flaviviruses contains an RNA triphosphatase activity. *Virology* (1993) 197:265–273. doi: 10.1006/viro.1993.1587
298. Bartholomeusz A, Tomlinson E, Wright PJ, Birch C, Locarnini S, Weigold H, Marcuccio S, Holan G. Use of a flavivirus RNA-dependent RNA polymerase assay to investigate the antiviral activity of selected compounds. *Antiviral Res* (1994) 24:341–350. doi: 10.1016/0166-3542(94)90080-9
299. Inokuchi Y, Hirashima A. Interference with viral infection by defective RNA replicase. *J Virol* (1987) 61:3946–3949.
300. Poch O, Sauvaget I, Delarue M, Tordo N. Identification of four conserved motifs among the RNA-dependent polymerase encoding elements. *EMBO J* (1989) 8:3867–3874.

301. Koonin EV. The phylogeny of RNA-dependent RNA polymerases of positive-strand RNA viruses. *Journal of General Virology* (1991) 72:2197–2206. doi: 10.1099/0022-1317-72-9-2197
302. Flamand M, Megret F, Mathieu M, Lepault J, Rey FA, Deubel V. Dengue virus type 1 nonstructural glycoprotein NS1 is secreted from mammalian cells as a soluble hexamer in a glycosylation-dependent fashion. *J Virol* (1999) 73:6104–6110. doi: 10.1128/JVI.73.7.6104-6110.1999
303. Gutsche I, Coulibaly F, Voss JE, Salmon J, d’Alayer J, Ermonval M, Larquet E, Charneau P, Krey T, Mégret F, et al. Secreted dengue virus nonstructural protein NS1 is an atypical barrel-shaped high-density lipoprotein. *Proc Natl Acad Sci U S A* (2011) 108:8003–8008. doi: 10.1073/pnas.1017338108
304. McLean JE, Wudzinska A, Datan E, Quaglino D, Zakeri Z. Flavivirus NS4A-induced Autophagy Protects Cells against Death and Enhances Virus Replication. *J Biol Chem* (2011) 286:22147–22159. doi: 10.1074/jbc.M110.192500
305. Miller S, Kastner S, Krijnse-Locker J, Bühler S, Bartenschlager R. The non-structural protein 4A of dengue virus is an integral membrane protein inducing membrane alterations in a 2K-regulated manner. *J Biol Chem* (2007) 282:8873–8882. doi: 10.1074/jbc.M609919200
306. Leung JY, Pijlman GP, Kondratieva N, Hyde J, Mackenzie JM, Khromykh AA. Role of Nonstructural Protein NS2A in Flavivirus Assembly. *J Virol* (2008) 82:4731–4741. doi: 10.1128/JVI.00002-08
307. Bollati M, Alvarez K, Assenberg R, Baronti C, Canard B, Cook S, Coutard B, Decroly E, de Lamballerie X, Gould EA, et al. Structure and functionality in flavivirus NS-proteins: Perspectives for drug design. *Antiviral Res* (2010) 87:125–148. doi: 10.1016/j.antiviral.2009.11.009
308. Malet H, Massé N, Selisko B, Romette J-L, Alvarez K, Guillemot JC, Tolou H, Yap TL, Vasudevan SG, Lescar J, et al. The flavivirus polymerase as a target for drug discovery. *Antiviral Research* (2008) 80:23–35. doi: 10.1016/j.antiviral.2008.06.007
309. Miner JJ, Diamond MS. Zika Virus Pathogenesis and Tissue Tropism. *Cell Host Microbe* (2017) 21:134–142. doi: 10.1016/j.chom.2017.01.004
310. Ngono AE, Shresta S. Immune Response to Dengue and Zika. *Annu Rev Immunol* (2018) 36:279–308. doi: 10.1146/annurev-immunol-042617-053142
311. Devhare P, Meyer K, Steele R, Ray RB, Ray R. Zika virus infection dysregulates human neural stem cell growth and inhibits differentiation into neuroprogenitor cells. *Cell Death Dis* (2017) 8:e3106. doi: 10.1038/cddis.2017.517
312. Tang H, Hammack C, Ogden SC, Wen Z, Qian X, Li Y, Yao B, Shin J, Zhang F, Lee EM, et al. Zika Virus Infects Human Cortical Neural Progenitors and Attenuates Their Growth. *Cell Stem Cell* (2016) 18:587–590. doi: 10.1016/j.stem.2016.02.016

313. Rothan HA, Fang S, Mohan M, Byrareddy SN. Correction to: Zika Virus and the Metabolism of Neuronal Cells. *Mol Neurobiol* (2019) 56:2558. doi: 10.1007/s12035-018-1337-9
314. Meertens L, Labeau A, Dejarnac O, Cipriani S, Sinigaglia L, Bonnet-Madin L, Le Charpentier T, Hafirassou ML, Zamborlini A, Cao-Lormeau V-M, et al. Axl Mediates ZIKA Virus Entry in Human Glial Cells and Modulates Innate Immune Responses. *Cell Rep* (2017) 18:324–333. doi: 10.1016/j.celrep.2016.12.045
315. Manangeeswaran M, Kielczewski JL, Sen HN, Xu BC, Ireland DDC, McWilliams IL, Chan C-C, Caspi RR, Verthelyi D. ZIKA virus infection causes persistent chorioretinal lesions. *Emerg Microbes Infect* (2018) 7:96. doi: 10.1038/s41426-018-0096-z
316. Singh S, Farr D, Kumar A. Erratum: Singh, S. et al. Ocular Manifestations of Emerging Flaviviruses and the Blood-Retinal Barrier. *Viruses* 2018, 10, 530. *Viruses* (2019) 11: doi: 10.3390/v11050475
317. Hamel R, Dejarnac O, Wichit S, Ekchariyawat P, Neyret A, Luplertlop N, Perera-Lecoin M, Surasombatpattana P, Talignani L, Thomas F, et al. Biology of Zika Virus Infection in Human Skin Cells. *J Virol* (2015) 89:8880–8896. doi: 10.1128/JVI.00354-15
318. Pagani I, Ghezzi S, Ulisse A, Rubio A, Turrini F, Garavaglia E, Candiani M, Castilletti C, Ippolito G, Poli G, et al. Human Endometrial Stromal Cells Are Highly Permissive To Productive Infection by Zika Virus. *Sci Rep* (2017) 7:44286. doi: 10.1038/srep44286
319. Liu S, DeLalio LJ, Isakson BE, Wang TT. AXL-Mediated Productive Infection of Human Endothelial Cells by Zika Virus. *Circ Res* (2016) 119:1183–1189. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.116.309866
320. Tabata T, Pettitt M, Puerta-Guardo H, Michlmayr D, Wang C, Fang-Hoover J, Harris E, Pereira L. Zika Virus Targets Different Primary Human Placental Cells Suggesting Two Routes for Vertical Transmission. *Cell Host Microbe* (2016) 20:155–166. doi: 10.1016/j.chom.2016.07.002
321. Aagaard KM, Lahon A, Suter MA, Arya RP, Seferovic MD, Vogt MB, Hu M, Stossi F, Mancini MA, Harris RA, et al. Primary Human Placental Trophoblasts are Permissive for Zika Virus (ZIKV) Replication. *Sci Rep* (2017) 7:41389. doi: 10.1038/srep41389
322. Quicke KM, Bowen JR, Johnson EL, McDonald CE, Ma H, O’Neal JT, Rajakumar A, Wrammert J, Rimawi BH, Pulendran B, et al. Zika Virus Infects Human Placental Macrophages. *Cell Host Microbe* (2016) 20:83–90. doi: 10.1016/j.chom.2016.05.015
323. Winkler CW, Evans AB, Carmody AB, Peterson KE. Placental myeloid cells protect against Zika virus vertical transmission in a Rag1-deficient mouse model. *J Immunol* (2020) 205:143–152. doi: 10.4049/jimmunol.1901289
324. Vielle NJ, Zumkehr B, García-Nicolás O, Blank F, Stojanov M, Musso D, Baud D, Summerfield A, Alves MP. Silent infection of human dendritic cells by African and Asian strains of Zika virus. *Sci Rep* (2018) 8:5440. doi: 10.1038/s41598-018-23734-3
325. Perera-Lecoin M, Meertens L, Carnec X, Amara A. Flavivirus entry receptors: an update. *Viruses* (2013) 6:69–88. doi: 10.3390/v6010069

326. Pierson TC, Kielian M. Flaviviruses: braking the entering. *Curr Opin Virol* (2013) 3:3–12. doi: 10.1016/j.coviro.2012.12.001
327. Dhama K, Karthik K, Tiwari R, Khandia R, Munjal A, Chakraborty S, Yadav JP, Kumar D, Latheef S, M. S, et al. Zika Virus / Zika Fever: A Comprehensive Update. *Journal of Experimental Biology and Agricultural Sciences* (2018) 6:1–31. doi: 10.18006/2018.6(1).1.31
328. Meertens L, Carnec X, Lecoin MP, Ramdasi R, Guivel-Benhassine F, Lew E, Lemke G, Schwartz O, Amara A. The TIM and TAM families of phosphatidylserine receptors mediate dengue virus entry. *Cell Host Microbe* (2012) 12:544–557. doi: 10.1016/j.chom.2012.08.009
329. Lemke G, Rothlin CV. Immunobiology of the TAM receptors. *Nat Rev Immunol* (2008) 8:327–336. doi: 10.1038/nri2303
330. Rothlin CV, Ghosh S, Zuniga EI, Oldstone MBA, Lemke G. TAM receptors are pleiotropic inhibitors of the innate immune response. *Cell* (2007) 131:1124–1136. doi: 10.1016/j.cell.2007.10.034
331. Lemke G. Biology of the TAM receptors. *Cold Spring Harb Perspect Biol* (2013) 5:a009076. doi: 10.1101/cshperspect.a009076
332. Bhattacharyya S, Zagórska A, Lew ED, Shrestha B, Rothlin CV, Naughton J, Diamond MS, Lemke G, Young JAT. Enveloped Viruses Disable Innate Immune Responses in Dendritic Cells by Direct Activation of TAM Receptors. *Cell Host Microbe* (2013) 14:136–147. doi: 10.1016/j.chom.2013.07.005
333. Yoshimura A, Naka T, Kubo M. SOCS proteins, cytokine signalling and immune regulation. *Nature Reviews Immunology* (2007) 7:454–465. doi: 10.1038/nri2093
334. Strange DP, Jiyarom B, Pourhabibi Zarandi N, Xie X, Baker C, Sadri-Ardekani H, Shi P-Y, Verma S. Axl Promotes Zika Virus Entry and Modulates the Antiviral State of Human Sertoli Cells. *mBio* (2019) 10: doi: 10.1128/mBio.01372-19
335. Croker BA, Kiu H, Nicholson SE. SOCS Regulation of the JAK/STAT Signalling Pathway. *Semin Cell Dev Biol* (2008) 19:414–422. doi: 10.1016/j.semcdb.2008.07.010
336. Chen J, Yang Y-F, Yang Y, Zou P, Chen J, He Y, Shui S-L, Cui Y-R, Bai R, Liang Y-J, et al. AXL promotes Zika virus infection in astrocytes by antagonizing type I interferon signalling. *Nat Microbiol* (2018) 3:302–309. doi: 10.1038/s41564-017-0092-4
337. Miorin L, Maestre AM, Fernandez-Sesma A, García-Sastre A. ANTAGONISM OF TYPE I INTERFERON BY FLAVIVIRUSES. *Biochem Biophys Res Commun* (2017) 492:587–596. doi: 10.1016/j.bbrc.2017.05.146
338. Wium M, Pacciez JD, Zerbini LF. The Dual Role of TAM Receptors in Autoimmune Diseases and Cancer: An Overview. *Cells* (2018) 7: doi: 10.3390/cells7100166
339. Freeman GJ, Casasnovas JM, Umetsu DT, DeKruyff RH. TIM genes: a family of cell surface phosphatidylserine receptors that regulate innate and adaptive immunity. *Immunol Rev* (2010) 235:172–189. doi: 10.1111/j.0105-2896.2010.00903.x

340. Dejarnac O, Hafirassou ML, Chazal M, Versapuech M, Gaillard J, Perera-Lecoin M, Umana-Diaz C, Bonnet-Madin L, Carnec X, Tinevez J-Y, et al. TIM-1 Ubiquitination Mediates Dengue Virus Entry. *Cell Rep* (2018) 23:1779–1793. doi: 10.1016/j.celrep.2018.04.013
341. Davis CW, Nguyen H-Y, Hanna SL, Sánchez MD, Doms RW, Pierson TC. West Nile virus discriminates between DC-SIGN and DC-SIGNR for cellular attachment and infection. *J Virol* (2006) 80:1290–1301. doi: 10.1128/JVI.80.3.1290-1301.2006
342. Tassaneeritthep B, Burgess TH, Granelli-Piperno A, Trumpfheller C, Finke J, Sun W, Eller MA, Pattanapanyasat K, Sarasombath S, Birx DL, et al. DC-SIGN (CD209) Mediates Dengue Virus Infection of Human Dendritic Cells. *J Exp Med* (2003) 197:823–829. doi: 10.1084/jem.20021840
343. Richard AS, Shim B-S, Kwon Y-C, Zhang R, Otsuka Y, Schmitt K, Berri F, Diamond MS, Choe H. AXL-dependent infection of human fetal endothelial cells distinguishes Zika virus from other pathogenic flaviviruses. *Proc Natl Acad Sci USA* (2017) 114:2024–2029. doi: 10.1073/pnas.1620558114
344. Jemielity S, Wang JJ, Chan YK, Ahmed AA, Li W, Monahan S, Bu X, Farzan M, Freeman GJ, Umetsu DT, et al. TIM-family proteins promote infection of multiple enveloped viruses through virion-associated phosphatidylserine. *PLoS Pathog* (2013) 9:e1003232. doi: 10.1371/journal.ppat.1003232
345. Richard AS, Zhang A, Park S-J, Farzan M, Zong M, Choe H. Virion-associated phosphatidylethanolamine promotes TIM1-mediated infection by Ebola, dengue, and West Nile viruses. *Proc Natl Acad Sci USA* (2015) 112:14682–14687. doi: 10.1073/pnas.1508095112
346. Fernández-Fernández L, Bellido-Martín L, García de Frutos P. Growth arrest-specific gene 6 (GAS6). An outline of its role in haemostasis and inflammation. *Thromb Haemost* (2008) 100:604–610. doi: 10.1160/th08-04-0253
347. Stitt TN, Conn G, Gore M, Lai C, Bruno J, Radziejewski C, Mattsson K, Fisher J, Gies DR, Jones PF. The anticoagulation factor protein S and its relative, Gas6, are ligands for the Tyro 3/Axl family of receptor tyrosine kinases. *Cell* (1995) 80:661–670. doi: 10.1016/0092-8674(95)90520-0
348. Amara A, Mercer J. Viral apoptotic mimicry. *Nat Rev Microbiol* (2015) 13:461–469. doi: 10.1038/nrmicro3469
349. Chu JJH, Ng ML. Infectious Entry of West Nile Virus Occurs through a Clathrin-Mediated Endocytic Pathway. *J Virol* (2004) 78:10543–10555. doi: 10.1128/JVI.78.19.10543-10555.2004
350. Acosta EG, Castilla V, Damonte EB. Functional entry of dengue virus into *Aedes albopictus* mosquito cells is dependent on clathrin-mediated endocytosis. *J Gen Virol* (2008) 89:474–484. doi: 10.1099/vir.0.83357-0
351. Mosso C, Galván-Mendoza IJ, Ludert JE, del Angel RM. Endocytic pathway followed by dengue virus to infect the mosquito cell line C6/36 HT. *Virology* (2008) 378:193–199. doi: 10.1016/j.virol.2008.05.012



352. Cruz-Oliveira C, Freire JM, Conceição TM, Higa LM, Castanho MARB, Da Poian AT. Receptors and routes of dengue virus entry into the host cells. *FEMS Microbiology Reviews* (2015) 39:155–170. doi: 10.1093/femsre/fuu004
353. Smit JM, Moesker B, Rodenhuis-Zybert I, Wilschut J. Flavivirus cell entry and membrane fusion. *Viruses* (2011) 3:160–171. doi: 10.3390/v3020160
354. Stiasny K, Fritz R, Pangerl K, Heinz FX. Molecular mechanisms of flavivirus membrane fusion. *Amino Acids* (2011) 41:1159–1163. doi: 10.1007/s00726-009-0370-4
355. Chao LH, Klein DE, Schmidt AG, Peña JM, Harrison SC. Correction: Sequential conformational rearrangements in flavivirus membrane fusion. *Elife* (2015) 4: doi: 10.7554/eLife.08656
356. Gratton R, Agrelli A, Tricarico PM, Brandão L, Crovella S. Autophagy in Zika Virus Infection: A Possible Therapeutic Target to Counteract Viral Replication. *Int J Mol Sci* (2019) 20: doi: 10.3390/ijms20051048
357. Cortese M, Goellner S, Acosta EG, Neufeldt CJ, Oleksiuk O, Lampe M, Haselmann U, Funaya C, Schieber N, Ronchi P, et al. Ultrastructural Characterization of Zika Virus Replication Factories. *Cell Rep* (2017) 18:2113–2123. doi: 10.1016/j.celrep.2017.02.014
358. Filomatori CV, Iglesias NG, Villordo SM, Alvarez DE, Gamarnik AV. RNA Sequences and Structures Required for the Recruitment and Activity of the Dengue Virus Polymerase. *J Biol Chem* (2011) 286:6929–6939. doi: 10.1074/jbc.M110.162289
359. Hsu N-Y, Ilnytska O, Belov G, Santiana M, Chen Y-H, Takvorian PM, Pau C, van der Schaar H, Kaushik-Basu N, Balla T, et al. Viral reorganization of the secretory pathway generates distinct organelles for RNA replication. *Cell* (2010) 141:799–811. doi: 10.1016/j.cell.2010.03.050
360. Savidis G, McDougall WM, Meraner P, Perreira JM, Portmann JM, Trincucci G, John SP, Aker AM, Renzette N, Robbins DR, et al. Identification of Zika Virus and Dengue Virus Dependency Factors using Functional Genomics. *Cell Reports* (2016) 16:232–246. doi: 10.1016/j.celrep.2016.06.028
361. Gillespie LK, Hoenen A, Morgan G, Mackenzie JM. The Endoplasmic Reticulum Provides the Membrane Platform for Biogenesis of the Flavivirus Replication Complex. *J Virol* (2010) 84:10438–10447. doi: 10.1128/JVI.00986-10
362. Garcia-Blanco MA, Vasudevan SG, Bradrick SS, Nicchitta C. Flavivirus RNA transactions from viral entry to genome replication. *Antiviral Research* (2016) 134:244–249. doi: 10.1016/j.antiviral.2016.09.010
363. Selisko B, Wang C, Harris E, Canard B. Regulation of Flavivirus RNA synthesis and replication. *Current Opinion in Virology* (2014) 9:74–83. doi: 10.1016/j.coviro.2014.09.011
364. Rey FA, Heinz FX, Mandl C, Kunz C, Harrison SC. The envelope glycoprotein from tick-borne encephalitis virus at 2 Å resolution. *Nature* (1995) 375:291–298. doi: 10.1038/375291a0

365. Zhang X, Ge P, Yu X, Brannan JM, Bi G, Zhang Q, Schein S, Zhou ZH. CryoEM structure of the mature dengue virus at 3.5-Å resolution. *Nat Struct Mol Biol* (2013) 20:105–110. doi: 10.1038/nsmb.2463
366. Li L, Lok S-M, Yu I-M, Zhang Y, Kuhn RJ, Chen J, Rossmann MG. The flavivirus precursor membrane-envelope protein complex: structure and maturation. *Science* (2008) 319:1830–1834. doi: 10.1126/science.1153263
367. Zhang Y, Zhang W, Ogata S, Clements D, Strauss JH, Baker TS, Kuhn RJ, Rossmann MG. Conformational Changes of the Flavivirus E Glycoprotein. *Structure* (2004) 12:1607–1618. doi: 10.1016/j.str.2004.06.019
368. Zhang Y, Corver J, Chipman PR, Zhang W, Pletnev SV, Sedlak D, Baker TS, Strauss JH, Kuhn RJ, Rossmann MG. Structures of immature flavivirus particles. *EMBO J* (2003) 22:2604–2613. doi: 10.1093/emboj/cdg270
369. Guirakhoo F, Heinz FX, Mandl CW, Holzmann H, Kunz C. Fusion activity of flaviviruses: comparison of mature and immature (prM-containing) tick-borne encephalitis virions. *J Gen Virol* (1991) 72 (Pt 6):1323–1329. doi: 10.1099/0022-1317-72-6-1323
370. Junjhon J, Edwards TJ, Utaipat U, Bowman VD, Holdaway HA, Zhang W, Keelapang P, Puttikhunt C, Perera R, Chipman PR, et al. Influence of pr-M Cleavage on the Heterogeneity of Extracellular Dengue Virus Particles. *J Virol* (2010) 84:8353–8358. doi: 10.1128/JVI.00696-10
371. Pierson TC, Diamond MS. Degrees of maturity: the complex structure and biology of flaviviruses. *Curr Opin Virol* (2012) 2:168–175. doi: 10.1016/j.coviro.2012.02.011
372. Yun S-I, Lee Y-M. Zika virus: An emerging flavivirus. *J Microbiol* (2017) 55:204–219. doi: 10.1007/s12275-017-7063-6
373. Agrelli A, de Moura RR, Crovella S, Brandão LAC. ZIKA virus entry mechanisms in human cells. *Infection, Genetics and Evolution* (2019) 69:22–29. doi: 10.1016/j.meegid.2019.01.018
374. Swaminathan S, Schlaberg R, Lewis J, Hanson KE, Couturier MR. Fatal Zika Virus Infection with Secondary Nonsexual Transmission. *N Engl J Med* (2016) 375:1907–1909. doi: 10.1056/NEJMc1610613
375. Sarno M, Sacramento GA, Khouri R, do Rosário MS, Costa F, Archanjo G, Santos LA, Nery N, Vasilakis N, Ko AI, et al. Zika Virus Infection and Stillbirths: A Case of Hydrops Fetalis, Hydranencephaly and Fetal Demise. *PLoS Negl Trop Dis* (2016) 10:e0004517. doi: 10.1371/journal.pntd.0004517
376. Beaufrière A, Bessières B, Bonnière M, Driessen M, Alfano C, Couderc T, Thiry M, Thelen N, Lecuit M, Attié-Bitach T, et al. A clinical and histopathological study of malformations observed in fetuses infected by the Zika virus. *Brain Pathol* (2019) 29:114–125. doi: 10.1111/bpa.12644
377. Syndrome de Guillain-Barré. <https://www.who.int/fr/news-room/fact-sheets/detail/guillain-barré-syndrome> [Accessed February 14, 2021]

378. Hughes RAC, Cornblath DR. Guillain-Barré syndrome. *Lancet* (2005) 366:1653–1666. doi: 10.1016/S0140-6736(05)67665-9
379. Pradhan F, Burns JD, Agameya A, Patel A, Alfaqih M, Small JE, Ooi W. Case Report: Zika Virus Meningoencephalitis and Myelitis and Associated Magnetic Resonance Imaging Findings. *Am J Trop Med Hyg* (2017) 97:340–343. doi: 10.4269/ajtmh.16-0921
380. Neri VC, Xavier MF, Barros PO, Melo Bento C, Marignier R, Papais Alvarenga R. Case Report: Acute Transverse Myelitis after Zika Virus Infection. *Am J Trop Med Hyg* (2018) 99:1419–1421. doi: 10.4269/ajtmh.17-0938
381. Acosta-Ampudia Y, Monsalve DM, Castillo-Medina LF, Rodríguez Y, Pacheco Y, Halstead S, Willison HJ, Anaya J-M, Ramírez-Santana C. Autoimmune Neurological Conditions Associated With Zika Virus Infection. *Front Mol Neurosci* (2018) 11:116. doi: 10.3389/fnmol.2018.00116
382. Devakumar D, Bamford A, Ferreira MU, Broad J, Rosch RE, Groce N, Breuer J, Cardoso MA, Copp AJ, Alexandre P, et al. Infectious causes of microcephaly: epidemiology, pathogenesis, diagnosis, and management. *The Lancet Infectious Diseases* (2018) 18:e1–e13. doi: 10.1016/S1473-3099(17)30398-5
383. Stracker TH, Morrison CG, Gergely F. Molecular causes of primary microcephaly and related diseases: a report from the UNIA Workshop. *Chromosoma* (2020) 129:115–120. doi: 10.1007/s00412-020-00737-6
384. Zika - PAHO/WHO | Pan American Health Organization. <https://www.paho.org/en/topics/zika> [Accessed February 18, 2021]
385. Kublin JL, Whitney JB. Zika virus research models. *Virus Res* (2018) 254:15–20. doi: 10.1016/j.virusres.2017.07.025
386. Dudley DM, Aliota MT, Mohr EL, Weiler AM, Lehrer-Brey G, Weisgrau KL, Mohns MS, Breitbach ME, Rasheed MN, Newman CM, et al. A rhesus macaque model of Asian-lineage Zika virus infection. *Nat Commun* (2016) 7:12204. doi: 10.1038/ncomms12204
387. Cugola FR, Fernandes IR, Russo FB, Freitas BC, Dias JLM, Guimarães KP, Benazzato C, Almeida N, Pignatari GC, Romero S, et al. The Brazilian Zika virus strain causes birth defects in experimental models. *Nature* (2016) 534:267–271. doi: 10.1038/nature18296
388. Nazmi A, Dutta K, Hazra B, Basu A. Role of pattern recognition receptors in flavivirus infections. *Virus Research* (2014) 185:32–40. doi: 10.1016/j.virusres.2014.03.013
389. da Silva MHM, Moises RNC, Alves BEB, Pereira HWB, de Paiva AAP, Morais IC, Nascimento YM, Monteiro JD, de Souto JT, Nascimento MSL, et al. Innate immune response in patients with acute Zika virus infection. *Med Microbiol Immunol* (2019) 208:703–714. doi: 10.1007/s00430-019-00588-8
390. Pichlmair A, Reis e Sousa C. Innate recognition of viruses. *Immunity* (2007) 27:370–383. doi: 10.1016/j.immuni.2007.08.012
391. Takeuchi O, Akira S. Pattern recognition receptors and inflammation. *Cell* (2010) 140:805–820. doi: 10.1016/j.cell.2010.01.022

392. Meylan E, Tschopp J, Karin M. Intracellular pattern recognition receptors in the host response. *Nature* (2006) 442:39–44. doi: 10.1038/nature04946
393. Yoneyama M, Fujita T. RNA recognition and signal transduction by RIG-I-like receptors. *Immunol Rev* (2009) 227:54–65. doi: 10.1111/j.1600-065X.2008.00727.x
394. Kato H, Takeuchi O, Sato S, Yoneyama M, Yamamoto M, Matsui K, Uematsu S, Jung A, Kawai T, Ishii KJ, et al. Differential roles of MDA5 and RIG-I helicases in the recognition of RNA viruses. *Nature* (2006) 441:101–105. doi: 10.1038/nature04734
395. Fredericksen BL, Keller BC, Fornek J, Katze MG, Gale M. Establishment and Maintenance of the Innate Antiviral Response to West Nile Virus Involves both RIG-I and MDA5 Signaling through IPS-1. *J Virol* (2008) 82:609–616. doi: 10.1128/JVI.01305-07
396. Nasirudeen AMA, Wong HH, Thien P, Xu S, Lam K-P, Liu DX. RIG-I, MDA5 and TLR3 Synergistically Play an Important Role in Restriction of Dengue Virus Infection. *PLoS Negl Trop Dis* (2011) 5: doi: 10.1371/journal.pntd.0000926
397. Seth RB, Sun L, Ea C-K, Chen ZJ. Identification and Characterization of MAVS, a Mitochondrial Antiviral Signaling Protein that Activates NF- $\kappa$ B and IRF3. *Cell* (2005) 122:669–682. doi: 10.1016/j.cell.2005.08.012
398. Wies E, Wang MK, Maharaj NP, Chen K, Zhou S, Finberg RW, Gack MU. Dephosphorylation of the RNA sensors RIG-I and MDA5 by the phosphatase PP1 is essential for innate immune signaling. *Immunity* (2013) 38:437–449. doi: 10.1016/j.immuni.2012.11.018
399. Zeng W, Sun L, Jiang X, Chen X, Hou F, Adhikari A, Xu M, Chen ZJ. Reconstitution of the RIG-I pathway reveals a signaling role of unanchored polyubiquitin chains in innate immunity. *Cell* (2010) 141:315–330. doi: 10.1016/j.cell.2010.03.029
400. Gack MU, Shin YC, Joo C-H, Urano T, Liang C, Sun L, Takeuchi O, Akira S, Chen Z, Inoue S, et al. TRIM25 RING-finger E3 ubiquitin ligase is essential for RIG-I-mediated antiviral activity. *Nature* (2007) 446:916–920. doi: 10.1038/nature05732
401. Liu S, Chen J, Cai X, Wu J, Chen X, Wu Y-T, Sun L, Chen ZJ. MAVS recruits multiple ubiquitin E3 ligases to activate antiviral signaling cascades. *Elife* (2013) 2:e00785. doi: 10.7554/eLife.00785
402. Hou F, Sun L, Zheng H, Skaug B, Jiang Q-X, Chen ZJ. MAVS Forms Functional Prion-Like Aggregates To Activate and Propagate Antiviral Innate Immune Response. *Cell* (2011) 146:448–461. doi: 10.1016/j.cell.2011.06.041
403. Sharma S, tenOever BR, Grandvaux N, Zhou G-P, Lin R, Hiscott J. Triggering the interferon antiviral response through an IKK-related pathway. *Science* (2003) 300:1148–1151. doi: 10.1126/science.1081315
404. Fitzgerald KA, McWhirter SM, Faia KL, Rowe DC, Latz E, Golenbock DT, Coyle AJ, Liao S-M, Maniatis T. IKKepsilon and TBK1 are essential components of the IRF3 signaling pathway. *Nat Immunol* (2003) 4:491–496. doi: 10.1038/ni921

405. Liu S, Cai X, Wu J, Cong Q, Chen X, Li T, Du F, Ren J, Wu Y-T, Grishin NV, et al. Phosphorylation of innate immune adaptor proteins MAVS, STING, and TRIF induces IRF3 activation. *Science* (2015) 347:aaa2630–aaa2630. doi: 10.1126/science.aaa2630
406. Yoneyama M, Suhara W, Fukuhara Y, Fukuda M, Nishida E, Fujita T. Direct triggering of the type I interferon system by virus infection: activation of a transcription factor complex containing IRF-3 and CBP/p300. *EMBO J* (1998) 17:1087–1095. doi: 10.1093/emboj/17.4.1087
407. Yeow WS, Au WC, Juang YT, Fields CD, Dent CL, Gewert DR, Pitha PM. Reconstitution of virus-mediated expression of interferon alpha genes in human fibroblast cells by ectopic interferon regulatory factor-7. *J Biol Chem* (2000) 275:6313–6320. doi: 10.1074/jbc.275.9.6313
408. Randall RE, Goodbourn S. Interferons and viruses: an interplay between induction, signalling, antiviral responses and virus countermeasures. *J Gen Virol* (2008) 89:1–47. doi: 10.1099/vir.0.83391-0
409. Cleary CM, Donnelly RJ, Soh J, Mariano TM, Pestka S. Knockout and reconstitution of a functional human type I interferon receptor complex. *J Biol Chem* (1994) 269:18747–18749.
410. Novick D, Cohen B, Rubinstein M. The human interferon alpha/beta receptor: characterization and molecular cloning. *Cell* (1994) 77:391–400. doi: 10.1016/0092-8674(94)90154-6
411. Schneider WM, Chevillotte MD, Rice CM. Interferon-stimulated genes: a complex web of host defenses. *Annu Rev Immunol* (2014) 32:513–545. doi: 10.1146/annurev-immunol-032713-120231
412. Schoggins JW. Interferon-stimulated genes: roles in viral pathogenesis. *Curr Opin Virol* (2014) 6:40–46. doi: 10.1016/j.coviro.2014.03.006
413. Weisblum Y, Oiknine-Djian E, Vorontsov OM, Haimov-Kochman R, Zakay-Rones Z, Meir K, Shveiky D, Elgavish S, Nevo Y, Roseman M, et al. Zika Virus Infects Early- and Midgestation Human Maternal Decidual Tissues, Inducing Distinct Innate Tissue Responses in the Maternal-Fetal Interface. *J Virol* (2017) 91: doi: 10.1128/JVI.01905-16
414. Yang E, Li MMH. All About the RNA: Interferon-Stimulated Genes That Interfere With Viral RNA Processes. *Frontiers in Immunology* (2020) 11: <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fimmu.2020.605024> [Accessed April 20, 2022]
415. Brass AL, Huang I-C, Benita Y, John SP, Krishnan MN, Feeley EM, Ryan B, Weyer JL, van der Weyden L, Fikrig E, et al. IFITM Proteins Mediate the Innate Immune Response to Influenza A H1N1 Virus, West Nile Virus and Dengue Virus. *Cell* (2009) 139:1243–1254. doi: 10.1016/j.cell.2009.12.017
416. Savidis G, Perreira JM, Portmann JM, Meraner P, Guo Z, Green S, Brass AL. The IFITMs Inhibit Zika Virus Replication. *Cell Reports* (2016) 15:2323–2330. doi: 10.1016/j.celrep.2016.05.074

417. Ganapathiraju MK, Karunakaran KB, Correa-Menéndez J. Predicted protein interactions of IFITMs may shed light on mechanisms of Zika virus-induced microcephaly and host invasion. *PLoS Res* (2017) 5: doi: 10.12688/f1000research.9364.2
418. Wu Y, Liu Q, Zhou J, Xie W, Chen C, Wang Z, Yang H, Cui J. Zika virus evades interferon-mediated antiviral response through the co-operation of multiple nonstructural proteins in vitro. *Cell Discov* (2017) 3:17006. doi: 10.1038/celldisc.2017.6
419. Seo J-Y, Yaneva R, Cresswell P. Viperin: a multifunctional, interferon-inducible protein that regulates virus replication. *Cell Host Microbe* (2011) 10:534–539. doi: 10.1016/j.chom.2011.11.004
420. Helbig KJ, Beard MR. The role of viperin in the innate antiviral response. *J Mol Biol* (2014) 426:1210–1219. doi: 10.1016/j.jmb.2013.10.019
421. Lindqvist R, Överby AK. The Role of Viperin in Antiflavivirus Responses. *DNA Cell Biol* (2018) 37:725–730. doi: 10.1089/dna.2018.4328
422. Panayiotou C, Lindqvist R, Kurhade C, Vonderstein K, Pasto J, Edlund K, Upadhyay AS, Överby AK. Viperin Restricts Zika Virus and Tick-Borne Encephalitis Virus Replication by Targeting NS3 for Proteasomal Degradation. *J Virol* (2018) 92: doi: 10.1128/JVI.02054-17
423. Van der Hoek KH, Eyre NS, Shue B, Khantisitthiporn O, Glab-Ampi K, Carr JM, Gartner MJ, Jolly LA, Thomas PQ, Adikusuma F, et al. Viperin is an important host restriction factor in control of Zika virus infection. *Sci Rep* (2017) 7:4475. doi: 10.1038/s41598-017-04138-1
424. Vota D, Torti M, Papparini D, Giovannoni F, Merech F, Hauk V, Calo G, Ramhorst R, Garcia C, Leirós CP. Zika virus infection of first trimester trophoblast cells affects cell migration, metabolism and immune homeostasis control. *Journal of Cellular Physiology* n/a: doi: <https://doi.org/10.1002/jcp.30203>
425. Kumar A, Hou S, Airo AM, Limonta D, Mancinelli V, Branton W, Power C, Hobman TC. Zika virus inhibits type-I interferon production and downstream signaling. *EMBO Rep* (2016) 17:1766–1775. doi: 10.15252/embr.201642627
426. Wu Y, Yang X, Yao Z, Dong X, Zhang D, Hu Y, Zhang S, Lin J, Chen J, An S, et al. C19orf66 interrupts Zika virus replication by inducing lysosomal degradation of viral NS3. *PLoS Negl Trop Dis* (2020) 14:e0008083. doi: 10.1371/journal.pntd.0008083
427. Richardson RB, Ohlson MB, Eitson JL, Kumar A, McDougal MB, Boys IN, Mar KB, De La Cruz-Rivera PC, Douglas C, Konopka G, et al. A CRISPR screen identifies IFI6 as an ER-resident interferon effector that blocks flavivirus replication. *Nat Microbiol* (2018) 3:1214–1223. doi: 10.1038/s41564-018-0244-1
428. Dukhovny A, Lamkiewicz K, Chen Q, Fricke M, Jabrane-Ferrat N, Marz M, Jung JU, Sklan EH. A CRISPR Activation Screen Identifies Genes That Protect against Zika Virus Infection. *J Virol* (2019) 93: doi: 10.1128/JVI.00211-19
429. Tahara E, Tahara H, Kanno M, Naka K, Takeda Y, Matsuzaki T, Yamazaki R, Ishihara H, Yasui W, Barrett JC, et al. G1P3, an interferon inducible gene 6-16, is expressed in

- gastric cancers and inhibits mitochondrial-mediated apoptosis in gastric cancer cell line TMK-1 cell. *Cancer Immunol Immunother* (2005) 54:729–740. doi: 10.1007/s00262-004-0645-2
430. Qi Y, Li Y, Zhang Y, Zhang L, Wang Z, Zhang X, Gui L, Huang J. IFI6 Inhibits Apoptosis via Mitochondrial-Dependent Pathway in Dengue Virus 2 Infected Vascular Endothelial Cells. *PLoS One* (2015) 10:e0132743. doi: 10.1371/journal.pone.0132743
431. Friedman RL, Manly SP, McMahon M, Kerr IM, Stark GR. Transcriptional and posttranscriptional regulation of interferon-induced gene expression in human cells. *Cell* (1984) 38:745–755. doi: 10.1016/0092-8674(84)90270-8
432. Cheriya V, Glaser KB, Waring JF, Baz R, Hussein MA, Borden EC. G1P3, an IFN-induced survival factor, antagonizes TRAIL-induced apoptosis in human myeloma cells. *J Clin Invest* (2007) 117:3107–3117. doi: 10.1172/JCI31122
433. Park G-H, Kim K-Y, Cho SW, Cheong JY, Yu GI, Shin DH, Kwack KB. Association between Interferon-Inducible Protein 6 (IFI6) Polymorphisms and Hepatitis B Virus Clearance. *Genomics Inform* (2013) 11:15–23. doi: 10.5808/GI.2013.11.1.15
434. Haller O, Staeheli P, Schwemmle M, Kochs G. Mx GTPases: dynamin-like antiviral machines of innate immunity. *Trends Microbiol* (2015) 23:154–163. doi: 10.1016/j.tim.2014.12.003
435. Singh PK, Singh S, Farr D, Kumar A. Interferon-stimulated gene 15 (ISG15) restricts Zika virus replication in primary human corneal epithelial cells. *Ocul Surf* (2019) 17:551–559. doi: 10.1016/j.jtos.2019.03.006
436. Wang Y, Ren K, Li S, Yang C, Chen L. Interferon stimulated gene 15 promotes Zika virus replication through regulating Jak/STAT and ISGylation pathways. *Virus Research* (2020) 287:198087. doi: 10.1016/j.virusres.2020.198087
437. Chua PK, McCown MF, Rajyaguru S, Kular S, Varma R, Symons J, Chiu SS, Cammack N, Nájera I. Modulation of alpha interferon anti-hepatitis C virus activity by ISG15. *J Gen Virol* (2009) 90:2929–2939. doi: 10.1099/vir.0.013128-0
438. Sooryanarain H, Rogers AJ, Cao D, Haac MER, Karpe YA, Meng X-J. ISG15 Modulates Type I Interferon Signaling and the Antiviral Response during Hepatitis E Virus Replication. *J Virol* (2017) 91: doi: 10.1128/JVI.00621-17
439. Chaudhary V, Yuen K-S, Chan JF-W, Chan C-P, Wang P-H, Cai J-P, Zhang S, Liang M, Kok K-H, Chan C-P, et al. Selective Activation of Type II Interferon Signaling by Zika Virus NS5 Protein. *J Virol* (2017) 91: doi: 10.1128/JVI.00163-17
440. Bayer A, Lennemann NJ, Ouyang Y, Bramley JC, Morosky S, Marques ETDA, Cherry S, Sadovsky Y, Coyne CB. Type III Interferons Produced by Human Placental Trophoblasts Confer Protection against Zika Virus Infection. *Cell Host Microbe* (2016) 19:705–712. doi: 10.1016/j.chom.2016.03.008
441. Corry J, Arora N, Good CA, Sadovsky Y, Coyne CB. Organotypic models of type III interferon-mediated protection from Zika virus infections at the maternal–fetal interface. *Proc Natl Acad Sci U S A* (2017) 114:9433–9438. doi: 10.1073/pnas.1707513114

442. Maucourant C, Queiroz GAN, Samri A, Grassi MFR, Yssel H, Vieillard V. Zika virus in the eye of the cytokine storm. *European Cytokine Network* (2019) 30:74–81. doi: 10.1684/ecn.2019.0433
443. Kam Y-W, Leite JA, Lum F-M, Tan JLL, Lee B, Judice CC, Teixeira DA de T, Andreato-Santos R, Vinolo MA, Angerami R, et al. Specific Biomarkers Associated With Neurological Complications and Congenital Central Nervous System Abnormalities From Zika Virus-Infected Patients in Brazil. *J Infect Dis* (2017) 216:172–181. doi: 10.1093/infdis/jix261
444. Camacho-Zavala E, Santacruz-Tinoco C, Muñoz E, Chacón-Salinas R, Salazar-Sanchez MI, Grajales C, González-Ibarra J, Borja-Aburto VH, Jaenisch T, Gonzalez-Bonilla CR. Pregnant Women Infected with Zika Virus Show Higher Viral Load and Immunoregulatory Cytokines Profile with CXCL10 Increase. *Viruses* (2021) 13: doi: 10.3390/v13010080
445. Elong Ngonu A, Vizcarra EA, Tang WW, Sheets N, Joo Y, Kim K, Gorman MJ, Diamond MS, Shresta S. Mapping and Role of the CD8+ T Cell Response During Primary Zika Virus Infection in Mice. *Cell Host Microbe* (2017) 21:35–46. doi: 10.1016/j.chom.2016.12.010
446. Pardy RD, Rajah MM, Condotta SA, Taylor NG, Sagan SM, Richer MJ. Analysis of the T Cell Response to Zika Virus and Identification of a Novel CD8+ T Cell Epitope in Immunocompetent Mice. *PLoS Pathog* (2017) 13:e1006184. doi: 10.1371/journal.ppat.1006184
447. Winkler CW, Myers LM, Woods TA, Messer RJ, Carmody AB, McNally KL, Scott DP, Hasenkrug KJ, Best SM, Peterson KE. Adaptive Immune Responses to Zika Virus Are Important for Controlling Virus Infection and Preventing Infection in Brain and Testes. *J Immunol* (2017) 198:3526–3535. doi: 10.4049/jimmunol.1601949
448. Hassert M, Wolf KJ, Schwetye KE, DiPaolo RJ, Brien JD, Pinto AK. CD4+T cells mediate protection against Zika associated severe disease in a mouse model of infection. *PLoS Pathog* (2018) 14:e1007237. doi: 10.1371/journal.ppat.1007237
449. Lucas CGO, Kitoko JZ, Ferreira FM, Suzart VG, Papa MP, Coelho SVA, Cavazzoni CB, Paula-Neto HA, Olsen PC, Iwasaki A, et al. Critical role of CD4+ T cells and IFN $\gamma$  signaling in antibody-mediated resistance to Zika virus infection. *Nat Commun* (2018) 9:3136. doi: 10.1038/s41467-018-05519-4
450. Tonnerre P, Melgaço JG, Torres-Cornejo A, Pinto MA, Yue C, Blümel J, de Sousa PSF, de Mello V da M, Moran J, de Filippis AMB, et al. Evolution of the innate and adaptive immune response in women with acute Zika virus infection. *Nat Microbiol* (2020) 5:76–83. doi: 10.1038/s41564-019-0618-z
451. Osuna CE, Lim S-Y, Deleage C, Griffin BD, Stein D, Schroeder LT, Orange RW, Best K, Luo M, Hraber PT, et al. Zika viral dynamics and shedding in rhesus and cynomolgus macaques. *Nat Med* (2016) 22:1448–1455. doi: 10.1038/nm.4206
452. Grifoni A, Pham J, Sidney J, O'Rourke PH, Paul S, Peters B, Martini SR, de Silva AD, Ricciardi MJ, Magnani DM, et al. Prior Dengue Virus Exposure Shapes T Cell Immunity to Zika Virus in Humans. *J Virol* (2017) 91: doi: 10.1128/JVI.01469-17



453. Lai L, Roupheal N, Xu Y, Natrajan MS, Beck A, Hart M, Feldhammer M, Feldpausch A, Hill C, Wu H, et al. Innate, T-, and B-Cell Responses in Acute Human Zika Patients. *Clin Infect Dis* (2018) 66:1–10. doi: 10.1093/cid/cix732
454. Wen J, Tang WW, Sheets N, Ellison J, Sette A, Kim K, Shresta S. Identification of Zika virus epitopes reveals immunodominant and protective roles for dengue virus cross-reactive CD8<sup>+</sup> T cells. *Nat Microbiol* (2017) 2:17036. doi: 10.1038/nmicrobiol.2017.36
455. Priyamvada L, Quicke KM, Hudson WH, Onlamoon N, Sewatanon J, Edupuganti S, Pattanapanyasat K, Chokephaibulkit K, Mulligan MJ, Wilson PC, et al. Human antibody responses after dengue virus infection are highly cross-reactive to Zika virus. *Proc Natl Acad Sci U S A* (2016) 113:7852–7857. doi: 10.1073/pnas.1607931113
456. Stettler K, Beltramello M, Espinosa DA, Graham V, Cassotta A, Bianchi S, Vanzetta F, Minola A, Jaconi S, Mele F, et al. Specificity, cross-reactivity, and function of antibodies elicited by Zika virus infection. *Science* (2016) 353:823–826. doi: 10.1126/science.aaf8505
457. Delgado FG, Torres KI, Castellanos JE, Romero-Sánchez C, Simon-Lorière E, Sakuntabhai A, Roth C. Improved Immune Responses Against Zika Virus After Sequential Dengue and Zika Virus Infection in Humans. *Viruses* (2018) 10: doi: 10.3390/v10090480
458. Sironi M, Forni D, Clerici M, Cagliani R. Nonstructural Proteins Are Preferential Positive Selection Targets in Zika Virus and Related Flaviviruses. *PLoS Negl Trop Dis* (2016) 10: doi: 10.1371/journal.pntd.0004978
459. Rogers TF, Goodwin EC, Briney B, Sok D, Beutler N, Strubel A, Nedellec R, Le K, Brown ME, Burton DR, et al. Zika virus activates de novo and cross-reactive memory B cell responses in dengue-experienced donors. *Sci Immunol* (2017) 2: doi: 10.1126/sciimmunol.aan6809
460. Andrade DV, Harris E. Recent advances in understanding the adaptive immune response to Zika virus and the effect of previous flavivirus exposure. *Virus Res* (2018) 254:27–33. doi: 10.1016/j.virusres.2017.06.019
461. Priyamvada L, Suthar MS, Ahmed R, Wrammert J. Humoral Immune Responses Against Zika Virus Infection and the Importance of Preexisting Flavivirus Immunity. *J Infect Dis* (2017) 216:S906–S911. doi: 10.1093/infdis/jix513
462. Robbiani DF, Bozzacco L, Keefe JR, Khouri R, Olsen PC, Gazumyan A, Schaefer-Babajew D, Avila-Rios S, Nogueira L, Patel R, et al. Recurrent Potent Human Neutralizing Antibodies to Zika Virus in Brazil and Mexico. *Cell* (2017) 169:597–609.e11. doi: 10.1016/j.cell.2017.04.024
463. Pierson TC, Graham BS. Zika Virus: Immunity and Vaccine Development. *Cell* (2016) 167:625–631. doi: 10.1016/j.cell.2016.09.020
464. Bowen JR, Quicke KM, Maddur MS, O’Neal JT, McDonald CE, Fedorova NB, Puri V, Shabman RS, Pulendran B, Suthar MS. Zika Virus Antagonizes Type I Interferon Responses during Infection of Human Dendritic Cells. *PLoS Pathog* (2017) 13:e1006164. doi: 10.1371/journal.ppat.1006164

