

UNIVERSITÉ DE NANTES
FACULTÉ DES SCIENCES ET DES TECHNIQUES

ECOLE DOCTORALE BIOLOGIE SANTE NANTES-ANGERS (502)

Année 2012

Fonctions immunologiques de la molécule HLA-E : Implication en Cancérologie et en Transplantation

THÈSE DE DOCTORAT

Discipline : Biologie-Santé

Spécialité : Immunologie

Présentée

et soutenue publiquement par

Mathilde ALLARD

Le 27 septembre 2012, devant le jury ci-dessous

Président : Marc BONNEVILLE, DR, UMR 892 INSERM / 6299 CNRS / Université de Nantes

Rapporteurs : Nathalie ROUAS-FREISS, DR, CEA / Université Paris Diderot
Véronique BRAUD, DR, UMR 7275 CNRS / Université de Nice Sophia-Antipolis

Membres invités : Anne CAIGNARD, DR, UMR 1016 INSERM / 8104 CNRS / Université Paris Descartes
Béatrice CHARREAU, CR, UMR 1064 INSERM / Université de Nantes

Directeur de thèse : Nadine GERVOIS, PR, UMR 892 INSERM / 6299 CNRS / Université de Nantes

Sommaire

Préambule	5
Introduction	10
1 HLA-E : Structure, polymorphisme et expression	11
1.1 Généralités	11
1.2 Polymorphisme et évolution	13
1.3 Répertoire peptidique et apprêtement	19
1.3.1 Présentation de peptides issus des autres molécules HLA-I	20
1.3.2 Présentation des peptides alternatifs	24
1.4 Profil d'expression tissulaire	28
1.4.1 Régulation transcriptionnelle	28
1.4.2 Régulation post-transcriptionnelle	29
1.4.3 Expression dans les conditions pathologiques	31
2. HLA-E : Ligand des récepteurs NK CD94-NKG2	34
2.1 Les récepteurs CD94/NKG2.....	34
2.1.1 Complexe génétique CD94/NKG2.....	34
2.1.2 Expression des molécules CD94/NKG2	37
2.1.3 Modalités d'interaction avec HLA-E	40
2.1.4 Signalisation intracellulaire.....	44
<i>i. Formes activatrices CD94/NKG2-C/-E/-H.....</i>	<i>44</i>
<i>ii. Formes inhibitrices CD94/NKG2-A/-B</i>	<i>45</i>
2.2 Fonctions immunologiques de l'interaction HLA-E - CD94/NKG2.....	47
2.2.1 Éducation des cellules NK	47
2.2.2 Tolérance périphérique au soi	49
2.2.3 Surveillance immunitaire du soi stressé/infecté/tumoral	51
<i>i. Stress cellulaire.....</i>	<i>51</i>
<i>ii. Infections.....</i>	<i>51</i>
<i>iii. Transformation tumorale.....</i>	<i>53</i>
2.2.4 Réponses xéno- et allo-géniques	55
<i>i. Grossesse- tolérance fœto-maternelle.....</i>	<i>55</i>
<i>ii. Transplantation des cellules hématopoïétiques allogéniques</i>	<i>56</i>
<i>iii. Transplantation d'organes solides</i>	<i>57</i>
3. HLA-E : Ligand des récepteurs TCR	58
3.1 Répertoire et éducation des lymphocytes T CD8 restreints HLA-E/Qa-1	58
3.2 Fonctions immunologiques des lymphocytes T restreints HLA-E/Qa-1	59
3.2.1 Réponses T restreintes Qa-1/HLA-E dirigées contre des peptides exogènes ..	61
i. Lymphocytes T restreints HLA-E/Qa-1 anti-bactériens	61
ii. Lymphocytes T restreints HLA-E/Qa-1 anti-viraux	62
3.2.2 Réponses T restreintes HLA-E/Qa-1 dirigées contre des peptides endogènes	65
i. Lymphocytes T restreints HLA-E/Qa-1 anti-tumoraux	65
ii. Lymphocytes T restreints HLA-E/Qa-1 suppresseurs	66

4. Molécules HLA-I solubles	70
4.1 Caractéristiques moléculaires et production	70
4.2 Valeur pronostique/diagnostique des molécules HLA-I solubles	73
4.2.1 Maladies auto-immunes et inflammatoires	74
4.2.2 Maladies Infectieuses	75
4.2.3 Cancers	75
4.2.4 Grossesse	77
4.2.5 Transplantation	78
4.3 Fonctions Immunologiques des molécules HLA-I solubles	80
4.3.1 Inhibition des fonctions effectrices des cellules NK et T	81
4.3.2 Induction de l'apoptose des cellules NK et T	82
4.3.3 Inhibition de la prolifération des cellules T et B	83
4.3.4 Inhibition de la chémotaxie des cellules T	83
4.3.5 Induction de cellules T suppressives et de cellules dendritiques tolérogènes ..	84
Objectifs	85
Résultats	87
1. Implication des molécules HLA-E solubles en oncologie	88
1.1 Production des molécules HLA-E solubles par les cellules tumorales et détECTION dans les sérums de patients atteints de mélanome	88
1.2 Étude des propriétés fonctionnelles des molécules HLA-E solubles sur les lymphocytes T anti-tumoraux CD94/NKG2-A ⁺	99
1.2.1 Impact sur l'expression du récepteur CD94/NKG2-A	100
1.2.2 Impact sur la réponse lymphocytaire T	100
2. Implication des molécules HLA-E en transplantation	104
2.1 Étude de l'alloréactivité des lymphocytes T restreints HLA-E induits par le CMV chez un patient transplanté	104
2.2 Étude des propriétés fonctionnelles des molécules HLA-E solubles sur les lymphocytes T restreints HLA-E	143
2.2.1 Effet direct sur les lymphocytes T CD8 restreints HLA-E	143
2.2.2 Impact sur la reconnaissance de cibles par les lymphocytes T CD8 restreints HLA-E	150
Discussion & Perspectives	153
1. Implication des molécules HLA-E en oncologie	154
2. Implication des molécules HLA-E en transplantation	160
Bibliographie	166
Annexes	196
Annexe 1	197
Annexe 2	208
Annexe 3	220

Abréviations

A

ADN : Acide DésoxyriboNucléique
AICD : Activation-Induced Cell Death
ANCA : Anti-Neutrophil Cytoplasmic Autoantibodies
ATP : Adénosine TriPhosphate

B

BCG : Bacille de Calmette et Guérin
β2m : Bêta 2 Microglobuline

C

CCR : CC chemokine Receptor
CD : Cluster of Differentiation
CDR : Complementary Determining Regions
CIITA : Class II major histocompatibility complex TransActivator
CMH : Complexe Majeur d'Histocompatibilité
CMV : CytoMégalo Virus
CTL : Cytotoxic T Lymphocytes
CTLA-4 : Cytotoxic T Lymphocyte Antigen 4
CXCR : CXC chemokine Receptor

D

DC : Dendritic Cells

E

EBV : Epstein-Barr Virus
ECTV : ECTromelia Virus
ERAAP : ER Aminopeptidase associated with Antigen Processing

G

GVH : Graft Versus Host
GVHD : Graft Versus Host Disease
GVT : Graft Versus Tumor

H

HBV : Hepatitis B Virus
HCV : Hepatitis C Virus
HIV : Human Immunodeficiency Virus
HLA : Human Leukocyte Antigen
HPV : Human Papilloma Virus
HSP : Heat Shock Protein
HSV : Herpes Simplex Virus
HTLV : Human T-Lymphotropic Virus

I

IFN : InterFéroN
IL : InterLeukine
ILT : Ig-Like Transcripts
ITAM : Immunoreceptor Tyrosine-based Activation Motif
ITIM : Immunoreceptor Tyrosine-based Inhibitory Motif

K

KIR : Killer-cell Ig-like Receptor

L

LAT : Linker of Activated T cells

LFA : Lymphocyte Function-associated Antigen

LIR : Leukocyte Ig-like Receptor

M

MAP : Mitogen-Activated Protein kinase

MOG : Myelin Oligodendrocyte Glycoprotein

MRP : Multidrug Resistance Protein

N

NK : Natural Killer

NKR : Natural Killer Receptor

NKT : Natural Killer T

O

ORF : Open Reading Frame

P

PBMC : Peripheral Blood Mononuclear Cell

PI3K : PhosphoInositol-3-Kinase

PLC : Peptide Loading Complex

PLC- γ : PhosphoLipase C gamma

Prdx : Péroxyrédoxine

R

RE : Réticulum Endoplasmique

S

SH2 : Src Homology 2 domain

SHP : Small Heterodimer Partner

SLP : Src homology 2 domain-containing Leukocyte Protein

SNP : Single Nucleotide Polymorphism

SPase : Signal Peptidase

SPPase : Signal Peptide Peptidase

STAT : Signal Transducer and Activator of Transcription

T

TAP : Transporter associated with Antigen Processing

TCR : T Cell Receptor

TEIPP : T cell Epitope associated with Impaired Presentation Pathway

TGF : Transforming Growth Factor

TNF : Tumor Necrosis Factor

TRAIL : TNF-Related Apoptosis-Inducing Ligand

Z

ZAP-70 : Zeta-chain-Associated Protein kinase 70

Préambule

Le système immunitaire regroupe un ensemble coordonné et dynamique d'effecteurs moléculaires et cellulaires ayant pour but de défendre l'intégrité de l'organisme en reconnaissant et en éliminant spécifiquement les micro-organismes étrangers et les cellules du soi anormal ou du non-soi. Parmi les nombreux acteurs impliqués dans la protection immunitaire, les molécules du Complexe Majeur d'Histocompatibilité (CMH) jouent un rôle majeur dans la capacité des principaux effecteurs cytotoxiques, les lymphocytes T $\alpha\beta$ CD8 et les cellules NK, à discriminer les cellules du soi sain des cellules du soi altéré ou du non-soi.

Les lymphocytes T $\alpha\beta$ reconnaissent des antigènes à la surface des cellules, par le biais de récepteurs réarrangés : TCR (T Cell Receptor). Ceux-ci sont hautement polymorphes et exclusivement activateurs. Ils reconnaissent spécifiquement des antigènes sous la forme de peptides apprêtés par les molécules du CMH de classe I (CMH-I) pour les lymphocytes T CD8, et de classe II (CMH-II) pour les lymphocytes T CD4.

Contrairement aux TCRs, les récepteurs des cellules NK (NKR) sont invariants et peuvent être activateurs ou inhibiteurs. Les récepteurs NKR inhibiteurs reconnaissent majoritairement des molécules du CMH-I du soi, tandis que les récepteurs NKR activateurs reconnaissent des ligands plus variés et dont l'expression est induite ou augmentée à la surface des cellules transformées. Les récepteurs NKR sont exprimés majoritairement par les cellules NK dont l'activité dépend de la balance entre les signaux activateurs et inhibiteurs perçus. Mais ils peuvent également être exprimés à la surface des lymphocytes T où ils vont pouvoir moduler (potentialiser ou inhiber) l'activation initiée par l'engagement de leur TCR.

On distingue 2 types de molécules du CMH-I : celles dites de classe Ia ou encore classiques : HLA-A, -B et -C chez l'homme, et celles dites de classe Ib ou non classiques : HLA-E, -F et -G. Toutes sont des glycoprotéines transmembranaires qui, pour pouvoir être exprimées à la surface des cellules, nécessitent généralement de former un complexe hétérotrimérique résultant de leur association avec la chaîne invariante β 2 microglobuline (β 2m) et un peptide d'environ 8 à 10 acides aminés.

Les molécules du CMH-Ia sont très polymorphiques et sont exprimées à la membrane de la majorité des cellules nucléées de l'organisme. Dans les conditions physiologiques, elles présentent des peptides du soi, et leur interaction avec les récepteurs TCR et NKR joue alors un rôle crucial dans le développement et la tolérance au soi des cellules T $\alpha\beta$ CD8 et NK. En revanche, lors de stress cellulaires, d'infections ou de la transformation tumorale, leur

répertoire peptidique intracellulaire peut être modifié et conduire à l'expression de nouveaux complexes antigéniques susceptibles d'être reconnus par le TCR des lymphocytes T $\alpha\beta$ CD8 (Figure 1).

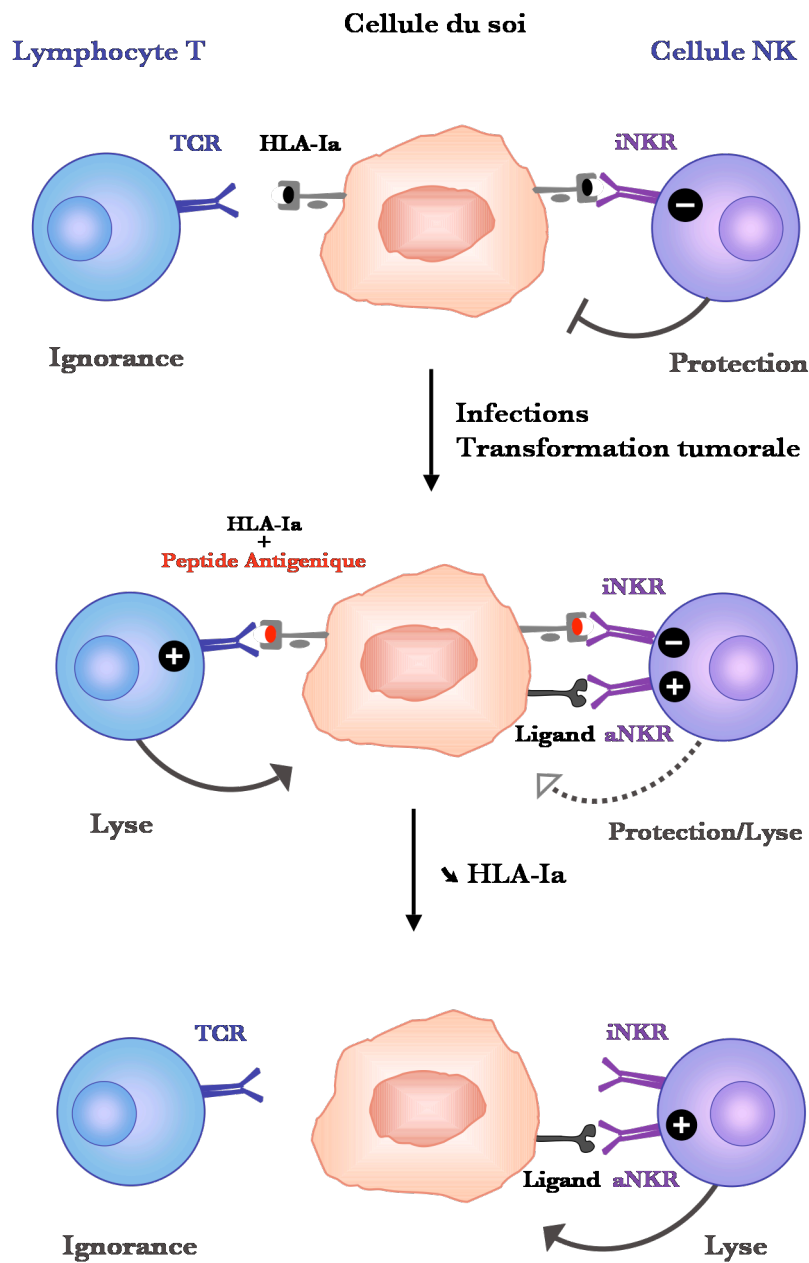


Figure 1 : Implication des molécules HLA-I classiques dans la surveillance et l'échappement immunitaire viral et tumoral

iNKR : récepteur NK inhibiteur, aNKR : récepteur NK activateur

L'expression des molécules du CMH-I jouant un rôle crucial dans la capacité des effecteurs T CD8 et NK à contrôler l'intégrité des cellules de l'organisme, l'altération de leur expression constitue un mécanisme d'échappement fréquemment utilisé par les agents pathogènes intracellulaires et les cellules néoplasiques (Finlay and McFadden 2006; Campoli and Ferrone 2008). Ainsi, de nombreux virus codent pour les protéines ou des ARN interférents qui s'opposent à l'expression à la membrane des molécules HLA-I classiques, limitant ainsi l'expression de complexes antigéniques à la surface des cellules infectées (Yewdell and Hill 2002; Hansen and Bouvier 2009). De façon similaire, la transformation tumorale est fréquemment associée à une altération de l'expression des molécules HLA-I classiques à la surface des cellules néoplasiques contribuant ainsi à l'échappement des tumeurs à la surveillance exercée par les lymphocytes T $\alpha\beta$ CD8 (Garrido *et al.* 2010). Cependant, la diminution de l'expression des molécules HLA-I classiques, en limitant leur interaction avec les récepteurs NK inhibiteurs, augmente également leur sensibilité à la lyse par les cellules NK (**Figure 1**).

Les molécules du CMH-I non classiques présentent un polymorphisme, un profil d'expression et un répertoire peptidique beaucoup plus restreint que celui des molécules HLA-I classiques. Si les propriétés immunologiques de la molécule HLA-F sont encore mal définies, de nombreuses données structurales et fonctionnelles ont été acquises sur les molécules HLA-E et HLA-G. Ces molécules interagissent principalement avec des récepteurs NKR de type inhibiteur : majoritairement CD94/NKG2-A pour HLA-E et ILT-2, ou ILT-4 pour HLA-G. De fait, leur expression par les cellules du soi ou non joue un rôle protecteur en limitant leur reconnaissance par les effecteurs immuns NK et T exprimant les récepteurs inhibiteurs associés.

Contrairement aux molécules HLA-I classiques, l'expression des molécules HLA-Ib est fréquemment induite ou augmentée à la surface des cellules infectées ou tumorales. Leur expression semble constituer un mécanisme d'immuno-subversion alternatif, favorisant l'échappement des cellules transformées à la lyse par les cellules NK et par les lymphocytes T exprimant les récepteurs NK inhibiteurs associés (Orange *et al.* 2002; Rouas-Freiss *et al.* 2005; Tripathi and Agrawal 2007; Wischhusen *et al.* 2007; Urosevic and Dummer 2008; Amiot *et al.* 2011).

L'expression des molécules HLA-E permet aux cellules NK et T CD8 de contrôler indirectement l'intégrité de la voie de présentation des antigènes par les molécules du CMH-I. En effet, dans les conditions physiologiques, les molécules HLA-E présentent majoritairement des peptides issus des autres molécules HLA-I favorisant leur interaction avec les récepteurs inhibiteurs CD94/NKG2-A et conduisant ainsi à la protection des cellules de la lyse NK.

En revanche, en cas de stress, d'infection ou de transformation tumorale, l'expression des molécules HLA-I classiques est souvent diminuée et le répertoire peptidique des molécules HLA-E s'en trouve être modifié. Par conséquent, les molécules HLA-E membranaires sont moins susceptibles de pouvoir interagir avec les récepteurs inhibiteurs CD94/NKG2-A et les cellules deviennent alors plus sensibles à la lyse NK.

De plus, dans les cellules stressées, infectées ou tumorales, la molécule HLA-E peut présenter des peptides alternatifs, issus notamment de molécules de stress ou virales, et ces nouveaux complexes sont susceptibles d'être reconnus spécifiquement par le TCR de lymphocytes T CD8 qui pourront alors éliminer les cellules altérées (**Figure 2**).

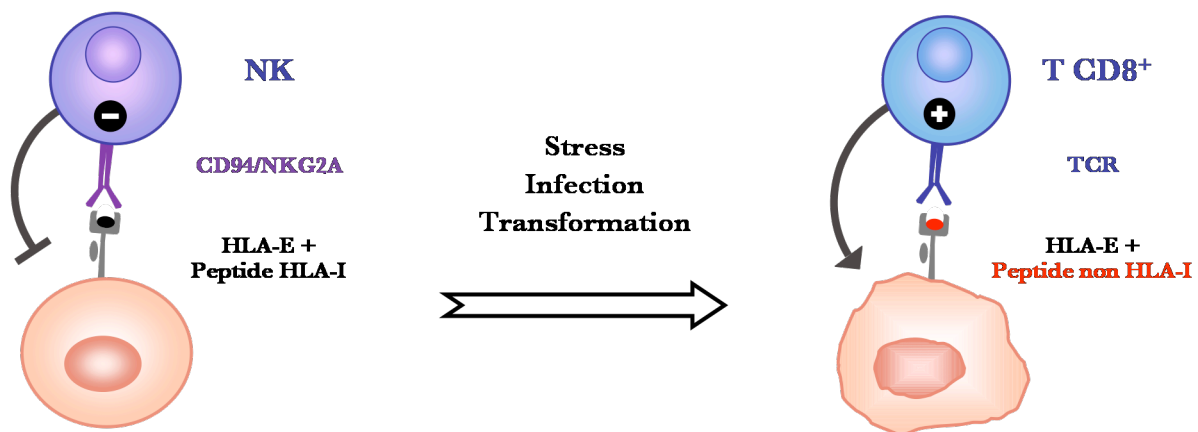


Figure 2 : Implication des molécules HLA-E dans la surveillance immunitaire

Introduction

1 HLA-E : Structure, polymorphisme et expression

1.1 Généralités

Le gène codant pour la molécule HLA-E est localisé entre les loci des molécules HLA-C et HLA-A, dans la région du bras court du chromosome n°6 qui code pour l'ensemble des molécules HLA (**Figure 3**). Découvert en parallèle par trois groupes américains indépendants en 1987 et 1988 (Srivastava *et al.* 1987; Koller *et al.* 1988; Mizuno *et al.* 1988), il fut isolé à partir de banques d'ADNc de lymphocytes B et T et initialement dénommé RS5, HLA-6.2 et JTW15 respectivement.

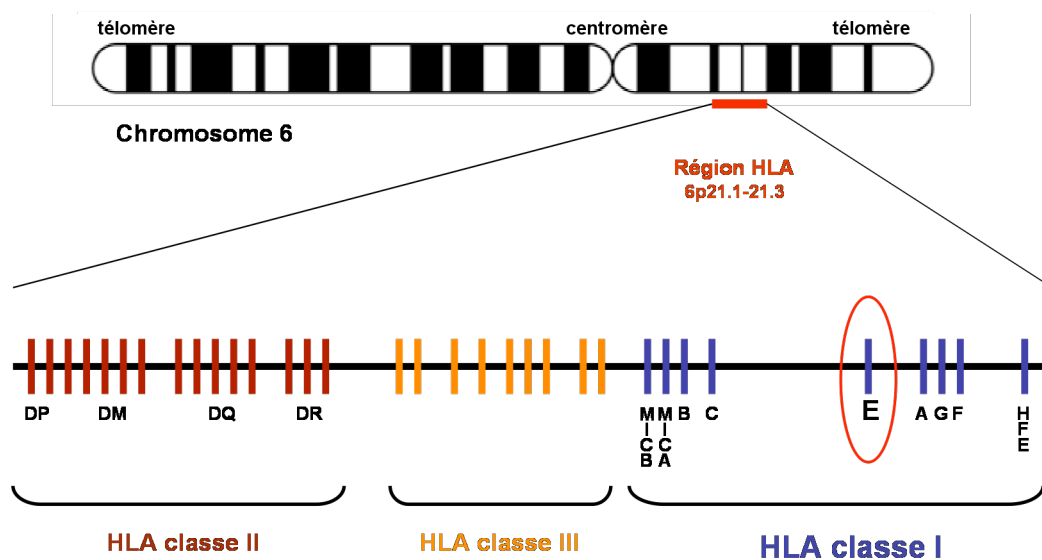


Figure 3 : Localisation du gène HLA-E

À l'instar des autres gènes HLA-I, le gène HLA-E code pour une glycoprotéine transmembranaire de 358 acides aminés (soit 2 à 4 acides aminés de moins que les molécules HLA-A/-B/-C) qui nécessite de former un complexe hétérotrimérique, formé par son association avec la β 2-microglobuline (β 2m) et un peptide, pour pouvoir être exprimé à la membrane cellulaire. Ce gène présente une organisation en 8 exons, commune à celles des autres molécules HLA-I. Le premier exon code pour le peptide signal de translocation au réticulum endoplasmique (RE). Les trois exons suivants codent respectivement pour les domaines extracellulaires α 1, α 2 et α 3, le cinquième exon pour la région transmembranaire et

les sixième et septième exons pour la portion intracytoplasmique de la chaîne lourde. L'exon 8 code pour une séquence 3' non traduite (**Figure 4**).

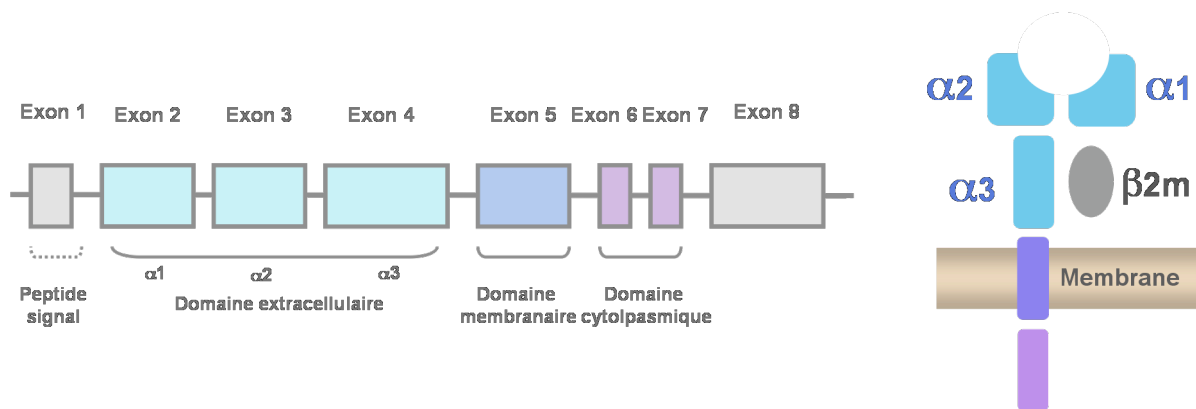


Figure 4 : Organisation et structure du gène et de la molécule HLA-E

Bien que le degré d'homologie du gène HLA-E avec les gènes HLA-A/-B/-C soit important (82%), il est cependant inférieur à celui observé entre les molécules HLA-A/B/C elles-mêmes. Ainsi, tandis que les séquences codant pour le domaine extracellulaire $\alpha 3$ impliqué dans la liaison à la $\beta 2m$ présentent 91% d'homologie avec celles des molécules HLA-A/-B/-C, celles codant pour les domaines extracellulaires $\alpha 1$ et $\alpha 2$ assurant la liaison aux peptides, sont beaucoup plus divergentes, et ce même à des positions conservées par l'ensemble des autres molécules HLA-I (Heinrichs and Orr 1990). En outre, la molécule HLA-E présente un répertoire peptidique distinct et plus restreint que celui des molécules HLA-I classiques. Dans les conditions physiologiques, ce répertoire est majoritairement issu des séquences signal d'export au RE des autres molécules HLA-I. Cependant, lors de stress, d'infection ou de la transformation tumorale celui-ci peut être modifié.

Dès son identification, son homologie avec les gènes du CMH-I non classique déjà décrits chez la souris fut suggérée. En effet, le niveau de divergence de la molécule HLA-E vis-à-vis des molécules HLA-A/-B/-C est comparable à celui observé entre les produits des gènes de la région Qa/TLa chez la souris et les molécules H2-K/-D/-H. Son homologie structurale et fonctionnelle avec le gène murin Qa-1 fut ensuite clairement démontrée (Yeager *et al.* 1997; Joly and Rouillon 2006). Ces molécules sont toutes deux caractérisées par un polymorphisme très restreint, un profil d'expression tissulaire semblable et plus limité que celui des molécules du CMH-I classique, ainsi qu'un répertoire peptidique commun et conservé (Aldrich *et al.* 1988; Connolly *et al.* 1993; Braud *et al.* 1997; Kurepa *et al.* 1998).

1.2 Polymorphisme et évolution

Le locus HLA-E est le plus conservé de tous les gènes codant pour des molécules du CMH-I, classique ou non (**Tableau 1**) (IMGT/HLA database). À ce jour, seuls 11 variants alléliques ont été décrits au sein de la population mondiale : HLA-E*01:01:01 (Mizuno *et al.* 1988), HLA-E*01:01:02 (Pyo *et al.* 2006), HLA-E*01:01:03, HLA-E*01:03:01:01 (Ohya *et al.* 1990), HLA-E*01:03:01:02 (Pyo *et al.* 2006), HLA-E*01:03:02:01 (Gomez-Casado *et al.* 1997), HLA-E*01:03:02:02, HLA-E*01:03:03, HLA-E*01:03:04 (Pyo *et al.* 2006), HLA-E*01:03:05 (Veiga-Castelli *et al.* 2012) et HLA-E*01:04 (Ohya *et al.* 1990). Le dernier allèle découvert (HLA-E*01:03:05) a été décrit très récemment dans la population brésilienne, l'une des populations les plus hétérogènes au monde (Veiga-Castelli *et al.* 2012).

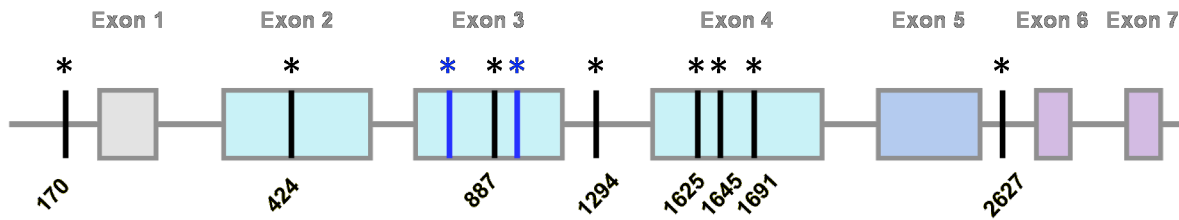
Tableau 1: Polymorphisme des gènes codant pour les molécules HLA-I

Adapté de *IMGT/HLA Database*

Gènes	HLA-I classiques				HLA-I non classiques			
	HLA-A	HLA-B	HLA-C	Total	HLA-E	HLA-F	HLA-G	Total
Allèles	1884	2490	1384	5758	11	22	49	82
Protéines	1365	1898	1006	4269	3	4	15	22

Ces variants alléliques présentent un niveau de polymorphisme très restreint (10 SNPs décrits) et, de par la localisation intronique et le caractère silencieux de la majorité des substitutions nucléotidiques, codent uniquement pour 3 variants protéiques : HLA-E*0101, HLA-E*0103 et HLA-E*0104 (**Tableau 1 et Figure 5**). Cependant, il est désormais admis que l'isoforme HLA-E*0104 provient d'une erreur de séquençage et ne constitue pas de réel variant de la molécule HLA-E. En effet, depuis sa première description dans la population japonaise (Ohya *et al.* 1990), aucune autre étude n'a retrouvé ce polymorphisme, que ce soit dans la population japonaise ou dans d'autres populations humaines.

Polymorphisme allélique de HLA-E



Polymorphisme protéique de HLA-E

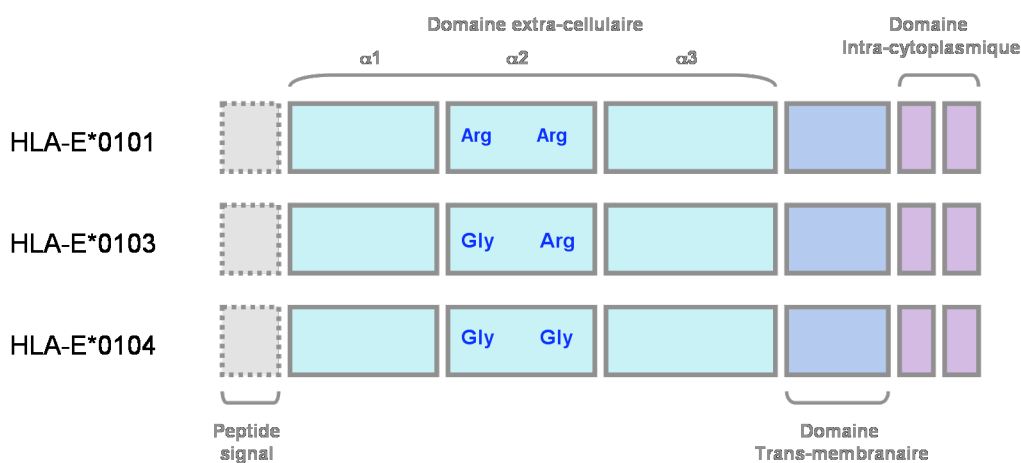


Figure 5 : Polymorphisme allélique et protéique de la molécule HLA-E

Les nucléotides (SNP) et acides aminés polymorphes sont indiqués en bleu.

Le polymorphisme de la molécule HLA-E semble être associé de façon aléatoire avec les haplotypes des autres loci HLA, et les rares cas de déséquilibre de liaisons décrits sont beaucoup moins importants que ceux observés entre les autres loci de classe I ou II (Geraghty *et al.* 1992; Grimsley and Ober 1997; Zhao *et al.* 2001; Zhen *et al.* 2004). Il semblerait donc que le polymorphisme de la molécule HLA-E se soit stabilisé précocement, sous l'influence de pressions de sélection visant à maintenir un faible degré de polymorphisme. Le degré de polymorphisme des orthologues de HLA-E chez les primates est également très faible, avec généralement 1 seul ou 2 allèles présents dans chaque espèce (Boyson *et al.* 1995; Grimsley *et al.* 1998; Knapp *et al.* 1998; Adams and Parham 2001; Arnaiz-Villena *et al.* 2007). L'homologue murin de HLA-E (Qa-1) ne présente également que deux variants alléliques : Qa-1a et Qa-1b. De façon encore plus surprenante, tandis que l'homologie de séquence entre les molécules HLA-E et HLA-A/-B/-C varie entre 50 et 90%, celle de HLA-E

et de son équivalent murin Qa-1 est de 73%. De plus, la structure des poches peptidiques, le mode de liaison aux peptides et les peptides liés par les molécules HLA-E et ses homologues sont très similaires (Connolly *et al.* 1993; Braud *et al.* 1997; Yeager *et al.* 1997). Ainsi, la molécule HLA-E peut se lier aux peptides présentés par son homologue murin (Braud *et al.* 1997; Kurepa and Forman 1997) et réciproquement (Kurepa *et al.* 1998; Stevens *et al.* 2001). Le faible niveau de polymorphisme ainsi que la conservation de la spécificité peptidique de la molécule HLA-E et de ses homologues face à l'évolution, reflète probablement le rôle essentiel de ces molécules dans l'immunité.

Les deux isoformes protéiques de HLA-E ne diffèrent que par un seul acide aminé situé à la position 107 et caractérisé par la substitution d'une Arginine (HLA-E*0101 ou HLA-E^R) par une Glycine (HLA-E*0103 ou HLA-E^G). D'un point de vue évolutif, l'allèle HLA-E*0103 semble être le plus ancien. L'allèle HLA-E*0101 serait apparu précocement au cours de développement des homo sapiens. En effet, ce polymorphisme n'est pas retrouvé dans les molécules équivalentes chez les autres primates (Grimsley and Ober 1997). Ces deux allèles sont retrouvés à des fréquences similaires (environ 50% pour chaque forme allélique) dans la population mondiale et ce même au sein d'ethnies diverses (**Tableau 2**) (Grimsley and Ober 1997; Matte *et al.* 2000; Zhao *et al.* 2001; Grimsley *et al.* 2002; Kimkong *et al.* 2003; Zhen *et al.* 2004; Arnaiz-Villena *et al.* 2007; Park *et al.* 2007; Tripathi and Agrawal 2007; Antoun *et al.* 2009; Danzer *et al.* 2009; Di Cristofaro *et al.* 2011; Liu *et al.* 2012; Veiga-Castelli *et al.* 2012). Cette répartition équitable implique l'existence d'une pression de sélection visant à maintenir la co-existence des deux formes alléliques de HLA-E dans la population humaine et suggère également que celles-ci présentent des propriétés fonctionnelles distinctes conférant ainsi un avantage sélectif à l'hétérozygotie.

L'acide aminé distinguant les dimorphes protéiques de HLA-E est positionné sur la face externe du domaine extracellulaire $\alpha 2$ de la chaîne lourde et n'est donc pas impliqué dans la liaison au peptide (**Figure 6**). D'un point de vue conformationnel, cette substitution ne semble pas non plus affecter la structure de la molécule HLA-E ou encore son interaction avec la $\beta 2m$. Cependant, elle a une conséquence non négligeable sur la stabilité des complexes HLA-E/peptide. Ainsi, l'allèle HLA-E*0101 est comparativement moins stable et par conséquent plus faiblement exprimé à la surface cellulaire que l'allèle HLA-E*0103 (Ulbrecht *et al.* 1999; Maier *et al.* 2000; Strong *et al.* 2003).

Tableau 2 : Fréquence des variants protéiques de HLA-E dans la population humaine

Fréquence allélique (%)	HLA-E*0101	HLA-E*0103	Références
Caucasiens	n=852 42,5 n=46 55,4 n=223 55,8	57,5 44,6 44,2	Kostyu <i>et al.</i> 1993 Grimsley and Ober 1997 Antoun <i>et al.</i> 2009
Français	n=50 50,0	50,0	Di Cristofaro <i>et al.</i> 2011
Hispaniques	n=48 56,2	43,8	Grimsley and Ober 1997
Africains	n=108 50,9	49,1	Matte <i>et al.</i> 2000
Congolais	n=91 58,0	42,0	Di Cristofaro <i>et al.</i> 2011
Pygmés	n=73 59,0	41,0	Di Cristofaro <i>et al.</i> 2011
Afro-américains	n=67 58,2 n=38 56,6	41,8 43,4	Grimsley and Ober 1997 Grimsley <i>et al.</i> 2002
Afro-caribéains	n=60 53,3	46,7	Antoun <i>et al.</i> 2009
Amérindiens	n=167 58,4	41,6	Arnaiz-Villena <i>et al.</i> 2007
Indiens	n=200 64,7	35,3	Tripathi and Agrawal 2007
Indo-Asiatiques	n=52 56,7	43,3	Antoun <i>et al.</i> 2009
Chinois	n=200 42,3 n=150 45,3 n=690 39,9	57,7 54,7 60,1	Zhao <i>et al.</i> 2001 Zhen <i>et al.</i> 2004 Liu <i>et al.</i> 2012
Japonais	n=50 32,0	68,0	Grimsley <i>et al.</i> 2002
Thaï	n=100 42,5	57,5	Kimkong <i>et al.</i> 2003
Coréens	n=486 49,1	50,9	Park <i>et al.</i> 2007
Australiens	n=200 57,0	43,0	Danzer <i>et al.</i> 2009
Brésiliens	n=104 62,5	37,5	Veiga-Castelli <i>et al.</i> 2012
Total	n=4061 48,5 %	51,5 %	

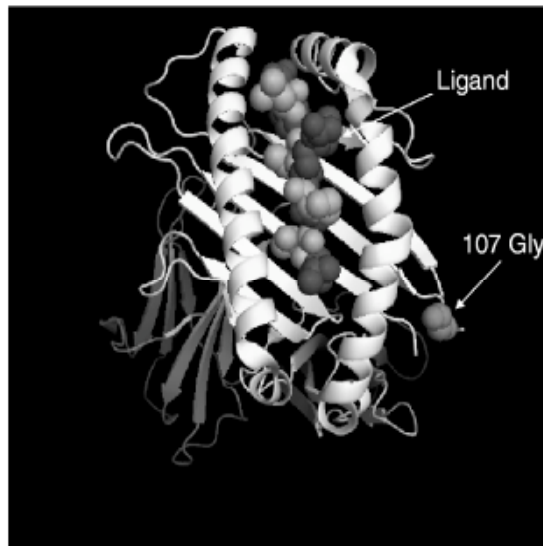


Figure 6 : Représentation cristallographique du sillon peptidique de la molécule HLA-E

La position de l'acide aminé polymorphe (Arginine/Glycine¹⁰⁷) est indiquée.

(Tripathi *et al.* 2006)

Plusieurs études ont décrit une association entre le polymorphisme de la molécule HLA-E et la susceptibilité à développer certaines pathologies (**Tableau 3**). Ainsi, il a notamment été montré que l'homozygotie pour l'allèle HLA-E*0103 était associée à une plus grande susceptibilité à développer des carcinomes du nasopharynx (Hirankarn *et al.* 2004), à un moindre risque d'être infecté par le HIV et le HBV (Lajoie *et al.* 2006; Zhang *et al.* 2012) et à une augmentation de la survie globale et sans rechute des patients recevant une greffe de cellules souches hématopoïétiques (Tamouza *et al.* 2005; Tamouza *et al.* 2006; Danzer *et al.* 2009; Ludajic *et al.* 2009; Hosseini *et al.* 2012). L'allèle HLA-E*0101, quant à lui, serait associé à une prédisposition aux avortements spontanés (Steffensen *et al.* 1998; Tripathi *et al.* 2006; Mosaad *et al.* 2011), à une diminution du risque d'être infecté par le HCV (Schulte *et al.* 2009) et semble également favoriser la survenue de maladies auto-immunes (Hodgkinson *et al.* 2000; Cascino *et al.* 2007; Park *et al.* 2007; Paladini *et al.* 2009). Dans la majorité des cas, il a été proposé que l'impact du polymorphisme de HLA-E sur la survenue de ces pathologies était lié à la stabilité relative des deux formes alléliques à la membrane cellulaire et donc à leur capacité à interagir avec les récepteurs NK et T. Aussi, en dépit de leur grande similarité, les deux formes alléliques de la molécule HLA-E semblent cependant présenter des propriétés fonctionnelles distinctes pouvant avoir favorisé leur maintien respectif dans la population humaine.

**Tableau 3 : Impact du polymorphisme de HLA-E
dans divers contextes physiopathologiques**

Contexte physiopathologique	Impact du polymorphisme de HLA-E	Références
Maladies auto-immunes et inflammatoires		
Diabète de type 1	Augmentation significative de la fréquence de l'allèle HLA-E*0101 chez les patients	Hodgkinson <i>et al.</i> 2000
Syndrome de Behçet	Corrélation entre expression de l'allèle HLA-E*0101 et diminution du risque de développer la pathologie	Park <i>et al.</i> 2007
Spondylarthrite ankylosante	Augmentation significative de la fréquence de l'allèle HLA-E*0101 chez les patients	Cascino <i>et al.</i> 2007, Paladini <i>et al.</i> 2009
Maladies infectieuses		
HIV	Corrélation entre homozygotie pour l'allèle HLA-E*0103 et diminution du risque d'infection par le virus	Lajoie <i>et al.</i> 2006
HCV	Corrélation entre homozygotie pour l'allèle HLA-E*0101 et diminution du risque d'infection par le virus	Schulte <i>et al.</i> 2009
HBV	Corrélation entre expression de l'allèle HLA-E*0101 et augmentation du risque d'infection par le virus	Zhang <i>et al.</i> 2012
Cancers		
Carcinomes Nasopharyngés	Augmentation significative de la fréquence de l'allèle HLA-E*0103 chez les patients	Hirankarn <i>et al.</i> 2004
Grossesse		
Avortements spontanés	Augmentation significative de la fréquence de l'allèle HLA-E*0101 chez les patientes sujettes aux avortements spontanés récurrents	Steffensen <i>et al.</i> 1998, Tripathi <i>et al.</i> 2006, Mosaad <i>et al.</i> 2011
Transplantation		
Greffe de cellules hématopoïétiques	Corrélation entre homozygotie pour l'allèle HLA-E*0103 et diminution de l'incidence des maladies du greffon contre l'hôte, diminution de la mortalité liée à la greffe et augmentation de la survie globale des patients Corrélation entre homozygotie pour l'allèle HLA-E*0101 et augmentation de la mortalité post-greffe et risque d'infections bactériennes	Tamouza <i>et al.</i> 2005, Tamouza <i>et al.</i> 2006, Danzer <i>et al.</i> 2009, Ludajic <i>et al.</i> 2009, Hosseini <i>et al.</i> 2012

1.3 Répertoire peptidique et apprêtement

Une fois traduites dans le réticulum endoplasmique, les chaînes lourdes des molécules HLA-I nécessitent généralement de s'associer à la chaîne légère invariante, β_2m , et d'être apprêtées par un peptide afin de former un complexe hétérotrimérique stable qui pourra alors transiter, via le Golgi, vers la membrane plasmique.

Le sillon peptidique des molécules HLA-I est formé à l'interface des domaines extracellulaires α_1 et α_2 de la chaîne lourde et est composé de 8 feuilletts β et de 2 hélices α . Le sillon peptidique des molécules HLA-I classiques possède généralement 6 poches de liaison qui sont hautement polymorphes en termes de taille, de forme et de propriétés électrochimiques. Ainsi, chaque allèle HLA-I classique peut se lier à un répertoire peptidique distinct et varié, majoritairement constitué de peptides de 8 à 10 acides aminés qui sont générés dans le cytosol par dégradation protéolytique avant d'être transportés dans le réticulum endoplasmique par le transporteur peptidique TAP. La spécificité du répertoire peptidique lié pour un allèle HLA-Ia est généralement déterminée par la séquence de 2 à 3 acides aminés qui correspondent aux résidus d'ancrages permettant au peptide de s'associer aux sites de contact (ou poches d'ancrages) dans le sillon peptidique. Ces résidus d'ancrage sont généralement localisés à la position 2 et à l'extrémité C-terminale du peptide. Cependant, d'autres résidus auxiliaires peuvent également stabiliser la liaison du peptide.