465. Michlmayr D, Andrade P, Gonzalez K, Balmaseda A, Harris E. CD14+CD16+ monocytes are the main target of Zika virus infection in peripheral blood mononuclear cells in a paediatric study in Nicaragua. *Nat Microbiol* (2017) 2:1462–1470. doi: 10.1038/s41564-017-0035-0
466. Foo S-S, Chen W, Chan Y, Bowman JW, Chang L-C, Choi Y, Yoo JS, Ge J, Cheng G, Bonnin A, et al. Asian Zika virus strains target CD14+ blood monocytes and induce M2-skewed immunosuppression during pregnancy. *Nat Microbiol* (2017) 2:1558–1570. doi: 10.1038/s41564-017-0016-3
467. Sun X, Hua S, Chen H-R, Ouyang Z, Einkauf K, Tse S, Ard K, Ciaranello A, Yawetz S, Sax P, et al. Transcriptional changes during naturally-acquired Zika Virus infection render dendritic cells highly conducive to viral replication. *Cell Rep* (2017) 21:3471–3482. doi: 10.1016/j.celrep.2017.11.087
468. Shi C, Pamer EG. Monocyte recruitment during infection and inflammation. *Nat Rev Immunol* (2011) 11:762–774. doi: 10.1038/nri3070
469. Costa VV, Ye W, Chen Q, Teixeira MM, Preiser P, Ooi EE, Chen J. Dengue Virus-Infected Dendritic Cells, but Not Monocytes, Activate Natural Killer Cells through a Contact-Dependent Mechanism Involving Adhesion Molecules. *mBio* (2017) 8: doi: 10.1128/mBio.00741-17
470. Muñoz-Jordan JL, Sánchez-Burgos GG, Laurent-Rolle M, García-Sastre A. Inhibition of interferon signaling by dengue virus. *Proc Natl Acad Sci USA* (2003) 100:14333–14338. doi: 10.1073/pnas.2335168100
471. Grant A, Ponia SS, Tripathi S, Balasubramaniam V, Miorin L, Sourisseau M, Schwarz MC, Sánchez-Seco MP, Evans MJ, Best SM, et al. Zika Virus Targets Human STAT2 to Inhibit Type I Interferon Signaling. *Cell Host Microbe* (2016) 19:882–890. doi: 10.1016/j.chom.2016.05.009
472. Guo J-T, Hayashi J, Seeger C. West Nile virus inhibits the signal transduction pathway of alpha interferon. *J Virol* (2005) 79:1343–1350. doi: 10.1128/JVI.79.3.1343-1350.2005
473. Jones M, Davidson A, Hibbert L, Gruenwald P, Schlaak J, Ball S, Foster GR, Jacobs M. Dengue virus inhibits alpha interferon signaling by reducing STAT2 expression. *J Virol* (2005) 79:5414–5420. doi: 10.1128/JVI.79.9.5414-5420.2005
474. Morrison J, Aguirre S, Fernandez-Sesma A. Innate immunity evasion by Dengue virus. *Viruses* (2012) 4:397–413. doi: 10.3390/v4030397
475. Muñoz-Jordán JL, Laurent-Rolle M, Ashour J, Martínez-Sobrido L, Ashok M, Lipkin WI, García-Sastre A. Inhibition of alpha/beta interferon signaling by the NS4B protein of flaviviruses. *J Virol* (2005) 79:8004–8013. doi: 10.1128/JVI.79.13.8004-8013.2005
476. Ngueyen TTN, Kim S-J, Lee JY, Myoung J. Zika Virus Proteins NS2A and NS4A Are Major Antagonists that Reduce IFN- $\beta$  Promoter Activity Induced by the MDA5/RIG-I Signaling Pathway. *J Microbiol Biotechnol* (2019) 29:1665–1674. doi: 10.4014/jmb.1909.09017

477. Xia H, Luo H, Shan C, Muruato AE, Nunes BT, Medeiros DBA, Zou J, Xie X, Giraldo MI, Vasconcelos PFC, et al. An evolutionary NS1 mutation enhances Zika virus evasion of host interferon induction. *Nat Commun* (2018) 9: doi: 10.1038/s41467-017-02816-2
478. He Z, Zhu X, Wen W, Yuan J, Hu Y, Chen J, An S, Dong X, Lin C, Yu J, et al. Dengue Virus Subverts Host Innate Immunity by Targeting Adaptor Protein MAVS. *J Virol* (2016) 90:7219–7230. doi: 10.1128/JVI.00221-16
479. Dalrymple NA, Cimica V, Mackow ER. Dengue Virus NS Proteins Inhibit RIG-I/MAVS Signaling by Blocking TBK1/IRF3 Phosphorylation: Dengue Virus Serotype 1 NS4A Is a Unique Interferon-Regulating Virulence Determinant. *mBio* (2015) 6:e00553-00515. doi: 10.1128/mBio.00553-15
480. Wang B, Thurmond S, Zhou K, Sánchez-Aparicio MT, Fang J, Lu J, Gao L, Ren W, Cui Y, Veit EC, et al. Structural basis for STAT2 suppression by flavivirus NS5. *Nat Struct Mol Biol* (2020) 27:875–885. doi: 10.1038/s41594-020-0472-y
481. Ashour J, Laurent-Rolle M, Shi P-Y, García-Sastre A. NS5 of dengue virus mediates STAT2 binding and degradation. *J Virol* (2009) 83:5408–5418. doi: 10.1128/JVI.02188-08
482. Glasner A, Oiknine-Djian E, Weisblum Y, Diab M, Panet A, Wolf DG, Mandelboim O. Zika Virus Escapes NK Cell Detection by Upregulating Major Histocompatibility Complex Class I Molecules. *J Virol* (2017) 91: doi: 10.1128/JVI.00785-17
483. Lima NS, Rolland M, Modjarrad K, Trautmann L. T Cell Immunity and Zika Virus Vaccine Development. *Trends in Immunology* (2017) 38:594–605. doi: 10.1016/j.it.2017.05.004
484. Oehler E, Watrin L, Larre P, Leparac-Goffart I, Lastère S, Valour F, Baudouin L, Mallet HP, Musso D, Ghawche F. Zika virus infection complicated by Guillain-Barré syndrome – case report, French Polynesia, December 2013. *Eurosurveillance* (2014) 19:20720. doi: 10.2807/1560-7917.ES2014.19.9.20720
485. Lucchese G, Kanduc D. Zika virus and autoimmunity: From microcephaly to Guillain-Barré syndrome, and beyond. *Autoimmunity Reviews* (2016) 15:801–808. doi: 10.1016/j.autrev.2016.03.020
486. Girdhar K, Powis A, Raisingani A, Chrudinová M, Huang R, Tran T, Sevgi K, Dogus Dogru Y, Altindis E. Viruses and Metabolism: The Effects of Viral Infections and Viral Insulins on Host Metabolism. *Annu Rev Virol* (2021) 8:373–391. doi: 10.1146/annurev-virology-091919-102416
487. Polcicova K, Badurova L, Tomaskova J. Metabolic reprogramming as a feast for virus replication. *Acta Virol* (2020) 64:201–215. doi: 10.4149/av\_2020\_210
488. Fontaine KA, Sanchez EL, Camarda R, Lagunoff M. Dengue Virus Induces and Requires Glycolysis for Optimal Replication. *J Virol* (2014) 89:2358–2366. doi: 10.1128/JVI.02309-14
489. Allonso D, Andrade IS, Conde JN, Coelho DR, Rocha DCP, da Silva ML, Ventura GT, Silva EM, Mohana-Borges R. Dengue Virus NS1 Protein Modulates Cellular Energy

- Metabolism by Increasing Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase Activity. *J Virol* (2015) 89:11871–11883. doi: 10.1128/JVI.01342-15
490. Liang Q, Luo Z, Zeng J, Chen W, Foo S-S, Lee S-A, Ge J, Wang S, Goldman SA, Zlokovic BV, et al. Zika Virus NS4A and NS4B Proteins Deregulate Akt-mTOR Signaling in Human Fetal Neural Stem Cells to Inhibit Neurogenesis and Induce Autophagy. *Cell Stem Cell* (2016) 19:663–671. doi: 10.1016/j.stem.2016.07.019
491. Gomes JA, Sgarioni E, Vieira IA, Fraga LR, Ashton-Prolla P, Terças-Tretell ACP, da Silva JH, Ribeiro BFR, Galera MF, de Oliveira TM, et al. Functional Polymorphisms in the p53 Pathway Genes on the Genetic Susceptibility to Zika Virus Teratogenesis. *Front Cell Infect Microbiol* (2021) 11:641413. doi: 10.3389/fcimb.2021.641413
492. Li P, Jiang H, Peng H, Zeng W, Zhong Y, He M, Xie L, Chen J, Guo D, Wu J, et al. Non-Structural Protein 5 of Zika Virus Interacts with p53 in Human Neural Progenitor Cells and Induces p53-Mediated Apoptosis. *Virol Sin* (2021) 36:1411–1420. doi: 10.1007/s12250-021-00422-7
493. Lin S-C, Chen M-C, Liu S, Callahan VM, Bracci NR, Lehman CW, Dahal B, de la Fuente CL, Lin C-C, Wang TT, et al. Phloretin inhibits Zika virus infection by interfering with cellular glucose utilisation. *International Journal of Antimicrobial Agents* (2019) 54:80–84. doi: 10.1016/j.ijantimicag.2019.03.017
494. Chen Q, Gouilly J, Ferrat YJ, Espino A, Glaziou Q, Cartron G, El Costa H, Al-Daccak R, Jabrane-Ferrat N. Metabolic reprogramming by Zika virus provokes inflammation in human placenta. *Nat Commun* (2020) 11: doi: 10.1038/s41467-020-16754-z
495. Sun JC, Beilke JN, Lanier LL. Adaptive Immune Features of Natural Killer Cells. *Nature* (2009) 457:557–561. doi: 10.1038/nature07665
496. Dranoff G. Cytokines in cancer pathogenesis and cancer therapy. *Nature Reviews Cancer* (2004) 4:11–22. doi: 10.1038/nrc1252
497. Brubaker SW, Bonham KS, Zanoni I, Kagan JC. Innate Immune Pattern Recognition: A Cell Biological Perspective. *Annu Rev Immunol* (2015) 33:257–290. doi: 10.1146/annurev-immunol-032414-112240
498. Spits H, Artis D, Colonna M, Diefenbach A, Di Santo JP, Eberl G, Koyasu S, Locksley RM, McKenzie ANJ, Mebius RE, et al. Innate lymphoid cells — a proposal for uniform nomenclature. *Nature Reviews Immunology* (2013) 13:145–149. doi: 10.1038/nri3365
499. Adamiak M, Tokarz-Deptuła B, Deptuła W. [Characteristic of innate lymphoid cells (ILC)]. *Postepy Hig Med Dosw (Online)* (2014) 68:1464–1471. doi: 10.5604/17322693.1131700
500. Bonilla FA, Oettgen HC. Adaptive immunity. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* (2010) 125:S33–S40. doi: 10.1016/j.jaci.2009.09.017
501. Vivier E, Tomasello E, Baratin M, Walzer T, Ugolini S. Functions of natural killer cells. *Nature Immunology* (2008) 9:503–510. doi: 10.1038/ni1582

502. Carrega P, Ferlazzo G. Natural killer cell distribution and trafficking in human tissues. *Front Immunol* (2012) 3:347. doi: 10.3389/fimmu.2012.00347
503. Ritz J, Schmidt RE, Michon J, Hercend T, Schlossman SF. Characterization of functional surface structures on human natural killer cells. *Adv Immunol* (1988) 42:181–211. doi: 10.1016/s0065-2776(08)60845-7
504. Identity of Leu-19 (CD56) leukocyte differentiation antigen and neural cell adhesion molecule. *J Exp Med* (1989) 169:2233–2238.
505. Hanna J, Mandelboim O. When killers become helpers. *Trends in Immunology* (2007) 28:201–206. doi: 10.1016/j.it.2007.03.005
506. Campbell JJ, Qin S, Unutmaz D, Soler D, Murphy KE, Hodge MR, Wu L, Butcher EC. Unique Subpopulations of CD56+ NK and NK-T Peripheral Blood Lymphocytes Identified by Chemokine Receptor Expression Repertoire. *The Journal of Immunology* (2001) 166:6477–6482. doi: 10.4049/jimmunol.166.11.6477
507. Vitale M, Chiesa MD, Carlomagno S, Romagnani C, Thiel A, Moretta L, Moretta A. The small subset of CD56brightCD16– natural killer cells is selectively responsible for both cell proliferation and interferon- $\gamma$  production upon interaction with dendritic cells. *European Journal of Immunology* (2004) 34:1715–1722. doi: <https://doi.org/10.1002/eji.200425100>
508. Anfossi N, André P, Guia S, Falk CS, Roetynck S, Stewart CA, Bresó V, Frassati C, Reviron D, Middleton D, et al. Human NK Cell Education by Inhibitory Receptors for MHC Class I. *Immunity* (2006) 25:331–342. doi: 10.1016/j.immuni.2006.06.013
509. Cooper MA, Fehniger TA, Caligiuri MA. The biology of human natural killer-cell subsets. *Trends Immunol* (2001) 22:633–640. doi: 10.1016/s1471-4906(01)02060-9
510. Moretta A. Natural killer cells and dendritic cells: rendezvous in abused tissues. *Nature Reviews Immunology* (2002) 2:957–965. doi: 10.1038/nri956
511. Björkström NK, Riese P, Heuts F, Andersson S, Fauriat C, Ivarsson MA, Björklund AT, Flodström-Tullberg M, Michaëlsson J, Rottenberg ME, et al. Expression patterns of NKG2A, KIR, and CD57 define a process of CD56dim NK-cell differentiation uncoupled from NK-cell education. *Blood* (2010) 116:3853–3864. doi: 10.1182/blood-2010-04-281675
512. Lopez-Vergès S, Milush JM, Schwartz BS, Pando MJ, Jarjoura J, York VA, Houchins JP, Miller S, Kang S-M, Norris PJ, et al. Expansion of a unique CD57+NKG2Chi natural killer cell subset during acute human cytomegalovirus infection. *Proc Natl Acad Sci U S A* (2011) 108:14725–14732. doi: 10.1073/pnas.1110900108
513. Björkström NK, Ljunggren H-G, Michaëlsson J. Emerging insights into natural killer cells in human peripheral tissues. *Nature Reviews Immunology* (2016) 16:310–320. doi: 10.1038/nri.2016.34
514. Hudspeth K, Donadon M, Cimino M, Pontarini E, Tentorio P, Preti M, Hong M, Bertoletti A, Biccato S, Invernizzi P, et al. Human liver-resident CD56bright/CD16neg NK cells

- are retained within hepatic sinusoids via the engagement of CCR5 and CXCR6 pathways. *J Autoimmun* (2016) 66:40–50. doi: 10.1016/j.jaut.2015.08.011
515. Lugthart G, Melsen JE, Vervat C, Dam MM van O, Corver WE, Roelen DL, Bergen J van, Tol MJD van, Lankester AC, Schilham MW. Human Lymphoid Tissues Harbor a Distinct CD69+CXCR6+ NK Cell Population. *The Journal of Immunology* (2016) 197:78–84. doi: 10.4049/jimmunol.1502603
516. Marquardt N, Kekäläinen E, Chen P, Kvedaraite E, Wilson JN, Ivarsson MA, Mjösberg J, Berglin L, Säfholm J, Manson ML, et al. Human lung natural killer cells are predominantly comprised of highly differentiated hypofunctional CD69–CD56dim cells. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* (2017) 139:1321–1330.e4. doi: 10.1016/j.jaci.2016.07.043
517. Stegmann KA, Robertson F, Hansi N, Gill U, Pallant C, Christophides T, Pallett LJ, Peppas D, Dunn C, Fusai G, et al. CXCR6 marks a novel subset of T-bet<sup>lo</sup>Eomes<sup>hi</sup> natural killer cells residing in human liver. *Sci Rep* (2016) 6:26157. doi: 10.1038/srep26157
518. Kumar BV, Ma W, Miron M, Granot T, Guyer RS, Carpenter DJ, Senda T, Sun X, Ho S-H, Lerner H, et al. Human tissue-resident memory T cells are defined by core transcriptional and functional signatures in lymphoid and mucosal sites. *Cell Rep* (2017) 20:2921–2934. doi: 10.1016/j.celrep.2017.08.078
519. Montaldo E, Vacca P, Chiossone L, Croxatto D, Loiacono F, Martini S, Ferrero S, Walzer T, Moretta L, Mingari MC. Unique Eomes<sup>+</sup> NK Cell Subsets Are Present in Uterus and Decidua During Early Pregnancy. *Front Immunol* (2016) 6:646. doi: 10.3389/fimmu.2015.00646
520. Marquardt N, Béziat V, Nyström S, Hengst J, Ivarsson MA, Kekäläinen E, Johansson H, Mjösberg J, Westgren M, Lankisch TO, et al. Cutting Edge: Identification and Characterization of Human Intrahepatic CD49a<sup>+</sup> NK Cells. *The Journal of Immunology* (2015) 194:2467–2471. doi: 10.4049/jimmunol.1402756
521. Freud AG, Caligiuri MA. Human natural killer cell development. *Immunological Reviews* (2006) 214:56–72. doi: 10.1111/j.1600-065X.2006.00451.x
522. Seaman WE, Blackman MA, Gindhart TD, Roubinian JR, Loeb JM, Talal N.  $\beta$ -Estradiol Reduces Natural Killer Cells in Mice. *The Journal of Immunology* (1978) 121:2193–2198.
523. Miller JS, Alley KA, McGlave P. Differentiation of natural killer (NK) cells from human primitive marrow progenitors in a stroma-based long-term culture system: identification of a CD34<sup>+</sup>7<sup>+</sup> NK progenitor. *Blood* (1994) 83:2594–2601.
524. Huntington ND, Vosshenrich CAJ, Di Santo JP. Developmental pathways that generate natural-killer-cell diversity in mice and humans. *Nat Rev Immunol* (2007) 7:703–714. doi: 10.1038/nri2154
525. Galy A, Travis M, Cen D, Chen B. Human T, B, natural killer, and dendritic cells arise from a common bone marrow progenitor cell subset. *Immunity* (1995) 3:459–473. doi: 10.1016/1074-7613(95)90175-2

526. Yu H, Fehniger TA, Fuchshuber P, Thiel KS, Vivier E, Carson WE, Caligiuri MA. Flt3 Ligand Promotes the Generation of a Distinct CD34+Human Natural Killer Cell Progenitor That Responds to Interleukin-15. *Blood* (1998) 92:3647–3657. doi: 10.1182/blood.V92.10.3647
527. Zamai L, Ahmad M, Bennett IM, Azzoni L, Alnemri ES, Perussia B. Natural killer (NK) cell-mediated cytotoxicity: differential use of TRAIL and Fas ligand by immature and mature primary human NK cells. *J Exp Med* (1998) 188:2375–2380. doi: 10.1084/jem.188.12.2375
528. Shilling HG, McQueen KL, Cheng NW, Shizuru JA, Negrin RS, Parham P. Reconstitution of NK cell receptor repertoire following HLA-matched hematopoietic cell transplantation. *Blood* (2003) 101:3730–3740. doi: 10.1182/blood-2002-08-2568
529. Chan A, Hong D-L, Atzberger A, Kollnberger S, Filer AD, Buckley CD, McMichael A, Enver T, Bowness P. CD56bright human NK cells differentiate into CD56dim cells: role of contact with peripheral fibroblasts. *J Immunol* (2007) 179:89–94. doi: 10.4049/jimmunol.179.1.89
530. Romagnani C, Juelke K, Falco M, Morandi B, D’Agostino A, Costa R, Ratto G, Forte G, Carrega P, Lui G, et al. CD56brightCD16– Killer Ig-Like Receptor– NK Cells Display Longer Telomeres and Acquire Features of CD56dim NK Cells upon Activation. *The Journal of Immunology* (2007) 178:4947–4955. doi: 10.4049/jimmunol.178.8.4947
531. Ljunggren HG, Kärre K. In search of the “missing self”: MHC molecules and NK cell recognition. *Immunol Today* (1990) 11:237–244. doi: 10.1016/0167-5699(90)90097-s
532. Markel G, Mussaffi H, Ling K-L, Salio M, Gadola S, Steuer G, Blau H, Achdout H, de Miguel M, Gonen-Gross T, et al. The mechanisms controlling NK cell autoreactivity in TAP2-deficient patients. *Blood* (2004) 103:1770–1778. doi: 10.1182/blood-2003-06-2114
533. Valiante NM, Uhrberg M, Shilling HG, Lienert-Weidenbach K, Arnett KL, D’Andrea A, Phillips JH, Lanier LL, Parham P. Functionally and structurally distinct NK cell receptor repertoires in the peripheral blood of two human donors. *Immunity* (1997) 7:739–751. doi: 10.1016/S1074-7613(00)80393-3
534. Fernandez NC, Treiner E, Vance RE, Jamieson AM, Lemieux S, Raulet DH. A subset of natural killer cells achieves self-tolerance without expressing inhibitory receptors specific for self-MHC molecules. *Blood* (2005) 105:4416–4423. doi: 10.1182/blood-2004-08-3156
535. Liao NS, Bix M, Zijlstra M, Jaenisch R, Raulet D. MHC class I deficiency: susceptibility to natural killer (NK) cells and impaired NK activity. *Science* (1991) 253:199–202. doi: 10.1126/science.1853205
536. Jonsson AH, Yokoyama WM. Natural killer cell tolerance licensing and other mechanisms. *Adv Immunol* (2009) 101:27–79. doi: 10.1016/S0065-2776(08)01002-X
537. Kim S, Poursine-Laurent J, Truscott SM, Lybarger L, Song Y-J, Yang L, French AR, Sunwoo JB, Lemieux S, Hansen TH, et al. Licensing of natural killer cells by host major histocompatibility complex class I molecules. *Nature* (2005) 436:709–713. doi: 10.1038/nature03847

538. Yokoyama WM, Kim S. Licensing of natural killer cells by self-major histocompatibility complex class I. *Immunol Rev* (2006) 214:143–154. doi: 10.1111/j.1600-065X.2006.00458.x
539. Raulet DH, Vance RE. Self-tolerance of natural killer cells. *Nat Rev Immunol* (2006) 6:520–531. doi: 10.1038/nri1863
540. Gasser S, Raulet DH. Activation and self-tolerance of natural killer cells. *Immunol Rev* (2006) 214:130–142. doi: 10.1111/j.1600-065X.2006.00460.x
541. Wiemann K, Mittrücker H-W, Feger U, Welte SA, Yokoyama WM, Spies T, Rammensee H-G, Steinle A. Systemic NKG2D Down-Regulation Impairs NK and CD8 T Cell Responses In Vivo. *The Journal of Immunology* (2005) 175:720–729. doi: 10.4049/jimmunol.175.2.720
542. Oppenheim DE, Roberts SJ, Clarke SL, Filler R, Lewis JM, Tigelaar RE, Girardi M, Hayday AC. Sustained localized expression of ligand for the activating NKG2D receptor impairs natural cytotoxicity in vivo and reduces tumor immunosurveillance. *Nat Immunol* (2005) 6:928–937. doi: 10.1038/ni1239
543. Joncker NT, Fernandez NC, Treiner E, Vivier E, Raulet DH. NK Cell Responsiveness is Tuned Commensurate with the Number of Inhibitory Receptors for Self MHC Class I: the Rheostat Model. *J Immunol* (2009) 182:4572–4580. doi: 10.4049/jimmunol.0803900
544. Brodin P, Lakshmikanth T, Johansson S, Kärre K, Höglund P. The strength of inhibitory input during education quantitatively tunes the functional responsiveness of individual natural killer cells. *Blood* (2009) 113:2434–2441. doi: 10.1182/blood-2008-05-156836
545. Höglund P, Brodin P. Current perspectives of natural killer cell education by MHC class I molecules. *Nature Reviews Immunology* (2010) 10:724–734. doi: 10.1038/nri2835
546. Luevano M, Madrigal A, Saudemont A. Transcription factors involved in the regulation of natural killer cell development and function: an update. *Front Immunol* (2012) 3:319. doi: 10.3389/fimmu.2012.00319
547. Mrózek E, Anderson P, Caligiuri MA. Role of Interleukin-15 in the Development of Human CD56+ Natural Killer Cells From CD34+ Hematopoietic Progenitor Cells. *Blood* (1996) 87:2632–2640.
548. Boos MD, Yokota Y, Eberl G, Kee BL. Mature natural killer cell and lymphoid tissue-inducing cell development requires Id2-mediated suppression of E protein activity. *J Exp Med* (2007) 204:1119–1130. doi: 10.1084/jem.20061959
549. Heemskerk MHM, Blom B, Nolan G, Stegmann APA, Bakker AQ, Weijer K, Res PCM, Spits H. Inhibition of T Cell and Promotion of Natural Killer Cell Development by the Dominant Negative Helix Loop Helix Factor Id3. *J Exp Med* (1997) 186:1597–1602.
550. Deng Y, Kerdiles Y, Chu J, Yuan S, Wang Y, Chen X, Mao H, Zhang L, Zhang J, Hughes T, et al. Transcription Factor Foxo1 Is a Negative Regulator of NK Cell Maturation and Function. *Immunity* (2015) 42:457–470. doi: 10.1016/j.immuni.2015.02.006



551. Ramirez K, Chandler KJ, Spaulding C, Zandi S, Sigvardsson M, Graves BJ, Kee BL. Gene deregulation and chronic activation in natural killer cells deficient in the transcription factor ETS1. *Immunity* (2012) 36:921–932. doi: 10.1016/j.immuni.2012.04.006
552. Narni-Mancinelli E, Jaeger BN, Bernat C, Fenis A, Kung S, De Gassart A, Mahmood S, Gut M, Heath SC, Estellé J, et al. Tuning of Natural Killer Cell Reactivity by NKp46 and Helios Calibrates T Cell Responses. *Science* (2012) 335:344–348. doi: 10.1126/science.1215621
553. Shik Park C, Lee P-H, Yamada T, Burns A, Shen Y, Puppi M, Lacorazza HD. Krüppel-like factor 4 (KLF4) promotes the survival of natural killer cells and maintains the number of conventional dendritic cells in the spleen. *J Leukoc Biol* (2012) 91:739–750. doi: 10.1189/jlb.0811413
554. Samson SI, Richard O, Tavian M, Ranson T, Vosshenrich CAJ, Colucci F, Buer J, Grosveld F, Godin I, Di Santo JP. GATA-3 Promotes Maturation, IFN- $\gamma$  Production, and Liver-Specific Homing of NK Cells. *Immunity* (2003) 19:701–711. doi: 10.1016/S1074-7613(03)00294-2
555. Orange JS. Natural killer cell deficiency. *J Allergy Clin Immunol* (2013) 132:515–526. doi: 10.1016/j.jaci.2013.07.020
556. Hammer Q, Rückert T, Romagnani C. Natural killer cell specificity for viral infections. *Nat Immunol* (2018) 19:800–808. doi: 10.1038/s41590-018-0163-6
557. Williams NS, Moore TA, Schatzle JD, Puzanov IJ, Sivakumar PV, Zlotnik A, Bennett M, Kumar V. Generation of Lytic Natural Killer 1.1+, Ly-49<sup>-</sup> Cells from Multipotential Murine Bone Marrow Progenitors in a Stroma-free Culture: Definition of Cytokine Requirements and Developmental Intermediates. *J Exp Med* (1997) 186:1609–1614.
558. Michaud A, Dardari R, Charrier E, Cordeiro P, Herblot S, Duval M. IL-7 enhances survival of human CD56bright NK cells. *J Immunother* (2010) 33:382–390. doi: 10.1097/CJI.0b013e3181cd872d
559. Colucci F, Di Santo JP. The receptor tyrosine kinase c-kit provides a critical signal for survival, expansion, and maturation of mouse natural killer cells. *Blood* (2000) 95:984–991.
560. McKenna HJ, Stocking KL, Miller RE, Brasel K, De Smedt T, Maraskovsky E, Maliszewski CR, Lynch DH, Smith J, Pulendran B, et al. Mice lacking flt3 ligand have deficient hematopoiesis affecting hematopoietic progenitor cells, dendritic cells, and natural killer cells. *Blood* (2000) 95:3489–3497.
561. Fehniger TA, Suzuki K, Ponnappan A, VanDeusen JB, Cooper MA, Florea SM, Freud AG, Robinson ML, Durbin J, Caligiuri MA. Fatal leukemia in interleukin 15 transgenic mice follows early expansions in natural killer and memory phenotype CD8<sup>+</sup> T cells. *J Exp Med* (2001) 193:219–231. doi: 10.1084/jem.193.2.219
562. Sandau MM, Schluns KS, Lefrancois L, Jameson SC. Cutting edge: transpresentation of IL-15 by bone marrow-derived cells necessitates expression of IL-15 and IL-15R alpha by the same cells. *J Immunol* (2004) 173:6537–6541. doi: 10.4049/jimmunol.173.11.6537

563. Burkett PR, Koka R, Chien M, Chai S, Boone DL, Ma A. Coordinate expression and trans presentation of interleukin (IL)-15 $\alpha$  and IL-15 supports natural killer cell and memory CD8<sup>+</sup> T cell homeostasis. *J Exp Med* (2004) 200:825–834. doi: 10.1084/jem.20041389
564. Becknell B, Caligiuri MA. “Interleukin-2, Interleukin-15, and Their Roles in Human Natural Killer Cells.” In: Alt FW, editor. *Advances in Immunology*. Academic Press (2005). p. 209–239 doi: 10.1016/S0065-2776(04)86006-1
565. Rautela J, Huntington ND. IL-15 signaling in NK cell cancer immunotherapy. *Current Opinion in Immunology* (2017) 44:1–6. doi: 10.1016/j.coi.2016.10.004
566. Lodolce JP, Boone DL, Chai S, Swain RE, Dassopoulos T, Trettin S, Ma A. IL-15 receptor maintains lymphoid homeostasis by supporting lymphocyte homing and proliferation. *Immunity* (1998) 9:669–676. doi: 10.1016/s1074-7613(00)80664-0
567. Kennedy MK, Glaccum M, Brown SN, Butz EA, Viney JL, Embers M, Matsuki N, Charrier K, Sedger L, Willis CR, et al. Reversible defects in natural killer and memory CD8 T cell lineages in interleukin 15-deficient mice. *J Exp Med* (2000) 191:771–780. doi: 10.1084/jem.191.5.771
568. Vosshenrich CAJ, Ranson T, Samson SI, Corcuff E, Colucci F, Rosmaraki EE, Di Santo JP. Roles for common cytokine receptor gamma-chain-dependent cytokines in the generation, differentiation, and maturation of NK cell precursors and peripheral NK cells in vivo. *J Immunol* (2005) 174:1213–1221. doi: 10.4049/jimmunol.174.3.1213
569. Response of resting human peripheral blood natural killer cells to interleukin 2. *J Exp Med* (1984) 160:1147–1169.
570. Chaix J, Tessmer MS, Hoebe K, Fuséri N, Ryffel B, Dalod M, Alexopoulou L, Beutler B, Brossay L, Vivier E, et al. Priming of Natural Killer cells by Interleukin-18. *J Immunol* (2008) 181:1627–1631.
571. Fehniger TA, Shah MH, Turner MJ, VanDeusen JB, Whitman SP, Cooper MA, Suzuki K, Wechser M, Goodsaid F, Caligiuri MA. Differential cytokine and chemokine gene expression by human NK cells following activation with IL-18 or IL-15 in combination with IL-12: implications for the innate immune response. *J Immunol* (1999) 162:4511–4520.
572. Leong JW, Chase JM, Romee R, Schneider SE, Sullivan RP, Cooper MA, Fehniger TA. Pre-activation with IL-12, IL-15, and IL-18 induces CD25 and a functional high affinity IL-2 receptor on human cytokine-induced memory-like NK cells. *Biol Blood Marrow Transplant* (2014) 20:463–473. doi: 10.1016/j.bbmt.2014.01.006
573. Mirjačić Martinović K, Babović N, Džodić R, Jurišić V, Matković S, Konjević G. Favorable in vitro effects of combined IL-12 and IL-18 treatment on NK cell cytotoxicity and CD25 receptor expression in metastatic melanoma patients. *J Transl Med* (2015) 13:120. doi: 10.1186/s12967-015-0479-z
574. Terrén I, Mikelez I, Odriozola I, Gredilla A, González J, Orrantia A, Vitallé J, Zenarruzabeitia O, Borrego F. Implication of Interleukin-12/15/18 and Ruxolitinib in the

Phenotype, Proliferation, and Polyfunctionality of Human Cytokine-Preactivated Natural Killer Cells. *Front Immunol* (2018) 9:737. doi: 10.3389/fimmu.2018.00737

575. Wang X, Sun R, Hao X, Lian Z-X, Wei H, Tian Z. IL-17 constrains natural killer cell activity by restraining IL-15-driven cell maturation via SOCS3. *Proc Natl Acad Sci U S A* (2019) 116:17409–17418. doi: 10.1073/pnas.1904125116
576. Viel S, Marçais A, Guimaraes FS-F, Loftus R, Rabilloud J, Grau M, Degouve S, Djebali S, Sanlaville A, Charrier E, et al. TGF- $\beta$  inhibits the activation and functions of NK cells by repressing the mTOR pathway. *Science Signaling* (2016) 9:ra19–ra19. doi: 10.1126/scisignal.aad1884
577. Gill S, Vasey AE, De Souza A, Baker J, Smith AT, Kohrt HE, Florek M, Gibbs KD, Tate K, Ritchie DS, et al. Rapid development of exhaustion and down-regulation of eomesodermin limit the antitumor activity of adoptively transferred murine natural killer cells. *Blood* (2012) 119:5758–5768. doi: 10.1182/blood-2012-03-415364
578. Gordon SM, Chaix J, Rupp LJ, Wu J, Madera S, Sun JC, Lindsten T, Reiner SL. The Transcription Factors T-bet and Eomes Control Key Checkpoints of Natural Killer Cell Maturation. *Immunity* (2012) 36:55–67. doi: 10.1016/j.immuni.2011.11.016
579. van Helden MJ, Goossens S, Daussy C, Mathieu A-L, Faure F, Marçais A, Vandamme N, Farla N, Mayol K, Viel S, et al. Terminal NK cell maturation is controlled by concerted actions of T-bet and Zeb2 and is essential for melanoma rejection. *J Exp Med* (2015) 212:2015–2025. doi: 10.1084/jem.20150809
580. Male V, Nisoli I, Kostrzewski T, Allan DSJ, Carlyle JR, Lord GM, Wack A, Brady HJM. The transcription factor E4bp4/Nfil3 controls commitment to the NK lineage and directly regulates Eomes and Id2 expression. *J Exp Med* (2014) 211:635–642. doi: 10.1084/jem.20132398
581. Gascoyne DM, Long E, Veiga-Fernandes H, de Boer J, Williams O, Seddon B, Coles M, Kioussis D, Brady HJM. The basic leucine zipper transcription factor E4BP4 is essential for natural killer cell development. *Nat Immunol* (2009) 10:1118–1124. doi: 10.1038/ni.1787
582. Kamizono S, Duncan GS, Seidel MG, Morimoto A, Hamada K, Grosveld G, Akashi K, Lind EF, Haight JP, Ohashi PS, et al. Nfil3/E4bp4 is required for the development and maturation of NK cells in vivo. *J Exp Med* (2009) 206:2977–2986. doi: 10.1084/jem.20092176
583. Delconte RB, Shi W, Sathe P, Ushiki T, Seillet C, Minnich M, Kolesnik TB, Rankin LC, Mielke LA, Zhang J-G, et al. The Helix-Loop-Helix Protein ID2 Governs NK Cell Fate by Tuning Their Sensitivity to Interleukin-15. *Immunity* (2016) 44:103–115. doi: 10.1016/j.immuni.2015.12.007
584. Yokota Y, Mansouri A, Mori S, Sugawara S, Adachi S, Nishikawa S-I, Gruss P. Development of peripheral lymphoid organs and natural killer cells depends on the helix-loop-helix inhibitor Id2. *Nature* (1999) 397:702–706. doi: 10.1038/17812
585. Pikovskaya O, Chaix J, Rothman NJ, Collins A, Chen Y-H, Scipioni AM, Vivier E, Reiner SL. Eomesodermin is Sufficient to Direct Type 1 Innate Lymphocyte Development into

- the Conventional Natural Killer Lineage. *J Immunol* (2016) 196:1449–1454. doi: 10.4049/jimmunol.1502396
586. Townsend MJ, Weinmann AS, Matsuda JL, Salomon R, Farnham PJ, Biron CA, Gapin L, Glimcher LH. T-bet Regulates the Terminal Maturation and Homeostasis of NK and Vα14i NKT Cells. *Immunity* (2004) 20:477–494. doi: 10.1016/S1074-7613(04)00076-7
587. Grund EM, Spyropoulos DD, Watson DK, Muise-Helmericks RC. Interleukins 2 and 15 Regulate Ets1 Expression via ERK1/2 and MNK1 in Human Natural Killer Cells\*. *Journal of Biological Chemistry* (2005) 280:4772–4778. doi: 10.1074/jbc.M408356200
588. Taveirne S, Wahlen S, Van Loocke W, Kiekens L, Persyn E, Van Ammel E, De Mulder K, Roels J, Tilleman L, Aumercier M, et al. The transcription factor ETS1 is an important regulator of human NK cell development and terminal differentiation. *Blood* (2020) 136:288–298. doi: 10.1182/blood.2020005204
589. Miyazaki T, Kawahara A, Fujii H, Nakagawa Y, Minami Y, Liu Z-J, Oishi I, Silvennoinen O, Witthuhn BA, Ihle JN, et al. Functional Activation of Jak1 and Jak3 by Selective Association with IL-2 Receptor Subunits. *Science* (1994) 266:1045–1047. doi: 10.1126/science.7973659
590. Eckelhart E, Warsch W, Zebedin E, Simma O, Stoiber D, Kolbe T, Rüllicke T, Mueller M, Casanova E, Sexl V. A novel Ncr1-Cre mouse reveals the essential role of STAT5 for NK-cell survival and development. *Blood* (2011) 117:1565–1573. doi: 10.1182/blood-2010-06-291633
591. Witalisz-Siepracka A, Klein K, Prinz D, Leidenfrost N, Schabbauer G, Dohnal A, Sexl V. Loss of JAK1 Drives Innate Immune Deficiency. *Front Immunol* (2019) 9:3108. doi: 10.3389/fimmu.2018.03108
592. Vargas-Hernández A, Witalisz-Siepracka A, Prchal-Murphy M, Klein K, Mahapatra S, Al-Herz W, Mace EM, Carisey AF, Orange JS, Sexl V, et al. Human STAT5b mutation causes dysregulated human natural killer cell maturation and impaired lytic function. *J Allergy Clin Immunol* (2020) 145:345–357.e9. doi: 10.1016/j.jaci.2019.09.016
593. Bezman NA, Cedars E, Steiner DF, Belloch R, Hesslein DGT, Lanier LL. Distinct requirements of microRNAs in NK cell activation, survival, and function. *J Immunol* (2010) 185:3835–3846. doi: 10.4049/jimmunol.1000980
594. Leong JW, Sullivan RP, Fehniger TA. Natural Killer Cell Regulation by MicroRNAs in Health and Disease. *J Biomed Biotechnol* (2012) 2012:632329. doi: 10.1155/2012/632329
595. Ng S-B, Yan J, Huang G, Selvarajan V, Tay JL-S, Lin B, Bi C, Tan J, Kwong Y-L, Shimizu N, et al. Dysregulated microRNAs affect pathways and targets of biologic relevance in nasal-type natural killer/T-cell lymphoma. *Blood* (2011) 118:4919–4929. doi: 10.1182/blood-2011-07-364224
596. Yamanaka Y, Tagawa H, Takahashi N, Watanabe A, Guo Y-M, Iwamoto K, Yamashita J, Saitoh H, Kameoka Y, Shimizu N, et al. Aberrant overexpression of microRNAs activate AKT signaling via down-regulation of tumor suppressors in natural killer-cell lymphoma/leukemia. *Blood* (2009) 114:3265–3275. doi: 10.1182/blood-2009-06-222794

597. Fehniger TA, Wylie T, Germino E, Leong JW, Magrini VJ, Koul S, Keppel CR, Schneider SE, Koboldt DC, Sullivan RP, et al. Next-generation sequencing identifies the natural killer cell microRNA transcriptome. *Genome Res* (2010) 20:1590–1604. doi: 10.1101/gr.107995.110
598. Beaulieu AM, Bezman NA, Lee JE, Matloubian M, Sun JC, Lanier LL. MicroRNA function in NK cell biology. *Immunol Rev* (2013) 253:40–52. doi: 10.1111/imr.12045
599. Bezman NA, Chakraborty T, Bender T, Lanier LL. miR-150 regulates the development of NK and iNKT cells. *J Exp Med* (2011) 208:2717–2731. doi: 10.1084/jem.20111386
600. Watanabe A, Tagawa H, Yamashita J, Teshima K, Nara M, Iwamoto K, Kume M, Kameoka Y, Takahashi N, Nakagawa T, et al. The role of microRNA-150 as a tumor suppressor in malignant lymphoma. *Leukemia* (2011) 25:1324–1334. doi: 10.1038/leu.2011.81
601. Kim N, Kim M, Yun S, Doh J, Greenberg PD, Kim T-D, Choi I. MicroRNA-150 regulates the cytotoxicity of natural killers by targeting perforin-1. *J Allergy Clin Immunol* (2014) 134:195-203.e4. doi: 10.1016/j.jaci.2014.02.018
602. Liu X, Wang Y, Sun Q, Yan J, Huang J, Zhu S, Yu J. Identification of microRNA transcriptome involved in human natural killer cell activation. *Immunology Letters* (2012) 143:208–217. doi: 10.1016/j.imlet.2012.02.014
603. Trotta R, Chen L, Ciarlariello D, Josyula S, Mao C, Costinean S, Yu L, Butchar JP, Tridandapani S, Croce CM, et al. miR-155 regulates IFN- $\gamma$  production in natural killer cells. *Blood* (2012) 119:3478–3485. doi: 10.1182/blood-2011-12-398099
604. Sullivan RP, Fogel LA, Leong JW, Schneider SE, Wong R, Romee R, Thai T-H, Sexl V, Matkovich SJ, Dorn GW, et al. miR-155 tunes both the threshold and extent of NK cell activation via targeting of multiple signaling pathways. *J Immunol* (2013) 191:10.4049/jimmunol.1301950. doi: 10.4049/jimmunol.1301950
605. Cheng YQ, Ren JP, Zhao J, Wang JM, Zhou Y, Li GY, Moorman JP, Yao ZQ. MicroRNA-155 regulates interferon- $\gamma$  production in natural killer cells via Tim-3 signalling in chronic hepatitis C virus infection. *Immunology* (2015) 145:485–497. doi: 10.1111/imm.12463
606. Moretta L, Ferlazzo G, Bottino C, Vitale M, Pende D, Mingari MC, Moretta A. Effector and regulatory events during natural killer–dendritic cell interactions. *Immunological Reviews* (2006) 214:219–228. doi: 10.1111/j.1600-065X.2006.00450.x
607. Amakata Y, Fujiyama Y, Andoh A, Hodohara K, Bamba T. Mechanism of NK cell activation induced by coculture with dendritic cells derived from peripheral blood monocytes. *Clin Exp Immunol* (2001) 124:214–222. doi: 10.1046/j.1365-2249.2001.01550.x
608. Draghi M, Pashine A, Sanjanwala B, Gendzekhadze K, Cantoni C, Cosman D, Moretta A, Valiante NM, Parham P. NKp46 and NKG2D recognition of infected dendritic cells is necessary for NK cell activation in the human response to influenza infection. *J Immunol* (2007) 178:2688–2698. doi: 10.4049/jimmunol.178.5.2688

609. Ferlazzo G, Pack M, Thomas D, Paludan C, Schmid D, Strowig T, Bougras G, Muller WA, Moretta L, Münz C. 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) 101:16606–16611. doi: 10.1073/pnas.0407522101
610. Semino C, Angelini G, Poggi A, Rubartelli A. NK/iDC interaction results in IL-18 secretion by DCs at the synaptic cleft followed by NK cell activation and release of the DC maturation factor HMGB1. *Blood* (2005) 106:609–616. doi: 10.1182/blood-2004-10-3906
611. Fernandez NC, Lozier A, Flament C, Ricciardi-Castagnoli P, Bellet D, Suter M, Perricaudet M, Tursz T, Maraskovsky E, Zitvogel L. Dendritic cells directly trigger NK cell functions: cross-talk relevant in innate anti-tumor immune responses in vivo. *Nat Med* (1999) 5:405–411. doi: 10.1038/7403
612. 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) 195:327–333. doi: 10.1084/jem.20010938
613. Granucci F, Zanoni I, Pavelka N, Van Dommelen SLH, Andoniou CE, Belardelli F, Degli Esposti MA, Ricciardi-Castagnoli P. A contribution of mouse dendritic cell-derived IL-2 for NK cell activation. *J Exp Med* (2004) 200:287–295. doi: 10.1084/jem.20040370
614. Orange JS, Biron CA. An absolute and restricted requirement for IL-12 in natural killer cell IFN-gamma production and antiviral defense. Studies of natural killer and T cell responses in contrasting viral infections. *The Journal of Immunology* (1996) 156:1138–1142.
615. Orange JS, Biron CA. Characterization of early IL-12, IFN-alpha, and TNF effects on antiviral state and NK cell responses during murine cytomegalovirus infection. *J Immunol* (1996) 156:4746–4756.
616. Lucas M, Schachterle W, Oberle K, Aichele P, Diefenbach A. Natural Killer Cell-Mediated Control of Infections Requires Production of Interleukin 15 by Type I IFN-Triggered Dendritic Cells. *Immunity* (2007) 26:503–517. doi: 10.1016/j.immuni.2007.03.006
617. Brilot F, Strowig T, Roberts SM, Arrey F, Münz C. NK cell survival mediated through the regulatory synapse with human DCs requires IL-15. *J Clin Invest* (2007) 117:3316–3329. doi: 10.1172/JCI31751
618. Castillo EF, Stonier SW, Frasca L, Schluns KS. Dendritic Cells Support the In Vivo Development and Maintenance of NK Cells via IL-15 Trans-Presentation. *J Immunol* (2009) 183:4948–4956. doi: 10.4049/jimmunol.0900719
619. Ferlazzo G, Morandi B. Cross-Talks between Natural Killer Cells and Distinct Subsets of Dendritic Cells. *Front Immunol* (2014) 5:159. doi: 10.3389/fimmu.2014.00159
620. Kerdiles Y, Ugolini S, Vivier E. T cell regulation of natural killer cells. *J Exp Med* (2013) 210:1065–1068. doi: 10.1084/jem.20130960

621. Co EC, Gormley M, Kapidzic M, Rosen DB, Scott MA, Stolp HAR, McMaster M, Lanier LL, Bárcena A, Fisher SJ. Maternal Decidual Macrophages Inhibit NK Cell Killing of Invasive Cytotrophoblasts During Human Pregnancy. *Biol Reprod* (2013) 88:155. doi: 10.1095/biolreprod.112.099465
622. Bellora F, Castriconi R, Dondero A, Reggiardo G, Moretta L, Mantovani A, Moretta A, Bottino C. The interaction of human natural killer cells with either unpolarized or polarized macrophages results in different functional outcomes. *Proc Natl Acad Sci U S A* (2010) 107:21659–21664. doi: 10.1073/pnas.1007654108
623. Vacca P, Cantoni C, Vitale M, Prato C, Canegallo F, Fenoglio D, Ragni N, Moretta L, Mingari MC. Crosstalk between decidual NK and CD14<sup>+</sup> myelomonocytic cells results in induction of Tregs and immunosuppression. *Proc Natl Acad Sci U S A* (2010) 107:11918–11923. doi: 10.1073/pnas.1001749107
624. Manaster I, Mizrahi S, Goldman-Wohl D, Sela HY, Stern-Ginossar N, Lankry D, Gruda R, Hurwitz A, Bdolah Y, Haimov-Kochman R, et al. Endometrial NK Cells Are Special Immature Cells That Await Pregnancy. *The Journal of Immunology* (2008) 181:1869–1876. doi: 10.4049/jimmunol.181.3.1869
625. Jaeger BN, Donadieu J, Cognet C, Bernat C, Ordoñez-Rueda D, Barlogis V, Mahlaoui N, Fenis A, Narni-Mancinelli E, Beaupain B, et al. Neutrophil depletion impairs natural killer cell maturation, function, and homeostasis. *J Exp Med* (2012) 209:565–580. doi: 10.1084/jem.20111908
626. Vivier E, Nunès JA, Vély F. Natural Killer Cell Signaling Pathways. *Science* (2004) 306:1517–1519. doi: 10.1126/science.1103478
627. Long EO. Regulation of immune responses through inhibitory receptors. *Annu Rev Immunol* (1999) 17:875–904. doi: 10.1146/annurev.immunol.17.1.875
628. Yokoyama WM, Kim S. How do natural killer cells find self to achieve tolerance? *Immunity* (2006) 24:249–257. doi: 10.1016/j.immuni.2006.03.006
629. 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) 331:44–49. doi: 10.1126/science.1198687
630. Sivori S, Carlomagno S, Pesce S, Moretta A, Vitale M, Marcenaro E. TLR/NCR/KIR: Which One to Use and When? *Front Immunol* (2014) 5:105. doi: 10.3389/fimmu.2014.00105
631. Meiliana A, Dewi N, Wijaya A. Prospect of Natural Killer Cells in Cancer Immunotherapy. *The Indonesian Biomedical Journal* (2018) 10:192–202. doi: 10.18585/inabj.v10i3.532
632. Marsh S g. e., Parham P, Dupont B, Geraghty D e., Trowsdale J, Middleton D, Vilches C, Carrington M, Witt C, Guethlein L a., et al. Killer-cell immunoglobulin-like receptor (KIR) nomenclature report, 2002. *Tissue Antigens* (2003) 62:79–86. doi: 10.1034/j.1399-0039.2003.00072.x

633. Colonna M, Samaridis J. Cloning of Immunoglobulin-Superfamily Members Associated with HLA-C and HLA-B Recognition by Human Natural Killer Cells. *Science* (1995) 268:405–408. doi: 10.1126/science.7716543
634. Lanier LL. Up on the tightrope: natural killer cell activation and inhibition. *Nat Immunol* (2008) 9:495–502. doi: 10.1038/ni1581
635. Lanier LL, Corliss BC, Wu J, Leong C, Phillips JH. Immunoreceptor DAP12 bearing a tyrosine-based activation motifs involved in activating NK cells. *Nature* (1998) 391:703–707. doi: 10.1038/35642
636. Thielens A, Vivier E, Romagné F. NK cell MHC class I specific receptors (KIR): from biology to clinical intervention. *Current Opinion in Immunology* (2012) 24:239–245. doi: 10.1016/j.coi.2012.01.001
637. Cosman D, Fanger N, Borges L, Kubin M, Chin W, Peterson L, Hsu M-L. A Novel Immunoglobulin Superfamily Receptor for Cellular and Viral MHC Class I Molecules. *Immunity* (1997) 7:273–282. doi: 10.1016/S1074-7613(00)80529-4
638. Brown D, Trowsdale J, Allen R. The LILR family: modulators of innate and adaptive immune pathways in health and disease. *Tissue Antigens* (2004) 64:215–225. doi: 10.1111/j.0001-2815.2004.00290.x
639. Lemaoult J, Zafaranloo K, Le Danff C, Carosella ED. HLA-G up-regulates ILT2, ILT3, ILT4, and KIR2DL4 in antigen presenting cells, NK cells, and T cells. *The FASEB Journal* (2005) 19:1–23. doi: 10.1096/fj.04-1617fje
640. Favier B, LeMaoult J, Lesport E, Carosella ED. ILT2/HLA-G interaction impairs NK-cell functions through the inhibition of the late but not the early events of the NK-cell activating synapse. *The FASEB Journal* (2010) 24:689–699. doi: 10.1096/fj.09-135194
641. Morel E, Bellón T. HLA Class I Molecules Regulate IFN- $\gamma$  Production Induced in NK Cells by Target Cells, Viral Products, or Immature Dendritic Cells through the Inhibitory Receptor ILT2/CD85j. *The Journal of Immunology* (2008) 181:2368–2381. doi: 10.4049/jimmunol.181.4.2368
642. Chapman TL, Heikema AP, Bjorkman PJ. The Inhibitory Receptor LIR-1 Uses a Common Binding Interaction to Recognize Class I MHC Molecules and the Viral Homolog UL18. *Immunity* (1999) 11:603–613. doi: 10.1016/S1074-7613(00)80135-1
643. Gumá M, Angulo A, López-Botet M. NK cell receptors involved in the response to human cytomegalovirus infection. *Curr Top Microbiol Immunol* (2006) 298:207–223. doi: 10.1007/3-540-27743-9\_11
644. Pende D, Parolini S, Pessino A, Sivori S, Augugliaro R, Morelli L, Marcenaro E, Accame L, Malaspina A, Biassoni R, et al. Identification and Molecular Characterization of Nkp30, a Novel Triggering Receptor Involved in Natural Cytotoxicity Mediated by Human Natural Killer Cells. *J Exp Med* (1999) 190:1505–1516.
645. Sivori S, Vitale M, Morelli L, Sanseverino L, Augugliaro R, Bottino C, Moretta L, Moretta A. p46, a Novel Natural Killer Cell-specific Surface Molecule That Mediates Cell Activation. *J Exp Med* (1997) 186:1129–1136.