En revanche, la structure du sillon peptidique de la molécule HLA-E et de ses homologues est particulièrement bien conservée face à l'évolution et diverge de celle des autres molécules du CMH-I classique. Ainsi, la poche peptidique des molécules HLA-E et Qa-1 présente une structure très hydrophobe et est caractérisée par la substitution, par des sérines, des acides aminés 143 et 147, qui, dans les molécules du CMH-Ia, sont invariablement une thréonine et un tryptophane respectivement et qui jouent un rôle prépondérant dans la stabilité de la liaison à l'extrémité C-terminale des peptides (Soloski *et al.* 1995). De plus, la poche peptidique présente de nombreuses positions d'ancrage, restreignant ainsi la liaison à des peptides ayant une séquence bien définie. En conséquence, ces molécules présentent un répertoire peptidique conservé, distinct et plus restreint que celui des autres molécules HLA-I.

Ainsi, dans des conditions physiologiques, les molécules HLA-E présentent majoritairement des peptides issus des séquences signal d'export au RE des autres molécules du CMH-I. Cependant, lors de stress cellulaire, d'infections ou de la transformation tumorale,

le répertoire peptidique de ces molécules peut varier, conduisant ainsi à la présentation de nouveaux peptides à la surface des cellules.

1.3.1 Présentation de peptides issus des autres molécules HLA-I

Dans les conditions physiologiques, les molécules HLA-E et Qa-1 membranaires présentent très majoritairement des peptides issus des résidus 3 à 11 des séquences signal d'export au RE des autres molécules du CMH-I. Ainsi, il a été estimé que plus de 70% des molécules Qa-I exprimées en surface étaient liées au peptide Qdm (AMAPRTLLL) issus de la séquence signal des molécules H-2D et H-2L (DeCloux *et al.* 1997; Kurepa *et al.* 1998). De façon similaire, l'expression à la membrane de HLA-E est stabilisée par des peptides nonamériques issus des séquences signal des autres molécules HLA-I (Braud *et al.* 1997; Lee *et al.* 1998; Stevens *et al.* 2001; Miller *et al.* 2003). Ces peptides présentent tous une séquence globalement hydrophobe et assez conservée. En effet, seules des variations mineures sont observées aux positions 1, 2, 7 et 8 (**Tableau 4**).

Tous les peptides issus des séquences signal des molécules HLA-I ne sont cependant pas susceptibles de se lier à la molécule HLA-E, les positions 2 et 9 étant particulièrement critiques pour la liaison. En outre, les peptides issus de certains allèles HLA-B, et présentant une thréonine en position 2, ne peuvent pas stabiliser l'expression de la molécule HLA-E. Le peptide issu de la séquence signal des molécules HLA-G est également capable de se lier à la molécule HLA-E, mais seule l'expression intracellulaire de l'isoforme membranaire HLA-G1 semble pouvoir stabiliser efficacement l'expression membranaire de la molécule HLA-E (Ulbrecht *et al.* 2004). En revanche, les peptides issus des molécules HLA-E et HLA-F, caractérisées par des séquences signal plus courtes, ne sont pas capables de se lier à HLA-E.

De fait, pour pouvoir être exprimée stablement en surface, la molécule HLA-E nécessite généralement d'être co-exprimée avec des molécules HLA-I classiques ou avec la molécule HLA-G. D'ailleurs, les cellules exprimant le plus fortement les molécules HLA-E en surface, sont les cellules lymphocytaires et endothéliales, qui expriment à un niveau élevé les molécules HLA-I classiques, ainsi que les cellules du trophoblaste, qui expriment la molécule HLA-G.

**Tableau 4 : Séquence des peptides signal issus des molécules HLA-I
et capacité à se lier à la molécule HLA-E**

Peptide signal	Origine	Liaison à HLA-E
VMAPRTLIL	HLA-A : A*01, A*03, A*11, A*29, A*30, A*31, A*32, A*33, A*36 et A*74 HLA-C : Cw*02 et Cw*15	+
VMAPRTLVL	HLA-A : A*02, A*23, A*24, A*25, A*26, A*3402, A*43, A*66 et A*69	+
IMAPRTLVL	HLA-A : A*34:01	ND
VMPRTLIL	HLA-A : A*80	ND
VMAPRTVLL	HLA-B : B*07, B*08, B*14, B*38, B*42, B*67, B*73 et B*81	+
VTAPRTLIL	HLA-B : B*13, B*18, B*27, B*35:42, B*37, B*40, B*44, B*47, B*54, B*56, B*58, B*59, B*82 et B*83	-
VTAPRTVLL	HLA-B : B*15, B*35, B*40, B*41, B44:18, B*45, B*49, B*50, B*51, B*52, B*57 et B*78	-
VMAPRTLIL	HLA-C : Cw*01, Cw*03, Cw*0401, Cw*05, Cw*06, Cw*08, Cw*12, Cw*14, Cw*16 et Cw*17:02	+
VMAPRTLTL	HLA-C : Cw*08:09	ND
VMAPRALIL	HLA-C : Cw*07 et Cw*18	+
VMAPQALIL	HLA-C : Cw*17:01-03	ND
MVDGTLIL	HLA-E	-
MAPRSLLI	HLA-F	-
VMAPRTLFL	HLA-G	+

L'apprêtement des molécules HLA-E et Qa-1 par les peptides issus des séquences signal d'export au RE des autres molécules du CMH-I est réalisé dans le réticulum endoplasmique (**Figure 7**). Lors de la synthèse des molécules HLA-A/-B/-C/-G, la séquence signal d'export au RE est clivée par des peptidases signal (signal peptidase ou SPase et signal peptide peptidase ou SPPase) présentes à la membrane du RE (Lemberg *et al.* 2001). La séquence N-terminale qui contient le peptide d'intérêt est alors relarguée dans le cytosol puis prise en charge par le protéasome qui va générer le peptide optimal 3-11 (Bland *et al.* 2003). Les peptides nonamériques sont ensuite transportés vers le RE de façon dépendante du transporteur de peptides TAP (Braud *et al.* 1998; Tompkins *et al.* 1998; Ulbrecht *et al.* 1998).

Une fois dans le RE, ils peuvent alors être chargés sur un complexe HLA-E/Qa-1- β 2m, à l'aide de protéines chaperonnes du complexe de chargement peptidique (Peptide Loading Complex ou PLC), avant d'être finalement acheminés vers la membrane (Bai *et al.* 1998; Braud *et al.* 1998; Li *et al.* 2004).

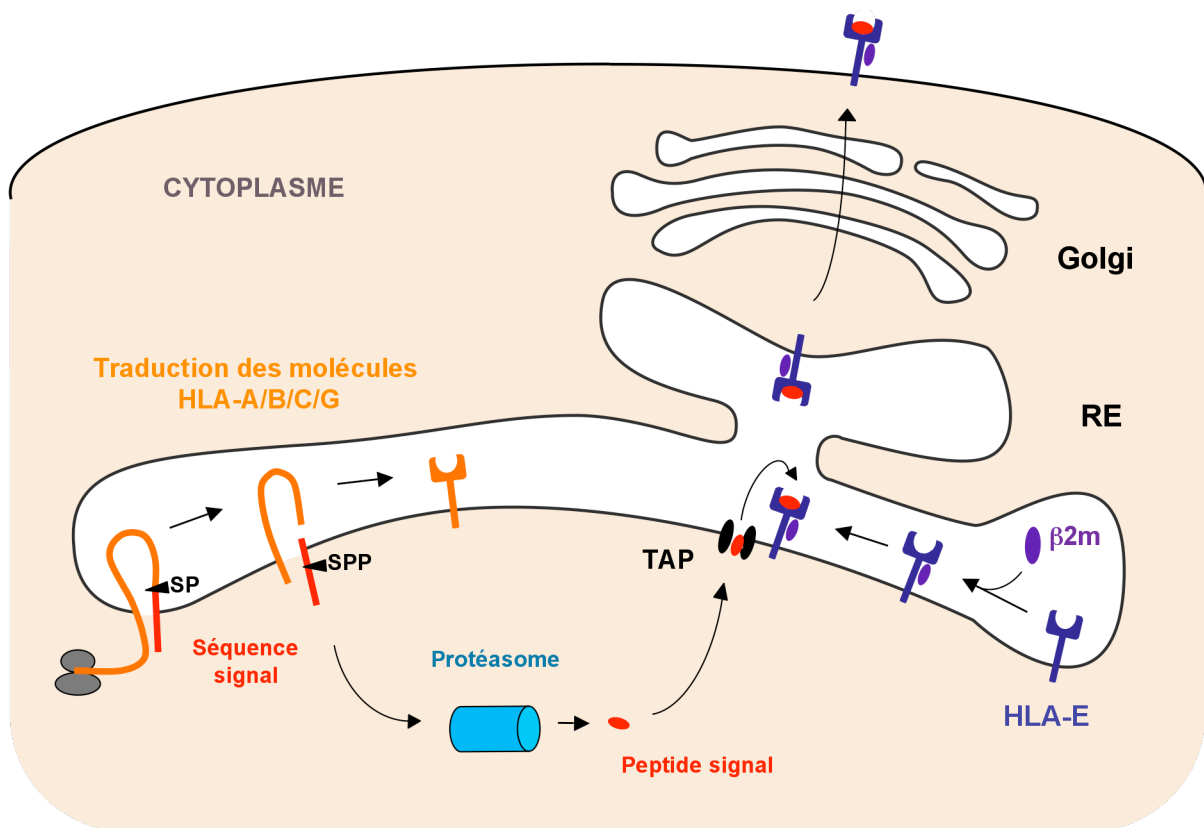


Figure 7 : Modalité d'apprêtement des peptides issus des séquences signal d'export au RE des molécules HLA-A/-B/-C/-G par la molécule HLA-E

En définitive, l'expression en surface des peptides issus des autres molécules du CMH-I par les molécules HLA-E/Qa-1 est strictement dépendante de l'intégrité de nombreux acteurs moléculaires participant à la voie de présentation endogène des antigènes. Par conséquent, les cellules n'exprimant pas la β 2m ou déficientes pour les molécules TAP, Tapasine, SPase, SPPase ou constituant le protéasome ne seront pas capables de présenter les peptides issus des séquences signal d'export au RE des autres molécules HLA-I.

L'analyse de la structure cristallographique des molécules HLA-E/Qa-1 liées à ces peptides signaux a permis de montrer la spécificité de leur interaction. D'une part, les chaînes latérales de 5 des 9 résidus peptidiques se lient à des poches peptidiques (P2, P3, P6, P7 et P9). De ce fait, les peptides sont plus profondément enfouis dans le sillon peptidique, comparativement à ce qui est observé pour les peptides apprêtés par les molécules HLA-Ia présentant seulement 2 positions d'ancrage (P2 et P9) (**Figure 8**). D'autre part, les expériences de mutagenèse montrent que chacun des 9 résidus peptidiques participe à optimiser la liaison dans le sillon peptidique des molécules HLA-E/Qa-1 (Braud *et al.* 1997; O'Callaghan *et al.* 1998; Miller *et al.* 2003; Strong *et al.* 2003).

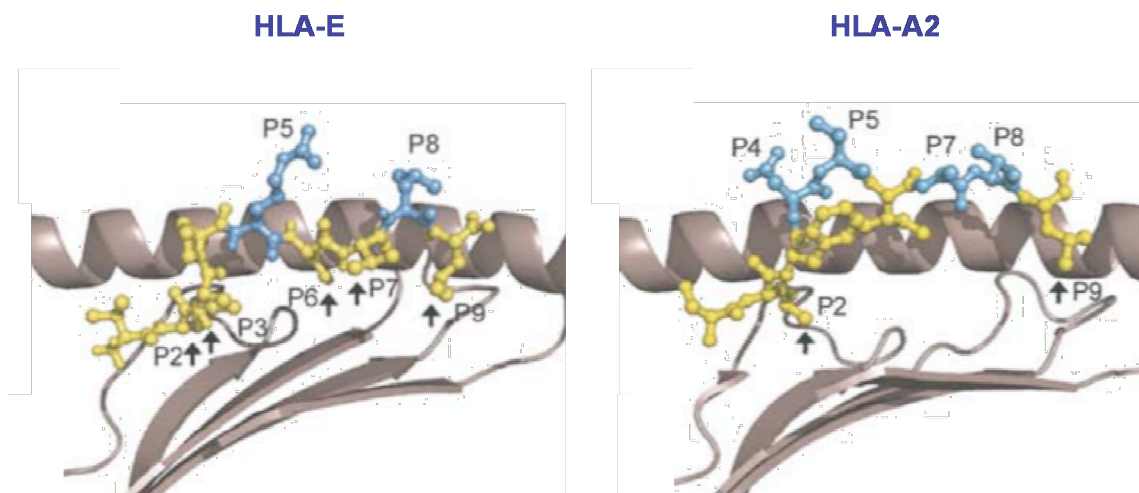


Figure 8 : Comparaison du mode de liaison au peptide des molécules HLA-E et HLA-A*0201 liées respectivement aux peptides VMAPRTVLL (peptide signal HLA-B*08) et SLFNTIAVL (HIV gag) (Sullivan *et al.* 2006)

Cependant, bien que hautement spécifique, cette liaison semble plus labile que celle observée pour les molécules du CMH-I classiques. En effet, il a clairement été démontré que les peptides issus des séquences signal des molécules du CMH-I se dissociaient très rapidement des formes solubles et membranaires des molécules HLA-E/Qa-1. Ainsi, le temps de demi-vie du peptide Qdm complexé à la molécule Qa-1 est de 54 minutes contre 682 minutes pour le peptide optimal SIINFEKL complexé à la molécule du CMH-I classique H-2K^b. En revanche, tandis que la stabilité des complexes membranaires formés par les molécules du CMH-I classique est très dépendante de leur apprêtement peptidique, cette étude suggère également que les complexes HLA-E/Qdm-B2m "vides" sont comparativement plus stables à la surface cellulaire (Kambayashi *et al.* 2004).

1.3.2 Présentation des peptides alternatifs

Si, dans des conditions physiologiques, les molécules HLA-E/Qa-1 sont majoritairement apprêtées de façon TAP dépendante par des peptides issus des autres molécules du CMH-I, d'autres peptides peuvent également être accommodés et stabiliser l'expression en surface de ces molécules. D'ailleurs, les cellules TAP déficientes ou ne possédant pas de peptides issus des autres molécules du CMH-I, expriment cependant des niveaux détectables de molécules HLA-E/Qa-1 en surface, bien qu'à des taux d'expression généralement inférieurs (Ulbrecht *et al.* 1992; Weiss *et al.* 1998; Furukawa *et al.* 1999; Lo Monaco *et al.* 2008). L'origine de ces peptides est diverse. Ceux-ci peuvent être issus de protéines endogènes ou exogènes, certains étant également dérivés de séquences signal d'export intracellulaire, et leurs modalités d'apprêtement peuvent dépendre, ou non, du transporteur peptidique TAP (**Tableau 5**).

Parmi les peptides endogènes présentés par la molécule HLA-E et ses homologues, plusieurs sont issus de molécules associées au stress cellulaire telles que les molécules chaperonnes HSP60 ou le transporteur se liant à l'ATP MRP7 (Multidrug Resistance Protein 7) (Michaelsson *et al.* 2002; Davies *et al.* 2003; Wooden *et al.* 2005). Cependant, l'affinité relative de ces peptides pour les molécules HLA-E/Qa-1 est inférieure à celle observée pour les peptides issus des molécules du CMH-I. Ces molécules sont exprimées constitutivement, mais leur expression peut également être augmentée en réponse à de nombreux stimuli tels que l'augmentation de la température, la carence en nutriments, l'exposition à des toxines ou encore l'inflammation. Aussi, il a été montré qu'en absence de peptides issus des molécules du CMH-I, les molécules Qa-I membranaires étaient majoritairement liées au peptide issu de la protéine murine HSP60 dont la présentation est dépendante du transporteur TAP. De plus, la présentation de l'ensemble de ces peptides par les molécules HLA-E/Qa-1 est augmentée à la surface des cellules exposées à un choc thermique. Les modalités d'apprêtement des peptides issus respectivement de la séquence signal d'export aux mitochondries et du domaine transmembranaire des molécules HSP60 et MRP7 humaines n'ont pas été étudiées à ce jour.

**Tableau 5 : Origine et séquence des peptides non conventionnels présentés
par la molécule HLA-E et ses homologues**

Molécule	Source	Peptide	Remarque	Références
HLA-E	Endogène			
	HSP60 ₁₀₋₁₈	QMRPVSRL		Michaelsson <i>et al.</i> 2002
	ABC MRP7 ₄₉₆₋₅₀₄	ALALVRMLI		Wooden <i>et al.</i> 2005
	Prdx5 mutée ₅₂₋₆₀	AMAPIKTHL AMAPIKVRL		Sensi <i>et al.</i> 2009
	Chaîne Vb du TCR	SLELGDSAI LLLGPGSGL		Li <i>et al.</i> 2001
	Exogène			
	HCMV gpUL40 ₁₅₋₂₃	VMAPRTLVL VMAPRTLIL VMAPRTLLL	Apprêtement dans le RE, indépendant de TAP	Tomasec <i>et al.</i> 2000, Ulbrecht <i>et al.</i> 2000
	HCV core ₃₅₋₄₄	YLLPRRGPRL		Nattermann <i>et al.</i> 2005
	HIV p24 ₁₄₋₂₂	AISPRTLNA		Nattermann <i>et al.</i> 2005
	EBV BZLF-1 ₃₉₋₄₇	SQAPLPCVL		Ulbrecht <i>et al.</i> 1998
	Influenza InfM ₅₉₋₆₇	ILGFVFTLT		Ulbrecht <i>et al.</i> 1998
	<i>Salmonella typhi</i> GroEL	Variés		Salerno-Goncalves <i>et al.</i> 2004
	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	Variés	Apprêtement dans les phagosomes, dépendant de TAP	Heinzel <i>et al.</i> 2002, Grotzke <i>et al.</i> 2009
	Gliadine chaîne $\alpha 2$ ₅₂₋₆₀	SQQPYLQLQ		Terrazzano <i>et al.</i> 2007
Qa-1	Endogène			
	Hsp60 ₂₁₆₋₂₂₄	GMKFDRGYI	Apprêtement dépendant de TAP	Davies <i>et al.</i> 2003
	Prépro-Insuline II ₂₋₁₀	ALWMRFLPL		Chun <i>et al.</i> 1998
	Chaîne Vb du TCR	variés		Jiang <i>et al.</i> 1995
	TEIPP	Variés	Apprêtement dans les cellules TAP déficientes	Oliveira <i>et al.</i> 2010
	Fam49b	FYAEATPML	Apprêtement dans les cellules ERAAP déficientes	Nagarajan <i>et al.</i> 2012
	Exogène			
	<i>Listeria monocytogenes</i>	?	Apprêtement dépendant de TAP	Bouwer <i>et al.</i> 1997
	<i>Salmonella typhimurium</i> GroEL ₁₉₂₋₂₀₀	GMQFDRGYL	Apprêtement dépendant de TAP	Lo <i>et al.</i> 1999, Lo <i>et al.</i> 2000
Caja-E	Endogène			
	MOG ₄₀₋₄₈	YRPPFSRVV		Jagessar <i>et al.</i> 2012

D'autres peptides du soi se liant à la molécule HLA-E et/ou à ses homologues ont également été décrits. Ainsi, les molécules HLA-E et Qa-1 peuvent apprêter des peptides issus de la chaîne V β du TCR dans les lymphocytes T CD4 activés (Jiang *et al.* 1995; Li *et al.* 2001). La molécule Qa-1 peut aussi présenter un peptide issu de la séquence signal de la prépro-insuline II dans les cellules pancréatiques β (Chun *et al.* 1998) et un peptide issu d'un gène exprimé constitutivement mais de fonction inconnue : ORF Fam49b dans les cellules ERAAP^{-/-} (Nagarajan *et al.* 2012). Enfin, la molécule Caja-E (homologue de HLA-E chez le ouistiti) peut présenter un peptide issu de la protéine MOG (Myéline/Oligodendrocytes Glycoprotéine) à la surface des oligodendrocytes (Jagessar *et al.* 2012).

La transformation tumorale représente un autre facteur susceptible de modifier le répertoire peptidique de ces molécules. Ainsi, il a été montré *in vitro* que l'expression en surface des molécules HLA-E était indépendante de la disponibilité des peptides issus des autres molécules HLA-I dans de nombreuses lignées tumorales (Palmisano *et al.* 2005; Lo Monaco *et al.* 2011). Les antigènes mutés de tumeur Prdx5 Δ 2 et Prdx5 Δ 2,3 (Péroxirédoxine 5) codent notamment pour des peptides qui stabilisent l'expression de la molécule HLA-E, et des peptides processés de façon TAP indépendante (TEIPP : T cell Epitope associated with Impaired Presentation Pathway) sont présentés par la molécule Qa-1 à la surface des cellules tumorales TAP déficientes (Sensi *et al.* 2009; van Hall *et al.* 2010).

De nombreux agents pathogènes intracellulaires fournissent également des peptides pouvant se lier aux molécules HLA-E/Qa-1.

Ainsi, plusieurs peptides viraux (CMV, HCV, EBV, HIV, Influenza) sont capables de stabiliser l'expression membranaire de la molécule HLA-E et les cellules infectées par le CMV, le HIV et le HCV expriment d'avantage de molécules HLA-E à leur membrane (Tomasec *et al.* 2000; Ulbrecht *et al.* 2000; Garcia *et al.* 2002; Nattermann *et al.* 2005; Nattermann *et al.* 2005; Prod'homme *et al.* 2012). De façon intéressante, les peptides codés par le CMV sont strictement identiques à ceux issus de la séquence d'export au RE des molécules HLA-I classiques, mais sont apprêtés de manière TAP indépendante. Ce virus code également pour plusieurs protéines qui inhibent l'activité du transporteur peptidique TAP, empêchant donc l'apprêtement de la molécule HLA-E par les peptides issus des autres molécules HLA-I. Ainsi, la capacité du virus à fournir des peptides aux molécules HLA-E de façon TAP indépendante semble pallier la restriction de répertoire peptidique de HLA-E afin d'assurer le maintien de son expression à la membrane dans les cellules infectées.

Par ailleurs, les infections bactériennes (*Salmonella enterica*, et *Mycobacterium tuberculosis*) peuvent également conduire à la présentation de peptides bactériens par les molécules HLA-E/Qa-1 (Lo *et al.* 1999; Lo *et al.* 2000; Soloski and Metcalf 2001; Salerno-Goncalves *et al.* 2004). En outre, les cellules dendritiques infectées par *Mycobacterium tuberculosis* sont capables d'apprêter des peptides sur les molécules HLA-E dans le RE, mais également dans les phagosomes, et ce de façon TAP dépendante. Cet apprêtement dans les compartiments phagosomiaux se ferait à partir de molécules HLA-E recyclées à la surface membranaire (Heinzel *et al.* 2002; Grotzke *et al.* 2009).

Enfin, il est intéressant de constater que le répertoire peptidique de la molécule HLA-E présente certaines ressemblances avec celui de la molécule HLA-A*0201. En effet, les peptides issus de Prdx5 Δ 2, Prdx5 Δ 2,3 et du HIV se lient à ces deux molécules. De plus, l'équipe de Thorbald Van Hall a observé que dans les cellules TAP déficientes le répertoire peptidique des molécules HLA-E s'apparentait clairement à celui des molécules HLA-A*0201 avec une prédilection pour les acides aminés leucine et valine/leucine en positions 2 et 9 (Résultats non publiés).

Ainsi, il apparaît que, dans des conditions limitant l'apport en peptides majoritaires (issus des séquences signal des autres molécules HLA-I), le répertoire peptidique de la molécule HLA-E tend à se rapprocher de celui des molécules HLA-I classiques, que ce soit en termes de spécificité ou en termes de variété.

1.4 Profil d'expression tissulaire

Les molécules du CMH-I classique sont exprimées à la surface d'une majorité des cellules somatiques nucléées de l'organisme, bien qu'à des taux très variables en fonction du type cellulaire.

En revanche, les molécules du CMH-I non-classique sont caractérisées par un profil d'expression tissulaire plus restreint. Ainsi, les molécules HLA-G et HLA-F ne sont physiologiquement exprimées que par un nombre limité de tissus : cellules épithéliales thymiques (Crisa *et al.* 1997; Mallet *et al.* 1999), cornée (Le Discorde *et al.* 2003), îlots pancréatiques (Cirulli *et al.* 2006), précurseurs endothéliaux et érythroïdes (Menier *et al.* 2004) et tissus extra-embryonnaires (Kovats *et al.* 1990; Wei and Orr 1990; Blaschitz *et al.* 2001) pour HLA-G ; cellules leucocytaires activées (Lymphocytes B et T, cellules NK et Monocytes) (Geraghty *et al.* 1990; Lury *et al.* 1990; Lee and Geraghty 2003; Lee *et al.* 2010) et du trophoblaste (Ishitani *et al.* 2003) pour HLA-F.

La molécule HLA-E et son homologue murin Qa-1 présentent un profil d'expression distinct, moins restreint que celui des autres molécules du CMH-I non classiques.

1.4.1 Régulation transcriptionnelle

La structure des régions promotrices régulant l'activité transcriptionnelle du gène HLA-E diffère de celle des autres molécules HLA-I, conduisant à un profil d'expression original et distinct.

Le gène HLA-E code pour 2 transcrits, d'environ 1,9kb et 3,3kb, ne résultant pas d'un épissage alternatif du gène mais de l'utilisation de sites de polyadénylation alternatifs. Ces deux transcrits sont constitutivement exprimés dans tous les types cellulaires et tissulaires étudiés et leur niveau relatif d'expression est comparable.

Comme pour les molécules HLA-I classiques, le taux d'expression des molécules HLA-E est supérieur dans les tissus et cellules lymphoïdes, l'expression maximale étant observée dans les lymphocytes B et T matures. L'activation des cellules lymphocytaires engendre, notamment, une augmentation globale de l'activité transcriptionnelle de HLA-E avec une modification de l'expression relative des deux transcrits en faveur de la forme la

plus courte (Koller *et al.* 1988; Mizuno *et al.* 1988; Wei and Orr 1990; Truong *et al.* 1992; Ulbrecht *et al.* 1992; Houlihan *et al.* 1995).

De façon plus surprenante, des taux d'expression comparables à ceux observés dans les lymphocytes B sont également observés dans les annexes embryonnaires (placenta, amnios et chorion) (Wei and Orr 1990; Houlihan *et al.* 1995). D'ailleurs, le gène codant pour la molécule HLA-E est le seul qui échappe à la méthylation *in vitro* dans les cellules du trophoblaste, contrairement aux autres molécules HLA de classe I dont l'activité transcriptionnelle est fortement, voire totalement, réprimée (Boucraut *et al.* 1993; Guillaudeux *et al.* 1995). La progestérone augmente également l'activité transcriptionnelle du gène HLA-E dans ces cellules (Huang *et al.* 2009).

L'IFN- γ et le TNF- α augmentent aussi le taux de transcription et sont associés à une modification du taux relatif d'expression des deux formes de transcrits, au détriment de la forme longue. L'augmentation de l'activité transcriptionnelle de HLA-E engendrée par l'IFN implique la liaison des facteurs transactivateurs STAT1 et CIITA à des sites de fixation présents dans la région promotrice du gène codant pour HLA-E (Gustafson and Ginder 1996; Gobin and van den Elsen 2000).

1.4.2 Régulation post-transcriptionnelle

L'expression de la protéine HLA-E a été montrée, *in vitro* et *in vivo*, dans de nombreux tissus et organes, annexes extra-embryonnaires incluses. Cependant, son expression est restreinte à un petit nombre de types cellulaires que sont les cellules immunitaires d'origine lymphoïde et myéloïde (exception faite des érythrocytes), les cellules endothéliales, les cellules épithéliales, les mélanocytes, les kératinocytes et les cellules du trophoblaste. En revanche, les adipocytes, les fibroblastes, les cellules musculaires et les cellules du système nerveux n'expriment pas, ou très peu, la molécule HLA-E (Derre *et al.* 2006; Coupel *et al.* 2007; Perera *et al.* 2007; Gooden *et al.* 2011; Lo Monaco *et al.* 2011).

Le fait que le profil d'expression protéique de la molécule HLA-E soit beaucoup plus restreint que celui de ses transcrits suggère l'existence de mécanismes de régulation post-transcriptionnelle spécifiques limitant son expression à certains types cellulaires. Cependant, à ce jour, aucune étude n'a permis d'expliquer ce profil d'expression traductionnel restreint. La seule étude ayant décrit un mécanisme de régulation traductionnelle de la molécule HLA-E a

été réalisée *in vitro* avec des cellules tumorales. Ces travaux montrent que le sélénite induit une diminution spécifique de l'expression de la protéine HLA-E, sans que son niveau de transcription ne soit affecté. Cette inhibition de la traduction protéique de HLA-E semble être associée à la génération d'un stress oxydatif dans les cellules et n'affecte pas les niveaux d'expression membranaire des autres molécules du CMH-I (Enqvist *et al.* 2011).

Une autre caractéristique de la molécule HLA-E est que son niveau d'expression à la membrane cellulaire est bien inférieur à celui observé pour les molécules HLA-I classiques *in vitro*. Cette particularité est également partagée par son homologue murin Qa-1.

Plusieurs études ont suggéré que le faible niveau d'expression à la surface des molécules HLA-E et Qa-1 était la conséquence de la faible stabilité des complexes hétérotrimériques qu'elles forment en s'associant à la $\beta 2m$ et à un peptide. De ce fait, ces complexes hétérotrimériques instables seraient séquestrés plus longtemps dans le RE, faiblement exportés vers le réseau trans-golgien, et seule une fraction minoritaire de ces molécules arriverait jusqu'à la surface cellulaire, où elles seraient alors rapidement recyclées (Ulbrecht *et al.* 1999).

Cependant, le groupe de Giacomini a, plus récemment, suggéré que l'expression membranaire de la molécule HLA-E avait été sous-estimée au cours des études précédentes, du fait de l'utilisation d'anticorps reconnaissant des formes minoritaires de la molécule HLA-E, n'étant pas ou faiblement liées à la $\beta 2m$, et par conséquent instables et faiblement exprimées à la surface cellulaire (Lo Monaco *et al.* 2008).

Enfin, comme précédemment évoqué, le polymorphisme de la molécule HLA-E influence également le niveau d'expression de la molécule HLA-E en surface. Ainsi, l'allèle HLA-E*0101 forme des complexes hétérotrimériques moins stables que l'allèle HLA-E*0103 et est, par conséquent, moins fortement exprimé à la surface cellulaire (Kambayashi *et al.* 2004).

1.4.3 Expression dans les conditions pathologiques

Comme pour une majorité des molécules du CMH, l'expression de la molécule HLA-E est augmentée dans les conditions pro-inflammatoires. Il a été montré que l'IFN- γ et le TNF- α augmentaient *in vitro* son activité transcriptionnelle, traductionnelle et son niveau d'expression à la surface de nombreux types cellulaires (Malmberg *et al.* 2002; Derre *et al.* 2006; Nguyen *et al.* 2009).

Par ailleurs, il a été montré *in vitro* que les radiations gamma modifiaient l'expression membranaire des molécules HLA-E de façon paradoxale, celle-ci étant respectivement diminuée à la surface de cellules tumorales de mélanome et augmentée sur celle des cellules endothéliales macrovasculaires irradiées (Michelin *et al.* 2009; Riederer *et al.* 2010).

Les cellules ayant subi un stress thermique expriment également plus de complexes HLA-E/Qa-1 à la surface *in vitro*, cette augmentation de l'expression étant associée à la l'apprêtement de peptides issus de molécules de stress (Michaelsson *et al.* 2002; Davies *et al.* 2003; Wooden *et al.* 2005).

Par ailleurs, tandis que de nombreux virus ont, en réprimant l'expression des molécules HLA-I classiques à la surface des cellules infectées, développé des stratégies visant à limiter la présentation des antigènes viraux, celle des molécules HLA-E est conservée, voire augmentée, à la surface des cellules infectées par le HIV, le CMV et le HCV (Nattermann *et al.* 2005). Ainsi, le HIV peut non seulement fournir des peptides apprêtés par la molécule HLA-E, mais également, via la protéine Nef, diminuer spécifiquement l'expression membranaire des molécules HLA-A/B, tout en épargnant celle des molécules HLA-C et HLA-E à la surface des cellules infectées (Cohen *et al.* 1999). De manière similaire, tandis que les cellules infectées par le CMV "downrégulent" fortement l'expression des molécules HLA-I classiques, l'expression membranaire de HLA-E est préservée grâce à la capacité du virus à fournir une source alternative de peptides de façon TAP indépendante (Tomasec *et al.* 2000; Millo *et al.* 2007). Enfin, l'infection par le papilloma virus est également associée à une augmentation de l'expression de HLA-E, le niveau de son expression étant positivement corrélé à la taille des lésions infectieuses observées pour les virus HPV16/18 (Gooden *et al.* 2011).

La transformation tumorale est également souvent associée à une modification du profil d'expression des molécules du CMH. Ainsi, tandis que l'expression membranaire des molécules HLA-I classiques est souvent diminuée, celle des molécules non classiques HLA-E et HLA-G est fréquemment induite ou augmentée à la surface des cellules transformées. En outre, plusieurs études ont montré que la molécule HLA-E était exprimée *in vitro* et *in vivo* par de nombreux cancers d'origines histologiques variées (**Tableau 6**). De plus, dans certains cancers, son expression est corrélée avec le stade clinique, la présence et la composition de l'infiltrat lymphocytaire, ou encore le pronostic vital des patients (Malmberg *et al.* 2002; Bukur *et al.* 2003; Marin *et al.* 2003; Wischhusen *et al.* 2005; Bianchini *et al.* 2006; Derre *et al.* 2006; Mittelbronn *et al.* 2007; Goncalves *et al.* 2008; John *et al.* 2008; Kopantzev *et al.* 2008; Levy *et al.* 2008; Hanak *et al.* 2009; de Kruijf *et al.* 2010; Kren *et al.* 2010; Benevolo *et al.* 2011; Chen *et al.* 2011; Gooden *et al.* 2011; Lo Monaco *et al.* 2011; Silva *et al.* 2011; Bossard *et al.* 2012; Kren *et al.* 2012; Kren *et al.* 2012).

Dans les tissus sains, l'expression à la membrane de HLA-E semble dépendre majoritairement de celle des molécules HLA-A/-B/-C/-G susceptibles de fournir des peptides stabilisant celle-ci. Cependant cette dépendance n'est pas toujours aussi exclusive dans les cellules tumorales, suggérant la liaison à des peptides alternatifs. Ainsi, il a été montré que son expression membranaire était corrélée positivement avec celles des molécules HLA-Ia, de la $\beta 2m$, ou encore du complexe d'apprêtement du RE dans les carcinomes colorectaux, du col de l'utérus et de l'ovaire (Gooden *et al.* 2011; Bossard *et al.* 2012). En revanche, son expression à la membrane est indépendante de celle des molécules HLA-I classiques dans de nombreuses cellules tumorales *in vitro* (Palmisano *et al.* 2005; Lo Monaco *et al.* 2011), dans les carcinomes rénaux (de Kruijf *et al.* 2010) et est corrélée négativement avec celle de la $\beta 2m$ dans les carcinomes colorectaux (Bianchini *et al.* 2006).

Tableau 6 : Expression des molécules HLA-E par divers types tumoraux

Cancers	Expression de HLA-E	Références
Carcinomes / Adénocarcinomes		
Ovaire	<i>In vitro & In vivo</i> Corrélation négative avec le pronostic et positive avec la présence d'infiltrat lymphocytaire CD8	Malmberg <i>et al.</i> 2002, Gooden <i>et al.</i> 2011
Larynx	<i>In vitro & In vivo</i> Corrélation positive avec le stade clinique	Marin <i>et al.</i> 2003, Silva <i>et al.</i> 2011
Sein	<i>In vitro & In vivo</i> Corrélation négative avec le pronostic	Marin <i>et al.</i> 2003, de Kruijf <i>et al.</i> 2010
Col de l'utérus	<i>In vitro & In vivo</i> Corrélation positive avec le stade clinique	Goncalves <i>et al.</i> 2008, Gooden <i>et al.</i> 2011
Rein	<i>In vivo</i> Corrélation positive avec le pronostic	Bukur <i>et al.</i> 2003, Hanak <i>et al.</i> 2009, Kren <i>et al.</i> 2012
Colon / Rectum	<i>In vitro & In vivo</i> Corrélation négative/positive avec la survie et la présence d'infiltrat lymphocytaire	Bianchini <i>et al.</i> 2006, Levy <i>et al.</i> 2008, Benevolo <i>et al.</i> 2011, Bossard <i>et al.</i> 2012
Estomac	<i>In vitro & In vivo</i>	Marin <i>et al.</i> 2003, Lo Monaco <i>et al.</i> 2011
Poumon	<i>In vitro & In vivo</i>	Marin <i>et al.</i> 2003, Kopantzev <i>et al.</i> 2008
Pancréas	<i>In vitro & In vivo</i>	Marin <i>et al.</i> 2003, Lo Monaco <i>et al.</i> 2011
Prostate	<i>In vitro</i>	Marin <i>et al.</i> 2003
Endomètre	<i>In vivo</i>	Lo Monaco <i>et al.</i> 2011
Foie	<i>In vivo</i>	Chen <i>et al.</i> 2011, Lo Monaco <i>et al.</i> 2011
Parotide	<i>In vivo</i>	Lo Monaco <i>et al.</i> 2011
Thyroïde	<i>In vivo</i>	Lo Monaco <i>et al.</i> 2011
Autres types histologiques		
Lymphomes	<i>In vitro & In vivo</i> Corrélation positive avec le stade clinique dans les lymphomes non Hodgkiniens	Marin <i>et al.</i> 2003, Kren <i>et al.</i> 2012
Mélanomes	<i>In vitro & In vivo</i> Corrélation négative avec le stade clinique et positive avec le pronostic dans les mélanomes de stade III	Marin <i>et al.</i> 2003, Derre <i>et al.</i> 2006, John <i>et al.</i> 2008
Gliomes	<i>In vivo</i> Corrélation positive avec le stade clinique et la présence d'infiltrat lymphocytaire CD8	Wischhusen <i>et al.</i> 2005, Mittelbronn <i>et al.</i> 2007
Ostéosarcomes	<i>In vivo</i>	Lo Monaco <i>et al.</i> 2011
Rhabdomyosarcomes	<i>In vivo</i>	Lo Monaco <i>et al.</i> 2011
Histiocytomes	<i>In vivo</i>	Lo Monaco <i>et al.</i> 2011
Hémangiomes	<i>In vivo</i>	Lo Monaco <i>et al.</i> 2011
Séminomes	<i>In vivo</i>	Lo Monaco <i>et al.</i> 2011

2. HLA-E : Ligand des récepteurs NK CD94-NKG2

En 1998, Véronique Braud *et coll.* ont montré, à l'aide de tétramères recombinants que les molécules HLA-E se liaient à une fraction significative (entre 2 et 11%) des cellules lymphocytaires du sang périphérique. Une large proportion des cellules marquées (en moyenne 57%) présentait un phénotype associé aux cellules NK, CD3⁻CD56⁺, tandis qu'une plus faible proportion (environ 34%) était CD3⁺.

Il fut alors démontré, à l'aide d'anticorps bloquants, que les récepteurs se liant à la molécule HLA-E appartenaient à la famille des récepteurs CD94/NKG2 dont les ligands étaient alors encore mal définis (Braud *et al.* 1998). Ces récepteurs hétérodimériques appartiennent à la superfamille des récepteurs NK de type lectine-C et sont formés par l'association de la molécule invariante CD94 à une des glycoprotéines codée par un gène de la famille NKG2 (Chang *et al.* 1995; Lazetic *et al.* 1996; Carretero *et al.* 1997).

Par une approche similaire, il fut ensuite montré que les récepteurs CD94/NKG2 murins se liaient également à l'homologue de HLA-E : la molécule Qa-I (Salcedo *et al.* 1998; Vance *et al.* 1998; Vance *et al.* 1999).

2.1 Les récepteurs CD94/NKG2

2.1.1 Complexe génétique CD94/NKG2

Chez l'homme, les gènes codant pour les composants des récepteurs CD94/NKG2 sont situés dans le "complexe NK" sur le chromosome 12, et dans l'ordre suivant : CD94, NKG2-D, NKG2-F, NKG2-E, NKG2-C, NKG2-A (Houchins *et al.* 1991) (**Figure 9**). La séquence de ces gènes et leur ordre sont très bien conservés chez l'ensemble des primates (Glienke *et al.* 1998; Sobanov *et al.* 1999). Les gènes homologues murins sont situés dans le complexe NK murin sur le chromosome 6 et présentent une organisation et une structure similaires, à la différence près qu'il n'existe pas d'homologue à NKG2-F (Vance *et al.* 1997; Vance *et al.* 1998; Lohwasser *et al.* 1999; Lohwasser *et al.* 2000).

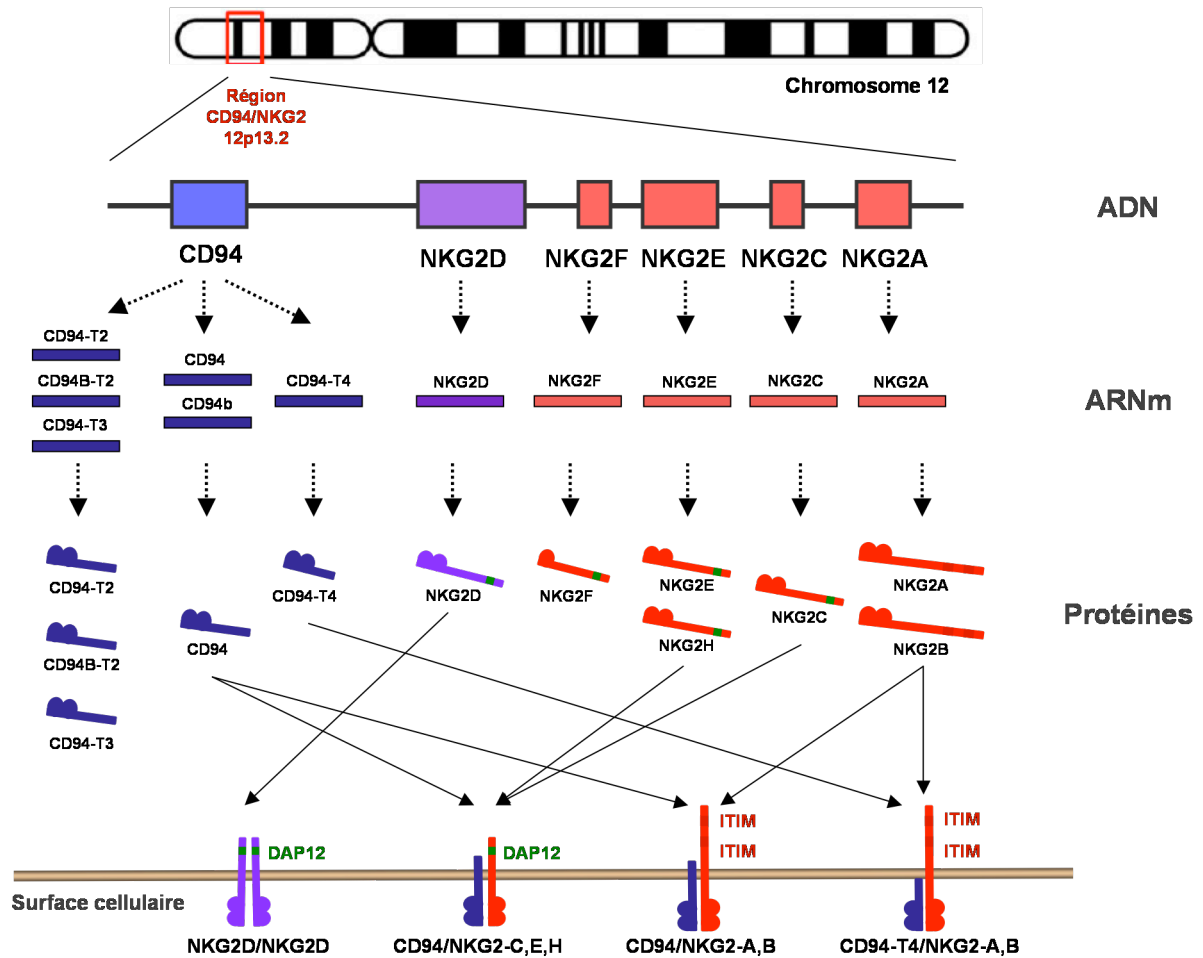


Figure 9 : Représentation du complexe génique CD94/NKG2 et de ses produits

Le gène CD94 présente deux séquences promotrices et 6 séquences exoniques. Ces promoteurs alternatifs présentent tous deux des domaines de liaisons à l'IFN- γ et aux ETS (E-Twenty Six), mais diffèrent par leur sensibilité aux interleukines IL-2 et IL-15. Chez l'humain, le promoteur proximal est constitutivement actif dans les cellules NK et les lymphocytes T $\alpha\beta$ CD8, tandis que l'activité du promoteur distal est induite en culture par l'IL-2 et l'IL-15. La configuration inverse est observée pour le gène murin (Rodriguez *et al.* 1998; Lieto *et al.* 2003; Wilhelm *et al.* 2003).

Chez l'homme, ce gène code pour 6 transcrits alternatifs générés par épissage : CD94, CD94b, CD94-T4, CD94-T2, CD94B-T2 et CD94-T3 (Liето *et al.* 2006). Les deux transcrits CD94 et CD94b codent pour des protéines membranaires de 30kDa présentant un domaine intracellulaire très court (10 acides aminés) et dépourvu de domaine de signalisation (Chang *et al.* 1995). Leur partie extracellulaire présente une structure lectine de type C non classique,

ne se liant pas au calcium et ne présentant qu'une des deux hélices α canoniques (Boyington *et al.* 1999). Le transcrite CD94-T4 code pour un variant protéique ayant un domaine intracellulaire tronqué qui s'associe préférentiellement à la molécule NKG2-B. Les transcrits CD94-T2, CD94B-T2 et CD94-T3 codent pour des protéines qui ne s'associent pas avec les membres NKG2 et dont l'expression est restreinte aux compartiments intracellulaires (Lieto *et al.* 2006).

Les gènes codant pour les molécules NKG2 semblent être issus de la duplication d'un gène ancestral commun, le gène NKG2-A étant apparu le plus précocement. Tous sont orientés dans le même sens et ils présentent une structure exon/intron similaire (Sobanov *et al.* 1999). De plus, à l'exception de la molécule NKG2-D qui est plus divergente, les séquences des protéines codées par les gènes NKG2-A, NKG2-C, NKG2-E et NKG2-F sont très conservées (93-97% d'homologie) et varient surtout dans les régions intracellulaires (Vance *et al.* 1999).

Il existe sept membres protéiques de la famille NKG2 : NKG2-A, NKG2-B, NKG2-C, NKG2-D, NKG2-E, NKG2-F et NKG2-H. Toutes les protéines de la famille NKG2 sont membranaires et présentent un domaine extracellulaire de type lectin-like ; leur taille varie entre 39kDa pour les formes activatrices et 43kDa pour les formes inhibitrices. Exception faite de la protéine NKG2-D qui est exprimée à la surface sous forme d'homodimères, toutes nécessitent de s'associer à la molécule CD94 pour pouvoir être exprimées à la membrane (Houchins *et al.* 1991; Lazetic *et al.* 1996; Brooks *et al.* 1997; Carretero *et al.* 1997; Plougastel and Trowsdale 1997; Cantoni *et al.* 1998).

NKG2-A et NKG2-B représentent deux variants protéiques issus d'un même transcrite du gène NKG2-A. Ils contiennent, dans leur séquence intracellulaire, deux domaines ITIM (Immunoreceptor Tyrosin-based Inhibition Motif) leur conférant des fonctions inhibitrices. Les protéines NKG2-C, NKG2-E, NKG2-F et NKG2-H sont activatrices. Elles présentent, dans leur séquence intracellulaire, des résidus chargés positivement (lysine) qui s'apparient via un résidu chargé négativement (acide aspartique) à l'adaptateur DAP12 contenant un motif ITAM (Immunoreceptor Tyrosin-based Activation Motif) responsable de la transduction des signaux activateurs (Cantoni *et al.* 1998; Lanier *et al.* 1998). Cependant, la protéine NKG2-F est dépourvue de domaine extracellulaire et n'est pas exprimée à la membrane, probablement à cause de son incapacité à pouvoir se lier à la molécule CD94 (Kim *et al.* 2004).

2.1.2 Expression des molécules CD94/NKG2

Les molécules CD94 peuvent être exprimées à la membrane sous la forme d'homodimères non fonctionnels (Perez-Villar *et al.* 1996; Jabri *et al.* 2002), mais sont majoritairement exprimées sous la forme d'hétérodimères liés par un pont disulfure aux molécules NKG2-A/-B/-C/-E/-H. L'expression d'un des membres NKG2 n'est pas exclusive, une même cellule NK ou T pouvant exprimer à la fois plusieurs membres NKG2 différents. Cependant l'expression de la forme inhibitrice NKG2-A est prédominante (Kusumi *et al.* 2006; Saez-Borderias *et al.* 2009; Angelini *et al.* 2011).

Les récepteurs CD94/NKG2 sont majoritairement exprimés par les cellules NK CD3⁻CD56⁺. L'expression de ces récepteurs apparaît précocement dans le développement des cellules NK *in vivo* (au stade NK immature) et précède l'acquisition des capacités prolifératives chez la souris (Kim *et al.* 2002). L'induction de leur expression est sous l'influence de l'IL-15 et semble suivre un ordre bien défini, la molécule CD94 étant exprimée en surface la première, suivie des molécules NKG2-A et NKG2-E et finalement de NKG2-C. De fait, le récepteur CD94/NKG2-A est le premier récepteur NK inhibiteur exprimé pendant le développement des cellules NK et le récepteur inhibiteur prédominant dans les cellules NK pré- et néo-natales (Mingari *et al.* 1997; Kubota *et al.* 1999; Sivakumar *et al.* 1999; Toomey *et al.* 1999; Salcedo *et al.* 2000; Williams *et al.* 2000; Takei *et al.* 2001; Lian *et al.* 2002).

La fraction des cellules exprimant des récepteurs CD94/NKG2 tend ensuite à diminuer au cours de la maturation des cellules NK et est associée à l'acquisition parallèle d'autres récepteurs inhibiteurs (majoritairement LY49 chez la souris et KIR chez l'humain) (Dorfman and Raulet 1998; Kubota *et al.* 1999; Salcedo *et al.* 2000; Lutz *et al.* 2005; Beziat *et al.* 2010). Ainsi, le pourcentage de cellules NK marquées par les tétramères Qa-1 passe de 70% chez les jeunes souris (1 semaine) à 50% chez les souris adultes (9 semaines). Chez l'adulte, la forme CD94/NKG2-A reste prédominante et les transcrits NKG2-A sont 20 fois plus abondants que ceux des molécules NKG2-C et NKG2-E dans les cellules NK (Kubota *et al.* 1999; Van Beneden *et al.* 2001; Brostjan *et al.* 2002).

Chez l'homme, les cellules NK matures peuvent être subdivisées en deux grandes sous populations : la majorité (environ 90%) expriment faiblement CD56 et fortement CD16 (CD56^{dim} CD16^{high}), tandis qu'environ 10% des NK ont un phénotype associant une forte expression de CD56 et une faible expression de CD16 (CD56^{bright}CD16^{low}). Les cellules NK

CD56^{dim} présentent une plus grande capacité cytotoxique *in vitro*, alors que les cellules NK CD56^{bright} produisent de plus grandes quantités de cytokines comme l'IFN- γ , l'IL-10, le TNF- α et le TNF- β . D'autre part, les cellules NK CD56^{dim} présentent des télomères plus courts que les cellules CD56^{bright} et sont préférentiellement localisées en périphérie, tandis que les cellules CD56^{bright} sont surtout retrouvées dans les organes lymphoïdes. Ainsi, il a été proposé que les cellules CD56^{bright}CD16^{low} représentent un stade de développement moins avancé et qu'elles pourraient se différencier en cellules CD56^{dim}CD16^{high} dans la moelle osseuse ou en périphérie. Les cellules NK CD56^{bright} expriment fortement les récepteurs CD94-NKG2 (majoritairement la forme inhibitrice CD94/NKG2-A) et faiblement les KIR. À l'inverse, les cellules CD56^{dim} expriment faiblement les récepteurs CD94-NKG2 et fortement les KIR (Voss *et al.* 1998; Cooper *et al.* 2001; Jacobs *et al.* 2001; Jonges *et al.* 2001; Ouyang *et al.* 2007) (**Figure 10**).

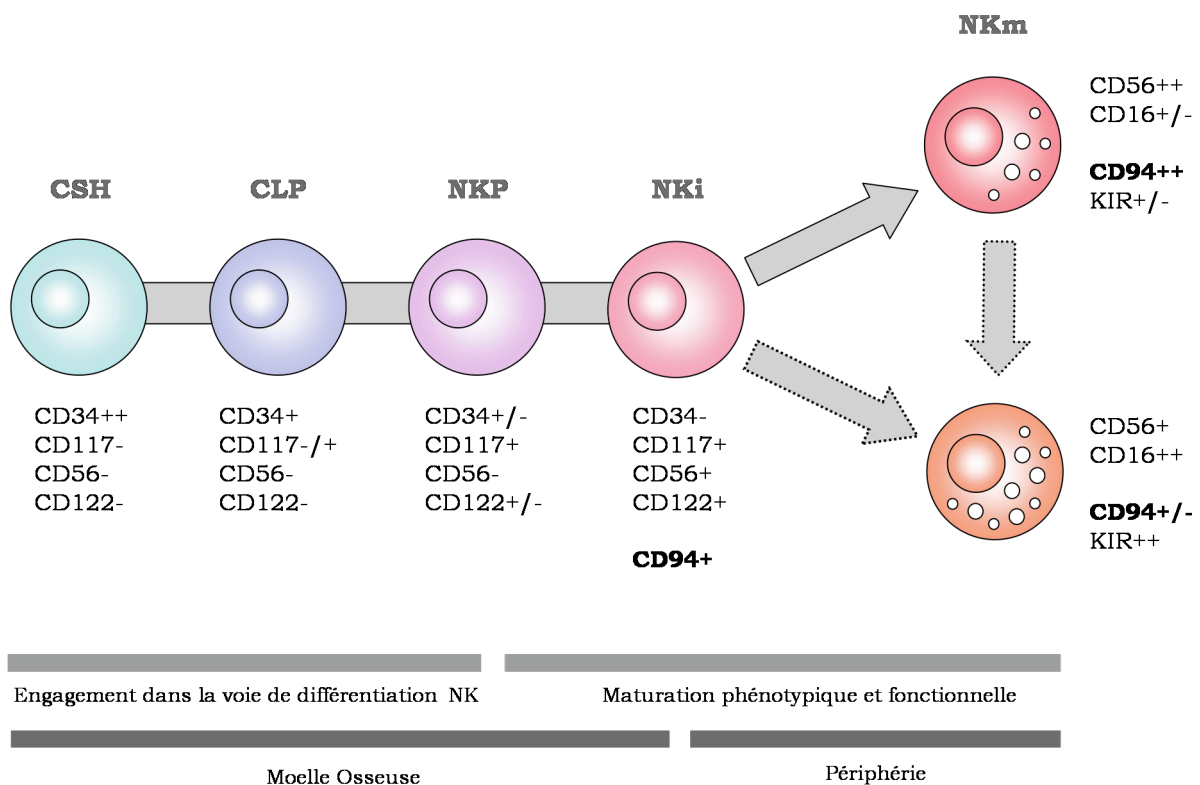


Figure 10 : Expression des récepteurs CD94/NKG2 au cours du développement des cellules NK humaines

CSH : Cellule souche hématopoïétique, CLP : Cellule progénitrice lymphoïde,
 NKP : précurseur NK, NKi : NK immature, NKm : NK mature

Bien que ceux-ci soient majoritairement exprimés par les cellules NK, une fraction non significative des cellules lymphocytaires CD3⁺ exprime également les récepteurs CD94/NKG2. Ainsi, ces récepteurs sont exprimés à la surface de lymphocytes T $\alpha\beta$ (environ 5% des T $\alpha\beta$ CD8⁺ du sang périphérique, les T $\alpha\beta$ CD4⁺ n'exprimant pas -Th2- ou très peu -Th1- ces récepteurs au repos) et d'une majorité des lymphocytes T $\gamma\delta$ (environ 80% des T $\gamma\delta$ 2) et des cellules NKT (Battistini *et al.* 1997; Carena *et al.* 1997; Halary *et al.* 1997; Moretta *et al.* 1997; Poccia *et al.* 1997; Braud *et al.* 1998; Meyers *et al.* 2002; Ota *et al.* 2005).

L'expression des récepteurs CD94/NKG2 semble intervenir plus tardivement dans le développement des cellules T que dans celui des cellules NK. En effet, elle n'est observée que chez les cellules T matures ayant déjà rencontré leur antigène et présentant un profil effecteur/mémoire, tandis que les cellules T thymiques et du sang de cordon n'expriment pas de récepteurs NK (Mingari *et al.* 1996; Mingari *et al.* 1997; Boullier *et al.* 1998; Speiser *et al.* 1999; Arlettaz *et al.* 2004). De plus, l'expression du récepteur CD94/NKG2-A peut être induite *in vitro* à la surface de cellules T $\alpha\beta$ CD8 et CD4 après stimulation antigénique en présence d'IL-15, d'IL-12, d'IL-10 ou de TGF- β (Mingari *et al.* 1998; Bertone *et al.* 1999; Romero *et al.* 2001; Derre *et al.* 2002; Ortega *et al.* 2004; Gunturi *et al.* 2005). En outre, l'acquisition de l'expression des récepteurs CD94/NKG2 par les cellules T semble stochastique, puisque des cellules T $\alpha\beta$ ou $\gamma\delta$ exprimant le même TCR peuvent présenter un profil d'expression variable de ces récepteurs NK, leur conférant des propriétés fonctionnelles distinctes (Noppen *et al.* 1998; Becker *et al.* 2000; Uhrberg *et al.* 2001; Jabri *et al.* 2002; Lafarge *et al.* 2005).

Par ailleurs, il a été montré que les récepteurs CD94/NKG2-A présentent la particularité d'être exprimés de façon très stable à la membrane des cellules NK et T. En effet ceux-ci sont très peu "downrégulés" en surface suite à leur engagement par leur ligand.

Une majorité de récepteurs NK activateurs (NKG2-D, NKp46, CD16, KIR) (Harrison *et al.* 1991; Borrego *et al.* 1994; Paolini *et al.* 1999; Ogasawara *et al.* 2003; Sandusky *et al.* 2006; Cecchetti *et al.* 2007; Burgess *et al.* 2008; Wang *et al.* 2009) comme les complexes CD3-TCR (Alcover and Alarcon 2000; Liu *et al.* 2000; Barr *et al.* 2006) voient leur expression à la membrane diminuer suite à leur engagement. Cette diminution d'expression est liée à leur internalisation puis à leur routage vers les compartiments lysosomiaux où ils sont alors dégradés. Cette "downrégulation" semble constituer un mécanisme permettant de

limiter la durée et l'intensité des signaux activateurs transduits par ces récepteurs, rendant ainsi les cellules réfractaires aux stimulations subséquentes et protégeant également les cellules de la mort induite par l'activation.

En revanche, il apparaît que les récepteurs CD94/NKG2-A sont constitutivement internalisés puis rapidement recyclés en surface (1 à 2 heures), indépendamment de leur engagement. L'endocytose de ces récepteurs s'apparente à un processus de macropinocytose non classique, indépendant de la clathrine, de l'actine, des radeaux lipidiques et de l'activité de la kinase PI3K, mais sensible à l'amiloride et nécessitant l'activité de Rac1. Une fois endocytés, les récepteurs CD94/NKG2-A localisés dans le compartiment endosomal précoce sont ensuite rapidement recyclés à la surface (15 à 20 minutes), de façon dépendante de l'actine. Il a été proposé que ce mécanisme, assurant une expression membranaire continue des récepteurs inhibiteurs CD94/NKG2-A, vise à prévenir une activation préjudiciable des cellules NK (Borrego *et al.* 2002; Borrego *et al.* 2005; Masilamani *et al.* 2008; Peruzzi *et al.* 2009).

2.1.3 Modalités d'interaction avec HLA-E

Les molécules HLA-E et Qa-1 sont les ligands endogènes exclusifs des récepteurs CD94/NKG2 humains et murins (Braud *et al.* 1998; Brooks *et al.* 1999; Kaiser *et al.* 2005). L'interaction des récepteurs CD94/NKG2 avec leur ligand est dépendante de la nature du membre NKG2 ainsi que de celle du peptide présenté par la molécule HLA-E/Qa-1. En revanche, le dimorphisme allélique de la molécule HLA-E ne semble pas affecter l'affinité de cette interaction (Kaiser *et al.* 2005). La cinétique et l'affinité de cette interaction sont très similaires à celle des KIR et de leurs ligands HLA-I classiques, et sont caractérisées par des constantes d'association et de dissociation rapides et de relativement faible affinité (Vales-Gomez *et al.* 1999; Kaiser *et al.* 2005; Sullivan *et al.* 2007).

L'analyse par mutagenèse et cristallographie montre une interaction de type clé/serrure impliquant, d'une part, les résidus situés dans les hélices $\alpha 1$ et $\alpha 2$ de la molécule HLA-E ainsi que ceux de l'extrémité C terminale du peptide présenté et, d'autre part, des résidus des deux membres du récepteur hétérodimérique CD94/NKG2 (**Figure 11**). Cette interaction est majoritairement gouvernée par des interactions électrostatiques, un domaine acide du CD94 interagissant avec une région basique de l'hélice $\alpha 1$ de HLA-E et un domaine

basique de NKG2 interagissant avec une région acide de l'hélice $\alpha 2$ de HLA-E. La contribution de la molécule CD94 est prédominante (69% de la surface de contact, versus 31% pour la molécule NKG2). De plus, l'interaction avec les résidus du peptide présenté par les molécules HLA-E/Qa-1 implique majoritairement la molécule CD94 et par conséquent tous les récepteurs CD94/NKG2 semblent présenter la même spécificité peptidique, indépendamment de la nature des membres NKG2 (Wada *et al.* 2004; Kaiser *et al.* 2005; Kaiser *et al.* 2008; Petrie *et al.* 2008).

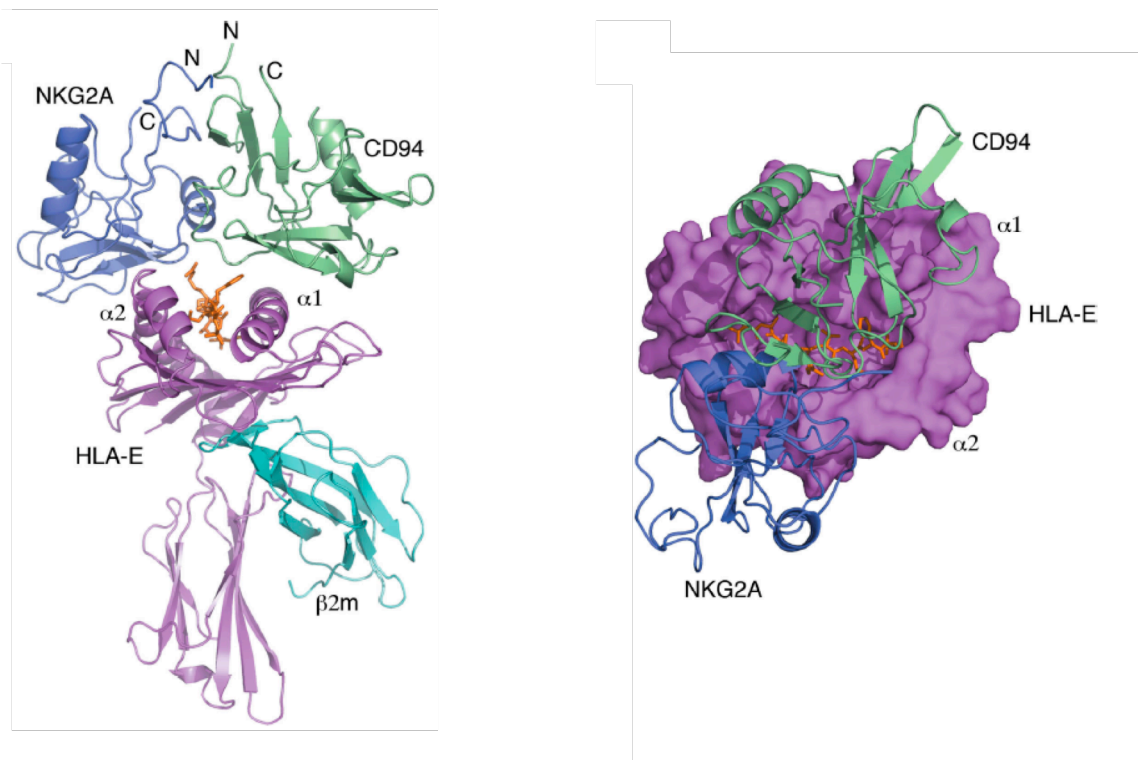


Figure 11: Représentation du complexe CD94/NKG2-A/HLA-E-VMAPRTLFL

(Petrie *et al.* 2008)

En dépit de leur forte homologie de séquence, la nature des membres NKG2 influence cependant l'affinité de l'interaction. Ainsi, l'interaction de la forme activatrice CD94/NKG2-C est environ 6 fois moins forte que celle des formes CD94/NKG2-A et CD94/NKG2-E. Cette différence d'affinité est due au polymorphisme des acides aminés 167-170 de l'hélice $\alpha 2$ des molécules NKG2. Ces résidus sont situés à l'interface des molécules NKG2 et CD94 et ne sont pas directement impliqués dans la liaison avec HLA-E. Aussi, leur impact sur l'affinité pour le ligand résulte probablement des changements conformationnels induits au sein du complexe CD94-NKG2 (Llano *et al.* 1998; Vales-Gomez *et al.* 1999; Miller *et al.* 2003; Wada *et al.* 2004; Kaiser *et al.* 2005).

L'affinité de l'interaction est également dépendante de la nature du peptide présenté par HLA-E/Qa-1. De fait, les peptides capables de stabiliser l'expression à la membrane des molécules HLA-E/Qa-1 ne conduisent cependant pas tous à une interaction avec les récepteurs CD94-NKG2 (**Tableau 7**). En outre, la nature des résidus P4, P5 et P8, dont les chaînes latérales sont impliquées dans l'interaction avec les récepteurs CD94/NKG2, semble influencer significativement l'affinité de l'interaction avec les molécules HLA-E et Qa-1 (Kraft *et al.* 2000; Miller *et al.* 2003; Kaiser *et al.* 2005).

Tableau 7 : Capacité des complexes HLA-E-peptides à interagir avec les récepteurs CD94-NKG2 en fonction des peptides apprêtés

Origine	Peptide	Interaction avec CD94/NKG2	Références
Endogène			
HLA-A/B/C	VMAPRTLIL	+	Llano <i>et al.</i> 1998 Vales-Gomez <i>et al.</i> 1999 Maier <i>et al.</i> 2000 Kaiser <i>et al.</i> 2005 Sullivan <i>et al.</i> 2007 Hoare <i>et al.</i> 2008
	VMAPRTLVL	+	
	IMAPRTLVL	+	
	VMPRTLIL	+	
	VMAPRTVLL	+	
	VTAPRTLIL	+/-	
	VTAPRTVLL	+/-	
	VMAPRTLIL	+	
	VMAPRALLL	-	
HLA-G	VMAPRTLFL	++	
HSP60	QMRPVSRVL	-	Michaelsson <i>et al.</i> 2002
MRP7	ALALVRMLI	+	Wooden <i>et al.</i> 2005
Prdx5 mutée	AMAPIKTHL	-	Sensi <i>et al.</i> 2009
	AMAPIKVRL	-	
Exogène			
HCMV UL40	VMAPRTLVL	+	Tomasec <i>et al.</i> 2000 Ulbrecht <i>et al.</i> 2000
	VMAPRTLIL	+	
	VMAPRTLIL	+	
HCV	YLLPRRGPRL	+	Nattermann <i>et al.</i> 2005 Schulte <i>et al.</i> 2009
HIV p24	AISPRTLNA	+	Nattermann <i>et al.</i> 2005
EBV BZLF-1	SQAPLPCVL	-	Brooks <i>et al.</i> 1999 Garcia <i>et al.</i> 2002
Gliadine	SQQPYLQLQ	+	Terrazzano <i>et al.</i> 2007

Ainsi, les molécules HLA-E liées au peptide issu de HLA-G sont préférentiellement reconnues par les récepteurs CD94/NKG2-A et CD94/NKG2-C. De façon intéressante, les molécules HLA-E et HLA-G sont co-exprimées dans les cellules du trophoblaste où elles jouent un rôle crucial dans la tolérance au fœtus. En revanche, les peptides issus des molécules HLA-Cw*0702 (VMAPRALLL) ne sont pas capables de protéger les cellules de la lyse par des cellules NK CD94/NKG2-A⁺, bien qu'ils stabilisent l'expression à la membrane de HLA-E. Par ailleurs, les peptides provenant d'allèles HLA-B et présentant une thréonine en P2 ne permettent pas, non plus, de protéger les cellules de la lyse NK, à cause de leur incapacité à stabiliser l'expression des molécules HLA-E en surface (Llano *et al.* 1998; Brooks *et al.* 1999; Vales-Gomez *et al.* 1999; Maier *et al.* 2000; Hoare *et al.* 2008). Cependant, compte tenu du fait que les cellules expriment jusqu'à 6 allèles HLA-Ia différents, il semble peu probable qu'aucun de ces allèles ne puisse fournir un peptide capable, à la fois de stabiliser l'expression de HLA-E à la surface et de permettre l'interaction avec les récepteurs CD94/NKG2.

Concernant les peptides non classiques, leur liaison aux molécules HLA-E peut conduire, ou non, à une reconnaissance par les récepteurs CD94/NKG2. Ainsi les peptides issus de la protéine MRP7 (endogène) et de la gliadine (exogène) sont également reconnus par les récepteurs CD94/NKG2-A, tandis que les peptides issus des protéines HSP60 et de la peroxydase Prdx5 mutée ne le sont pas. Les peptides viraux issus des protéines du CMV (identiques à ceux qui sont issus des allèles HLA-A/-C), du HIV et du HCV sont capables d'interagir avec les récepteurs CD94/NKG2-A et de protéger les cellules infectées de la lyse par des cellules NK CD94/NKG2-A⁺, tandis que ceux issus de l'EBV n'en sont pas capables.

2.1.4 Signalisation intracellulaire

i. Formes activatrices CD94/NKG2-C/-E/-H

Les récepteurs NK et T activateurs présentent des domaines intracellulaires très courts et nécessitent de s'associer à des protéines adaptatrices pour transmettre leur signalisation intracellulaire. Les récepteurs activateurs CD94/NKG2-C, -E et -H s'associent à des homodimères de la protéine adaptatrice DAP12 dont chaque chaîne possède un motif ITAM (YxxL/I-(x)⁶-Y-x-x-L/I) (Lanier *et al.* 1998). Cette association implique l'interaction entre un résidu chargé positivement (Lysine) dans la partie transmembranaire de la molécule NKG2, et des acides aminés chargés négativement (Aspartate) dans le domaine transmembranaire des homodimères DAP12.

La cascade de signalisation transduite par DAP12 dans les cellules NK et T est assez semblable à celle du complexe TCR-CD3 (**Figure 12**). Suite à l'engagement du complexe formé par le récepteur activateur et l'homodimère DAP12, les résidus tyrosine des ITAM sont phosphorylés par des kinases de la famille Src (Lck, Fyn, Src, Yes, Lyn et Frg). Ces phosphotyrosines servent alors de site d'ancrage et permettent le recrutement des tyrosines kinases présentant un domaine SH2 telles Syk et ZAP-70 (Cambier 1995; Isakov 1997). Ces kinases vont alors recruter et activer des médiateurs multiples dont la PI3K, LAT et SLP-76, lesquelles vont à leur tour activer les voies de signalisation dépendantes de la PLC γ , du calcium et la voie des MAP kinases (Billadeau *et al.* 1998; Clements *et al.* 1998; Zhang *et al.* 1998; Carretero *et al.* 2000).

Dans les cellules NK, l'engagement des récepteurs CD94/NKG2-C/-E aboutit notamment à la réorganisation du cytosquelette d'actine nécessaire à la polarisation et au relargage des granules lytiques. Il induit également la transcription de nombreux gènes, dont ceux codant pour des chimiokines et des cytokines et ceux impliqués dans le processus de prolifération cellulaire. Dans les cellules T, l'engagement du TCR est indispensable à l'activation des fonctions effectrices lymphocytaires ; cependant le co-engagement des récepteurs NK activateur permet d'amplifier le niveau d'activation perçu par les lymphocytes T et par conséquent de potentialiser leur réponse effectrice.

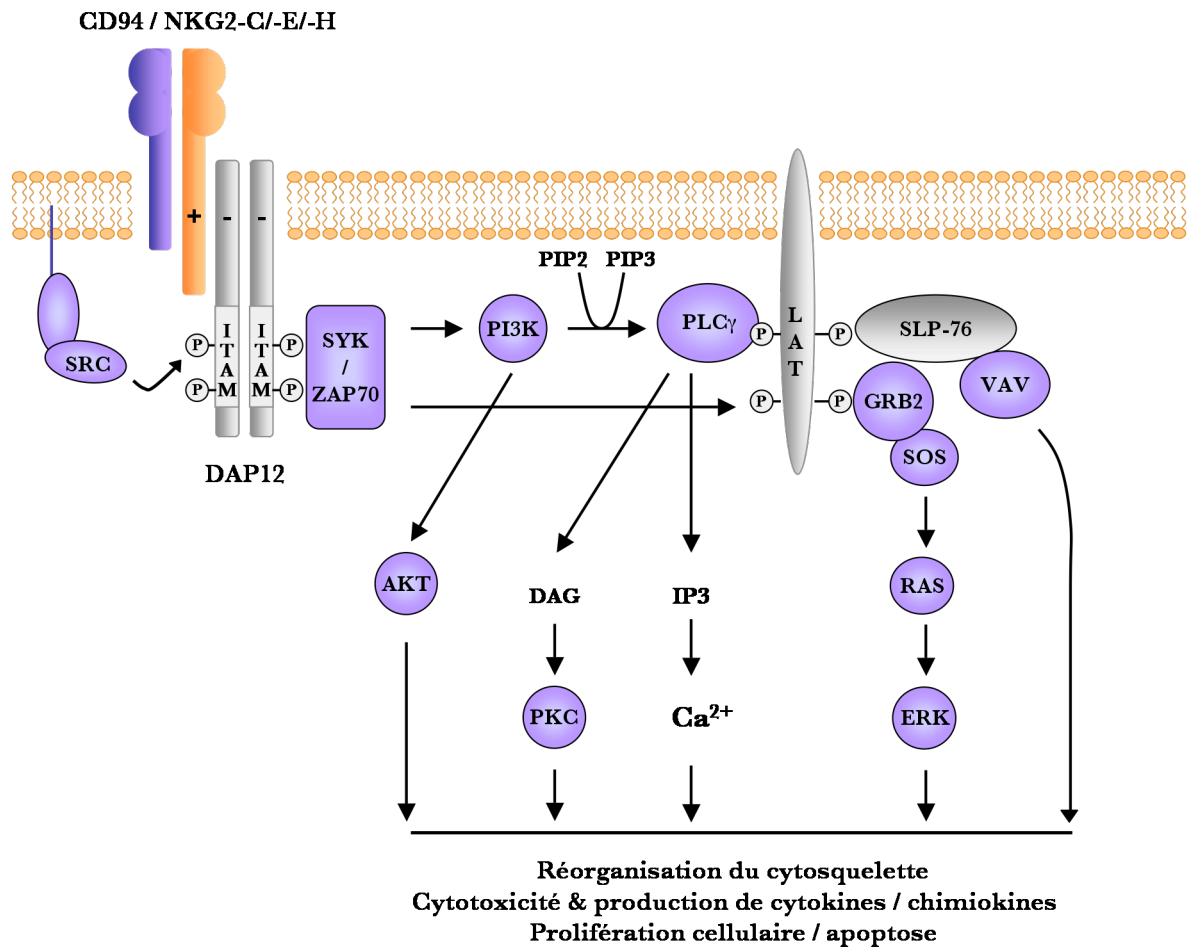


Figure 12 : Signalisation induite par les récepteurs CD94/NKG2-C/-E/-H

ii. Formes inhibitrices CD94/NKG2-A/-B

Tous les récepteurs NK inhibiteurs possèdent dans leurs domaines intracytoplasmiques des motifs ITIM (I/V/L/S-x-Y-x-x-x-L/V) qui sont responsables de la transduction du signal. Suite à leur interaction avec leurs ligands, les tyrosines présentes dans les domaines ITIM des molécules NKG2-A/-B sont phosphorylées par une kinase de la famille Src (**Figure 13**). La phosphorylation induit un changement de conformation favorisant le recrutement et l'activation de phosphatases présentant un domaine SH2 : SHP-1 et SHP-2 (Carena *et al.* 1997; Carretero *et al.* 1998; Le Drean *et al.* 1998). Ces phosphatases recrutées sous la membrane vont alors réguler localement et transitoirement le niveau de phosphorylation de nombreux récepteurs activateurs et médiateurs intracellulaires dont les kinases de la famille Src, l'adaptateur transmembranaire LAT, ZAP-70, la PLC γ , la PI3K, SLP-76 et Vav (Binstadt *et al.* 1996; Plas *et al.* 1996; Valiante *et al.* 1996; Dustin *et al.* 1999; Palmieri *et al.* 1999;

Zhang *et al.* 2000). Ainsi, l'activation des phosphatases agit en inhibant la transduction des signaux activateurs à plusieurs niveaux. En outre, la déphosphorylation des protéines Vav, en perturbant la polymérisation des réseaux d'actine, limite le recrutement et l'accumulation des récepteurs activateurs dans les radeaux lipidiques ainsi que la polarisation des granules lytiques à la synapse des cellules NK (Stebbins *et al.* 2003; Masilamani *et al.* 2006; Das and Long 2010).

Par conséquent, en fonction de l'intensité relative des signaux activateurs et inhibiteurs transduits dans les cellules NK et T lors de leur interaction avec une cible, l'engagement des récepteur inhibiteurs CD94/NKG2-A/-B peut prévenir (uniquement dans le cas des cellules NK) ou diminuer l'activation et l'intensité des fonctions effectrices subséquentes (cytotoxicité, production de cytokines et prolifération). Cependant, l'engagement des récepteurs NK inhibiteurs peut également jouer un rôle protecteur en limitant le phénomène d'apoptose lié à l'activation ou AICD (Activation-Induced Cell Death) (Warren 1999; Gunturi *et al.* 2003). Les mécanismes moléculaires sous-jacents n'ont pas été décrits, mais il est probable que cette protection soit liée à l'inhibition de la voie de signalisation pro-apoptotique induite par l'engagement de Fas avec son ligand, comme cela a été montré pour les récepteurs KIR inhibiteurs dans les cellules T CD8 (Gati *et al.* 2003).

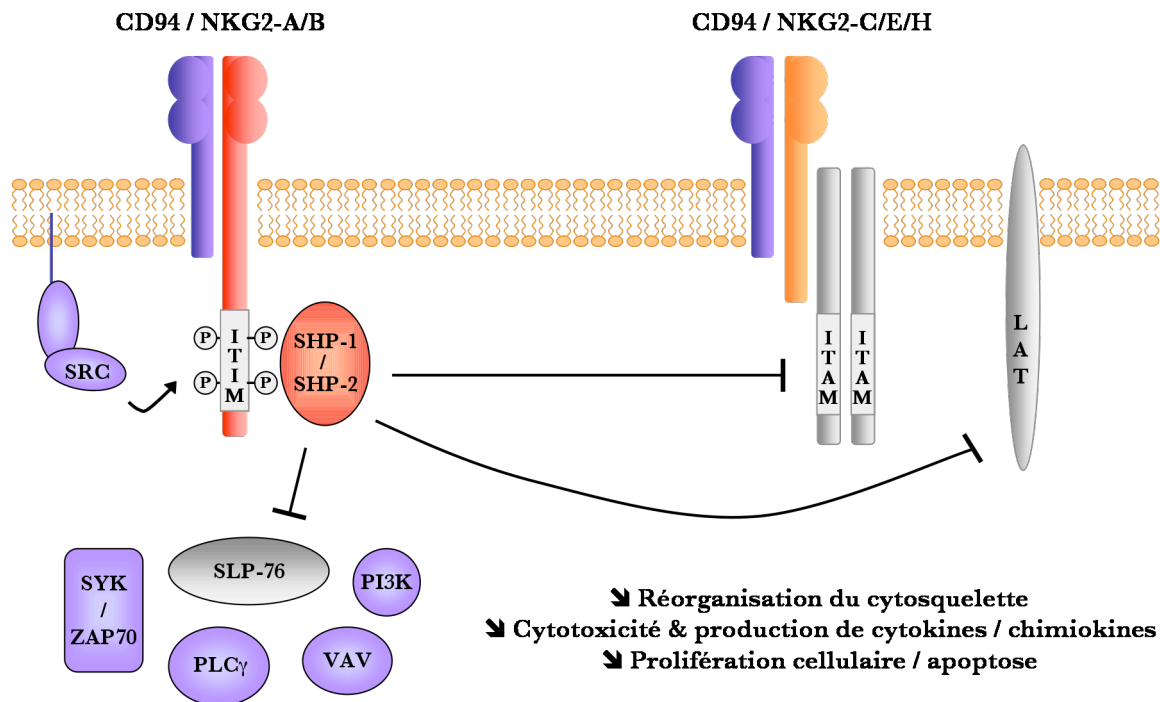


Figure 13 : Signalisation induite par les récepteurs CD94/NKG2-A/-B

2.2 Fonctions immunologiques de l'interaction HLA-E - CD94/NKG2

Compte tenu du fait que les récepteurs CD94/NKG2 peuvent traduire des signaux opposés et que leur interaction avec les molécules HLA-E/Qa-1 est dépendante de la nature des peptides apprêtés, les fonctions immunologiques résultantes sont diverses et parfois assez paradoxales.

L'expression membranaire des molécules HLA-E/Qa-1 permet aux cellules NK et T, via les récepteurs CD94/NKG2, de contrôler indirectement l'intégrité du système d'apprêtement des molécules du CMH-I des cellules de l'organisme. Dans les conditions physiologiques, les molécules HLA-E/Qa-1 présentent majoritairement des peptides issus des autres molécules du CMH-I classique permettant l'interaction avec les récepteurs CD94/NKG2. En revanche, l'expression et le répertoire peptidique des molécules HLA-E/Qa-1 peuvent être modifié à la surface des cellules du soi transformées (stressées, infectées ou tumorales) et ainsi influencer leur sensibilité à la lyse par les cellules NK et T.

Les effecteurs lymphocytaires T et NK exprimant majoritairement la forme inhibitrice CD94/NKG2-A, l'expression des molécules HLA-E/Qa-1 joue un rôle prépondérant dans la tolérance périphérique au soi et le contrôle des réponses immunes chroniques, en prévenant l'activation préjudiciable des cellules NK et en modulant le seuil d'activation des lymphocytes T. Cependant, il a été montré que l'engagement des récepteurs CD94/NKG2-A favorisait également la survie et l'expansion des effecteurs NK et T activés en limitant le phénomène d'AICD. L'expression des formes CD94/NKG2 inhibitrices peut donc contribuer au maintien des réponses immunes à médiation cellulaire. Enfin, bien que moins fréquemment exprimées, les formes activatrices CD94/NKG2-C et CD94/NKG2-E semblent jouer un rôle clé dans le contrôle de certaines pathologies infectieuses par les cellules NK.

2.2.1 Éducation des cellules NK

Le rôle des molécules du CMH-I dans l'éducation et le développement des cellules T thymiques (sélection positive et négative thymique) est clairement établi. De façon similaire, les cellules NK immatures subissent également un processus d'éducation dépendant des molécules du CMH-I du soi et qui aura un rôle déterminant dans la capacité des cellules NK matures à distinguer les cellules du soi sain des cellules du soi transformé ou du non soi.

La théorie du "licensing" propose qu'une cellule NK immature doive exprimer au moins un récepteur inhibiteur capable d'interagir avec les molécules du CMH-I du soi pour pouvoir être réactive aux stimuli ultérieurs, un état nommé "licensed" (Kim *et al.* 2005; Yokoyama and Kim 2006). Le "licensing" des cellules NK serait induit par l'interaction des récepteurs NK inhibiteurs avec leur ligand exprimé par les cellules normales du soi lors de leur développement dans la moelle osseuse et précéderait l'acquisition des fonctions effectrices. Cependant, chez la souris et chez l'homme, bien que la majorité des cellules NK expriment au moins un récepteur NK inhibiteur spécifique des molécules du CMH-I du soi, une fraction de cellules NK matures (environ 10%) n'en expriment pas et, bien que moins réactives, sont capables de produire des cytokines après stimulation (Fernandez *et al.* 2005; Anfossi *et al.* 2006).

Proposé plus récemment, le modèle du rhéostat permet de concilier ces observations avec la théorie du "licensing". Ce modèle propose que, durant leur développement, les cellules NK immatures qui interagissent avec les cellules du soi intègrent les signaux transmis par leurs récepteurs engagés, et que c'est la somme des signaux perçus qui détermine alors leur seuil d'activation. Les cellules NK exprimant des combinaisons diverses de récepteurs, l'équilibre entre les signaux inhibiteurs et activateurs est extrêmement variable d'une sous-population à une autre. Ainsi, les cellules NK coexprimant plusieurs récepteurs inhibiteurs spécifiques du CMH-I du soi présentent un seuil d'activation très bas, tandis que celles n'en exprimant aucun ont un seuil d'activation bien plus élevé leur permettant d'être tolérantes au soi (Joncker *et al.* 2009).

Comme précédemment évoqué, le récepteur inhibiteur CD94/NKG2-A est le premier récepteur NK inhibiteur exprimé au cours du développement des cellules NK humaines et murines. Les molécules HLA-E/Qa-1 étant fortement exprimées à la surface d'une majorité de cellules hématopoïétiques, il est très probable que leur interaction avec les récepteurs CD94/NKG2 joue un rôle prépondérant dans l'éducation des cellules NK. En outre, il a été démontré chez la souris que l'acquisition des récepteurs CD94/NKG2-A par les cellules NK fœtales était corrélée avec leur capacité à distinguer les cellules exprimant des molécules du CMH-I, des cellules CMH-I déficientes (Sivakumar *et al.* 1999; Toomey *et al.* 1999). Le développement et la maturation des cellules NK chez les souris CD94 déficientes ne sont toutefois pas altérés, mais il est probable que, dans ces modèles, d'autres récepteurs inhibiteurs pallient cette absence (principalement Ly49 chez la souris) (Vance *et al.* 2002; Orr *et al.* 2010).

2.2.2 Tolérance périphérique au soi

Plusieurs arguments sont en faveur d'un rôle clé de l'interaction des molécules HLA-E/Qa-1 avec les récepteurs inhibiteurs CD94/NKG2-A dans la tolérance au soi. En effet, en prévenant l'activation inappropriée des effecteurs cytotoxiques T et NK, elle limite la survenue de pathologies auto-immunes ou inflammatoires.

Ainsi, l'interaction des récepteurs CD94/NKG2-A avec les molécules HLA-E/Qa-1 semble jouer un rôle prépondérant dans la tolérance au soi des cellules NK pré- et néo-natales (Kubota *et al.* 1999; Salcedo *et al.* 2000). Dans les modèles murins, l'interaction de CD94/NKG2-A avec Qa-1, en diminuant l'activation des cellules NKT, prévient le développement d'hépatites inflammatoires induites par la Concavaline A (Kawamura *et al.* 2009) et limite la durée des réponses NKT primaires et mémoires (Ota *et al.* 2005).

Un autre argument en faveur du rôle de cette interaction dans la tolérance au soi est l'augmentation significative de la fréquence de l'allèle HLA-E*0101 chez les patients atteints de diabète auto-immun (Hodgkinson *et al.* 2000) et de spondylarthrite ankylosante (Cascino *et al.* 2007; Paladini *et al.* 2009). Il a été proposé que, cette forme allélique étant moins stable, elle soit donc moins exprimée à la surface cellulaire, limitant ainsi son interaction avec les récepteurs CD94/NKG2-A. De fait, les cellules du soi seraient plus sensibles vis à vis de la lyse NK, ce qui pourrait favoriser la survenue de pathologies auto-immunes. En outre, le récepteur CD94/NKG2-A a aussi été impliqué dans la diminution des fonctions des cellules NK et T CD8 intrasynoviales chez les patients atteints d'arthrite rhumatoïde auto-immune (Dulphy *et al.* 2002; de Matos *et al.* 2007; Walsh *et al.* 2011).

Il a également été montré que cette interaction jouait un rôle protecteur/toléro-gène dans l'immunité des muqueuses digestives. Ainsi, dans les conditions physiologiques, l'expression des récepteurs CD94/NKG2-A par les lymphocytes intra-épithéliaux et celle des molécules HLA-E par les entérocytes contribuent à limiter le développement des réponses inflammatoires (Jabri *et al.* 2000). En revanche, les maladies coéliquas sont associées à une diminution de l'expression des molécules NKG2-A et à une augmentation de l'expression de la forme activatrice NKG2-C par les lymphocytes intra-épithéliaux et des molécules HLA-E par les entérocytes (Jabri *et al.* 2000; Meresse *et al.* 2006). Aussi, il apparaît que, dans certaines conditions pathologiques, l'interaction de CD94/NKG2-C avec les molécules HLA-E puisse jouer un rôle délétère en exacerbant les réponses inflammatoires.

L'interaction HLA-E/CD94/NKG2-A intervient également dans la tolérance périphérique en permettant aux cellules NK ganglionnaires de contrôler l'état de maturation des cellules dendritiques (DC), via leur capacité à exprimer les molécules HLA-E. Les cellules NK localisées dans les ganglions lymphoïdes présentent majoritairement le phénotype CD56^{bright} CD94/NKG2-A^{high} et peuvent lyser les DC selon un mécanisme dépendant de NKp30, NKp46 et DNAM-1 (Della Chiesa *et al.* 2003; Persson *et al.* 2008). Ainsi, si les DC matures qui expriment davantage à leur surface les molécules HLA-I, HLA-E incluses, sont protégées de la lyse NK de façon dépendante du récepteur CD94/NKG2-A. En revanche les DC immatures qui expriment plus faiblement les molécules HLA-E sont sensibles à la lyse NK (Spaggiari *et al.* 2001; Ferlazzo *et al.* 2002; Pende *et al.* 2006). La destruction spécifique des DC immatures dans les organes lymphoïdes secondaires permettrait de limiter la présentation sous-optimale d'antigènes, limitant ainsi le développement de réponses inappropriées ou tolérogènes.