646. Vitale M, Bottino C, Sivori S, Sanseverino L, Castriconi R, Marcenaro E, Augugliaro R, Moretta L, Moretta A. NKp44, a Novel Triggering Surface Molecule Specifically Expressed by Activated Natural Killer Cells, Is Involved in Non-Major Histocompatibility Complex-restricted Tumor Cell Lysis. *J Exp Med* (1998) 187:2065–2072.
647. Kruse PH, Matta J, Ugolini S, Vivier E. Natural cytotoxicity receptors and their ligands. *Immunology & Cell Biology* (2014) 92:221–229. doi: 10.1038/icb.2013.98
648. Pessino A, Sivori S, Bottino C, Malaspina A, Morelli L, Moretta L, Biassoni R, Moretta A. Molecular Cloning of NKp46: A Novel Member of the Immunoglobulin Superfamily Involved in Triggering of Natural Cytotoxicity. *J Exp Med* (1998) 188:953–960.
649. Cantoni C, Bottino C, Vitale M, Pessino A, Augugliaro R, Malaspina A, Parolini S, Moretta L, Moretta A, Biassoni R. NKp44, A Triggering Receptor Involved in Tumor Cell Lysis by Activated Human Natural Killer Cells, Is a Novel Member of the Immunoglobulin Superfamily. *J Exp Med* (1999) 189:787–796.
650. Delahaye NF, Rusakiewicz S, Martins I, Ménard C, Roux S, Lyonnet L, Paul P, Sarabi M, Chaput N, Semeraro M, et al. Alternatively spliced NKp30 isoforms affect the prognosis of gastrointestinal stromal tumors. *Nat Med* (2011) 17:700–707. doi: 10.1038/nm.2366
651. Moretta A, Bottino C, Vitale M, Pende D, Cantoni C, Mingari MC, Biassoni R, Moretta L. Activating receptors and coreceptors involved in human natural killer cell-mediated cytotoxicity. *Annu Rev Immunol* (2001) 19:197–223. doi: 10.1146/annurev.immunol.19.1.197
652. Costello RT, Sivori S, Marcenaro E, Lafage-Pochitaloff M, Mozziconacci M-J, Reviron D, Gastaut J-A, Pende D, Olive D, Moretta A. Defective expression and function of natural killer cell-triggering receptors in patients with acute myeloid leukemia. *Blood* (2002) 99:3661–3667. doi: 10.1182/blood.V99.10.3661
653. Mandelboim O, Porgador A. NKp46. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* (2001) 33:1147–1150. doi: 10.1016/S1357-2725(01)00078-4
654. Moretta L, Moretta A. Unravelling natural killer cell function: triggering and inhibitory human NK receptors. *EMBO J* (2004) 23:255–259. doi: 10.1038/sj.emboj.7600019
655. Hudspeth K, Silva-Santos B, Mavilio D. Natural Cytotoxicity Receptors: Broader Expression Patterns and Functions in Innate and Adaptive Immune Cells. *Front Immunol* (2013) 4:69. doi: 10.3389/fimmu.2013.00069
656. Narni-Mancinelli E, Gauthier L, Baratin M, Guia S, Fenis A, Deghmane A-E, Rossi B, Fourquet P, Escalière B, Kerdiles YM, et al. Complement factor P is a ligand for the natural killer cell-activating receptor NKp46. *Sci Immunol* (2017) 2:eaam9628. doi: 10.1126/sciimmunol.aam9628
657. Baychelier F, Sennepin A, Ermonval M, Dorgham K, Debré P, Vieillard V. Identification of a cellular ligand for the natural cytotoxicity receptor NKp44. *Blood* (2013) 122:2935–2942. doi: 10.1182/blood-2013-03-489054

658. Rosental B, Brusilovsky M, Hadad U, Oz D, Appel MY, Afergan F, Yossef R, Rosenberg LA, Aharoni A, Cerwenka A, et al. Proliferating Cell Nuclear Antigen is a novel inhibitory ligand for the natural cytotoxicity receptor NKp44. *J Immunol* (2011) 187:5693–5702. doi: 10.4049/jimmunol.1102267
659. Barrow AD, Edeling MA, Trifonov V, Luo J, Goyal P, Bohl B, Bando J, Kim AH, Walker J, Andahazy M, et al. Natural Killer cells control tumor growth by sensing a growth factor. *Cell* (2018) 172:534–548.e19. doi: 10.1016/j.cell.2017.11.037
660. Matta J, Baratin M, Chiche L, Forel J-M, Cognet C, Thomas G, Farnarier C, Piperoglou C, Papazian L, Chaussabel D, et al. Induction of B7-H6, a ligand for the natural killer cell-activating receptor NKp30, in inflammatory conditions. *Blood* (2013) 122:394–404. doi: 10.1182/blood-2013-01-481705
661. Pogge von Strandmann E, Simhadri VR, von Tresckow B, Sasse S, Reiners KS, Hansen HP, Rothe A, Böll B, Simhadri VL, Borchmann P, et al. Human leukocyte antigen-B-associated transcript 3 is released from tumor cells and engages the NKp30 receptor on natural killer cells. *Immunity* (2007) 27:965–974. doi: 10.1016/j.immuni.2007.10.010
662. Arnon TI, Lev M, Katz G, Chernobrov Y, Porgador A, Mandelboim O. Recognition of viral hemagglutinins by NKp44 but not by NKp30. *European Journal of Immunology* (2001) 31:2680–2689. doi: 10.1002/1521-4141(200109)31:9<2680::AID-IMMU2680>3.0.CO;2-A
663. Hershkovitz O, Rosental B, Rosenberg LA, Navarro-Sanchez ME, Jivov S, Zilka A, Gershoni-Yahalom O, Brient-Litzler E, Bedouelle H, Ho JW, et al. NKp44 receptor mediates interaction of the envelope glycoproteins from the West-Nile and dengue viruses with Natural Killer cells. *J Immunol* (2009) 183:2610–2621. doi: 10.4049/jimmunol.0802806
664. Mandelboim O, Lieberman N, Lev M, Paul L, Arnon TI, Bushkin Y, Davis DM, Strominger JL, Yewdell JW, Porgador A. Recognition of haemagglutinins on virus-infected cells by NKp46 activates lysis by human NK cells. *Nature* (2001) 409:1055–1060. doi: 10.1038/35059110
665. Jarahian M, Fiedler M, Cohnen A, Djandji D, Hämmerling GJ, Gati C, Cerwenka A, Turner PC, Moyer RW, Watzl C, et al. Modulation of NKp30- and NKp46-Mediated Natural Killer Cell Responses by Poxviral Hemagglutinin. *PLoS Pathog* (2011) 7:e1002195. doi: 10.1371/journal.ppat.1002195
666. Mao H, Tu W, Liu Y, Qin G, Zheng J, Chan P-L, Lam K-T, Peiris JSM, Lau Y-L. Inhibition of Human Natural Killer Cell Activity by Influenza Virions and Hemagglutinin. *J Virol* (2010) 84:4148–4157. doi: 10.1128/JVI.02340-09
667. Arnon TI, Achdout H, Levi O, Markel G, Saleh N, Katz G, Gazit R, Gonen-Gross T, Hanna J, Nahari E, et al. Inhibition of the NKp30 activating receptor by pp65 of human cytomegalovirus. *Nat Immunol* (2005) 6:515–523. doi: 10.1038/ni1190
668. Shibuya A, Campbell D, Hannum C, Yssel H, Franz-Bacon K, McClanahan T, Kitamura T, Nicholl J, Sutherland GR, Lanier LL, et al. DNAM-1, A Novel Adhesion Molecule Involved in the Cytolytic Function of T Lymphocytes. *Immunity* (1996) 4:573–581. doi: 10.1016/S1074-7613(00)70060-4

669. Bryceson YT, March ME, Ljunggren H-G, Long EO. Activation, co-activation, and co-stimulation of resting human NK cells. *Immunol Rev* (2006) 214:10.1111/j.1600-065X.2006.00457.x. doi: 10.1111/j.1600-065X.2006.00457.x
670. Long EO, Kim HS, Liu D, Peterson ME, Rajagopalan S. Controlling NK Cell Responses: Integration of Signals for Activation and Inhibition. *Annu Rev Immunol* (2013) 31:10.1146/annurev-immunol-020711-075005. doi: 10.1146/annurev-immunol-020711-075005
671. Martinet L, Ferrari De Andrade L, Guillerey C, Lee JS, Liu J, Souza-Fonseca-Guimaraes F, Hutchinson DS, Kolesnik TB, Nicholson SE, Huntington ND, et al. DNAM-1 Expression Marks an Alternative Program of NK Cell Maturation. *Cell Reports* (2015) 11:85–97. doi: 10.1016/j.celrep.2015.03.006
672. Nabekura T, Kanaya M, Shibuya A, Fu G, Gascoigne NRJ, Lanier LL. The costimulatory molecule DNAM-1 is essential for optimal differentiation of memory natural killer cells during mouse cytomegalovirus infection. *Immunity* (2014) 40:225–234. doi: 10.1016/j.immuni.2013.12.011
673. Bottino C, Castriconi R, Pende D, Rivera P, Nanni M, Carnemolla B, Cantoni C, Grassi J, Marcenaro S, Reymond N, et al. Identification of PVR (CD155) and Nectin-2 (CD112) as Cell Surface Ligands for the Human DNAM-1 (CD226) Activating Molecule. *J Exp Med* (2003) 198:557–567. doi: 10.1084/jem.20030788
674. Pende D, Bottino C, Castriconi R, Cantoni C, Marcenaro S, Rivera P, Spaggiari GM, Dondero A, Carnemolla B, Reymond N, et al. PVR (CD155) and Nectin-2 (CD112) as ligands of the human DNAM-1 (CD226) activating receptor: involvement in tumor cell lysis. *Molecular Immunology* (2005) 42:463–469. doi: 10.1016/j.molimm.2004.07.028
675. Sibénil S, Dutertre C-A, Boix C, Bonnin E, Ménez R, Stura E, Jorieux S, Fridman W-H, Teillaud J-L. Molecular aspects of human FcγR interactions with IgG: Functional and therapeutic consequences. *Immunology Letters* (2006) 106:111–118. doi: 10.1016/j.imlet.2006.05.009
676. Yeap WH, Wong KL, Shimasaki N, Teo ECY, Quek JKS, Yong HX, Diong CP, Bertoletti A, Linn YC, Wong SC. Corrigendum: CD16 is indispensable for antibody-dependent cellular cytotoxicity by human monocytes. *Sci Rep* (2017) 7:46202. doi: 10.1038/srep46202
677. Gessner JE, Heiken H, Tamm A, Schmidt RE. The IgG Fc receptor family. *Ann Hematol* (1998) 76:231–248. doi: 10.1007/s002770050396
678. Simmons D, Seed B. The Fcγ receptor of natural killer cells is a phospholipid-linked membrane protein. *Nature* (1988) 333:568–570. doi: 10.1038/333568a0
679. Metes D, Ernst LK, Chambers WH, Sulica A, Herberman RB, Morel PA. Expression of Functional CD32 Molecules on Human NK Cells Is Determined by an Allelic Polymorphism of the FcγRIIC Gene. *Blood* (1998) 91:2369–2380. doi: 10.1182/blood.V91.7.2369

680. Lanier LL, Yu G, Phillips JH. Analysis of Fc gamma RIII (CD16) membrane expression and association with CD3 zeta and Fc epsilon RI-gamma by site-directed mutation. *The Journal of Immunology* (1991) 146:1571–1576.
681. Nagler A, Lanier LL, Cwirla S, Phillips JH. Comparative studies of human FcRIII-positive and negative natural killer cells. *The Journal of Immunology* (1989) 143:3183–3191.
682. Trinchieri G, Valiante N. Receptors for the Fc fragment of IgG on natural killer cells. *Nat Immun* (1993) 12:218–234.
683. Voskoboinik I, Whisstock JC, Trapani JA. Perforin and granzymes: function, dysfunction and human pathology. *Nat Rev Immunol* (2015) 15:388–400. doi: 10.1038/nri3839
684. Smyth MJ, Cretney E, Kelly JM, Westwood JA, Street SEA, Yagita H, Takeda K, Dommelen SLH van, Degli-Esposti MA, Hayakawa Y. Activation of NK cell cytotoxicity. *Molecular Immunology* (2005) 42:501–510. doi: 10.1016/j.molimm.2004.07.034
685. Prager I, Watzl C. Mechanisms of natural killer cell-mediated cellular cytotoxicity. *Journal of Leukocyte Biology* (2019) 105:1319–1329. doi: 10.1002/JLB.MR0718-269R
686. Warren HS, Kinnear BF. Quantitative Analysis of the Effect of CD16 Ligation on Human NK Cell Proliferation. *The Journal of Immunology* (1999) 162:735–742.
687. Morvan MG, Lanier LL. NK cells and cancer: you can teach innate cells new tricks. *Nat Rev Cancer* (2016) 16:7–19. doi: 10.1038/nrc.2015.5
688. Battella S, Cox MC, Santoni A, Palmieri G. Natural killer (NK) cells and anti-tumor therapeutic mAb: unexplored interactions. *Journal of Leukocyte Biology* (2016) 99:87–96. doi: 10.1189/jlb.5VMR0415-141R
689. Böttcher JP, Bonavita E, Chakravarty P, Brees H, Cabeza-Cabrerizo M, Sammicheli S, Rogers NC, Sahai E, Zelenay S, Reis e Sousa C. NK Cells Stimulate Recruitment of cDC1 into the Tumor Microenvironment Promoting Cancer Immune Control. *Cell* (2018) 172:1022-1037.e14. doi: 10.1016/j.cell.2018.01.004
690. Walzer T, Dalod M, Robbins SH, Zitvogel L, Vivier E. Natural-killer cells and dendritic cells: “l’union fait la force.” *Blood* (2005) 106:2252–2258. doi: 10.1182/blood-2005-03-1154
691. Martín-Fontecha A, Thomsen LL, Brett S, Gerard C, Lipp M, Lanzavecchia A, Sallusto F. Induced recruitment of NK cells to lymph nodes provides IFN-gamma for T(H)1 priming. *Nat Immunol* (2004) 5:1260–1265. doi: 10.1038/ni1138
692. Schuster IS, Coudert JD, Andoniou CE, Degli-Esposti MA. “Natural Regulators”: NK Cells as Modulators of T Cell Immunity. *Front Immunol* (2016) 7:235. doi: 10.3389/fimmu.2016.00235
693. Lazetic S, Chang C, Houchins JP, Lanier LL, Phillips JH. Human natural killer cell receptors involved in MHC class I recognition are disulfide-linked heterodimers of CD94 and NKG2 subunits. *The Journal of Immunology* (1996) 157:4741–4745.

694. Brooks AG, Posch PE, Scorzelli CJ, Borrego F, Coligan JE. NKG2A Complexed with CD94 Defines a Novel Inhibitory Natural Killer Cell Receptor. *J Exp Med* (1997) 185:795–800.
695. Kusumi M, Yamashita T, Fujii T, Nagamatsu T, Kozuma S, Taketani Y. Expression patterns of lectin-like natural killer receptors, inhibitory CD94/NKG2A, and activating CD94/NKG2C on decidual CD56bright natural killer cells differ from those on peripheral CD56dim natural killer cells. *Journal of Reproductive Immunology* (2006) 70:33–42. doi: 10.1016/j.jri.2005.12.008
696. Béziat V, Liu LL, Malmberg J-A, Ivarsson MA, Sohlberg E, Björklund AT, Retière C, Sverremark-Ekström E, Traherne J, Ljungman P, et al. NK cell responses to cytomegalovirus infection lead to stable imprints in the human KIR repertoire and involve activating KIRs. *Blood* (2013) 121:2678–2688. doi: 10.1182/blood-2012-10-459545
697. Hendricks DW, Balfour HH, Dunmire SK, Schmeling DO, Hogquist KA, Lanier LL. NKG2ChiCD57+ Natural Killer cells respond specifically to acute infection with cytomegalovirus and not Epstein-Barr virus. *J Immunol* (2014) 192:4492–4496. doi: 10.4049/jimmunol.1303211
698. Valés-Gómez M, Reyburn HT, Erskine RA, López-Botet M, Strominger JL. Kinetics and peptide dependency of the binding of the inhibitory NK receptor CD94/NKG2-A and the activating receptor CD94/NKG2-C to HLA-E. *EMBO J* (1999) 18:4250–4260. doi: 10.1093/emboj/18.15.4250
699. Kaiser BK, Barahmand-pour F, Paulsene W, Medley S, Geraghty DE, Strong RK. Interactions between NKG2x Immunoreceptors and HLA-E Ligands Display Overlapping Affinities and Thermodynamics. *The Journal of Immunology* (2005) 174:2878–2884. doi: 10.4049/jimmunol.174.5.2878
700. Braud VM, Allan DSJ, O’Callaghan CA, Söderström K, D’Andrea A, Ogg GS, Lazetic S, Young NT, Bell JI, Phillips JH, et al. HLA-E binds to natural killer cell receptors CD94/NKG2A, B and C. *Nature* (1998) 391:795–799. doi: 10.1038/35869
701. Lee N, Llano M, Carretero M, Ishitani A, Navarro F, López-Botet M, Geraghty DE. HLA-E is a major ligand for the natural killer inhibitory receptor CD94/NKG2A. *Proc Natl Acad Sci U S A* (1998) 95:5199–5204.
702. Lee N, Goodlett DR, Ishitani A, Marquardt H, Geraghty DE. HLA-E Surface Expression Depends on Binding of TAP-Dependent Peptides Derived from Certain HLA Class I Signal Sequences. *The Journal of Immunology* (1998) 160:4951–4960.
703. Lanier LL, Corliss B, Wu J, Phillips JH. Association of DAP12 with activating CD94/NKG2C NK cell receptors. *Immunity* (1998) 8:693–701. doi: 10.1016/s1074-7613(00)80574-9
704. Wu J, Song Y, Bakker ABH, Bauer S, Spies T, Lanier LL, Phillips JH. An Activating Immunoreceptor Complex Formed by NKG2D and DAP10. *Science* (1999) 285:730–732. doi: 10.1126/science.285.5428.730
705. Roberts AI, Lee L, Schwarz E, Groh V, Spies T, Ebert EC, Jabri B. Cutting Edge: NKG2D Receptors Induced by IL-15 Costimulate CD28-Negative Effector CTL in the Tissue

- Microenvironment. *The Journal of Immunology* (2001) 167:5527–5530. doi: 10.4049/jimmunol.167.10.5527
706. Park YP, Choi S-C, Kiesler P, Gil-Krzewska A, Borrego F, Weck J, Krzewski K, Coligan JE. Complex regulation of human NKG2D-DAP10 cell surface expression: opposing roles of the  $\gamma$ c cytokines and TGF- $\beta$ 1. *Blood* (2011) 118:3019–3027. doi: 10.1182/blood-2011-04-346825
707. Zhang C, Zhang J, Niu J, Zhou Z, Zhang J, Tian Z. Interleukin-12 improves cytotoxicity of natural killer cells via upregulated expression of NKG2D. *Human Immunology* (2008) 69:490–500. doi: 10.1016/j.humimm.2008.06.004
708. Castriconi R, Cantoni C, Della Chiesa M, Vitale M, Marcenaro E, Conte R, Biassoni R, Bottino C, Moretta L, Moretta A. Transforming growth factor  $\beta$ 1 inhibits expression of NKP30 and NKG2D receptors: Consequences for the NK-mediated killing of dendritic cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* (2003) 100:4120–4125. doi: 10.1073/pnas.0730640100
709. Lee J-C, Lee K-M, Kim D-W, Heo DS. Elevated TGF- $\beta$ 1 Secretion and Down-Modulation of NKG2D Underlies Impaired NK Cytotoxicity in Cancer Patients. *The Journal of Immunology* (2004) 172:7335–7340. doi: 10.4049/jimmunol.172.12.7335
710. Muntasell A, Magri G, Pende D, Angulo A, López-Botet M. Inhibition of NKG2D expression in NK cells by cytokines secreted in response to human cytomegalovirus infection. *Blood* (2010) 115:5170–5179. doi: 10.1182/blood-2009-11-256479
711. Burgess SJ, Marusina AI, Pathmanathan I, Borrego F, Coligan JE. IL-21 Down-Regulates NKG2D/DAP10 Expression on Human NK and CD8+ T Cells. *The Journal of Immunology* (2006) 176:1490–1497. doi: 10.4049/jimmunol.176.3.1490
712. Lanier LL. NKG2D receptor and its ligands in host defense. *Cancer Immunol Res* (2015) 3:575–582. doi: 10.1158/2326-6066.CIR-15-0098
713. Bauer S, Groh V, Wu J, Steinle A, Phillips JH, Lanier LL, Spies T. Pillars Article: Activation of NK Cells and T Cells by NKG2D, a Receptor for Stress-Inducible MICA. *Science*. 1999. 285: 727–729. *The Journal of Immunology* (2018) 200:2231–2233.
714. Bauer S, Groh V, Wu J, Steinle A, Phillips JH, Lanier LL, Spies T. Activation of NK Cells and T Cells by NKG2D, a Receptor for Stress-Inducible MICA. *Science* (1999) 285:727–729. doi: 10.1126/science.285.5428.727
715. Bacon L, Eagle RA, Meyer M, Easom N, Young NT, Trowsdale J. Two Human ULBP/RAET1 Molecules with Transmembrane Regions Are Ligands for NKG2D. *The Journal of Immunology* (2004) 173:1078–1084. doi: 10.4049/jimmunol.173.2.1078
716. Jan Chalupny N, Sutherland CL, Lawrence WA, Rein-Weston A, Cosman D. ULBP4 is a novel ligand for human NKG2D. *Biochemical and Biophysical Research Communications* (2003) 305:129–135. doi: 10.1016/S0006-291X(03)00714-9
717. Eagle RA, Traherne JA, Hair JR, Jafferji I, Trowsdale J. ULBP6/RAET1L is an additional human NKG2D ligand. *European Journal of Immunology* (2009) 39:3207–3216. doi: 10.1002/eji.200939502

718. Eagle RA, Trowsdale J. Promiscuity and the single receptor: NKG2D. *Nat Rev Immunol* (2007) 7:737–744. doi: 10.1038/nri2144
719. Definition of a natural killer NKR-P1A+/CD56-/CD16- functionally immature human NK cell subset that differentiates in vitro in the presence of interleukin 12 [published erratum appears in *J Exp Med* 1997 Mar 17;185(6):1150-1]. *J Exp Med* (1996) 184:1845–1856.
720. Montaldo E, Vitale C, Cottalasso F, Conte R, Glatzer T, Ambrosini P, Moretta L, Mingari MC. Human NK cells at early stages of differentiation produce CXCL8 and express CD161 molecule that functions as an activating receptor. *Blood* (2012) 119:3987–3996. doi: 10.1182/blood-2011-09-379693
721. Rosen DB, Bettadapura J, Alsharifi M, Mathew PA, Warren HS, Lanier LL. Cutting Edge: Lectin-Like Transcript-1 Is a Ligand for the Inhibitory Human NKR-P1A Receptor. *The Journal of Immunology* (2005) 175:7796–7799. doi: 10.4049/jimmunol.175.12.7796
722. Aldemir H, Prod'homme V, Dumaurier M-J, Retiere C, Poupon G, Cazareth J, Bihl F, Braud VM. Cutting edge: lectin-like transcript 1 is a ligand for the CD161 receptor. *J Immunol* (2005) 175:7791–7795. doi: 10.4049/jimmunol.175.12.7791
723. Germain C, Meier A, Jensen T, Knapnougel P, Poupon G, Lazzari A, Neisig A, Håkansson K, Dong T, Wagtmann N, et al. Induction of Lectin-like Transcript 1 (LLT1) Protein Cell Surface Expression by Pathogens and Interferon- $\gamma$  Contributes to Modulate Immune Responses. *J Biol Chem* (2011) 286:37964–37975. doi: 10.1074/jbc.M111.285312
724. Maghazachi AA. Role of chemokines in the biology of natural killer cells. *Curr Top Microbiol Immunol* (2010) 341:37–58. doi: 10.1007/82\_2010\_20
725. Nguyen KB, Salazar-Mather TP, Dalod MY, Deusen JBV, Wei X, Liew FY, Caligiuri MA, Durbin JE, Biron CA. Coordinated and Distinct Roles for IFN- $\alpha\beta$ , IL-12, and IL-15 Regulation of NK Cell Responses to Viral Infection. *The Journal of Immunology* (2002) 169:4279–4287. doi: 10.4049/jimmunol.169.8.4279
726. Grégoire C, Chasson L, Luci C, Tomasello E, Geissmann F, Vivier E, Walzer T. The trafficking of natural killer cells. *Immunol Rev* (2007) 220:169–182. doi: 10.1111/j.1600-065X.2007.00563.x
727. Lauzon NM, Mian F, MacKenzie R, Ashkar AA. The direct effects of Toll-like receptor ligands on human NK cell cytokine production and cytotoxicity. *Cellular Immunology* (2006) 241:102–112. doi: 10.1016/j.cellimm.2006.08.004
728. Della Chiesa M, Marcenaro E, Sivori S, Carlomagno S, Pesce S, Moretta A. Human NK cell response to pathogens. *Seminars in Immunology* (2014) 26:152–160. doi: 10.1016/j.smim.2014.02.001
729. Sivori S, Falco M, Chiesa MD, Carlomagno S, Vitale M, Moretta L, Moretta A. CpG and double-stranded RNA trigger human NK cells by Toll-like receptors: Induction of cytokine release and cytotoxicity against tumors and dendritic cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* (2004) 101:10116–10121. doi: 10.1073/pnas.0403744101

730. Schlaepfer E, Speck RF. Anti-HIV Activity Mediated by Natural Killer and CD8<sup>+</sup> Cells after Toll-Like Receptor 7/8 Triggering. *PLoS One* (2008) 3:e1999. doi: 10.1371/journal.pone.0001999
731. Fons P, Chabot S, Cartwright JE, Lenfant F, L'Faqihi F, Giustiniani J, Herault J-P, Gueguen G, Bono F, Savi P, et al. Soluble HLA-G1 inhibits angiogenesis through an apoptotic pathway and by direct binding to CD160 receptor expressed by endothelial cells. *Blood* (2006) 108:2608–2615. doi: 10.1182/blood-2005-12-019919
732. 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.
733. Le Bouteiller P, Barakonyi A, Giustiniani J, Lenfant F, Marie-Cardine A, Aguerre-Girr M, Rabot M, Hilgert I, Mami-Chouaib F, Tabiasco J, et al. 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) 99:16963–16968. doi: 10.1073/pnas.012681099
734. Barakonyi A, Rabot M, Marie-Cardine A, Aguerre-Girr M, Polgar B, Schiavon V, Bensussan A, Bouteiller PL. 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. *The Journal of Immunology* (2004) 173:5349–5354. doi: 10.4049/jimmunol.173.9.5349
735. Tu TC, Brown NK, Kim T-J, Wroblewska J, Yang X, Guo X, Lee SH, Kumar V, Lee K-M, Fu Y-X. CD160 is essential for NK-mediated IFN- $\gamma$  production. *J Exp Med* (2015) 212:415–429. doi: 10.1084/jem.20131601
736. Mathew PA, Garni-Wagner BA, Land K, Takashima A, Stoneman E, Bennett M, Kumar V. Cloning and characterization of the 2B4 gene encoding a molecule associated with non-MHC-restricted killing mediated by activated natural killer cells and T cells. *The Journal of Immunology* (1993) 151:5328–5337.
737. Identification of a novel signal transduction surface molecule on human cytotoxic lymphocytes. *J Exp Med* (1993) 178:1397–1406.
738. Veillette A. Immune regulation by SLAM family receptors and SAP-related adaptors. *Nat Rev Immunol* (2006) 6:56–66. doi: 10.1038/nri1761
739. Betser-Cohen G, Mizrahi S, Elboim M, Alsheich-Bartok O, Mandelboim O. The Association of MHC Class I Proteins with the 2B4 Receptor Inhibits Self-Killing of Human NK Cells. *The Journal of Immunology* (2010) 184:2761–2768. doi: 10.4049/jimmunol.0901572
740. McVicar DW, Taylor LS, Gosselin P, Willette-Brown J, Mikhael AI, Geahlen RL, Nakamura MC, Linnemeyer P, Seaman WE, Anderson SK, et al. DAP12-mediated Signal Transduction in Natural Killer Cells: A DOMINANT ROLE FOR THE Syk PROTEIN-TYROSINE KINASE\*. *Journal of Biological Chemistry* (1998) 273:32934–32942. doi: 10.1074/jbc.273.49.32934



741. Jiang K, Zhong B, Gilvary DL, Corliss BC, Vivier E, Hong-Geller E, Wei S, Djeu JY. Syk Regulation of Phosphoinositide 3-Kinase-Dependent NK Cell Function. *The Journal of Immunology* (2002) 168:3155–3164. doi: 10.4049/jimmunol.168.7.3155
742. Jiang K, Zhong B, Gilvary DL, Corliss BC, Hong-Geller E, Wei S, Djeu JY. Pivotal role of phosphoinositide-3 kinase in regulation of cytotoxicity in natural killer cells. *Nat Immunol* (2000) 1:419–425. doi: 10.1038/80859
743. MacFarlane AW, Campbell KS. Signal transduction in natural killer cells. *Curr Top Microbiol Immunol* (2006) 298:23–57. doi: 10.1007/3-540-27743-9\_2
744. Jiang K, Zhong B, Ritchey C, Gilvary DL, Hong-Geller E, Wei S, Djeu JY. Regulation of Akt-dependent cell survival by Syk and Rac. *Blood* (2003) 101:236–244. doi: 10.1182/blood-2002-04-1251
745. Brumbaugh KM, Binstadt BA, Billadeau DD, Schoon RA, Dick CJ, Ten RM, Leibson PJ. Functional Role for Syk Tyrosine Kinase in Natural Killer Cell-mediated Natural Cytotoxicity. *J Exp Med* (1997) 186:1965–1974.
746. Turnbull IR, Colonna M. Activating and inhibitory functions of DAP12. *Nat Rev Immunol* (2007) 7:155–161. doi: 10.1038/nri2014
747. Bruhns P, Marchetti P, Fridman WH, Vivier E, Daëron M. Differential Roles of N- and C-Terminal Immunoreceptor Tyrosine-Based Inhibition Motifs During Inhibition of Cell Activation by Killer Cell Inhibitory Receptors. *The Journal of Immunology* (1999) 162:3168–3175.
748. Ravetch JV, Lanier LL. Immune Inhibitory Receptors. *Science* (2000) 290:84–89. doi: 10.1126/science.290.5489.84
749. Coxon CH, Geer MJ, Senis YA. ITIM receptors: more than just inhibitors of platelet activation. *Blood* (2017) 129:3407–3418. doi: 10.1182/blood-2016-12-720185
750. Gilfillan S, Ho EL, Cella M, Yokoyama WM, Colonna M. NKG2D recruits two distinct adapters to trigger NK cell activation and costimulation. *Nat Immunol* (2002) 3:1150–1155. doi: 10.1038/ni857
751. Chang LC, Wang JP. Examination of the signal transduction pathways leading to activation of extracellular signal-regulated kinase by formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine in rat neutrophils. *FEBS Lett* (1999) 454:165–168. doi: 10.1016/s0014-5793(99)00717-6
752. Wu C. Integrin-linked kinase and PINCH: partners in regulation of cell-extracellular matrix interaction and signal transduction. *J Cell Sci* (1999) 112 ( Pt 24):4485–4489.
753. Wu J, Cherwinski H, Spies T, Phillips JH, Lanier LL. Dap10 and Dap12 Form Distinct, but Functionally Cooperative, Receptor Complexes in Natural Killer Cells. *J Exp Med* (2000) 192:1059–1068.
754. Morra M, Lu J, Poy F, Martin M, Sayos J, Calpe S, Gullo C, Howie D, Rietdijk S, Thompson A, et al. Structural basis for the interaction of the free SH2 domain EAT-2 with

- SLAM receptors in hematopoietic cells. *EMBO J* (2001) 20:5840–5852. doi: 10.1093/emboj/20.21.5840
755. Sayós J, Nguyen KB, Wu C, Stepp SE, Howie D, Schatzle JD, Kumar V, Biron CA, Terhorst C. 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* (2000) 12:1749–1757. doi: 10.1093/intimm/12.12.1749
756. Roncagalli R, Taylor JER, Zhang S, Shi X, Chen R, Cruz-Munoz M-E, Yin L, Latour S, Veillette A. Negative regulation of natural killer cell function by EAT-2, a SAP-related adaptor. *Nat Immunol* (2005) 6:1002–1010. doi: 10.1038/ni1242
757. van Erp EA, Luytjes W, Ferwerda G, van Kasteren PB. Fc-Mediated Antibody Effector Functions During Respiratory Syncytial Virus Infection and Disease. *Front Immunol* (2019) 10: doi: 10.3389/fimmu.2019.00548
758. Baum LL, Cassutt KJ, Knigge K, Khattri R, Margolick J, Rinaldo C, Kleeberger CA, Nishanian P, Henrard DR, Phair J. HIV-1 gp120-specific antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity correlates with rate of disease progression. *The Journal of Immunology* (1996) 157:2168–2173.
759. Wren LH, Chung AW, Isitman G, Kelleher AD, Parsons MS, Amin J, Cooper DA, Stratov I, Navis M, Kent SJ. Specific antibody-dependent cellular cytotoxicity responses associated with slow progression of HIV infection. *Immunology* (2013) 138:116–123. doi: 10.1111/imm.12016
760. Ackerman ME, Mikhailova A, Brown EP, Dowell KG, Walker BD, Bailey-Kellogg C, Suscovich TJ, Alter G. Polyfunctional HIV-Specific Antibody Responses Are Associated with Spontaneous HIV Control. *PLoS Pathog* (2016) 12:e1005315. doi: 10.1371/journal.ppat.1005315
761. Bonsignori M, Pollara J, Moody MA, Alpert MD, Chen X, Hwang K-K, Gilbert PB, Huang Y, Gurley TC, Kozink DM, et al. Antibody-Dependent Cellular Cytotoxicity-Mediating Antibodies from an HIV-1 Vaccine Efficacy Trial Target Multiple Epitopes and Preferentially Use the VH1 Gene Family. *J Virol* (2012) 86:11521–11532. doi: 10.1128/JVI.01023-12
762. Haynes BF, Gilbert PB, McElrath MJ, Zolla-Pazner S, Tomaras GD, Alam SM, Evans DT, Montefiori DC, Karnasuta C, Sutthent R, et al. Immune-Correlates Analysis of an HIV-1 Vaccine Efficacy Trial. *N Engl J Med* (2012) 366:1275–1286. doi: 10.1056/NEJMoa1113425
763. Corey L, Gilbert PB, Tomaras G, Haynes BF, Pantaleo G, Fauci AS. Immune Correlates of Vaccine Protection Against HIV-1 Acquisition: A Review. *Sci Transl Med* (2015) 7:310rv7. doi: 10.1126/scitranslmed.aac7732
764. Vanderven HA, Jegaskanda S, Wheatley AK, Kent SJ. Antibody-dependent cellular cytotoxicity and influenza virus. *Current Opinion in Virology* (2017) 22:89–96. doi: 10.1016/j.coviro.2016.12.002
765. Jegaskanda S, Luke C, Hickman HD, Sangster MY, Wieland-Alter WF, McBride JM, Yewdell JW, Wright PF, Treanor J, Rosenberger CM, et al. Generation and Protective

- Ability of Influenza Virus–Specific Antibody-Dependent Cellular Cytotoxicity in Humans Elicited by Vaccination, Natural Infection, and Experimental Challenge. *J Infect Dis* (2016) 214:945–952. doi: 10.1093/infdis/jiw262
766. Gao R, Sheng Z, Sreenivasan CC, Wang D, Li F. Influenza A Virus Antibodies with Antibody-Dependent Cellular Cytotoxicity Function. *Viruses* (2020) 12:276. doi: 10.3390/v12030276
767. Huber VC, Lynch JM, Bucher DJ, Le J, Metzger DW. Fc Receptor-Mediated Phagocytosis Makes a Significant Contribution to Clearance of Influenza Virus Infections. *The Journal of Immunology* (2001) 166:7381–7388. doi: 10.4049/jimmunol.166.12.7381
768. Co MDT, Terajima M, Thomas SJ, Jarman RG, Rungrojcharoenkit K, Fernandez S, Yoon I-K, Buddhari D, Cruz J, Ennis FA. Relationship of Preexisting Influenza Hemagglutination Inhibition, Complement-Dependent Lytic, and Antibody-Dependent Cellular Cytotoxicity Antibodies to the Development of Clinical Illness in a Prospective Study of A(H1N1)pdm09 Influenza in Children. *Viral Immunol* (2014) 27:375–382. doi: 10.1089/vim.2014.0061
769. Orange JS. Formation and function of the lytic NK-cell immunological synapse. *Nature Reviews Immunology* (2008) 8:713–725. doi: 10.1038/nri2381
770. Bryceson YT, March ME, Barber DF, Ljunggren H-G, Long EO. Cytolytic granule polarization and degranulation controlled by different receptors in resting NK cells. *J Exp Med* (2005) 202:1001–1012. doi: 10.1084/jem.20051143
771. Orange JS, Harris KE, Andzelm MM, Valter MM, Geha RS, Strominger JL. The mature activating natural killer cell immunologic synapse is formed in distinct stages. *Proc Natl Acad Sci U S A* (2003) 100:14151–14156. doi: 10.1073/pnas.1835830100
772. Vyas YM, Mehta KM, Morgan M, Maniar H, Butros L, Jung S, Burkhardt JK, Dupont B. Spatial Organization of Signal Transduction Molecules in the NK Cell Immune Synapses During MHC Class I-Regulated Noncytolytic and Cytolytic Interactions. *The Journal of Immunology* (2001) 167:4358–4367. doi: 10.4049/jimmunol.167.8.4358
773. Roda-Navarro P, Mittelbrunn M, Ortega M, Howie D, Terhorst C, Sánchez-Madrid F, Fernández-Ruiz E. Dynamic Redistribution of the Activating 2B4/SAP Complex at the Cytotoxic NK Cell Immune Synapse. *The Journal of Immunology* (2004) 173:3640–3646. doi: 10.4049/jimmunol.173.6.3640
774. Wülfing C, Purtic B, Klem J, Schatzle JD. Stepwise cytoskeletal polarization as a series of checkpoints in innate but not adaptive cytolytic killing. *Proc Natl Acad Sci U S A* (2003) 100:7767–7772. doi: 10.1073/pnas.1336920100
775. Ménager MM, Ménasché G, Romao M, Knapnougel P, Ho C-H, Garfa M, Raposo G, Feldmann J, Fischer A, de Saint Basile G. Secretory cytotoxic granule maturation and exocytosis require the effector protein hMunc13-4. *Nat Immunol* (2007) 8:257–267. doi: 10.1038/ni1431
776. Cohnen A, Chiang SC, Stojanovic A, Schmidt H, Claus M, Saftig P, Janßen O, Cerwenka A, Bryceson YT, Watzl C. Surface CD107a/LAMP-1 protects natural killer cells from

- degranulation-associated damage. *Blood* (2013) 122:1411–1418. doi: 10.1182/blood-2012-07-441832
777. Alter G, Malenfant JM, Altfeld M. CD107a as a functional marker for the identification of natural killer cell activity. *Journal of Immunological Methods* (2004) 294:15–22. doi: 10.1016/j.jim.2004.08.008
778. Blott EJ, Griffiths GM. Secretory lysosomes. *Nat Rev Mol Cell Biol* (2002) 3:122–131. doi: 10.1038/nrm732
779. Krzewski K, Coligan JE. Human NK cell lytic granules and regulation of their exocytosis. *Front Immunol* (2012) 3:335. doi: 10.3389/fimmu.2012.00335
780. Ojcius DM, Persechini PM, Zheng LM, Notaroberto PC, Adeodato SC, Young JD. Cytolytic and ion channel-forming properties of the N terminus of lymphocyte perforin. *Proc Natl Acad Sci U S A* (1991) 88:4621–4625.
781. Thiery J, Keefe D, Boulant S, Boucrot E, Walch M, Martinvalet D, Goping IS, Bleackley RC, Kirchhausen T, Lieberman J. Perforin pores in the endosomal membrane trigger release of endocytosed granzyme B to the cytosol of target cells. *Nat Immunol* (2011) 12:770–777. doi: 10.1038/ni.2050
782. Synergistic roles of granzymes A and B in mediating target cell death by rat basophilic leukemia mast cell tumors also expressing cytolysin/perforin. *J Exp Med* (1995) 181:1037–1046.
783. Martinvalet D, Dykxhoorn DM, Ferrini R, Lieberman J. Granzyme A cleaves a mitochondrial complex I protein to initiate caspase-independent cell death. *Cell* (2008) 133:681–692. doi: 10.1016/j.cell.2008.03.032
784. Martinvalet D, Zhu P, Lieberman J. Granzyme A Induces Caspase-Independent Mitochondrial Damage, a Required First Step for Apoptosis. *Immunity* (2005) 22:355–370. doi: 10.1016/j.immuni.2005.02.004
785. Beresford PJ, Xia Z, Greenberg AH, Lieberman J. Granzyme A Loading Induces Rapid Cytolysis and a Novel Form of DNA Damage Independently of Caspase Activation. *Immunity* (1999) 10:585–595. doi: 10.1016/S1074-7613(00)80058-8
786. Granzyme A is an interleukin 1 beta-converting enzyme. *J Exp Med* (1995) 181:1917–1922.
787. Thomas DA, Scorrano L, Putcha GV, Korsmeyer SJ, Ley TJ. Granzyme B can cause mitochondrial depolarization and cell death in the absence of BID, BAX, and BAK. *Proc Natl Acad Sci U S A* (2001) 98:14985–14990. doi: 10.1073/pnas.261581498
788. Sutton VR, Wowk ME, Cancilla M, Trapani JA. Caspase Activation by Granzyme B Is Indirect, and Caspase Autoprocessing Requires the Release of Proapoptotic Mitochondrial Factors. *Immunity* (2003) 18:319–329. doi: 10.1016/S1074-7613(03)00050-5
789. Darmon AJ, Nicholson DW, Bleackley RC. Activation of the apoptotic protease CPP32 by cytotoxic T-cell-derived granzyme B. *Nature* (1995) 377:446–448. doi: 10.1038/377446a0