De façon intéressante, il a été montré *in vitro* que la gliadine (un antigène majeur dans les maladies cœliaques) pouvait fournir des peptides capables de stabiliser l'expression de HLA-E, et ainsi de protéger les cellules DC immatures de la lyse par les cellules NK CD94/NKG2-A. Aussi, il a été proposé que ce mécanisme pourrait contribuer au développement des maladies cœliaques en favorisant l'activation de réponses T inappropriées (Terrazzano *et al.* 2007).

Par ailleurs, l'interaction des molécules Qa-1, exprimées par les DC matures, avec les récepteurs CD94/NKG2-A des cellules NK diminue la production d'IFN- γ par ces dernières, limitant ainsi la réponse inflammatoire (Colmenero *et al.* 2007).

Enfin, cette interaction est également impliquée dans le contrôle des réponses T CD4 par les cellules NK. En effet, les lymphocytes T CD4 activés qui n'expriment pas les molécules HLA-E sont sujets à la lyse par les cellules NK via un mécanisme impliquant NKG2-D, LFA-1 et TRAIL (Takao *et al.* 2010; Nielsen *et al.* 2012). Ce mécanisme semble jouer un rôle important dans la tolérance au soi, l'incapacité des cellules NK à lyser les lymphocytes T CD4 activés pouvant favoriser la survenue des pathologies auto-immunes et inflammatoires. Ainsi, il a été montré *in vivo* que l'administration d'anticorps anti-NKG2-A bloquants, en permettant aux cellules NK d'éliminer les lymphocytes T CD4 autoréactifs, était associée à une diminution de la progression de l'arthrite et des encéphalomyélites auto-immunes induites expérimentalement dans des modèles murins (Fort *et al.* 1998; Leavenworth *et al.* 2010).

2.2.3 Surveillance immunitaire du soi stressé/infecté/tumoral

i. Stress cellulaire

Il a été montré que les cellules stressées présentaient à leur surface des molécules HLA-E apprêtées par des peptides issus de la protéine HSP60. Ces peptides ne permettant pas l'interaction avec les récepteurs CD94/NKG2, ces cellules deviennent alors sensibles à la lyse par les cellules NK CD94-NKG2-A⁺ autologues (Michaelsson *et al.* 2002). De fait, l'interaction CD94/NKG2-HLA-E/Qa-1 joue donc un rôle dans la surveillance des cellules stressées par les cellules NK.

ii. Infections

L'interaction des récepteurs CD94/NKG2 avec HLA-E peut jouer un rôle protecteur ou délétère dans le contrôle des pathologies infectieuses. En effet, les infections virales sont souvent associées à une diminution, voire à une perte, de l'expression des molécules du CMH-I classiques par les cellules infectées. Si ce mécanisme permet aux cellules infectées d'échapper à la surveillance exercée par les lymphocytes T $\alpha\beta$ CD8 cytotoxiques, ces cellules sont également moins susceptibles de pouvoir exprimer en surface des molécules HLA-E/Qa-1 apprêtées par des peptides issus des molécules du CMH-I, ce qui favorise leur reconnaissance par les cellules NK. Cependant, plusieurs virus sont capables de fournir des peptides alternatifs, permettant à la fois de stabiliser l'expression des molécules HLA-E à la surface des cellules infectées et d'interagir avec les récepteurs CD94/NKG2. De plus, le profil d'expression des formes inhibitrices et activatrices des récepteurs CD94/NKG2 par les effecteurs immuns peut varier en fonction des contextes infectieux.

L'expression de la forme inhibitrice CD94/NKG2-A est augmentée chez les cellules NK des patients atteints d'hépatite C virale (Jinushi *et al.* 2004; Nattermann *et al.* 2006). De plus, la part des lymphocytes T CD8 spécifiques d'antigènes viraux et bactériens exprimant les récepteurs CD94/NKG2-A est augmentée aux cours de nombreuses infections chez l'homme : HIV (Andre *et al.* 1999; Galiani *et al.* 1999), HCV (Nattermann *et al.* 2006; Bonorino *et al.* 2007), EBV (Poon *et al.* 2005), malaria (D'Ombraïn *et al.* 2007) et chez la souris : CMV, Influenza, HSV-1, Polyoma virus et *Listeria monocytogenes* (McMahon *et al.* 2002; Miller *et al.* 2002; Moser *et al.* 2002; Wojtasiak *et al.* 2004).

Il a été documenté *in vitro* et *in vivo* que l'engagement des récepteurs CD94/NKG2-A pouvait diminuer l'activité cytotoxique des cellules NK et T ($\alpha\beta$ et $\gamma\delta$) vis-à-vis des cellules infectées (De Maria *et al.* 1997; Poccia *et al.* 1997; Moser *et al.* 2002; Van Beneden *et al.* 2002; Nattermann *et al.* 2006; Bonorino *et al.* 2007). Ainsi, il apparaît que l'expression des récepteurs inhibiteurs CD94/NKG2-A, en limitant l'élimination des cellules infectées, peut jouer un rôle délétère dans le cadre d'infections. En outre, la capacité du virus de l'hépatite C à fournir un peptide stabilisant l'expression de la molécule HLA-E et capable d'interagir avec les récepteurs CD94/NKG2 semble constituer un mécanisme d'immuno-subversion virale. En effet, cette infection est associée à une augmentation de la proportion des cellules NK et T CD8⁺ exprimant le récepteur inhibiteur CD94/NKG2-A et ayant par conséquent une activité cytotoxique réduite vis-à-vis des cellules infectées par le HCV *in vitro* (Nattermann *et al.* 2005; Nattermann *et al.* 2006; Bonorino *et al.* 2007). De plus, les cellules NK CD94/NKG2-A⁺ des patients infectés par le HCV produisent surtout des cytokines immuno-régulatrices (IL-10 et TGF- β) et leur interaction avec les cellules dendritiques conduit à l'induction de réponse T CD4⁺ régulatrices contribuant ainsi à limiter le développement des réponses adaptatives anti-virales (Jinushi *et al.* 2004; Jinushi *et al.* 2007).

Cependant, dans le cadre d'infections chroniques, ce mécanisme pourrait également prévenir l'activation excessive des réponses immunes et donc éviter les dommages tissulaires. Par ailleurs, l'expression des récepteurs CD94/NKG2-A contribue également à protéger les lymphocytes de la mort par apoptose, ce qui favorise le maintien du répertoire et le développement de réponses mémoires subséquentes (Warren 1999; Gunturi *et al.* 2003; Byers *et al.* 2006).

À l'inverse, la part des cellules NK exprimant la forme activatrice NKG2-C augmente chez les patients infectés par le CMV (Guma *et al.* 2004; Guma *et al.* 2006; van Stijn *et al.* 2008; Lopez-Verges *et al.* 2011), le HIV (Goodier *et al.* 2007; Thomas *et al.* 2012) et l'hantavirus (Bjorkstrom *et al.* 2011). Les virus du CMV et du HIV sont capables de fournir des peptides stabilisant l'expression de HLA-E et permettant leur interaction avec les récepteurs CD94/NKG2. Ainsi, tandis que l'expression des molécules HLA-I classiques est diminuée, celle des molécules HLA-E est augmentée à la surface des cellules infectées par le HIV (Nattermann *et al.* 2005) et le CMV (Tomasec *et al.* 2000; Ulbrecht *et al.* 2000; Prod'homme *et al.* 2012). Ce mécanisme semble contribuer à l'échappement viral à la surveillance exercée par les cellules NK et T CD94/NKG2A⁺ (Wang *et al.* 2002; Martini *et al.* 2005; Nattermann *et al.* 2005; Lin *et al.* 2007). Toutefois, ces infections sont associées à

une augmentation de la part des cellules NK CD94/NKG2-C⁺ qui sont capables de développer des réponses effectrices vis-à-vis des cellules infectées (Mela *et al.* 2005; Foley *et al.* 2012; Munoz-Cobo *et al.* 2012). Ainsi, l'interaction des récepteurs CD94/NKG2-C peut également contribuer au contrôle de ces infections virales. En outre, l'homozygotie pour l'allèle HLA-E*0103 (le plus stable) est associée à un moindre risque d'infection par le HIV (Lajoie *et al.* 2006) tandis que l'absence de NKG2-C est associée à une plus grande susceptibilité à l'infection par le HIV (Thomas *et al.* 2012).

De façon similaire, l'infection par le virus ectromelia (ECTV) est associée à une augmentation de la proportion des cellules NK murines exprimant la forme activatrice CD94/NKG-E et les souris déficientes pour le CD94 ne sont plus capables de contrôler cette infection (Fang *et al.* 2011).

iii. Transformation tumorale

L'expression des molécules HLA-E est fréquemment induite ou augmentée à la surface des cellules tumorales *in vivo* et confère *in vitro* une protection vis-à-vis de la lyse par les cellules NK et T CD94/NKG2-A⁺ à des cellules tumorales d'origines histologiques variées (Poccia *et al.* 1997; Le Drean *et al.* 1998; Speiser *et al.* 1999; Malmberg *et al.* 2002; Perrin *et al.* 2002; Sheu *et al.* 2005; Wischhusen *et al.* 2005; Derre *et al.* 2006; Stangl *et al.* 2008; Levy *et al.* 2009; Fregni *et al.* 2011; Lo Monaco *et al.* 2011; Wolpert *et al.* 2012).

Ainsi, compte tenu du fait que les cellules NK et T infiltrant les tumeurs expriment fréquemment le récepteur inhibiteur CD94/NKG2-A (mélanomes, astrocytomes, carcinomes du col de l'utérus et du rein) (Speiser *et al.* 1999; Perrin *et al.* 2002; Schleypen *et al.* 2003; Sheu *et al.* 2005), il a été proposé que l'expression de HLA-E par les cellules malignes puisse contribuer à l'échappement des tumeurs à la surveillance exercée par le système immunitaire.

À l'appui de cette hypothèse, le niveau d'expression de la molécule HLA-E est corrélé positivement avec la progression tumorale dans les carcinomes du larynx (Silva *et al.* 2011), du col de l'utérus (Goncalves *et al.* 2008), les lymphomes hodgkiniens (Kren *et al.* 2012) et les gliomes (Wischhusen *et al.* 2005; Mittelbronn *et al.* 2007) et est associé à un mauvais pronostic dans les carcinomes de l'ovaire (Gooden *et al.* 2011), du sein (de Kruijf *et al.* 2010) et dans certains carcinomes colorectaux (Levy *et al.* 2008; Bossard *et al.* 2012). En outre, son expression est corrélée positivement avec celle des récepteurs CD94/NKG2-A par les lymphocytes T CD8 infiltrant les carcinomes de l'ovaire et colo-rectaux et elle neutralise les effets bénéfiques de la présence d'un infiltrat lymphocytaire intratumoral sur la survie des patientes dans le carcinomes de l'ovaire (Gooden *et al.* 2011; Bossard *et al.* 2012). De plus,

les lymphocytes T CD8 infiltrant les carcinomes du col de l'utérus et exprimant la forme inhibitrice NKG2-A produisent, comparativement aux autres, moins de perforine, ce qui limite leur activité cytotoxique (Sheu *et al.* 2005). Enfin, la fréquence de l'allèle HLA-E*0103 (la forme la plus stable) est associée positivement avec la prévalence des carcinomes nasopharyngés (Hirankarn *et al.* 2004).

Si, dans de nombreux cancers, l'expression des molécules HLA-E semble favoriser le développement des tumeurs en limitant la réponse immunitaire anti-tumorale, son expression tend cependant à diminuer lors de la progression des mélanomes (Derre *et al.* 2006; John *et al.* 2008). De plus, une forte expression des molécules HLA-E a été associée à un facteur de bon pronostic dans les mélanomes (John *et al.* 2008) de même que dans certains cancers colorectaux (Benevolo *et al.* 2011) et du rein (Kren *et al.* 2012).

Dans les mélanomes, le rôle protecteur de son expression pourrait être dû à l'augmentation de l'expression des formes activatrice NKG2-C/-E par les cellules T CD8 infiltrant les tumeurs métastatiques, en comparaison avec celles qui infiltrent les tumeurs primaires (Vetter *et al.* 2000).

D'autre part, les cellules tumorales présentent fréquemment des altérations de la voie de présentation des antigènes ou de l'expression des molécules HLA-Ia. Ainsi, le répertoire peptidique des molécules HLA-E peut être modifié durant la transformation tumorale, ce qui pourrait interférer avec leur capacité à interagir avec les récepteurs CD94/NKG2. En effet il a été montré *in vitro* que seules les cellules tumorales qui co-expriment des molécules HLA-I susceptibles de fournir un peptide interagissant avec les récepteurs CD94/NKG2 sont protégées de la lyse par les cellules NK CD94/NKG2-A⁺ (Lo Monaco *et al.* 2011).

Enfin, l'expression des formes inhibitrices des récepteurs CD94/NKG2 pourrait également favoriser le maintien dans le temps des réponses effectrices en diminuant le phénomène d'AICD.

2.2.4 Réponses xéno- et allo-géniques

i. Grossesse- tolérance fœto-maternelle

L'interaction des molécules HLA-E-CD94/NKG2 semble jouer un rôle crucial dans la tolérance au fœtus en limitant l'alloréactivité des cellules lymphocytaires NK et T maternelles vis-à-vis du fœtus. Ainsi, il a été montré que l'homozygotie pour l'allèle HLA-E*0101 qui est le moins stable, était associée à une augmentation significative du risque d'avortement spontané chez les femmes enceintes (Steffensen *et al.* 1998; Tripathi *et al.* 2006; Mosaad *et al.* 2011).

Pendant la grossesse, les cellules fœtales semi allogéniques (ou allogéniques) du syncytiotrophoblaste sont en contact direct avec les cellules déciduales maternelles.

Tandis que l'expression des molécules classiques HLA-A et -B est fortement réprimée, celle des molécules HLA-I non classiques (HLA-E, HLA-G et HLA-F) est induite ou augmentée à la surface des cellules du cytotrophoblaste extravilleux (Boucraut *et al.* 1993; Houlihan *et al.* 1995; King *et al.* 2000; Ishitani *et al.* 2003). De plus, et de façon remarquable, la co-expression des molécules HLA-G permet de fournir aux molécules HLA-E des peptides présentant une très forte affinité pour les récepteurs CD94/NKG2.

Les cellules NK qui représentent plus de 90 % des cellules leucocytaires déciduales, présentent un phénotype CD56^{bright} CD16^{low}. A l'instar de la population minoritaire du sang circulant CD56^{bright} CD16^{low}, elles sont faiblement cytotoxiques mais produisent de grandes quantités de cytokines. Les cellules NK déciduales expriment majoritairement les récepteurs NKR CD94/NKG2-A et NKG2-C et ce à des niveaux environ 5 fois supérieurs à ceux des cellules NK du sang (Koopman *et al.* 2003; Trundley and Moffett 2004; Kusumi *et al.* 2006).

L'expression des formes inhibitrices permet de prévenir l'activité cytotoxique des cellules NK déciduales vis-à-vis des cellules fœtales, tandis que celle des formes activatrices CD94/NKG2-C stimule la production de cytokines qui pourraient favoriser les processus d'implantation et de vascularisation du fœtus (Saito *et al.* 1993; Saito *et al.* 1993; King *et al.* 2000; Cooper *et al.* 2001; Higuma-Myojo *et al.* 2005).

La part des cellules lymphocytaires T $\alpha\beta$ et $\gamma\delta$ déciduales exprimant des récepteurs CD94/NKG2 est également augmentée, comparativement aux lymphocytes du sang circulant, et leur interaction avec les molécules HLA-E limitent l'activité cytotoxique des T $\gamma\delta$ 2 *in vitro* (Barakonyi *et al.* 2002; Szereday *et al.* 2003; Tilburgs *et al.* 2009).

ii. Transplantation des cellules hématopoïétiques allogéniques

L'allogreffe de cellules souches hématopoïétiques est indiquée dans le traitement de nombreuses hémopathies malignes (leucémies myéloïdes et lymphoblastiques, myélodysplasies, splénomégalie myéloïde, aplasies et éventuellement myélomes multiples et certains lymphomes).

Les cellules souches hématopoïétiques peuvent provenir de plusieurs sources, à savoir du sang de cordon ombilical (cellules souches placentaires), de la moelle osseuse (cellules souche médullaire) ou encore du sang périphérique (cellules souches périphériques).

Le pouvoir curatif de l'allogreffe dénommé l'effet GVT (Graft versus Tumor) repose essentiellement sur l'éradication des cellules tumorales du patient par les effecteurs immuns issus du greffon. À l'opposé, l'allogreffe peut également conduire à l'effet délétère GVH (Graft versus Host) quand les cellules saines du receveur deviennent elles-mêmes la cible du greffon, ce qu'on appelle communément la maladie du greffon contre l'hôte ou GVHD (Graft Versus Host disease).

Lors de la reconstitution immunologique du receveur, les cellules NK qui se développent *in vivo* à partir du greffon expriment majoritairement le récepteur inhibiteur CD94/NKG2-A (Shilling *et al.* 2003; Nguyen *et al.* 2005; Wang *et al.* 2007; Olteanu *et al.* 2010). Par conséquent, l'expression de la molécule HLA-E par les cellules du receveur peut jouer un rôle bénéfique en limitant la survenue des complications post-greffe mais peut également s'opposer à l'effet thérapeutique lié à l'éradication des cellules tumorales.

Ainsi, chez les patients greffés en compatibilité HLA-Ia et HLA-II, l'homozygotie du receveur pour l'allèle HLA-E*0103 et la présence de cette forme allélique (que ce soit à l'état d'hétéro- ou d'homozygotie) chez le greffon sont associées à une augmentation de la survie et un moindre risque de développer l'effet GVHD (Tamouza *et al.* 2006; Danzer *et al.* 2009; Ludajic *et al.* 2009; Hosseini *et al.* 2012). Cet effet protecteur a été associé à la plus forte stabilité de la molécule HLA-E*0103 et donc à sa capacité à mieux protéger les cellules de l'hôte vis-à-vis des cellules du greffon. À l'inverse, la présence de la forme allélique HLA-E*0101 est associée à un plus grand risque d'infections bactériennes post-greffe et de complications diverses liées notamment à l'effet GVHD (Tamouza *et al.* 2005).

En revanche, l'expression des molécules HLA-E par les cellules tumorales du receveur pourrait influencer négativement le pouvoir curatif de la transplantation, en diminuant leur sensibilité à la lyse par les cellules NK et T du greffon (Nguyen *et al.* 2005; Stangl *et al.* 2008; Nguyen *et al.* 2009). De plus, il a été montré qu'un haut niveau

d'expression du CD94 par le donneur ou le receveur était associé à une plus faible survie sans rechute chez les patients atteints de leucémie (Zhao *et al.* 2007).

iii. Transplantation d'organes solides

À ce jour, aucune étude n'a clairement établi la contribution éventuelle de l'interaction CD94/NKG2 avec les molécules HLA-E dans la transplantation d'organes allogéniques. Cependant, les travaux de l'équipe de Béatrice Chareau ont montré que la capacité des cellules endothéliales à exprimer les molécules HLA-E leur conférait une protection contre la lyse par les cellules NK allogéniques *in vitro*. De fait, l'interaction des molécules HLA-E avec les récepteurs CD94/NKG2 pourrait jouer un rôle non négligeable dans le développement des réponses allogéniques vis-à-vis des organes vascularisés (Coupel *et al.* 2007).

De plus, plusieurs études ont montré le potentiel immunosuppresseur des molécules HLA-E dans le cadre de transplantations xénogéniques. Ainsi, les cellules endothéliales et lymphoïdes de porcs transgéniques qui expriment à leur surface des molécules HLA-E humaines apprêtées par un peptide approprié (issu de molécules HLA-G co-exprimées ou de la séquence signal des molécules HLA-E recombinantes) sont protégées de la lyse par les cellules NK humaines *in vitro* et ce de façon dépendante de leur interaction avec les récepteurs CD94/NKG2-A (Sasaki *et al.* 1999; Matsunami *et al.* 2000; Matsunami *et al.* 2002; Crew *et al.* 2005; Forte *et al.* 2005; Lilienfeld *et al.* 2007; Weiss *et al.* 2009).

3. HLA-E : Ligand des récepteurs TCR

Bien que les molécules HLA-E/Qa-1 aient majoritairement été décrites pour leur rôle en tant que ligands des récepteurs CD94/NKG2, plusieurs études montrent qu'elles peuvent également restreindre la reconnaissance d'antigènes par les récepteurs T de lymphocytes T $\alpha\beta$ CD8 et $\gamma\delta$. Ainsi, en 1989, D. Vidovic *et coll.* ont décrit pour la première fois qu'un hybridome T exprimant un TCR de type $\gamma\delta$ était capable de reconnaître un peptide synthétique (polyGT) présenté dans le contexte non-classique Qa-1 (Vidovic *et al.* 1989). Par la suite, de nombreux groupes ont montré que des réponses T CD8 dirigées contre des peptides d'origine endogène ou exogène pouvaient être restreintes par les molécules HLA-E/Qa-1. Il a notamment été montré que ces réponses non conventionnelles pouvaient jouer un rôle protecteur lors de réponses immunes anti-infectieuses et anti-tumorales. D'autre part, les molécules HLA-E/Qa-1 sont également impliquées dans la reconnaissance des lymphocytes T CD4 auto-réactifs par des lymphocytes T CD8 suppresseurs, jouant ainsi un rôle crucial dans le maintien de la tolérance périphérique au soi.

3.1 Répertoire et éducation des lymphocytes T CD8 restreints HLA-E/Qa-1

L'utilisation de souris déficientes pour l'expression des molécules du CMH-I classique a permis de montrer qu'une fraction minoritaire mais significative des lymphocytes T CD8⁺ (environ 10%) était restreinte par des molécules du CMH-I non classiques telles que H2-M3, Qa-1 et Qa-2 (Perarnau *et al.* 1999; Jay *et al.* 2008; Cho *et al.* 2011). En outre, ces souris mutées ne présentent pas d'altération en termes de phénotype et de diversité du répertoire T exprimant des TCR de type $\alpha\beta$ (Perarnau *et al.* 1999; Laouini *et al.* 2000). Ce répertoire est composé à 90% de cellules exprimant le corécepteur hétérodimérique CD8 $\alpha\beta$, mais des cellules T $\alpha\beta$ exprimant l'homodimère CD8 $\alpha\alpha$ sont également retrouvées, surtout dans l'infiltrat lymphocytaire épithélial intestinal (Park *et al.* 1999; Kurepa *et al.* 2003). De plus, bien que le nombre de cellules T CD8⁺ thymiques et périphériques soit plus réduit chez ces souris, à la faveur du répertoire T CD4⁺, elles sont cependant capables de développer des réponses anti-infectieuses protectrices, associées à la génération de réponses T CD8 primaires

et mémoires restreintes par les molécules du CMH-Ib (Seaman *et al.* 1999; D'Orazio *et al.* 2003; Su *et al.* 2005; Swanson *et al.* 2008; Chen *et al.* 2011; Cho *et al.* 2011).

L'existence d'un répertoire lymphocytaire T restreint par les molécules HLA-E/Qa-1 pose la question de leur éducation thymique. L'utilisation de souris transgéniques exprimant un TCR spécifique d'un complexe antigénique insuline/Qa-1 a permis de montrer que la sélection positive des lymphocytes T restreints Qa-1 était dépendante de l'expression thymique des molécules Qa-1, de la $\beta 2m$ et de TAP mais ne nécessitait pas la présence de peptide issu des molécules du CMH-I (Sullivan *et al.* 2002). Cependant, dans les conditions physiologiques, l'expression de molécules HLA-E/Qa-1 apprêtées par les peptides issus des molécules du CMH-I du soi doit certainement jouer un rôle important dans la sélection négative des lymphocytes T restreints HLA-E/Qa-1, afin d'éliminer les lymphocytes auto-réactifs reconnaissant ces complexes avec une forte affinité. De plus, tandis que la sélection thymique des lymphocytes T restreints par les molécules du CMH-I classiques dépend majoritairement de l'expression de leur ligand par les cellules épithéliales thymiques (Anderson *et al.* 1994), celle des lymphocytes T restreints Qa-1 pourrait également impliquer l'expression des molécules Qa-1 par les cellules d'origine hématopoïétique (Sullivan *et al.* 2002; Urdahl *et al.* 2002). Par ailleurs, tandis que l'expression du transporteur de peptide TAP semble indispensable à leur éducation thymique, leur expansion en périphérie se fait indépendamment de celui-ci (Sullivan *et al.* 2004).

3.2 Fonctions immunologiques des lymphocytes T restreints

HLA-E/Qa-1

Si l'interaction des molécules HLA-E/Qa-1 avec les récepteurs CD94/NKG2 est principalement dépendante de leur capacité à apprêter des peptides issus des molécules du CMH-I du soi, les réponses T CD8 restreintes par ces molécules sont liées à leur capacité à présenter des peptides alternatifs.

À ce jour, plusieurs peptides d'origine endogène ou exogène ont été décrits comme étant la cible de réponses T CD8 restreintes par les molécules HLA-E/Qa-1 et sont répertoriés dans le tableau suivant (**Tableau 8**). Parmi les peptides issus de pathogènes intracellulaires, plusieurs semblent jouer un rôle dans le contrôle des infections virales et bactériennes par les

lymphocytes T CD8 restreints HLA-E/Qa-1. Concernant les peptides d'origine endogène, une majorité est exprimée dans des conditions associées au stress cellulaire, à la transformation tumorale ou encore à un défaut de la voie de présentation des antigènes par les molécules du CMH-I. De fait, leur expression est impliquée dans la surveillance de l'intégrité des cellules du soi par les lymphocytes T CD8.

Tableau 8 : Origine et séquence des peptides reconnus par le TCR de lymphocytes T restreints par les molécules HLA-E et ses homologues

Molécule	Source	Peptide	Liaison au TCR	Références	
HLA-E	Endogène				
	hsp60 ₁₀₋₁₈	QMRPVSRVL	+	Jiang <i>et al.</i> 2010	
	Prdx5 mutée ₅₂₋₆₀	AMAPIKTHL AMAPIKVRL	+	Sensi <i>et al.</i> 2009	
	Chaîne V β du TCR	SLELGDSAI LLLGPGSGL	+	Li <i>et al.</i> 2001	
	Exogène				
	HCMV gpUL40 ₁₅₋₂₃	VMAPRTLVL VMAPRTLIL VMAPRTLLL	+	Pietra <i>et al.</i> 2003	
	HCV core ₃₅₋₄₄	YLLPRRGPRL	+	Schulte <i>et al.</i> 2009	
	EBV BZLF-1 ₃₉₋₄₇	SQAPLPCVL	+	Garcia <i>et al.</i> 2002	
	Influenza InflM ₅₉₋₆₇	ILGFVFTLT	+/-	Garcia <i>et al.</i> 2002	
	<i>Salmonella typhi</i> GroEL	variés	+	Salerno-Goncalves <i>et al.</i> 2004	
	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	variés	+	Heinzel <i>et al.</i> 2002 Grotzke <i>et al.</i> 2009	
	Qa-1	Endogène			
		hsp60 ₂₁₆₋₂₂₄	GMKFDRGYI	+	Davies <i>et al.</i> 2003
Chaîne V β du TCR		variés	+	Jiang <i>et al.</i> 1995	
TEIPP		variés	+	Oliveira <i>et al.</i> 2010	
Fam49b		FYAEATPML	+	Nagarajan <i>et al.</i> 2012	
Exogène					
<i>Listeria monocytogenes</i>		?	+	Bouwer <i>et al.</i> 1997	
<i>Salmonella typhimurium</i> GroEL ₁₉₂₋₂₀₀		GMQFDRGYL	+	Lo <i>et al.</i> 2000	
Caja-E	Endogène				
	MOG ₄₀₋₄₈	YRPPFSRVV	+	Jagessar <i>et al.</i> 2012	

3.2.1 Réponses T restreintes Qa-1/HLA-E dirigées contre des peptides exogènes

i. Lymphocytes T restreints HLA-E/Qa-1 anti-bactériens

L'existence de réponses T cytotoxiques restreintes par la molécule Qa-1 a été décrite pour la première fois en 1997. Ayant initialement observé que l'infection par *Listeria monocytogenes* était associée à l'apparition de réponses T CD8 cytotoxique restreintes par des molécules du CMH-I non classiques *in vivo*, il fut alors démontré que ces réponses T non conventionnelles étaient restreintes par la molécule Qa-1 et que leur présence contribuait au contrôle de l'infection (Bouwer *et al.* 1994; Bouwer *et al.* 1997). Le même groupe montra ensuite que ces réponses non-classiques apparaissaient plus précocement que les réponses T CD8 conventionnelles, avec un pic de prolifération à J4-J6 post-infection et qu'elles étaient associées au développement de réponses mémoires protectrices lors d'infections subséquentes (Seaman *et al.* 2000). Par la suite, d'autres études confirmèrent le rôle des réponses T CD8 restreintes par les molécules HLA-E/Qa-I dans le contrôle des infections bactériennes.

Ainsi, il fut montré successivement chez la souris, puis chez l'homme, que des peptides issus des bactéries *Salmonella typhimurium* et *typhi* pouvaient également être la cible de réponses T $\alpha\beta$ CD8 restreintes par les molécules Qa-I/HLA-E. En outre, l'immunisation de donneurs sains avec une souche vaccinale atténuée est associée à l'apparition de réponses T CD8 effectrices et mémoires qui reconnaissent des peptides bactériens variés (au moins 6 peptides différents) dans le contexte HLA-E. Ces lymphocytes sont détectés dans le sang périphérique 4 jours après la vaccination, présentent un fort potentiel cytotoxique et persistent au delà de deux ans après immunisation (Salerno-Goncalves *et al.* 2004; Salerno-Goncalves *et al.* 2010). Chez la souris, cette infection est également associée à l'expansion rapide (3 jours après infection) de cellules T $\gamma\delta$ restreintes par la molécule Qa-1 et pouvant représenter jusqu'à 15% des cellules T $\gamma\delta$ présentes dans l'infiltrat intra-épithelial intestinal (Davies *et al.* 2004). De façon intéressante, les lymphocytes T $\alpha\beta$ CD8 restreints par Qa-1 reconnaissant le peptide bactérien issu de la protéine GroEL (GMQFDRGYL) cross réagissent également avec un peptide endogène dérivé de la protéine de stress HSP60 (GMKFDGRGYI) et sont ainsi capables de reconnaître et de lyser des macrophages autologues "stressés". Aussi, a-t-il été proposé que ces réponses T non conventionnelles pourraient également contribuer au développement de maladies auto-immunes (Lo *et al.* 1999; Lo *et al.* 2000; Soloski and

Metcalf 2001). Enfin, la séquence de ce peptide GroEL₁₉₂₋₂₀₀ étant conservée chez des nombreuses bactéries (dont *Escherichia coli*, *Yersinia enterocolitica*, *Klebsiella pneumoniae* et *Helicobacter pylori*), il est probable que les lymphocytes T restreints Qa-1/HLA-E participent également au contrôle de ces infections bactériennes.

L'infection par *Mycobacterium tuberculosis* est également associée à l'apparition de réponse T CD8 restreintes par HLA-E. En l'occurrence, ces réponses non conventionnelles sont prédominantes chez les patients infectés et peuvent être dirigées contre plus d'une cinquantaine de peptides microbiens différents chez les individus vaccinés par le BCG (Lewinsohn *et al.* 1998; Lewinsohn *et al.* 2000; Heinzl *et al.* 2002; Joosten *et al.* 2010). En outre, il a été proposé que le rôle prépondérant des réponses T restreintes HLA-E dans cette infection soit, à la différence des molécules HLA-I classiques, lié à la capacité des molécules HLA-E à apprêter des peptides microbiens dans les compartiments phagosomiaux infectés (Grotzke *et al.* 2009).

ii. Lymphocytes T restreints HLA-E/Qa-1 anti-viraux

Les lymphocytes T restreints HLA-E peuvent également reconnaître des peptides viraux issus du CMV, du HCV, de l'EBV et de l'Influenza et jouer un rôle protecteur dans le contrôle d'infections virales.

Ainsi, le groupe de Maria Christina Mingari et de Lorenzo Moretta a montré que des réponses T $\alpha\beta$ CD8 restreintes HLA-E étaient fréquemment induites chez les individus séropositifs pour le CMV (Pietra *et al.* 2003; Romagnani *et al.* 2004; Mazzarino *et al.* 2005). De façon intéressante, ces cellules T reconnaissent des peptides (VMAPRTLIL et VMAPRTLVL) issus des protéines virales gpUL40 qui sont identiques à ceux provenant des séquences signal de molécules HLA-A et/ou HLA-C. Par conséquent leur immunogénicité est limitée par l'haplotype HLA-A et HLA-C des patients infectés. En effet, ces réponses ne sont détectées que chez les patients pour lesquels la séquence du peptide d'origine virale diffère de celles des peptides issus des molécules HLA-A/C autologues et ne constitue donc pas un peptide du soi.

Compte tenu du fait que le virus du CMV a développé de nombreux mécanismes permettant de diminuer l'expression des molécules HLA-I classiques à la surface des cellules infectées, la capacité de cellules T CD8 à reconnaître des peptides viraux dans ce contexte HLA-I non classique joue certainement un rôle décisif dans le contrôle de cette infection. Ainsi, et de manière paradoxale, la capacité de ce virus à fournir des peptides stabilisant

l'expression de la molécule HLA-E peut conjointement (i) contribuer à leur échappement à la surveillance exercée par les cellules NK et T exprimant les récepteurs CD94/NKG2-A (ii) et induire la reconnaissance des cellules infectées par des cellules T restreintes HLA-E chez les patients permissifs.

À l'aide de tétramères recombinants, il fut montré que ces réponses T CD8 $\alpha\beta$ représentaient en moyenne entre 1 à 3 % des cellules T CD8 circulantes *in vivo* mais pouvait excéder 20% chez certains individus séropositifs. Ces cellules constituent généralement une population pauciclonale comme en témoigne la faible diversité du répertoire des TCR (1 à 3 chaînes V β différentes par individu). Elles présentent un phénotype effecteur/mémoire EMRA (CD45RA Effector Memory T cells) (CD27⁻CD28⁻CD45RA⁺CCR7⁻) et sont capables de produire de grande quantité d'IFN- γ et de lyser des fibroblastes infectés *in vitro*. Elles sont également caractérisées par l'expression du marqueur NK CD56 et de nombreux récepteurs de type NK (KIR, CD94/NKG2, ILT-2/LIR-1), aussi furent-elles initialement dénommées NK-CTL.

Ces cellules T présentent également la capacité à reconnaître des cellules tumorales allogéniques et prolifèrent préférentiellement lors des stimulations allogéniques *in vitro* (Romagnani *et al.* 2002). Cette allo-réactivité résulte du fait que les peptides d'origine virale reconnus sont identiques à ceux issus de molécules HLA-Ia allogéniques. De fait, il a été proposé que, si ces cellules pouvaient contribuer positivement au contrôle de l'infection par le CMV chez les patients transplantés, elles pourraient également contribuer au rejet du greffon en reconnaissant les cellules allogéniques. Cependant, à ce jour, aucune étude n'a encore formellement évalué leur rôle dans le cadre de transplantations.

Les caractéristiques de l'interaction des TCR avec les complexes HLA-E-peptides du CMV ont été investiguées. L'analyse des cristaux de complexes recombinants tripartites TCR $\alpha\beta$ -HLA-E-VMAPRTLIL a permis de montrer une structure similaire à celles impliquant des molécules HLA-I classiques (**Figure 14**). Le TCR interagit avec le complexe HLA-E-peptide selon une orientation oblique par rapport à celle du sillon peptidique. Les chaînes V α et V β du TCR contribuent de façon équivalente à l'interaction (respectivement 46% et 54%), laquelle implique majoritairement les domaines CDR1 et CDR3 de la chaîne V α côté N-terminal du peptide et les domaines CDR2 et CDR3 de la chaîne V β côté C-terminal du peptide. L'affinité (Kd d'environ 30 μ M) et la cinétique de cette interaction sont également comparables à celles des TCR spécifiques d'antigènes présentés dans un contexte HLA-I classique et ne sont pas affectées par la nature du résidu polymorphique de la molécule

HLA-E, lequel n'est pas directement impliqué dans l'interaction avec le TCR. Par contre, cette interaction est très dépendante de la nature du résidu peptidique en position 8 et la discrimination de cette position semble impliquer les 3 domaines variables de la chaîne V β du TCR (Hoare *et al.* 2006).

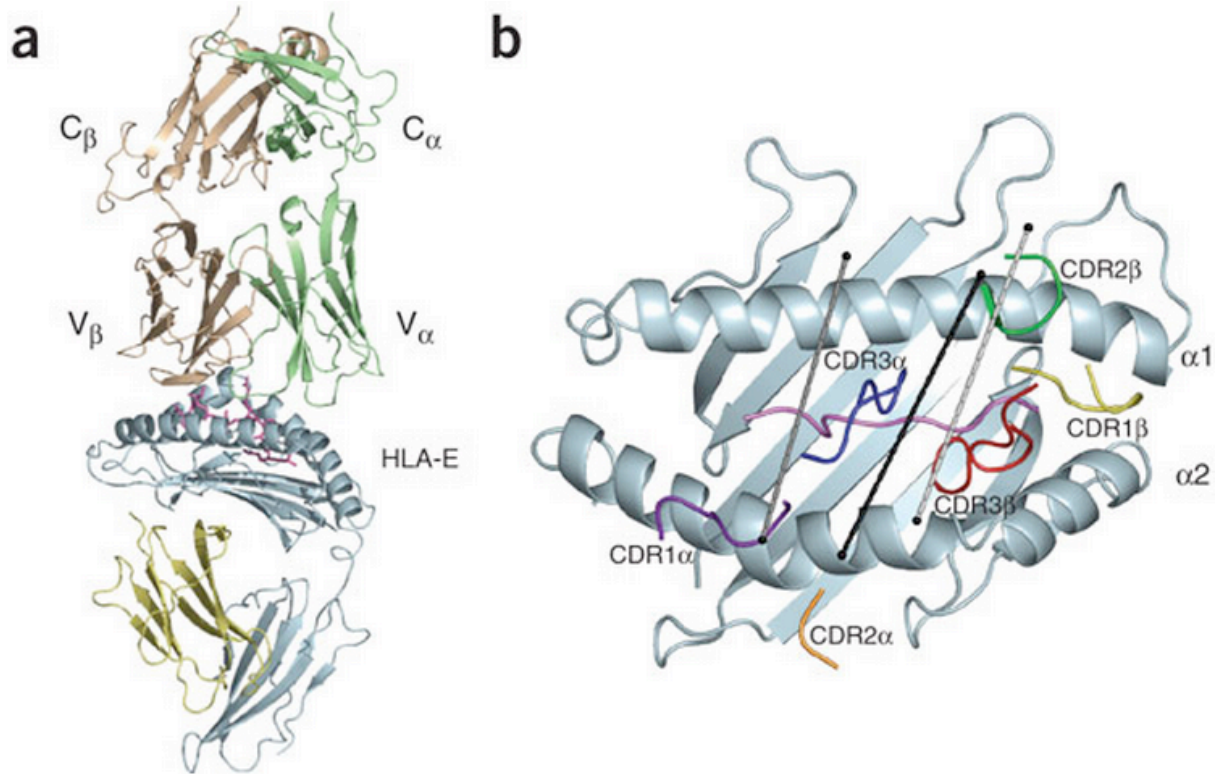


Figure 14 : Interaction TCR-HLA-E-peptide

(a) Représentation tridimensionnelle du complexe TCR-HLA-E-VMAPRTLIL

(b) Orientation du TCR vis à vis du complexe HLA-E-peptide, l'axe reliant les centres de gravité des domaines V α et V β étant indiqué en noir. Pour comparaison, l'orientation de TCRs spécifiques des complexes HLA-A2-LLFGYPVYV (protéine tax de l'HTLV-1) (gris foncé) et HLA-B8-FLRGRAYGL (antigène nucléaire 3A de l'EBV) (gris clair) est indiquée. (Hoare *et al.* 2006)

Par ailleurs, il a été montré que le peptide 35-44 issu de la protéine Core du HCV, dont l'immunogénicité avait déjà été décrite dans le contexte classique HLA-A*0201, était également la cible de réponses T $\alpha\beta$ CD8⁺ restreintes par HLA-E. En outre, les réponses T non conventionnelles dirigées contre ce peptide sont détectées chez une fraction significative des patients infectés (40%) et leur présence est associée à une plus faible charge virale. De façon plus surprenante, la fréquence de ces réponses est augmentée chez les patients homozygotes pour l'allèle HLA-E*0101 décrit comme étant le moins stable (Schulte *et al.* 2009).

3.2.2 Réponses T restreintes HLA-E/Qa-1 dirigées contre des peptides endogènes

La capacité des molécules HLA-E à présenter des peptides endogènes non conventionnels (ne provenant pas des molécules du CMH-I du soi) semble jouer un rôle important dans le contrôle immunitaire de l'intégrité du soi. En effet, les réponses T CD8 dirigées contre ces antigènes endogènes peuvent contribuer à la surveillance immunitaire des cellules néoplasiques, mais également jouer un rôle régulateur en prévenant le développement des réponses T CD4 auto-immunes. D'autre part, l'existence de lymphocyte T restreints par l'homologue de HLA-E, Caja-E, et dirigés contre des peptides issus de la protéine MOG (un constituant de la myéline) pose également la question de l'éventuel rôle délétère de ces réponses T non conventionnelles (Jagessar *et al.* 2012).

i. Lymphocytes T restreints HLA-E/Qa-1 anti-tumoraux

L'apprêtement des molécules HLA de classe I est fréquemment altéré lors de la transformation tumorale et semble jouer un rôle prépondérant dans l'échappement tumoral à la surveillance exercée par le système immunitaire. Cependant, en 2006, les travaux de Thorbald van Hall ont permis de montrer que ces modifications pouvaient également favoriser l'émergence d'un nouveau répertoire peptidique, susceptible d'induire la reconnaissance et l'élimination des cellules transformées par des cellules T (van Hall *et al.* 2006). Ces peptides immunogènes sont issus de protéines exprimées constitutivement par les cellules mais dont l'apprêtement et donc l'expression à la surface sont inhibés dans les cellules saines. Ainsi, il apparaît que de cette nouvelle classe d'antigènes tumoraux dont l'expression est associée à des défauts de la voie de présentation des antigènes ou TEIPP (T-cell Epitopes associated with Impaired Peptide Processing) pourrait représenter des cibles d'intérêt majeur dans le développement de protocoles d'immunothérapies anti-tumorales plus efficaces. À l'appui de cette hypothèse, il a été montré *in vivo* que la vaccination (peptidique ou cellulaire) ou le transfert adoptif des cellules T ciblant ces antigènes pouvait conduire à l'éradication des tumeurs TAP déficientes chez la souris tout en épargnant les cellules saines de l'organisme (van Hall *et al.* 2006; Chambers *et al.* 2007; Oliveira *et al.* 2010). En outre, une fraction significative des antigènes processés dans les cellules tumorales TAP négatives est restreinte par l'homologue murin de HLA-E et reconnaît des tumeurs totalement déficientes pour l'expression des molécules du CMH-I classiques (Oliveira *et al.* 2010). De plus, ce groupe a

démontré que des réponses T CD8 polyclonales (répertoire V β varié) ciblant cette classe d'antigènes non conventionnels pouvaient facilement être détectées *in vitro* en stimulant les PBMC de patients atteints de cancer avec des cellules tumorales autologues TAP déficientes (Lampen *et al.* 2010).

De façon similaire, une étude récente a montré que les cellules déficientes pour l'expression d'une aminopeptidase du RE ERAAP, induisaient la prolifération de lymphocytes T CD8 cytotoxiques restreints par la molécule Qa-1, *in vitro* et *in vivo*. Ces réponses T sont dirigées contre un peptide nonamérique issu d'un ORF (Fam49b) qui est exprimé constitutivement et dont la séquence est très conservée chez les vertébrés. Les réponses T CD8 induites *in vivo* présentent un profil effecteur/mémoire et la fréquence des cellules T spécifiques de ce complexe antigénique est très importante, même chez les souris naïves (1/10⁴ parmi les cellules T CD8⁺ spléniques) (Nagarajan *et al.* 2012). De façon intéressante, l'expression des homologues humains de cette aminopéptidase (ERAP1 et ERAP2) est fréquemment altérée dans des tumeurs d'origines variées (Fruci *et al.* 2008) et il a été montré que l'ORF codant pour le peptide murin immunogène était surexprimé dans les cancers du poumon non à petites cellules (Petroziello *et al.* 2004). Aussi, peut-on se poser la question de l'éventuelle immunogénicité des peptides endogènes "processés" dans les cellules tumorales ERAP déficientes chez l'humain.

Par ailleurs, il a été montré dans le mélanome que des peptides issus de la peroxydase mutée Prdx5 pouvaient stabiliser l'expression de HLA-E à la membrane et étaient reconnus, bien qu'avec une faible avidité, par les cellules NK-CTL spécifiques des peptides immunogènes issus du CMV (Sensi *et al.* 2009).

ii. Lymphocytes T restreints HLA-E/Qa-1 suppresseurs

Les lymphocytes T restreints HLA-E/Qa-1 jouent également un rôle dans le contrôle de la tolérance périphérique au soi en éliminant les lymphocytes T CD4 auto-réactifs, limitant ainsi la survenue de pathologies auto-immunes.

L'existence de T $\alpha\beta$ CD8 régulateurs restreints par la molécule Qa-1 a initialement été mise en évidence à la fin des années 90 par le groupe de Leonard Chess. Plusieurs études avaient jusqu'alors montré l'effet protecteur de l'injection de cellules T CD4 auto-réactives irradiées dans des modèles murins de maladies auto-immunes. Cet effet bénéfique est associé à l'induction de réponses T CD8 suppressives, qui limitent l'activité délétère des lymphocytes

T CD4 autologues *in vivo*. En 1995, ce groupe a alors démontré que ces réponses T CD8 régulatrices pouvaient être restreintes par la molécule Qa-1 et étaient capables de lyser spécifiquement les lymphocytes T CD4 activés exprimant un TCR composé d'une même chaîne V β donnée (Jiang *et al.* 1995; Ware *et al.* 1995). Par la suite, plusieurs études ont confirmé que l'effet bénéfique de la vaccination CD4 était lié à l'induction de réponses T CD8 restreintes par la molécule Qa-1 et spécifiques de peptides issus de la région conservée de la chaîne V β des lymphocytes T CD4 autologues (Correale *et al.* 1997; Jiang *et al.* 1998). De fait, le transfert adoptif ou l'activation *in vivo* (par injection de cellules T CD4 irradiés ou vaccination peptidique) de ces cellules T CD8 "anti-idiotypiques" permet de prévenir le développement des pathologies auto-immunes dans de nombreux modèles murins (EAE, diabète, kératites) (Jiang *et al.* 2001; Jiang *et al.* 2003; Panoutsakopoulou *et al.* 2004; Tang *et al.* 2006; Tang *et al.* 2007). Par ailleurs, il a récemment été montré que ce type de réponses T CD8 suppressives se développait spontanément dans les modèles murins d'encéphalomyélite auto-immune (Varthaman *et al.* 2011). Enfin, la preuve du concept que des réponses T CD8 restreintes par la molécule HLA-E et dirigées contre des épitopes issus de chaînes V β du TCR existent chez humain a été faite *in vitro* (Li *et al.* 2001).

Par la suite, le développement de modèles murins déficients pour la molécule Qa-1 a permis de confirmer le rôle crucial de cette molécule dans le contrôle des pathologies auto-immunes. En effet, les souris Qa-1^{-/-} présentent des réponses T CD4 exacerbées, une plus grande susceptibilité à développer des pathologies auto-immunes induites expérimentalement et ne sont pas capables de prévenir leur développement lors d'inductions secondaires (Hu *et al.* 2004). Cependant, ces modèles ne permettent pas d'exclure le rôle de l'interaction des molécules Qa-1 avec les récepteurs CD94/NKG2 dans la tolérance au soi. Aussi, a-t-il été développé un modèle murin muté pour un seul acide aminé de la molécule Qa-1 permettant de préserver sa capacité à interagir avec les récepteurs CD94/NKG2, mais abolissant son interaction avec les corécepteurs CD8. Chez ces souris, on observe l'apparition spontanée de troubles auto-immuns systémiques, associés notamment à la présence d'auto-anticorps et d'infiltrations myéloïdes et lymphoïdes dans de nombreux tissus et au développement de glomérulonéphrites (Lu *et al.* 2008; Kim and Cantor 2011). De fait, la capacité des molécules Qa-1 à interagir avec le TCR de lymphocytes T joue un rôle majeur dans le contrôle de la tolérance immunitaire au soi.

Plus récemment, un mécanisme alternatif permettant aux lymphocytes T CD8 restreints par les molécules Qa-1/HLA-E de maintenir la tolérance au soi a été proposé par le groupe de Leonard Chess (Jiang *et al.* 2005). Ce modèle intitulé "avidity model of peripheral T-cell regulation" est basé sur la capacité des lymphocytes T CD8 spécifiques du complexe antigénique Qa-1/HSP60 à détruire spécifiquement les lymphocytes T CD4 activés présentant une avidité modérée pour leur antigène (**Figure 15**). En effet, les lymphocytes T CD4 de forte avidité pour les antigènes du soi étant probablement éliminés précocement par les processus intra-thymiques de sélection négative, seuls des lymphocytes T CD4 d'avidité modérée pour les antigènes du soi sont retrouvés dans le sang périphérique. Lors de leur activation, les lymphocytes T CD4 de moyenne avidité exprimeraient majoritairement des molécules Qa-1 liées au peptide issu de la protéine de stress HSP60 à leur surface les rendant ainsi susceptibles à la lyse par les cellules T CD8 régulatrices. En revanche les T CD4 de faible ou de forte avidité pour leur antigène n'exprimeraient pas de complexes Qa-1-HSP60 et seraient donc épargnés par les cellules T restreintes QA-1. Ainsi, la vaccination de souris par des cellules dendritiques chargées avec le peptide issu des molécules HSP60 permet d'induire des réponses T CD8 suppressives qui préviennent le développement de maladies auto-immunes induites expérimentalement (encéphalomyélites allergiques et diabète de type 1) (Chen *et al.* 2007; Wu *et al.* 2009). Enfin, ce groupe a montré l'existence de cellules T CD8 suppressives équivalentes chez l'homme qui participeraient également au maintien de la tolérance périphérique au soi via la reconnaissance du complexe antigénique HLA-E/HSP60 (Jiang *et al.* 2010).

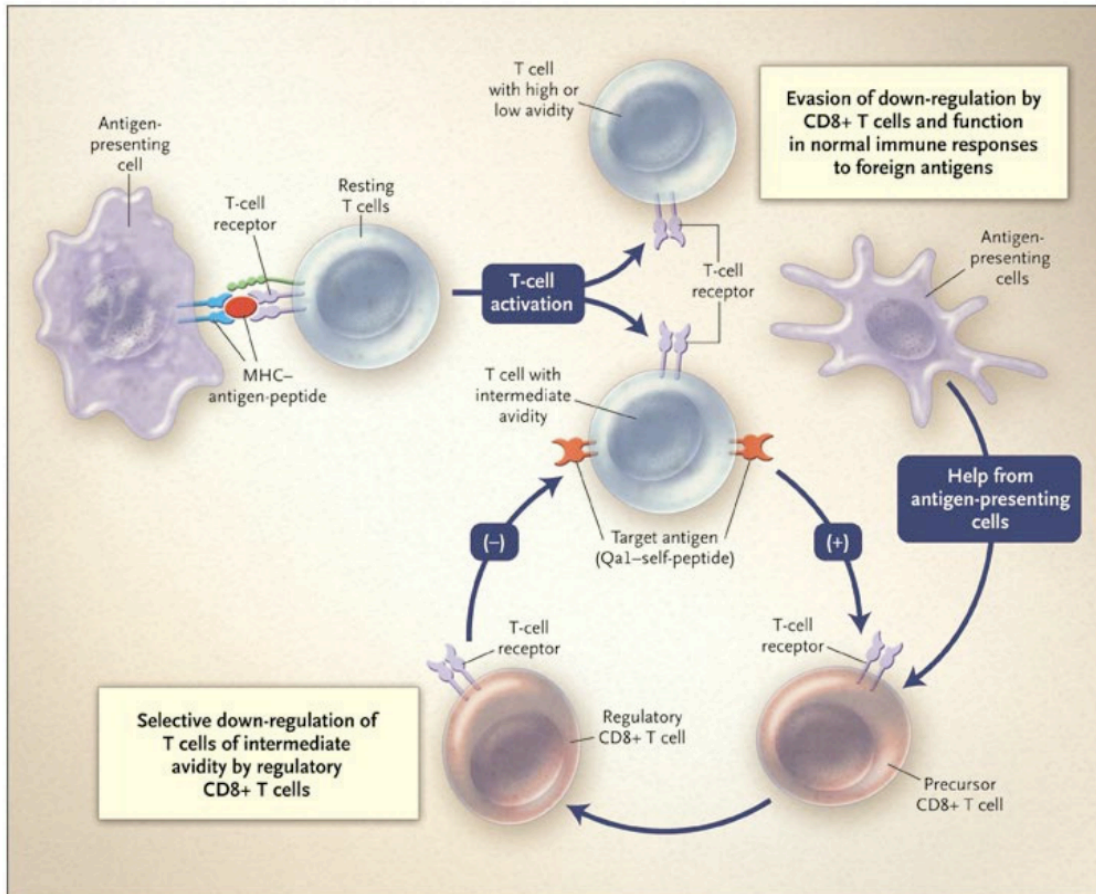


Figure 15 : Représentation du modèle de régulation en périphérie des réponses T en fonction de leur avidité pour l'antigène

(Jiang and Chess 2006)

4. Molécules HLA-I solubles

L'existence de molécules HLA-I solubles fut décrite pour la première fois en 1970 dans le sérum de donneurs sains (Charlton and Zmijewski 1970; van Rood *et al.* 1970). Par la suite, il fut montré que des molécules HLA-I solubles, classiques ou non, étaient retrouvées dans le sérum et de nombreux fluides corporels de tous les individus. Cependant, tandis que leur concentration sérique est relativement stable dans les conditions physiologiques, elle est modifiée dans de nombreux contextes pathologiques et peut notamment être corrélée avec la progression de la maladie ou encore avec le pronostic de survie des patients. De plus, ces molécules peuvent présenter des propriétés immuno-modulatrices et pourraient donc jouer un rôle non négligeable dans la régulation des réponses immunitaires.

4.1 Caractéristiques moléculaires et production

À la différence des formes membranaires, les molécules HLA-I solubles sont très hétérogènes en termes de structure et de taille (**Figure 16**).

On peut distinguer trois isoformes majoritaires de molécules HLA-I solubles en fonction de leur poids moléculaire : 44-46, 39-41 et 35-37 kDa (Allison *et al.* 1977; Dobbe *et al.* 1988; Haga *et al.* 1991). Les formes de 44-46 kDa représentent des molécules HLA-I "complètes". Bien que circulantes, elles sont associées avec des lipides et/ou des lipoprotéines et il a été proposé qu'elles soient issues du relargage constitutif de microparticules de membranes cellulaires telles que les exosomes (Allison *et al.* 1977; Krangel 1987; Datema *et al.* 1999). Les formes d'environ 40kDa sont issues d'un épissage alternatif. Elles ne présentent pas de domaine membranaire et par conséquent sont dirigées vers la voie de sécrétion constitutive des protéines solubles (Krangel *et al.* 1984; Krangel 1985; He and Le 1995). Les formes de plus faible poids moléculaire sont dépourvues des domaines transmembranaires et intracellulaires et sont générées lors du clivage de formes membranaires par des métalloprotéases associées à la membrane. Il semblerait qu'elles soient majoritairement issues de formes membranaires dépourvues de $\beta 2m$ (mais pouvant conserver leur association avec un peptide) qui, après clivage par les métalloprotéases, pourraient se réassocier avec la $\beta 2m$ et former des complexes solubles stables (Demaria *et al.* 1994; Demaria *et al.* 1999; Demaria and Bushkin 2000)

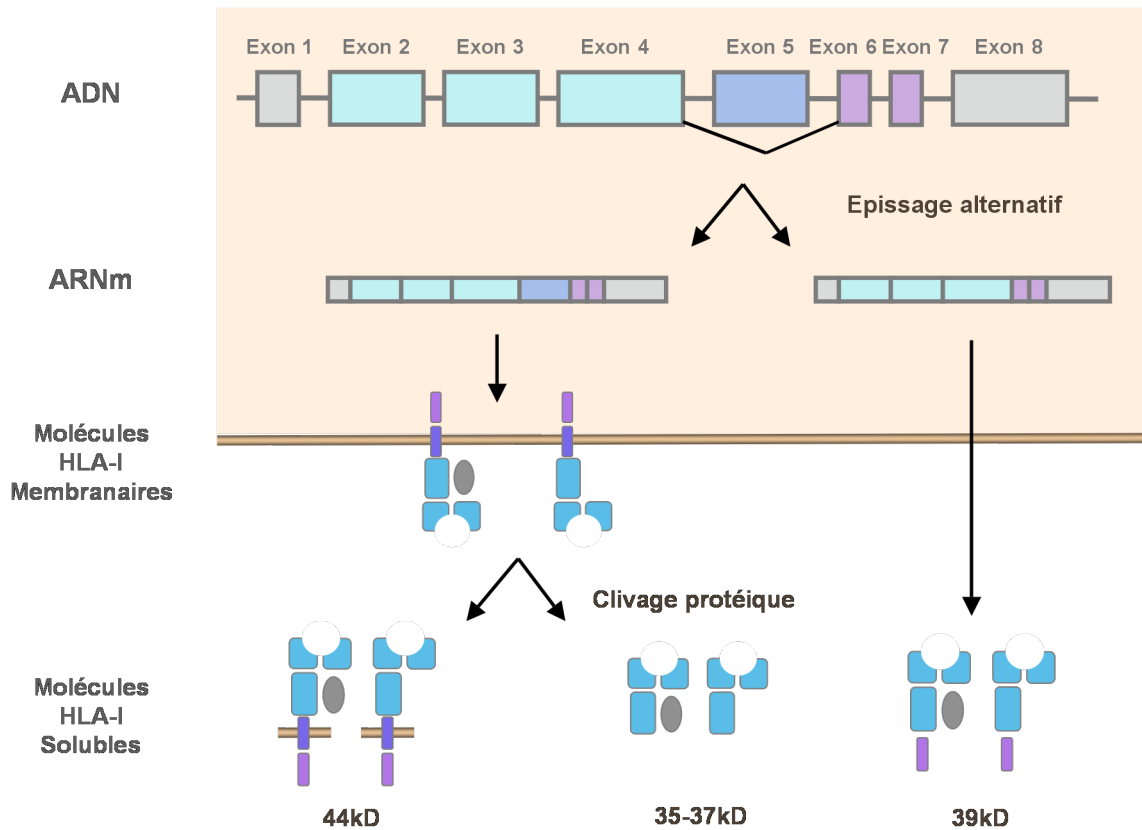


Figure 16 : Structure et génération des molécules HLA-I solubles

Toutes les isoformes solubles peuvent être retrouvées sous des formes liées, ou non, à la $\beta 2m$, bien que les formes associées à cette dernière semblent majoritaires (Allison *et al.* 1977; Pickl *et al.* 1993; DeVito-Haynes *et al.* 1998; Puppo *et al.* 1999; Haynes *et al.* 2002). De plus, ces isoformes peuvent également se complexer entre elles pour former des agrégats moléculaires plus lourds (Davies *et al.* 1989). Enfin, il semblerait qu'une partie non négligeable de ces molécules solubles présente toujours des peptides (Bassani-Sternberg *et al.* 2010).

In vitro, les molécules HLA-I solubles sont constitutivement produites par une majorité des cellules d'origine myéloïde et lymphoïde et cette production est potentialisée suite à leur activation par des cytokines, des agents mitogènes ou par des antigènes allogéniques ou non (Krangel *et al.* 1984; Krangel 1986; Villar *et al.* 1989; Brieva *et al.* 1990; Pickl *et al.* 1993). Leur production est également augmentée ou induite dans de nombreux types cellulaires normaux ou tumoraux en présence d'IFN (α , β , γ) ou de TNF- α (Krangel 1986; He and Le 1995; Datema *et al.* 1999; Haynes *et al.* 2002). L'effet des cytokines semble

lié à l'augmentation globale de l'activité transcriptionnelle et traductionnelle des molécules HLA-I membranaires et sécrétées, mais également à l'augmentation de l'activité des métalloprotéases qui clivent les molécules membranaires pour générer les isoformes solubles de 35-37 kDa. En outre, la concentration des molécules HLA-I soluble dans le sérum est augmentée chez les patients porteurs de carcinomes rénaux traités avec de l'IFN- γ (Aulitzky *et al.* 1991).

Dans les conditions physiologiques, les molécules HLA-I solubles retrouvées dans le surnageant de culture cellulaire ou dans le sérum de donneurs sains sont majoritairement de type classique, cependant les molécules HLA-I non classiques peuvent également être produites sous des formes solubles (Dong *et al.* 2003).

Ainsi, notre équipe et celle de Béatrice Chareau ont montré que des molécules HLA-E solubles pouvaient être détectées dans le sérum de donneurs sains et que celles-ci étaient produites *in vitro* par les mélanocytes, les cellules tumorales de mélanome, et les cellules endothéliales (Derre *et al.* 2006; Coupel *et al.* 2007). Les cellules tumorales de carcinome colorectal semblent également capables de produire des formes solubles de HLA-E (Levy *et al.* 2008). Les molécules HLA-E solubles ont un poids moléculaire d'environ 37kDa, leur production est induite ou augmentée en présence d'IFN- γ et/ou de TNF α et semble dépendre principalement de l'activité de métalloprotéases.

Des molécules HLA-G solubles sont également retrouvées dans le sérum de donneurs sains. Dans les conditions physiologiques, l'expression des molécules HLA-G est réduite à un petit nombre de types cellulaires et la production de molécules HLA-G solubles est principalement restreinte aux cellules d'origine myéloïde (Rebmann *et al.* 2003; Le Friec *et al.* 2004). Cependant, l'expression des molécules HLA-G ainsi que leur concentration sérique sont augmentées dans de nombreuses conditions pathologiques pro-inflammatoires incluant notamment les cancers et la transplantation. Ainsi, l'expression des molécules HLA-G est fréquemment induite dans le cadre de la transformation tumorale et la concentration sérique de formes solubles de HLA-G est augmentée dans le sérum de patients atteints de nombreux types de cancers (Rebmann *et al.* 2003; Rouas-Freiss *et al.* 2007; Yan 2011). D'autre part, il a été montré *in vitro* que les lymphocytes T CD4 et CD8 activés de façon allogénique pouvaient produire des molécules HLA-G solubles (Lila *et al.* 2001; Le Rond *et al.* 2004). Les molécules HLA-G sont particulièrement hétérogènes. En effet, on peut distinguer sept isoformes protéiques issues d'épissage alternatif : quatre formes membranaires, HLA-G1, HLA-G2, HLA-G3 et HLA-G4 et trois formes sécrétées, HLA-G5, HLA-G6 et HLA-G7

(Ishitani and Geraghty 1992; Fujii *et al.* 1994; Kirszenbaum *et al.* 1994). Cependant, les isoformes les plus exprimées sont celles qui correspondent à des protéines "complètes" capables de se lier à la $\beta 2m$ et à un peptide : HLA-G1 (membranaire) et HLA-G5 (soluble). Par conséquent, les molécules HLA-G sériques sont majoritairement de type HLA-G5 et HLA-G1, ces dernières étant générées par clivage protéique (Park *et al.* 2004). Ainsi, a-t-il été estimé que la concentration des molécules HLA-G1 et HLA-G5 solubles dans les sérums de donneurs sains variait entre 28 et 96ng/ml (Rebmann *et al.* 2005; Rebmann *et al.* 2007). De plus les molécules HLA-G solubles peuvent également former des multimères, liés par des ponts disulfures, qui présenteraient une activité supérieure à celles des formes monomériques (Apps *et al.* 2007; Morales *et al.* 2007; Carosella *et al.* 2008; Zhong *et al.* 2009).

4.2 Valeur pronostique/diagnostique des molécules HLA-I solubles

Des molécules HLA-I solubles sont retrouvées dans les sérums des individus sains à des concentration stables (environ 1 μ g/ml), mais également dans de nombreux fluides corporels tels que les urines (Singh *et al.* 1987), la bile (Pollard *et al.* 1989), le liquide synovial (Stevenson *et al.* 1990), le liquide séminal (Koelman *et al.* 2000), le liquide amniotique, le liquide céphalo-rachidien, la sueur (Zavazava *et al.* 1994), les ascites et les effusions pleurales (Amirghofran *et al.* 2002).

Les concentrations sériques des molécules HLA-I totales ne semblent pas être affectées par l'âge ou le sexe, mais peuvent varier en fonction du génotype HLA des individus. Ainsi, les haplotypes HLA-A*09/23/24/29/33 sont associés à des taux plus élevés de molécules HLA-I circulantes (Pellegrino *et al.* 1974; Dobbe *et al.* 1988; Doxiadis *et al.* 1989; Adamashvili *et al.* 1996). De façon similaire, les concentrations sériques des molécules HLA-G solubles ne varient pas en fonctions du sexe (Rebmann *et al.* 1999) mais sont influencées par le génotype HLA-G des individus, les variants polymorphiques de cette molécule présentant des niveaux d'expression variables (Rebmann *et al.* 2001; Hviid *et al.* 2004; Chen *et al.* 2008).

Si, chez les donneurs sains, les concentrations des molécules HLA-I solubles sont relativement stables, celles-ci peuvent être modifiées dans des contextes physio-pathologiques

variés tels que la grossesse, les maladies auto-immunes, la transplantation, les infections virales ou encore la transformation tumorale. De plus, de nombreuses études ont montré que leur niveau d'expression pouvait être corrélée avec la progression et la survie des patients atteints des pathologies diverses.

4.2.1 Maladies auto-immunes et inflammatoires

Le taux des molécules HLA-I (totales ou classiques) solubles est fréquemment augmenté de façon significative dans le sérum, le liquide céphalo-rachidien et/ou le liquide synovial de patients atteints de troubles auto-immuns ou inflammatoires tels que les lupus érythémateux systémiques (Hagihara *et al.* 1993; Tsuchiya *et al.* 1996; Adamashvili *et al.* 2003), les scléroses multiples (Filaci *et al.* 1997; Fainardi *et al.* 2006), les polyarthrites rhumatoïdes (Stevenson *et al.* 1990; Adamashvili *et al.* 1995; Verbruggen *et al.* 2006) et les hépatites chroniques (Sakaguchi *et al.* 1992; Hagihara *et al.* 1997). Cette augmentation est probablement liée à l'état inflammatoire induit lors du développement de ces pathologies et il a été montré dans les lupus qu'elle était associée au développement de formes plus agressives chez les patientes d'haplogroupe HLA-A24 (Adamashvili *et al.* 2003).

Concernant les molécules non classiques, la concentration sérique des molécules HLA-G solubles augmente chez les patients atteints de sclérose multiple (Fainardi *et al.* 2003; Fainardi *et al.* 2006), de maladie cœliaque (Torres *et al.* 2006) et de septicémie (Monneret *et al.* 2007) tandis qu'elle diminue chez ceux atteints d'arthrite (arthrite rhumatoïde, arthrite idiopathique juvénile et spondylarthrite ankylosante) (Verbruggen *et al.* 2006; Chen *et al.* 2010; Prigione *et al.* 2011). En outre, les patients présentant de faibles taux des molécules HLA-G sont plus prédisposés au développement d'arthrite juvénile idiopathique et, lors de septicémies, l'augmentation du taux des molécules HLA-G sériques est associée positivement avec la survie des patients. Aussi, a-t-il été proposé que de faibles concentrations de molécules HLA-G solubles puissent favoriser l'incidence de troubles auto-immuns et qu'à l'inverse, l'augmentation de leur production puisse constituer un mécanisme de rétrocontrôle visant à rétablir la tolérance immunitaire et/ou à diminuer l'inflammation.

Par ailleurs, il a été montré que les molécules HLA-E solubles étaient augmentées significativement dans les sérums de patient atteint de la maladie de Kawasaki (vascularite

systémique infantile) (Lin *et al.* 2009) et leur niveau semble corrélérer avec l'activité de la maladie dans les micro-vascularites (granulomatose avec polyangéite de Wegener) associées aux auto-anticorps ANCA (Anti-Neutrophil Cytoplasmic Autoantibodies) (Coupel *et al.* 2007). Il est probable que l'augmentation du taux des molécules HLA-E sériques soit la conséquence de l'activation des cellules endothéliales en présence de cytokines pro-inflammatoires.

4.2.2 Maladies Infectieuses

Le développement et le contrôle immunitaire des pathologies infectieuses sont généralement associés à la production de cytokines pro-inflammatoires visant notamment à augmenter l'expression des molécules HLA-I à la membrane des cellules infectées. En outre, les taux sériques des molécules HLA-I, classiques ou non, sont augmentés significativement chez les individus infectés par le HIV (Ferreira *et al.* 1988; Puppo *et al.* 1990; Puppo *et al.* 1994; Murdaca *et al.* 2009; Huang *et al.* 2010), le HCV (Puppo *et al.* 1995; Weng *et al.* 2011), l'Hantaan Virus (un Hantavirus responsable de fièvres hémorragiques) (Park *et al.* 1997), le HBV (Shi *et al.* 2011) et chez les patients atteints de tuberculose (Inostroza *et al.* 1997). De plus, cette augmentation est corrélée avec la progression de la maladie chez les patients sidaïques et chez ceux infectés par l'Hantaan virus mais également avec le développement de syndromes méningés chez les patients infectés par le virus varicelle-zona (Alvarez-Cermeno *et al.* 1989).

4.2.3 Cancers

La transformation tumorale est fréquemment associée à une altération de l'expression des molécules du CMH et de nombreuses tumeurs présentent, notamment, la capacité de produire des molécules HLA-I solubles, classiques ou non, et ce surtout en présence de cytokines pro-inflammatoires. Ainsi, la concentration des molécules HLA-I et/ou HLA-G solubles est augmentée dans le sérum des patients atteints de nombreux types de cancers solides et liquides (**Tableau 9**). Cette augmentation est encore plus marquée chez les patients atteints de mélanome et traité par de l'IFN- α recombinant (Ugurel *et al.* 2001).

**Tableau 9 : Valeur diagnostique et/ou pronostique des molécules HLA-I/HLA-G
sériques chez les patients atteints de cancer**

Cancer	Valeur diagnostique/pronostique des molécules sériques		Références
Cancers du pancréas	sHLA-I	Augmentation significative chez les patients	Shimura <i>et al.</i> 2001
Cancers du sein	sHLA-G	Augmentation significative chez les patients Diagnostic des sous types histologiques	Rebmann <i>et al.</i> 2003, Provatopoulou <i>et al.</i> 2012
Cancers de l’ovaire	sHLA-G	Augmentation significative chez les patients	Rebmann <i>et al.</i> 2003
Cancers du rein	sHLA-G	Augmentation significative chez les patients	Li <i>et al.</i> 2009
Cancers colorectaux	sHLA-G	Augmentation significative chez les patients Diagnostic des lésions malignes / bénignes	Cao <i>et al.</i> 2011, Zhu <i>et al.</i> 2011
Cancers du poumon	sHLA-I & sHLA-G	Augmentation significative chez les patients Corrélation négative avec la survie globale	Schutt <i>et al.</i> 2010, Cao <i>et al.</i> 2011
Cancers gastriques	sHLA-G	Augmentation significative chez les patients	Cao <i>et al.</i> 2011
Cancers de l’oesophage	sHLA-G	Augmentation significative chez les patients	Cao <i>et al.</i> 2011
Mélanomes	sHLA-G	Augmentation significative chez les patients Corrélation positive avec la progression tumorale	Ugurel <i>et al.</i> 2001, Rebmann <i>et al.</i> 2003
Glioblastomes	sHLA-G	Corrélation négative avec la survie	Rebmann <i>et al.</i> 2003
Neuroblastomes	sHLA-G	Augmentation significative chez les patients Corrélation positive avec le risque de rechute	Morandi <i>et al.</i> 2007
Leucémies	sHLA-I	Augmentation significative chez les patients atteints de leucémie myéloïde Corrélation négative avec la survie dans les leucémies myéloïdes aiguës	Hillebrand <i>et al.</i> 1994, Albitar <i>et al.</i> 2007
	sHLA-G	Augmentation significative chez les patients atteints de leucémies	Rebmann <i>et al.</i> 2003, Sebti <i>et al.</i> 2003, Gros <i>et al.</i> 2006, Sebti <i>et al.</i> 2007
Lymphomes	sHLA-I	Augmentation significative chez les patients Corrélation négative avec la survie dans les lymphomes non hodgkiniens	Nocito <i>et al.</i> 1997, Albitar <i>et al.</i> 2007
	sHLA-G	Augmentation significative chez les patients	Sebti <i>et al.</i> 2003, Sebti <i>et al.</i> 2007
Myélomes	sHLA-I	Augmentation significative chez les patients Corrélation positive avec la progression tumorale Corrélation négative avec la survie	Leleu <i>et al.</i> 2005
	sHLA-G	Augmentation significative chez les patients	Leleu <i>et al.</i> 2005, Wlasiuk <i>et al.</i> 2012

De façon intéressante, l'augmentation des molécules HLA-I solubles est associée à la progression tumorale et/ou à une réduction de la survie dans de nombreux cancers. Ainsi la progression tumorale est corrélée positivement avec les niveaux sériques des molécules HLA-I dans les myélomes multiples (Leleu *et al.* 2005) et des molécules HLA-G dans les mélanomes (Ugurel *et al.* 2001). De plus, les taux sériques des molécules HLA-I et/ou -G sont corrélés positivement avec le risque de rechute dans les neuroblastomes (Morandi *et al.* 2007) et négativement avec la survie des patient atteints de glioblastome (Rebmann *et al.* 2003), de cancer du poumon (Schutt *et al.* 2010), de myélome multiple (Leleu *et al.* 2005), de leucémie myéloïde aigue (Albitar *et al.* 2007) et de lymphome non hodgkinien (Albitar *et al.* 2007). Il a également été montré que les niveaux sériques des molécules HLA-G solubles permettaient le diagnostic différentiel entre les lésions malignes et les lésions bénignes dans le cancer colorectal (Zhu *et al.* 2011) et entre les sous-types histologiques des cancers du sein (Provatopoulou *et al.* 2012).

Des molécules HLA-I solubles sont également retrouvées fréquemment dans les effusions pleurales et péritonéales malignes (Amirghofran *et al.* 2002; Rebmann *et al.* 2003). De plus, il a été montré que la concentration des molécules HLA-G solubles permettait de différencier les ascites bénignes des ascites malignes issues de patientes atteintes de carcinome mammaire ou ovarien (Singer *et al.* 2003).

Compte tenu du fait que l'augmentation des molécules HLA-I solubles semble associée à la transformation tumorale et influencer négativement les chances de survie des patients atteints de cancer, il a été proposé que la capacité des cellules malignes ou du microenvironnement tumoral à produire des molécules HLA-I solubles soit liée au processus d'"immunoediting" des cancers favorisant le développement de tumeurs faiblement immunogènes et donc résistantes à la surveillance exercée par le système immunitaire (Tabayoyong and Zavazava 2007; Campoli and Ferrone 2008).

4.2.4 Grossesse

Au cours de la grossesse, le taux des molécules HLA-I totales et des molécules HLA-G solubles augmente progressivement dans le sérum de la mère pendant les deux premiers trimestres puis chute au cours du troisième (Inostroza *et al.* 1997; Darmochwal-Kolarz *et al.* 2012). Des molécules HLA-I et HLA-G solubles sont également retrouvées dans le liquide amniotique et dans le sang de cordon (Puppo *et al.* 1999).

Il est intéressant de constater que des molécules HLA-I solubles provenant du fœtus sont détectables dans le sang de la mère dès la 8^{ème} semaine puis tout au long de la grossesse et que ces formes solubles peuvent être complexées à des anticorps maternels (Reed *et al.* 1991). Aussi, a-t-il été proposé que les molécules HLA-I solubles allogéniques fœtales pourraient, soit jouer un rôle délétère dans la tolérance au fœtus du fait de leur immunogénicité, soit jouer un rôle bénéfique en neutralisant les anticorps maternels alloréactifs.

En revanche, les molécules HLA-G solubles sont clairement impliquées dans la protection du fœtus. En effet les molécules HLA-G solubles produites par les ovocytes fécondés puis par les cellules du trophoblaste sont indispensables au maintien de l'embryon. Ainsi la capacité des ovocytes fertilisés à produire des molécules HLA-G solubles *in vitro* est associée positivement avec leur viabilité et leur chance d'implantation *in vivo* (Sher *et al.* 2004; Noci *et al.* 2005; Sher *et al.* 2005; Sher *et al.* 2005; Yie *et al.* 2005; Rizzo *et al.* 2007; Rebmann *et al.* 2010; Heidari *et al.* 2011; Jee *et al.* 2011). Au même titre, les femmes présentant de faibles taux sériques de molécules HLA-G sont plus sujettes aux avortements spontanés récurrents lors de grossesses "normales" (Jassem *et al.* 2012) et ont un plus grand risque d'échec lors de tentatives d'inséminations assistées (Sipak-Szmigiel *et al.* 2007).

4.2.5 Transplantation

De nombreuses études ont rapporté que les concentrations des molécules HLA-I solubles dans le sérum de patients transplantés étaient augmentées, cette augmentation étant fréquemment corrélée négativement avec la survie du greffon.

Ainsi, il a été montré que, dans le cadre de transplantations d'organes solides tels que le rein (Zavazava *et al.* 1990; Yang *et al.* 1995; Borelli *et al.* 1999; Rebmann *et al.* 2009; Jin *et al.* 2012), le pancréas (Rebmann *et al.* 2009), le foie (Rhynes *et al.* 1993; Puppo *et al.* 1994; Renna Molajoni *et al.* 1995; Zarkhin *et al.* 2010), le cœur (Rhynes *et al.* 1993; Zavazava *et al.* 1993) et le poumon (DeVito-Haynes *et al.* 2000), l'augmentation post-greffe des taux sériques des molécules HLA-I totales chez les receveurs était associée positivement avec l'incidence et la sévérité des rejets aigus et/ou chroniques.

De façon similaire, la présence des molécules HLA-I solubles dans le mucus broncho-alvéolaire post-greffe est corrélée positivement avec le risque de rejet des poumons transplantés (DeVito-Haynes *et al.* 1997).

Par ailleurs, il a été montré que des molécules HLA-I solubles allogéniques pouvaient fréquemment être détectées dans le sérum des receveurs d'organes (Davies *et al.* 1989; DeVito-Haynes *et al.* 1994; DeVito-Haynes *et al.* 1996). Leur présence est également associée à une augmentation du risque de rejet du greffon chez les patients ayant reçu une greffe de rein (DeVito-Haynes *et al.* 1994) ou une double greffe rein/pancréas (DeVito-Haynes *et al.* 1994).

Enfin, l'augmentation des molécules HLA-I sériques est associée au développement de GVHD aiguës et/ou chroniques chez les patients ayant reçu une greffe de cellules souches hématopoïétiques (Tsuji *et al.* 1985; Westhoff *et al.* 1989; Puppo *et al.* 1996; Liem *et al.* 1997; Le Maux *et al.* 2008).

Si l'expression globale des molécules HLA-I solubles, allogéniques ou non, semble associée négativement avec la tolérance allogénique, en revanche celle des molécules HLA-G solubles semble jouer un rôle protecteur.

Ainsi, leur présence pré- ou post-greffe dans le sérum des patients greffés rénaux est corrélée négativement avec le risque de rejet et la production d'anticorps anti-HLA allogéniques (Qiu *et al.* 2006; Rebmann *et al.* 2009). De façon similaire, les niveaux sériques des molécules HLA-G sont corrélés négativement avec le risque de rejet chez les patients ayant reçu une greffe de cœur (Lila *et al.* 2000; Lila *et al.* 2002; Luque *et al.* 2006), de rein et/ou de foie (Creput *et al.* 2003; Basturk *et al.* 2006; Qiu *et al.* 2006) et de cellules hématopoïétiques (Le Maux *et al.* 2008; Menier *et al.* 2010).

En outre, plusieurs études ont montré que les traitements immunosuppresseurs (mycophénolate mofétil, cyclosporine A, corticoïdes et Belatacept - protéines CTLA-4 recombinantes fusionnées avec les domaines constant d'une IgG1 humaine -) induisaient une augmentation du taux sérique des molécules HLA-G chez les patients transplantés et il a été montré *in vitro* et *in vivo* que le Belatacept induisait la production des molécules HLA-G solubles par les cellules dendritiques (Luque *et al.* 2006; Bahri *et al.* 2009). Ainsi, l'effet tolérogène des traitements immunosuppresseurs pourrait notamment être lié à leur capacité à augmenter la production des molécules HLA-G solubles chez les patients transplantés.

4.3 Fonctions Immunologiques des molécules HLA-I solubles

À l'instar des formes membranaires, il semblerait que les molécules HLA-I solubles ne soient pas " inertes " mais biologiquement actives.

Suite à leur découverte, il fut très rapidement constaté que les molécules HLA-I solubles allo- ou xéno-géniques étaient immunogènes et pouvaient induire la production d'anticorps *in vivo*. Il fut alors suggéré que les molécules HLA-I solubles pourraient jouer un rôle délétère dans le cadre de transplantations et/ou de grossesses en stimulant notamment le développement de réponses humorales allogéniques (Ferrone *et al.* 1977; Pellegrino *et al.* 1982).

Cependant, de nombreuses études ont montré, par la suite, que les molécules HLA-I solubles, classiques ou non, présentaient également des propriétés immunosuppressives. Ainsi, l'utilisation de modèles murins a permis de montrer que la sensibilisation pré-greffe des animaux receveurs avec des molécules HLA-I solubles allogéniques diminuait les réponses allogéniques subséquentes et favorisait ainsi le maintien du greffon (Grumet *et al.* 1994; Hunziker *et al.* 1997; Geissler *et al.* 2000; Behrens *et al.* 2001). Aussi, plusieurs études ont suggéré l'implication des molécules HLA-I solubles dans l'effet protecteur des transfusions sanguines pré-greffe sur la survie et la tolérance des greffons (Ghio *et al.* 2008; Ghio *et al.* 2010). De fait, il a ensuite été démontré que les molécules HLA-I solubles, en interagissant avec les récepteurs NK, T ou avec les corécepteurs CD8, pouvaient affecter la fonctionnalité de nombreux acteurs des réponses immunes à médiation cellulaire. L'expression des molécules HLA-I solubles étant induite ou augmentée dans de nombreux contextes pro-inflammatoires, elles pourraient donc constituer un mécanisme de rétrocontrôle participant à limiter l'ampleur des réponses immunitaires. Ainsi, elles pourraient non seulement jouer un rôle bénéfique non négligeable dans la tolérance immunitaire au soi et au non-soi, mais également contribuer à l'échappement tumoral à la surveillance exercée par le système immunitaire.

Par ailleurs, les molécules HLA-I solubles pourraient également être impliquées dans les processus d'angiogénèse. En effet, les molécules HLA-G solubles, via leur interaction avec les molécules CD160, inhibent la prolifération et la migration des cellules endothéliales (Fons *et al.* 2006; Le Bouteiller *et al.* 2007).

4.3.1 Inhibition des fonctions effectrices des cellules NK et T

Plusieurs études montrent que les molécules HLA-I solubles, classiques ou non, peuvent diminuer l'activité cytotoxique et la production de cytokines des cellules NK et des lymphocytes T *in vitro*.

Ainsi, il a été montré que les molécules HLA-Ia solubles recombinantes ou naturelles (provenant de sérums humains ou de surnageants de culture cellulaire) diminuaient l'activité cytotoxique et la réponse cytokinique (IFN- γ , TNF- α et IL-2) des cellules NK et T $\alpha\beta$ CD8 stimulées de façon allogénique ou spécifique. Cette inhibition semble liée à l'engagement, par les molécules HLA-I solubles, des récepteurs de type NK et/ou des corécepteurs CD8 exprimés à la surface des cellules NK et T CD8 (Carbone *et al.* 1996; Gansuud *et al.* 2000; Contini *et al.* 2003; Ghio *et al.* 2009). De plus, il a été montré que l'interaction de molécules HLA-A/-B/-C solubles avec le corécepteur CD8 de cellules NK induisait la production de la cytokine immunosuppressive TGF- β 1 (Ghio *et al.* 2009).

Les molécules HLA-Ib solubles peuvent également inhiber les fonctions effectrices des cellules T et NK en interagissant avec les récepteurs NK inhibiteurs associés. Ainsi, les molécules HLA-E solubles produites par les cellules endothéliales activées peuvent diminuer la susceptibilité de ces cellules à la lyse par les effecteurs NK, de façon dépendante des récepteurs CD94/NKG2-A *in vitro* (Coupel *et al.* 2007). De façon similaire, les molécules HLA-G solubles peuvent diminuer l'activité cytotoxique et la production de cytokines par les cellules NK, T $\alpha\beta$ CD8 et CD4 et T $\gamma\delta$ *in vitro* en se liant aux récepteurs NK inhibiteurs ILT-2 et/ou KIR2DL4 (Contini *et al.* 2003; Park *et al.* 2004; Mitsdoerffer *et al.* 2005; Bahri *et al.* 2006; Lindaman *et al.* 2006; Lesport *et al.* 2011). L'inhibition de la lyse des cellules tumorales exprimant les molécules HLA-G5 semble notamment liée à un défaut de polarisation des granules cytotoxiques dans les cellules NK (Lesport *et al.* 2009). De plus, il a été montré que les cellules T naïves sensibilisées en présence des molécules HLA-G5 solubles devenaient anergiques (Le Rond *et al.* 2006).

4.3.2 Induction de l'apoptose des cellules NK et T

Il a également été proposé que les molécules HLA-I solubles inhibent le développement des réponses immunes en induisant la mort cellulaire des effecteurs T et NK.

En effet, de nombreuses études ont montré que les molécules HLA-I solubles, classiques ou non et de type recombinantes ou "naturelles", induisaient la mort par apoptose des cellules $T\alpha\beta$, $T\gamma\delta$ et NK *in vitro* (Zavazava and Kronke 1996; Contini *et al.* 2000; Gansuud *et al.* 2000; Puppo *et al.* 2000; Spaggiari *et al.* 2002; Contini *et al.* 2003; Poggi *et al.* 2005). Dans la majorité des cas, l'effet pro-apoptotique observé semble principalement lié à l'augmentation de l'expression des molécules Fas-L membranaires et solubles par les cellules lymphoïdes incubées en présence des molécules HLA-I solubles, conduisant à la lyse fratricide des cellules Fas⁺. La plupart des travaux publiés associent l'effet pro-apoptique des molécules HLA-I solubles, classiques ou non, à leur capacité à interagir avec les corécepteurs CD8, bien que leur liaison aux récepteurs NK activateurs puisse également être impliquée (Spaggiari *et al.* 2002). L'interaction des molécules HLA-I solubles avec les co-récepteurs CD8 exprimés par des cellules T se traduit par le recrutement et l'activation des protéines tyrosine kinases p56lck et ZAP-70, de la voie de signalisation dépendante du calcium et des facteurs nucléaires NF-AT et NF- κ B, ce qui conduirait notamment à augmenter l'activité transcriptionnelle de FasL (Contini *et al.* 2005).

Ainsi, ce mécanisme pourrait favoriser l'élimination des cellules allo- ou auto-réactives et jouer un rôle protecteur dans la tolérance au greffon et au soi. En revanche, la capacité des cellules tumorales à produire des molécules HLA-I solubles pourrait favoriser la suppression des effecteurs immuns anti-tumoraux et donc jouer un rôle néfaste chez les patients atteints de cancer. Cependant, il a été proposé qu'elle pourrait également contribuer à l'élimination des cellules tumorales leucémiques exprimant les récepteurs appropriés *in vivo* (Contini *et al.* 2007).

4.3.3 Inhibition de la prolifération des cellules T et B

Les molécules HLA-G solubles peuvent également limiter le développement des réponses immunitaires en diminuant l'activité proliférative des cellules T et B.

Ainsi, plusieurs groupes, dont celui du Dr Nathalie Rouas-Freiss, ont montré *in vitro* que les molécules HLA-G solubles inhibaient la réponse proliférative, allogénique ou non, des cellules T CD4 et CD8 exprimant le récepteur inhibiteur ILT-2 (Lila *et al.* 2001; Le Rond *et al.* 2004; Le Rond *et al.* 2005; Mitsdoerffer *et al.* 2005; Le Rond *et al.* 2006).

Concernant les mécanismes impliqués, une étude a montré que l'activation de cellules T en présence de molécules HLA-G5 était associée à une diminution de l'expression des cyclines régulant la transition entre les phases du cycle cellulaire G₁-S et S-G₂ ainsi qu'à une augmentation de l'activation de la kinase p27^{kip1} qui inhibe la progression dans le cycle cellulaire (Bahri *et al.* 2006). L'inhibition des réponses T allo-prolifératives par les molécules HLA-G solubles semble également dépendante de la voie Fas/Fas-L, l'utilisation d'anticorps bloquants anti-Fas-L permettant de restituer les capacités prolifératives des lymphocytes T activés en présence des molécules HLA-G solubles (Naji *et al.* 2007).

De plus, il a récemment été montré que les molécules HLA-G5 plasmatiques étaient également capables d'inhiber la prolifération de cellules B néoplasiques ILT-2⁺ *in vitro*, suggérant qu'elles pourraient également limiter la progression tumorale dans le cadre de tumeur d'origine hématopoïétique (Naji *et al.* 2012).

4.3.4 Inhibition de la chimotaxie des cellules T

Plus récemment, il a été proposé que les molécules HLA-G solubles puissent moduler les réponses T immunes en modifiant l'expression des récepteurs aux chimiokines à la surface des cellules T. En effet les cellules T $\alpha\beta$, CD4 et CD8, et T $\gamma\delta$ stimulées *ex vivo* en présence de molécules HLA-G solubles "downrégulent" l'expression de nombreux récepteurs aux chimiokines (CCR2, CXCR3 et CXCR5), ce qui inhibe leur capacité à migrer par chimiotactisme *in vitro* (Morandi *et al.* 2010). Aussi, ces observations suggèrent que les molécules HLA-G solubles puissent également diminuer l'efficacité des réponses T en limitant leur recrutement aux sites inflammatoires.