790. Krensky AM, Clayberger C. Granulysin: A Novel Host Defense Molecule. *American Journal of Transplantation* (2005) 5:1789–1792. doi: 10.1111/j.1600-6143.2005.00970.x
791. Peña SV, Hanson DA, Carr BA, Goralski TJ, Krensky AM. Processing, subcellular localization, and function of 519 (granulysin), a human late T cell activation molecule with homology to small, lytic, granule proteins. *The Journal of Immunology* (1997) 158:2680–2688.
792. Kaspar AA, Okada S, Kumar J, Poulain FR, Drouvalakis KA, Kelekar A, Hanson DA, Kluck RM, Hitoshi Y, Johnson DE, et al. A Distinct Pathway of Cell-Mediated Apoptosis Initiated by Granulysin. *The Journal of Immunology* (2001) 167:350–356. doi: 10.4049/jimmunol.167.1.350
793. Okada S, Li Q, Whitin JC, Clayberger C, Krensky AM. Intracellular Mediators of Granulysin-Induced Cell Death. *The Journal of Immunology* (2003) 171:2556–2562. doi: 10.4049/jimmunol.171.5.2556
794. Gamen S, Hanson DA, Kaspar A, Naval J, Krensky AM, Anel A. Granulysin-Induced Apoptosis. I. Involvement of at Least Two Distinct Pathways. *The Journal of Immunology* (1998) 161:1758–1764.
795. Ghosh D, Lippert D, Krokhin O, Cortens JP, Wilkins JA. Defining the membrane proteome of NK cells. *Journal of Mass Spectrometry* (2010) 45:1–25. doi: 10.1002/jms.1696
796. Scott FL, Stec B, Pop C, Dobaczewska MK, Lee JJ, Monosov E, Robinson H, Salvesen GS, Schwarzenbacher R, Riedl SJ. The Fas/FADD death domain complex structure unravels signaling by receptor clustering. *Nature* (2009) 457:1019–1022. doi: 10.1038/nature07606
797. Kischkel FC, Hellbardt S, Behrmann I, Germer M, Pawlita M, Krammer PH, Peter ME. Cytotoxicity-dependent APO-1 (Fas/CD95)-associated proteins form a death-inducing signaling complex (DISC) with the receptor. *EMBO J* (1995) 14:5579–5588.
798. Kischkel FC, Lawrence DA, Chuntharapai A, Schow P, Kim KJ, Ashkenazi A. Apo2L/TRAIL-Dependent Recruitment of Endogenous FADD and Caspase-8 to Death Receptors 4 and 5. *Immunity* (2000) 12:611–620. doi: 10.1016/S1074-7613(00)80212-5
799. MacFarlane M, Merrison W, Dinsdale D, Cohen GM. Active Caspases and Cleaved Cytokeratins Are Sequestered into Cytoplasmic Inclusions in Trail-Induced Apoptosis. *J Cell Biol* (2000) 148:1239–1254.
800. Legler DF, Micheau O, Doucey M-A, Tschopp J, Bron C. Recruitment of TNF Receptor 1 to Lipid Rafts Is Essential for TNF $\alpha$ -Mediated NF- $\kappa$ B Activation. *Immunity* (2003) 18:655–664. doi: 10.1016/S1074-7613(03)00092-X
801. 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. Compartmentalization of TNF Receptor 1 Signaling: Internalized TNF Receptosomes as Death Signaling Vesicles. *Immunity* (2004) 21:415–428. doi: 10.1016/j.immuni.2004.08.017

802. Lee E-W, Kim J-H, Ahn Y-H, Seo J, Ko A, Jeong M, Kim S-J, Ro JY, Park K-M, Lee H-W, et al. Ubiquitination and degradation of the FADD adaptor protein regulate death receptor-mediated apoptosis and necroptosis. *Nat Commun* (2012) 3:978. doi: 10.1038/ncomms1981
803. Passos ST, Silver JS, O'Hara AC, Sehy D, Stumhofer JS, Hunter CA. IL-6 promotes NK cell production of IL-17 during toxoplasmosis. *J Immunol* (2010) 184:1776–1783. doi: 10.4049/jimmunol.0901843
804. Perona-Wright G, Mohrs K, Szaba FM, Kummer LW, Madan R, Karp CL, Johnson LL, Smiley ST, Mohrs M. Systemic but not local infections elicit immunosuppressive IL-10 production by Natural Killer cells. *Cell Host Microbe* (2009) 6:503–512. doi: 10.1016/j.chom.2009.11.003
805. Mocikat R, Braumüller H, Gumy A, Egeter O, Ziegler H, Reusch U, Bubeck A, Louis J, Mailhammer R, Riethmüller G, et al. Natural Killer Cells Activated by MHC Class II Low Targets Prime Dendritic Cells to Induce Protective CD8 T Cell Responses. *Immunity* (2003) 19:561–569. doi: 10.1016/S1074-7613(03)00264-4
806. Piccioli D, Sbrana S, Melandri E, Valiante NM. Contact-dependent Stimulation and Inhibition of Dendritic Cells by Natural Killer Cells. *J Exp Med* (2002) 195:335–341. doi: 10.1084/jem.20010934
807. Adam C, King S, Allgeier T, Braumüller H, Lüking C, Mysliwietz J, Kriegeskorte A, Busch DH, Röcken M, Mocikat R. DC-NK cell cross talk as a novel CD4+ T-cell-independent pathway for antitumor CTL induction. *Blood* (2005) 106:338–344. doi: 10.1182/blood-2004-09-3775
808. Mantovani A, Sica A, Sozzani S, Allavena P, Vecchi A, Locati M. The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization. *Trends in Immunology* (2004) 25:677–686. doi: 10.1016/j.it.2004.09.015
809. Fauriat C, Long EO, Ljunggren H-G, Bryceson YT. Regulation of human NK-cell cytokine and chemokine production by target cell recognition. *Blood* (2010) 115:2167–2176. doi: 10.1182/blood-2009-08-238469
810. Robertson MJ. Role of chemokines in the biology of natural killer cells. *Journal of Leukocyte Biology* (2002) 71:173–183. doi: 10.1189/jlb.71.2.173
811. Borg C, Jalil A, Laderach D, Maruyama K, Wakasugi H, Charrier S, Ryffel B, Cambi A, Figdor C, Vainchenker W, et al. NK cell activation by dendritic cells (DCs) requires the formation of a synapse leading to IL-12 polarization in DCs. *Blood* (2004) 104:3267–3275. doi: 10.1182/blood-2004-01-0380
812. Pallandre JR, Krzewski K, Bedel R, Ryffel B, Caignard A, Rohrlich PS, Pivot X, Tiberghien P, Zitvogel L, Strominger JL, et al. Dendritic cell and natural killer cell cross-talk: a pivotal role of CX3CL1 in NK cytoskeleton organization and activation. *Blood* (2008) 112:4420–4424. doi: 10.1182/blood-2007-12-126888
813. Pende D, Castriconi R, Romagnani P, Spaggiari GM, Marcenaro S, Dondero A, Lazzeri E, Lasagni L, Martini S, Rivera P, et al. Expression of the DNAM-1 ligands, Nectin-2 (CD112) and poliovirus receptor (CD155), on dendritic cells: relevance for natural killer-

- dendritic cell interaction. *Blood* (2006) 107:2030–2036. doi: 10.1182/blood-2005-07-2696
814. Spaggiari GM, Carosio R, Pende D, Marcenaro S, Rivera P, Zocchi MR, Moretta L, Poggi A. NK cell-mediated lysis of autologous antigen-presenting cells is triggered by the engagement of the phosphatidylinositol 3-kinase upon ligation of the natural cytotoxicity receptors NKp30 and NKp46. *European Journal of Immunology* (2001) 31:1656–1665. doi: 10.1002/1521-4141(200106)31:6<1656::AID-IMMU1656>3.0.CO;2-V
815. Ferlazzo G, Tsang ML, Moretta L, Melioli G, Steinman RM, Münz C. Human Dendritic Cells Activate Resting Natural Killer (NK) Cells and Are Recognized via the NKp30 Receptor by Activated NK Cells. *J Exp Med* (2002) 195:343–351. doi: 10.1084/jem.20011149
816. Chiesa MD, Vitale M, Carlomagno S, Ferlazzo G, Moretta L, Moretta A. The natural killer cell-mediated killing of autologous dendritic cells is confined to a cell subset expressing CD94/NKG2A, but lacking inhibitory killer Ig-like receptors. *European Journal of Immunology* (2003) 33:1657–1666. doi: 10.1002/eji.200323986
817. Mailliard RB, Son Y-I, Redlinger R, Coates PT, Giermasz A, Morel PA, Storkus WJ, Kalinski P. Dendritic Cells Mediate NK Cell Help for Th1 and CTL Responses: Two-Signal Requirement for the Induction of NK Cell Helper Function. *The Journal of Immunology* (2003) 171:2366–2373. doi: 10.4049/jimmunol.171.5.2366
818. Tosi D, Valenti R, Cova A, Sovena G, Huber V, Pilla L, Arienti F, Belardelli F, Parmiani G, Rivoltini L. Role of Cross-Talk between IFN- $\alpha$ -Induced Monocyte-Derived Dendritic Cells and NK Cells in Priming CD8+ T Cell Responses against Human Tumor Antigens. *The Journal of Immunology* (2004) 172:5363–5370. doi: 10.4049/jimmunol.172.9.5363
819. Biron CA, Nguyen KB, Pien GC, Cousens LP, Salazar-Mather TP. Natural killer cells in antiviral defense: function and regulation by innate cytokines. *Annu Rev Immunol* (1999) 17:189–220. doi: 10.1146/annurev.immunol.17.1.189
820. Biron CA, Byron KS, Sullivan JL. Severe Herpesvirus Infections in an Adolescent without Natural Killer Cells. <http://dx.doi.org.proxy.insermbiblio.inist.fr/101056/NEJM198906293202605> (2010) doi: 10.1056/NEJM198906293202605
821. Orange JS. Human natural killer cell deficiencies and susceptibility to infection. *Microbes and Infection* (2002) 4:1545–1558. doi: 10.1016/S1286-4579(02)00038-2
822. Orange JS. Human natural killer cell deficiencies. *Current Opinion in Allergy and Clinical Immunology* (2006) 6:399–409. doi: 10.1097/ACI.0b013e3280106b65
823. Gumá M, Angulo A, Vilches C, Gómez-Lozano N, Malats N, López-Botet M. Imprint of human cytomegalovirus infection on the NK cell receptor repertoire. *Blood* (2004) 104:3664–3671. doi: 10.1182/blood-2004-05-2058
824. Gumá M, Budt M, Sáez A, Brckalo T, Hengel H, Angulo A, López-Botet M. Expansion of CD94/NKG2C+ NK cells in response to human cytomegalovirus-infected fibroblasts. *Blood* (2006) 107:3624–3631. doi: 10.1182/blood-2005-09-3682

825. Lopez-Vergès S, Milush JM, Schwartz BS, Pando MJ, Jarjoura J, York VA, Houchins JP, Miller S, Kang S-M, Norris PJ, et al. Expansion of a unique CD57+NKG2Chi natural killer cell subset during acute human cytomegalovirus infection. *Proc Natl Acad Sci U S A* (2011) 108:14725–14732. doi: 10.1073/pnas.1110900108
826. Béziat V, Dalgard O, Asselah T, Halfon P, Bedossa P, Boudifa A, Hervier B, Theodorou I, Martinot M, Debré P, et al. CMV drives clonal expansion of NKG2C+ NK cells expressing self-specific KIRs in chronic hepatitis patients. *European Journal of Immunology* (2012) 42:447–457. doi: 10.1002/eji.201141826
827. Williams H, McAulay K, Macsween KF, Gallacher NJ, Higgins CD, Harrison N, Swerdlow AJ, Crawford DH. The immune response to primary EBV infection: a role for natural killer cells. *British Journal of Haematology* (2005) 129:266–274. doi: 10.1111/j.1365-2141.2005.05452.x
828. Pappworth IY, Wang EC, Rowe M. The Switch from Latent to Productive Infection in Epstein-Barr Virus-Infected B Cells Is Associated with Sensitization to NK Cell Killing. *J Virol* (2007) 81:474–482. doi: 10.1128/JVI.01777-06
829. Liu B, Mori I, Hossain MJ, Dong L, Takeda K, Kimura Y 2004. Interleukin-18 improves the early defence system against influenza virus infection by augmenting natural killer cell-mediated cytotoxicity. *Journal of General Virology* 85:423–428. doi: 10.1099/vir.0.19596-0
830. Vieillard V, Strominger JL, Debré P. NK cytotoxicity against CD4+ T cells during HIV-1 infection: A gp41 peptide induces the expression of an NKp44 ligand. *Proc Natl Acad Sci U S A* (2005) 102:10981–10986. doi: 10.1073/pnas.0504315102
831. Strunz B, Hengst J, Deterding K, Manns MP, Cornberg M, Ljunggren H-G, Wedemeyer H, Björkström NK. Chronic hepatitis C virus infection irreversibly impacts human natural killer cell repertoire diversity. *Nat Commun* (2018) 9:2275. doi: 10.1038/s41467-018-04685-9
832. Strunz B, Hengst J, Wedemeyer H, Björkström NK. Irreversible impact of chronic hepatitis C virus infection on human natural killer cell diversity. *Cell Stress* 2:216–218. doi: 10.15698/cst2018.07.150
833. Golden-Mason L, Cox AL, Randall JA, Cheng L, Rosen HR. Increased NK cytotoxicity and NKp30 expression protects against HCV infection in high-risk individuals and inhibits replication in vitro. *Hepatology* (2010) 52:1581–1589. doi: 10.1002/hep.23896
834. Andoniou CE, Andrews DM, Degli-Esposti MA. Natural killer cells in viral infection: more than just killers. *Immunological Reviews* (2006) 214:239–250. doi: 10.1111/j.1600-065X.2006.00465.x
835. Owen RE, Yamada E, Thompson CI, Phillipson LJ, Thompson C, Taylor E, Zambon M, Osborn HMI, Barclay WS, Borrow P. Alterations in Receptor Binding Properties of Recent Human Influenza H3N2 Viruses Are Associated with Reduced Natural Killer Cell Lysis of Infected Cells. *J Virol* (2007) 81:11170–11178. doi: 10.1128/JVI.01217-07
836. Cheent K, Khakoo SI. Natural killer cells and hepatitis C: action and reaction. *Gut* (2011) 60:268–278. doi: 10.1136/gut.2010.212555



837. Doherty DG, O'Farrelly C. Innate and adaptive lymphoid cells in the human liver. *Immunol Rev* (2000) 174:5–20. doi: 10.1034/j.1600-0528.2002.017416.x
838. De Maria A, Fogli M, Costa P, Murdaca G, Puppo F, Mavilio D, Moretta A, Moretta L. The impaired NK cell cytolytic function in viremic HIV-1 infection is associated with a reduced surface expression of natural cytotoxicity receptors (NKp46, NKp30 and NKp44). *European Journal of Immunology* (2003) 33:2410–2418. doi: 10.1002/eji.200324141
839. Ramsuran V, Naranbhai V, Horowitz A, Qi Y, Martin MP, Yuki Y, Gao X, Walker-Sperling V, Del Prete GQ, Schneider DK, et al. Elevated HLA-A expression impairs HIV control through inhibition of NKG2A-expressing cells. *Science* (2018) 359:86–90. doi: 10.1126/science.aam8825
840. Jonjic S, Babic M, Polic B, Krmpotic A. Immune evasion of natural killer cells by viruses. *Curr Opin Immunol* (2008) 20:30–38. doi: 10.1016/j.coi.2007.11.002
841. O'Leary JG, Goodarzi M, Drayton DL, von Andrian UH. T cell- and B cell-independent adaptive immunity mediated by natural killer cells. *Nat Immunol* (2006) 7:507–516. doi: 10.1038/ni1332
842. Paust S, Senman B, von Andrian UH. Adaptive Immune Responses Mediated by Natural Killer Cells. *Immunol Rev* (2010) 235:286–296. doi: 10.1111/j.0105-2896.2010.00906.x
843. Paust S, Gill HS, Wang B-Z, Flynn MP, Moseman EA, Senman B, Szczepanik M, Telenti A, Askenase PW, Compans RW, et al. Critical role for CXCR6 in NK cell-mediated antigen-specific memory to haptens and viruses. *Nat Immunol* (2010) 11:1127–1135. doi: 10.1038/ni.1953
844. Kujur W, Murillo O, Adduri RSR, Vankayalapati R, Konduru NV, Mulik S. Memory like NK cells display stem cell like properties after Zika virus infection. *PLoS Pathog* (2020) 16: doi: 10.1371/journal.ppat.1009132
845. Beaulieu AM. Memory responses by natural killer cells. *Journal of Leukocyte Biology* (2018) 104:1087–1096. doi: 10.1002/JLB.1RI0917-366R
846. Cooper MA, Yokoyama WM. Memory-like Responses of Natural Killer Cells. *Immunol Rev* (2010) 235:297–305. doi: 10.1111/j.0105-2896.2010.00891.x
847. Geary CD, Sun JC. Memory responses of natural killer cells. *Semin Immunol* (2017) 31:11–19. doi: 10.1016/j.smim.2017.08.012
848. Cerwenka A, Lanier LL. Natural killer cell memory in infection, inflammation and cancer. *Nature reviews Immunology* (2016) 16:112–123. doi: 10.1038/nri.2015.9
849. Berrien-Elliott MM, Wagner JA, Fehniger TA. Human Cytokine-Induced Memory-Like Natural Killer Cells. *J Innate Immun* (2015) 7:563–571. doi: 10.1159/000382019
850. Cooper MA, Elliott JM, Keyel PA, Yang L, Carrero JA, Yokoyama WM. Cytokine-induced memory-like natural killer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* (2009) 106:1915–1919. doi: 10.1073/pnas.0813192106

851. Romee R, Schneider SE, Leong JW, Chase JM, Keppel CR, Sullivan RP, Cooper MA, Fehniger TA. Cytokine activation induces human memory-like NK cells. *Blood* (2012) 120:4751–4760. doi: 10.1182/blood-2012-04-419283
852. Ni J, Miller M, Stojanovic A, Garbi N, Cerwenka A. Sustained effector function of IL-12/15/18–preactivated NK cells against established tumors. *J Exp Med* (2012) 209:2351–2365. doi: 10.1084/jem.20120944
853. Boieri M, Ulvmoen A, Sudworth A, Lendrem C, Collin M, Dickinson AM, Kveberg L, Inngjerdigen M. IL-12, IL-15, and IL-18 pre-activated NK cells target resistant T cell acute lymphoblastic leukemia and delay leukemia development in vivo. *Oncimmunology* (2017) 6:e1274478. doi: 10.1080/2162402X.2016.1274478
854. Romee R, Rosario M, Berrien-Elliott MM, Wagner JA, Jewell BA, Schappe T, Leong JW, Abdel-Latif S, Schneider SE, Willey S, et al. Cytokine-induced memory-like natural killer cells exhibit enhanced responses against myeloid leukemia. *Sci Transl Med* (2016) 8:357ra123. doi: 10.1126/scitranslmed.aaf2341
855. Pahl JHW, Koch J, Götz J-J, Arnold A, Reusch U, Gantke T, Rajkovic E, Treder M, Cerwenka A. CD16A Activation of NK Cells Promotes NK Cell Proliferation and Memory-Like Cytotoxicity against Cancer Cells. *Cancer Immunol Res* (2018) 6:517–527. doi: 10.1158/2326-6066.CIR-17-0550
856. Ewen E-M, Pahl JHW, Miller M, Watzl C, Cerwenka A. KIR downregulation by IL-12/15/18 unleashes human NK cells from KIR/HLA-I inhibition and enhances killing of tumor cells. *European Journal of Immunology* (2018) 48:355–365. doi: 10.1002/eji.201747128
857. Bulmer JN, Morrison L, Longfellow M, Ritson A, Pace D. Granulated lymphocytes in human endometrium: histochemical and immunohistochemical studies. *Human Reproduction* (1991) 6:791–798. doi: 10.1093/oxfordjournals.humrep.a137430
858. Huang Y, Zhu X-Y, Du M-R, Li D-J. Human Trophoblasts Recruited T Lymphocytes and Monocytes into Decidua by Secretion of Chemokine CXCL16 and Interaction with CXCR6 in the First-Trimester Pregnancy. *The Journal of Immunology* (2008) 180:2367–2375. doi: 10.4049/jimmunol.180.4.2367
859. Lu H, Jin L-P, Huang H-L, Ha S-Y, Yang H-L, Chang R-Q, Li D-J, Li M-Q. Trophoblast-derived CXCL12 promotes CD56brightCD82–CD29+ NK cell enrichment in the decidua. *American Journal of Reproductive Immunology* (2020) 83: doi: 10.1111/aji.13203
860. Hanna J, Wald O, Goldman-Wohl D, Prus D, Markel G, Gazit R, Katz G, Haimov-Kochman R, Fujii N, Yagel S, et al. CXCL12 expression by invasive trophoblasts induces the specific migration of CD16– human natural killer cells. *Blood* (2003) 102:1569–1577. doi: 10.1182/blood-2003-02-0517
861. Kunkel EJ, Butcher EC. Chemokines and the Tissue-Specific Migration of Lymphocytes. *Immunity* (2002) 16:1–4. doi: 10.1016/S1074-7613(01)00261-8
862. Santoni A, Carlino C, Stabile H, Gismondi A. REVIEW ARTICLE: Mechanisms Underlying Recruitment and Accumulation of Decidual NK Cells in Uterus During

- Pregnancy. *American Journal of Reproductive Immunology* (2008) 59:417–424. doi: 10.1111/j.1600-0897.2008.00598.x
863. King A, Balendran N, Wooding P, Carter NP, Loke YW. CD3- Leukocytes Present in the Human Uterus During Early Placentation: Phenotypic and Morphologic Characterization of the CD56++ Population. *Dev Immunol* (1991) 1:169–190. doi: 10.1155/1991/83493
864. Doisne J-M, Balmas E, Boulenouar S, Gaynor LM, Kieckbusch J, Gardner L, Hawkes DA, Barbara CF, Sharkey AM, Brady HJM, et al. Composition, Development, and Function of Uterine Innate Lymphoid Cells. *J Immunol* (2015) 195:3937–3945. doi: 10.4049/jimmunol.1500689
865. Vacca P, Montaldo E, Croxatto D, Loiacono F, Canegallo F, Venturini PL, Moretta L, Mingari MC. Identification of diverse innate lymphoid cells in human decidua. *Mucosal Immunol* (2015) 8:254–264. doi: 10.1038/mi.2014.63
866. Gibbs A, Leeansyah E, Introini A, Paquin-Proulx D, Hasselrot K, Andersson E, Broliden K, Sandberg JK, Tjernlund A. MAIT cells reside in the female genital mucosa and are biased towards IL-17 and IL-22 production in response to bacterial stimulation. *Mucosal Immunol* (2017) 10:35–45. doi: 10.1038/mi.2016.30
867. Bulmer JN, Longfellow M, Ritson A. Leukocytes and Resident Blood Cells in Endometrium. *Annals of the New York Academy of Sciences* (1991) 622:57–68. doi: <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1991.tb37850.x>
868. Gardner L, Moffett A. Dendritic cells in the human decidua. *Biol Reprod* (2003) 69:1438–1446. doi: 10.1095/biolreprod.103.017574
869. HEIKKINEN J, MÖTTÖNEN M, ALANEN A, LASSILA O. Phenotypic characterization of regulatory T cells in the human decidua. *Clin Exp Immunol* (2004) 136:373–378. doi: 10.1111/j.1365-2249.2004.02441.x
870. Bulmer JN, Pace D, Ritson A. Immunoregulatory cells in human decidua: morphology, immunohistochemistry and function. *Reprod Nutr Dev* (1988) 28:1599–1613. doi: 10.1051/rnd:19881006
871. Vacca P, Moretta L, Moretta A, Mingari MC. Origin, phenotype and function of human natural killer cells in pregnancy. *Trends in Immunology* (2011) 32:517–523. doi: 10.1016/j.it.2011.06.013
872. Vacca P, Vitale C, Montaldo E, Conte R, Cantoni C, Fulcheri E, Darretta V, Moretta L, Mingari MC. 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) 108:2402–2407. doi: 10.1073/pnas.1016257108
873. Male V, Hughes T, McClory S, Colucci F, Caligiuri MA, Moffett A. Immature NK cells, capable of producing interleukin-22, are present in human uterine mucosa. *J Immunol* (2010) 185:3913–3918. doi: 10.4049/jimmunol.1001637
874. Keskin DB, Allan DSJ, Rybalov B, Andzelm MM, Stern JNH, Kopcow HD, Koopman LA, Strominger JL. TGF $\beta$  promotes conversion of CD16+ peripheral blood NK cells into

- CD16<sup>+</sup> NK cells with similarities to decidual NK cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* (2007) 104:3378–3383. doi: 10.1073/pnas.0611098104
875. Allan DSJ, Rybalov B, Awong G, Zúñiga-Pflücker JC, Kopcow HD, Carlyle JR, Strominger JL. TGF- $\beta$  affects development and differentiation of human natural killer cell subsets. *Eur J Immunol* (2010) 40:2289–2295. doi: 10.1002/eji.200939910
876. Cerdeira AS, Rajakumar A, Royle CM, Lo A, Husain Z, Thadhani RI, Sukhatme VP, Karumanchi SA, Kopcow HD. Conversion of peripheral blood NK cells to a decidual NK-like phenotype by a cocktail of defined factors. *J Immunol* (2013) 190:3939–3948. doi: 10.4049/jimmunol.1202582
877. Siewiera J, Gouilly J, Hocine H-R, Cartron G, Levy C, Al-Daccak R, Jabrane-Ferrat N. Natural cytotoxicity receptor splice variants orchestrate the distinct functions of human natural killer cell subtypes. *Nat Commun* (2015) 6:10183. doi: 10.1038/ncomms10183
878. Zhou Y, Fu B, Xu X, Zhang J, Tong X, Wang Y, Dong Z, Zhang X, Shen N, Zhai Y, et al. PBX1 expression in uterine natural killer cells drives fetal growth. *Science Translational Medicine* (2020) 12:eaax1798. doi: 10.1126/scitranslmed.aax1798
879. Li H, Hou Y, Zhang S, Zhou Y, Wang D, Tao S, Ni F. CD49a regulates the function of human decidual natural killer cells. *American Journal of Reproductive Immunology* (2019) 81:e13101. doi: 10.1111/aji.13101
880. Koopman LA, Kopcow HD, Rybalov B, Boyson JE, Orange JS, Schatz F, Masch R, Lockwood CJ, Schachter AD, Park PJ, et al. Human decidual natural killer cells are a unique NK cell subset with immunomodulatory potential. *J Exp Med* (2003) 198:1201–1212. doi: 10.1084/jem.20030305
881. Costa HE, Casemayou A, Aguerre-Girr M, Rabot M, Berrebi A, Parant O, Clouet-Delannoy M, Lombardelli L, Jabrane-Ferrat N, Rukavina D, et al. Critical and Differential Roles of NKp46- and NKp30-Activating Receptors Expressed by Uterine NK Cells in Early Pregnancy. *The Journal of Immunology* (2008) 181:3009–3017. doi: 10.4049/jimmunol.181.5.3009
882. Lockwood CJ, Huang SJ, Chen C-P, Huang Y, Xu J, Faramarzi S, Kayisli O, Kayisli U, Koopman L, Smedts D, et al. Decidual Cell Regulation of Natural Killer Cell–Recruiting Chemokines. *Am J Pathol* (2013) 183:841–856. doi: 10.1016/j.ajpath.2013.05.029
883. Vento-Tormo R, Efremova M, Botting RA, Turco MY, Vento-Tormo M, Meyer KB, Park J-E, Stephenson E, Polański K, Goncalves A, et al. Single-cell reconstruction of the early maternal–fetal interface in humans. *Nature* (2018) 563:347–353. doi: 10.1038/s41586-018-0698-6
884. Wang F, Jia W, Fan M, Shao X, Li Z, Liu Y, Ma Y, Li Y-X, Li R, Tu Q, et al. Single-cell Immune Landscape of Human Recurrent Miscarriage. *Genomics, Proteomics & Bioinformatics* (2021) doi: 10.1016/j.gpb.2020.11.002
885. Siewiera J, El Costa H, Tabiasco J, Berrebi A, Cartron G, Le Bouteiller P, Bouteiller P, Jabrane-Ferrat N. Human cytomegalovirus infection elicits new decidual natural killer cell effector functions. *PLoS Pathog* (2013) 9:e1003257. doi: 10.1371/journal.ppat.1003257

886. Apps R, Murphy SP, Fernando R, Gardner L, Ahad T, Moffett A. Human leucocyte antigen (HLA) expression of primary trophoblast cells and placental cell lines, determined using single antigen beads to characterize allotype specificities of anti-HLA antibodies. *Immunology* (2009) 127:26–39. doi: 10.1111/j.1365-2567.2008.03019.x
887. King A, Hiby S e., Verma S, Burrows T, Gardner L, Loke YW. Uterine NK Cells and Trophoblast HLA Class I Molecules. *American Journal of Reproductive Immunology* (1997) 37:459–462. doi: 10.1111/j.1600-0897.1997.tb00260.x
888. Moffett A, Colucci F. Uterine NK cells: active regulators at the maternal-fetal interface. *J Clin Invest* (2014) 124:1872–1879. doi: 10.1172/JCI68107
889. Helige C, Ahammer H, Moser G, Hammer A, Dohr G, Huppertz B, Sedlmayr P. Distribution of decidual natural killer cells and macrophages in the neighbourhood of the trophoblast invasion front: a quantitative evaluation. *Human Reproduction* (2014) 29:8–17. doi: 10.1093/humrep/det353
890. Smith SD, Dunk CE, Aplin JD, Harris LK, Jones RL. Evidence for Immune Cell Involvement in Decidual Spiral Arteriole Remodeling in Early Human Pregnancy. *Am J Pathol* (2009) 174:1959–1971. doi: 10.2353/ajpath.2009.080995
891. Tilburgs T, Crespo ÂC, van der Zwan A, Rybalov B, Raj T, Stranger B, Gardner L, Moffett A, Strominger JL. Human HLA-G<sup>+</sup> extravillous trophoblasts: Immune-activating cells that interact with decidual leukocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* (2015) 112:7219–7224. doi: 10.1073/pnas.1507977112
892. Wallace AE, Whitley GS, Thilaganathan B, Cartwright JE. Decidual natural killer cell receptor expression is altered in pregnancies with impaired vascular remodeling and a higher risk of pre-eclampsia. *J Leukoc Biol* (2015) 97:79–86. doi: 10.1189/jlb.2A0614-282R
893. Moffett A, Shreeve N. First do no harm: uterine natural killer (NK) cells in assisted reproduction. *Hum Reprod* (2015) 30:1519–1525. doi: 10.1093/humrep/dev098
894. Wallace AE, Fraser R, Cartwright JE. Extravillous trophoblast and decidual natural killer cells: a remodelling partnership. *Hum Reprod Update* (2012) 18:458–471. doi: 10.1093/humupd/dms015
895. Jones RL, Stoikos C, Findlay JK, Salamonsen LA. TGF- $\beta$  superfamily expression and actions in the endometrium and placenta. *Reproduction* (2006) 132:217–232. doi: 10.1530/rep.1.01076
896. Lockwood CJ, Basar M, Kayisli UA, Guzeloglu-Kayisli O, Murk W, Wang J, De Paz N, Shapiro JP, Masch RJ, Semerci N, et al. Interferon- $\gamma$  Protects First-Trimester Decidual Cells against Aberrant Matrix Metalloproteinases 1, 3, and 9 Expression in Preeclampsia. *Am J Pathol* (2014) 184:2549–2559. doi: 10.1016/j.ajpath.2014.05.025
897. Otun HA, Lash GE, Innes BA, Bulmer JN, Naruse K, Hannon T, Searle RF, Robson SC. Effect of tumour necrosis factor- $\alpha$  in combination with interferon- $\gamma$  on first trimester extravillous trophoblast invasion. *Journal of Reproductive Immunology* (2011) 88:1–11. doi: 10.1016/j.jri.2010.10.003

898. Hu Y, Dutz JP, MacCalman CD, Yong P, Tan R, Dadelszen P von. Decidual NK Cells Alter In Vitro First Trimester Extravillous Cytotrophoblast Migration: A Role for IFN- $\gamma$ . *The Journal of Immunology* (2006) 177:8522–8530. doi: 10.4049/jimmunol.177.12.8522
899. Chakraborty D, Rumi MAK, Konno T, Soares MJ. Natural killer cells direct hemochorial placentation by regulating hypoxia-inducible factor dependent trophoblast lineage decisions. *Proc Natl Acad Sci U S A* (2011) 108:16295–16300. doi: 10.1073/pnas.1109478108
900. King A, Allan DS, Bowen M, Powis SJ, Joseph S, Verma S, Hiby SE, McMichael AJ, Loke YW, Braud VM. HLA-E is expressed on trophoblast and interacts with CD94/NKG2 receptors on decidual NK cells. *Eur J Immunol* (2000) 30:1623–1631. doi: 10.1002/1521-4141(200006)30:6<1623::AID-IMMU1623>3.0.CO;2-M
901. Rajagopalan S, Bryceson YT, Kuppusamy SP, Geraghty DE, van der Meer A, Joosten I, Long EO. Activation of NK Cells by an Endocytosed Receptor for Soluble HLA-G. *PLoS Biol* (2006) 4:e9. doi: 10.1371/journal.pbio.0040009
902. Hazan AD, Smith SD, Jones RL, Whittle W, Lye SJ, Dunk CE. Vascular-Leukocyte Interactions. *Am J Pathol* (2010) 177:1017–1030. doi: 10.2353/ajpath.2010.091105
903. Faas MM, de Vos P. Uterine NK cells and macrophages in pregnancy. *Placenta* (2017) 56:44–52. doi: 10.1016/j.placenta.2017.03.001
904. 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) 80:572–580. doi: 10.1189/jlb.0406250
905. Tilburgs T, Evans JH, Crespo ÂC, Strominger JL. The HLA-G cycle provides for both NK tolerance and immunity at the maternal–fetal interface. *Proc Natl Acad Sci U S A* (2015) 112:13312–13317. doi: 10.1073/pnas.1517724112
906. Saito S, Nishikawa K, Morii T, Enomoto M, Narita N, Motoyoshi K, Ichijo M. Cytokine production by CD16-CD56bright natural killer cells in the human early pregnancy decidua. *Int Immunol* (1993) 5:559–563. doi: 10.1093/intimm/5.5.559
907. Jokhi PP, King A, Loke YW. Immunology: Production of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor by human trophoblast cells and by decidual large granular lymphocytes. *Human Reproduction* (1994) 9:1660–1669. doi: 10.1093/oxfordjournals.humrep.a138769
908. Robson A, Harris LK, Innes BA, Lash GE, Aljunaidy MM, Aplin JD, Baker PN, Robson SC, Bulmer JN. Uterine natural killer cells initiate spiral artery remodeling in human pregnancy. *The FASEB Journal* (2012) 26:4876–4885. doi: 10.1096/fj.12-210310
909. Naruse K, Lash GE, Innes BA, Otun HA, Searle RF, Robson SC, Bulmer JN. Localization of matrix metalloproteinase (MMP)-2, MMP-9 and tissue inhibitors for MMPs (TIMPs) in uterine natural killer cells in early human pregnancy. *Human Reproduction* (2009) 24:553–561. doi: 10.1093/humrep/den408

910. Kopcow HD, Allan DSJ, Chen X, Rybalov B, Andzelm MM, Ge B, Strominger JL. Human decidual NK cells form immature activating synapses and are not cytotoxic. *Proc Natl Acad Sci U S A* (2005) 102:15563–15568. doi: 10.1073/pnas.0507835102
911. Vacca P, Pietra G, Falco M, Romeo E, Bottino C, Bellora F, Prefumo F, Fulcheri E, Venturini PL, Costa 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) 108:4078–4085. doi: 10.1182/blood-2006-04-017343
912. Kalkunte SS, Mselle TF, Norris WE, Wira CR, Sentman CL, Sharma S. VEGF C facilitates immune tolerance and endovascular activity of human uterine NK cells at the maternal-fetal interface. *J Immunol* (2009) 182:4085–4092. doi: 10.4049/jimmunol.0803769
913. 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) 59:425–432. doi: 10.1111/j.1600-0897.2008.00595.x
914. Hirst CE, Buzza MS, Sutton VR, Trapani JA, Loveland KL, Bird PI. 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* (2001) 7:1133–1142. doi: 10.1093/molehr/7.12.1133
915. Straszewski-Chavez SL, Abrahams VM, Funai EF, Mor G. X-linked inhibitor of apoptosis (XIAP) confers human trophoblast cell resistance to Fas-mediated apoptosis. *Molecular Human Reproduction* (2004) 10:33–41. doi: 10.1093/molehr/gah001
916. Gamliel M, Goldman-Wohl D, Isaacson B, Gur C, Stein N, Yamin R, Berger M, Grunewald M, Keshet E, Rais Y, et al. Trained Memory of Human Uterine NK Cells Enhances Their Function in Subsequent Pregnancies. *Immunity* (2018) 48:951–962.e5. doi: 10.1016/j.immuni.2018.03.030
917. Eastabrook G, Hu Y, von Dadelszen P. The Role of Decidual Natural Killer Cells in Normal Placentation and in the Pathogenesis of Preeclampsia. *Journal of Obstetrics and Gynaecology Canada* (2008) 30:467–476. doi: 10.1016/S1701-2163(16)32862-6
918. Liu F, Guo J, Tian T, Wang H, Dong F, Huang H, Dong M. Placental trophoblasts shifted Th1/Th2 balance toward Th2 and inhibited Th17 immunity at fetomaternal interface. *APMIS* (2011) 119:597–604. doi: 10.1111/j.1600-0463.2011.02774.x
919. Thum MY, Bhaskaran S, Abdalla HI, Ford B, Sumar N, Shehata H, Bansal AS. An increase in the absolute count of CD56dimCD16+CD69+ NK cells in the peripheral blood is associated with a poorer IVF treatment and pregnancy outcome. *Hum Reprod* (2004) 19:2395–2400. doi: 10.1093/humrep/deh378
920. Santillán I, Lozano I, Illán J, Verdú V, Coca S, Bajo-Arenas JM, Martínez F. Where and when should natural killer cells be tested in women with repeated implantation failure? *Journal of Reproductive Immunology* (2015) 108:142–148. doi: 10.1016/j.jri.2014.12.009
921. Babayeva G, Purut YE, Giray B, Oltulu P, Alakuş R, Çolakoğlu MC. Endometrial CD56+ natural killer cells in women with recurrent implantation failure: An

- immunohistochemical study. *Turk J Obstet Gynecol* (2020) 17:236–239. doi: 10.4274/tjod.galenos.2020.90359
922. Lédée N, Petitbarat M, Rahmati M, Dubanchet S, Chaouat G, Sandra O, Perrier-d'Hauterive S, Munaut C, Foidart JM. New pre-conception immune biomarkers for clinical practice: interleukin-18, interleukin-15 and TWEAK on the endometrial side, G-CSF on the follicular side. *Journal of Reproductive Immunology* (2011) 88:118–123. doi: 10.1016/j.jri.2011.01.007
923. Lédée-Bataille N, Bonnet-Chea K, Hosny G, Dubanchet S, Frydman R, Chaouat G. Role of the endometrial tripod interleukin-18, -15, and -12 in inadequate uterine receptivity in patients with a history of repeated in vitro fertilization–embryo transfer failure. *Fertility and Sterility* (2005) 83:598–605. doi: 10.1016/j.fertnstert.2004.11.021
924. Quenby S, Nik H, Innes B, Lash G, Turner M, Drury J, Bulmer J. Uterine natural killer cells and angiogenesis in recurrent reproductive failure. *Human Reproduction* (2009) 24:45–54. doi: 10.1093/humrep/den348
925. Tuckerman E, Mariee N, Prakash A, Li TC, Laird S. Uterine natural killer cells in peri-implantation endometrium from women with repeated implantation failure after IVF. *Journal of Reproductive Immunology* (2010) 87:60–66. doi: 10.1016/j.jri.2010.07.001
926. Faridi RM, Das V, Tripathi G, Talwar S, Parveen F, Agrawal S. Influence of activating and inhibitory killer immunoglobulin-like receptors on predisposition to recurrent miscarriages. *Human Reproduction* (2009) 24:1758–1764. doi: 10.1093/humrep/dep047
927. Moffett A, Hiby S. Influence of activating and inhibitory killer immunoglobulin-like receptors on predisposition to recurrent miscarriages. *Hum Reprod* (2009) 24:2048–2049. doi: 10.1093/humrep/dep216
928. Cheng S-B, Sharma S. Interleukin-10: A Pleiotropic Regulator in Pregnancy. *Am J Reprod Immunol* (2015) 73:487–500. doi: 10.1111/aji.12329
929. Stallmach T, Hebisch G, Orban P, Lü X. Aberrant positioning of trophoblast and lymphocytes in the fetomaternal interface with pre-eclampsia. *Virchows Archiv* (1999) 434:207–211. doi: 10.1007/s004280050329
930. Bachmayer N, Rafik Hamad R, Liszka L, Bremme K, Sverremark-Ekström E. Aberrant Uterine Natural Killer (NK)-Cell Expression and Altered Placental and Serum Levels of the NK-Cell Promoting Cytokine Interleukin-12 in Pre-Eclampsia. *American Journal of Reproductive Immunology* (2006) 56:292–301. doi: 10.1111/j.1600-0897.2006.00429.x
931. Williams PJ, Bulmer JN, Searle RF, Innes BA, Robson SC. Altered decidual leucocyte populations in the placental bed in pre-eclampsia and foetal growth restriction: a comparison with late normal pregnancy. *Reproduction* (2009) 138:177–184. doi: 10.1530/REP-09-0007
932. Rieger L, Segerer S, Bernar T, Kapp M, Majic M, Morr A-K, Dietl J, Kämmerer U. Specific subsets of immune cells in human decidua differ between normal pregnancy and preeclampsia - a prospective observational study. *Reprod Biol Endocrinol* (2009) 7:132. doi: 10.1186/1477-7827-7-132



933. Milosevic-Stevanovic J, Krstic M, Radovic-Janosevic D, Popovic J, Tasic M, Stojnev S. Number of decidual natural killer cells & macrophages in pre-eclampsia. *Indian J Med Res* (2016) 144:823–830. doi: 10.4103/ijmr.IJMR\_776\_15
934. Sones JL, Lob HE, Isroff CE, Davisson RL. Role of decidual natural killer cells, interleukin-15, and interferon- $\gamma$  in placental development and preeclampsia. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* (2014) 307:R490–R492. doi: 10.1152/ajpregu.00176.2014
935. Olusi SO, Diejomaoh M, Omu A, Abdulaziz A, Prabha K, George S. Interleukins in Preeclampsia. *Annals of Saudi Medicine* (2000) 20:4–7. doi: 10.5144/0256-4947.2000.4
936. Agra IKR, Liao AW, Hoshida MS, Schultz R, Toscano MP, Francisco RPV, Zugaib M, Brizot ML. Expression of dNK cells and their cytokines in twin pregnancies with preeclampsia. *Clinics (Sao Paulo)* (2019) 74:e1200. doi: 10.6061/clinics/2019/e1200
937. Murphy SP, Tayade C, Ashkar AA, Hatta K, Zhang J, Croy BA. Interferon Gamma in Successful Pregnancies. *Biol Reprod* (2009) 80:848–859. doi: 10.1095/biolreprod.108.073353
938. Zhang J, Dunk CE, Shynlova O, Caniggia I, Lye SJ. TGF $\beta$ 1 suppresses the activation of distinct dNK subpopulations in preeclampsia. *EBioMedicine* (2018) 39:531–539. doi: 10.1016/j.ebiom.2018.12.015
939. Laban M, Ibrahim EA-S, Elsafty MSE, Hassanin AS. Placenta accreta is associated with decreased decidual natural killer (dNK) cells population: a comparative pilot study. *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology* (2014) 181:284–288. doi: 10.1016/j.ejogrb.2014.08.015
940. Wegmann TG, Lin H, Guilbert L, Mosmann TR. Bidirectional cytokine interactions in the maternal-fetal relationship: is successful pregnancy a TH2 phenomenon? *Immunology Today* (1993) 14:353–356. doi: 10.1016/0167-5699(93)90235-D
941. Chaouat G, Lédée-Bataille N, Zourbas S, Ostojic S, Dubanchet S, Martal J, Frydman R. Cytokines, implantation and early abortion: re-examining the Th1/Th2 paradigm leads to question the single pathway, single therapy concept. *American Journal of Reproductive Immunology* (2003) 50:177–186. doi: 10.1034/j.1600-0897.2003.00080.x
942. Chaouat G, Ledee-Bataille N, Dubanchet S, Zourbas S, Sandra O, Martal J. Reproductive immunology 2003: reassessing the Th1/Th2 paradigm? *Immunology Letters* (2004) 92:207–214. doi: 10.1016/j.imlet.2004.01.011
943. King K, Smith S, Chapman M, Sacks G. Detailed analysis of peripheral blood natural killer (NK) cells in women with recurrent miscarriage. *Human Reproduction* (2010) 25:52–58. doi: 10.1093/humrep/dep349
944. Giuliani E, Parkin KL, Lessey BA, Young SL, Fazleabas AT. CHARACTERIZATION OF UTERINE NK CELLS IN WOMEN WITH INFERTILITY OR RECURRENT PREGNANCY LOSS AND ASSOCIATED ENDOMETRIOSIS. *Am J Reprod Immunol* (2014) 72:262–269. doi: 10.1111/aji.12259

945. Kuon R-J, Weber M, Heger J, Santillán I, Vomstein K, Bär C, Strowitzki T, Markert UR, Toth B. Uterine natural killer cells in patients with idiopathic recurrent miscarriage. *American Journal of Reproductive Immunology* (2017) 78:e12721. doi: 10.1111/aji.12721
946. Kuon RJ, Vomstein K, Weber M, Müller F, Seitz C, Wallwiener S, Strowitzki T, Schleussner E, Markert UR, Daniel V, et al. The “killer cell story” in recurrent miscarriage: Association between activated peripheral lymphocytes and uterine natural killer cells. *Journal of Reproductive Immunology* (2017) 119:9–14. doi: 10.1016/j.jri.2016.11.002
947. El-Azzamy H, Dambaeva SV, Katukurundage D, Salazar Garcia MD, Skariah A, Hussein Y, Germain A, Fernandez E, Gilman-Sachs A, Beaman KD, et al. Dysregulated uterine natural killer cells and vascular remodeling in women with recurrent pregnancy losses. *American Journal of Reproductive Immunology* (2018) 80:e13024. doi: 10.1111/aji.13024
948. Lachapelle MH, Miron P, Hemmings R, Roy DC. Endometrial T, B, and NK cells in patients with recurrent spontaneous abortion. Altered profile and pregnancy outcome. *The Journal of Immunology* (1996) 156:4027–4034.
949. Plaçais L, Kolanska K, Kraiem YB, Cohen J, Suner L, Bornes M, Sedille L, Rosefort A, D’Argent EM, Selleret L, et al. Intralipid therapy for unexplained recurrent miscarriage and implantation failure: Case-series and literature review. *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology* (2020) 252:100–104. doi: 10.1016/j.ejogrb.2020.06.017
950. Mekinian A, Cohen J, Alijotas-Reig J, Carbillon L, Nicaise-Roland P, Kayem G, Daraï E, Fain O, Bornes M. Unexplained Recurrent Miscarriage and Recurrent Implantation Failure: Is There a Place for Immunomodulation? *American Journal of Reproductive Immunology* (2016) 76:8–28. doi: 10.1111/aji.12493
951. Perfetto CO, Fan X, Dahl S, Krieg S, Westphal LM, Lathi RB, Nayak NR. Expression of interleukin-22 in decidua of patients with early pregnancy and unexplained recurrent pregnancy loss. *J Assist Reprod Genet* (2015) 32:977–984. doi: 10.1007/s10815-015-0481-7
952. Kamoi M, Fukui A, Kwak-Kim J, Fuchinoue K, Funamizu A, Chiba H, Yokota M, Fukuhara R, Mizunuma H. NK22 Cells in the Uterine Mid-Secretory Endometrium and Peripheral Blood of Women with Recurrent Pregnancy Loss and Unexplained Infertility. *American Journal of Reproductive Immunology* (2015) 73:557–567. doi: 10.1111/aji.12356
953. Lash GE, Ernerudh J. Decidual cytokines and pregnancy complications: focus on spontaneous miscarriage. *Journal of Reproductive Immunology* (2015) 108:83–89. doi: 10.1016/j.jri.2015.02.003
954. Eide IP, Rolfseng T, Isaksen CV, Mecsei R, Roald B, Lydersen S, Salvesen KÅ, Harsem NK, Austgulen R. Serious foetal growth restriction is associated with reduced proportions of natural killer cells in decidua basalis. *Virchows Arch* (2006) 448:269–276. doi: 10.1007/s00428-005-0107-z
955. Mayhew TM, Ohadike C, Baker PN, Crocker IP, Mitchell C, Ong SS. Stereological Investigation of Placental Morphology in Pregnancies Complicated by Pre-eclampsia with