4.3.5 Induction de cellules T suppressives et de cellules dendritiques tolérogènes

Si les molécules HLA-G solubles peuvent altérer directement l'activité et le recrutement des effecteurs immuns T, B et NK, elles peuvent également inhiber leur fonction de manière indirecte, en induisant le développement de cellules T suppressives et en altérant la maturation des cellules présentatrices d'antigènes.

Les travaux du groupe de Nathalie Rouas-Freiss ont montré que des cellules T régulatrices pouvait être induites *in vitro* en présence de la molécule HLA-G5 soluble (Le Rond *et al.* 2006). Ces cellules n'expriment pas le facteur de transcription Foxp3 caractéristique de nombreuses cellules T régulatrices et présentent un profil CD3⁺CD4^{low} ou CD3⁺CD8^{low}. Elles ne sont pas capables de proliférer en réponse à une stimulation allogénique et inhibent l'alloréactivité des cellules T autologues de façon dépendante des facteurs solubles tels que l'IL-10. De façon intéressante, ces cellules sont retrouvées dans le sang des patients transplantés et leur présence est corrélée avec une meilleure tolérance au greffon (Naji *et al.* 2007). De plus, la production de HLA-G5 par les cellules souches mésenchymateuses contribuerait également à l'expansion des lymphocytes T régulateurs "classiques" CD4⁺CD25^{high}FOXP3⁺ allostimulés (Selmani *et al.* 2008).

Les cellules d'origine myéloïde expriment également les récepteurs inhibiteurs ILT-2 et ILT-4, spécifiques des molécules HLA-G. Ainsi, il a été montré *in vitro* que les cellules dendritiques différenciées à partir de monocytes et maturées en présence de molécules HLA-G solubles exprimaient plus faiblement les marqueurs de différenciation CD80 et HLA-DR en surface et produisaient moins d'IL-12. Par conséquent, les cellules NK autologues incubées en présence des ces cellules dendritiques présentent un niveau plus faible d'activation caractérisé par une diminution de leur réponse cytotoxique et de leur capacité à produire de l'IFN- γ (Gros *et al.* 2008). De plus, les cellules dendritiques jouant un rôle crucial dans l'activation et la polarisation des réponses effectrices adaptatives, les molécules HLA-G soluble pourraient contribuer indirectement à limiter le développement des réponses immunitaires T en altérant la maturation des cellules présentatrices d'antigènes.

Objectifs

Ce projet s'inscrit dans la thématique de l'équipe du Dr Nathalie Labarrière du Centre de Recherche en Cancérologie Nantes Angers (CRCNA), qui concerne l'analyse de la fonction, la spécificité et la régulation des lymphocytes T associés aux tumeurs en vue de leur utilisation en immunothérapie.

Ayant observé qu'une fraction significative (environ un tiers) des clones T CD8⁺ anti-mélanome exprime le récepteur NKR inhibiteur CD94/NKG2-A et que celui-ci est fonctionnel, notre équipe a étudié l'expression de son ligand : HLA-E par les mélanomes. Nous avons montré, *in vivo* et *in vitro*, que les mélanomes exprimaient des molécules HLA-E à leur membrane (Derre *et al.* 2006). D'un point de vue fonctionnel, plusieurs équipes, dont la nôtre, ont montré *in vitro* l'inhibition de la réponse anti-tumorale innée (cellules NK) et adaptative (lymphocytes T CD8⁺) après engagement du CD94/NKG2-A (Le Drean *et al.* 1998; Speiser *et al.* 1999; Derre *et al.* 2006). De fait, la capacité des mélanomes à exprimer les molécules HLA-E pourrait donc limiter la capacité des effecteurs immuns anti-tumoraux à éradiquer les tumeurs *in vivo*.

De façon intéressante, nous avons également observé, *in vitro*, qu'une majorité des cellules de mélanomes produisaient spontanément une forme soluble de la molécule HLA-E. Il a été montré que la production de molécules HLA-I solubles par les cellules tumorales pouvait constituer un mécanisme alternatif d'échappement tumoral à la surveillance exercée par le système immunitaire (Tabayoyong and Zavazava 2007; Campoli and Ferrone 2008). Aussi, un des objectifs de ce travail était de mieux caractériser la capacité des cellules tumorales à produire ces molécules HLA-E solubles. De plus, plusieurs études ayant montré la valeur pronostique des molécules HLA-I solubles sériques chez les patients atteints de cancer, nous avons étudié celle des molécules HLA-E solubles chez les patients atteints de mélanome. Enfin, nous avons également cherché à évaluer les éventuelles propriétés immunologiques des molécules HLA-E solubles vis-à-vis des lymphocytes T anti-tumoraux exprimant les récepteurs NK CD94/NKG2-A.

Par ailleurs, dans le cadre d'un projet collaboratif avec l'équipe du Dr Béatrice Charreau de l'Institut de Transplantation Urologie-Néphrologie (ITUN) de Nantes, nous avons caractérisé la réactivité vis-à-vis de cellules endothéliales allogénique des lymphocytes T CD8 restreintes par la molécules HLA-E et induites par l'infection à CMV chez un patient transplanté rénal. De plus, compte tenu du fait que les cellules endothéliales peuvent également produire des formes solubles des molécules HLA-E et ce, surtout en présence de cytokines pro-inflammatoires, nous avons également étudié leurs propriétés fonctionnelles vis-à-vis des cellules T CD8 restreintes par la molécule HLA-E.

Résultats

1. Implication des molécules HLA-E solubles en cancérologie

Notre groupe a observé que les cellules de mélanome pouvaient produire des formes solubles de la molécule HLA-E (HLA-Es) *in vitro* (Brevet INSERM N° EP04 293 023.0 (2004), B. Charreau, S. Coupel, N. Gervois, L. Derré, et F. Jotereau "Production de HLA-E soluble par les cellules endothéliales et les lignées de mélanome activées : un nouveau marqueur et une molécule immunorégulatrice"). Aussi, nous avons voulu mieux documenter la capacité des cellules tumorales à produire des molécules HLA-Es *in vitro* et déterminer leur éventuelle valeur pronostique chez les patients atteints de mélanome. De plus, nous avons également cherché à évaluer leurs propriétés fonctionnelles vis-à-vis de lymphocytes T spécifiques d'antigènes de tumeur et exprimant des récepteurs CD94/NKG2-A.

1.1 Production des molécules HLA-E solubles par les cellules tumorales et détection dans les sérums de patients atteints de mélanome

Les molécules HLA-E sont exprimées à la membrane de tumeurs d'origines histologiques variées *in vitro* et *in vivo*. Ainsi, dans un premier temps, nous avons voulu tester la capacité de lignées tumorales d'origines variées à produire des molécules HLA-Es *in vitro* et évaluer l'impact de diverses cytokines sur cette production. Nous avons également recherché leur présence dans le sérum de patients atteints de mélanome. En effet, leur niveau ou leur évolution pourrait corrélérer avec des facteurs de bon ou de mauvais pronostic ou encore être un marqueur de la capacité de réponse à des immunothérapies.

Afin de pouvoir quantifier les molécules HLA-Es dans des échantillons biologiques, nous avons mis au point un test ELISA permettant de détecter spécifiquement les molécules HLA-Es dans les surnageants de culture cellulaire et les sérums. Grâce à ce test, nous avons montré :

- la production, *in vitro*, de cette forme soluble par de nombreux types tumoraux

Nous avons recherché la présence des molécules HLA-Es dans les surnageants de culture de 98 lignées tumorales d'origines histologiques variées : mélanomes (n=30), carcinomes (poumon n=5, colorectum n=12, rein n=10, ovaire n=3, sein n=11 et prostate n=3), cancer de

la thyroïde (n=1), cancer de l'utérus (n=1), ostéosarcomes (n=3), gliomes (n=2) et tumeurs liquides (mésothéliomes n=7, myélomes n=7 et leucémies n=3). La présence de HLA-Es a été détectée dans le surnageant de culture de lignées tumorales d'origines variées, à l'exception des tumeurs de l'ovaire, des myélomes, des leucémies et des gliomes. Ainsi, sur les 98 lignées testées, 24,5% produisent spontanément la molécule HLA-Es (24/98) et 49% en produisent en présence d'IFN- γ (48/98).

- la régulation positive de cette production en présence de cytokines pro-inflammatoires : IFN- α , IFN- γ et TNF- α

- une augmentation significative de la présence de cette molécule dans les sérums de patients atteints de mélanome (n=127) en comparaison avec des donneurs sains (n=94)

Ces résultats ont fait l'objet d'une publication dans le journal PLoS ONE en 2011, publication présentée ci-après (**Article 1**).

D'autre part, ces travaux nous ont conduits à établir une collaboration avec le Dr Anne Caignard (UMR 1016 INSERM / 8104 CNRS / Université Paris Descartes, Institut Cochin, Paris). Notre participation a consisté à rechercher la présence de HLA-Es dans le sérum de patients atteints de mélanome métastatique et traités, ou non, par chimiothérapies, ainsi que dans les surnageants de lignées tumorales de carcinomes rénaux mutés, ou non, pour le gène suppresseur de tumeur VHL (Von Hippel Lindau). Ces travaux m'ont permis d'être associée à deux publications présentées en annexe :

- *"Unique functional status of natural killer cells in metastatic stage IV melanoma patients and its modulation by chemotherapy"* Fregni G, Perier A, Pittari G, Jacobelli S, Sastre X, Gervois N, Allard M, Bercovici N, Avril MF, Caignard A. Clin Cancer Res. 2011 (**Annexe 1**).

- *"Mutations of the von Hippel-Lindau gene confer increased susceptibility to natural killer cells of clear-cell renal cell carcinoma"* Perier A, Fregni G, Wittnebel S, Gad S, Allard M, Gervois N, Escudier B, Azzarone B, Caignard A. Oncogene. 2011 (**Annexe 2**)

Serum Soluble HLA-E in Melanoma: A New Potential Immune-Related Marker in Cancer

Mathilde Allard^{1,2}, Romain Oger^{1,2}, Virginie Vignard¹, Jean-Michel Percier¹, Giulia Fregni³, Aurélie Périer³, Anne Caignard³, Béatrice Charreau⁴, Karine Bernardeau⁵, Amir Khammari^{1,6,7}, Brigitte Dréno^{1,6,7}, Nadine Gervois^{1,2*}

1 UMR INSERM, U892, Nantes, France, **2** University Nantes, Faculté des Sciences, Nantes, France, **3** Institut Cochin, University Paris Descartes, INSERM U1016, CNRS UMR 8104, Paris, France, **4** UMR INSERM, U643, Nantes, France, **5** Recombinant protein production facility of the IFR 26, Nantes, France, **6** Unit of Skin Cancer, Centre Hospitalier Universitaire de Nantes, Nantes, France, **7** GMP Unit of Cellular Therapy, Centre Hospitalier Universitaire de Nantes, Nantes, France

Abstract

Background: Tumor-derived soluble factors, including soluble HLA molecules, can contribute to cancer immune escape and therefore impact on clinical course of malignant diseases. We previously reported that melanoma cells produce, *in vitro*, soluble forms of the non-classical MHC class I molecule HLA-E (sHLA-E). In order to investigate sHLA-E production by various tumors and to address its potential value as a tumor-associated marker, we developed a specific ELISA for the quantification of sHLA-E in biological fluids.

Methodology/Principal Findings: We developed a sHLA-E specific and sensitive ELISA and we showed that serum sHLA-E levels were significantly elevated ($P < 0.01$) in melanoma patients ($n = 127$), compared with healthy donors ($n = 94$). sHLA-E was also detected in the culture supernatants of a wide variety of tumor cell lines ($n = 98$) including melanomas, kidney, colorectal and breast cancers. Cytokines regulation of sHLA-E production by tumor cells was also carried out. IFN- γ , IFN- α and TNF- α were found to upregulate sHLA-E production by tumor cells.

Conclusions/Significance: In view of the broad tumor tissue release of HLA-E and its up-regulation by inflammatory cytokines, sHLA-E should be studied for its involvement in immune responses against tumors. Interestingly, our results demonstrated a positive association between the presence of serum sHLA-E and melanoma. Therefore, the determination of sHLA-E levels, using ELISA approach, may be investigated as a clinical marker in cancer patients.

Citation: Allard M, Oger R, Vignard V, Percier J-M, Fregni G, et al. (2011) Serum Soluble HLA-E in Melanoma: A New Potential Immune-Related Marker in Cancer. PLoS ONE 6(6): e21118. doi:10.1371/journal.pone.0021118

Editor: Jacques Zimmer, Centre de Recherche Public de la Santé (CRP-Santé), Luxembourg

Received: May 10, 2011; **Accepted:** May 19, 2011; **Published:** June 21, 2011

Copyright: © 2011 Allard et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Funding: This work was supported by grants awarded by the "Ligue Nationale contre le Cancer" (labellisation 2007). The funder has no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

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

* E-mail: ngervois@nantes.inserm.fr

Introduction

Evidences accumulated demonstrate the ability of the immune system to identify and destroy malignant cells, in order to prevent tumor development. This process called cancer immunosurveillance, is based on the joined action of the effectors of innate (NK, NKT cells, $\gamma\delta$ T cells, and dendritic cells) and adaptive (antigen-specific T and B cells) immunity to sense and eradicate nascent-transformed cells. However, despite the existence of well-defined immunogenic tumor antigens, and even in the presence of tumor-antigen-specific cytotoxic T cells, the immune system does not seem to be fully effective in eradicating tumors [1].

Several mechanisms have been implicated in tumor immune escape, including structural and functional alterations of the Human Leukocyte Antigens (HLA), which represent frequent events in cancers. This include classical HLA class I antigen (HLA-A, -B, -C) loss or downregulation and aberrant expression of non-classical HLA class I antigens (HLA-E, -G), providing mechanisms leading to a decrease in recognition and destruction of tumor cells by immune cytotoxic effectors (mainly CTL and NK cells) [2].

Interest in non-classical HLA molecules has been stimulated by the demonstration that they may contribute to NK and T cell tumor cell escape through their interaction with NK inhibitory receptors [3–6]. Furthermore, production of non-cell bound soluble HLA (sHLA) molecules has also been described and may represent an alternative strategy for cancer immune escape [7,8]. In support of this hypothesis, sHLA molecules have been shown to induce *in vitro* inhibition and/or apoptosis of CTL and NK [9,10]. Moreover, increased serum levels of classical and non-classical sHLA have been described in several malignant diseases, and their prognostic relevance is suggested by statistically significant association with high stage disease or with particular clinical course in various malignancies [11].

We previously observed, in collaboration with pathologists, a frequent expression of HLA-E by melanomas and colon carcinomas [12]. Studies from our group and others supported an immunosuppressive potential of this expression, through engagement of the CD94/NKG2A inhibitory NKR on cytotoxic cells (NK and CD8 TIL) by tumor cell membrane HLA-E [13–16]. We also reported that melanoma cell lines can produce

soluble forms of HLA-E (sHLA-E) *in vitro*, by protease dependant shedding of surface molecules, and that this production was increased by IFN- γ [12].

The aim of the present project was to develop an ELISA assay for the detection and the quantification of sHLA-E in biological fluids, to validate its specificity and, if adequate, to address the clinical significance of sHLA-E levels in the blood of melanoma patients.

Results

Development of an HLA-E specific ELISA

To detect and quantify sHLA-E in biological samples, we develop a sandwich ELISA using noncompeting solid capture and biotinylated detection anti-HLA-E monoclonal antibodies MEM-E/08 and MEM-E/07 respectively. First a concentration range of a purified recombinant soluble HLA-E (rsHLA-E) was tested. As shown on Figure 1A, rsHLA-E was detected at a minimum concentration of 5 pg/ml. Given the reported cross-reactivity of both anti-HLA-E Abs with four HLA class Ia allelic forms: HLA-A23, -B7, -B8 and -B27, we then checked their detection using our designed ELISA assay. Among recombinant soluble HLA-A23,

-B7, -B8 and -B27 as well as rsHLA-A2 used as negative control, only a weak signal was obtained with rsHLA-B7 at the maximal dose 20 ng/ml (Fig. 1B).

These results led to the conclusion that the sandwich ELISA described here is highly specific and sensitive for HLA-E and could be used as a screening method for the detection of sHLA-E in biological samples.

Increased soluble HLA-E in sera of melanoma patients

We screened sera from 94 healthy donors and 127 melanoma patients without current therapy for the presence of sHLA-E (Table 1). We detected sHLA-E in serum samples from both healthy and patient donors in a dilution-dependent manner (Fig. 2A) demonstrating that this ELISA could be used to quantify sHLA-E in sera samples. Considering the possible incidence of age and the gender, no significant differences in sHLA-E levels were observed (data not shown). The individual values of serum sHLA-E are presented on a dot-plot using a log scale (Fig. 2B) and means, medians and ranges are indicated on Table 2.

In melanoma patients, serum levels of sHLA-E (median [range]) were significantly increased compared with those in healthy

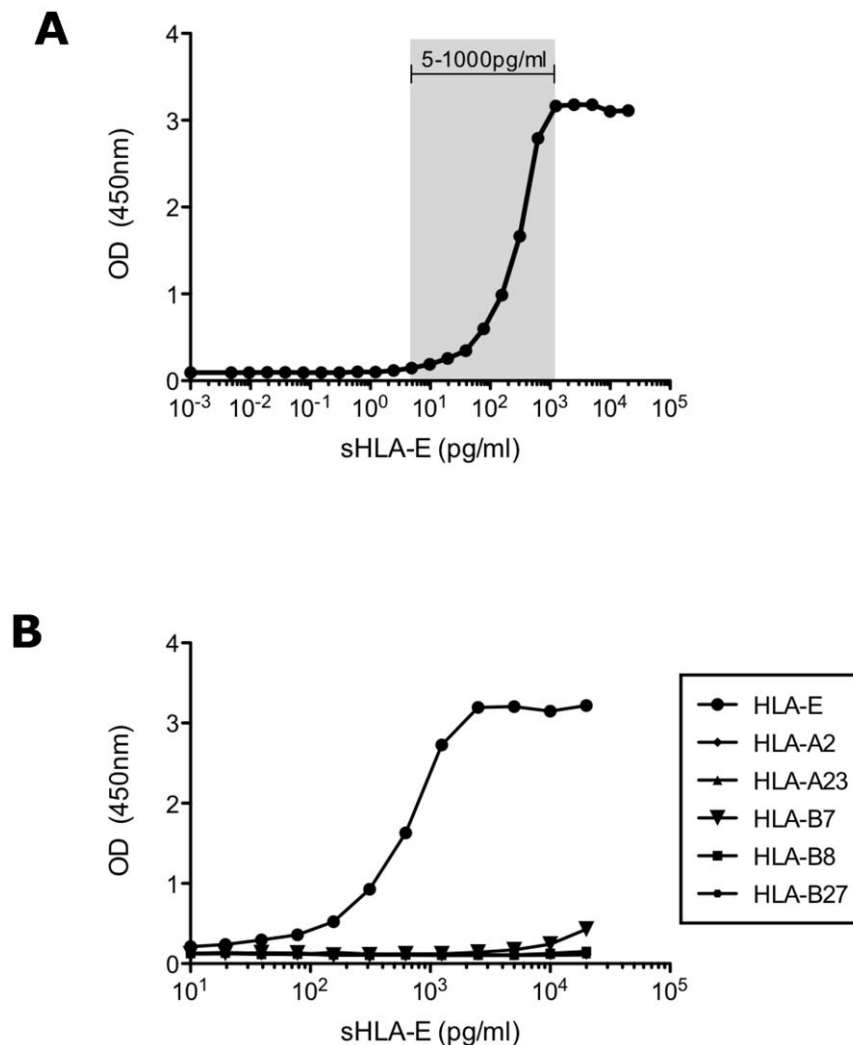


Figure 1. Sensitivity and specificity of sHLA-E ELISA. A/ Detection of sHLA-E using serial dilutions of recombinant HLA-E monomer. The grey area indicates the range of measurable sHLA-E levels. B/ Determination of the HLA-E binding specificity. Serial dilutions of HLA-A2, -A23, -B7, -B8 and -B27 recombinant soluble monomers have been tested in comparison with recombinant HLA-E monomer.
doi:10.1371/journal.pone.0021118.g001

Table 1. Characteristics of healthy donors and melanoma patients studied.

	N° of cases	Age			Gender	
		Mean	Median	Range	Male	Female
Healthy donors	94	42.5	44	19–67	46	48
Melanoma patients	127	55	54.5	20–88	81	46

doi:10.1371/journal.pone.0021118.t001

controls (9 pg/ml [0–2544] vs 0 pg/ml [0–1224], respectively, $p < 0.001$). To quantify the frequency of sHLA-E-positive sera, we take a cut-off value of 5 pg/ml. This analysis revealed that in the group of 94 healthy donors, sHLA-E could be detected in 30 sera (31.9% of total). In contrast, in melanoma patients, 68 out of 127 sera (53.5% of total) contained sHLA-E (Fig. 2C). Thus, percentages of positive sera were significantly higher in melanoma patients compared to healthy donors ($p < 0.001$). Subgroup analysis considering AJCC stages (American Joint Committee on

Cancer, <http://www.cancerstaging.org/>) was then performed. No relationship of serum sHLA-E levels was found with respect to tumor grading (Fig. 2D). However, as shown in Table 1, sHLA-E levels were significantly increased in stage III melanoma patients compared with healthy donors ($p < 0.0001$).

Together, these results validated an ELISA for the determination of sHLA-E in human serum and demonstrated that sHLA-E is significantly increased in sera of melanoma patients.

Production of soluble HLA-E by a diverse panel of human tumor cell lines

We analyzed the production of soluble HLA-E by 98 different established human tumor cell lines, representing solid tumors as melanomas ($n = 30$), carcinomas (cancers of the lung ($n = 5$), colorectum ($n = 12$), kidney ($n = 10$), ovary ($n = 3$), breast ($n = 11$) and prostate (3)), thyroid cancer ($n = 1$), cervix cancer ($n = 1$), sarcomas (osteosarcomas, $n = 3$), gliomas ($n = 2$) and liquid tumors (mesotheliomas ($n = 7$), myelomas ($n = 7$) and leukemias ($n = 3$)). As shown in Figures 3A and 3B (in white), sHLA-E was detected in the supernatants of tumor cell lines derived from all origins tested, excepted in the supernatant of ovary tumor, myeloma, leukemias

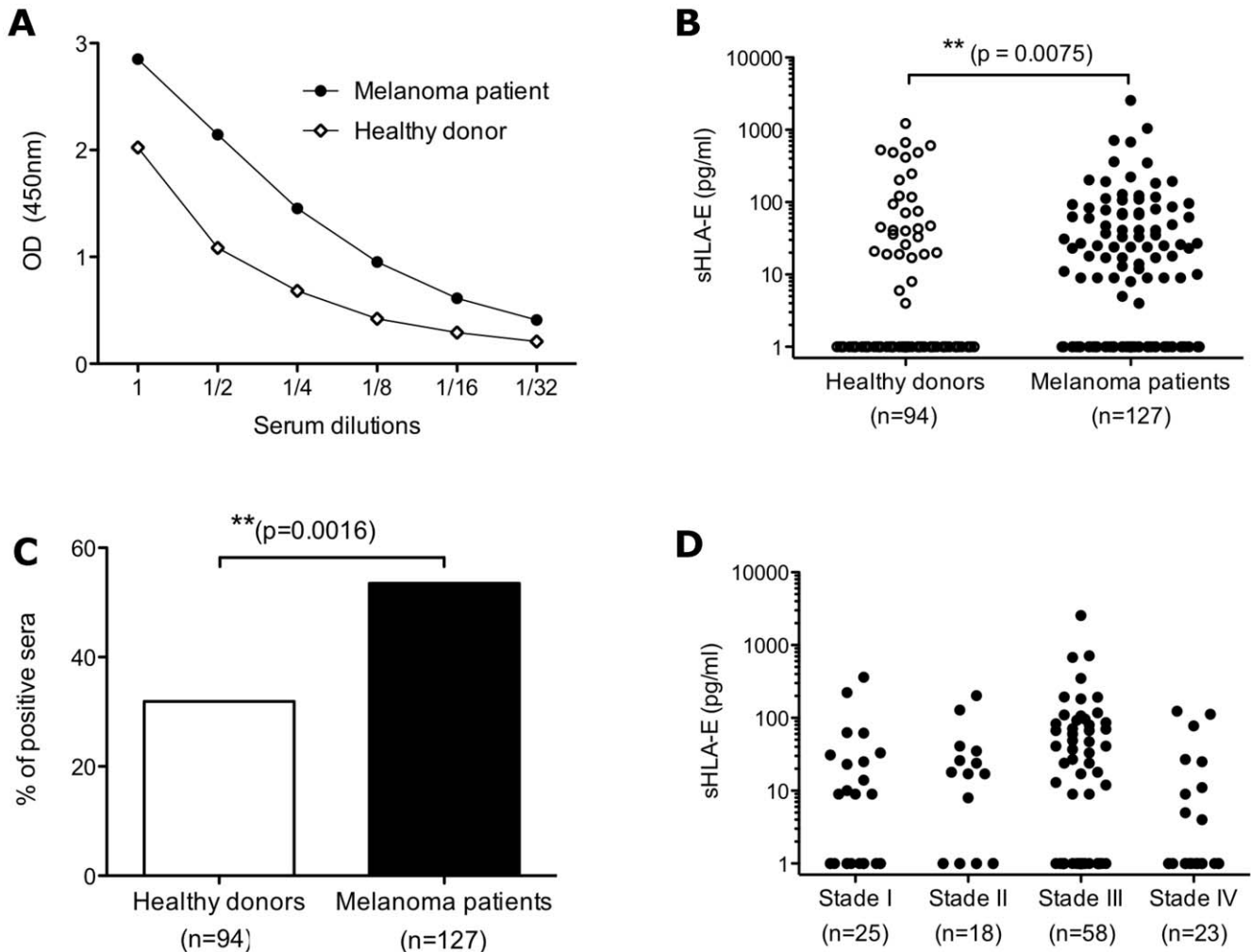


Figure 2. Analysis of sHLA-E in sera of healthy controls and melanoma patients. A/ Illustrative detection of sHLA-E using serial dilutions of two serum samples by ELISA. B/ Distribution of soluble HLA-E concentrations in sera of healthy controls and melanoma patients. P-value indicates the difference between the two groups. C/ Percentages of positive sHLA-E sera (sHLA-E ≥ 5 pg/ml) in healthy donors and melanoma patients. D/ Distribution of soluble HLA-E concentrations in sera of melanoma patients with regard of tumor stages.

doi:10.1371/journal.pone.0021118.g002

Table 2. sHLA-E in sera of healthy donors and melanoma patients studied.

	N° of cases	sHLA-E (pg/ml)			Positive sHLA-E sera (%) [*]
		Mean	Median	Range	
Healthy donors	94	61.6	0	0–1224	31.9
Melanoma patients	127	72.6**	9	0–2544	53.5**
Stage I	25	34.9	9	0–361	52
Stage II	18	28.9	12.5	0–202	55.6
Stage III	58	109.7**	21	0–2544	60***
Stage IV	23	17.2	0	0–124	34.8

**p<0.01,

***p<0.001.

p-values indicate the differences between healthy controls and the patient groups.

*Sera are considered as positive if sHLA-E levels are higher than or equal to 5 pg/ml.

doi:10.1371/journal.pone.0021118.t002

and glioma cell lines (Fig. 3 and data not shown). In our culture conditions (500 000 cells, in 3 ml, during 48 h), the levels of sHLA-E naturally produced by tumor cell lines were ranging from 5 to 400 pg/ml. Highest productions were detected among melanoma, colorectal and kidney tumor cells lines. The frequency analysis of the tumor cell lines able to produce sHLA-E (taking a cut-off value of 5 pg/ml) revealed that about one third of the tumor cell lines produced sHLA-E (24.5%, 24 out of 98) with higher percentages obtained in melanoma (40%, 12 out of 30) and renal cell carcinoma (40%, 4 out of 10) (Fig. 3C).

Selective regulation of sHLA-E production by cytokines

We have previously shown that IFN- γ increased the surface expression of HLA-E and the shedding of soluble HLA-E by melanoma cells. To confirm this result and broaden the panel of tested cytokines, the effect of IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-6, IL-7, IL-10, IL-12, IL-13, IL-15, IL-23, IFN- α 2a, IFN- γ , TNF- α and GM-CSF upon tumor cells lines sHLA-E production was tested. As expected, sHLA-E release was induced or significantly increased in tumor cell supernatants after IFN- γ activation (p<0.0001). The frequency analysis of the tumor cell lines able to produce sHLA-E after IFN- γ treatment doubled (from 24.5% to 49%, 48 out of 98) (Fig. 3C). To a lesser extent, exposure to IFN- α and TNF- α significantly increased the production of sHLA-E by tumor cell lines (p<0.001 and p<0.05 respectively). These results are illustrated in Figure 4A using two melanoma cell lines (M88 and M102) and one colon adenocarcinoma cell line (HT29). Other tested cytokines have no effect on this production. Kinetic analysis and dose-response experiments were performed with IFN- γ , IFN- α and TNF- α . As shown in Figure 4B, sHLA-E production was significantly increased in a dose-dependent manner with the maximal effect observed with 10 ng/ml for the three cytokines. This production was detectable as early as 1 day following cytokines treatment of tumor cells and was maximal after 48 hours (Fig. 4C).

Discussion

This study provides evidence that serum sHLA-E is significantly increased in patients suffering from melanoma compared to normal individuals, independently of age and gender. We carried this analysis through, using a specific and sensitive ELISA that we developed and validated for the determination of sHLA-E levels in biological fluids. In this large study including 221 individuals, we observed elevated concentrations of serum sHLA-E, as well as

higher frequency of sHLA-E positive sera in patients with melanomas compared with healthy donors. Considering the tumor grading, while sHLA-E levels seemed to ascend with advanced disease stages until stage III, we did not find significant association between serum sHLA-E levels and melanoma stage, which may be caused by the inequitable repartition of patients by subgroup. However, if compared to healthy donors, patients with stage III melanoma exhibited highly elevated sHLA-E serum level in terms of both concentration and frequency of positive sera. On the other hand, patients with stage IV disease exhibited lower levels of sHLA-E, which is in accordance with the faint spontaneous expression of HLA-E by metastatic tumor sections that we previously reported by immunohistochemistry [12].

These data emphasized the interest for soluble non-classical HLA-I molecules in malignant diseases. Another non-classical HLA-I molecule, HLA-G, has been identified in diverse malignancies including cancers and has received a lot of attention in recent publications. Clinical studies demonstrated that sHLA-G levels were significantly elevated in sera of patients with malignant melanomas, gliomas, breast and ovarian cancers, non-small-cell-lung cancers (NSCLC), chronic lymphocytic leukemias, B cell and T cell Non-Hodgkin's lymphomas [17–21]. Moreover, Zhu et al. demonstrated that serum sHLA-G levels could be a useful indicator in distinguishing colorectal cancers from benign colorectal diseases [22]. Finally, sHLA-G levels were also significantly higher in malignant ascites of ovarian and breast carcinomas than in benign controls [23]. Similarly, elevated levels of the stress-inducible MHC class I chain-related surface glycoproteins, MICA and MICB, have been found to correlate with cancer stages and metastasis in several carcinomas [24–26]. Altogether, these studies congruently revealed increased amounts of non classical HLA-I molecules in biological fluids (blood and ascite) of patients suffering from various cancers.

Given the fact that we and others have previously detected sHLA-E in the supernatants of melanoma and colorectal cell lines by Western blot analysis, we investigated, using our designed ELISA, the production of sHLA-E by tumor cell lines derived from major tumor categories, including solid tumors as melanoma, cancers of the breast, colon and kidney and liquid tumors as mesotheliomas and myelomas [12,27]. We showed that sHLA-E is spontaneously produced by 25% of tested cell lines (24 out of 98), derived from several types of human tumors, especially from melanoma, colorectal and kidney cancers. So, it will be interesting to address the potential predictive and prognostic value of sHLA-E levels in the blood of patients suffering from these cancers.

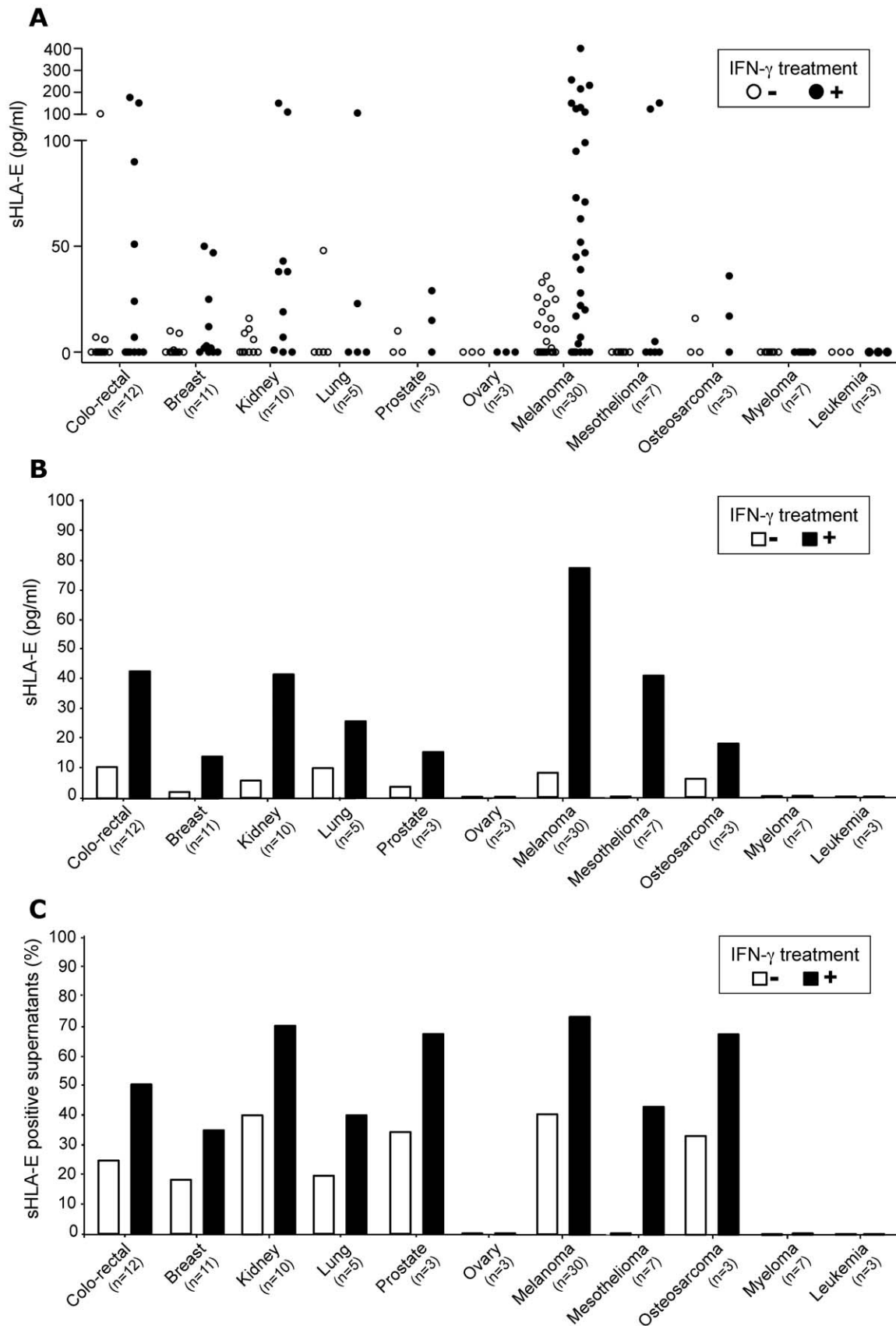


Figure 3. Analysis of sHLA-E production by tumor cell lines. Analysis of soluble HLA-E concentrations in supernatants of tumor cell lines treated or not by IFN- γ with regard of tumor origins: distribution of individual concentrations (A), mean levels (B) and percentages of positive supernatants (sHLA-E \geq 5 pg/ml) (C).
doi:10.1371/journal.pone.0021118.g003

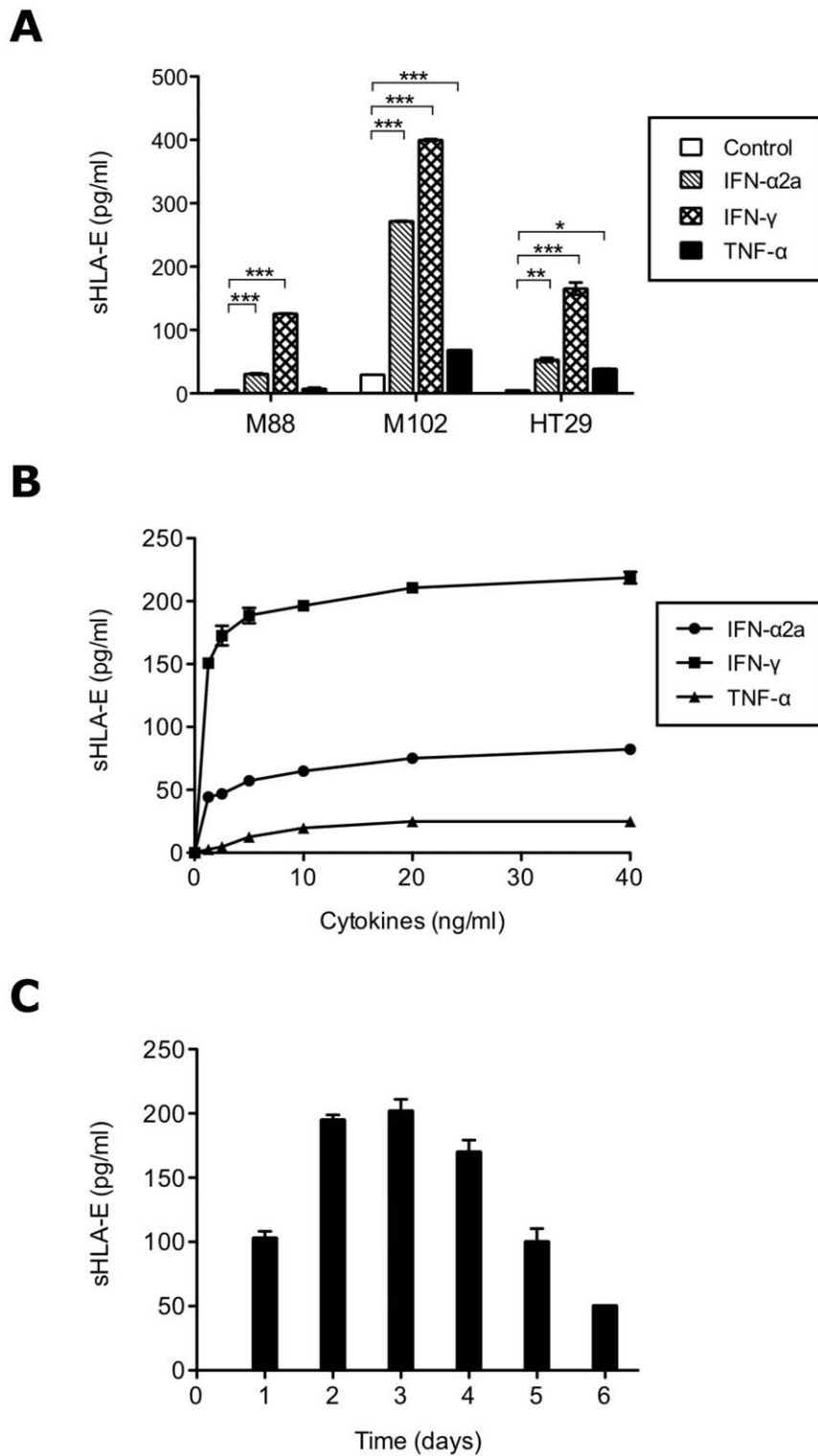


Figure 4. Influence of cytokines on sHLA-E production by tumor cells. A/ sHLA-E detection in supernatants of three tumor cell lines: two melanoma cell lines (M88 and M102) and one colocal carcinoma cell line (HT29), treated or not with IFN- α , IFN- γ or TNF- α (10 ng/ml, 48 h). Significant differences between the control and treatment values are indicated (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$). B/ sHLA-E detection in culture supernatants of M102 treated with serial concentrations of IFN- α , IFN- γ and TNF- α for 48 h. C/ Time course of sHLA-E production in culture supernatant of M102 treated for up to 6 days with 10 ng/ml IFN- γ . doi:10.1371/journal.pone.0021118.g004

We have also examined the influence of various cytokines on HLA-E production by tumor cell lines. According to our previous results on melanoma cell lines [12], we showed that IFN- γ induced or increased sHLA-E production, leading to the production of sHLA-E by 50% of the tumor cell lines tested (48 out of 98). Moreover, release of sHLA-E was also driven by IFN- α and TNF- α in a lesser extent. Considering that IFN- γ and IFN- α are high inducers of HLA-I molecules expression, their impact upon sHLA-E production likely reflect the increase of HLA-E expression by tumor cells. Since sHLA-E release by melanoma cells is mainly matrix metalloproteinase-dependant, TNF- α effect on HLA-E production could be due to the ability of TNF- α to promote matrix metalloproteinase expression [12,28]. These results are consistent with those of Coupel *et al.* showing sHLA-E production by endothelial cells after treatment with IFN- γ and TNF- α [29]. Yet, in opposition to their study, we did not observe any effect of IL-1 β treatment on sHLA-E production by tumor cells, probably due to a low expression of IL-1 receptor (IL-1R1) by the tumor cell lines tested in our study. However, as it has been reported that tumor cell lines, including melanoma cell lines, can express IL-1R1, we can postulate that IL-1 β , which is known to promote matrix metalloproteinase expression, could increase the production of sHLA-E by IL-1R1 expressing tumor cells [30,31].

Due to its effect on the proliferation of tumor cells, angiogenesis and its immunomodulatory capacities, IFN- α is used as immunotherapy in the treatment of various solid tumors, as melanoma and renal carcinoma [32]. Therefore, as we show its ability to upregulate sHLA-E production by tumor cell lines, systemic therapy with IFN- α may increase the sHLA-E production in melanoma patients. In this support, IFN- α therapy is associated with elevated sHLA-G serum levels in patients with melanoma [33]. Moreover, it has been reported that γ -irradiation downregulates the surface expression of HLA-G1 on melanoma cells, by enhancing the proteolytic cleavage of this molecule [34]. So, it will be interesting to determine if this mechanism is also observed with HLA-E, which would then be released into the tumor microenvironment and hereby affect the local immunological status.

Independently of the possible mechanism of sHLA-E production, it is important to highlight how the generation of sHLA-E by tumor cells could contribute for immunosurveillance escape. Since interaction of membrane-bound HLA-E with the inhibitory receptors CD94/NKG2-A induced inhibition of NK and T cell responses, the immunosuppressor activity of sHLA-E should be investigated. In support of a potential immunoregulatory fonction, Coupel *et al.* reported that sHLA-E protect endothelial cells from NK-mediated cell lysis [29]. Moreover, sHLA-G and sMICA have been shown to decrease the immune recognition and destruction of tumor cells. sHLA-G, via its interaction with inhibitor receptors ILT-2 and ITL-4, has been shown to inhibit lytic activity of NK cells, to induce apoptosis of CD8⁺ CTL, to affect CD4⁺ alloproliferation and to impair NK/DC crosstalk [35–38]. Moreover, the tumor-derived soluble MICA induced endocytosis and degradation of the cognate activatory receptor NKG2-D on tumor-infiltrating lymphocytes, impairing their activation [29,39]. Altogether, these data emphasized the importance of tumor-derived soluble NKR ligands in providing a tumor microenvironment favoring immune escape. Moreover, it has been reported that sHLA-G are produced *in vitro* as monomeric and multimeric forms and that sHLA-G dimerization augments ILT-2-mediated inhibition of T cell alloresponse [40]. So, the existence of sHLA-E multimers should also be investigated.

In conclusion, the current study provides for the first time evidence of an elevated sHLA-E in sera from melanoma patients, indicating that HLA-E might serve as a clinical marker for the

prognosis or prediction of the clinical outcomes of these cancers especially in the context of immunotherapy. Because a sensitive sHLA-E-ELISA has practical advantages for large-scale screening, it could be adopted for routine use in the immunological follow-up of melanomas and other human cancers. Although the function of tumor-derived soluble HLA-E remains to be defined, we can postulate that these molecules could reinforce the host's immune suppression through inhibiting the functions of NK and T cells, and thereby favor the survival of tumor cells. The clinically relevant function of these sHLA-E molecules needs to be carefully analyzed in order to develop appropriate immunotherapeutic strategies.

Materials and Methods

Antibodies

MEM-E/07 and MEM-E/08 mAbs (Exbio, Czech Republic), that binds native HLA-E proteins were used for ELISA.

Peptides and Recombinant soluble HLA

Peptides were purchased from Eurogentec (Angers, France). Purity (>85%) was controlled by reverse-phase high performance liquid chromatography. Diverse HLA and β 2-microglobulin recombinant proteins were refolded with the followed indicated synthetic peptides. HLA-E*0101/VMAPRTLVL (HLA-A*0201 signal peptide) and HLA-A*0201/AAGIGILTV (Melan-A_{27–35}) monomers were generated at the recombinant protein facility (IFR 26, Nantes). HLA-A*2301/PYLFWLAAL, HLA-B*0702/GILGFVFTL, HLA-B*0801/QAKWRLQTL and HLA-B*2705/HRCQAIRKK monomers were supplied by the tetramer production facility (Ludwig Institute For Cancer Research, Lausanne, Switzerland).

Patients and specimens

Sera samples were collected from patients with melanoma (n = 127), all with formal consent. Sera from healthy donors (n = 94) were provided by the Etablissement Français du Sang (EFS) (Nantes, France) and used as controls.

Ethics Statement

Written consents were obtained from all patients and healthy donors. All these studies were approved by the local ethics committees “Comité de Protection des Personnes Ouest IV-Nantes” and the “Agence Française de Sécurité Sanitaire des Produits de Santé”.

Cell lines culture

Melanoma cell lines were established in the GMP Unit of Cellular Therapy and in our laboratory (UMR 892 INSERM/Université de Nantes, France) and belong to the Biocollection PC-U892-NL (CHU Nantes). Colorectal carcinoma cell lines were purchased from ATCC or established in our laboratory UMR 892 INSERM/Université de Nantes (Biocollection PC-U892-FJ, CHU Nantes). Renal carcinoma cell lines were established in INSERM U1016/CNRS UMR 8104, Paris, France) [41]. Breast cancer cell lines were purchased from ATCC or established in our laboratory UMR 892 INSERM/Université de Nantes (Biocollection PC-U892-NG, CHU Nantes). Lung cancer cell lines and mesothelioma cell lines were purchased from ATCC or gifts from M. Grégoire (UMR 892 INSERM/Université de Nantes, France, Biocollection PC-U892-MG, CHU Nantes). Myeloma cells lines were gifts from C. Pellat (UMR 892 INSERM/Université de Nantes, France, Biocollection PC-U892-MA, CHU Nantes). Ovary carcinoma, glioma, leukemia, thyroid, cervix and prostate cancer cell lines were purchased from ATCC and kindly

provided by C. Saï, F. Vallette and F. Paris (UMR 892 INSERM/ Université de Nantes, France). Osteosarcoma cells lines were purchased from ATCC and gifts from M. Padrines (EA3822, INSERM U957, Nantes, France). All cell lines were cultured in RPMI or DMEM with 10% of fetal calf serum (FCS, PAA, Austria).

Tumor supernatants production

For sHLA-E production screening, 500 000 tumor cells were cultured in 6-well plates in 3 ml of 10% FCS-RPMI, supplemented or not with IFN- γ (20 ng/ml). After 48 hours, tumor supernatants were collected, centrifuged 5 min at 2500 g and kept frozen before testing in ELISA.

The impact of others cytokines under sHLA-E production, has initially been tested at 20 ng/ml during 48 hours with two melanomas cell lines (M88 and M102) and one colorectal adenocarcinoma cell line (HT29). Dose-response and kinetics assessments of IFN- γ , IFN- α 2a and TNF- α were secondarily performed as described (concentration ranging from 40 to 0,02 ng/ml during 1 to 6 days) with these three tumors cell lines.

Detection of sHLA-E by ELISA

Nunc-Immuno MaxiSorp Microtiter plates were coated (50 μ L/well) with MEM-E/08 mAb at 1 μ g/ml in carbonate/bicarbonate buffer (CO₃HNa 35 mM, CO₃Na₂ 15 mM, pH 9.5) overnight at 4°C. After four washes with PBS-0.05% Tween 20 (200 μ L/well), plates were saturated with PBS containing 10% FCS for 2 h at room temperature (200 μ L/well). After four washes, the biological samples (50 μ L/well optionally diluted in saturation buffer) were added (in triplicate) and incubated for 2 h at room temperature. Culture supernatants were assayed undiluted while six doubling dilutions of sera were used. The detecting biotinylated MEM-E/07 mAb diluted at 1 μ g/ml in saturation buffer was added after four washes (50 μ L/well) and incubated again for 2 h at room temperature. Plates were washed four times and incubated with strepta-HRP reagent (BD pharmingen) diluted at 1/1000 in saturation buffer for 1 h at room temperature.

References

- Kim R, Emi M, Tanabe K (2007) Cancer immunoeediting from immune surveillance to immune escape. *Immunology* 121(1): 1–14.
- Marin R, Ruiz-Cabello F, Pedrinaci S, Mendez R, Jimenez P, et al. (2003) Analysis of HLA-E expression in human tumors. *Immunogenetics* 54(11): 767–775.
- Algarra I, Garcia-Lora A, Cabrera T, Ruiz-Cabello F, Garrido F (2004) The selection of tumor variants with altered expression of classical and nonclassical MHC class I molecules: implications for tumor immune escape. *Cancer Immunol Immunother* 53(10): 904–910.
- Campoli M, Ferrone S (2008) HLA antigen changes in malignant cells: epigenetic mechanisms and biologic significance. *Oncogene* 27(45): 5869–5885.
- Rouas-Freiss N, Moreau P, Ferrone S, Carosella ED (2005) HLA-G proteins in cancer: do they provide tumor cells with an escape mechanism? *Cancer Res* 65(22): 10139–10144.
- Seliger B, Abken H, Ferrone S (2003) HLA-G and MIC expression in tumors and their role in anti-tumor immunity. *Trends Immunol* 24(2): 82–87.
- Bangia N, Ferrone S (2006) Antigen presentation machinery (APM) modulation and soluble HLA molecules in the tumor microenvironment: do they provide tumor cells with escape mechanisms from recognition by cytotoxic T lymphocytes? *Immunol Invest* 35(3–4): 485–503.
- Campoli M, Ferrone S (2008) Tumor escape mechanisms: potential role of soluble HLA antigens and NK cells activating ligands. *Tissue Antigens* 72(4): 321–334.
- Bahri R, Hirsch F, Josse A, Rouas-Freiss N, Bidere N, et al. (2006) Soluble HLA-G inhibits cell cycle progression in human alloreactive T lymphocytes. *J Immunol* 176(3): 1331–1339.
- Contini P, Ghio M, Poggi A, Filaci G, Indiveri F, et al. (2003) Soluble HLA-A, -B, -C and -G molecules induce apoptosis in T and NK CD8+ cells and inhibit cytotoxic T cell activity through CD8 ligation. *Eur J Immunol* 33(1): 125–134.
- Tabayoyong WB, Zavazava N (2007) Soluble HLA revisited. *Leuk Res* 31(2): 121–125.
- Derre L, Corvaisier M, Charreau B, Moreau A, Godefroy E, et al. (2006) Expression and release of HLA-E by melanoma cells and melanocytes: potential impact on the response of cytotoxic effector cells. *J Immunol* 177(5): 3100–3107.
- Derre L, Corvaisier M, Pandolfino MC, Diez E, Jotereau F, et al. (2002) Expression of CD94/NKG2-A on human T lymphocytes is induced by IL-12: implications for adoptive immunotherapy. *J Immunol* 168(10): 4864–4870.
- Le Drecn E, Vely F, Olcese L, Cambiaggi A, Guia S, et al. (1998) Inhibition of antigen-induced T cell response and antibody-induced NK cell cytotoxicity by NKG2A: association of NKG2A with SHP-1 and SHP-2 protein-tyrosine phosphatases. *Eur J Immunol* 28(1): 264–276.
- Malmberg KJ, Levitsky V, Norell H, de Matos CT, Carlsten M, et al. (2002) IFN-gamma protects short-term ovarian carcinoma cell lines from CTL lysis via a CD94/NKG2A-dependent mechanism. *J Clin Invest* 110(10): 1515–1523.
- Speiser DE, Pittet MJ, Valmori D, Dunbar R, Rimoldi D, et al. (1999) In vivo expression of natural killer cell inhibitory receptors by human melanoma-specific cytolytic T lymphocytes. *J Exp Med* 190(6): 775–782.
- Rebmann V, Nuckel H, Duhren U, Grosse-Wilde H (2007) HLA-G in B-chronic lymphocytic leukaemia: clinical relevance and functional implications. *Semin Cancer Biol* 17(6): 430–435.
- Rebmann V, Regel J, Stolke D, Grosse-Wilde H (2003) Secretion of sHLA-G molecules in malignancies. *Semin Cancer Biol* 13(5): 371–377.
- Rebmann V, Wagner S, Grosse-Wilde H (2007) HLA-G expression in malignant melanoma. *Semin Cancer Biol* 17(6): 422–429.
- Schutt P, Schutt B, Switala M, Bauer S, Stamatis G, et al. (2010) Prognostic relevance of soluble human leukocyte antigen-G and total human leukocyte antigen class I molecules in lung cancer patients. *Hum Immunol* 71(5): 489–495.
- Sebt Y, Le Fricc G, Pangault C, Gros F, Drenou B, et al. (2003) Soluble HLA-G molecules are increased in lymphoproliferative disorders. *Hum Immunol* 64(11): 1093–1101.
- Zhu CB, Wang CX, Zhang X, Zhang J, Li W (2011) Serum sHLA-G levels: a useful indicator in distinguishing colorectal cancer from benign colorectal diseases. *Int J Cancer* 128(3): 617–622.

23. Singer G, Rebmann V, Chen YC, Liu HT, Ali SZ, et al. (2003) HLA-G is a potential tumor marker in malignant ascites. *Clin Cancer Res* 9(12): 4460–4464.
24. Arreygue-Garcia NA, Daneri-Navarro A, del Toro-Arreola A, Cid-Arregui A, Gonzalez-Ramella O, et al. (2008) Augmented serum level of major histocompatibility complex class I-related chain A (MICA) protein and reduced NKG2D expression on NK and T cells in patients with cervical cancer and precursor lesions. *BMC Cancer* 8: 16.
25. Holdenrieder S, Stieber P, Peterfi A, Nagel D, Steinle A, et al. (2006) Soluble MICA in malignant diseases. *Int J Cancer* 118(3): 684–687.
26. Holdenrieder S, Stieber P, Peterfi A, Nagel D, Steinle A, et al. (2006) Soluble MICB in malignant diseases: analysis of diagnostic significance and correlation with soluble MICA. *Cancer Immunol Immunother* 55(12): 1584–1589.
27. Levy EM, Bianchini M, Von Eeuw EM, Barrio MM, Bravo AI, et al. (2008) Human leukocyte antigen-E protein is overexpressed in primary human colorectal cancer. *Int J Oncol* 32(3): 633–641.
28. Sprague AH, Khalil RA (2009) Inflammatory cytokines in vascular dysfunction and vascular disease. *Biochem Pharmacol* 78(6): 539–552.
29. Coupel S, Moreau A, Hamidou M, Horejsi V, Souillou JP, et al. (2007) Expression and release of soluble HLA-E is an immunoregulatory feature of endothelial cell activation. *Blood* 109(7): 2806–2814.
30. Kholmanskikh O, van Baren N, Brasseur F, Ottaviani S, Vanacker J, et al. (2010) Interleukins 1alpha and 1beta secreted by some melanoma cell lines strongly reduce expression of MITF-M and melanocyte differentiation antigens. *Int J Cancer* 127(7): 1625–1636.
31. Yeruva S, Ramadori G, Raddatz D (2008) NF-kappaB-dependent synergistic regulation of CXCL10 gene expression by IL-1beta and IFN-gamma in human intestinal epithelial cell lines. *Int J Colorectal Dis* 23(3): 305–317.
32. Bracarda S, Bellmunt J, Melichar B, Negrier S, Bajetta E, et al. (2011) Overall survival in patients with metastatic renal cell carcinoma initially treated with bevacizumab plus interferon-alpha2alpha and subsequent therapy with tyrosine kinase inhibitors: a retrospective analysis of the phase III AVOREN trial. *BJU Int* 107(2): 214–219.
33. Ugurel S, Rebmann V, Ferrone S, Tilgen W, Grosse-Wilde H, et al. (2001) Soluble human leukocyte antigen-G serum level is elevated in melanoma patients and is further increased by interferon-alpha immunotherapy. *Cancer* 92(2): 369–376.
34. Michelin S, Gallegos CE, Dubner D, Favier B, Carosella ED (2009) Ionizing radiation modulates the surface expression of human leukocyte antigen-G in a human melanoma cell line. *Hum Immunol* 70(12): 1010–1015.
35. Bainbridge DR, Ellis SA, Sargent IL (2000) HLA-G suppresses proliferation of CD4(+) T-lymphocytes. *J Reprod Immunol* 48(1): 17–26.
36. Fournel S, Aguerre-Girr M, Huc X, Lenfant F, Alam A, et al. (2000) Cutting edge: soluble HLA-G1 triggers CD95/CD95 ligand-mediated apoptosis in activated CD8+ cells by interacting with CD8. *J Immunol* 164(12): 6100–6104.
37. Gros F, Cabillic F, Toutirais O, Maux AL, Sebti Y, et al. (2008) Soluble HLA-G molecules impair natural killer/dendritic cell crosstalk via inhibition of dendritic cells. *Eur J Immunol* 38(3): 742–749.
38. Rouas-Freiss N, Goncalves RM, Menier C, Dausset J, Carosella ED (1997) Direct evidence to support the role of HLA-G in protecting the fetus from maternal uterine natural killer cytotoxicity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94(21): 11520–11525.
39. Groh V, Wu J, Yee C, Spies T (2002) Tumour-derived soluble MIC ligands impair expression of NKG2D and T-cell activation. *Nature* 419(6908): 734–738.
40. Zhong M, Weng X, Liang Z, Lu S, Li J, et al. (2009) Dimerization of soluble HLA-G by IgG-Fc fragment augments ILT2-mediated inhibition of T-cell alloresponse. *Transplantation* 87(1): 8–15.
41. Perier A, Fregni G, Wittnebel S, Gad S, Allard M, et al. (2011) Mutations of the von Hippel-Lindau gene confer increased susceptibility to natural killer cells of clear-cell renal cell carcinoma. *Oncogene*;Epub ahead of print.

1.2 Étude des propriétés fonctionnelles des molécules HLA-E solubles sur les lymphocytes T anti-tumoraux CD94/NKG2-A⁺

Plusieurs études ayant montré que les molécules HLA-I solubles présentaient des propriétés fonctionnelles, nous avons cherché à évaluer l'éventuelle activité immunologique des molécules HLA-Es *in vitro*. Pour cela, nous avons principalement utilisé des complexes HLA-E*0101/peptide/ β 2m recombinants solubles (rHLA-Es), sous une forme monomérique ou tétramérique (**Figure 17**), produits par la plateforme de protéines recombinantes de la SFR-Santé François Bonamy (Nantes). Ces complexes recombinants sont chargés avec le peptide VMAPRTLVL issu des molécules HLA-A*02 et décrit pour permettre l'interaction avec les récepteurs CD94/NKG2.

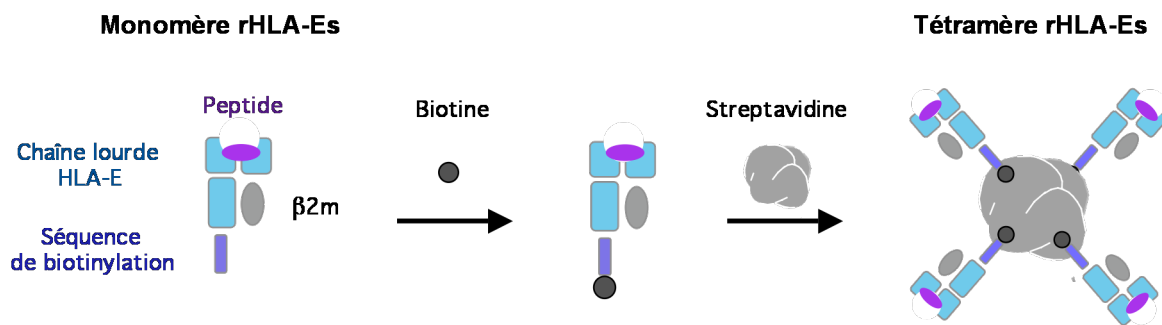


Figure 17 : Complexes HLA-E/peptides/ β 2m recombinants solubles

Les propriétés immunologiques des molécules HLA-Es ont été évaluées vis-à-vis d'un clone lymphocytaire T $\alpha\beta$ CD8⁺ dénommé H2 issu de la sensibilisation de PBMC d'un donneur sain. Ce clone est spécifique de l'antigène de mélanome NA17-A (HLA-A*0201/VLPDVFIRC) (Guilloux *et al.* 1996) et est caractérisé par un fort niveau d'expression des molécules CD94 et NKG2-A. L'expression des récepteurs CD94/NKG2-A et leur capacité à interagir avec les molécules HLA-Es recombinantes ont été contrôlées par cytométrie de flux à l'aide d'anticorps spécifiques ou de tétramères rHLA-E/peptide couplés à des fluorochromes (**Figure 18**).

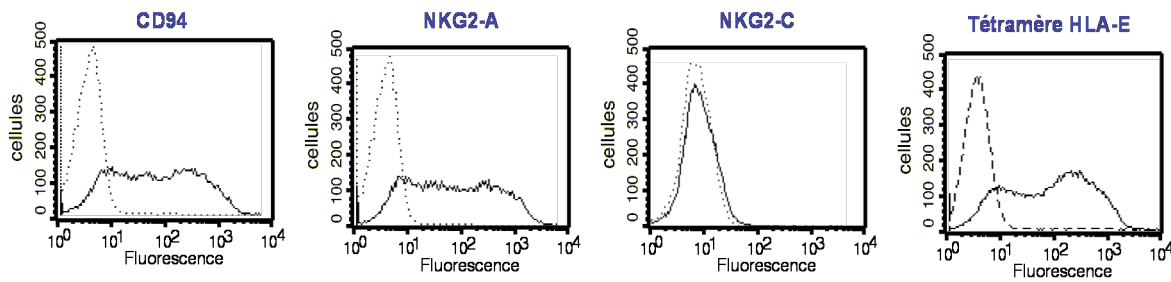


Figure 18 : Expression membranaire des récepteurs CD94/NKG2 par le clone H2

Les histogrammes en trait plein représentent la fluorescence émise par les cellules marquées par l'anticorps ou le tétramère d'intérêt, les contrôles négatifs étant représentés en pointillé.

1.2.1 Impact sur l'expression du récepteur CD94/NKG2-A

Dans un premier temps, nous avons cherché à déterminer si les molécules HLA-Es pouvaient influencer l'expression membranaire des récepteurs CD94/NKG2-A. Pour cela, le clone $T\alpha\beta$ $CD8^+$ a été incubé en présence de complexes HLA-E/peptide recombinants (10 μ g/ml) sur des périodes de 15 minutes à 7 jours, puis l'expression des molécules CD94 et NKG2-A a été analysée par immunofluorescence. Les contrôles ont été réalisés en incubant le clone T avec des complexes HLA-A*0201/peptide irrelevant. Nous avons alors observé que l'expression des récepteurs CD94/NKG2-A était stable dans le temps et ne semblait pas influencée par la présence de son ligand sous une forme soluble monomérique ou tétramérique.

1.2.2 Impact sur la réponse lymphocytaire T

Ayant déjà montré que l'expression membranaire de HLA-E inhibait l'activité cytotoxique de clones $T\alpha\beta$ $CD8^+$ $CD94/NKG2-A^+$ vis-à-vis des cellules de mélanome, nous avons voulu tester la capacité des molécules HLA-Es (recombinantes ou non) à moduler la réponse du clone H2 stimulé par des cellules tumorales ou par des anticorps anti-CD3. Nous avons étudié l'influence des molécules HLA-Es sur les différentes phases de la réponse lymphocytaire induite suite à l'engagement du TCR par son antigène : la réponse précoce qui traduit la transduction des signaux d'activation et notamment une augmentation intracellulaire du Ca^{2+} (ou flux calcique), la réponse intermédiaire caractérisée par la dégranulation de molécules cytotoxiques et la production de cytokines, et la réponse tardive aboutissant à la prolifération clonale et éventuellement à l'apoptose.

Dans un premier temps, nous avons analysé l'effet de la présence des molécules HLA-Es recombinantes (utilisées à 10µg/ml) sur l'augmentation du flux calcique intracellulaire dans les cellules T activées par un anticorps anti-CD3 (UCHT1, utilisé à 5µg/ml). Les variations du Ca²⁺ intracytoplasmique du clone H2 ont été analysées en vidéo-microscopie grâce à des sondes ratiométriques fluorescentes (fura-2-AM). Nous avons observé que les molécules rHLA-Es tétramériques limitaient l'augmentation du taux de calcium intracellulaire induit par l'engagement du TCR. Ainsi, et comme illustré dans la **figure 19**, l'ajout préalable ou simultané de molécules rHLA-Es tétramériques induit une diminution de la vitesse et de l'amplitude (-35% et -63%) du pic calcique intracellulaire provoqué par l'engagement du TCR du clone H2. En revanche, aucun effet n'a été observé en présence de formes monomériques, suggérant qu'elles sont moins susceptibles de pouvoir moduler l'activité des lymphocytes T CD94/NKG2-A⁺.

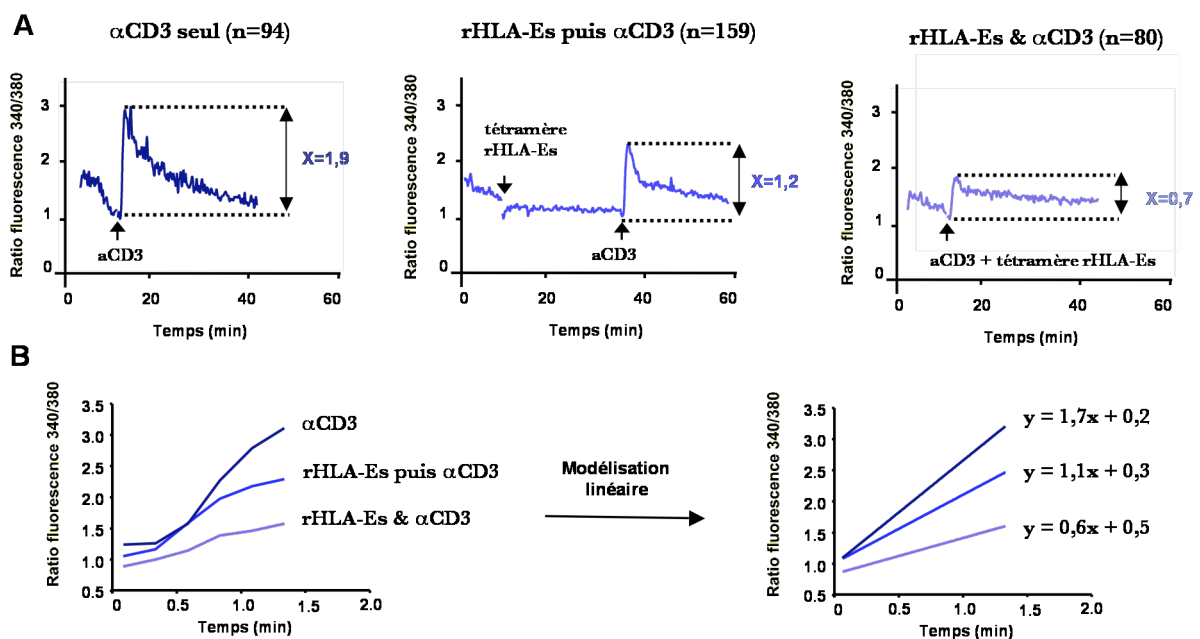


Figure 19: Impact des tétramères rHLA-Es sur le flux calcique du clone H2

- (A) Evolution de calcium libre intracytoplasmique du clone T H2 au cours du temps, le nombre de cellules analysées étant indiqué
- (B) Modélisation du pic calcique induit lors de la stimulation du clone T H2

Nous avons ensuite évalué l'effet des molécules HLA-Es sur la réponse lymphocytaire T cytotoxique (test de cytotoxicité au ^{51}Cr et expression du marqueur de dégranulation CD107a) et la production de cytokines (IFN- γ , TNF- α et IL-2, par marquage immunofluorescent intracellulaire ou par dosage biologique). Pour cela, le clone T a été stimulé par des anticorps anti-CD3 (OKT3 immobilisé, utilisé entre 0,01 et 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) ou par des cellules tumorales de mélanome et ce, en présence de molécules HLA-Es recombinantes (monomériques ou tétramériques, utilisées à 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$) ou naturelles (surnageants de culture de mélanome HLA-Es $^+$). Des contrôles ont été réalisés à l'aide de complexes HLA/peptide irrelevantes ou de surnageants de mélanome ne contenant pas de molécules HLA-Es. En dépit de nombreuses tentatives expérimentales, nous n'avons jamais pu observer d'effet des molécules HLA-Es sur la réponse cytotoxique ou cytokinique du clone lymphocytaire T H2 *in vitro*.

L'impact des molécules HLA-Es sur l'apoptose de lymphocytes T CD94/NKG2-A $^+$ a également été investigué. Les clones H2 ont été incubés en présence de molécules HLA-Es, recombinantes ou naturelles, et d'anticorps anti-CD3 (OKT3 immobilisé de 0,01 à 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) sur des périodes allant de 6 heures à 4 jours. Puis, l'apoptose a été évaluée par marquage Annexin-V/7-AAD. Cependant, aucun effet des molécules HLA-Es n'a pu être observé, que ce soit sur des lymphocytes T stimulés, ou non.

Enfin, nous avons recherché la capacité des molécules HLA-Es à moduler la réponse proliférative des lymphocytes T CD94/NKG2-A $^+$. Pour cela, les lymphocytes H2 ont été marqués au CFSE puis cultivés en présence d'anticorps anti-CD3 (immobilisé à 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) et de molécules HLA-Es, naturelles ou non, pendant 7 à 10 jours. Leur index de prolifération a ensuite été évalué par cytométrie de flux. Comme illustré dans la **figure 20**, dans certaines expériences nous avons pu observer une diminution significative de l'activité proliférative du clone T stimulé en présence de formes recombinantes tétramériques (utilisées à 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$) et une tendance à l'inhibition en présence des formes recombinantes monomériques et naturelles (surnageants de culture HLA-Es $^+$).

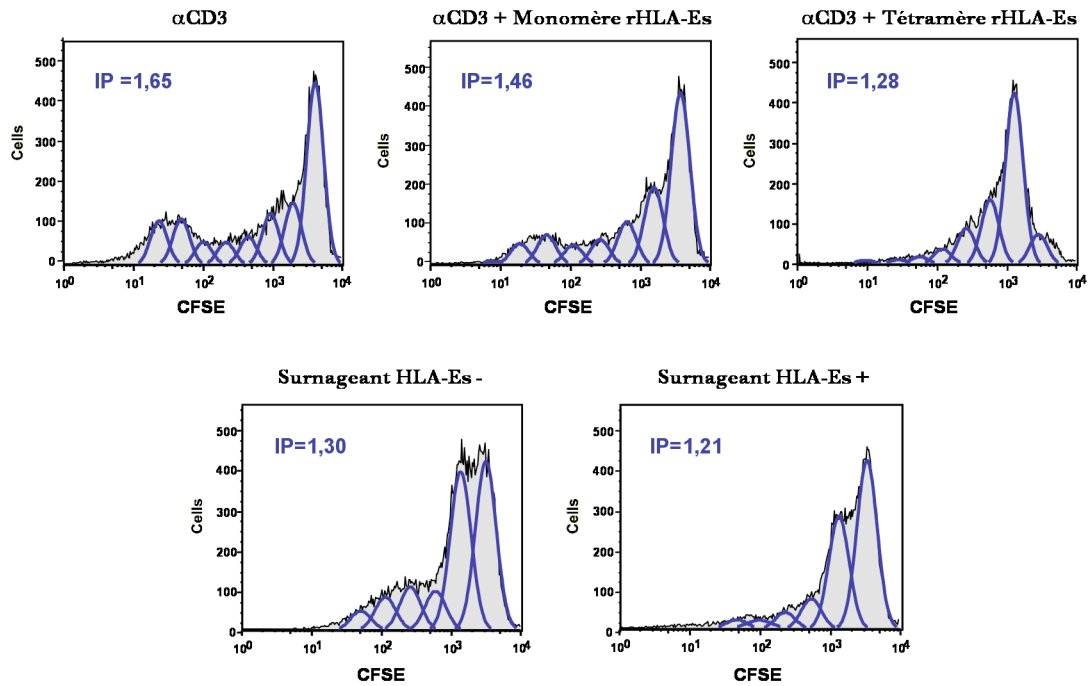


Figure 20: Impact des molécules HLA-Es sur l'activité proliférative du clone H2

L'index de prolifération qui représente le nombre moyen de divisions cellulaires est indiqué.

En définitive, nous n'avons pas observé d'effet significatif des molécules HLA-Es recombinantes monomériques ou naturelles sur la réponse à l'activation de lymphocytes $T\alpha\beta$ $CD8^+$ $CD94/NKG2-A^+$. En revanche, les formes recombinantes multimériques semblent limiter le niveau d'activation perçu par les lymphocytes lors de l'engagement de leur TCR, ce qui se traduit par une diminution du flux calcique intracellulaire et de la capacité proliférative. Cependant, les réponses lymphocytaires cytotoxiques et cytokiniques ne semblent pas affectées pour autant, de même que leur sensibilité à l'apoptose.

2. Implication des molécules HLA-E en transplantation

2.1 Étude de l'alloréactivité des lymphocytes T restreints HLA-E induits par le CMV chez un patient transplanté

Les infections par le CMV peuvent induire l'activation de réponses T CD8 restreintes par la molécule HLA-E et dirigées contre des peptides issus de la protéine virale UL-40. De façon intéressante, les peptides viraux reconnus peuvent également dériver de la séquence signal de molécules HLA-I allogéniques. De fait, si ces réponses T CD8 sont susceptibles de jouer un rôle bénéfique dans le contrôle de l'infection virale, il est possible qu'elles favorisent également le rejet des cellules allogéniques chez les patients transplantés. Afin d'étayer le potentiel rôle délétère de ces lymphocytes T dans le cadre de transplantations d'organes solides, nous avons étudié leur réactivité vis-à-vis de cellules endothéliales allogéniques, principales cellules exprimant la molécule HLA-E dans les tissus non lymphoïdes.

Les résultats obtenus sont présentés dans l'**article 2** qui est actuellement en phase de soumission chez le journal PLoS ONE et ont fait l'objet d'un dépôt de brevet : *Brevet INSERM N° EP12305823.2 (2012), N. Gervois, M. Allard et B. Charreau "Methods and kits for determining whether a cytomegalovirus infection in a transplanted patient is susceptible to induce allograft rejection"* (**Annexe 3**).

Dans cette étude, réalisée en collaboration avec le groupe du Dr Béatrice Charreau (UMR 1064 INSERM/Université Nantes, ITUN), nous avons caractérisé d'un point de vue phénotypique et fonctionnel la population T CD8 restreinte par HLA-E qui est apparue dans le sang d'un patient transplanté rénal au cours d'une infection par le CMV. Nous montrons que ces lymphocytes T CD8 non conventionnels sont capables de reconnaître des peptides issus des molécules HLA-I allogéniques et, par conséquent, de lyser des cellules endothéliales allogéniques *in vitro*. De plus, il apparaît que l'activité de cette population T non conventionnelle est modulée par l'expression de nombreux récepteurs NKR, et plus particulièrement par celle d'un récepteur inhibiteur KIR. De fait, l'haplotype HLA-C, principal ligand des KIRs, joue un rôle majeur dans la susceptibilité des cellules allogéniques à la lyse par ces lymphocytes T. Ces travaux suggèrent que les réponses T CD8 restreintes par la molécule HLA-E et induites lors d'infections à CMV pourraient jouer un rôle délétère chez les patients transplantés par réaction croisée avec les cellules endothéliales allogéniques, favorisant ainsi le rejet des organes solides.

HLA-E-restricted cross-recognition of allogeneic endothelial cells by CMV-committed CD8 T cells : a potential risk factor following transplantation

Mathilde Allard^{1,2,3}, Pierre Tonnerre^{2,4}, Steven Nedellec^{1,2,3}, Romain Oger^{1,2,3}, Alexis Morice^{1,2,3}, Yannick Guilloux^{1,2,3}, Elisabeth Houssaint^{1,2,3}, Béatrice Charreau^{2,4,5} and Nadine Gervois^{1,2,3}

¹Inserm, U892, Nantes, F-44000, France

²Univ Nantes, Nantes, F-44000, France

³CNRS, UMR 6299, Nantes, F-44000, France

⁴Inserm, U1064, Nantes, F-44000, France

⁵CHU Nantes, Nantes, F-44000, France

Corresponding author :

Dr. Nadine Gervois:

Phone number: 0033(0)228080241

Fax number: 0033(0)228080329

E-mail: nadine.gervois@inserm.fr

Abstract

Although association between CMV infection and allograft rejection is well admitted, the precise mechanisms involved remain uncertain. Characterization of alloreactive T cells in CMV seropositive kidney transplant patients allowed us to identify a monoclonal HLA-E-restricted CD8 $\alpha\beta$ T cell population displaying reactivity against peptides derived from the leader sequences of both HCMV-UL40 and allogeneic classical HLA-I molecules. As HLA-E expression in nonlymphoid organs is mainly restricted to endothelial cells, we investigated the reactivity of this HLA-E-restricted T cell population towards allogeneic endothelial cells. We clearly demonstrated that CMV-committed HLA-E-restricted T cells efficiently recognized and killed allogeneic endothelial cells *in vitro*. Therefore, while HLA-E-restricted T cells have potential to contribute to the control of CMV infection, they may also directly mediate graft rejection *in vivo* through recognition of peptides derived from allogeneic HLA-I molecules on graft cells. Moreover, our data indicate that this alloreactivity is tightly regulated by NK receptors, especially by inhibitory KIR2DL2 that strongly prevents TCR-induced activation through recognition of HLA-C molecules. Hence, a better evaluation of the role of CMV-committed HLA-E-restricted T cells in transplantation and of the impact of HLA-genotype, especially HLA-C, on their alloreactivity may determine whether they indeed represent a risk factor following organ transplantation.

Introduction

Cytomegalovirus (CMV) is a common opportunistic pathogen that persists for life in the human host after primary infection. While CMV infection of immunocompetent individuals generally results in subclinical diseases, it may cause serious life threatening complications in immunocompromised ones. Consequently, transplant patients with immunosuppressive regimens are particularly prone to CMV disease and it is estimated that up to 75% of all patients undergoing solid organ transplantation experience new infection or reactivation of latent CMV infection[1,2].

CMV infection has been implicated in the development of both acute and chronic allograft rejection and has been associated with decreased allograft and patient survival[3,4]. Although association between CMV infection and allograft rejection is well admitted, the precise mechanisms involved remain uncertain.

CMV could account for graft rejection by triggering the activation of endothelial cells, which are preferential targets of CMV infection[5,6,7]. This might directly increase the expression of MHC, costimulatory and adhesion molecules on the allograft endothelium through the induction of mediators release such as type I IFN. Then, activated graft's EC may attract and activate recipient's cytotoxic T cells, which can trigger rejection[8]. CMV infection could also be implicated in the development of allograft rejection because of cross-reactivity of CMV-specific T cells toward allogeneic HLA molecules as we and others have previously documented[9,10,11,12]. An alternate mechanism has been suggested by studies reporting the existence in CMV seropositive individuals of CD8 T cells that recognize, in a HLA-E restricted-fashion, peptides derived from the leader sequences of both HCMV-UL40 and allogeneic classical HLA-I molecules[13,14,15,16]. Consequently, while this HLA-E-restricted T cells potentially mediate protection against CMV infection, they may also promote graft rejection through

recognition of peptides derived from allogeneic HLA-I molecules presented by HLA-E on graft cells.

One of the most striking features of the non-classical HLA-I molecule HLA-E is its highly conserved nature. Only two allelic forms exist in the Caucasian population, HLA-E*0101 (HLA-E^{107R}) and HLA-E*0103 (HLA-E^{107G}) that differ at one amino acid position[17]. As a consequence, HLA-E-bound peptides are highly restricted, comprising mostly signal peptides derived from others HLA-I proteins[18]. Class Ib molecules are often considered to have a prominent role in innate immunity. Among this line, surface expression of HLA-E bound to autologous HLA class I derived peptides, indicating the integrity of the MHC I antigen processing machinery and acting as a ligand for CD94-NKG2 receptors, modulate the activation of NK and T cells[19,20]. However, in times of cellular stress or infections, HLA-E is associated with a much more diverse repertoire of peptides, which can be sensed directly by $\alpha\beta$ TCR[21,22]. Indeed, several studies in human and mice have highlighted a dual role for unclassical HLA-Ib molecules, in that, like classical HLA-Ia molecules (ie HLA-A/B/C), they can mediate adaptative immune responses to bacteria[23,24], viruses[13,25,26], tumors[27] and self-antigens[28,29].

Although HLA-E is virtually expressed in all tissues, its surface expression profile is more restricted than that of classical HLA-I molecules. We previously reported that, HLA-E surface expression in normal nonlymphoid organs is mainly restricted to endothelial cells[30]. Upon solid organ transplantation, because graft endothelial cells display MHC-peptide complexes at their surface and come in regular contact with recipient circulating T cells, the endothelium of allografts plays a central role in eliciting immune-mediated rejection[8,31]. However, while HLA-E has been shown to behave as a strong transplantation antigen in rodent models[32], whether HLA-E expressed on human graft's tissues could trigger an allogeneic cellular response remains to be documented.

Hence, the purpose of our study was to investigate the potential alloreactivity of CMV-committed HLA-E-restricted CD8 T cells isolated from a CMV seropositive recipient. We clearly demonstrated the reactivity of CMV-committed HLA-E-restricted CD8 T cells against allogeneic endothelial cells from transplant donors and its tight regulation by NK receptors and therefore address their potential involvement in human adaptative response against allograft organs.

Materials and Methods

HLA-E-restricted CD8 T cells isolation and culture

Blood sample was collected from a CMV-seropositive kidney-transplant patient (HLA-A*0201, -B*4402, -B*5101, -Cw*0501 and -Cw*1402) (referred as KR2 in a previous study)[33] with formal consent. PBMC were isolated by a Ficoll density gradient (PAA, Les Mureaux, France) and cultured with RPMI 1640 (Sigma-Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France) containing 8% human serum (local production) and 150U/mL rIL-2 (Eurocetus, Rueil-Malmaison, France). HLA-E-reactive population was enriched using a TNF- α Secretion Assay Cell Enrichment and Detection Kit (Miltenyi, Paris, France) after stimulation with HLA-E-transfected COS-7 cells. Sorted cells were cloned by limiting dilution and expanded by stimulation with phytohemagglutinin (PHA)-L (Sigma-Aldrich) in the presence of irradiated feeder cells (allogeneic lymphocytes and Epstein Barr Virus-transformed B lymphocytes)[34].

HAEC isolation, culture and IFN- γ activation

Human arterial endothelial cells (HAEC) were isolated from unused artery pieces collected at the time of kidney transplantation, harvested according to good medical practice and stored in the DIVAT Biocollection (French Health Minister Project number 02G55)[35]. Briefly, fragment of arteries were incubated with collagenase A (Roche, Basel, Switzerland) for 30min at 37°C and EC were selected using CD31-Dynabeads (Dyna, Villebon sur Yvette, France). HAEC were grown in Endothelial Cell Basal Medium (ECBM) supplemented with 10% fetal calf serum (FCS, PAA, France), 0.004m-L/mL ECGS/Heparin, 0.1ng/mL hEGF, 1ng/mL hbFGF, 1 μ g/mL hydrocortisone, 50 μ g/mL gentamicin and 50ng/mL amphotericin B (C-22010, PromoCell, Heidelberg, Germany). For activation, confluent HAEC monolayers were starved overnight in ECBM supplemented with 2%FCS without growth factors and incubated with recombinant human

IFN- γ (50U/mL, Imukin, Boehringer Ingelheim, Germany) for 48h. HLA class I genotyping was performed by the Etablissement Français du Sang (Nantes, France).

B-EBV 721.221 and COS-7 cells culture

The HLA-E-transfected (721.221-E) and untransfected (721.221) B-EBV cell lines were kindly provided by V. Braud (UMR CNRS 6097/Université Nice-Sophia Antipolis, Valbonne, France)[36]. COS-7 cells were obtained from T. Boon (Ludwig institute for Cancer Research, Brussels, Belgium)[37]. These cells were maintained in RPMI 1640 10%FSC.

Antibodies

The following antibodies were used in a conjugated form (phenotyping) or not (blocking or redirected lysis experiments) with fluorescein isothiocyanate (FITC), phycoerythrin (PE) or allophycocyanin (APC): TCR $\alpha\beta$ -PE, CD8 α -PE, IFN- γ -PE (Miltenyi), CD3-PE, CD27-PE, CD28-PE, CD45-RA-PE, CD45-RO-PE, CD56-PE, CD57-FITC, CD62-L-PE, CCR7-PE, CD107a-PE, Perforine-FITC, Granzyme-A-FITC, TNF- α -PE, GM-CSF-PE, TGF- β -PE, IL-2-PE, IL-4-PE, IL-5-PE, IL-13-PE, IL-21-PE, HLA-A/B/C (clone G46-2.6) (Becton Dickinson, Le Pont de Claix, France), CD8 β -PE, CD94-PE (clone HP-3B1), NKG2A-PE (clone Z199), KIR2DS1/2DL1-APC (clone EB6), KIR2DS2/2DL2/2DL3-APC (clone GL183), KIR2DS4 (clone FES172), KIR3DS1/3DL1-PE (clone ZIN273), ILT-2-PE (clone HPF1) (Beckman Coulters, Villepinte, France), NKG2C-PE (clone 134522), NKG2D-PE (clone 149810), IL-17F-PE (R&D, Lille, France), IL-22-PE, HLA-E (clone 3D12) (BioLegend, San Diego, CA) and HLA-I (clone W6.32, American Type Culture Collection).

Peptides and recombinant peptide/HLA-E monomers

Peptides VMAPRTL LL and VMAPRTL VL (HLA-A*01- and HLA-A*02-derived signal peptides respectively) with purity >85% were purchased from Eurogentec (Angers,

France). HLA-E*0101/peptide monomers were generated by the recombinant protein facility of SFR26 (Nantes, France).

Phenotypic characterization by flow cytometry

For membrane staining, 2×10^5 cells were incubated at 4°C with $10\mu\text{g/ml}$ of Ab (specific or isotype control) or tetramers for 30min or 1h respectively. When non-conjugated mAb were used, a second incubation with PE-conjugated goat F(ab')₂ fragment anti-Mouse IgG (Beckman Coulters) was performed. 5×10^4 cells were acquired in the viable cells gate on a FACScalibur flow cytometer using CellQuest software (Becton Dickinson).

Transient transfection of COS-7 cells and TNF assay

Briefly, 20×10^3 COS-7 cells were transfected with 100ng of HLA-E*0101 or HLA-E*0103 encoding plasmid by the DEAE-dextran-chloroquine method. 48h after transfection, 5×10^3 T cells were added to transfected COS-7 cells. Culture supernatants were harvested 6h later and tested for TNF content through assessment of the sensitive WEHI164 clone13 viability in a MTT colorimetric assay.

Intracellular staining

For cytokine/perforine/granzyme intracellular staining, 1×10^5 T cells were stimulated in the presence of Brefeldin A (Sigma-Aldrich, $10\mu\text{g/ml}$) with 2×10^5 target cells (B-EBV cells or HAEC) for 6h at 37°C , in the presence or not of blocking Abs. For peptide loading, target cells were incubated with peptides for 1h at 37°C before incubation with T cells. Cells were then fixed with 4% paraformaldehyde (Sigma-Aldrich), labeled with specific mAbs and analyzed by flow cytometry.

CD107a degranulation

1×10^5 T cells were stimulated with 2×10^5 target cells in the presence of anti-CD107a mAb. After 4h at 37°C , cells were analyzed by flow cytometry.

TCR- $\alpha\beta$ /CD3/CD8 downregulation

1×10^5 T cells were stimulated with 2×10^5 target cells at 37°C . After the indicated time, TCR- $\alpha\beta$ /CD3/CD8 fluorescence intensity was measured in unstimulated and activated lymphocytes. Relative fluorescence intensity (RFI) was calculated as sample mean fluorescence divided by isotype control mean fluorescence. Data were expressed as percentages of RFI that were calculated according to the following formula: (RFI of activated lymphocytes/RFI of unstimulated lymphocytes) $\times 100$.

Single-cell Ca^{2+} video imaging

Fura-2/AM loaded T cells ($1\mu\text{M}$, Invitrogen, Cergy-Pontoise, France) for 1h at room temperature in HBSS (Invitrogen) were resuspended in HBSS 1%FCS and seeded on Lab-Tek glass chamber slides (Nunc, Naperville, IL) coated with poly-L-lysine (Sigma-Aldrich). Target cells were left to adhere on glass slides before addition of T cells. Measurements of intracellular Ca^{2+} responses were performed at 37°C with a DMI 6000 B microscope (Leica Microsystems, Nanterre, France). Cells were illuminated every 15 s with a 300 W xenon lamp by using 340/10 nm and 380/10 nm excitation filters. Emission at 510 nm was used for analysis of Ca^{2+} responses and captured with a Cool Snap HQ2 camera (Roper, Tucson, AZ) and analyzed with Metafluor 7.1 imaging software (Universal Imaging, Downington, PA).