- and without Intrauterine Growth Restriction. *Placenta* (2003) 24:219–226. doi: 10.1053/plac.2002.0900
956. Gerretsen G, Huisjes HJ, Elema JD. Morphological changes of the spiral arteries in the placental bed in relation to pre-eclampsia and fetal growth retardation. *Br J Obstet Gynaecol* (1981) 88:876–881. doi: 10.1111/j.1471-0528.1981.tb02222.x
957. Wilczyński JR, Tchórzewski H, Banasik M, Głowacka E, Wieczorek A, Lewkowicz P, Malinowski A, Szpakowski M, Wilczyński J. Lymphocyte subset distribution and cytokine secretion in third trimester decidua in normal pregnancy and preeclampsia. *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology* (2003) 109:8–15. doi: 10.1016/S0301-2115(02)00350-0
958. Sen Santara S, Crespo ÂC, Mulik S, Ovies C, Boulenouar S, Strominger JL, Lieberman J. Decidual NK cells kill Zika virus–infected trophoblasts. *Proceedings of the National Academy of Sciences* (2021) 118:e2115410118. doi: 10.1073/pnas.2115410118
959. Krämer B, Körner C, Kebschull M, Glässner A, Eisenhardt M, Nischalke H-D, Alexander M, Sauerbruch T, Spengler U, Nattermann J. 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* (2012) 56:1201–1213. doi: 10.1002/hep.25804
960. Martinez Viedma M del P, Pickett BE. Characterizing the Different Effects of Zika Virus Infection in Placenta and Microglia Cells. *Viruses* (2018) 10:649. doi: 10.3390/v10110649
961. Seidel E, Glasner A, Mandelboim O. Virus-mediated inhibition of natural cytotoxicity receptor recognition. *Cell Mol Life Sci* (2012) 69:3911–3920. doi: 10.1007/s00018-012-1001-x
962. Gardiner CM. NK cell function and receptor diversity in the context of HCV infection. *Front Microbiol* (2015) 6:1061. doi: 10.3389/fmicb.2015.01061
963. Nattermann J, Nischalke HD, Hofmeister V, Kupfer B, Ahlenstiel G, Feldmann G, Rockstroh J, Weiss EH, Sauerbruch T, Spengler U. HIV-1 infection leads to increased HLA-E expression resulting in impaired function of natural killer cells. *Antivir Ther* (2005) 10:95–107.
964. Jun Y, Kim E, Jin M, Sung HC, Han H, Geraghty DE, Ahn K. Human cytomegalovirus gene products US3 and US6 down-regulate trophoblast class I MHC molecules. *J Immunol* (2000) 164:805–811. doi: 10.4049/jimmunol.164.2.805
965. Zingoni A, Molfetta R, Fionda C, Soriani A, Paolini R, Cippitelli M, Cerboni C, Santoni A. NKG2D and Its Ligands: “One for All, All for One.” *Front Immunol* (2018) 9: doi: 10.3389/fimmu.2018.00476
966. Bryceson YT, March ME, Ljunggren H-G, Long EO. Synergy among receptors on resting NK cells for the activation of natural cytotoxicity and cytokine secretion. *Blood* (2006) 107:159–166. doi: 10.1182/blood-2005-04-1351
967. Lunemann S, Schöbel A, Kah J, Fittje P, Hölzemer A, Langeneckert AE, Hess LU, Poch T, Martrus G, Garcia-Beltran WF, et al. Interactions Between KIR3DS1 and HLA-F

- Activate Natural Killer Cells to Control HCV Replication in Cell Culture. *Gastroenterology* (2018) 155:1366-1371.e3. doi: 10.1053/j.gastro.2018.07.019
968. Ishitani A, Sageshima N, Lee N, Dorofeeva N, Hatake K, Marquardt H, Geraghty DE. Protein Expression and Peptide Binding Suggest Unique and Interacting Functional Roles for HLA-E, F, and G in Maternal-Placental Immune Recognition. *The Journal of Immunology* (2003) 171:1376–1384. doi: 10.4049/jimmunol.171.3.1376
969. Morandi F, Pistoia V. Interactions between HLA-G and HLA-E in Physiological and Pathological Conditions. *Front Immunol* (2014) 5:394. doi: 10.3389/fimmu.2014.00394
970. Kaiser BK, Pizarro JC, Kerns J, Strong RK. Structural basis for NKG2A/CD94 recognition of HLA-E. *Proc Natl Acad Sci U S A* (2008) 105:6696–6701. doi: 10.1073/pnas.0802736105
971. Llano M, Lee N, Navarro F, García P, Albar JP, Geraghty DE, López-Botet M. HLA-E-bound peptides influence recognition by inhibitory and triggering CD94/NKG2 receptors: preferential response to an HLA-G-derived nonamer. *European Journal of Immunology* (1998) 28:2854–2863. doi: 10.1002/(SICI)1521-4141(199809)28:09<2854::AID-IMMU2854>3.0.CO;2-W
972. Xu X, Zhou Y, Wei H. Roles of HLA-G in the Maternal-Fetal Immune Microenvironment. *Frontiers in Immunology* (2020) 11: <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fimmu.2020.592010> [Accessed March 21, 2022]
973. Kovács IJ, Hegedűs K, Pál A, Pusztai R. Production of Proinflammatory Cytokines by Syncytiotrophoblasts Infected with Human Cytomegalovirus Isolates. *Placenta* (2007) 28:620–623. doi: 10.1016/j.placenta.2006.09.008
974. Lu R, Zhang Y, Sun J. STAT3 activation in infection and infection-associated cancer. *Mol Cell Endocrinol* (2017) 451:80–87. doi: 10.1016/j.mce.2017.02.023
975. Kuchipudi SV. The Complex Role of STAT3 in Viral Infections. *J Immunol Res* (2015) 2015:272359. doi: 10.1155/2015/272359
976. Patel MV, Ghosh M, Fahey JV, Wira CR. Uterine Epithelial Cells Specifically Induce Interferon-Stimulated Genes in Response to Polyinosinic-Polycytidylic Acid Independently of Estradiol. *PLoS One* (2012) 7:e35654. doi: 10.1371/journal.pone.0035654
977. Gao D, Ciancanelli MJ, Zhang P, Harschnitz O, Bondet V, Hasek M, Chen J, Mu X, Itan Y, Cobat A, et al. TLR3 controls constitutive IFN- $\beta$  antiviral immunity in human fibroblasts and cortical neurons. *J Clin Invest* 131:e134529. doi: 10.1172/JCI134529
978. Patel MV, Hopkins DC, Barr FD, Wira CR. Sex Hormones and Aging Modulate Interferon Lambda 1 Production and Signaling by Human Uterine Epithelial Cells and Fibroblasts. *Front Immunol* (2021) 12:718380. doi: 10.3389/fimmu.2021.718380
979. Ank N, West H, Bartholdy C, Eriksson K, Thomsen AR, Paludan SR. Lambda Interferon (IFN- $\lambda$ ), a Type III IFN, Is Induced by Viruses and IFNs and Displays Potent Antiviral

- Activity against Select Virus Infections In Vivo. *J Virol* (2006) 80:4501–4509. doi: 10.1128/JVI.80.9.4501-4509.2006
980. Hou W, Wang X, Ye L, Zhou L, Yang Z-Q, Riedel E, Ho W-Z. Lambda Interferon Inhibits Human Immunodeficiency Virus Type 1 Infection of Macrophages. *J Virol* (2009) 83:3834–3842. doi: 10.1128/JVI.01773-08
981. Cannella F, Scagnolari C, Selvaggi C, Stentella P, Recine N, Antonelli G, Pierangeli A. Interferon lambda 1 expression in cervical cells differs between low-risk and high-risk human papillomavirus-positive women. *Med Microbiol Immunol* (2014) 203:177–184. doi: 10.1007/s00430-014-0330-9
982. Wang Y, Li J, Wang X, Zhou Y, Zhang T, Ho W. Comparison of Antiviral Activity of Lambda-Interferons Against HIV Replication in Macrophages. *J Interferon Cytokine Res* (2015) 35:213–221. doi: 10.1089/jir.2014.0064
983. Tian R-R, Guo H-X, Wei J-F, Yang C-K, He S-H, Wang J-H. IFN- $\lambda$  inhibits HIV-1 integration and post-transcriptional events in vitro, but there is only limited in vivo repression of viral production. *Antiviral Research* (2012) 95:57–65. doi: 10.1016/j.antiviral.2012.04.011
984. Serra C, Biolchini A, Mei A, Kotenko S, Dolei A. Type III and I Interferons Increase HIV Uptake and Replication in Human Cells That Overexpress CD4, CCR5, and CXCR4. *AIDS Research and Human Retroviruses* (2008) 24:173–180. doi: 10.1089/aid.2007.0198
985. Zhou L, Li J-L, Zhou Y, Liu J-B, Zhuang K, Gao J-F, Liu S, Sang M, Wu J-G, Ho W-Z. Induction of interferon- $\lambda$  contributes to TLR3 and RIG-I activation-mediated inhibition of herpes simplex virus type 2 replication in human cervical epithelial cells. *Mol Hum Reprod* (2015) 21:917–929. doi: 10.1093/molehr/gav058
986. Jagger BW, Miner JJ, Cao B, Arora N, Smith AM, Kovacs A, Mysorekar IU, Coyne CB, Diamond MS. Gestational stage and IFN- $\lambda$  signaling regulate ZIKV infection in utero. *Cell Host Microbe* (2017) 22:366-376.e3. doi: 10.1016/j.chom.2017.08.012
987. Casazza RL, Lazear HM, Miner JJ. Protective and Pathogenic Effects of Interferon Signaling During Pregnancy. *Viral Immunol* (2020) 33:3–11. doi: 10.1089/vim.2019.0076
988. Montes MJ, Tortosa CG, Borja C, Abadía AC, González-Gómez F, Ruiz C, Olivares EG. Constitutive secretion of interleukin-6 by human decidual stromal cells in culture. Regulatory effect of progesterone. *Am J Reprod Immunol* (1995) 34:188–194. doi: 10.1111/j.1600-0897.1995.tb00937.x
989. Trilling M, Le VTK, Zimmermann A, Ludwig H, Pfeiffer K, Sutter G, Smith GL, Hengel H. Gamma Interferon-Induced Interferon Regulatory Factor 1-Dependent Antiviral Response Inhibits Vaccinia Virus Replication in Mouse but Not Human Fibroblasts. *J Virol* (2009) 83:3684–3695. doi: 10.1128/JVI.02042-08
990. Perng Y-C, Lenschow DJ. ISG15 in antiviral immunity and beyond. *Nat Rev Microbiol* (2018) 16:423–439. doi: 10.1038/s41579-018-0020-5
991. Schoggins JW. Interferon-stimulated genes: roles in viral pathogenesis. *Curr Opin Virol* (2014) 6:40–46. doi: 10.1016/j.coviro.2014.03.006

992. Schoggins JW. Interferon-Stimulated Genes: What Do They All Do? *Annu Rev Virol* (2019) 6:567–584. doi: 10.1146/annurev-virology-092818-015756
993. Carty M, Guy C, Bowie AG. Detection of Viral Infections by Innate Immunity. *Biochem Pharmacol* (2021) 183:114316. doi: 10.1016/j.bcp.2020.114316
994. Paulesu L, Romagnoli R, Cintonino M, Ricci MG, Garotta G. First trimester human trophoblast expresses both interferon-gamma and interferon-gamma-receptor. *J Reprod Immunol* (1994) 27:37–48. doi: 10.1016/0165-0378(94)90013-2
995. Yockey LJ, Jurado KA, Arora N, Millet A, Rakib T, Milano KM, Hastings AK, Fikrig E, Kong Y, Horvath TL, et al. Type I interferons instigate fetal demise after Zika virus infection. *Sci Immunol* (2018) 3:eaa01680. doi: 10.1126/sciimmunol.aa01680
996. Buchrieser J, Degrelle SA, Couderc T, Nevers Q, Disson O, Manet C, Donahue DA, Porrot F, Hillion K-H, Perthame E, et al. IFITM proteins inhibit placental syncytiotrophoblast formation and promote fetal demise. *Science* (2019) 365:176–180. doi: 10.1126/science.aaw7733
997. Lasfar A, Zloza A, Cohen-Solal KA. IFN-lambda therapy: current status and future perspectives. *Drug Discovery Today* (2016) 21:167–171. doi: 10.1016/j.drudis.2015.10.021
998. Syedbasha M, Egli A. Interferon Lambda: Modulating Immunity in Infectious Diseases. *Front Immunol* (2017) 8:119. doi: 10.3389/fimmu.2017.00119
999. Xin P, Xu X, Deng C, Liu S, Wang Y, Zhou X, Ma H, Wei D, Sun S. The role of JAK/STAT signaling pathway and its inhibitors in diseases. *International Immunopharmacology* (2020) 80:106210. doi: 10.1016/j.intimp.2020.106210
1000. O’Shea JJ, Plenge R. JAK and STAT Signaling Molecules in Immunoregulation and Immune-Mediated Disease. *Immunity* (2012) 36:542–550. doi: 10.1016/j.immuni.2012.03.014
1001. King A, Jokhi P p., Burrows TD, Gardner L, Sharkey A m., Lore Y w. Functions of Human Decidual NK Cells. *American Journal of Reproductive Immunology* (1996) 35:258–260. doi: 10.1111/j.1600-0897.1996.tb00041.x
1002. Szekeres-Bartho J. Regulation of NK cell cytotoxicity during pregnancy. *Reprod Biomed Online* (2008) 16:211–217. doi: 10.1016/s1472-6483(10)60576-7
1003. Zhang X, Wei H. Role of Decidual Natural Killer Cells in Human Pregnancy and Related Pregnancy Complications. *Front Immunol* (2021) 12:728291. doi: 10.3389/fimmu.2021.728291
1004. Gaynor LM, Colucci F. Uterine Natural Killer Cells: Functional Distinctions and Influence on Pregnancy in Humans and Mice. *Front Immunol* (2017) 8:467. doi: 10.3389/fimmu.2017.00467
1005. Caligiuri MA. Human natural killer cells. *Blood* (2008) 112:461–469. doi: 10.1182/blood-2007-09-077438

1006. Quillay H, El Costa H, Duriez M, Marlin R, Cannou C, Madec Y, de Truchis C, Rahmati M, Barré-Sinoussi F, Nugeyre MT, et al. NK cells control HIV-1 infection of macrophages through soluble factors and cellular contacts in the human decidua. *Retrovirology* (2016) 13:39. doi: 10.1186/s12977-016-0271-z
1007. O'Connor T, Borsig L, Heikenwalder M. CCL2-CCR2 Signaling in Disease Pathogenesis. *Endocrine, Metabolic & Immune Disorders - Drug Targets* 15:105–118.
1008. Hao Q, Vadgama JV, Wang P. CCL2/CCR2 signaling in cancer pathogenesis. *Cell Commun Signal* (2020) 18:82. doi: 10.1186/s12964-020-00589-8
1009. Kim SY, Solomon DH. Tumor necrosis factor blockade and the risk of viral infection. *Nat Rev Rheumatol* (2010) 6:165–174. doi: 10.1038/nrrheum.2009.279
1010. Samuel CE. Antiviral Actions of Interferons. *Clin Microbiol Rev* (2001) 14:778–809. doi: 10.1128/CMR.14.4.778-809.2001
1011. Seo SH, Webster RG. Tumor Necrosis Factor Alpha Exerts Powerful Anti-Influenza Virus Effects in Lung Epithelial Cells. *J Virol* (2002) 76:1071–1076. doi: 10.1128/JVI.76.3.1071-1076.2002
1012. Li C, Xu D, Ye Q, Hong S, Jiang Y, Liu X, Zhang N, Shi L, Qin C-F, Xu Z. Zika Virus Disrupts Neural Progenitor Development and Leads to Microcephaly in Mice. *Cell Stem Cell* (2016) 19:672. doi: 10.1016/j.stem.2016.10.017
1013. Miner JJ, Cao B, Govero J, Smith AM, Fernandez E, Cabrera OH, Garber C, Noll M, Klein RS, Noguchi KK, et al. Zika Virus Infection during Pregnancy in Mice Causes Placental Damage and Fetal Demise. *Cell* (2016) 165:1081–1091. doi: 10.1016/j.cell.2016.05.008
1014. Meertens L, Labeau A, Dejarnac O, Cipriani S, Sinigaglia L, Bonnet-Madin L, Le Charpentier T, Hafirassou ML, Zamborlini A, Cao-Lormeau V-M, et al. Axl Mediates ZIKA Virus Entry in Human Glial Cells and Modulates Innate Immune Responses. *Cell Rep* (2017) 18:324–333. doi: 10.1016/j.celrep.2016.12.045
1015. Wu K-Y, Zuo G-L, Li X-F, Ye Q, Deng Y-Q, Huang X-Y, Cao W-C, Qin C-F, Luo Z-G. Vertical transmission of Zika virus targeting the radial glial cells affects cortex development of offspring mice. *Cell Res* (2016) 26:645–654. doi: 10.1038/cr.2016.58
1016. Nowakowski TJ, Pollen AA, Di Lullo E, Sandoval-Espinosa C, Bershteyn M, Kriegstein AR. Expression Analysis Highlights AXL as a Candidate Zika Virus Entry Receptor in Neural Stem Cells. *Cell Stem Cell* (2016) 18:591–596. doi: 10.1016/j.stem.2016.03.012
1017. El Costa H, Tabiasco J, Berrebi A, Parant O, Aguerre-Girr M, Piccinni M-P, Le Bouteiller P. Effector functions of human decidual NK cells in healthy early pregnancy are dependent on the specific engagement of natural cytotoxicity receptors. *Journal of Reproductive Immunology* (2009) 82:142–147. doi: 10.1016/j.jri.2009.06.123
1018. Male V, Sharkey A, Masters L, Kennedy PR, Farrell LE, Moffett A. The effect of pregnancy on the uterine NK cell KIR repertoire. *European Journal of Immunology* (2011) 41:3017–3027. doi: 10.1002/eji.201141445

1019. Holder KA, Stapleton SN, Gallant ME, Russell RS, Grant MD. Hepatitis C Virus–Infected Cells Downregulate NKp30 and Inhibit Ex Vivo NK Cell Functions. *The Journal of Immunology* (2013) 191:3308–3318. doi: 10.4049/jimmunol.1300164
1020. Alter G, Jost S, Rihn S, Reyor LL, Nolan BE, Ghebremichael M, Bosch R, Altfeld M, Lauer GM. Reduced frequencies of NKp30+ NKp46+, CD161+, and NKG2D+ NK cells in acute HCV infection may predict viral clearance. *J Hepatol* (2011) 55:278–288. doi: 10.1016/j.jhep.2010.11.030
1021. Sun C, Fu B, Gao Y, Liao X, Sun R, Tian Z, Wei H. TGF- $\beta$ 1 Down-Regulation of NKG2D/DAP10 and 2B4/SAP Expression on Human NK Cells Contributes to HBV Persistence. *PLoS Pathog* (2012) 8:e1002594. doi: 10.1371/journal.ppat.1002594
1022. Takahashi H, Yamamoto T, Yamazaki M, Murase T, Matsuno T, Chishima F. Natural Cytotoxicity Receptors in Decidua Natural Killer Cells of Term Normal Pregnancy. *J Pregnancy* (2018) 2018:4382084. doi: 10.1155/2018/4382084
1023. Hiby SE, Apps R, Sharkey AM, Farrell LE, Gardner L, Mulder A, Claas FH, Walker JJ, Redman CW, Redman CC, et al. Maternal activating KIRs protect against human reproductive failure mediated by fetal HLA-C2. *J Clin Invest* (2010) 120:4102–4110. doi: 10.1172/JCI43998
1024. Lapaque N, Walzer T, Méresse S, Vivier E, Trowsdale J. Interactions between human NK cells and macrophages in response to Salmonella infection. *J Immunol* (2009) 182:4339–4348. doi: 10.4049/jimmunol.0803329
1025. Nedvetzki S, Sowinski S, Eagle RA, Harris J, Vély F, Pende D, Trowsdale J, Vivier E, Gordon S, Davis DM. Reciprocal regulation of human natural killer cells and macrophages associated with distinct immune synapses. *Blood* (2007) 109:3776–3785. doi: 10.1182/blood-2006-10-052977
1026. Welte S, Kuttruff S, Waldhauer I, Steinle A. Mutual activation of natural killer cells and monocytes mediated by NKp80-AICL interaction. *Nat Immunol* (2006) 7:1334–1342. doi: 10.1038/ni1402
1027. Kammerer U, Kruse A, Barrientos G, Arck PC, Blois SM. Role of dendritic cells in the regulation of maternal immune responses to the fetus during mammalian gestation. *Immunol Invest* (2008) 37:499–533. doi: 10.1080/08820130802191334
1028. Laskarin G, Redzović A, Rubesa Z, Mantovani A, Allavena P, Haller H, Vlastelić I, Rukavina D. Decidual natural killer cell tuning by autologous dendritic cells. *Am J Reprod Immunol* (2008) 59:433–445. doi: 10.1111/j.1600-0897.2008.00599.x
1029. Karsten CM, Behrends J, Wagner AK, Fuchs F, Figge J, Schmutte I, Hellberg L, Kruse A. DC within the pregnant mouse uterus influence growth and functional properties of uterine NK cells. *European Journal of Immunology* (2009) 39:2203–2214. doi: 10.1002/eji.200838844
1030. Liu X, Zhao M, Yang X, Han M, Xu X, Jiang Y, Hu X. Toxoplasma gondii Infection of Decidual CD1c+ Dendritic Cells Enhances Cytotoxicity of Decidual Natural Killer Cells. *Inflammation* (2014) 37:1261–1270. doi: 10.1007/s10753-014-9853-x



1031. Gardiner CM. NK cell metabolism. *Journal of Leukocyte Biology* (2019) 105:1235–1242. doi: <https://doi.org/10.1002/JLB.MR0718-260R>
1032. Poznanski SM, Ashkar AA. What Defines NK Cell Functional Fate: Phenotype or Metabolism? *Front Immunol* (2019) 10: doi: 10.3389/fimmu.2019.01414
1033. Mah AY, Rashidi A, Keppel MP, Saucier N, Moore EK, Alinger JB, Tripathy SK, Agarwal SK, Jeng EK, Wong HC, et al. Glycolytic requirement for NK cell cytotoxicity and cytomegalovirus control. *JCI Insight* 2:e95128. doi: 10.1172/jci.insight.95128
1034. Keating SE, Zaiatz-Bittencourt V, Loftus RM, Keane C, Brennan K, Finlay DK, Gardiner CM. Metabolic Reprogramming Supports IFN- $\gamma$  Production by CD56bright NK Cells. *The Journal of Immunology* (2016) 196:2552–2560. doi: 10.4049/jimmunol.1501783
1035. Salzberger W, Martrus G, Bachmann K, Goebels H, Heß L, Koch M, Langeneckert A, Lunemann S, Oldhafer KJ, Pfeifer C, et al. Tissue-resident NK cells differ in their expression profile of the nutrient transporters Glut1, CD98 and CD71. *PLoS One* (2018) 13:e0201170. doi: 10.1371/journal.pone.0201170
1036. Pearce EL, Poffenberger MC, Chang C-H, Jones RG. Fueling Immunity: Insights into Metabolism and Lymphocyte Function. *Science* (2013) 342:1242454. doi: 10.1126/science.1242454
1037. O’Brien KL, Finlay DK. Immunometabolism and natural killer cell responses. *Nat Rev Immunol* (2019) 19:282–290. doi: 10.1038/s41577-019-0139-2
1038. Liu Z-Y, Shi W-F, Qin C-F. The evolution of Zika virus from Asia to the Americas. *Nat Rev Microbiol* (2019) 17:131–139. doi: 10.1038/s41579-018-0134-9
1039. Musso D, Ko AI, Baud D. Zika Virus Infection — After the Pandemic. *N Engl J Med* (2019) 381:1444–1457. doi: 10.1056/NEJMra1808246
1040. Anfasa F, Siegers JY, van der Kroeg M, Mumtaz N, Stalin Raj V, de Vrij FMS, Widagdo W, Gabriel G, Salinas S, Simonin Y, et al. Phenotypic Differences between Asian and African Lineage Zika Viruses in Human Neural Progenitor Cells. *mSphere* (2017) 2:e00292-17. doi: 10.1128/mSphere.00292-17
1041. Hamel R, Ferraris P, Wichit S, Diop F, Talignani L, Pompon J, Garcia D, Liégeois F, Sall AA, Yssel H, et al. African and Asian Zika virus strains differentially induce early antiviral responses in primary human astrocytes. *Infection, Genetics and Evolution* (2017) 49:134–137. doi: 10.1016/j.meegid.2017.01.015
1042. Smith DR, Sprague TR, Hollidge BS, Valdez SM, Padilla SL, Bellanca SA, Golden JW, Coyne SR, Kulesh DA, Miller LJ, et al. African and Asian Zika Virus Isolates Display Phenotypic Differences Both In Vitro and In Vivo. *Am J Trop Med Hyg* (2018) 98:432–444. doi: 10.4269/ajtmh.17-0685
1043. Calvez E, O’Connor O, Pol M, Rousset D, Faye O, Richard V, Tarantola A, Dupont-Rouzeyrol M. Differential transmission of Asian and African Zika virus lineages by *Aedes aegypti* from New Caledonia. *Emerg Microbes Infect* (2018) 7:159. doi: 10.1038/s41426-018-0166-2

1044. Roundy CM, Azar SR, Rossi SL, Huang JH, Leal G, Yun R, Fernandez-Salas I, Vitek CJ, Paploski IAD, Kitron U, et al. Variation in *Aedes aegypti* Mosquito Competence for Zika Virus Transmission. *Emerg Infect Dis* (2017) 23:625–632. doi: 10.3201/eid2304.161484
1045. Liu Z, Zhou T, Lai Z, Zhang Z, Jia Z, Zhou G, Williams T, Xu J, Gu J, Zhou X, et al. Competence of *Aedes aegypti*, *Ae. albopictus*, and *Culex quinquefasciatus* Mosquitoes as Zika Virus Vectors, China. *Emerg Infect Dis* (2017) 23:1085–1091. doi: 10.3201/eid2307.161528
1046. Weger-Lucarelli J, Rückert C, Chotiwan N, Nguyen C, Garcia Luna SM, Fauver JR, Foy BD, Perera R, Black WC, Kading RC, et al. Vector Competence of American Mosquitoes for Three Strains of Zika Virus. *PLoS Negl Trop Dis* (2016) 10:e0005101. doi: 10.1371/journal.pntd.0005101
1047. Pompon J, Morales-Vargas R, Manuel M, Huat Tan C, Vial T, Hao Tan J, Sessions OM, Vasconcelos P da C, Ng LC, Missé D. A Zika virus from America is more efficiently transmitted than an Asian virus by *Aedes aegypti* mosquitoes from Asia. *Sci Rep* (2017) 7:1215. doi: 10.1038/s41598-017-01282-6
1048. Lazear HM, Govero J, Smith AM, Platt DJ, Fernandez E, Miner JJ, Diamond MS. A Mouse Model of Zika Virus Pathogenesis. *Cell Host Microbe* (2016) 19:720–730. doi: 10.1016/j.chom.2016.03.010
1049. Shao Q, Herrlinger S, Zhu Y-N, Yang M, Goodfellow F, Stice SL, Qi X-P, Brindley MA, Chen J-F. The African Zika virus MR-766 is more virulent and causes more severe brain damage than current Asian lineage and dengue virus. *Development* (2017) 144:4114–4124. doi: 10.1242/dev.156752
1050. Jaeger AS, Murrieta RA, Goren LR, Crooks CM, Moriarty RV, Weiler AM, Rybarczyk S, Semler MR, Huffman C, Mejia A, et al. Zika viruses of African and Asian lineages cause fetal harm in a mouse model of vertical transmission. *PLoS Negl Trop Dis* (2019) 13:e0007343. doi: 10.1371/journal.pntd.0007343
1051. Goodfellow FT, Willard KA, Wu X, Scoville S, Stice SL, Brindley MA. Strain-Dependent Consequences of Zika Virus Infection and Differential Impact on Neural Development. *Viruses* (2018) 10:550. doi: 10.3390/v10100550
1052. Duggal NK, Ritter JM, McDonald EM, Romo H, Guirakhoo F, Davis BS, Chang G-JJ, Brault AC. Differential Neurovirulence of African and Asian Genotype Zika Virus Isolates in Outbred Immunocompetent Mice. *Am J Trop Med Hyg* (2017) 97:1410–1417. doi: 10.4269/ajtmh.17-0263
1053. Tripathi S, Balasubramaniam VRMT, Brown JA, Mena I, Grant A, Bardina SV, Maringer K, Schwarz MC, Maestre AM, Sourisseau M, et al. A novel Zika virus mouse model reveals strain specific differences in virus pathogenesis and host inflammatory immune responses. *PLoS Pathog* (2017) 13:e1006258. doi: 10.1371/journal.ppat.1006258
1054. Udenze D, Trus I, Berube N, Gerdtts V, Karniychuk U. The African strain of Zika virus causes more severe in utero infection than Asian strain in a porcine fetal transmission model. *Emerg Microbes Infect* (2019) 8:1098–1107. doi: 10.1080/22221751.2019.1644967

# Annexes

**Annexe 1 :**

**Innate Immune Response to Viral Infections at the Maternal-Fetal Interface in Human  
Pregnancy**

**Ana Espino**, Hicham El Costa, Julie Tabiasco, Reem Al-Daccak and Nabila Jabrane-Ferrat

**Frontiers in Medicine.** 2021 July 22. doi : 10.3389/fmed.2021.674645



# Innate Immune Response to Viral Infections at the Maternal-Fetal Interface in Human Pregnancy

Ana Espino<sup>1</sup>, Hicham El Costa<sup>1</sup>, Julie Tabiasco<sup>1</sup>, Reem Al-Daccak<sup>2</sup> and Nabila Jabrane-Ferrat<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> Infinity, Université de Toulouse - CNRS - Inserm, CHU Purpan, Toulouse, France, <sup>2</sup> Inserm UMRS976 - Université de Paris - Hôpital Saint-Louis, Paris, France

## OPEN ACCESS

### Edited by:

Petros I. Rafailidis,  
Democritus University of  
Thrace, Greece

### Reviewed by:

Ying Xu,  
Chengdu Medical College, China  
Lucia De Noronha,  
Pontifical Catholic University of  
Parana, Brazil  
Matthew Aliota,  
University of Minnesota Twin Cities,  
United States

### \*Correspondence:

Nabila Jabrane-Ferrat  
nabila.jabrane-ferrat@inserm.fr

### Specialty section:

This article was submitted to  
Infectious Diseases - Surveillance,  
Prevention and Treatment,  
a section of the journal  
Frontiers in Medicine

**Received:** 01 March 2021

**Accepted:** 25 June 2021

**Published:** 22 July 2021

### Citation:

Espino A, El Costa H, Tabiasco J,  
Al-Daccak R and Jabrane-Ferrat N  
(2021) Innate Immune Response to  
Viral Infections at the Maternal-Fetal  
Interface in Human Pregnancy.  
*Front. Med.* 8:674645.  
doi: 10.3389/fmed.2021.674645

The placenta, the first and largest organ to develop after conception, not only nurtures and promotes the development of the conceptus, but, it also functions as a barrier against invading pathogens. Early phases of pregnancy are associated with expansion of specific subsets of Natural Killer cells (dNK) and macrophages (dM $\phi$ ) at the maternal uterine mucosa, the basal decidua. In concert with cells of fetal origin, dNK cells, and dM $\phi$  orchestrate all steps of placenta and fetus development, and provide the first line of defense to limit vertical transmission. However, some pathogens that infect the mother can overcome this protective barrier and jeopardize the fetus health. In this review, we will discuss how members of the classical TORCH family (Toxoplasma, Other, Rubella, Cytomegalovirus, and Herpes simplex virus) and some emerging viruses (Hepatitis E virus, Zika virus, and SARS-CoV2) can afford access to the placental fortress. We will also discuss how changes in the intrauterine environment as a consequence of maternal immune cell activation contribute to placental diseases and devastating pregnancy outcomes.

**Keywords:** pregnancy, viral infection, maternal-fetal transmission, innate immunity, Natural Killer cells, macrophages, cytokine environment

## INTRODUCTION

Human pregnancy is associated with tremendous changes of the maternal uterine mucosa (endometrium), called decidua, to promote the implantation, and the development of the blastocyst. The interstitial implantation, in humans and non-human primates, is characterized by complete enclosure of the blastocyst by the decidua (1). A privileged crosstalk between the endometrium and a competent 256-cell blastocyst must be completed in a limited time called the implantation window. The outer surface of the blastocyst also is composed of cytotrophoblasts (CTBs), a unique cell type of the placenta, which will follow two differentiation programs (2). In the first program CTBs fuse to form the multinucleated syncytiotrophoblast (STB) outermost layer surrounding the inner core of the placental villi. The villous core containing mesenchymal/fibroblastic stroma stem cells, immature fetal capillaries and a population of yolk sac-derived macrophages termed Hofbauer cells (HBCs), is surrounded by a bilayer of CTBs.

In the second program, CTBs of the cell column differentiate into interstitial and endovascular invasive cytotrophoblast cells (iCTBs). Subsequently, iCTBs invade the decidua and remodel the maternal spiral arteries through active replacement of smooth muscle and vascular endothelial cells. Completion of vascular remodeling by trophoblast cells which happens by the end of first trimester of pregnancy (10–12 weeks), promotes the switch from high-resistance to low-resistance vessels with enlarged lumen to ensure routing of high blood flow into the intervillous space (3). As the development advances, the highly branched villous trees of the placenta are bathed with maternal blood till parturition. The invasion fetal trophoblast cells and tissue remodeling are under strict control by maternal immune cells to ensure confinement of the placenta to the allocated space within time constraints of pregnancy. Flaws in these developmental steps have been clearly incriminated in many great obstetrical syndromes including pre-eclampsia and fetal growth restriction (FGR), both associated with faulty placental development (3).

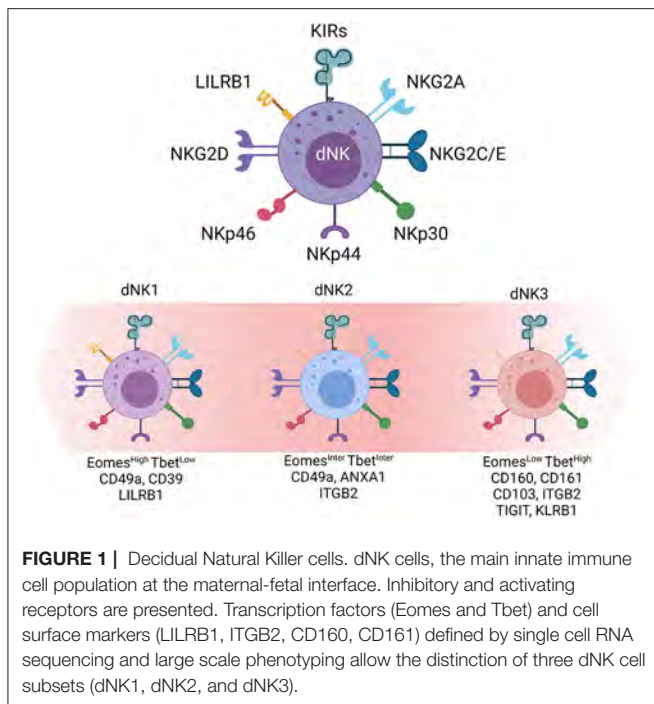
Unlike the fetus, the placenta is in direct contact with maternal cells. Intermingling between fetal and maternal cells, which is mandatory for placenta and fetal development, happens within privileged sites (maternal-fetal interface, composed of the basal decidua, and the intervillous space). Hormones are able to prime the decidua-associated remodeling (2), complete “physiological change” requires the presence of trophoblast cells. The extent of trophoblast cell invasion and tissue remodeling, both necessary for efficient and healthy placenta in late pregnancy, are dictated by a finely tuned crosstalk between fetal cells and maternal tissue resident immune cells. Leukocytes represent more than 40% of total cells in the basal decidua (4). While a large fraction of immune cells are tissue resident leukocytes, many factors produced by decidual stromal cells and trophoblast cells could contribute to the recruitment of additional leukocytes from the periphery (5, 6). A high percentage of decidual immune cells are non-cytotoxic CD56 super bright Natural Killer (dNK) cells that lack the expression of the Fc gamma receptor IIIA, CD16, and are endowed with angiogenic and regulatory activities. In the first trimester of pregnancy, dNK cell population represents 70% of leukocytes (7–9). Their rate remains relatively high in the second trimester but declines in the third trimester to reach normal uterine level at parturition (10). Other immune cell populations are also present in first trimester basal decidua, although, at lower levels. Decidual macrophages (dM $\phi$ ) represent 20–25% of total leukocytes, while dendritic cells and mast cells only represent 1–2% (11). The decidua contains only 5–10% T lymphocytes, including CD8, CD4, and  $\gamma\delta$ T cells, but B cells are barely present. The low level of B cells suggests that it is very unlikely that any eventual antibody response would harm invading trophoblast cells (12). Minor immune cell subsets include innate lymphoid cells (ILCs) (13) and mucosal-associated invariant T cells (MAIT) (14). The interaction of these immune cells with decidual stroma and invading fetal trophoblast cells is crucial for the establishment of an environment rich in soluble mediators including hormones, growth factors cytokines, chemokines and lipids, which are necessary for the development of the placenta and of the fetus. Given their dominance and active contribution to protection against pathogens, this review will mainly discuss

the key features of dNK cells and dM $\phi$  during healthy pregnancy as well as their functional adaptations during viral invasion, and how viral infections disrupt the maternal-fetal barrier resulting in congenital infections.

## DECIDUAL NK CELLS

Natural killer (NK) cells are innate lymphoid cells with documented anti-viral and anti-tumor functions. They are found in the bloodstream (pNK), where they represent up to 15% of circulating lymphocytes, but also in various tissues such as lymphoid organs, liver and uterus. NK cells are classified in two major populations according to the cell surface expression of CD56 (NCAM) and CD16. The majority of pNK cells (~95%) are CD56<sup>dim</sup>CD16<sup>pos</sup> and characterized by a highly cytotoxic capacity, the remaining 5% are CD56<sup>bright</sup>CD16<sup>neg</sup> (8, 15). At the implantation bed, the majority of dNK cells are CD56 super bright (dNK<sup>bright</sup>) that share some phenotypic similarities with the minor population of pNK and only a small fraction CD56<sup>dim</sup> (dNK<sup>dim</sup>) (8, 15, 16). dNK cells express most of the activating and inhibitory NK cell receptors including the NKp30, NKp46, NKG2C, NKG2E, NKG2D, NKG2A, 2B4, CD85/LILRB1/ILT2 (LILRB1), and Killer-cell immunoglobulin-like family of receptors (KIR) such as KIR2DL1, KIR2DL2/3, KIR2DL4, KIR3DL2 (10, 16–18). However, the function of several NKR is different as compared with pNK cells (15, 19). For example, the inhibitory LILRB1 in the periphery is an activating receptor in the decidua, whilst the co-activating 2B4 receptor functions as inhibitory receptors in dNK cells. dNK cells also express many other receptors that are not expressed on resting pNK cells. dNK cells have a constitutive expression of CD69 and CD25, and display differential expression of NKp44/NCR2 and NKp30/NCR3 splice variants implying the involvement of the decidual environment in shaping their cell fate (20). dNK cells also express high levels of integrins ( $\alpha$ D,  $\alpha$ X,  $\beta$ 1, and  $\beta$ 5) and other receptors such as CD53, CD63, and CD151 (8) as well as tissue residency markers (CD49a, CD9, and CD103). In addition, several chemokine receptors (CXCR3, CXCR4, CCR1, and CCR9) endow them with high mobility to warrant a fine-tuned dialogue with other cells (21).

dNK cells can be classified under three major subsets dNK1, dNK2, and dNK3. dNK1 is the most abundant subset (>30%), followed by dNK2 and dNK3 (22, 23). While all three subsets express of NKG2A, LILRB1 expression is a major hallmark of dNK1 cells. dNK1 cells also express the regulatory CD39 ATPase, involved in the shift between pro-inflammatory and immunosuppressive environment, large amounts of cytotoxic granules enriched in perforin and granzymes (8), and a combination of KIRs expression that further discriminates four dNK1 subgroups. Similar to dNK1, dNK2 cells express the NKG2C and NKG2E activating receptors as well as the NKG2A inhibitory receptor counterpart that recognize HLA molecules on fetal trophoblast cells. In addition, dNK2 cells express the ANXA1 and ITGB2 receptors. Finally, the third subset expresses CD160, CD161, TIGIT, KLRB1, ITGB2, and CD103 (22, 24).



The differential levels of NKp44 and NKG2A receptors suggest the presence of at least two subgroups of dNK3 cells.

In contrast to other tissues, all three CD49a<sup>pos</sup> dNK cell subsets express the Eomes and Tbet transcription factors although, at variable levels. Compared to Eomes<sup>high</sup>Tbet<sup>low</sup> dNK1 cells, dNK3 cells are Eomes<sup>low</sup>Tbet<sup>high</sup> whilst dNK2 cell express intermediate levels of both transcription factors (Figure 1).

How these three subsets interact with each other's, with fetal trophoblast cells and decidual stromal cells (DSC), and whether they are all needed to direct the invasion of trophoblast cells, remodeling of the maternal-fetal interface and the development of the placenta are still in debate. Nonetheless, a finely tuned dialogue between different subsets of dNK cells, decidual cells, and invading trophoblast cells seems necessary to promote the complete establishment of the maternal-fetal interface but also the development of the fetus and the placenta (25).

Indeed, through direct interaction with iCTBs and production of a highly diverse secretome rich in cytokines, chemokines metalloproteinases, and growth promoting factors such as VEGF, IGF2, pleiotrophin, osteoglycin, and osteopontin), dNK cells direct the extent of trophoblast invasion, tissue remodeling as well as placental and fetal growth (26, 27). Some of these soluble factors are also important for the establishment of a local pro- and anti-inflammatory cytokine balance that is necessary for fetal tolerance as well as protection against mother-to-child transmission of pathogens.

By contrast to pNK, dNK cells are devoid of cytotoxicity during healthy pregnancies preventing harmful reaction against the semi-allogeneic trophoblast cells (15, 28). Several mechanisms have been suggested for their involvement in

restricting dNK cell lytic machinery. These include (i) a defective polarization of the microtubule organizing center (MTOC), resulting in the formation of an immature immunologic synapse with target cells (29); (ii) the lack of SAP adapter molecule expression preventing activating signal from 2B4 (CD244) (19); (iii) the engagement of the NKG2A inhibitory receptor by its natural ligand HLA-E on trophoblast cells (30); and (iv) the expression of inhibitory isoforms of the Natural Cytotoxicity Receptors, NKp44 and NKp30 (16, 17, 20). Finally, the pressure of the local environment maintains cell cytotoxicity under a tight control (24).

Despite these regulatory mechanisms, dNK cell cytotoxic machinery can be unleashed resulting in failure in the harmonious mother-fetus dialogue and adverse pregnancy outcomes. For instance, patients with recurrent spontaneous abortion exhibit a change in the distribution of dNK cell subsets was associated with enhanced production of inflammatory cytokines and lytic granules, but impaired ability to produce growth promoting factors (27, 31). Thus, changes in dNK cell functions and the finely-tuned dialogue at the maternal-fetal interface is probably responsible for fetal trophoblast cells apoptosis and the resulting miscarriage. In addition, genetic studies demonstrated that particular combinations of HLA-C haplotypes and maternal inhibitory KIRs can be linked to defaults in trophoblast invasion and pregnancy disorders including pre-eclampsia pathologies (32, 33).

## DECIDUAL MACROPHAGES

Decidual macrophages (dM $\phi$ ) represent the second largest population of leukocytes. The local environment at the maternal-fetal interface orchestrates dM $\phi$  differentiation and functions. In early stages of pregnancy, dM $\phi$  have an M1 phenotype, then they switch to a mixed M1/M2 profile during trophoblast cell invasion. Once the placenta is fully developed, they switch toward an M2 phenotype to prevent fetal rejection (34). Consequently, dM $\phi$  share features of pro-inflammatory and tolerogenic macrophages, simultaneously expressing M1 (CD64, CD80, CD86) and M2 markers (CD163, CD206, DC-SIGN) (35–39).

Similar to dNK cells, dM $\phi$  secrete a large panel of pro-angiogenic factors and pro- and anti-inflammatory cytokines (40, 41). Their localization in the vicinity of spiral arteries and secretion of metalloproteinases allude to their active involvement in vascular remodeling (42). In concert with dNK cells, dM $\phi$  promote trophoblast cell invasion and placental development (43, 44) while contributing to defense against threatening pathogens.

## VIRAL INFECTIONS DURING PREGNANCY

The maternal-fetal interface constitutes a physical and immune barrier shielding the fetus from pathogens in the maternal circulation. However, some pathogens especially viruses can reach the fetal compartment either through hematogenous or decidual spread, resulting in congenital syndrome and high

case-fatality (Figure 2). Even in the absence of maternal-to-fetal transmission, previous epidemics of many emerging viral threats have resulted in poor pregnancy outcomes including maternal and fetal morbidity and mortality and peripartum infections with severe sequelae.

## Threatening TORCH Pathogens During Human Pregnancy

The TORCH family [Toxoplasma, Other (syphilis, varicella-zoster, parvovirus B19), Rubella, Cytomegalovirus and Herpes simplex viruses 1 and 2] are well-recognized as pregnancy threatening pathogens for human pregnancy.

The Human cytomegalovirus (HCMV), a large DNA virus that belongs to the herpesviridae family, is the most common cause of maternal and fetal morbidity and mortality. Primary maternal infection carries a 30–40% risk of vertical transmission. Congenital infection during the first trimester of pregnancy can result in severe congenital syndrome characterized by irreversible damage including deafness, psychomotor delays, myopathies, chorioretinitis, and devastating microcephaly (45). Even asymptomatic newborns can develop late neuro-developmental damage within the first 3 years of life (46). These congenital disorders could be partially attributed to severe placenta disruption with increased edema, massive inflammation, and avascular villi. HCMV infected placenta are characterized by massive viral-induced cytopathic effects in the villous capillaries and stromal cells and chronic villitis due to maternal inflammatory response.

The highly pathogenic Human immunodeficiency virus 1 (HIV-1) is an RNA virus from the retroviridae family. Histological analyses of first trimester placenta from untreated HIV-infected women revealed the presence of decidual necrosis and chorioamnionitis associated with the presence of HIV-1 in fetal tissues. Syncytin, the envelope glycoprotein of human endogenous retrovirus highly expressed by fetal trophoblast, mediates HIV entry through cell-to-cell fusion contributing to viral dissemination, and establishment of viral reservoir in deep tissues (47). Despite the high permissivity of trophoblast cells and dMφ, intrauterine transmission of HIV-1 is very rare during the first trimester of pregnancy (48) but occurs more frequently during labor and delivery. Although, ART can lower considerably the transmission rate, cesarean delivery is recommended for HIV-infected women with high viral loads.

## Emerging Viruses

Lessons from recent outbreaks and the current pandemic crisis, designated genotype 1 of Hepatitis E virus (HEV-1), Zika virus (ZIKV), and SARS-CoV2 as emerging viruses that can threaten human pregnancy.

Hepatitis E virus (HEV), a water-borne pathogen transmitted by the fecal-oral route, belongs to the *Hepeviridae* family. Strains that infect humans are classified in two species, *Orthohepevirus A* (eight genotypes) and *Orthohepevirus C* (49). HEV-1, prevalent in developing countries, is highly pathogenic during pregnancy with high maternal and fetal mortality rate (20%) due to fulminant hepatitis, hemorrhage, preeclampsia like syndrome,

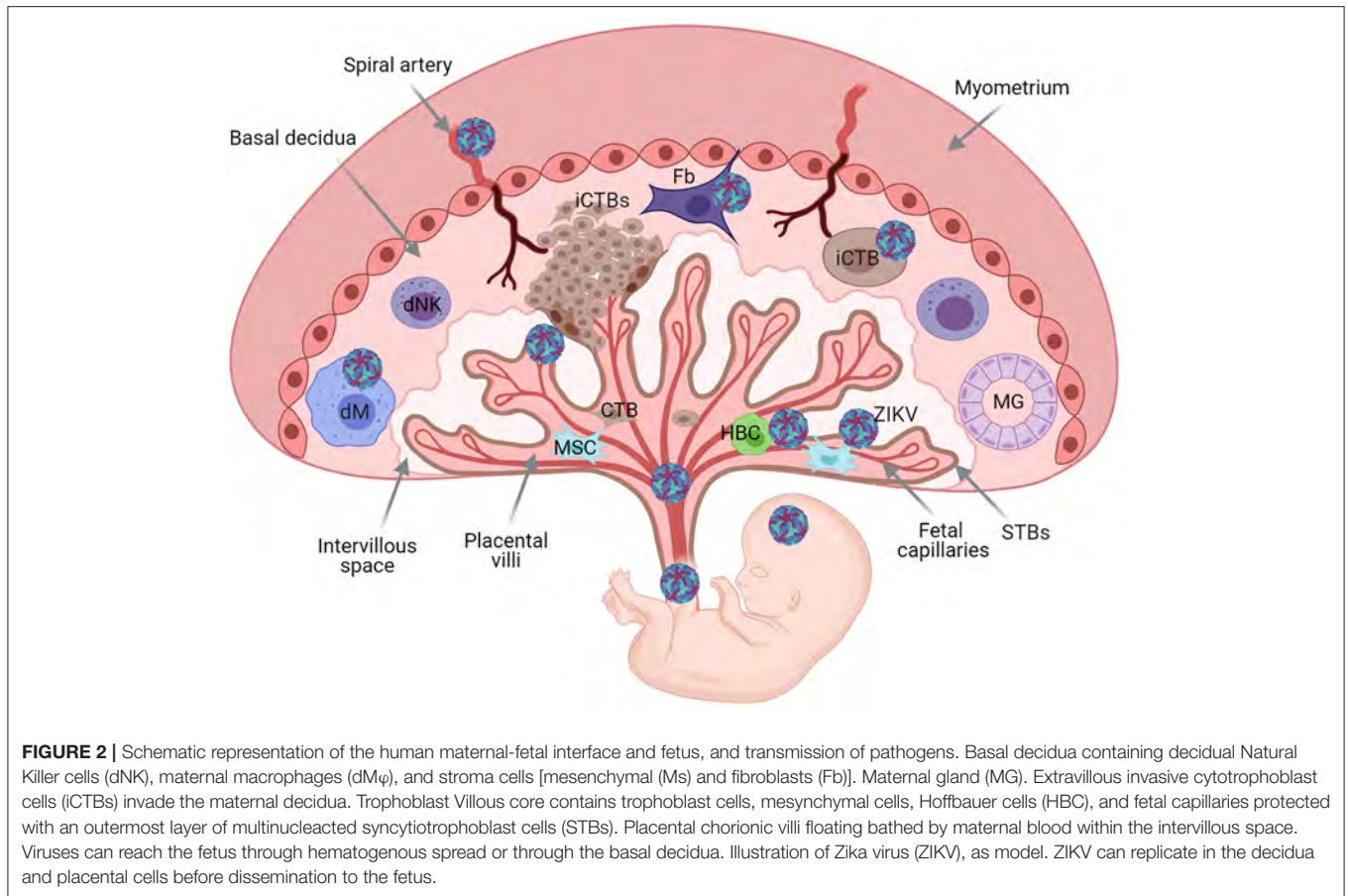
and severe placental diseases (50). The transmission rate of HEV-1 ranges from 50 to 100% (51). Trans-placental transmission has been documented by the presence of progeny virions in the fetal placenta and umbilical cord (52). Significant effort has been recently made by our team to understand mechanisms underlying HEV-1-related placental disorders (53). We demonstrate that pathogenic HEV-1 replicates efficiently both in maternal and fetal tissues, produces infectious progeny virions, and induces alteration of the local secretome leading to severe tissue damage.

ZIKV, a mosquito-borne *Flavivirus*, is able to surmount the physical and immunological barrier of the placenta to reach the developing conceptus in ~1 out of 10 infected pregnancies. In the 2015 outbreak in the western hemisphere, ZIKV was declared a serious public health concern, in particular for pregnant women due to surge of devastating microcephaly in newborns and increased frequency of placental pathology including preeclampsia, miscarriage and still birth (54, 55). Histological analysis of term placenta from congenital infected neonates, revealed the presence of immature villi with a large increase in the number of proliferating HBCs. Our group, among others, provided the proof that ZIKV targets a wide range of maternal and fetal cells including dMφ and HBCs, triggers massive inflammation and tissue damage, which may lead to placental insufficiency (56, 57). More recently, we described potential mechanisms for ZIKV-induced pathogenesis during early pregnancy (58). We showed that the virus usurps the placenta lipidome and the mitochondrial network to build replication factories necessary for the production of infectious progeny virions, and to overcome the placental intrinsic defense mechanisms through impairment of the homeostatic equilibrium of pro-/anti-inflammatory environment.

Pregnancy increases the risk of adverse maternal and offspring outcomes from many respiratory viral infections including Influenza virus. In December 2019, Wuhan, China, was faced with the outbreak of the deadliest acute respiratory distress syndrome, COVID-19 disease. On March 11, 2020 COVID-19 was declared a pandemic by the World Health Organization. The etiological agent of COVID-19, SARS-CoV2, is a newly identified member of a zoonotic family of coronaviruses responsible for severe acute respiratory syndrome (SARS). The former two family members SARS-CoV and Middle East respiratory syndrome (MERS)-CoV are the respective etiological agents responsible for the 2002 and 2012 outbreaks (59, 60).

Although, the COVID-19 pandemic has now infected large numbers of pregnant women, the risks and specific effects of SARS-CoV-2 are still largely unknown. Early reports of Chinese pregnancy cohorts did not provide evidence for maternal-fetal transmission in late gestation, but infection was clearly associated with increased risk of admission to intensive care, miscarriage, pre-eclampsia, premature membrane rupture, preterm labor and preterm birth (61–63). Neonates born to infected mothers presented fetal distress with abnormal respiratory gastrointestinal symptoms and refractory shock with multiple organ failure was reported (64). Furthermore, the presence of SARS-CoV-2 was detected either in amniotic fluid, umbilical cord blood or placental sections (65, 66). Vertical





transmission of SARS-CoV2 has been suspected in several cases but the mechanisms that allow the virus to breach the placental fortress and reach developing fetus are still lacking. Recent analyses of infected case reports and small cohorts from infected mothers and newborn dyad, revealed the presence of SAR-CoV2 antigens or viral RNA in fetal trophoblast cells and stromal cells (65, 66). The observation of SARS-CoV-2 spike protein in both maternal and fetal side is associated with tissue necrosis and massive recruitment of inflammatory cells to the intervillous space, termed chronic histiocytic intervillitis (67). Thus, placenta from COVID-19 pregnancies are highly likely to develop tissue inflammation and abnormal or injured maternal vessels.

As a cardinal unit for growth and regeneration, fetal trophoblast cells are central for the maintenance and development of the placenta and fetus, and defense against invading pathogens. The trophoblast rich in stem cells is endowed with intrinsic defense mechanisms, which include the production of type III interferons and a set of interferon stimulated genes (ISGs). In addition, a variety of receptors known as pattern recognition receptors (PRRs) including the Toll like receptors (TLRs) are widely expressed in the fetal placenta, but, very little is known about the expression of TLRs at the maternal decidua (68). Both innate immune cells and non-immune cells of the maternal-fetal unit including

decidual cells, mesenchymal and trophoblast stem cells, and the amniotic epithelium express TLRs 3, 7, 8, and 9 that can sense viral infection (69). In addition to the intrinsic defense mechanisms and inducible antiviral defenses could lead to beneficial effects by restricting viral replication and dissemination. However, the downstream signaling pathways and induced differential response may determine the final outcome. Our group and others demonstrate the placenta increases the production of a large number of ISGs including IFITM family members, IFI6 and ISG20, and type III IFNs to preempt ZIKV infection (58, 70, 71). Similarly, we reported the involvement of many factors in limiting HEV-1 infection (53). However, trophoblasts function as an active barrier preventing the transmission of certain viral infections to the fetus and sustained inflammatory response may result in disruption of the fine-tuned microenvironment leading to viral dissemination and major pregnancy disorders such as preeclampsia, or UGR.

## Immunity to Viral Infection

The “immune privilege” status of the maternal-fetal interface prevents harmful immune response to semi allogeneic embryonic cells. Nevertheless, there is an accumulating body of evidence supporting the active role of decidual immune cells in particular dNK cells and dM $\phi$  in controlling infections (72–74).

Our previous studies demonstrated that dNK cells can infiltrate HCMV-infected maternal-fetal tissues and colocalize with infected cells. dNK cells are then able to specifically detect and kill infected cells *via* the activating NKG2C/E and NKG2D receptors. They are also able to acquire specific cytotoxic functions directed against infected decidual fibroblasts (73). Interestingly, HCMV infection is also linked to a change in the secretome of dNK cells. Overall, by modulating the secretory profile of dNK cells toward increased production of cytotoxic factors, HCMV-infection likely constitutes virus-specific immune response (73).

Likewise, the secretion of IFN- $\gamma$  by dNK cells during HIV-1 infection shapes the polarization of dM $\phi$  endowing them with natural resistance to infection (72, 74). This resistance is lost when the dNK cells are no longer in contact with dM $\phi$  or when the IFN- $\gamma$  is neutralized by blocking antibodies, further confirming the role of the local environment in the control of the infection (72). In addition to their role during viral infection, dNK cells are able to balance the contradictory demands of fetal tolerance and protection against bacterial infection. Recent work by the group of Lieberman demonstrated that dNK cells are able to kill intracellular *Listeria monocytogenes* in trophoblasts and dM $\phi$ , through the transfer of granulysin cytotoxic molecules *via* tunneling nanotube (75).

The role of dM $\phi$  in the protection against pathogens did not receive much attention. However, dM $\phi$  express high levels of Toll-like receptors (TLRs 1–9) and engagement of these receptors *in vitro* enhances the secretion of pro- and anti-inflammatory cytokines that are compatible with maintenance of the fetotolerant immune environment during initiation of immune responses to pathogens (76). Likewise, dM $\phi$  antiviral innate immune response to HIV-1 is initiated by activation of TLRs 7 and 8 which in turn would restrict genome replication (74). Activation of TLR pathway induces downstream signaling cascades that ultimately lead to the production interferons (IFNs) and hundreds of IFN-stimulated genes (ISGs) with antiviral activity (77).

Our recent work highlighted the involvement of IFNs and a set of ISGs in placental defense against viral infection (53, 70).

## Cytokine Induced Immunopathology

The microenvironment of the uterine mucosa, within first semester of pregnancy, is mandatory not only for embryo implantation but also for the maternal-fetal tolerance (24). Despite the protective effect of immune cells, an overwhelming immune response at the maternal-fetal interface may constitute the other edge of the sword. Viral-induced disequilibrium of pro-inflammatory and anti-inflammatory factors could mediate tissue injury, leading to virus spread, and adverse pregnancy outcomes (78).

In the context of HCMV, modulation of the cytokine environment is considered as a potential initiator and/or exacerbator of placental and fetal injury. Indeed, HCMV infection during pregnancy is associated with a shift toward a proinflammatory cytokine status. Levels of the cytokines, TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-12, and IL-17; the chemokines CCL-2 (MCP1), CCL-4

(MIP-1 $\beta$ ), and CXCL10; and the growth factors GM-CSF and PDGF-bb were significantly elevated in amniotic fluids from congenital HCMV fetuses (79). In addition, stillborn HCMV-infected placenta have significantly elevated levels of CCL-2 and TNF $\alpha$  levels than uninfected placenta (80). Our team has shown that dNK cells produce high levels of sICAM-1, CXCL-1 (GRO $\alpha$ ), IL-6, Granzyme B when stimulated with infected autologous decidual cells. On the other hand, dNK cell production of CCL-4, IL-8, CXCL-10 (IP-10), GM-CSF, RANTES, and CCL-3 (MIP-1 $\alpha$ ) was significantly decreased. These changes in dNK cell secretome are necessary for the recruitment and initiation of anti-viral immune response but reduce trophoblast cell invasion and might be partially responsible for HCMV-associated fetal damages (73).

Increased production of pro-inflammatory cytokines was also associated with pregnancy disorders upon HEV-1 infection. Several pro-inflammatory factors (TNF $\alpha$ , IL-6, IFN- $\gamma$ , and TGF- $\beta$ 1) were increased in the maternal-fetal interface and peripheral blood from HEV-1 infected women with adverse pregnancy outcomes (81). Our studies revealed that HEV-1 skews the cytokine, chemokine, and growth factor secretory profile in both the decidua and placenta tissues with increased levels of IL-6, sICAM-1, CCL-3, CCL-4, G-CSF, and GM-CSF (53). These alterations in the local secretome were not only correlated with viral load but also promoted tissue apoptosis and necrosis, and may be responsible for HEV-1-associated pregnancy disorders. HEV-1 infection was also associated with decrease of CXCL-10 at the maternal fetal interface that could impair the invasion/migration of the fetal trophoblast and remodeling of maternal spiral arteries, both of which are mandatory for successful placentation.

ZIKV infection has been associated modulation of many factors such as VEGF-A, MMP-2, and MMP-9 that play a role in angiogenesis and ECM degradation. In contrast, the levels of sICAM-1 and IL-8, which could favor transmission of ZIKV, were increased. We found that ZIKV does not interfere type I or type II IFNs, but induces strong increase in the production of type III IFNs (IFN- $\lambda$ 2/3) and a set of interferon stimulated genes (70). We also provided the first evidence that ZIKV infection induces the production of several active lipid mediators which plays can modulate the placenta pro- and anti-inflammatory responses (58). The association between ZIKV-induced pro- and anti-inflammatory lipid metabolites and cytokines/chemokines have been implicated in the physiopathology of several infectious inflammatory disorders.

Modification of the local cytokine profile has also been reported in SARS-CoV-2 infection. SARS-CoV-2 infection is associated with immune cell activation, which may be responsible for a cytokine storm, leading at least to multiple system organ failure (82). The infection is associated with increased levels of pro-inflammatory cytokines IL-6, IL-10, GCSF, CXCL10, MCP-1, MIP-1 $\alpha$ , and TNF (83). Taken together, the cytokine storm induced during SARS-CoV-2 infection could impair the migration of trophoblasts cells and the remodeling of the maternal spiral arteries and contribute to placentation defects. The permanent increased pro-inflammatory state could also be likely to

impact the fetal brain development of the fetus, thus increasing the risk of autism, mental health disorders, or schizophrenia (84).

## CONCLUDING REMARKS

Lessons from the TORCH pathogens and emerging viruses have demonstrated that the infection of the maternal-fetal interface during early pregnancy is often associated with placental diseases and is highly detrimental to fetal development. Viral tropism and efficient replication combined with altered local environment dictate the extent of tissue damage. Significant effort has been made toward understanding the essential role of dNK cells in viral spread. However, why in some cases these cells fail to control the infection or participate to tissue damage need to be further investigated. dNK cell responsiveness to pathogens can be dependent on host factors. Thus, one research axis can focus on KIR and HLA alleles expressed by the host. Indeed, several examples of matched and mismatched KIR and HLA were previously described to be protective or deleterious during viral infections. Metabolic alterations may also underlie the failure of the immune response especially that viral infections are known to deplete and/or enrich the local environment with several metabolites that alters immune cell function. Viral factors may also shape the immune response. For instance, HEV-1 and ZIKV downregulate IFN $\lambda$  and other

ISGs in infected target cells, favoring their own replication and spread at the maternal-fetal interface. Although, similar alterations were previously reported in cell line-based models, the mechanisms that are at play in the decidua and placenta tissue remain elusive. The impact of such mechanisms on dNK cells need also to be further investigated. Another open question is whether dNK cells can expand in response to infected cells and generate a “memory-like” response. Such a memory may generate a natural vaccine against viruses and contribute to the control of viral transmission to the fetus. Finally, a particular attention should be given to dM $\phi$  since these cells constitutes the first barrier against different infections in other tissues.

## AUTHOR CONTRIBUTIONS

AE and NJ-F wrote and edited the manuscript. All authors contributed to the article and approved the submitted version.

## FUNDING

AE holds doctoral-fellowship from the Region Midi-Pyrénées Occitanie. NJ-F was supported by the French National Agency for Research on AIDS and Hepatitis (ANRS, ECTZ103104), JT was supported by the French Association against Endometriosis (EndoFrance).

## REFERENCES

- Bischof P, Campana A. A model for implantation of the human blastocyst and early placentation. *Hum Reprod Update*. (1996) 2:262–70. doi: 10.1093/humupd/2.3.262
- Pijnenborg R, Vercruyse L, Hanssens M. The uterine spiral arteries in human pregnancy: facts and controversies. *Placenta*. (2006) 27:939–58. doi: 10.1016/j.placenta.2005.12.006
- Moffett A, Loke C. Immunology of placentation in eutherian mammals. *Nat Rev Immunol*. (2006) 6:584–94. doi: 10.1038/nri1897
- Trundle A, Moffett A. Human uterine leukocytes and pregnancy. *Tissue Antigens*. (2004) 63:1–12. doi: 10.1111/j.1399-0039.2004.00170.x
- Carlino C, Stabile H, Morrone S, Bulla R, Soriani A, Agostinis C, 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. doi: 10.1182/blood-2007-08-105965
- Huang Y, Zhu X-Y, Du M-R, Li D-J. Human trophoblasts recruited T lymphocytes and monocytes into decidua by secretion of chemokine CXCL16 and interaction with CXCR6 in the first-trimester pregnancy. *J Immunol*. (2008) 180:2367–75. doi: 10.4049/jimmunol.180.4.2367
- Cooper MA, Fehniger TA, Caligiuri MA. The biology of human natural killer-cell subsets. *Trends Immunol*. (2001) 22:633–40. doi: 10.1016/S1471-4906(01)02060-9
- Koopman LA, Kopcow HD, Rybalov B, Boyson JE, Orange JS, Schatz F, et al. Human decidual natural killer cells are a unique NK cell subset with immunomodulatory potential. *J Exp Med*. (2003) 198:1201–12. doi: 10.1084/jem.20030305
- Moffett-King A. Natural killer cells and pregnancy. *Nat Rev Immunol*. (2002) 2:656–63. doi: 10.1038/nri886
- Jabrane-Ferrat N, Siewiera J. The up side of decidual natural killer cells: new developments in immunology of pregnancy. *Immunology*. (2014) 141:490–7. doi: 10.1111/imm.12218
- Gardner L, Moffett A. Dendritic cells in the human decidua. *Biol Reprod*. (2003) 69:1438–46. doi: 10.1095/biolreprod.103.017574
- Bulmer JN, Longfellow M, Ritson A. Leukocytes and resident blood cells in endometrium. *Ann N Y Acad Sci*. (1991) 622:57–68. doi: 10.1111/j.1749-6632.1991.tb37850.x
- Vacca P, Montaldo E, Croxatto D, Loiacono F, Canegallo F, Venturini PL, et al. Identification of diverse innate lymphoid cells in human decidua. *Mucosal Immunol*. (2015) 8:254–64. doi: 10.1038/mi.2014.63
- Gibbs A, Leeansyah E, Introini A, Paquin-Proulx D, Hasselrot K, Andersson E, et al. MAIT cells reside in the female genital mucosa and are biased towards IL-17 and IL-22 production in response to bacterial stimulation. *Mucosal Immunol*. (2017) 10:35–45. doi: 10.1038/mi.2016.30
- Hanna J, Goldman-Wohl D, Hamani Y, Avraham I, Greenfield C, Natanson-Yaron S, et al. Decidual NK cells regulate key developmental processes at the human fetal-maternal interface. *Nat Med*. (2006) 12:1065–74. doi: 10.1038/nm1452
- 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. doi: 10.4049/jimmunol.181.5.3009
- El Costa H, Tabiasco J, Berrebi A, Parant O, Aguerre-Girr M, Piccinni M-P, et al. Effector functions of human decidual NK cells in healthy early pregnancy are dependent on the specific engagement of natural cytotoxicity receptors. *J Reprod Immunol*. (2009) 82:142–7. doi: 10.1016/j.jri.2009.06.123
- 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. doi: 10.1002/eji.201141445
- Vacca P, Pietra G, Falco M, Romeo E, Bottino C, Bellora F, 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. doi: 10.1182/blood-2006-04-017343
- Siewiera J, Gouilly J, Hocine H-R, Cartron G, Levy C, Al-Daccak R, et al. Natural cytotoxicity receptor splice variants

- orchestrate the distinct functions of human natural killer cell subtypes. *Nat Commun.* (2015) 6:10183. doi: 10.1038/ncomms10183
21. Lockwood CJ, Huang SJ, Chen C-P, Huang Y, Xu J, Faramarzi S, et al. Decidual cell regulation of natural killer cell-recruiting chemokines: implications for the pathogenesis and prediction of preeclampsia. *Am J Pathol.* (2013) 183:841–56. doi: 10.1016/j.ajpath.2013.05.029
  22. Vento-Tormo R, Efremova M, Botting RA, Turco MY, Vento-Tormo M, Meyer KB, et al. Single-cell reconstruction of the early maternal-fetal interface in humans. *Nature.* (2018) 563:347–53. doi: 10.1038/s41586-018-0698-6
  23. Huhn O, Ivarsson MA, Gardner L, Hollinshead M, Stinchcombe JC, Chen P, et al. Distinctive phenotypes and functions of innate lymphoid cells in human decidua during early pregnancy. *Nat Commun.* (2020) 11:381. doi: 10.1038/s41467-019-14123-z
  24. Jabrane-Ferrat N. Features of human decidual NK cells in healthy pregnancy and during viral infection. *Front Immunol.* (2019) 10:1397. doi: 10.3389/fimmu.2019.01397
  25. Lash GE, Schiessl B, Kirkley M, Innes BA, Cooper A, Searle RF, et al. Expression of angiogenic growth factors by uterine natural killer cells during early pregnancy. *J Leukoc Biol.* (2006) 80:572–580. doi: 10.1189/jlb.04.06250
  26. Fraser R, Whitley GS, Johnstone AP, Host AJ, Sebire NJ, Thilaganathan B, et al. Impaired decidual natural killer cell regulation of vascular remodelling in early human pregnancies with high uterine artery resistance. *J Pathol.* (2012) 228:322–32. doi: 10.1002/path.4057
  27. Fu B, Zhou Y, Ni X, Tong X, Xu X, Dong Z, et al. Natural Killer cells promote fetal development through the secretion of growth-promoting factors. *Immunity.* (2017) 47:1100–13.e6. doi: 10.1016/j.immuni.2017.11.018
  28. Kalkunte SS, Mselle TF, Norris WE, Wira CR, Sentman CL, Sharma S. VEGF C facilitates immune tolerance and endovascular activity of human uterine NK cells at the maternal-fetal interface. *J Immunol.* (2009) 182:4085–92. doi: 10.4049/jimmunol.0803769
  29. Kopcow HD, Allan DSJ, Chen X, Rybalov B, Andzelm MM, Ge B, et al. Human decidual NK cells form immature activating synapses and are not cytotoxic. *Proc Natl Acad Sci U S A.* (2005) 102:15563–8. doi: 10.1073/pnas.0507835102
  30. King A, Allan DS, Bowen M, Powis SJ, Joseph S, Verma S, et al. HLA-E is expressed on trophoblast and interacts with CD94/NKG2 receptors on decidual NK cells. *Eur J Immunol.* (2000) 30:1623–31. doi: 10.1002/1521-4141(200006)30:6<1623::AID-IMMU1623>3.0.CO;2-M
  31. Nakashima A, Shiozaki A, Myojo S, Ito M, Tatematsu M, Sakai M, et al. Granulysin produced by uterine natural killer cells induces apoptosis of extravillous trophoblasts in spontaneous abortion. *Am J Pathol.* (2008) 173:653–64. doi: 10.2353/ajpath.2008.071169
  32. 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. doi: 10.1093/humrep/den011
  33. Hiby SE, Apps R, Sharkey AM, Farrell LE, Gardner L, Mulder A, et al. Maternal activating KIRs protect against human reproductive failure mediated by fetal HLA-C2. *J Clin Invest.* (2010) 120:4102–10. doi: 10.1172/JCI43998
  34. Houser BL, Tilburgs T, Hill J, Nicotra ML, Strominger JL. Two unique human decidual macrophage populations. *J Immunol.* (2011) 186:2633–42. doi: 10.4049/jimmunol.1003153
  35. Wynn TA, Chawla A, Pollard JW. Macrophage biology in development, homeostasis and disease. *Nature.* (2013) 496:445–55. doi: 10.1038/nature12034
  36. Martinez FO, Gordon S, Locati M, Mantovani A. Transcriptional profiling of the human monocyte-to-macrophage differentiation and polarization: new molecules and patterns of gene expression. *J Immunol.* (2006) 177:7303–11. doi: 10.4049/jimmunol.177.10.7303
  37. Italiani P, Boraschi D. From monocytes to M1/M2 macrophages: phenotypical vs. functional differentiation. *Front Immunol.* (2014) 5:514. doi: 10.3389/fimmu.2014.00514
  38. Repnik U, Tilburgs T, Roelen DL, van der Mast BJ, Kanhai HHH, Scherjon S, et al. Comparison of macrophage phenotype between decidua basalis and decidua parietalis by flow cytometry. *Placenta.* (2008) 29:405–12. doi: 10.1016/j.placenta.2008.02.004
  39. Heikkinen J, Möttönen M, Komi J, Alanen A, Lassila O. Phenotypic characterization of human decidual macrophages. *Clin Exp Immunol.* (2003) 131:498–505. doi: 10.1046/j.1365-2249.2003.02092.x
  40. Engert S, Rieger L, Kapp M, Becker JC, Diel J, Kämmerer U. Profiling chemokines, cytokines and growth factors in human early pregnancy decidua by protein array. *Am J Reprod Immunol.* (2007) 58:129–37. doi: 10.1111/j.1600-0897.2007.00498.x
  41. Lidström C, Matthesen L, Berg G, Sharma S, Ernerudh J, Ekerfelt C. Cytokine secretion patterns of NK cells and macrophages in early human pregnancy decidua and blood: implications for suppressor macrophages in decidua. *Am J Reprod Immunol.* (2003) 50:444–52. doi: 10.1046/j.8755-8920.2003.00112.x
  42. Lash GE, Pitman H, Morgan HL, Innes BA, Agwu CN, Bulmer JN. Decidual macrophages: key regulators of vascular remodeling in human pregnancy. *J Leukoc Biol.* (2016) 100:315–25. doi: 10.1189/jlb.1A0815-351R
  43. Nagamatsu T, Schust DJ. The immunomodulatory roles of macrophages at the maternal–fetal interface. *Reprod Sci.* (2010) 17:209–18. doi: 10.1177/1933719109349962
  44. Co EC, Gormley M, Kapidzic M, Rosen DB, Scott MA, Stolp HAR, et al. Maternal decidual macrophages inhibit nk cell killing of invasive cytotrophoblasts during human pregnancy. *Biol Reprod.* (2013) 88:155. doi: 10.1095/biolreprod.112.099465
  45. Enders G, Daiminger A, Bäder U, Exler S, Enders M. Intrauterine transmission and clinical outcome of 248 pregnancies with primary cytomegalovirus infection in relation to gestational age. *J Clin Virol.* (2011) 52:244–6. doi: 10.1016/j.jcv.2011.07.005
  46. Boppana SB, Fowler KB, Britt WJ, Stagno S, Pass RF. Symptomatic congenital cytomegalovirus infection in infants born to mothers with preexisting immunity to cytomegalovirus. *Pediatrics.* (1999) 104:55–60. doi: 10.1542/peds.104.1.55
  47. Tang Y, Woodward BO, Pastor L, George AM, Petrechko O, Nouvet FJ, et al. Endogenous retroviral envelope syncytin induces HIV-1 spreading and establishes HIV reservoirs in placenta. *Cell Rep.* (2020) 30:4528–39.e4. doi: 10.1016/j.celrep.2020.03.016
  48. Le Coeur S, Kanshana S, Jourdain G. [HIV-1 transmission from mother to child and its prevention]. *Med Trop.* (2003) 63:381–90.
  49. Primadharsini PP, Nagashima S, Okamoto H. Genetic variability and evolution of hepatitis E virus. *Viruses.* (2019) 11:456. doi: 10.3390/v11050456
  50. Patra S, Kumar A, Trivedi SS, Puri M, Sarin SK. Maternal and fetal outcomes in pregnant women with acute hepatitis E virus infection. *Ann Intern Med.* (2007) 147:28–33. doi: 10.7326/0003-4819-147-1-200707030-00005
  51. Sharma S, Kumar A, Kar P, Agarwal S, Ramji S, Husain SA, et al. Risk factors for vertical transmission of hepatitis E virus infection. *J Viral Hepat.* (2017) 24:1067–75. doi: 10.1111/jvh.12730
  52. Bose PD, Das BC, Hazam RK, Kumar A, Medhi S, Kar P. Evidence of extrahepatic replication of hepatitis E virus in human placenta. *J Gen Virol.* (2014) 95:1266–71. doi: 10.1099/vir.0.063602-0
  53. Gouilly J, Chen Q, Siewiera J, Cartron G, Levy C, Dubois M, et al. Genotype specific pathogenicity of hepatitis E virus at the human maternal-fetal interface. *Nat Commun.* (2018) 9:4748. doi: 10.1038/s41467-018-07200-2
  54. Melo AS de O, Aguiar RS, Amorim MMR, Arruda MB, Melo F de O, Ribeiro STC, et al. Congenital Zika virus infection: beyond neonatal microcephaly. *JAMA Neurol.* (2016) 73:1407–16. doi: 10.1001/jamaneurol.2016.3720
  55. Dudley DM, Van Rompay KK, Coffey LL, Ardeshtir A, Keesler RI, Grigsby PL, et al. Miscarriage and stillbirth following maternal Zika virus infection in non-human primates. *Nat Med.* (2018) 24:1104–7. doi: 10.1038/s41591-018-0088-5
  56. Miner JJ, Cao B, Govero J, Smith AM, Fernandez E, Cabrera OH, et al. Zika virus infection during pregnancy in mice causes placental damage and fetal demise. *Cell.* (2016) 165:1081–91. doi: 10.1016/j.cell.2016.05.008
  57. El Costa H, Gouilly J, Mansuy J-M, Chen Q, Levy C, Cartron G, et al. Zika virus reveals broad tissue and cell tropism during the first trimester of pregnancy. *Sci Rep.* (2016) 6:35296. doi: 10.1038/srep35296
  58. Chen Q, Gouilly J, Ferrat YJ, Espino A, Glaziou Q, Cartron G, et al. Metabolic reprogramming by Zika virus provokes inflammation in human placenta. *Nat Commun.* (2020) 11:2967. doi: 10.1038/s41467-020-16754-z
  59. Zaki AM, van Boheemen S, Bestebroer TM, Osterhaus ADME, Fouchier RAM. Isolation of a novel coronavirus from a man with pneumonia in Saudi Arabia. *N Engl J Med.* (2012) 367:1814–20. doi: 10.1056/NEJMoa1211721

60. Zhong N, Zheng B, Li Y, Poon L, Xie Z, Chan K, et al. Epidemiology and cause of severe acute respiratory syndrome (SARS) in Guangdong, People's Republic of China, in February, 2003. *Lancet*. (2003) 362:1353–8. doi: 10.1016/S0140-6736(03)14630-2
61. Baud D, Greub G, Favre G, Gengler C, Jatou K, Dubruc E, et al. Second-trimester miscarriage in a pregnant woman with SARS-CoV-2 infection. *JAMA*. (2020) 323:2198–200. doi: 10.1001/jama.2020.7233
62. Di Mascio D, Khalil A, Saccone G, Rizzo G, Buca D, Liberati M, et al. Outcome of coronavirus spectrum infections (SARS, MERS, COVID-19) during pregnancy: a systematic review and meta-analysis. *Am J Obstet Gynecol*. (2020) 2:100107. doi: 10.1016/j.ajogmf.2020.100107
63. Zaigham M, Andersson O. Maternal and perinatal outcomes with COVID-19: a systematic review of 108 pregnancies. *Acta Obstet Gynecol Scand*. (2020) 99:823–9. doi: 10.1111/aogs.13867
64. Schwartz DA. An analysis of 38 pregnant women with COVID-19, their newborn infants, and maternal-fetal transmission of SARS-CoV-2: maternal coronavirus infections and pregnancy outcomes. *Arch Pathol Lab Med*. (2020) 144:799–805. doi: 10.5858/arpa.2020-0901-SA
65. Verma S, Joshi CS, Silverstein RB, He M, Carter EB, Mysorekar IU. SARS-CoV-2 colonization of maternal and fetal cells of the human placenta promotes alteration of local renin-angiotensin system. *Med*. (2021) 2:575–90.e5. doi: 10.1016/j.medj.2021.04.009
66. Algarroba GN, Rekawek P, Vahanian SA, Khullar P, Palaia T, Peltier MR, et al. Visualization of severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 invading the human placenta using electron microscopy. *Am J Obstet Gynecol*. (2020) 223:275–8. doi: 10.1016/j.ajog.2020.05.023
67. Schwartz DA, Baldewijns M, Benachi A, Bugatti M, Collins RRJ, De Luca D, et al. Chronic histiocytic intervillitis with trophoblast necrosis are risk factors associated with placental infection from coronavirus disease 2019 (COVID-19) and intrauterine maternal-fetal severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (sars-cov-2) transmission in liveborn and stillborn infants. *Arch Pathol Lab Med*. (2020) 145: 517–28. doi: 10.5858/arpa.2020-0771-SA
68. Krikun G, Lockwood CJ, Abrahams VM, Mor G, Paidas M, Guller S. Expression of toll-like receptors in the human decidua. *Histol Histopathol*. (2007) 22:847–54. doi: 10.14670/HH-22.847
69. Koga K, Izumi G, Mor G, Fujii T, Osuga Y. Toll-like receptors at the maternal-fetal interface in normal pregnancy and pregnancy complications. *Am J Reprod Immunol*. (2014) 72:192–205. doi: 10.1111/aji.12258
70. Dukhovny A, Lamkiewicz K, Chen Q, Fricke M, Jabrane-Ferrat N, Marz M, et al. A CRISPR activation screen identifies genes that protect against Zika virus infection. *J Virol*. (2019) 93:e00211–19. doi: 10.1128/JVI.00211-19
71. Buchrieser J, Degrelle SA, Couderc T, Nevers Q, Disson O, Manet C, et al. IFITM proteins inhibit placental syncytiotrophoblast formation and promote fetal demise. *Science*. (2019) 365:176–80. doi: 10.1126/science.aaw7733
72. Quillay H, El Costa H, Duriez M, Marlin R, Cannou C, Madec Y, et al. NK cells control HIV-1 infection of macrophages through soluble factors and cellular contacts in the human decidua. *Retrovirology*. (2016) 13:39. doi: 10.1186/s12977-016-0271-z
73. Siewiera J, El Costa H, Tabiasco J, Berrebi A, Cartron G, Bouteiller P, et al. Human cytomegalovirus infection elicits new decidua natural killer cell effector functions. *PLoS Pathog*. (2013) 9:e1003257. doi: 10.1371/journal.ppat.1003257
74. El Costa H, Quillay H, Marlin R, Cannou C, Duriez M, Benjelloun F, et al. The local environment orchestrates mucosal decidua macrophage differentiation and substantially inhibits HIV-1 replication. *Mucosal Immunol*. (2016) 9:634–46. doi: 10.1038/mi.2015.87
75. Crespo AC, Mulik S, Dotiwala F, Ansara JA, Sen Santara S, Ingersoll K, et al. Decidual NK cells transfer granulysin to selectively kill bacteria in trophoblasts. *Cell*. (2020) 182:1125–39.e18. doi: 10.1016/j.cell.2020.07.019
76. Duriez M, Quillay H, Madec Y, El Costa H, Cannou C, Marlin R, et al. Human decidua macrophages and NK cells differentially express toll-like receptors and display distinct cytokine profiles upon TLR stimulation. *Front Microbiol*. (2014) 5:316. doi: 10.3389/fmicb.2014.00316
77. Schneider WM, Chevillotte MD, Rice CM. Interferon-stimulated genes: a complex web of host defenses. *Annu Rev Immunol*. (2014) 32:513–45. doi: 10.1146/annurev-immunol-032713-120231
78. Lash GE, Ernerudh J. Decidual cytokines and pregnancy complications: focus on spontaneous miscarriage. *J Reprod Immunol*. (2015) 108:83–9. doi: 10.1016/j.jri.2015.02.003
79. Scott GM, Chow SSW, Craig ME, Pang CNI, Hall B, Wilkins MR, et al. Cytomegalovirus infection during pregnancy with maternofetal transmission induces a proinflammatory cytokine bias in placenta and amniotic fluid. *J Infect Dis*. (2012) 205:1305–10. doi: 10.1093/infdis/jis186
80. Hamilton ST, Scott G, Naing Z, Iwasenko J, Hall B, Graf N, et al. Human cytomegalovirus induces cytokine changes in the placenta with implications for adverse pregnancy outcomes. *PLoS ONE*. (2012) 7:e52899. doi: 10.1371/journal.pone.0052899
81. Kumar A, Devi SG, Kar P, Agarwal S, Husain SA, Gupta RK, et al. Association of cytokines in hepatitis E with pregnancy outcome. *Cytokine*. (2014) 65:95–104. doi: 10.1016/j.cyto.2013.09.022
82. Channappanavar R, Perlman S. Pathogenic human coronavirus infections: causes and consequences of cytokine storm and immunopathology. *Semin Immunopathol*. (2017) 39:529–39. doi: 10.1007/s00281-017-0629-x
83. Huang C, Wang Y, Li X, Ren L, Zhao J, Hu Y, et al. Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China. *Lancet*. (2020) 395:497–506. doi: 10.1016/S0140-6736(20)30183-5
84. Chudnovets A, Lei J, Na Q, Dong J, Narasimhan H, Klein SL, et al. Dose-dependent structural and immunological changes in the placenta and fetal brain in response to systemic inflammation during pregnancy. *Am J Reprod Immunol*. (2020) 84:e13248. doi: 10.1111/aji.13248

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

Copyright © 2021 Espino, El Costa, Tabiasco, Al-Daccak and Jabrane-Ferrat. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner(s) are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

**Annexe 2 :**





**Metabolic reprogramming by Zika virus provokes inflammation in human placenta**

Qian Chen, Jordi Gouilly, Hicham El Costa, **Ana Espino**, Quentin Glaziou, Géraldine

Cartron, Yann Jabrane-Ferrat, Reem Al-Daccak and Nabila Jabrane-Ferrat

**Nature Communications.** 2020 June 11. doi : 10.1038/s41467-020-16754-z

# Metabolic reprogramming by Zika virus provokes inflammation in human placenta

Qian Chen <sup>1</sup>, Jordi Gouilly <sup>1</sup>, Yann J. Ferrat<sup>2</sup>, Ana Espino<sup>1</sup>, Quentin Glaziou<sup>1</sup>, Géraldine Cartron<sup>3</sup>, Hicham El Costa <sup>1</sup>, Reem Al-Daccak<sup>4</sup> & Nabila Jabrane-Ferrat <sup>1</sup>✉

The recent outbreak of Zika virus (ZIKV) was associated with birth defects and pregnancy loss when maternal infection occurs in early pregnancy, but specific mechanisms driving placental insufficiency and subsequent ZIKV-mediated pathogenesis remain unclear. Here we show, using large scale metabolomics, that ZIKV infection reprograms placental lipidome by impairing the lipogenesis pathways. ZIKV-induced metabolic alterations provide building blocks for lipid droplet biogenesis and intracellular membrane rearrangements to support viral replication. Furthermore, lipidome reprogramming by ZIKV is paralleled by the mitochondrial dysfunction and inflammatory immune imbalance, which contribute to placental damage. In addition, we demonstrate the efficacy of a commercially available inhibitor in limiting ZIKV infection, provides a proof-of-concept for blocking congenital infection by targeting metabolic pathways. Collectively, our study provides mechanistic insights on how ZIKV targets essential hubs of the lipid metabolism that may lead to placental dysfunction and loss of barrier function.

<sup>1</sup>Center for Pathophysiology of Toulouse Purpan, CNRS - Inserm - University of Toulouse, 31024 Toulouse, France. <sup>2</sup>CERAG Laboratory, University of Grenoble Alpes, 38040 Grenoble, France. <sup>3</sup>Department of Obstetrics and Gynecology, Paule de Viguier Hospital, 31059 Toulouse, France. <sup>4</sup>Saint-Louis Hospital, Inserm UMRS976, University of Paris Diderot, 75010 Paris, France. ✉email: [nabila.jabrane-ferrat@inserm.fr](mailto:nabila.jabrane-ferrat@inserm.fr)

The mosquito-borne Zika virus (ZIKV) is a single strand positive-sense RNA virus that belongs to the *Flaviviridae* family. ZIKV infection is mostly asymptomatic but in early pregnancy it has been linked to pregnancy loss and devastating birth defects including the life-threatening fetal brain abnormalities referred to as congenital ZIKV syndrome<sup>1,2</sup>. The replication of ZIKV in a wide range of fetal and maternal cells prompted the idea that maternal–fetal interface can serve as a replication platform enabling viral amplification before dissemination to the fetus<sup>3,4</sup>. However, despite intense investigation, mechanisms driving placental dysfunction, and subsequent ZIKV-mediated fetal pathogenesis are not fully understood.

Lipids are highly diverse cell components that play a central role in maintaining appropriate cellular functions, including membrane structure, energy sources, and signal transduction. Alteration in lipid metabolic pathways is a leading cause of many human diseases<sup>5,6</sup>. The fetal placenta is an autonomous organ endowed with an extraordinary high lipid content and metabolic rate to support fetal development. Mounting evidence links alteration of the placental lipid metabolism to the etiology of many “great obstetrical syndromes” including gestational diabetes mellitus (GDM), miscarriage, congenital disorders, fetal growth restriction (FGR), and pre-eclampsia<sup>7–9</sup>.

Lipid droplets (LDs) are fat storage organelles derived from the endoplasmic reticulum (ER) membrane under conditions of fatty acids excess. In contrast to other cellular organelles, LDs are composed of a neutral lipid core surrounded by a monolayer of phospholipids (PLs) harboring coat proteins and lipid metabolism enzymes<sup>10</sup>. The ER-resident diacylglycerol acyltransferase 1 (DGAT1) is central for LD biogenesis<sup>11,12</sup>. LDs make contact with many organelles to supply necessary lipids for energy production, membrane biogenesis, and intracellular vesicle trafficking. LDs also act as regulatory hubs to prevent lipotoxicity and maintain lipid homeostasis. The impairment of their protective cellular response has been associated with metabolic disorders<sup>13</sup>. Despite differences in their transmission mode, single-stranded positive RNA viruses hijack the ER membrane network and subvert lipid homeostatic pathways to build specific endomembrane organelles for viral replication (ROs). Both viral and host factors are supposed to be concentrated in ROs to facilitate assembly and shield nascent virions from immune assaults<sup>14,15</sup>. Increased knowledge about virus–host interactions and the role of host lipid metabolism prompted the development of therapeutic strategies that have been proven effective alternatives in controlling viral pathogenesis in many model systems<sup>16,17</sup>.

Lipids are also a repository of potent bioactive mediators, such as eicosanoids. Eicosanoids are derived from long-chain polyunsaturated fatty acids (PUFAs) through a complex pathway<sup>18</sup>. Similar to cytokines, bioactive lipid mediators (LMs) constitute a finely tuned and complex lipid signaling network that regulates homeostatic and inflammatory processes. Whilst some LMs have been implicated in the control and clearance of viral pathogens<sup>19,20</sup>, it remains unclear how ZIKV infection would affect the biosynthesis of placental lipid metabolites and perturb the homeostatic equilibrium of the placental barrier. Given the central role of lipids in fetal and placental development, dysregulation of this signaling network is very likely to contribute to placental inflammation and adverse pregnancy outcomes<sup>21,22</sup>. Unraveling such a mechanism would open new avenues for therapeutic strategies to prevent congenital ZIKV syndrome.

In this study, we used large-scale quantitative metabolomics to investigate the impact of ZIKV on human placenta during early pregnancy. We demonstrate that ZIKV reprograms the placenta lipidome to accommodate viral life cycle. We also provide evidence that loss of metabolic homeostasis is associated with mitochondrial dysfunction and imbalance in the pro-/anti-

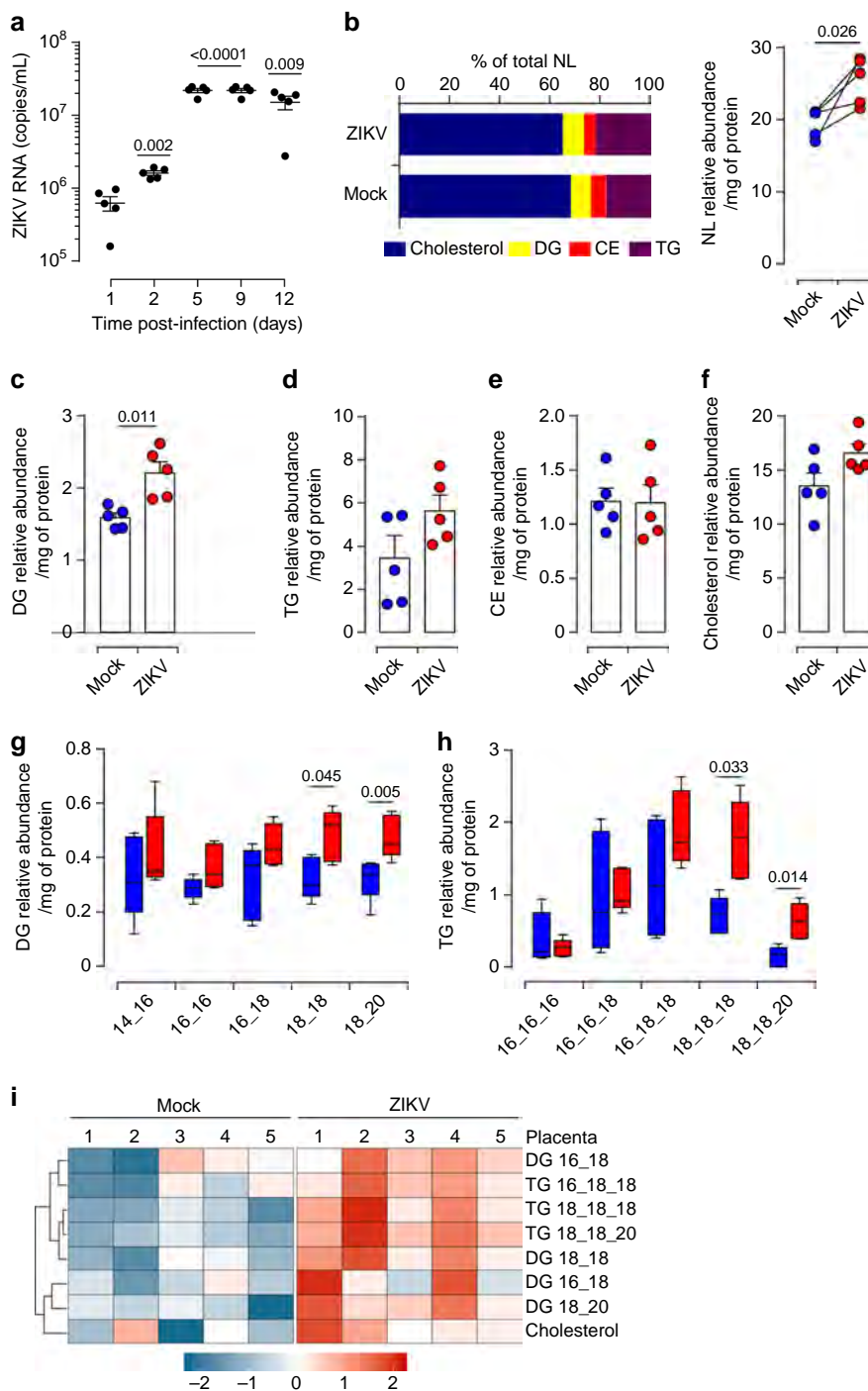
inflammatory equilibrium that characterize severe pregnancy outcomes. Our findings uncover a potential mechanism by which ZIKV overcomes the barrier function of the fetal placenta and may have important implications for the development of therapies for a wide range of placental diseases.

## Results

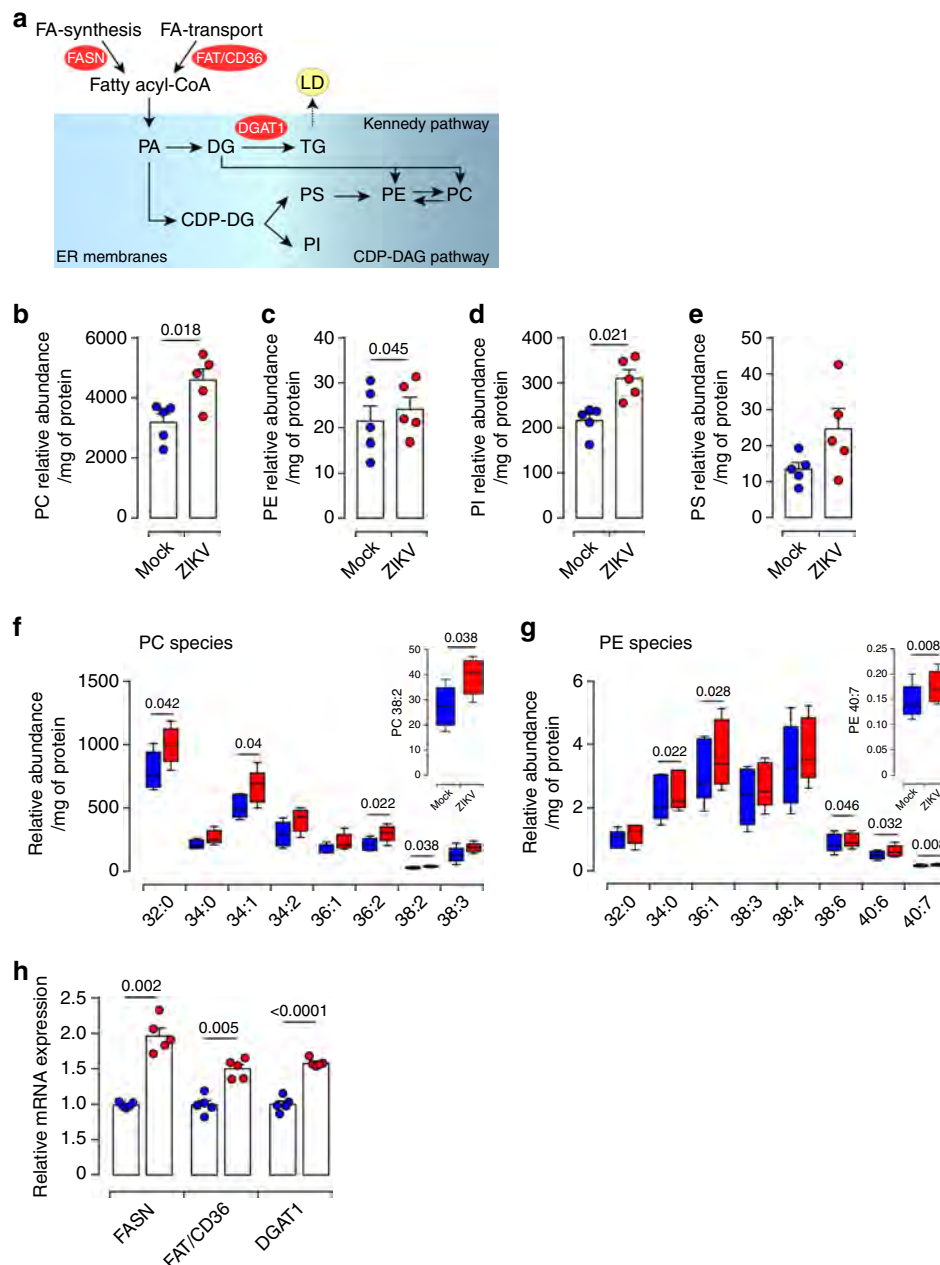
**ZIKV infection adjusts placental neutral lipids.** Metabolic reprogramming is a well-recognized hallmark of human disease including the great obstetrical syndromes linked to placental dysfunction<sup>9,23</sup>. Although congenital ZIKV infection can presumably occur at different gestational ages, severe sequelae have been linked to infection during early pregnancy<sup>1,24,25</sup>. To determine whether ZIKV perturbs the metabolic status of the fetal placenta, we therefore used first trimester pregnancy samples. Placentas were challenged with the Asian strain (KU886298) of ZIKV at  $6 \times 10^{10}$  RNA copies/mL (equivalent to a MOI of 1) obtained from the second passage in Vero cells<sup>3,26–28</sup>. The kinetic of infection was followed by quantification of viral RNA in culture supernatants. The maximum increase of ZIKV RNA was reached within 5 days of infection (Fig. 1a). We next subjected matched mock- and 5 day infected whole tissue samples to large-scale quantitative shotgun lipidomic coupled to mass spectrometry analyses. We analyzed four major groups of neutral lipids: cholesterol, diacylglycerols (DG), cholesterol ester (CE) and triacylglycerols (TG). Cholesterol occupies more than 65% of total placenta neutral lipids whereas aggregated DG and TG account only for ~30% (Fig. 1b). ZIKV-infected placentas displayed significantly higher amounts of total neutral lipids without changing their global distribution within different groups. Further analysis of independent groups revealed that the infection significantly increases the amount of DG and induces a tendency of higher TG and cholesterol contents without affecting CE (Fig. 1c–f). Given the importance of DG and TG in lipid homeostasis, we next examined the impact of viral infection on their related subspecies. Despite variability between donors, ZIKV infection significantly enhanced the relative abundance of subspecies with long acyl-chains containing 18 or more carbons in their tails, namely DG (18\_18), DG (18\_20), TG (18\_18\_18) and TG (18\_18\_20) (Fig. 1g, h). Hierarchical clustering using an algorithm that allows grouping of similar samples based on the pattern of relative abundance, heatmap, indicated that ZIKV-infected placentas nurture significant enhancement of differential neutral lipid species (Fig. 1i).

**ZIKV infection alters the biogenesis of PLs.** PLs are central for cellular membranes functionality since they provide adequate fluidity, vesicular traffic, molecular transport, and biosynthesis<sup>29,30</sup>. Phosphatidic acid (PA) and its product, DG, are the main precursors for PL synthesis through the Kennedy or CDP-DAG pathways (Fig. 2a, schematic summary). Therefore, we investigated the impact of ZIKV infection on placental PL metabolism. Matched mock- and ZIKV-infected Placentas were subjected to Bligh and Dyer’s extraction followed by LC-MS/MS quantification. In human placenta, phosphatidylcholine (PC) constitutes ~63% of total placental PLs, whereas sphingomyelin (SM) represents only ~23% and other PLs species <10% (Supplementary Fig. 1). Compatible analysis revealed significant upregulation of the relative abundance of PC, phosphatidylethanolamine (PE) and phosphatidylinositol (PI) species in ZIKV-infected samples (Fig. 2b–d). Although it did not reach significance, the phosphatidylserine (PS) group was also increased by the infection (Fig. 2e). No effect was observed for ceramide (Cer) or SM subspecies (Supplementary Fig. 2).





**Fig. 1 ZIKV infection impairs placental neutral lipid metabolism.** **a** Culture supernatants are collected from five independent ZIKV-infected first trimester placentas following the indicated time. Viral load is determined by qRT-PCR. **b** Neutral lipids (NL) are extracted from matched mock- and ZIKV-infected first trimester placentas 5 days post-infection (dpi). Four major neutral lipids, cholesterol, diacylglycerol (DG), cholesteryl ester (CE) and triglyceride (TG), were determined in human placenta. Quantification of neutral lipid species was achieved by comparison of the peak area of individual species relative to their class-specific internal standards. Values are normalized based on the protein level for each sample. Relative abundance of NL is calculated as the sum of DG, TG, CE, and Cholesterol amounts. **c-f** Quantification of DG, TG, CE, and cholesterol. Relative abundance of DG, TG, and CE represents the total abundance of the different subspecies in each group. **g-h** Quantification of DG and TG subspecies characterized by the number of carbon atoms in each acyl chain. Mock samples are depicted as blue bars and ZIKV-infected samples as red bars in the graph. Boxplot: boxplot medians (center lines), interquartile ranges (box ranges), whisker ranges. **i** Heatmap representing relative abundance profile of NL subspecies. Each column represents a single donor and each row corresponds to a single sub-specie of neutral lipids. All the data sets are presented as mean values  $\pm$  SEM of first trimester placentas from five independent donors. *P* values are computed using paired two-tailed Student's *t* test. Source data are provided as a Source Data file.



**Fig. 2 ZIKV infection perturbs the phospholipid placental profile.** **a** Simplified schematic overview of the phospholipid (PL) metabolism pathways. Fatty acid (FA), phosphatidic acid (PA), cytidine diphosphate diacylglycerol (CDP-DAG). Lipid droplet (LD). Fatty acid synthase (FASN) catalyzes FA de novo lipid synthesis. The transporter FAT/CD36 assists in FA uptake from the exogenous environment. The ER-resident diacylglycerol acyltransferase 1 (DGAT1), an essential enzyme for LD biogenesis, catalyzes the final step in TG biosynthesis. **b-g** PLs were extracted from mock or ZIKV-infected placenta explants 5 dpi and subjected to LC-MS/MS analysis. Quantification of PL species was achieved by comparison of the peak area of individual species relative to their class-specific internal standards. Values are normalized based on the protein level for each sample. The relative abundance of PL species is calculated as the sum of subspecies within different subgroups. **b** Phosphatidylcholine (PC), **c** phosphatidylethanolamine (PE), **d** phosphatidylinositol (PI), **e** phosphatidylserine (PS). **f-g** Relative abundance of differentially altered phospholipid subspecies from PC (**f**) and PE (**g**). Boxplot: boxplot medians (center lines), interquartile ranges (box ranges), whisker ranges. **h** Total RNA extracted from matched mock- and ZIKV-infected first trimester placentas at 5 dpi. The mRNA expression levels were determined by qRT-PCR. Mock-infected placenta (blue) and ZIKV-infected (red). Results are presented as mean values  $\pm$  SEM of first trimester placentas from five independent donors. *P* values are computed using paired two-tailed Student's *t* test. Source data are provided as a Source Data file.

Further profiling of individual subspecies revealed PC32:0 as the most abundant among 19 molecular subspecies detected in the PC group and identified a total of 16 molecular subspecies within the PE group with much lower abundance compared to the PC group (Supplementary Fig. 3). Most of ZIKV-increased

PC and PE subspecies displayed long-chain fatty acids with unsaturated structure (C32–C40) (Fig. 2f, g).

In a given membrane, even slight alterations to PL content can significantly change physical properties including spontaneous curvature, fluidity and permeability<sup>31,32</sup>. In this context, the

observed alterations in the biogenesis of individual PL subspecies suggest that ZIKV, through reprogramming of the lipid metabolome, may crucially impact the architecture of placental membranes increasing fluidity and permeability.

**ZIKV impairs placental lipid homeostasis.** To determine which pathways are responsible for ZIKV-induced placental metabolic alterations, we investigated expression levels of three essential enzymes: FASN (fatty acid synthase) which is central for de novo synthesis of fatty acid (FA), FAT/CD36 (fatty acid translocase), which facilitates FA transport and DGAT1, which is involved in LD biogenesis (Fig. 2a). Our analysis revealed that *FASN* and *FAT/CD36* mRNA levels are significantly increased in ZIKV-infected placentas compared to mock-infected samples (Fig. 2h).

The increase in *FASN* and *FAT/CD36* expression will enhance de novo synthesis of FAs and facilitate the transport of long-chain FAs from extracellular media for placental lipogenesis. Similar to *FASN* and *FAT/CD36*, we also detected significant increases of *DGAT1* mRNA levels in ZIKV-infected placentas which can promote TG synthesis. Our observations illuminate diverse pathways that ZIKV exploit to satisfy lipid needs namely FA synthesis and transport, and storage in LDs.

**Placental LDs are tangled during ZIKV Infection.** To provide insights into a possible role of LDs during ZIKV infection, we examined the distribution and morphology of these organelles in ZIKV-infected placenta. LDs were visualized in placental thin sections with the BODIPY 493/503 dye which stains the LD core. Trophoblast cells were visualized by immunostaining of cytokeratin 7 (CK7). ZIKV infection was detected with antibody against the NS3 viral protein. We found that small size LDs were distributed throughout mock-infected tissue sections, both in CK7 positive and negative cells. In contrast, the majority of LDs accumulates around infected focal sites within ZIKV-infected placental villi (Fig. 3a). In addition, large amounts of LDs were found in uninfected neighboring cells.

To further characterize the effect of ZIKV on placental LDs, we performed immunohistochemistry (IHC) on frozen thin sections from mock- or ZIKV-infected placentas. LDs were visualized with Oil Red O (ORO) and nuclei with hematoxylin staining (Fig. 3b). Our analysis showed that ZIKV infection induces large amounts of LDs with a nearly 1.7-fold increase in global distribution (Fig. 3c). The increase in LD distribution was also associated with major changes of the placental tissue architecture illustrated by morphometric alterations to the stroma and syncytiotrophoblast (STB) outer layer of the villi (Fig. 3b). Taken together, these findings demonstrate that ZIKV induces upregulation of the placental LD biosynthesis and further provide meaningful insights into the enhancement of DG and TG subspecies during the infection.

**ZIKV induces LD accumulation and morphological changes.**

To gain further insights into the mechanisms that underlie changes in LD morphology during ZIKV infection, we analyzed quantities and size distribution of LDs at the cellular level. Viral infection was visualized with anti-Flavivirus envelope group antigen antibody (anti-Env) or anti-NS3 antibody staining (Fig. 4 and Supplementary Fig. 4). LDs were labeled with the ORO or BODIPY 493/503 dye. ZIKV-infected cells accumulated large numbers of LDs with a significantly larger morphometric area (Fig. 4a and Supplementary Fig. 4a). Both the number and average volume of LDs were significantly increased by the infection (Fig. 4b and Supplementary Fig. 4b). Further stratification of LDs according to their size distribution and evaluation of the percentage in each diameter range revealed an average size

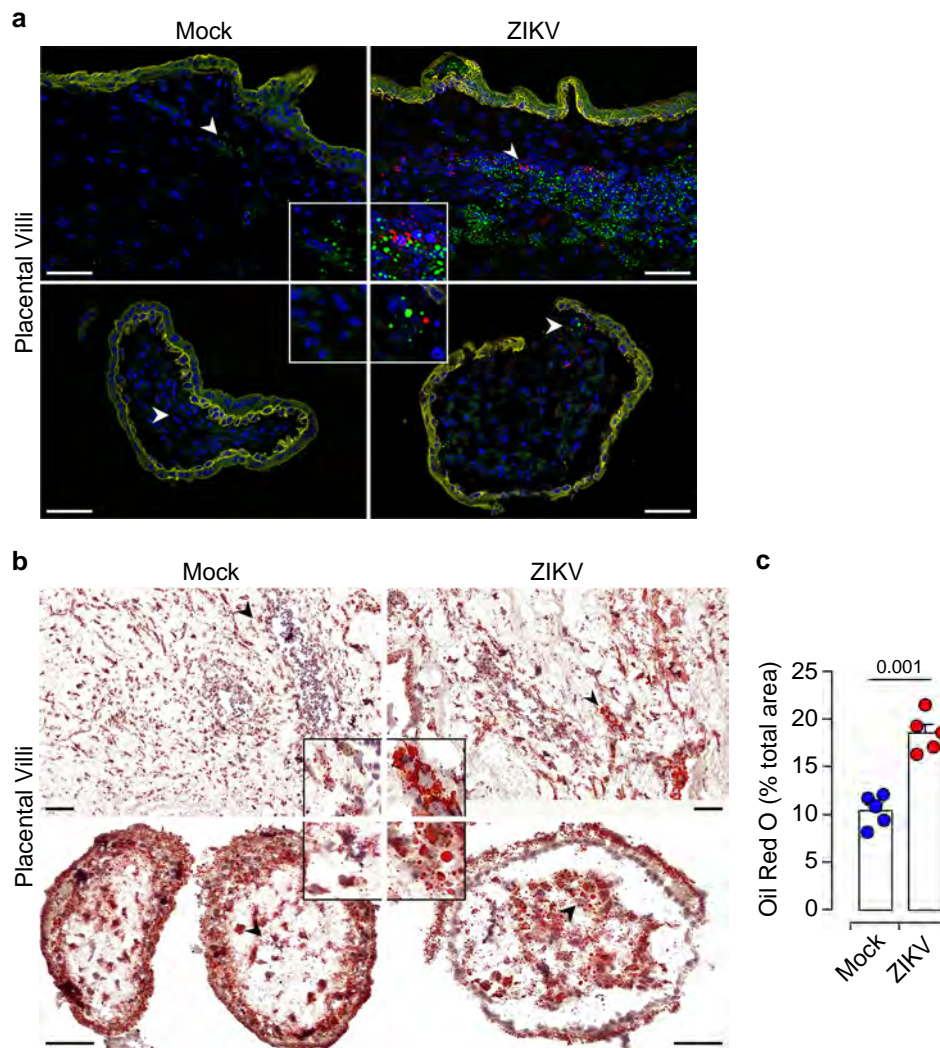
of approximately 1  $\mu\text{m}$ , although other sizes were also observed. Compared to mock-infected cells, ZIKV infection significantly decreased the percentage of small size LDs (<1  $\mu\text{m}$ ) and increased the percentage of large LDs (>1.5  $\mu\text{m}$ ) (Supplementary Fig. 4c). The shift in size with the accumulation of larger size organelles was even greater 5 day post-infection (dpi) (Fig. 4b, right panel). These findings indicate that ZIKV infection changes LD dynamics with respect to their size and number. This phenomenon is triggered either by fusion of several LDs or by organelle growth through integration of excess lipogenesis. We also observed an increase of the LD amount and size in uninfected neighboring cells suggesting a bystander effect.

In addition to trophoblast, the unique cell type of the placenta, the villous core contains mesenchymal/fibroblastic-like stem cells that contribute to the global architecture<sup>33</sup>. To determine whether a specific cell type support modulation of LD morphogenesis, we performed co-immunofluorescence staining of viral proteins, CK7 and LD. Morphological analysis indicated that ZIKV infection induces the accumulation of large size LDs in both trophoblast and stromal cells (Fig. 4c, d and Supplementary Fig. 4d). Three-D reconstitution model revealed that most of the large size LDs aggregate close to ZIKV viral particles, as evidenced by anti-Env staining (Fig. 4c, d, lower panels). Consistent with immunofluorescence, ultrastructural analysis using transmission electron microscopy (TEM) depicted abundant accumulation of LDs near the ER sheets in ZIKV-infected cells relative to mock-infected cells (Fig. 4e). Within the ER lumen, we detected LD surrounded by a large number of viral particles and connected with mitochondria (Fig. 4e, right panel). The juxtaposition of LDs with viral particles further highlights their involvement in the virus life cycle. Furthermore, the close connection between LD and mitochondria is likely to facilitate material exchange between these key organelles. Thus, ZIKV infection occurs in trophoblast and stromal cells and likely impairs LD morphology to support viral genome replication and/or assembly of progeny virions.

**ZIKV modulates LDs in both infected and bystander cells.**

Since bystander effects during pathogen infections underlies progression to advanced diseases, we extended our investigations to uninfected neighboring cells. We, therefore, examined the spatial distribution of LDs in uninfected neighboring placental cells at 3 and 5 dpi. LD content was determined by immunofluorescence in Env<sup>+</sup> infected cells and Env<sup>-</sup> cells. Neighboring cells harbored a considerable number of LDs which is even higher than that of infected cells (Fig. 5a and Supplementary Fig. 5a). Further quantification analysis showed that these bystander cells did not only contain higher amounts but also larger size LDs than infected cells expressing the viral envelope (Fig. 5b). Increased LD morphometric parameters in bystander cells were also observed at early infection time points (3 dpi) (Supplementary Fig. 5b).

Bystander effects of a variety of viruses implicate the establishment of intercellular channels within the gap junction, which play a central role in coordinating metabolic changes of neighboring cells, but also can implicate soluble mediators secreted by infected cells<sup>34–36</sup>. We thus tested this latter possibility by culturing freshly isolated placental cells with UV-irradiated conditioned medium harvested from ZIKV-infected placental cells (UV-ZIKV). Conditioned media from mock-infected cells were UV-irradiated and used as control (UV-Mock). Microscopic and quantitative analysis indicated remarkable LD accumulations in cells treated with UV-ZIKV compared to those treated with UV-Mock. Both the amount and the size of LDs were significantly increased in the presence of UV-ZIKV treated samples (Fig. 5c, d).



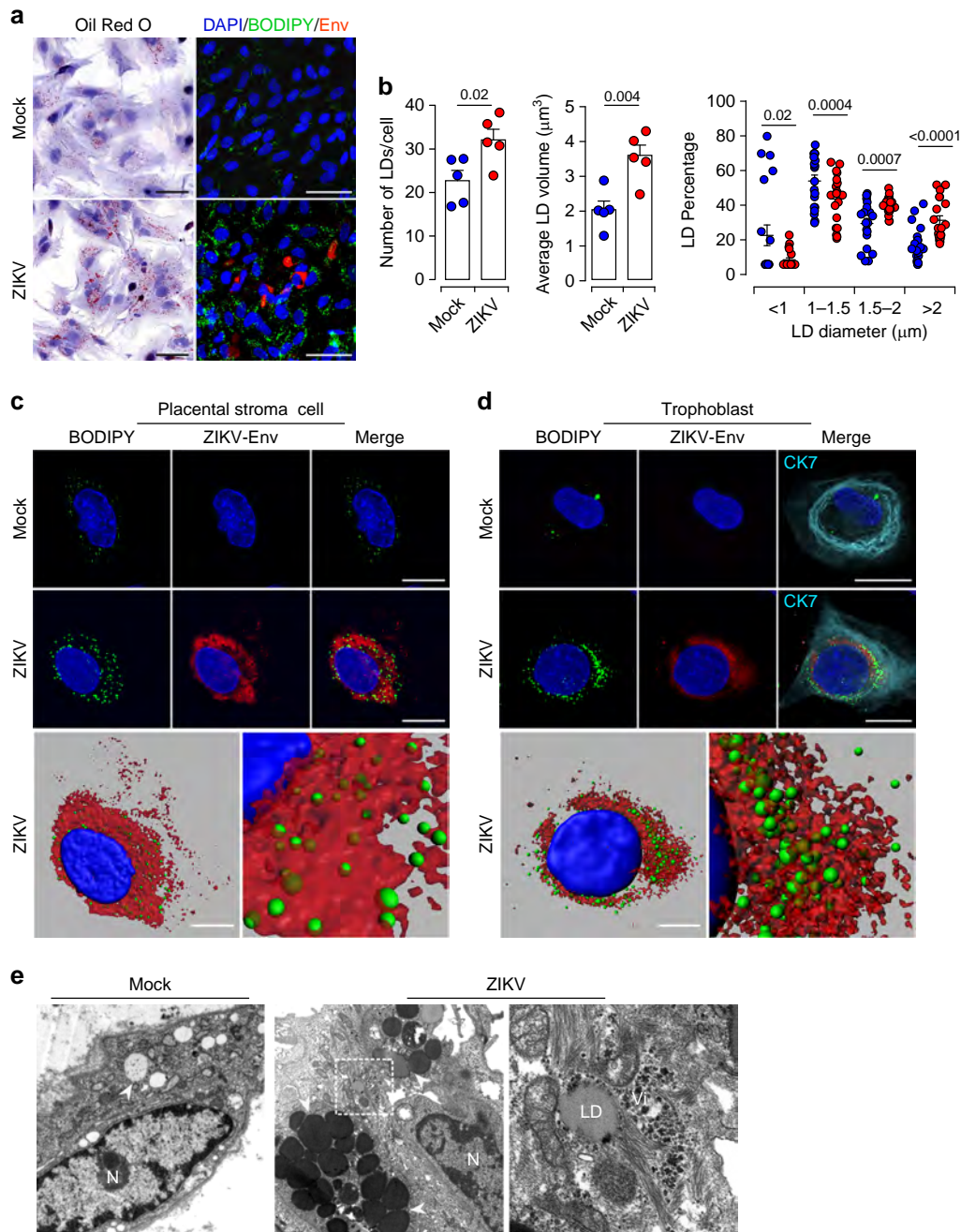
**Fig. 3 Accumulation of LDs in ZIKV-infected placenta.** **a** Representative thin sections of matched mock and ZIKV-infected placentas 5 dpi. Immunostaining is performed with anti-NS3 (red) and anti-CK7 (yellow) antibodies. LDs are stained with the BODIPY 493/503 dye (green) and nuclei with DAPI (blue). High magnification of the indicated area (arrowhead) is shown in insets. Scale bar, 50  $\mu$ m. Data are representative of at least three independent experiments. **b** Oil Red O staining of neutral lipid in tissue sections from matched mock- and ZIKV-infected placenta (red). Nuclei are counterstained with hematoxylin. High-magnification images of the indicated area (arrowhead) are shown in insets. Scale bar, 50  $\mu$ m. **c** Quantification of Oil Red O staining by Image J showing increased staining area in the infected placental sections. All data are presented as mean  $\pm$  SEM of first trimester placentas from five independent donors. *P* values are computed using paired two-tailed Student's *t* test. Source data are provided as a Source Data file.

Thus, ZIKV infection does not only directly regulate the lipid metabolism to support the virus life cycle but also induces bystander effect through gap junction exchange of cellular components or paracrine pathways, which may further emphasize the critical role of LD alterations in viral pathogenesis.

**ZIKV exploits LDs for genome replication.** The ER-resident DGAT1 enzyme, which is essential to LD biogenesis, plays a central role in the formation of Hepatitis C (HCV) particles<sup>37,38</sup>. We, therefore, hypothesize that ZIKV-induced morphometric changes of LDs are necessary for the virus life cycle. To test the involvement of these lipid regulatory hubs in viral replication, we used the pharmacological inhibitor A922500 (DGAT1i) to block the enzymatic activity of DGAT1 and inhibit the conversion of FAs to TGs (Supplementary Fig. 6). Freshly isolated placental cells were treated with different concentrations of DGAT1i for 5 days. As expected, immunofluorescence analysis using the BODIPY 493/503 dye demonstrated that compared to DMSO

control, DGAT1i treatment of placental cells substantially reduced the LD amounts without impairing the cell viability even in the presence of the highest concentration (5  $\mu$ M) (Supplementary Fig. 6b, c). Next, we examined the impact of DGAT1i during ZIKV infection. To this end, placental cells were challenged with ZIKV in the presence of different concentrations of the inhibitor. The spatiotemporal distribution of LD was analyzed 5 dpi by immunofluorescence (Fig. 6a, b). Compared to DMSO control, cells treated with DGAT1i harbor only scarce LDs. Further morphometric quantification revealed that both the number and average volume of LDs are significantly reduced in the presence of DGAT1i. The impairment of LD dynamics was associated with a lower infection rate.

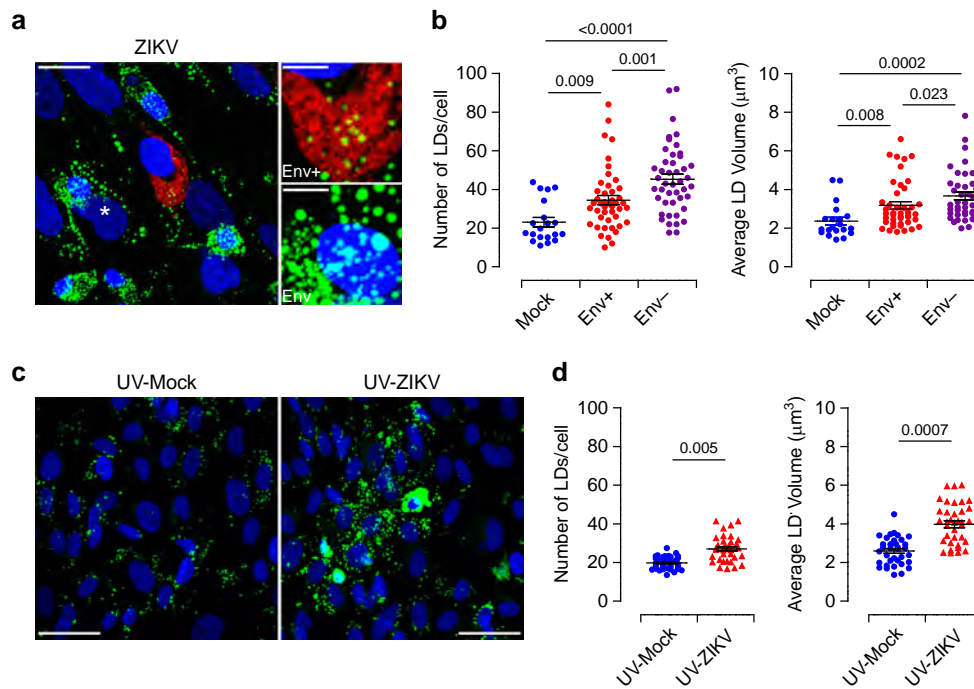
To further ascertain the role of LDs in ZIKV life cycle, we investigated whether inhibition of LD formation impacts infectious particle production. We determined the production of infectious particles using plaque assay (Fig. 6c, d). Consistent with our immunofluorescence analysis, inhibition of DGAT1 enzymatic activity significantly reduced the production of



**Fig. 4 Alterations of LD morphometric features by ZIKV infection of primary placental cells.** Matched freshly isolated placental cells are mock- or infected with ZIKV at MOI of 1 for 5 days. **a** Oil Red O staining (Left panel). Co-immunostaining of LDs with the BODIPY 493/503 dye (green), anti-Flavivirus group antigen antibodies (Env, red), and nuclei (DAPI in blue) (Right panel). Scale bar 50  $\mu\text{m}$ . **b** Quantification of LD number per cell, average volume and diameter distribution by Imaris software. LD morphometric features are analyzed in more than 400 cells for each placenta from five independent donors. *P* values are computed using two-tailed Student's *t* test. **c-d** Representative confocal images with high magnification of Z-stack projections. stromal cell (**c**), CK7 positive trophoblast cell (**d**). BODIPY 493/503 (green), Env (red), cytokeratin 7 (CK7 in cyan) and nuclei (DAPI in blue). Scale bar, 20  $\mu\text{m}$ . Bottom panels showing 3D models and higher magnification focus on ZIKV-infected placenta stromal cell (**c**) and trophoblast cell (**d**). Scale bar, 10  $\mu\text{m}$ . **e** Representative TEM micrographs showing LDs in (**a**) mock- and (**b**) ZIKV-infected placental cells (white arrowheads), nucleus (N). Scale bar, 2  $\mu\text{m}$ . **c** High magnification of the white square delineated area in (**b**) with a concentration of LDs around a large amount of viral particles (Vi). Scale bar, 500 nm. Data are representative of at least three independent experiments. Source data are provided as a Source Data file.

infectious particles in a dose depend-manner. We observed more than 200x fold decrease in viral production with 5  $\mu\text{M}$  DGAT1i treatment, compared to DMSO controls (Fig. 6d). Our findings demonstrate that specific blockade of DGAT1 enzymatic activity disrupts the biogenesis of LDs and thereby hinders the virus life cycle.

**ZIKV-infected cell exhibits intracellular membrane rearrangement.** Manipulating the distribution of lipids to build highly complex membranous webs, ROs, is a trademark of positive-stranded RNA viruses. The enrichment of lipid species with complex structures in infected placentas prompted us to investigate next whether ZIKV induces membrane remodeling to build



**Fig. 5 Bystander effect of ZIKV infection on LD biogenesis.** Placental cells were infected with ZIKV MOI of 1 for five days. **a** LD staining with the BODIPY 493/503 dye (green), anti-Flavivirus group antigen antibodies (Env) staining distinguishes ZIKV<sup>+</sup> (red) from ZIKV<sup>-</sup> bystander cells (asterisk). High-magnification images of LD are shown in the right panels. Scale bar, 20  $\mu\text{m}$ . High magnification image insets showing LDs in both ZIKV<sup>+</sup> (Env<sup>+</sup>) and ZIKV<sup>-</sup> (Env<sup>-</sup>) bystander. Scale bar, 5  $\mu\text{m}$ . **b** Morphometric measurements of LD number and volume based on Z-stack projections of confocal images. Data from five different donors are shown as dot plot graphs. Each data point represents the average number of LDs per cell and average volume from mock (blue) and ZIKV-infected cells (red) or bystander neighboring cells (violet). Results are presented as mean values  $\pm$  SEM and analyzed by one-way ANOVA, with Dunnett's multiple comparison test. **c** Supernatants from mock- or ZIKV-infected primary placental cells were collected from five independent donors 5 dpi and UV-irradiated. Freshly isolated placental cells are challenged with the UV-irradiated supernatants for 3 days. Immunofluorescence staining of LDs with the BODIPY 493/503 dye (green), ZIKV Env protein (red) and nuclei (DAPI in blue). Scale bar, 50  $\mu\text{m}$ . **d** LD number and volume analysis by Imaris software. Each data point represents the average number of LDs per cells and average volume from Mock- (blue) and ZIKV+ cells (red). Results are presented as mean values  $\pm$  SEM and analyzed by two-tailed Student's *t* test. Source data are provided as a Source Data file.

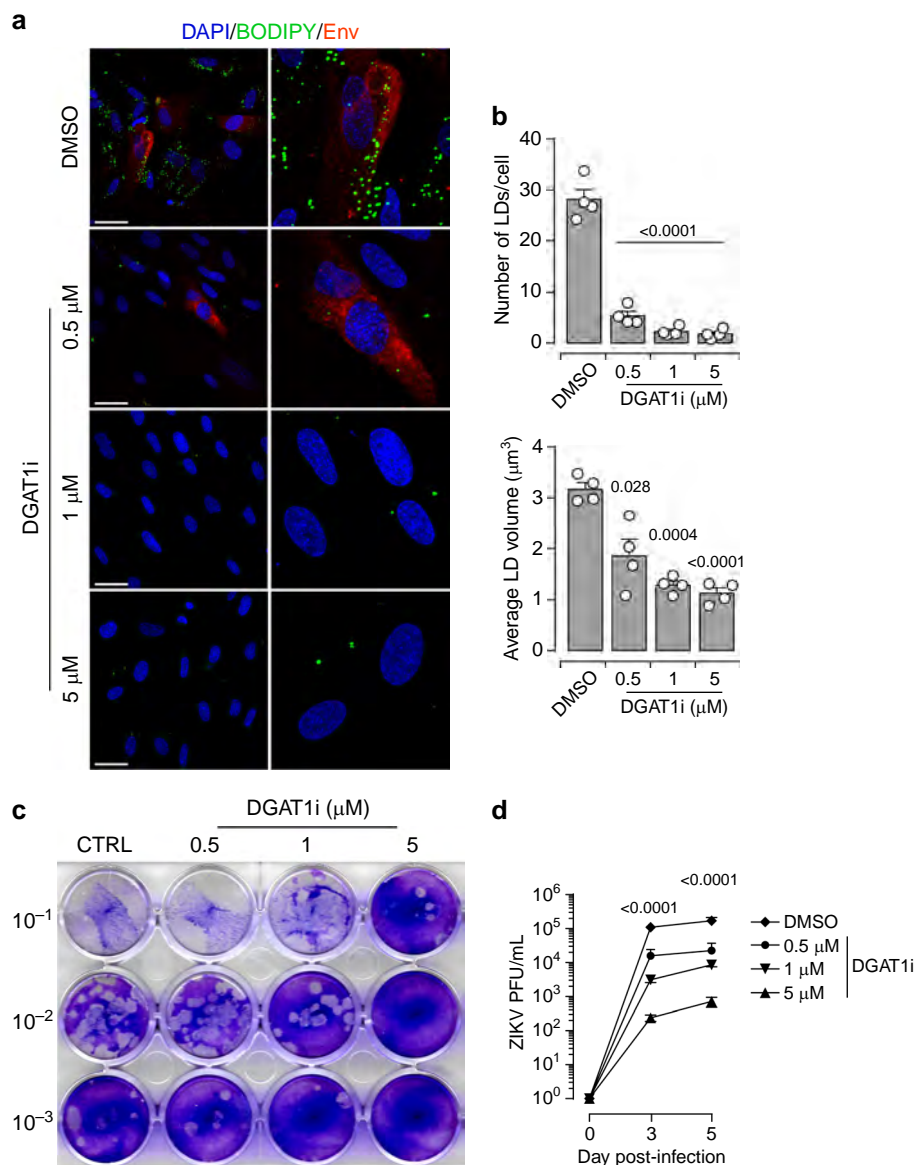
ROs. High-resolution TEM revealed the presence of convoluted membranes (CMs) and vesicle packets in the perinuclear region of infected trophoblast cells (Fig. 7a). A large number of viral particles were found within the ER lumen with an apposition of multiple viral-induced vesicular structures (Ve). These ZIKV-induced vesicular structures were heterogeneous in size (50–130 nm) but the majority of them were within a narrow diameter range of 90–110 nm (Fig. 7b). Similar structures housing viral RNA and proteins were previously found in Flavivirus infected hepatoblastoma cell line<sup>39–41</sup>. We also found spherical Ve either directly linked with viral particles or tightly connected with virion bags containing large clusters of assembled viral particles (Fig. 7c). Ve were connected with each other directly via pores (arrowhead) and occasionally with membrane tubes (T). These membrane structures are likely to convey cytoplasmic constituents to Ve and release of newly synthesized viral RNA in the cytoplasm as has been reported for West Nile virus (WNV)<sup>39</sup>.

Mitochondrial and ER-associated membranes (MAM) are well-recognized sites for ATP synthesis, lipogenesis and export as well as for viral replication<sup>14,42</sup>. Viral particles were present within the ER lumen closely associated with mitochondria (Fig. 7d). We also found viral particles at the tip of the Golgi apparatus cisternae (arrow) indicating their transfer to the trans-Golgi network (TGN) for maturation. Elongated mitochondria were located near the Golgi apparatus (G). Finally, budding of progeny virions occurred through the genesis of microvesicles containing large clusters of viral particles (Fig. 7e), which are then released as

300–500 nm diameter bi-layer lipid membrane-surrounded extracellular vesicles (EV).

Together, these ultrastructure observations demonstrate that ZIKV provokes intracellular membrane rearrangements providing topological evidence of the placental differential metabolic reprogramming. To the best of our knowledge, this is the first report highlighting usurpation of the placental extracellular vesicular pathway by ZIKV for budding of progeny virions.

**ZIKV infection induces mitochondrial dysfunction.** Mitochondria are essential organelles involved in the sensing of metabolic homeostasis and communication with other cellular organelles such as LDs or peroxisomes. Alterations to placental mitochondria functions have been associated with compromised human pregnancies<sup>43–45</sup>. Therefore, we further addressed the impact of ZIKV infection on mitochondria functions. Mito-Tracker and ZIKV envelope co-staining was used to investigate the mitochondrial morphodynamics in mock- and ZIKV-infected placental cells. Compared to mock cells, where the mitochondria showed a classic distribution, the mitochondria network was completely disrupted by ZIKV infection and linear connected mitochondria intermingling with the Env-positive viral particles (Fig. 8a). 3D-modeling further highlighted the distortion of the mitochondrial network in ZIKV-infected cells. Further ultrastructure analysis using TEM showed long size mitochondria located near large clusters of viral particles (Fig. 8a). Compared to



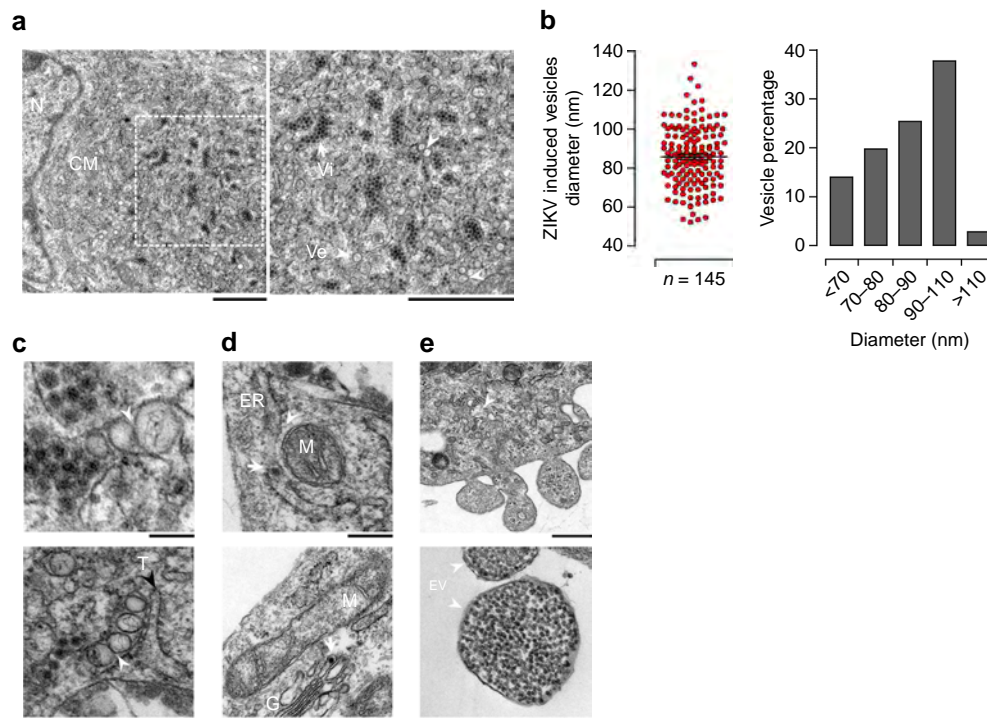
**Fig. 6 DGAT1 activity and LD formation are required for ZIKV life cycle.** Primary placental cells were pre-treated for 30 min with different concentrations of DGAT1i (0.5  $\mu\text{M}$ , 1  $\mu\text{M}$ , 5  $\mu\text{M}$ ), then cells were infected with ZIKV MOI of 1 up to 5 days in the presence of the DGAT1i. For the control, the cells treated with the same concentration of DMSO. **a** After ZIKV infection, the cells were co-immunostained for with the BODIPY 493/503 dye (green), envelope group antigen (Env in red), and nuclei (DAPI in blue). High-magnitude images are shown right panel, Scale bar 50  $\mu\text{m}$ . **b** Quantification of LD amount per cell, the average volume of LD determined from 4 independent donors based on Z-stack projections of confocal images. Results are presented as mean values  $\pm$  SEM. *P*-value denote comparisons between DMSO control and DTAG1i treated cells, two-tailed Student's *t* test. **c** Cell-free supernatants of cultures from growth curve experiments of DGAT1 inhibition assay were collected. The supernatants were 10-fold serial dilutions and 100  $\mu\text{l}$  of diluted supernatant was incubated with Vero cells for plaque assay. **d** The kinetic of viral titers were determined based on plaque assay experiments. Data are presented as mean values  $\pm$  SEM from three independent donors. Stars denote comparisons between DMSO control and DTAG1i treated cells. *P* values are computed using two-way ANOVA, with Tukey's multiple comparison test. Source data are provided as a Source Data file.

mock cells, the morphology of mitochondria was altered in ZIKV-infected placental cells (Fig. 8a, enlargement in the right panel).

To further investigate the mitochondrial function, we performed mitochondrial stress tests to probe the respiratory and glycolytic capacities using Seahorse Bioanalyzer. The analysis revealed that ZIKV infection inhibits oxygen consumption rate (OCR) but did not significantly change the extracellular acidification rate (ECAR) (Fig. 8b). Further quantitative analysis demonstrated that ZIKV infection considerably decreased the basal, maximal, and spare respiratory capacity (SRC) as well as the ATP-coupled OCR (Fig. 8c).

These observations reveal that ZIKV disrupts both the mitochondria morphology and respiratory capacity probably to impairment of the cell  $\beta$ -oxidation process, which in return will lead to metabolic alterations and accumulation of lipids within the placental tissue.

**Dual storm of inflammatory LMs in infected placentas.** Many viral pathogens interfere with the host lipid metabolism to promote the infection and associated inflammatory consequences<sup>19,46,47</sup>. LDs provide a distinct site for the production of specific LMs, Eicosanoids, which regulate inflammatory signaling cascades<sup>18,48</sup>.



**Fig. 7 Ultrastructure analysis of ZIKV induces membrane rearrangements in placental cells.** **a** Representative TEM micrographs of 5 dpi ZIKV-infected placental cells. Convoluted membrane within ER lumen (CM) are localized next to the nucleus (N) shown in left panel. White rectangle denotes the enlarged region shown in right magnification panel. Large number of single membrane cisterna containing aggregated virions (Vi) which closely associated with virus-induced vesicles (Ve) are shown the right magnification panel. Arrowheads and arrows point to Ve and Vi, respectively. Scale bar, 1  $\mu$ m. **b** Diameter of ZIKV-induced vesicles is shown in the left panel. The size distribution of Ve is shown in the right panel ( $n = 145$ ) per ZIKV-infected placenta cells. Results are presented as mean values  $\pm$  SEM. **c** Representative images of ZIKV-infected placental cells showing the localization of intracellular organelles depicted in ZIKV-infected cells (**a–f**). **a, b** Ve connected to each other through pores are indicated by white arrowheads. Scale bar, 100 nm. **c, d** Endoplasmic reticulum (ER) containing virions (Vi) are indicated by the white arrow, mitochondrion (M) and mitochondria-associated-membrane structures (white arrowhead) are shown, Golgi apparatus (G). **e, f** Representative micrographs showing viral budding from infected placenta cells and extracellular vesicles (EV) containing a large amount of viral particles are indicated with arrowheads. Scale bars, (**a–d**) 200 nm, (**e**) 500 nm, and (**f**) 200 nm. Data are representative of at least three independent experiments. Source data are provided as a Source Data file.

Within this context, we performed large-scale profiling of bioactive LMs to disclose the link between viral-induced lipid metabolism reprogramming and mitochondrial dysfunction. Among the profiled PUFA-derived LMs and their pathway metabolites, 25 mediators were detected in first-trimester placentas (Fig. 9). Although at different levels, many bioactive LMs were significantly up-regulated by ZIKV infection. In particular, significant increases were observed in those derived from the cyclooxygenase (COX), lipoxygenase (LOX) and cytochrome P450 enzymes (CyP450) pathways, as well as in HDoHE products of the omega-3 eicosapentaenoic acid (EPA) and docosahexaenoic acid (DHA) (Fig. 9a, b).

To look into the global inflammatory status of infected placentas, these 25 bioactive LMs were further clustered according to their pro-/anti-inflammatory properties and presented as a heatmap (Fig. 9c). ZIKV infection enhanced the production of both pro-/anti-inflammatory bioactive LMs. Despite the variability among donors, the level of pro-inflammatory prostaglandins PGE2 and PGE2 $\alpha$  from the COX pathway and 5-Oxo-EETE from 5-LOX pathway were significantly increased in all tested placentas. Yet, this unbiased system approach also revealed that many LMs, known for their role in promoting the resolution of acute inflammatory responses, are also increased in the context of ZIKV infection. In particular, significant increases were observed for 12-HETE and 15-HETE from the 12-/15-LOX pathway, for the 8,9-EET of the CyP450 pathway as well as for the 14-HDoHE and 17-HDoHE bioactive products from DHA (Fig. 9a–c).

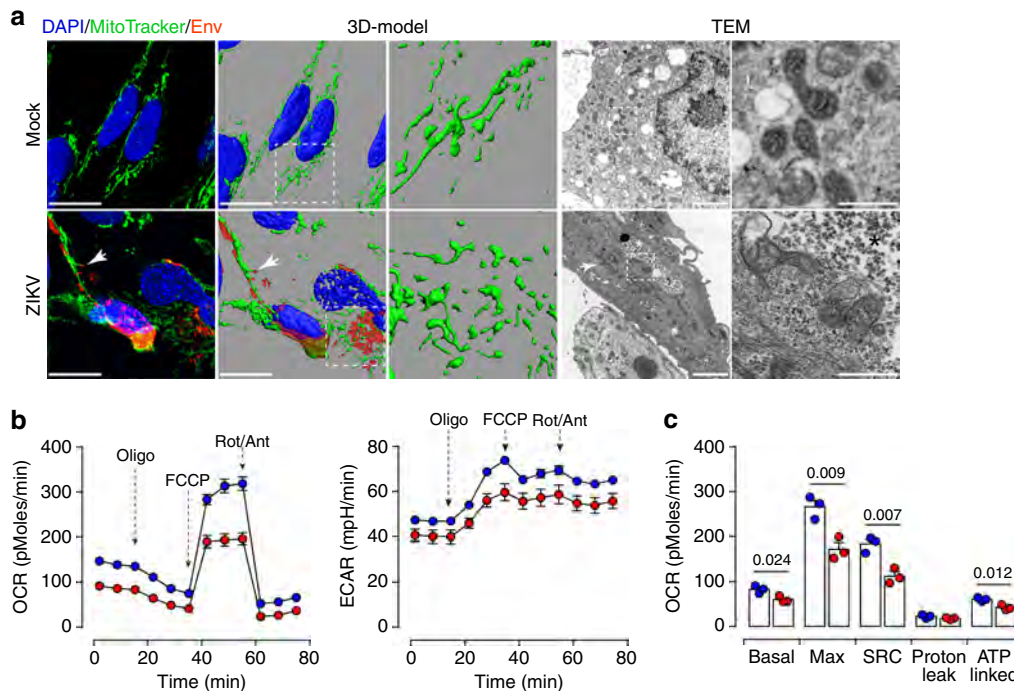
Accumulating evidence suggests that the occurrence of placental inflammation of either infectious or non-infectious origin can lead to placental dysfunction, and has been associated with obstetrical syndromes. Tilting the balance towards inflammatory response and regulating fetal trophoblast cell functions, might not only promote ZIKV survival but also impair the architecture of the developing fetal placenta. In support, Hematoxylin-Eosin (HE) staining revealed that while mock-infected placentas exhibited normal architecture of the chorionic villi, ZIKV-infected tissue showed significant disruption of the trophoblast layers evidenced by necrotic features such as pyknosis, karyorrhexis, and karyolysis (Supplementary Fig. 7a). Furthermore, we reviewed placenta from a congenital ZIKV case (10 weeks gestation). The placenta showed major changes in the architecture of the floating chorionic villi with a massive increase in CD68 positive Hofbauer cell number (Supplementary Fig. 7b).

Collectively, our findings evince a roadmap initiated by ZIKV reprogramming the lipid metabolome which would in turn induce disruption of the mitochondrial network and orchestrate a storm of immune mediators leading to fetal placental dysfunction.

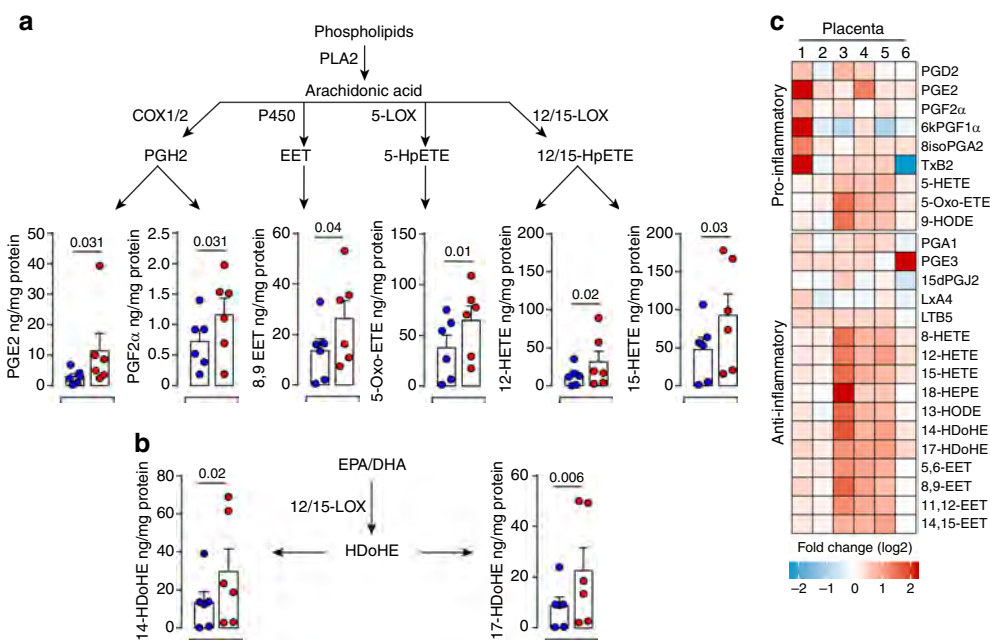
## Discussion

The fetal placenta has an extraordinary energy need and is undoubtedly the most metabolically demanding organ. While changes to the placental metabolism have been clearly associated





**Fig. 8 ZIKV infection impairs mitochondrial network distribution and respiratory capacities.** **a** Z-stack projection of confocal images from mock- and ZIKV-infected placental cells are stained with MitoTracker Deep Red FM (green) and anti-Flavivirus group antigen antibodies (Env, red). Nuclei are stained with DAPI (blue). 3D-view models are reconstructed by Imaris software. Scale bar, 20  $\mu$ m. TEM micrographs showing the distribution in mock- and ZIKV-infected cells. Elongated size mitochondria are found in ZIKV-infected cells (white arrow). Scale bar, 2  $\mu$ m. The white rectangle denotes the enlarged region shown in right magnification panels. Clustered viral particles (\*) are found in close proximity with abnormal mitochondria. Scale bar, 500 nm. **b** OCR measured in mock- and ZIKV-infected placental cells by Seahorse XFP analyzer. **c** Bar graphs comparing OCR parameters: basal, maximal and spare respiratory capacities (SRC), and ATP-linked OCR. Data are presented as mean values  $\pm$  SEM from three independent donors. *P* values are computed using two-tailed Student's *t* test. Source data are provided as a Source Data file.



**Fig. 9 ZIKV-induced inflammatory response contributes to placental dysfunction.** Bioactive lipids are extracted from mock- and 5 dpi ZIKV-infected placentas and analyzed by LC-MS/MS. Absolute quantification of selected eicosanoids derived from PLs through the phospholipase A2 (PLA2) was calculated based on the calibration curves of deuterated internal standards and normalized by the amount of protein in each sample. Quantities of lipids are presented as ng/mg of protein for each placenta sample. **a** Quantification of eicosanoids derived from the cyclooxygenase (COX), lipoxygenase (LOX), and cytochrome P450 (CYP450) pathways. **b** Quantification of eicosanoids derived from the EPA-DHA. **c** Heatmap representing fold change of lipid mediators segregated according to their role as pro-/anti-inflammatory. Each column represents individual placentas from six independent donors (1–6). Results are presented as mean values  $\pm$  SEM. *P* values are computed using paired two-tailed Student's *t* test. Source data are provided as a Source Data file.

with major pregnancy disorders, pre-eclampsia, FGR and GDM, their importance in the placenta's compensatory response to viral infections remains obscure. In this study, we made two primary contributions towards the understanding of ZIKV pathogenesis in early human pregnancy: (i) substantial adaptations of the fetal placental metabolism to meet the needs of viral replication and (ii) contextual associations between massive perturbation of the mitochondrial network, deep remodeling of the pro-/anti-inflammatory landscape and injury to the fetal placenta. To the best of our knowledge, this is the first study that links placental lipid metabolome and its associated inflammatory biomarkers to the degree of placental inflammation in ZIKV infection during pregnancy.

ZIKV infection triggered several adaptations to the placental lipid metabolism. These include enhancement of neutral lipids, specific PLs with long-fatty acid chains. During healthy pregnancy, lipids are commonly used for intracellular membrane biogenesis, energy storage directed down catabolic pathways or exported out of the placenta and become available to the developing fetus<sup>23,49,50</sup>. Here, we show that ZIKV-induced metabolic alterations impair the placental FA de novo synthesis and uptake pathway. Positive-stranded RNA viruses are able to mobilize FAs to increase lipid metabolism to build complex membrane structures for viral replication<sup>51</sup>. Our findings suggest that ZIKV-enhancement of FA transport/synthesis can be further stored in the LD core or processed to build ROs for the virus life cycle.

LDs are highly dynamic buffering organelles that regulate lipid homeostasis. Mature droplets engulfing sterol esters or TGs bud off the ER membranes to circumvent lipotoxicity in case of excessive amounts of lipids<sup>52,53</sup>. Many RNA viruses manipulate the LD biogenesis to favor viral genome replication and the production of progeny virions<sup>54,55</sup>. This is best exemplified by two members of the Flaviviridae family, HCV and DENV, which closely tangle with host cell LDs. Herein, ZIKV infection of placental tissue induces the accumulation of large size LDs. The growth of LD requires the integration of polar lipids, namely PLs and sterols, into the membrane layer and expansion of the hydrophobic central core by engulfment of neutral lipids. Our data clearly show that ZIKV infection increases *DGAT1* expression further promoting the biogenesis and growth of the placental LDs. The essential role of these organelles in ZIKV infection is further support by our observation showing that interference with *DGAT1* enzymatic activity suppresses the dynamic of LD growth and hampers viral replication. LDs entwining with viral replication factories could serve as platforms for the deposition and replication of the viral genome.

ZIKV-induced bystander accumulation of LD can be mediated through gap junction and soluble factors dependent mechanisms. It is very likely that modulation of the EV pathway and/or soluble factor release contribute to the observed bystander effect.

Thus, by programming the placental lipid metabolism, ZIKV coordinates the morphogenesis and functioning of key cellular organelles to establish a propitious environment for genome replication and virions assembly.

Recent reports suggest that similar to DENV, ZIKV might exploit the autophagy-dependent processing of LDs for efficient RNA replication<sup>56,57</sup>. In this sense, autophagy would then be a rapid and less selective mechanism for bulk processing of these lipids to supply building blocks for membrane biogenesis.

Flavivirus modify the lipid composition of the intracellular membrane structures. This is best supported by Flavivirus-induced enrichment of lipids that destabilize biological membrane curvature and permeability, and by the presence of a unique lipid repertoire in viral-induced ROs in infected cells<sup>14</sup>. Yet, in contrast to DENV and WNV<sup>58,59</sup>, our comparative analyses of ZIKV-infected placentas did not reveal any alterations to

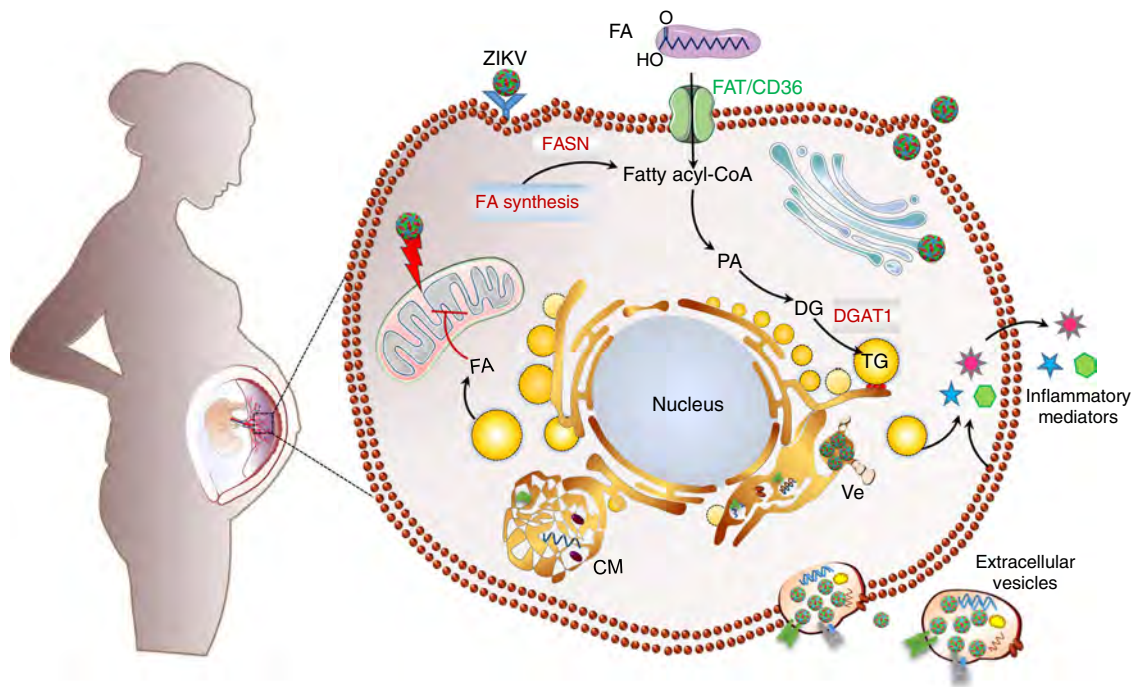
sphingolipid species, which underscores the tissue-specific particularity of ZIKV in regulating lipid metabolism.

Understanding how viruses regulate these topological changes is challenging. Our results show that ZIKV infection induces the formation of CMs within the ER lumen, which are in close proximity with an array of well-organized Ve. These vesicular structures, tightly interrelated with virus bags, are very likely to arise from dynamic mobility of ZIKV-induced CMs. While similar remodeling of ER membrane structures was previously observed in DENV and ZIKV infection<sup>41,60</sup>, no functional link has yet been established between the ER membrane-derived vesicles and viral genome replication. Compared to published data on Huh-7 cell line, the mean diameter of ZIKV-induced Ve was much larger in primary placental cells (>90 nm), which suggests that cell-specific determinants could influence the morphogenesis of these ROs. In the future, it would be interesting to determine whether these size difference in ROs morphology reflects comparable with specific lipid composition.

Placenta-specific factors might contribute to shaping the landscape of intracellular membranes during ZIKV infection. In this regard, our structural observations would suggest that ZIKV RNA synthesis likely occurs within CMs, which are connected to viral-induced vesicles in placenta cells. These viral-induced vesicles may also participate in carrying newly assembled virions to TGN network for subsequent maturation as previously reported<sup>61</sup>.

Mitochondria function is instrumental for many metabolic pathways. We provide pioneer evidence that ZIKV replication factories are in close proximity with MAM and that ZIKV infection disturbs the placenta mitochondrial network to meet its demanding replication needs. These ER-mitochondrial junctions constitute an excellent hub for coordinated lipid synthesis and trafficking as well as mitochondrial dynamics. Alterations to the tightly controlled mingling between these two organelles have been associated with many pathological conditions including pregnancy disorders<sup>62</sup>. Trafficking of ZIKV proteins to these highly dynamic membranes would not only help in the production of infectious progeny but also regulate placental intrinsic innate immune response. Mitochondria are also highly connected to LDs, allowing directional shuttling of fatty acids for subsequent mitochondria  $\beta$ -oxidation<sup>63,64</sup>. Proper partitioning and allocation of lipids between ER, LDs and mitochondria are therefore crucial to protect cells from lipotoxicity and cell death. By enhancing specific lipids, ZIKV may not only perturb the rate of lipid exchange and mitochondrial oxidative phosphorylation but also the crosstalk between these three essential hubs.

We demonstrate that the disruption of the mitochondrial network is linked to functional alterations illustrated by decreased oxygen consumption in ZIKV-infected placental cells. While ZIKV-induced mitochondrial stress may also contribute to a rise in placental lipid alterations, increased lipid content cannot be only explained by an increased synthesis/transport of FAs. The likely scenario rather includes alterations of the lipid esterification and downregulation in FA  $\beta$ -oxidation. We speculate that abnormalities in mitochondria engender excessive reactive oxygen species leading to oxidative stress, which can cause placental dysfunction. Since the placenta controls the quantity and composition of FAs delivery to the conceptus, even minor alterations of this mechanism would impair the delivery of lipids and lead to a higher risk of adverse birth outcomes. Furthermore, interrelated structure alterations MAM, mitochondria and LD dynamics observed in our ZIKV-infected placentas may also trigger massive inflammation hampering the success of pregnancy. Through large-scale analysis of bioactive mediators, we provide the first evidence that ZIKV perturbs the pro-/anti-inflammatory equilibrium of the placenta leading to tissue damage and massive



**Fig. 10 Summary of ZIKV-induced metabolic reprogramming of human placenta and specialized hubs that contribute to ZIKV life cycle.** By increasing placental lipid overload, ZIKV deprives the fetus of essential lipids and contributes to massive inflammation which may further impair the barrier function of the placenta.

infiltration of the villous core by inflammatory Hofbauer cells. While additional work is needed to fully define the link between mitochondrial network and accumulation of inflammatory metabolites at the molecular level, our study provides the first evidence linking lipid metabolome reprogramming to ZIKV infection drawing a potential path towards understanding viral-induced disruption of the placental barrier.

Collectively, reprogramming of the fetal placenta lipidome by ZIKV provides fundamental building blocks for optimal biogenesis and function of viral replication organelles. Damage to the mitochondria network may provide an amplification loop for placental inflammatory response. The metabolic disturbance can also interfere with placental intrinsic defense mechanisms allowing the virus to overcome the barrier function and reach the fetus (Fig. 10). Beyond illuminating novel mechanisms of ZIKV-induced pathogenesis during early pregnancy, our findings provide the groundwork for translational interventions directed towards supporting human pregnancy.

## Methods

**Patient samples.** Human sample collection for the study was approved by the French South-West & Outmer II ethical committee and registered at the French Ministry of Higher Education and Research (DC-2016-2772). Tissue samples were obtained with written informed consent from all participants in accordance with the Declaration of Helsinki guidelines.

**Tissue explant cultures and primary cell purification.** First-trimester placentas (7–11 weeks of gestation) were obtained from healthy women undergoing elective termination of pregnancy. About 0.3 cm<sup>2</sup> of tissue explant pieces were prepared from each placenta and kept in culture with DMEM:F12 (v:v) culture medium supplemented with 10% FBS. Primary cells were isolated from minced placental tissue subjected to enzyme digestion in culture medium containing 0.5 mg/mL collagenase IV (Sigma-Aldrich, France) and 0.1 mg/mL DNase I (Roche, France) for 25 min at 37 °C. Cell homogenates were then filtered (Thermo Fisher Scientific) and subjected to Ficol-Hypaque density gradient (Amersham Biotech) separation, and then cultured in DMEM:F12 medium containing 10% FBS. For immunofluorescence and confocal microscopy analyses, cells were cultured on 12 mm glass coverslips (Knittel Glaser).

**ZIKV isolation and propagation.** ZIKV was isolated from sperm sample of immunocompetent Caucasian patient returning from Brasil<sup>3,26–28</sup>. The patient was tested HIV negative. Potential infection with dengue or chikungunya virus were ruled by ELISA Diapro (Diagnostic Bioprobes Srl, <https://www.diapro.it>) and RealStar Dengue and Chikungunya qRT-PCR (Altona Diagnostics, <https://www.altona-diagnostics.com>). Partial sequence of NS5 protein has been submitted to GenBank (KU886298). Sequence alignment and phylogenetic clustering attributed the isolated strain to the Asian lineage of ZIKV<sup>26</sup>. High titer stocks were obtained from early passaging in Vero cells (Vero ATCC® CCL-81™). Briefly, ZIKV was isolated from sperm sample used to infect Vero cells. High titer supernatants were collected from 5 days post-infection (dpi). Viral titers were determined by RT-PCR and plaque assays on Vero cells. Comparative titration of viral stocks often shows a 2-log difference between RNA copy numbers and PFU. High titer viral stocks were stored as single use-aliquots and stored at –80 °C.

**Plaque assay.** Virus-containing medium from ZIKV-infected cells was collected at the indicated time post-infection. Confluent Vero cells grown in 12-well plates were infected with serial dilutions (up to 10<sup>–6</sup>) of the virus-containing medium for 2 h, washed, and overlaid with 2% low-melting agarose with 1% FBS DMEM. The cells were stained with crystal violet 5 dpi. Plaques were counted and titers are calculated as PFU/mL.

**ZIKV infection of ex vivo tissue explants and primary cells.** Matched placental explants and purified primary placental cells were mock- or ZIKV-infected overnight at MOI of 1 in DMEM:F12 containing 2% FBS. After six washes in excess PBS, samples were cultured in complete medium containing 10% FBS. Supernatants were collected immediately after washing and every other day as indicated in the figures. Virus RNA was extracted from culture supernatant and viral RNA copies were detected using RealStar Zika virus RT-PCR kit 1.0 (Altona Diagnostics, <https://www.altona-diagnostics.com>).

**Quantification of ZIKV RNA.** After ZIKV infection, RNA was extracted from culture supernatants using MagNA Pure 96™ instrument (Roche, France). ZIKV RNA was detected by amplification of an NS5 fragment (RealStar Zika virus RT-PCR kit 1.0, Altona Diagnostic GmbH, Germany) using a Light Cycler 480 instrument (Roche Molecular Systems) according to the manufacturer's instructions. Internal standards were included to correct for potential variations in the amount of input material. Quantitative RT-PCR (qRT-PCR) values were further normalized and are given as viral RNA copy numbers/mL. Kinetic of viral production was determined as RNA copy number/mL, calculated based on a standard curve.

**Quantitative of gene expression by qRT-PCR.** For qRT-PCR analysis, total RNA from Mock- or ZIKV-infected primary placental cells were extracted using RNeasy

Kit (Qiagen) according to the manufacturer's instructions. Purified RNA was reverse transcribed using the SuperScript III first-strand synthesis system kit (Invitrogen). Gene expression was quantified by qRT-PCR using Light Cycler 480 SYBR green I master mix (Roche) and specific primers (Supplementary Table 1). qRT-PCR were performed in 96-well plates and run on a Light Cycler 480 instrument (Roche). The housekeeping hypoxanthine-guanine phosphoribosyl transferase (*HPRT*) was used as control. The results are presented as fold change from matched mock-infected controls calculated using the  $2^{-\Delta\Delta CT}$  method.

**Lipid extraction and quantitative analysis by LC-MS/MS.** Five-day mock- or ZIKV-infected tissues were snap-frozen in liquid nitrogen and stored until extraction. Frozen tissue samples were crushed with a FastPrep<sup>®</sup>-24 Instrument (MP Biomedical, Santa Ana, CA) in 1 mL HBSS (Invitrogen, 14170112). After 2 crush cycles (6.5 m/s, 30 s), 50  $\mu$ L were withdrawn for protein quantification. Different classes of lipids were extracted according to the manufacturer's instructions. Signal intensity for specific lipid species was extracted according to the retention time. Samples with spiked internal standards were analyzed by either gas/liquid chromatography followed by mass spectrometry as described in Supplementary methods. Representative chromatogram of different lipid species have been provided in Supplementary Figs. 8–10. The Mass Spectrometry conditions of different lipid species have been indicated in Supplementary Tables 2–5.

**Sample preparation for immunohistology.** For frozen section, placenta tissues were fixed in 4% paraformaldehyde overnight, rinsed in DPBS and infiltrated with 15–30% sucrose. Tissues were next mounted in optimum cutting temperature compound (OCT), snap-frozen and kept at  $-80^{\circ}\text{C}$ . Frozen tissues were cut into 5–10  $\mu$ m sections using cryostat then processed for immunostaining. For classical IHC, congenital ZIKV-infected whole placentas were obtained from pathological termination of pregnancy (10 weeks of gestation). Tissues were fixed in 10% formalin and embedded in paraffin. Thin sections (3  $\mu$ m-thickness) were processed for hematoxylin and eosin (HE) staining or immunostaining.

**Immunostaining.** For fluorescent staining, tissue sections were saturated with 10% normal serum and 5% bovine serum albumin (BSA) following incubated with primary antibodies, polyclonal antibody to ZIKV NS3 protein (1:200 dilution, GenTex, GTX133309), the trophoblast marker Cytokeratin 7 (CK7, 1:200 dilution, Dako M7018) overnight at  $4^{\circ}\text{C}$ . The samples were then washed and incubated with Alexa Fluor 633 conjugated goat anti-mouse IgG1 (Invitrogen, A21126), Alexa Fluor 555 conjugated donkey anti-rabbit IgG (Invitrogen, A31572) secondary antibodies (1:500 dilution). LDs were stained with 10  $\mu$ g/mL BODIPY 493/503 (4,4-difluoro-1,3,5,7,8-pentamethyl-4-bora3a,4a-diaza-s-indacene) (Molecular Probes, D3922). Confocal z-stacks were captured using LSM710 confocal microscope (Carl Zeiss, Germany) captured with 63x oil objective. Image processing was performed using ImageJ free software (version 1.5 J, NIH). Oil Red O staining was carried out in placenta tissue thin sections and placental cells. Staining was performed with 0.2% Oil Red O solution for 10 min, and nuclei were counterstained with hematoxylin solution (Sigma Aldrich). 6- $\mu$ m-thick sections of paraffin-embedded from congenital samples were immunostained with the classical macrophage marker CD68 (1:100 dilution, Dako GA609). Images were taken with a Leica DMR microscope (Leica Microsystems, Nanterre, France) at 40x objective, using 3DHISTECH panoramic slide viewer (3DHISTECH Kft, Budapest, Hungary).

**Immunofluorescence and LD analysis.** Infected primary placenta cells grown on the coverslips were fixed for 20 min in 4% paraformaldehyde and permeabilized with 0.3% Triton X-100. Following, the cells were stained with anti-Flavivirus group antigen antibodies (D1-4G2-4-15, 1:400 dilution, Merck-Millipore, MAB10216), polyclonal antibody anti-ZIKV NS3 protein (1:300 dilution GenTex GTX133309), the trophoblast marker Cytokeratin 7 (CK7, 1:200 dilution, Dako M7018), incubated at  $4^{\circ}\text{C}$  overnight. Alexa Fluor 555- goat anti-mouse IgG2a (Invitrogen, A21137) and Alexa Fluor 633 conjugated goat anti-mouse IgG1 (Invitrogen, A21126) secondary antibodies (1:500 dilution) were used for visualizing. After, cells were washed with PBS and stained with 4,6-diamidino-2-phenylindole (DAPI, 1:10,000 dilution, Sigma). For LD staining, fixed cells were incubated with 10  $\mu$ g/mL BODIPY 493/503 dye (Molecular Probes, USA) for 30 min. Z-stacks images taken by LSM710 confocal microscope and processed using Imaris software (version 7.2.3, Bitplane AG). The total amount and, average volume and diameter of LDs were determined from ten randomly taken large field images from 5 independent donors.

**UV-irradiated conditioned medium.** Supernatants were collected from Mock- or ZIKV-infected primary placental cells 5 dpi, then UV-irradiated for 30 min using Spectroline EF-140/F UV lamp (220 volts, 50 Hz, 17 Amps). New fresh isolated placental cells were cultured for 3 days with UV-irradiated conditioned medium before immunostaining for LDs.

**DGAT1 inhibitors.** The pharmacological DGAT1 inhibitor (A922500) was obtained from MedChemExpress (MCE, USA). The inhibitor was well

characterized and published<sup>65</sup>. Cytotoxic effect of DGAT1 inhibitor (DGAT1i) on primary placental cells was determined by MTT assay (Sigma-Aldrich) and compared to DMSO control-treated cells. Cell viability was calculated as percentage of DMSO control-treated cells. For DGAT1 inhibition studies, primary placental cells were pre-treated for 30 min with different concentrations of DGAT1i, then challenged with ZIKV at MOI of 1. After 12 h exposure, cells were washed 6 times with fresh PBS before culturing in the presence of DGAT1i for 5 days. Supernatants were collected immediately after washing (0 dpi), 3 and 5 dpi. Viral titers were determined by plaque assay. Cells were processed for immunostaining of LD with the BODIPY 493/503 dye. The infection was visualized using the anti-Flavivirus group antigen antibody. LD number and size were determined using Imaris software.

**Electron microscopy.** The ZIKV-infected primary placental cells were fixed with 2.5% glutaraldehyde in 0.2 M cacodylate buffer for at least 1 h at room temperature. Then the cells were scraped from the flask and centrifuged at 3000g for 10 min. The pellets were fixed incubated in 1% osmium tetroxide for 1 h on ice. Fixed samples were dehydrated in a graded acetone series at room temperature and embedded in resin. Ultra-thin sections were prepared using microtome (Leica UC7, Germany) at 60 nm thickness and stained in 2% aqueous uranyl acetate and lead citrate. All images were then captured with a transmission electron microscope at 80 kV (Hitachi-7650, Japan).

**Mitochondrial morphology visualization and stress analysis.** Mitochondrial morphology was investigated using MitoTracker Deep red FM (Invitrogen, M22426) according to the manufacturer's instructions. Briefly, Mock- and ZIKV-infected placental cells were stained with 500 nM MitoTracker Deep red FM in condition medium for 30 min at  $37^{\circ}\text{C}$ . Cells were then washed in fresh growth medium and fixed with 4% paraformaldehyde. After permeabilization with 0.3% Triton X-100, cells were incubated with anti-Flavivirus group antigen (D1-4G2-4-15, 1:400 dilution, Merck-Millipore MAB10216) at  $4^{\circ}\text{C}$  overnight. Alexa Fluor 555- goat anti-mouse IgG2a (Invitrogen, A21137) secondary antibodies were used to visualize virus envelope protein. Images were captured by LSM710 Confocal microscope.

Mitochondrial Stress test kit was applied to determine Oxygen Consumption Rate (OCR) and the Extracellular Acidification Rate (ECAR) using the Seahorse XFp analyzer (Seahorse Bioscience). Mock- and ZIKV-infected placental cells ( $4 \times 10^4$  cells/well) were seeded into plates at a cell density of  $4 \times 10^4$  cells/well 12 h prior to analysis. Tissue culture medium was replaced by 180  $\mu$ L of Seahorse XF Base medium. Cells were incubated in a  $\text{CO}_2$ -free incubator at  $37^{\circ}\text{C}$  for 1 h to allow for temperature and pH equilibration before being loaded into the XFp analyzer. Under these basal conditions, 1  $\mu$ M oligomycin, 2  $\mu$ M FCCP fluoro-carbonyl-cyanide phenylhydrazone or 1  $\mu$ M rotenone and 1  $\mu$ M antimycin A (Rot/Ant) were injected at the indicated time points. Mitochondrial OCR and ECAR were recorded for three cycles under basal conditions and following each sequential injection. Data were analyzed with Wave software (version 2.6.0, Seahorse Bioscience).

**Quantification and statistical analysis.** Statistical analyses were performed using GraphPad Prism software 7 (GraphPad Software). All data graphs were presented as the mean  $\pm$  SEM. *P* values were determined by two-tailed Student's *t* test, one-way ANOVA, with Dunnett's multiple comparison test or two-way ANOVA, with Tukey's multiple comparison test. *P*-values of less than 0.05 are considered statistically significant and shown for each Figure. For heatmap analysis, data matrix normalized by autoscaling was exported into an Excel file and analyzed using R studio interface with an in-house R script. Red color indicates upregulation and blue indicate downregulation.

**Reporting summary.** Further information on research design is available in the Nature Research Reporting Summary linked to this article.

## Data availability

The authors declare that all the data supporting the findings of this study are available within the article and its Supplementary information files, or are available upon reasonable request to the lead author. The source data underlying Figs. 1, 2b–h, 3c, 4b, 5b, d, 6b, d, 7b, 8b–c, 9 and Supplementary Figs. 1, 2, 3, 4b–c, 5b, 6b are provided as a Source Data file.

Received: 14 August 2019; Accepted: 22 April 2020;

Published online: 11 June 2020

## References

1. Brasil, P. et al. Zika virus infection in pregnant women in Rio de Janeiro. *N. Engl. J. Med.* **375**, 2321–2334 (2016).
2. Coyne, C. B. & Lazear, H. M. Zika virus—reigniting the TORCH. *Nat. Rev. Microbiol.* **14**, 707–715 (2016).

3. El Costa, H. et al. ZIKA virus reveals broad tissue and cell tropism during the first trimester of pregnancy. *Sci. Rep.* **6**, 35296 (2016).
4. Tabata, T. et al. Zika virus targets different primary human placental cells, suggesting two routes for vertical transmission. *Cell Host Microbe* **20**, 155–166 (2016).
5. Krahnmer, N., Farese, R. V. Jr. & Walther, T. C. Balancing the fat: lipid droplets and human disease. *EMBO Mol. Med.* **5**, 973–983 (2013).
6. Thiam, A. R., Farese, R. V. Jr. & Walther, T. C. The biophysics and cell biology of lipid droplets. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **14**, 775–786 (2013).
7. Alvino, G. et al. Maternal and fetal fatty acid profile in normal and intrauterine growth restriction pregnancies with and without preeclampsia. *Pediatr. Res.* **64**, 615–620 (2008).
8. Calabuig-Navarro, V. et al. Effect of maternal obesity on placental lipid metabolism. *Endocrinology* **158**, 2543–2555 (2017).
9. Contini, C. et al. Concomitant intrauterine growth restriction alters the lipoprotein profile in preeclampsia. *Pregnancy Hypertens.* **15**, 154–160 (2019).
10. Tauchi-Sato, K., Ozeki, S., Houjou, T., Taguchi, R. & Fujimoto, T. The surface of lipid droplets is a phospholipid monolayer with a unique fatty acid composition. *J. Biol. Chem.* **277**, 44507–44512 (2002).
11. Nguyen, T. B. et al. DGAT1-dependent lipid droplet biogenesis protects mitochondrial function during starvation-induced autophagy. *Dev. Cell* **42**, 9–21 e25 (2017).
12. Yen, C. L., Stone, S. J., Koliwad, S., Harris, C. & Farese, R. V. Jr. Thematic review series: glycerolipids. DGAT enzymes and triacylglycerol biosynthesis. *J. Lipid Res.* **49**, 2283–2301 (2008).
13. Gluchowski, N. L., Becuwe, M., Walther, T. C. & Farese, R. V. Jr. Lipid droplets and liver disease: from basic biology to clinical implications. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* **14**, 343–355 (2017).
14. Neufeldt, C. J., Cortese, M., Acosta, E. G. & Bartenschlager, R. Rewiring cellular networks by members of the Flaviviridae family. *Nat. Rev. Microbiol.* **16**, 125–142 (2018).
15. Neufeldt, C. J. et al. ER-shaping atlastin proteins act as central hubs to promote flavivirus replication and virion assembly. *Nat. Microbiol.*, <https://doi.org/10.1038/s41564-019-0586-3> (2019).
16. Blanc, M. et al. Host defense against viral infection involves interferon mediated down-regulation of sterol biosynthesis. *PLoS Biol.* **9**, e1000598 (2011).
17. Hacke, M. et al. Inhibition of Ebola virus glycoprotein-mediated cytotoxicity by targeting its transmembrane domain and cholesterol. *Nat. Commun.* **6**, 7688 (2015).
18. Dennis, E. A. & Norris, P. C. Eicosanoid storm in infection and inflammation. *Nat. Rev. Immunol.* **15**, 511–523 (2015).
19. Tam, V. C. et al. Lipidomic profiling of influenza infection identifies mediators that induce and resolve inflammation. *Cell* **154**, 213–227 (2013).
20. Russell, C. D. & Schwarze, J. The role of pro-resolution lipid mediators in infectious disease. *Immunology* **141**, 166–173 (2014).
21. Bilodeau, J. F. Review: maternal and placental antioxidant response to preeclampsia - impact on vasoactive eicosanoids. *Placenta* **35**, S32–S38 (2014).
22. Sykes, L., MacIntyre, D. A., Teoh, T. G. & Bennett, P. R. Anti-inflammatory prostaglandins for the prevention of preterm labour. *Reproduction* **148**, R29–R40 (2014).
23. Herrera, E. & Ortega-Senovilla, H. Lipid metabolism during pregnancy and its implications for fetal growth. *Curr. Pharm. Biotechnol.* **15**, 24–31 (2014).
24. Arora, N., Sadovsky, Y., Dermody, T. S. & Coyne, C. B. Microbial vertical transmission during human pregnancy. *Cell Host Microbe* **21**, 561–567 (2017).
25. Cauchemez, S. et al. Association between Zika virus and microcephaly in French Polynesia, 2013–15: a retrospective study. *Lancet* **387**, 2125–2132 (2016).
26. Fourcade, C. et al. Viral load kinetics of Zika virus in plasma, urine and saliva in a couple returning from Martinique, French West Indies. *J. Clin. Virol.* **82**, 1–4 (2016).
27. Mansuy, J. M. et al. Zika virus: high infectious viral load in semen, a new sexually transmitted pathogen? *Lancet Infect. Dis.* **16**, 405 (2016).
28. Mansuy, J. M. et al. Peripheral plasma and semen cytokine response to zika virus in humans. *Emerg. Infect. Dis.* **25**, 823–825 (2019).
29. Gibellini, F. & Smith, T. K. The Kennedy pathway—De novo synthesis of phosphatidylethanolamine and phosphatidylcholine. *IUBMB Life* **62**, 414–428 (2010).
30. van Meer, G., Voelker, D. R. & Feigenson, G. W. Membrane lipids: where they are and how they behave. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **9**, 112–124 (2008).
31. Harayama, T. & Riezman, H. Understanding the diversity of membrane lipid composition. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **19**, 281–296 (2018).
32. Maulucci, G. et al. Fatty acid-related modulations of membrane fluidity in cells: detection and implications. *Free Radic. Res.* **50**, S40–S50 (2016).
33. Jabrane-Ferrat, N. Features of human decidual NK cells in healthy pregnancy and during viral infection. *Front Immunol.* **10**, 1397 (2019).
34. Zhou, H. et al. Mechanism of radiation-induced bystander effect: role of the cyclooxygenase-2 signaling pathway. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **102**, 14641–14646 (2005).
35. Kofahi, H. M. et al. Virus Infection of cultured human hepatoma cells causes apoptosis and pyroptosis in both infected and bystander cells. *Sci. Rep.* **6**, 37433 (2016).
36. Palmer, D. R. et al. Differential effects of dengue virus on infected and bystander dendritic cells. *J. Virol.* **79**, 2432–2439 (2005).
37. Camus, G. et al. Diacylglycerol acyltransferase-1 localizes hepatitis C virus NS5A protein to lipid droplets and enhances NS5A interaction with the viral capsid core. *J. Biol. Chem.* **288**, 9915–9923 (2013).
38. Herker, E. et al. Efficient hepatitis C virus particle formation requires diacylglycerol acyltransferase-1. *Nat. Med.* **16**, 1295–1298 (2010).
39. Gillespie, L. K., Hoenen, A., Morgan, G. & Mackenzie, J. M. The endoplasmic reticulum provides the membrane platform for biogenesis of the flavivirus replication complex. *J. Virol.* **84**, 10438–10447 (2010).
40. Mackenzie, J. M., Kenney, M. T. & Westaway, E. G. West Nile virus strain Kunjin NS5 polymerase is a phosphoprotein localized at the cytoplasmic site of viral RNA synthesis. *J. Gen. Virol.* **88**, 1163–1168 (2007).
41. Cortese, M. et al. Ultrastructural characterization of Zika virus replication factories. *Cell Rep.* **18**, 2113–2123 (2017).
42. Thoudam, T., Jeon, J. H., Ha, C. M. & Lee, I. K. Role of mitochondria-associated endoplasmic reticulum membrane in inflammation-mediated metabolic diseases. *Mediators Inflamm.* **2016**, 1851420 (2016).
43. Holland, O. et al. Review: Placental mitochondrial function and structure in gestational disorders. *Placenta* **54**, 2–9 (2017).
44. Myatt, L., Muralimanoharan, S. & Maloyan, A. Effect of preeclampsia on placental function: influence of sexual dimorphism, microRNA's and mitochondria. *Adv. Exp. Med Biol.* **814**, 133–146 (2014).
45. Scharwey, M., Tatsuta, T. & Langer, T. Mitochondrial lipid transport at a glance. *J. Cell Sci.* **126**, 5317–5323 (2013).
46. Morita, M. et al. The lipid mediator protectin D1 inhibits influenza virus replication and improves severe influenza. *Cell* **153**, 112–125 (2013).
47. Zhang, C. et al. Lipid metabolism in inflammation-related diseases. *Analyst* **143**, 4526–4536 (2018).
48. Buczynski, M. W., Dumlao, D. S. & Dennis, E. A. Thematic review series: proteomics. an integrated omics analysis of eicosanoid biology. *J. Lipid Res.* **50**, 1015–1038 (2009).
49. Chavan-Gautam, P., Rani, A. & Freeman, D. J. Distribution of fatty acids and lipids during pregnancy. *Adv. Clin. Chem.* **84**, 209–239 (2018).
50. Gallo, L. A., Barrett, H. L. & Dekker Nittert, M. Review: placental transport and metabolism of energy substrates in maternal obesity and diabetes. *Placenta* **54**, 59–67 (2017).
51. Nchoutmboube, J. A. et al. Increased long chain acyl-Coa synthetase activity and fatty acid import is linked to membrane synthesis for development of picornavirus replication organelles. *PLoS Pathog.* **9**, e1003401 (2013).
52. Farese, R. V. Jr. & Walther, T. C. Lipid droplets finally get a little R-E-S-P-E-C-T. *Cell* **139**, 855–860 (2009).
53. Olzmann, J. A. & Carvalho, P. Dynamics and functions of lipid droplets. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, <https://doi.org/10.1038/s41580-018-0085-z> (2018).
54. Miyanari, Y. et al. The lipid droplet is an important organelle for hepatitis C virus production. *Nat. Cell Biol.* **9**, 1089–1097 (2007).
55. Samsa, M. M. et al. Dengue virus capsid protein usurps lipid droplets for viral particle formation. *PLoS Pathog.* **5**, e1000632 (2009).
56. Heaton, N. S. & Randall, G. Dengue virus-induced autophagy regulates lipid metabolism. *Cell Host Microbe* **8**, 422–432 (2010).
57. Abernathy, E. et al. Differential and convergent utilization of autophagy components by positive-strand RNA viruses. *PLoS Biol.* **17**, e2006926 (2019).
58. Martin-Acebes, M. A., Vazquez-Calvo, A. & Saiz, J. C. Lipids and flaviviruses, present and future perspectives for the control of dengue, Zika, and West Nile viruses. *Prog. Lipid Res.* **64**, 123–137 (2016).
59. Martin-Acebes, M. A. et al. Host sphingomyelin increases West Nile virus infection in vivo. *J. Lipid Res.* **57**, 422–432 (2016).
60. Welsch, S. et al. Composition and three-dimensional architecture of the dengue virus replication and assembly sites. *Cell Host Microbe* **5**, 365–375 (2009).
61. Sager, G., Gabaglio, S., Sztul, E. & Belov, G. A. Role of host cell secretory machinery in Zika virus life cycle. *Viruses* **10**, <https://doi.org/10.3390/v10100559> (2018).
62. Vishnyakova, P. A. et al. Mitochondrial role in adaptive response to stress conditions in preeclampsia. *Sci. Rep.* **6**, 32410 (2016).
63. Herms, A. et al. AMPK activation promotes lipid droplet dispersion on detyrosinated microtubules to increase mitochondrial fatty acid oxidation. *Nat. Commun.* **6**, 7176 (2015).
64. Rambold, A. S., Cohen, S. & Lippincott-Schwartz, J. Fatty acid trafficking in starved cells: regulation by lipid droplet lipolysis, autophagy, and mitochondrial fusion dynamics. *Dev. Cell* **32**, 678–692 (2015).
65. Cao, J. et al. Targeting Acyl-CoA:diacylglycerol acyltransferase 1 (DGAT1) with small molecule inhibitors for the treatment of metabolic diseases. *J. Biol. Chem.* **286**, 41838–41851 (2011).

## Acknowledgements

The authors are grateful to clinical staff from Paule de Viguier maternity hospital for the collection of placentas and, to the cell imaging, histopathology and lipidomic core facilities for technical assistance. We thank Prof. L.B. Zeng and Dr. W.Z. Liu for help with electron microscopy, Dr. X.H. Tong and N Cenac for lipid profiling, Prof. E. Bahraoui and Prof. J. Izopet for critical comments on the manuscript. This work was supported by recurrent funds from the Inserm-CNRS-University of Toulouse. Dr. Q. Chen is a recipient of the Chinese Scholarship Council and the French National Agency for AIDS Research PhD fellowships.

## Author contributions

Q.C. conducted the experiments, analyzed data, drafted and revised the manuscript, J.G. and H.E.C. contributed to data analysis. Y.J.F. contributed to statistical analysis using R-studio, A.E. and Q.G. contributed to sample preparation, G.C. provided clinical samples, R.D. drafted and approved the manuscript, N.J.F. designed and supervised the research, drafted and revised the paper. Funding acquisition was carried out by N.J.F. and R.D.

## Competing Interests

The authors declare no competing interests.

## Additional information

**Supplementary information** is available for this paper at <https://doi.org/10.1038/s41467-020-16754-z>.

**Correspondence** and requests for materials should be addressed to N.J.-F.

**Peer review information** *Nature Communications* thanks Valerie O'Donnell, Sumana Sanyal and the other, anonymous, reviewer(s) for their contribution to the peer review of this work. Peer reviewer reports are available.

**Reprints and permission information** is available at <http://www.nature.com/reprints>

**Publisher's note** Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



**Open Access** This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons license, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons license and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this license, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

© The Author(s) 2020



### **Rôle des cellules Natural Killer dans la transmission mère-fœtus du Virus Zika**

Les premiers mois de la grossesse sont caractérisés par la mise en place du placenta, une barrière protectrice efficace. Il assure la communication materno-fœtale et permet les échanges qui contribuent au développement du fœtus, au niveau des interfaces materno-fœtales. Parmi ces interfaces, se trouve la decidua basalis (decidua), la muqueuse de la paroi utérine sur laquelle le placenta est ancré. Très riche en cellules immunitaires maternelles, la decidua constitue, avec le placenta, un site immunitaire privilégié, nécessaire à la tolérance du fœtus semi-allogénique ainsi qu'à la protection contre la transmission d'agents pathogènes. Néanmoins, malgré la protection robuste du placenta et la surveillance active des cellules immunitaires décíduales, certains pathogènes franchissent cette barrière et se disséminent jusqu'au fœtus. La famille des pathogènes TORCH (Toxoplasma, « Others », Rubéole, CytomégaloVirus, virus Herpès) est la plus connue pour être à l'origine d'infections congénitales. Plus récemment, d'autres virus émergents, capables d'infecter les interfaces mères-fœtus et de causer des complications graves pour la mère et le fœtus, ont été identifiés. Parmi ces virus, on retrouve notamment le virus Zika (ZIKV).

Dans ce contexte, l'objectif de mon doctorat a été de comprendre la pathogenèse de l'infection par le ZIKV à l'interface mère-fœtus et d'identifier le rôle des cellules immunitaires dans le contrôle de l'infection. Mes travaux de thèse se sont ainsi articulés en trois axes majeurs.

Dans la première partie de ma thèse, nous nous sommes intéressés à la pathogenèse du ZIKV à l'interface materno-fœtale en identifiant les récepteurs d'entrée du virus dans les cellules décíduales. Dans une deuxième partie, nous avons caractérisé l'effet du ZIKV sur le microenvironnement local décidual. Nous avons mis en évidence que l'infection des cellules décíduales est associée à un schéma spécifique, qui peut conditionner la réponse immunitaire à l'interface materno-fœtale. Enfin, dans la dernière partie, nous avons étudié la fonction des cellules Natural Killer décíduales (dNK). Lors d'une grossesse saine, ces cellules, qui représentent 30% des cellules décíduales, ne sont pas cytotoxiques mais produisent de nombreux facteurs solubles essentiels au développement placentaire et fœtal. Ces cellules sont néanmoins dotées d'une plasticité fonctionnelle et phénotypique qui leur permet d'adapter leurs fonctions effectrices et de devenir cytotoxiques lors d'une infection. De cette manière, nous avons découvert que les dNK sont capables de détecter et de limiter l'infection par le ZIKV des cellules décíduales et nous avons identifié les mécanismes cellulaires impliqués dans ce contrôle.

En conclusion, mes travaux de thèse permettent de fournir des informations importantes sur la pathogenèse du ZIKV à l'interface materno-fœtale. De plus, ils présentent un nouveau modèle expérimental pour étudier les infections congénitales, caractériser la réponse immunitaire lors d'une infection virale et tester de nouvelles stratégies thérapeutiques limitant les infections lors de la grossesse.

**Mots clés :** Grossesse, Interfaces materno-fœtales, Virus Zika, Infection congénitale, Système immunitaire, Cellules Natural Killer décíduales.

### **Role of Natural Killer cells in maternal-to-fetal transmission of Zika Virus**

The first months of pregnancy are characterized by the establishment of the placenta, an effective protective barrier. It ensures maternal-fetal communication and allows exchanges that contribute to the development of the fetus, in specific areas called maternal-fetal interfaces. Among these interfaces, we can distinguish the decidua basalis, a uterine mucosa on which the placenta is anchored. Enriched with maternal immune cells, the decidua constitutes, with the placenta, a privileged immune site, necessary for the tolerance of the semi-allogenic fetus as well as for protecting against the transmission of pathogenic agents to the child. However, despite the robust protection of the placenta and the active surveillance of decidual immune cells, some pathogens cross this barrier and spread to the fetus. TORCH pathogens (Toxoplasma, Others, Rubella, Cytomegalovirus, Herpes virus) are the best known for causing congenital infections. More recently, other emerging viruses, like Zika virus, have been identified. They are capable of infecting mother-fetus interfaces and cause severe outcomes for both the mother and the fetus.

In this context, the main objective of my work was to understand ZIKV pathogenesis at the maternal-fetal interface and to identify the role of immune cells in the control of ZIKV infection. My thesis work was articulated around three main axes.

In the first part of my PhD, we focused on the pathogenesis of ZIKV at the maternal-fetal interface by identifying the ZIKV entry receptors into decidual cells. In a second part, we characterized the effect of ZIKV infection on the decidual local microenvironment. We showed that ZIKV infection is associated with a specific pattern, which can induce a specific immune response at the maternal-fetal interface. Finally, in the last part of my PhD project, we studied the function of decidual Natural Killer cells (dNK). During a healthy pregnancy, these cells, which represent 30% of the decidua cells, are not cytotoxic but secrete many soluble factors that are essential for placental and fetal development. These cells are endowed with a functional and phenotypic plasticity which allows them to adapt their effector functions and to become cytotoxic during infection. We discovered that dNK cells are able to detect and limit ZIKV infection of decidual cells, and we identified the cellular mechanisms involved in this control.

In conclusion, my thesis work provides important information on the pathogenesis of ZIKV at the maternal-fetal interface. In addition, my project presents a new experimental model to study congenital infections, characterize the immune response during viral infection and test new therapeutic strategies to limit infections during pregnancy.

**Keywords:** Pregnancy, Maternal-Fetal Interfaces, Zika Virus, Congenital infection, Immune System, Decidual Natural Killer Cells.