^{51}Cr release assay

Target cells were labeled with $100\mu\text{Ci}$ $\text{Na}^{51}\text{CrO}_4$ (Oris Industrie, Gif-sur-Yvette, France) for 1h at 37°C , and incubated 4h at 37°C , with effectors T cells at various E/T ratios. Then, $25\mu\text{l}$ of supernatants were mixed with $100\mu\text{l}$ of scintillation liquid (Optiphase Supermix, Wallak, United Kingdom) for measurement of radioactive content on a β plate counter (EG&G Wallac, Evry, France). Percentage of target cell lysis was calculated according to the following formula: [(experimental release - spontaneous release)/(maximum release - spontaneous release)] $\times 100$. Maximum and spontaneous releases were determined by,

respectively, adding 0.1% Triton X-100 or medium to ^{51}Cr -labeled target cells in the absence of T cells.

Redirected cytolytic activity

1×10^3 ^{51}Cr -labeled murine mastocytoma Fc γ R P815 cells were incubated with T cells at various E/T ratio, in the presence of different concentrations of anti-CD3 Ab (clone OKT3). CD3 redirected lysis of P815 cells was modulated by the presence of indicated anti-NKR Abs (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$). After 4h, measurement of radioactive content and determination of percentage of specific lysis were performed.

Results

Frequency and phenotypic characteristics of HLA-E-reactive CD8 T cells isolated from peripheral blood of a cytomegalovirus-seropositive kidney-transplant patient

Investigations of a cohort of renal transplant recipients[12] allowed us to identify an HLA-E-reactive CD8⁺ T cell population in PBL of a kidney transplant recipient with an active CMV infection. This HLA-E-restricted response was not observed on blood samples harvested before CMV infection (at one month post-transplantation) but appeared correlated with CMV infection 2 years post-transplantation, in association with a T cell response to pp65₄₉₅₋₅₀₃/A*0201 HCMV epitope. As shown in Figure 1A, recipient PBL activity, assessed by TNF- α production, was observed against COS-7 cells transfected with either HLA-E*0101 or HLA-E*0103 alleles whereas no response was observed with other HLA-I alleles tested. The HLA-E-reactive population was enriched and cloned. All the CD8 T cell clones derived (n=9) were HLA-E-reactive and characterized by the homogeneous expression of the TCRV β 22 (unpublished data). Notably, TCRV β 22⁺ cells represent a sizable fraction (6%) of freshly isolated recipient PBMC, comprising 14% of CD8⁺CD3⁺ T cells (unpublished data). This monoclonal population, thereafter named MART.22, is characterized by CD8 $\alpha\beta$ ⁺CD62L⁻CCR7⁻CD27⁻CD28^{+/-}CD45RA^{lo}CD45RO^{hi}CD57⁻ surface phenotype (unpublished data), suggesting that MART.22 belongs to the effector-memory cell compartment[38]. Moreover, MART.22 expresses CD56 consistent with the phenotype of HLA-E-restricted NK-CTL previously reported by the group of L. Moretta[13].

Requirement of co-engagement of TCR and CD8 for HLA-E-reactive CD8 T cells

To further characterize MART.22, we used the 721.221 B-EBV cell line (.221), lacking classical HLA class I molecules and HLA-G expression, and the 721.221-E cell line (.221-E), which has been stably transfected with the cDNA encoding HLA-E*0101 together with

the leader sequence peptide from HLA-B*08, that is required for HLA-E cell surface expression and stabilization[18]. The transfected .221-E cell line, that consistently expresses high levels of HLA-E (Supporting Figure 1), induced strong activation of MART.22, as assessed by TNF production (59% of TNF- α producing T cells) (Figure 1B, white histogram), whereas .221 cells were not recognized (Figure 3).

To assess the contribution of T cell receptor and HLA-E interaction to target cell recognition, we performed antibody blocking experiments and TCR down-regulation analysis. A dose-dependent reduction of TNF- α producing T cells was observed in the presence of anti-CD3 (until 5% vs 59%), anti-HLA-I molecules (W6/32, until 20% vs 59%) or anti-HLA-E molecules (3D12, until 2% vs 59%) blocking antibodies (Figure 1B). By contrast blocking antibody specific for HLA-A/B/C molecules (G46-2.6) had no inhibitory effect on this process. TCR implication was also confirmed by the significant down-regulation of surface CD3/TCR complex after MART.22 stimulation with 221-E cells (Figure 1C). Furthermore, using the same approaches, we showed the high degree of CD8 dependency of MART.22 (Figures 1B-C). Together, these data confirm HLA-E restriction of MART.22 and unveil its strong CD8 dependency.

Peptide specificity of HLA-E-restricted CD8 T cells

Next, to investigate MART.22 peptide specificity, we test its ability to recognize .221 cells exogenously loaded with six HLA-E-restricted synthetic peptides (Table 1). This peptide set included the three previously described peptides derived from the UL40 protein of different human CMV strains[39,40] and the peptides derived from the majority of HLA-I leader sequences, including autologous HLA-I from the transplant recipient. We found that MART.22 recognized .221 cells pulsed with 3 out of 6 peptides tested (Figure 2A). The VMAPRTLILL peptide was recognized with the highest avidity (EC50 at $1 \times 10^{-2} \mu\text{M}$). This peptide is derived from both the UL40 of the clinically isolate CMV 3C strain[39] and the

leader sequence of various allogeneic HLA-A and HLA-C molecules. MART.22 also recognized with high avidity the VMAPRTVLL peptide (EC50 at $2 \times 10^{-2} \mu\text{M}$), which is derived from the leader sequence of various allogeneic HLA-B, including the HLA-B*08, molecules, thus providing explanation for the recognition of .221-E cells expressing HLA-B*08 leader sequence. MART.22 also recognized, albeit to a lesser extent (EC50 at $4 \times 10^{-2} \mu\text{M}$), the VMAPRTLIL peptide that derived from the UL40 of the laboratory CMV AD169 strain[39,40]. This latter result was unexpected as this peptide also derives from the leader sequence of various HLA-C molecules, including the two autologous HLA-C alleles of the patient (ie HLA-Cw*1402 and -Cw*0501). The three other tested peptides (VTAPRTLLL, VTAPRTVLL and VMAPRTLVL) were not recognized at all, pinpointing to the importance of a methionine and of a leucine or an isoleucine at position 2 and 8 respectively to allow peptide recognition. To further substantiate our data on MART.22 peptide specificity, we used HLA-E*0101 tetramers refolded with either VMAPRTLLL or VMAPRTLVL peptides. As expected, Figure 2B shows the ability of MART.22 to bind HLA-E/VMAPRTLLL tetramers whereas no significant binding was observed with tetramers refolded with the unrecognized VMAPRTLVL peptide.

Functional characteristics of HLA-E-restricted CD8 T cells

Functional characterization of MART.22 was assessed using .221-E stimulating cells. As shown in Figure 3A, incubation with .221-E cells triggered a strong and rapid elevation in intracellular free calcium (Ca^{2+}) concentration within MART.22 while no significant Ca^{2+} signal was detected when untransfected .221 cells were used. With regard to its potential ability to develop lytic response, incubation with .221-E cells induced MART.22 degranulation as demonstrated by the high CD107a surface mobilization (77% of CD107a positive T cells) and perforin/granzyme production (Figure 3B and unpublished data). This leads to the lysis of .221-E cells as assessed with a standard ^{51}Cr release assay (Fig. 3C).

As shown in Figure 3D, MART.22 was also found to produce high levels of TNF- α (78% of producing cells), IFN- γ (64%) and to a lower extent GM-CSF (31%), IL-2 (18%), IL-13 (17%) and IL-4 (13%). Conversely, no production of IL-5, IL-17F, IL-21, IL-22 or TGF- β was detected (unpublished data). These data emphasize the strong granzyme-dependent cytolytic and TNF- α /IFN- γ secretion capacities of MART.22.

Regulation of HLA-E-restricted CD8 T cells activity by NKR

As previous studies on HLA-E-restricted NK-CTL reported surface expression of HLA class I-specific inhibitory NK receptors (NKR), we investigated NKR expression on MART.22 (Figure 4A). MART.22 was strongly stained by the GL183 antibody, which recognizes KIR2DS2, KIR2DL2 and KIR2DL3. The combined use of KIR-specific mAbs[41] allowed us to identify the inhibitory KIR2DL2 as the KIR expressed by MART.22 (unpublished data). Surface expression of ILT-2, NKG2-D and CD94 were also observed. Surprisingly, CD94 expression was not associated with NKG2-A or NKG2-C surface expression. In order to address the functionality of these receptors, we analyzed, in a redirected lysis assay, the ability of anti-NKR mAbs to modulate MART.22 TCR dependent lysis. As shown in Figure 4B, anti-CD3 mAb induced cytolytic activity was strongly inhibited by the addition of anti-KIR2DL2 mAb. Lysis was also inhibited, although to a lesser extent, by the addition of anti-ILT-2 mAb while it was slightly increased in presence of anti-NKG2-D mAb. However, addition of anti-CD94 mAb did not affect the lysis efficiency, clearly indicating the non-functionality of the CD94 receptor expressed by MART.22. Taken together, our data clearly indicate that the activity of HLA-E-restricted T cells can be modulated by competing positive or negative signals transduced by NKR, with especially efficient inhibition through KIR2DL2 ligation. Interestingly, autologous MART.22 HLA-C molecules (HLA-Cw*0501 and *1402) are ligands for the KIR2DL2 receptor[42]. Since these HLA-C molecules also provide a recognized HLA-E-

bound peptide (Figure 2A and Table 2), this allowed us to hypothesize that inhibitory KIR2DL2 expression by MART.22 dampens its detrimental auto-reactivity against healthy (not CMV infected) autologous cells through ligation of autologous protective HLA-C molecules. Accordingly, when incubated in the presence of anti-KIR2DL2/DS2/DL3 or HLA-A/B/C blocking Abs, MART.22 developed fratricide response (Supporting Figure 2).

HLA-E-restricted CD8 T cells reactivity against allogeneic endothelial cells

Since we demonstrated that peptides derived from both CMV-UL40 and allogeneic HLA-I molecules can be recognized by MART.22 in an HLA-E-restricted fashion, we asked whether MART.22 could also recognize and damage allogeneic endothelial cells and therefore represent a risk factor for allograft outcome. To this end, primary human arterial endothelial cell (HAEC) cultures, isolated from kidney transplant donors were tested *in vitro* for their capacity to activate MART.22. HLA-I typing of the seven endothelial cell cultures tested as well as their capacity to provide recognized peptides or to interact with KIR2DL2 are documented in Table 2. All EC cultures expressed HLA-I molecules carrying peptides potentially recognized in the HLA-E context. The CMV serologic status of EC donors is also indicated. While surface HLA-E staining levels were similar on all EC cultures tested (Figure 5A and unpublished data), six out of seven EC cultures induced efficient cytokine responses of MART.22, as illustrated by TNF- α production (from 24% to 75% of T cells) (Figure 5B and Table 2). Moreover, MART.22 develops cytolytic responses against recognized endothelial cells, as assessed by CD107a surface expression (from 8% to 68% of T cells) (Figure 5C and Table 2). In accordance with recognition of both allelic forms of HLA-E by MART.22 (Figure 1A), endothelial cells are recognized independently of their HLA-E haplotype and with no correlation to CMV infection (mean value, 42% of TNF producing T cells for CMV negative versus 41% for CMV positive patients), suggesting the direct recognition of allogeneic HLA-I derived peptides in an

HLA-E-restricted fashion. Thus, HLA-E-restricted T cells could represent a risk factor for allograft outcome through recognition of allogeneic graft endothelial cells.

Tight regulation of HLA-E-restricted CD8 T cells alloreactivity by KIR2DL2

As mentioned above, in an unexpected way, one EC culture (HAEC#402), with no apparent defect in surface HLA-E expression levels, was not recognized by MART.22 (Figure 5A). To ascertain this was not the consequence of the specific lack of expression of HLA-I molecules encoding recognized peptides, we investigated whether incubation with the two best-recognized synthetic peptides could render these endothelial cells more susceptible to recognition by MART.22. As shown on Figure 6A, pulsing of the otherwise resistant HAEC#402 with VMAPRTLII and VMAPRTVLL induced TNF- α production by MART.22 but only with saturating amounts of peptides (respectively 40% and 18% of TNF secreting T cells when HAEC#402 were loaded with $10^2\mu\text{M}$ of peptides). Similar results were obtained with another poorly recognized EC culture (unpublished data), suggesting another mechanism conferring resistance to recognition. As we showed that MART.22 reactivity is strongly regulated by the inhibitory KIR2DL2, we investigated whether HAEC suboptimal recognition was indeed the consequence of the expression of protective HLA-C molecules (ie KIR2DL2 ligands)[42,43,44]. Interestingly, HLA-C haplotype crucially influence the MART.22 alloreactivity: endothelial cells possessing two appropriate HLA-C alleles (HAEC#116, #337 and #402) are less recognized (mean value, 18% of TNF producing T cells) than those bearing only one (HAEC#112, #331 and #495, 54% of TNF producing T cells) or no (HAEC#323, 75%) (Figure 6B). This was confirmed by assessing the effect of blocking antibodies on endothelial cells recognition by MART.22. As shown on Figure 6C, addition of KIR2DL2-blocking Abs and, to a lesser extent, of anti-HLA-A/B/C Abs efficiently restore the HAEC#402 recognition by MART.22 in a dose dependent manner (up to 40% and 25% respectively), whereas

addition of blocking Ab to ILT-2 had no significant effect. These results underline the tight regulation of HLA-E-restricted allo-reactivity by KIR2DL2 receptors through their recognition of HLA-C molecules expressed on target cells.

Effect of IFN- γ treatment on endothelial cells recognition by HLA-E-restricted CD8 T cells

Chronic CMV infections result in recruitment of inflammatory cells and mediators such as chemokines and cytokines including IFN- γ [4]. So, we analyzed the impact of IFN- γ treatment of EC cultures on their recognition by MART.22. As we previously reported[30], IFN- γ treatment enhances both HLA-E and total HLA-I surface expression on endothelial cells (Figure 7A and unpublished data). However, IFN- γ treatment of endothelial cells resulted in decreased MART.22 mediated lysis and cytokine production (Figures 7B-C). The percentage of TNF- α producing T cells upon stimulation with the HAEC#495 fell from 61% to 33% after IFN- γ treatment. Experiments performed with a less recognized EC culture show that MART.22 reactivity against IFN- γ treated HAEC#116 was completely abolished (unpublished data). To investigate whether the inhibitory effect of IFN- γ treatment was the consequence of an increased expression of inhibitory NKR ligands by endothelial cells, we performed antibody blocking experiments. First, anti-KIR2DL2 and anti-ILT-2 antibodies had little or no effect on recognition of the untreated HAEC#495 culture. In contrast, these antibodies, especially the anti-KIR2DL2 mAb, improved in a dose dependent manner the recognition of IFN- γ treated endothelial cells (71% vs 36% of TNF- α producing T cells for the maximal dose of anti-KIR2DL2 Ab) (Figure 7D). In the same way, mAb directed against classical HLA-I molecules, which are ligands of both KIR2DL2 and ILT-2, greatly enhanced recognition of IFN- γ treated endothelial cells recognition (69% vs 36% of TNF- α producing T cells for the maximal dose of Ab). Taken

together, these data underline the crucial role of inhibitory NKR ligands which expression on EC is a determining factor for HLA-E-restricted T cells reactivity.

Discussion

In conclusion, this study demonstrates for the first time the ability of CMV-committed HLA-E-restricted T cells from transplant recipient to recognize and lyse allogeneic endothelial cells thereby emphasizing their potential detrimental alloreactivity upon solid organ transplantation.

A function for HLA-E as a restricting element for the TCR of $\alpha\beta$ T cells has been clearly established[21] and therefore can play a role in the adaptive immune response in addition to its well-known regulation of innate immunity[45,46]. The HLA-E-restricted CD8 $\alpha\beta$ T cell population described in this study appears in association with a T cell response to classical HLA I-restricted HCMV epitope (pp65/A*02) in the blood of a kidney transplant recipient with an active CMV infection. Thus, HLA-E-restricted T cells may be induced *in vivo* in recipient patients as a consequence of CMV infection or reactivation, suggesting their possible role in the immune adaptative response to CMV. Various CMV proteins inhibit MHC class Ia surface expression impeding the control mediated by conventional (i.e. MHC class Ia-restricted) CD8 T cells[47,48]. Therefore, the capacity of CMV, through the expression of UL40, to supply HLA-E-binding peptides allowing increase of HLA-E surface expression in infected cells[40], strengthen that CMV-committed HLA-E-restricted T cells may have a particular relevance in the immune defense against CMV.

In accordance with previous studies showing that CMV-committed HLA-E-restricted T cells represent a pauciclonal population comprising a sizable fraction of CD8 $\alpha\beta$ T cells in CMV-seropositive patients[15,49], the population described in this study expresses homogeneously a given TCR owing to its monoclonal origin and constitutes a significant component of peripheral blood mononuclear cells (14% of CD8⁺CD3⁺ T cells). Moreover, we showed that this population has phenotypic characteristics of effector-

memory lymphocytes and displays strong granzyme-dependent cytolytic and TNF- α /IFN- γ secretion capacities, suggesting that they could play a relevant role in the control of CMV infection.

As three different HLA-E-binding HCMV-UL40-derived peptides have been previously described, we investigated the specificity of our HLA-E-restricted T cells. Previous studies from the group of L. Moretta have characterized HLA-E-restricted T cells reacting against peptides (i.e. VMAPRTLIL and VMAPRTLVL) derived from the UL40 of 2 HCMV laboratory strains (Toledo and AD169 strains)[15]. The HLA-E-restricted T cell population described here reacts against the additional UL40 derived-peptide, VMAPRTLLL, that has been shown to derive from the clinical isolate HCMV 3C strain.

Because recognized peptides also derived from the leader sequences of numerous allogeneic HLA-I alleles, CMV-committed HLA-E-restricted T cells have potential to mediate allograft rejection through direct recognition of allogeneic HLA-I derived-peptides presented by HLA-E on graft cells. In a previous study, we showed that HLA-E protein expression in normal human organs is mainly restricted to endothelial cells and leucocytes[30]. Hence, owing to the crucial role of endothelial cells in allo-antigen presentation to T cells[8] and to the HCMV tropism for endothelial cells[5,7], we investigated whether HLA-E-restricted T cells could recognize primary endothelial cells cultures, isolated from kidney allografts. We clearly demonstrate that CMV-committed HLA-E-restricted CD8 T cells can efficiently recognized and killed allogeneic endothelial cells *in vitro*, independently of their HLA-E allotype. Therefore, because immunosuppressed transplant patients are particularly prone to CMV infection, we can speculate that in the context of both CMV reactivation or primary infections, while these T cells have potential to contribute to infection control, they may also directly recognize allogeneic graft endothelial cells and thereby contribute to allograft rejection.

As suggested by previous studies, we clearly demonstrated that CMV-committed HLA-E-restricted T cell allo-reactivity is tightly regulated by NK receptors[50]. We first showed surface expression of KIR2DL2, ILT-2, NKG2D and CD94 receptors by MART.22. Surprisingly, CD94 surface expression was not associated with that of NKG2-A or NKG2-C molecules and did not allow interaction with HLA-E tetramer refolded with HLA-A2 peptide, suggesting the expression of CD94 homodimers as previously described[51]. Finally, we demonstrated the non-functionality of this receptor. All the other expressed NK receptors were found to be functional, with a predominant role in preventing target cell recognition for the highly expressed inhibitory KIR2DL2 through ligation of appropriated (protective) HLA-C molecules[42]. The expression of KIR2DL2 appears to constitute a safety mechanism avoiding harmful autoreactivity through the ligation of protective autologous HLA-C molecules. As a consequence, the ability of HLA-E-restricted T cells to mediate alloreactivity against endothelial cells was crucially impacted by the expression of protective HLA-C alleles. Thus, allogeneic endothelial cells that express protective HLA-C molecules, or that were pre-treated with INF- γ , were less recognized by HLA-E-restricted T cells, unless specific blocking antibodies (i.e. anti-KIR2DL2 or anti-HLA-A/B/C) were added to the cultures. This underlines the crucial impact of HLA-C haplotype of target cells on their ability to trigger, or not, an allogeneic HLA-E-restricted T cell response. Therefore, HLA-C haplotypes that are still underestimated in transplantation setting should be reconsidered and taken into account[52,53].

In conclusion, we demonstrated, for the first time, that immune control of CMV infection in transplanted patient trigger HLA-E-restricted T cells that can mediate detrimental vascularized allograft rejection via endothelial cells lysis. Therefore, CMV-committed HLA-E restricted T cells could account for the well-established association

between CMV-infection and accelerated allograft rejection. As HLA-E is also expressed in leucocytes, the involvement of HLA-E-restricted T cells in the immunological response following allogeneic hematopoietic stem cell transplantation should also be addressed, as it has been suggested by studies using transgenic mice[32]. Moreover, we provided strong evidence that HLA-C/NKR mismatch is a key player in HLA-E-restricted T cells alloreactivity. Thus, graft organ HLA-C haplotypes may impact on CMV-committed HLA-E-restricted T cells capacity to mediate allograft rejection. Hence, a deeper evaluation of the frequency and the role of CMV-committed HLA-E-restricted T cells in transplantation and of the impact of HLA-C haplotype on their alloreactivity, may determine whether this indeed represents an additional risk factor following solid organ transplantation.

Acknowledgements

The authors thank the tetramer production facility and the Cellular and Tissular Imaging Core Facility (MicroPICell) of the SFR Santé (Nantes, France) for the production of HLA-E monomers and for technical and scientific assistance on video-imaging. The authors also thank Dr Christelle Retière and Gaelle David (EFS, Nantes, France) for technical assistance and analysis of KIR phenotyping and Nathalie Gérard (UMR 1064, Nantes, France) for HLA-E allotyping. We acknowledge Dr. M. Bonneville for carefully reading the manuscript.

References

1. Husain S, Pietrangeli CE, Zeevi A (2009) Delayed onset CMV disease in solid organ transplant recipients. *Transpl Immunol* 21: 1-9.
2. Rowshani AT, Bemelman FJ, van Leeuwen EM, van Lier RA, ten Berge IJ (2005) Clinical and immunologic aspects of cytomegalovirus infection in solid organ transplant recipients. *Transplantation* 79: 381-386.
3. Fisher RA (2009) Cytomegalovirus infection and disease in the new era of immunosuppression following solid organ transplantation. *Transpl Infect Dis* 11: 195-202.
4. Streblow DN, Orloff SL, Nelson JA (2007) Acceleration of allograft failure by cytomegalovirus. *Curr Opin Immunol* 19: 577-582.
5. Adler B, Sinzger C (2009) Endothelial cells in human cytomegalovirus infection: one host cell out of many or a crucial target for virus spread? *Thromb Haemost* 102: 1057-1063.
6. Guetta E, Scarpati EM, DiCorleto PE (2001) Effect of cytomegalovirus immediate early gene products on endothelial cell gene activity. *Cardiovasc Res* 50: 538-546.
7. Sacher T, Mohr CA, Weyn A, Schlichting C, Koszinowski UH, et al. (2012) The role of cell types in cytomegalovirus infection in vivo. *Eur J Cell Biol* 91: 70-77.
8. Al-Lamki RS, Bradley JR, Pober JS (2008) Endothelial cells in allograft rejection. *Transplantation* 86: 1340-1348.
9. Amir AL, D'Orsogna LJ, Roelen DL, van Loenen MM, Hagedoorn RS, et al. (2010) Allo-HLA reactivity of virus-specific memory T cells is common. *Blood* 115: 3146-3157.
10. D'Orsogna LJ, Roelen DL, Doxiadis II, Claas FH (2010) Alloreactivity from human viral specific memory T-cells. *Transpl Immunol* 23: 149-155.
11. Gamadia LE, Remmerswaal EB, Surachno S, Lardy NM, Wertheim-van Dillen PM, et al. (2004) Cross-reactivity of cytomegalovirus-specific CD8+ T cells to allo-major histocompatibility complex class I molecules. *Transplantation* 77: 1879-1885.
12. Morice A, Charreau B, Neveu B, Brouard S, Soulillou JP, et al. (2010) Cross-reactivity of herpesvirus-specific CD8 T cell lines toward allogeneic class I MHC molecules. *PLoS One* 5: e12120.
13. Pietra G, Romagnani C, Falco M, Vitale M, Castriconi R, et al. (2001) The analysis of the natural killer-like activity of human cytolytic T lymphocytes revealed HLA-E as a novel target for TCR alpha/beta-mediated recognition. *Eur J Immunol* 31: 3687-3693.
14. Pietra G, Romagnani C, Manzini C, Moretta L, Mingari MC (2010) The emerging role of HLA-E-restricted CD8+ T lymphocytes in the adaptive immune response to pathogens and tumors. *J Biomed Biotechnol* 2010: 907092.
15. Pietra G, Romagnani C, Mazzarino P, Falco M, Millo E, et al. (2003) HLA-E-restricted recognition of cytomegalovirus-derived peptides by human CD8+ cytolytic T lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100: 10896-10901.
16. Romagnani C, Pietra G, Falco M, Millo E, Mazzarino P, et al. (2002) Identification of HLA-E-specific alloreactive T lymphocytes: a cell subset that undergoes preferential expansion in mixed lymphocyte culture and displays a broad cytolytic activity against allogeneic cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99: 11328-11333.
17. Strong RK, Holmes MA, Li P, Braun L, Lee N, et al. (2003) HLA-E allelic variants. Correlating differential expression, peptide affinities, crystal structures, and thermal stabilities. *J Biol Chem* 278: 5082-5090.

18. Lee N, Goodlett DR, Ishitani A, Marquardt H, Geraghty DE (1998) HLA-E surface expression depends on binding of TAP-dependent peptides derived from certain HLA class I signal sequences. *J Immunol* 160: 4951-4960.
19. Braud VM, Allan DS, O'Callaghan CA, Soderstrom K, D'Andrea A, et al. (1998) HLA-E binds to natural killer cell receptors CD94/NKG2A, B and C. *Nature* 391: 795-799.
20. Lee N, Llano M, Carretero M, Ishitani A, Navarro F, et al. (1998) HLA-E is a major ligand for the natural killer inhibitory receptor CD94/NKG2A. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95: 5199-5204.
21. Hoare HL, Sullivan LC, Pietra G, Clements CS, Lee EJ, et al. (2006) Structural basis for a major histocompatibility complex class Ib-restricted T cell response. *Nat Immunol* 7: 256-264.
22. van Hall T, Oliveira CC, Joosten SA, Ottenhoff TH (2010) The other Janus face of Qa-1 and HLA-E: diverse peptide repertoires in times of stress. *Microbes Infect* 12: 910-918.
23. Joosten SA, van Meijgaarden KE, van Weeren PC, Kazi F, Geluk A, et al. (2010) Mycobacterium tuberculosis peptides presented by HLA-E molecules are targets for human CD8 T-cells with cytotoxic as well as regulatory activity. *PLoS Pathog* 6: e1000782.
24. Salerno-Goncalves R, Fernandez-Vina M, Lewinsohn DM, Szein MB (2004) Identification of a human HLA-E-restricted CD8+ T cell subset in volunteers immunized with Salmonella enterica serovar Typhi strain Ty21a typhoid vaccine. *J Immunol* 173: 5852-5862.
25. Garcia P, Llano M, de Heredia AB, Willberg CB, Caparros E, et al. (2002) Human T cell receptor-mediated recognition of HLA-E. *Eur J Immunol* 32: 936-944.
26. Schulte D, Vogel M, Langhans B, Kramer B, Korner C, et al. (2009) The HLA-E(R)/HLA-E(R) genotype affects the natural course of hepatitis C virus (HCV) infection and is associated with HLA-E-restricted recognition of an HCV-derived peptide by interferon-gamma-secreting human CD8(+) T cells. *J Infect Dis* 200: 1397-1401.
27. Sensi M, Pietra G, Molla A, Nicolini G, Vegetti C, et al. (2009) Peptides with dual binding specificity for HLA-A2 and HLA-E are encoded by alternatively spliced isoforms of the antioxidant enzyme peroxiredoxin 5. *Int Immunol* 21: 257-268.
28. Jiang H, Canfield SM, Gallagher MP, Jiang HH, Jiang Y, et al. (2010) HLA-E-restricted regulatory CD8(+) T cells are involved in development and control of human autoimmune type 1 diabetes. *J Clin Invest* 120: 3641-3650.
29. Oliveira CC, van Veelen PA, Querido B, de Ru A, Sluijter M, et al. (2010) The nonpolymorphic MHC Qa-1b mediates CD8+ T cell surveillance of antigen-processing defects. *J Exp Med* 207: 207-221.
30. Coupel S, Moreau A, Hamidou M, Horejsi V, Soullillou JP, et al. (2007) Expression and release of soluble HLA-E is an immunoregulatory feature of endothelial cell activation. *Blood* 109: 2806-2814.
31. Choi J, Enis DR, Koh KP, Shiao SL, Pober JS (2004) T lymphocyte-endothelial cell interactions. *Annu Rev Immunol* 22: 683-709.
32. Pacasova R, Martinozzi S, Boulouis HJ, Ulbrecht M, Vieville JC, et al. (1999) Cell-surface expression and alloantigenic function of a human nonclassical class I molecule (HLA-E) in transgenic mice. *J Immunol* 162: 5190-5196.
33. Saulquin X, Ibisch C, Peyrat MA, Scotet E, Hourmant M, et al. (2000) A global appraisal of immunodominant CD8 T cell responses to Epstein-Barr virus and cytomegalovirus by bulk screening. *Eur J Immunol* 30: 2531-2539.

34. Gervois N, Labarriere N, Le Guiner S, Pandolfino MC, Fonteneau JF, et al. (2000) High avidity melanoma-reactive cytotoxic T lymphocytes are efficiently induced from peripheral blood lymphocytes on stimulation by peptide-pulsed melanoma cells. *Clin Cancer Res* 6: 1459-1467.
35. Coupel S, Leboeuf F, Boulday G, Soullou JP, Charreau B (2004) RhoA activation mediates phosphatidylinositol 3-kinase-dependent proliferation of human vascular endothelial cells: an alloimmune mechanism of chronic allograft nephropathy. *J Am Soc Nephrol* 15: 2429-2439.
36. Braud VM, Allan DS, Wilson D, McMichael AJ (1998) TAP- and tapasin-dependent HLA-E surface expression correlates with the binding of an MHC class I leader peptide. *Curr Biol* 8: 1-10.
37. De Plaen E, Lurquin C, Lethe B, van der Bruggen P, Brichard V, et al. (1997) Identification of genes coding for tumor antigens recognized by cytolytic T lymphocytes. *Methods* 12: 125-142.
38. Klebanoff CA, Gattinoni L, Restifo NP (2006) CD8+ T-cell memory in tumor immunology and immunotherapy. *Immunol Rev* 211: 214-224.
39. Cerboni C, Mousavi-Jazi M, Wakiguchi H, Carbone E, Karre K, et al. (2001) Synergistic effect of IFN-gamma and human cytomegalovirus protein UL40 in the HLA-E-dependent protection from NK cell-mediated cytotoxicity. *Eur J Immunol* 31: 2926-2935.
40. Tomasec P, Braud VM, Rickards C, Powell MB, McSharry BP, et al. (2000) Surface expression of HLA-E, an inhibitor of natural killer cells, enhanced by human cytomegalovirus gpUL40. *Science* 287: 1031.
41. David G, Morvan M, Gagne K, Kerdudou N, Willem C, et al. (2009) Discrimination between the main activating and inhibitory killer cell immunoglobulin-like receptor positive natural killer cell subsets using newly characterized monoclonal antibodies. *Immunology* 128: 172-184.
42. Moesta AK, Norman PJ, Yawata M, Yawata N, Gleimer M, et al. (2008) Synergistic polymorphism at two positions distal to the ligand-binding site makes KIR2DL2 a stronger receptor for HLA-C than KIR2DL3. *J Immunol* 180: 3969-3979.
43. Pende D, Marcenaro S, Falco M, Martini S, Bernardo ME, et al. (2009) Anti-leukemia activity of alloreactive NK cells in KIR ligand-mismatched haploidentical HSCT for pediatric patients: evaluation of the functional role of activating KIR and redefinition of inhibitory KIR specificity. *Blood* 113: 3119-3129.
44. Schonberg K, Sribar M, Enczmann J, Fischer JC, Uhrberg M (2011) Analyses of HLA-C-specific KIR repertoires in donors with group A and B haplotypes suggest a ligand-instructed model of NK cell receptor acquisition. *Blood* 117: 98-107.
45. Rodgers JR, Cook RG (2005) MHC class Ib molecules bridge innate and acquired immunity. *Nat Rev Immunol* 5: 459-471.
46. Sullivan LC, Clements CS, Rossjohn J, Brooks AG (2008) The major histocompatibility complex class Ib molecule HLA-E at the interface between innate and adaptive immunity. *Tissue Antigens* 72: 415-424.
47. Reddehase MJ (2002) Antigens and immunoevasins: opponents in cytomegalovirus immune surveillance. *Nat Rev Immunol* 2: 831-844.
48. Wilkinson GW, Tomasec P, Stanton RJ, Armstrong M, Prod'homme V, et al. (2008) Modulation of natural killer cells by human cytomegalovirus. *J Clin Virol* 41: 206-212.
49. Mazzarino P, Pietra G, Vacca P, Falco M, Colau D, et al. (2005) Identification of effector-memory CMV-specific T lymphocytes that kill CMV-infected target cells in an HLA-E-restricted fashion. *Eur J Immunol* 35: 3240-3247.

50. Moretta L, Romagnani C, Pietra G, Moretta A, Mingari MC (2003) NK-CTLs, a novel HLA-E-restricted T-cell subset. *Trends Immunol* 24: 136-143.
51. Jabri B, Selby JM, Negulescu H, Lee L, Roberts AI, et al. (2002) TCR specificity dictates CD94/NKG2A expression by human CTL. *Immunity* 17: 487-499.
52. Takemoto S, Port FK, Claas FH, Duquesnoy RJ (2004) HLA matching for kidney transplantation. *Hum Immunol* 65: 1489-1505.
53. van Bergen J, Thompson A, Haasnoot GW, Roodnat JJ, de Fijter JW, et al. (2011) KIR-ligand mismatches are associated with reduced long-term graft survival in HLA-compatible kidney transplantation. *Am J Transplant* 11: 1959-1964.

Figures

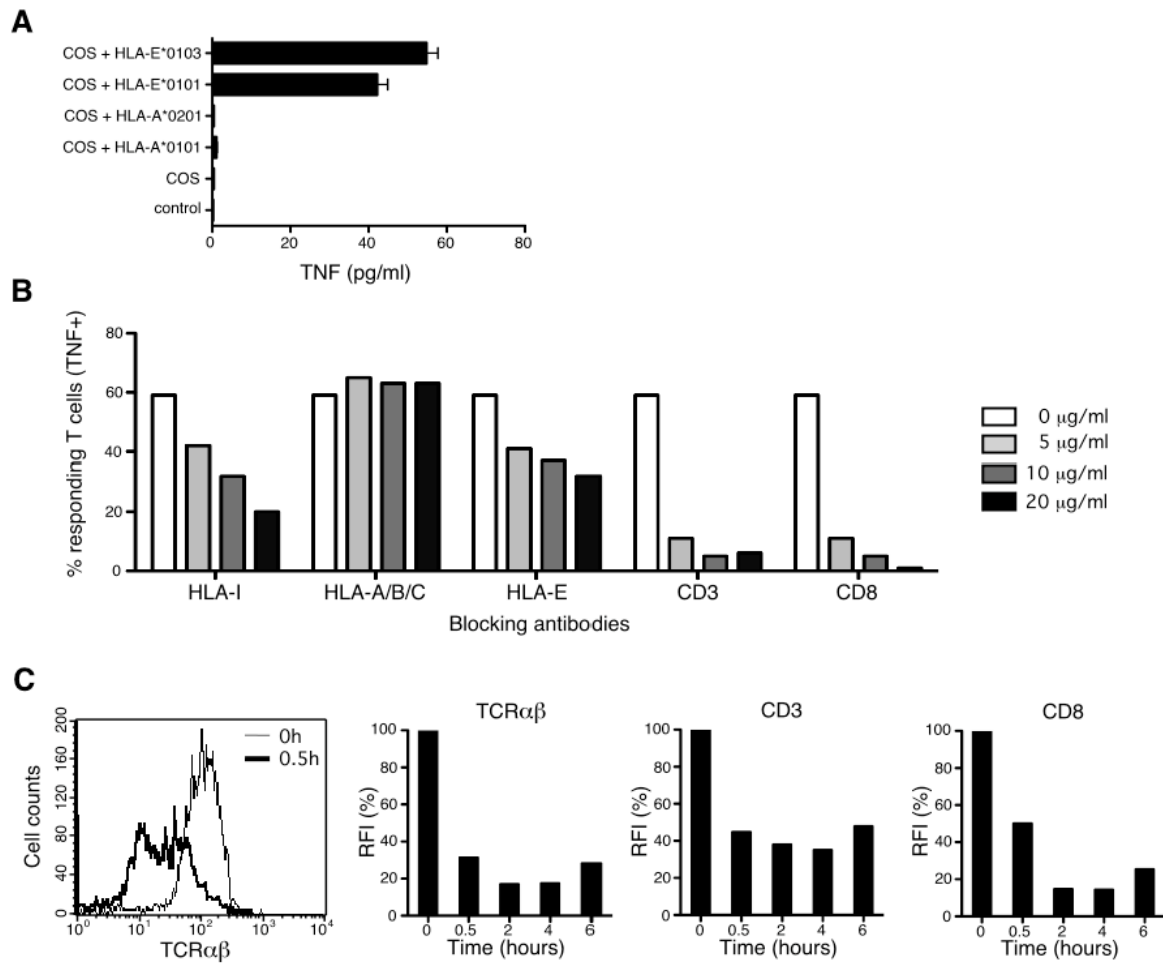


Figure 1. Characterization of HLA-E-restricted T cells in PBL of a kidney transplant patient undergoing CMV infection

A/ PBL reactivity against COS-7 cells transfected, or not, with HLA-I encoding cDNA was assessed by a TNF release assay. Means and standard deviations of sixplicates are shown. B/ TNF production in response to HLA-E transfected .221-E cells in the presence of blocking antibodies. MART.22 was stimulated with target cells in the presence or not of blocking antibodies directed against total HLA-I, HLA-A/B/C, HLA-E, CD3 and CD8 molecules at the indicated concentrations. After 6h, T cells were fixed, permeabilized and stained for intracellular TNF- α . Results are expressed as percentage of TNF-producing T cells. C/ Time course of TCR $\alpha\beta$, CD3 and CD8 surface expression on HLA-E-restricted CD8 T cells stimulated with .221-E cells. A representative FACS analysis of TCR $\alpha\beta$ at early time course is shown (left panel). Results are expressed as percentages of RFI (as defined in Material and Methods).

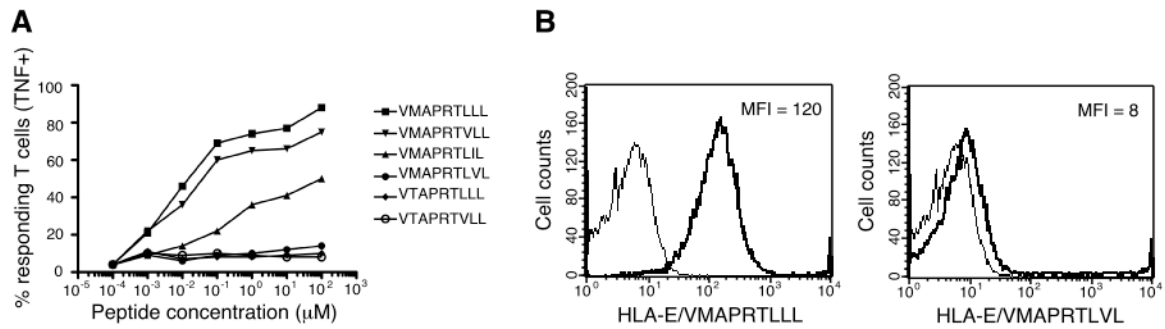


Figure 2. Characterization of CMV/HLA-I-derived peptides recognized by HLA-E-restricted CD8 T cells

A/ TNF production in response to stimulation with .221 cells pulsed with synthetic peptides. .221 cells were incubated for 1h with range concentrations of the indicated peptides before addition of MART.22 T cells. After 6h, T cells were fixed, permeabilized and stained for intracellular TNF- α . Results are expressed as percentage of TNF-producing T cells. B/ Peptide-MHC tetramer staining of HLA-E-restricted CD8 T cells. MART.22 T cells were incubated for 1h with biotinylated HLA-E monomers refolded with the indicated peptides and tetramerized with PE-coupled streptavidin. Peptide-HLA-E tetramers staining was assessed by flow cytometry and MFI are indicated.

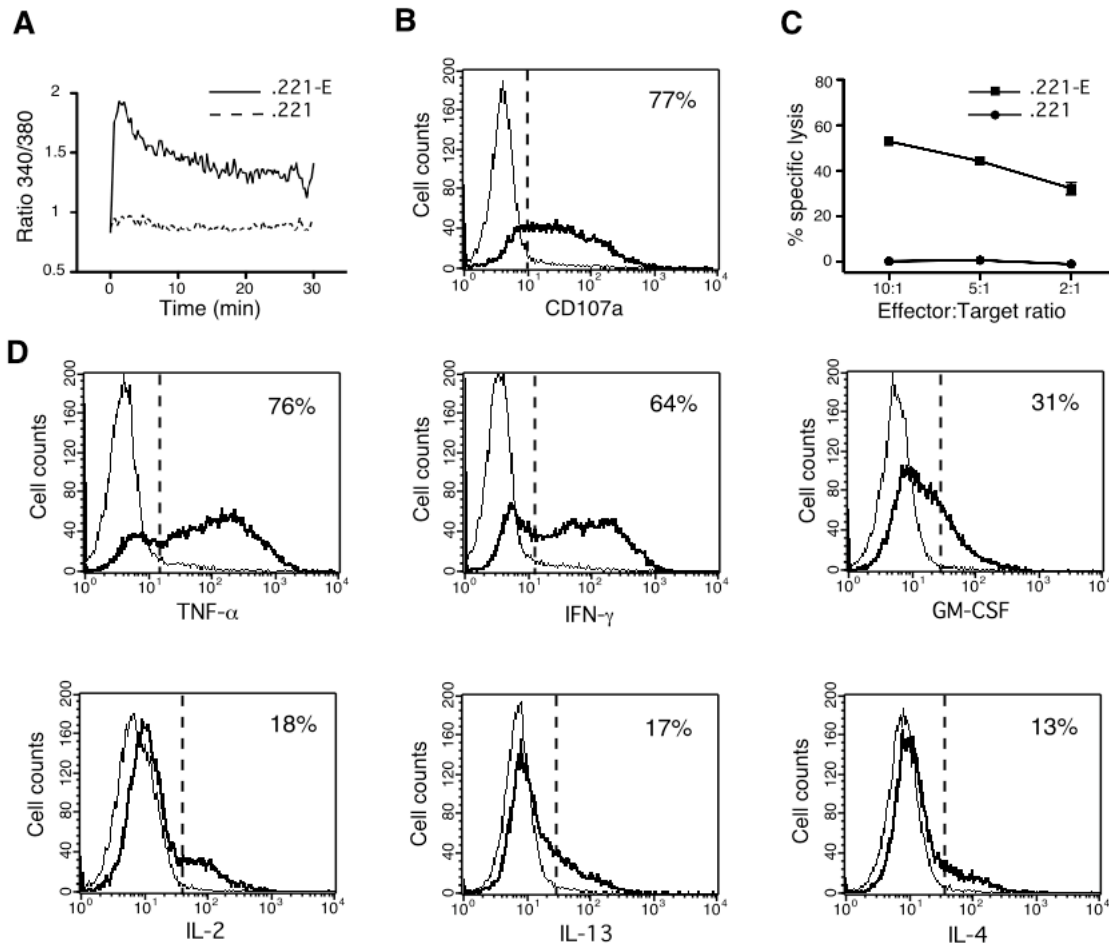


Figure 3. Functional characterization of HLA-E-restricted CD8 T cells

A/ Induction of strong and rapid Ca^{2+} responses within activated HLA-E-restricted CD8 T cells. B-EBV 721.221 cells transfected (.221-E) or not (.221) with HLA-E and the leader sequence of HLA-B*08, were incubated with MART.22 T cells loaded with Fura-2 (1:1 ratio). T cell intracellular Ca^{2+} levels were monitored by videomicroscopy for the indicated acquisition time. Graphs represent the kinetics of intracellular Ca^{2+} levels (340/380nm ratio). Values correspond to the mean of emission measured among all T cells present in the field (approximately 20 cells per experiment). Results are representative of two independent experiments. B/ Degranulation of HLA-E-restricted CD8 T cells upon stimulation. .221-E cells (thick line) or .221 cells (thin line) were incubated for 4h with MART.22 T cells in the presence of anti-CD107a antibody. Results are expressed as percentages of surface CD107a positives T cells upon stimulation with .221-E cells. C/ Cytotoxic activity of HLA-E restricted CD8 T cells. 10^3 ^{51}Cr -labeled .221-E cells (squares) or .221 cells (circles) were co-cultured for 4h with MART.22 T cells at various E/T ratios. Cytotoxic activity was assessed through measure of Chromium release in the supernatants. Percentages of specific lysis are indicated. Means and standard deviations of triplicate wells are shown for one out of three comparable experiments. D/ Cytokine production analysis of HLA-E restricted CD8 T cells. MART.22 T cells were fixed, permeabilized and stained for intracellular cytokines following 6h of incubation with .221-E cells (thick line) or .221 cells (thin line). Data are expressed as mean % of intracellular cytokine secreting cells upon stimulation with .221-E cells.

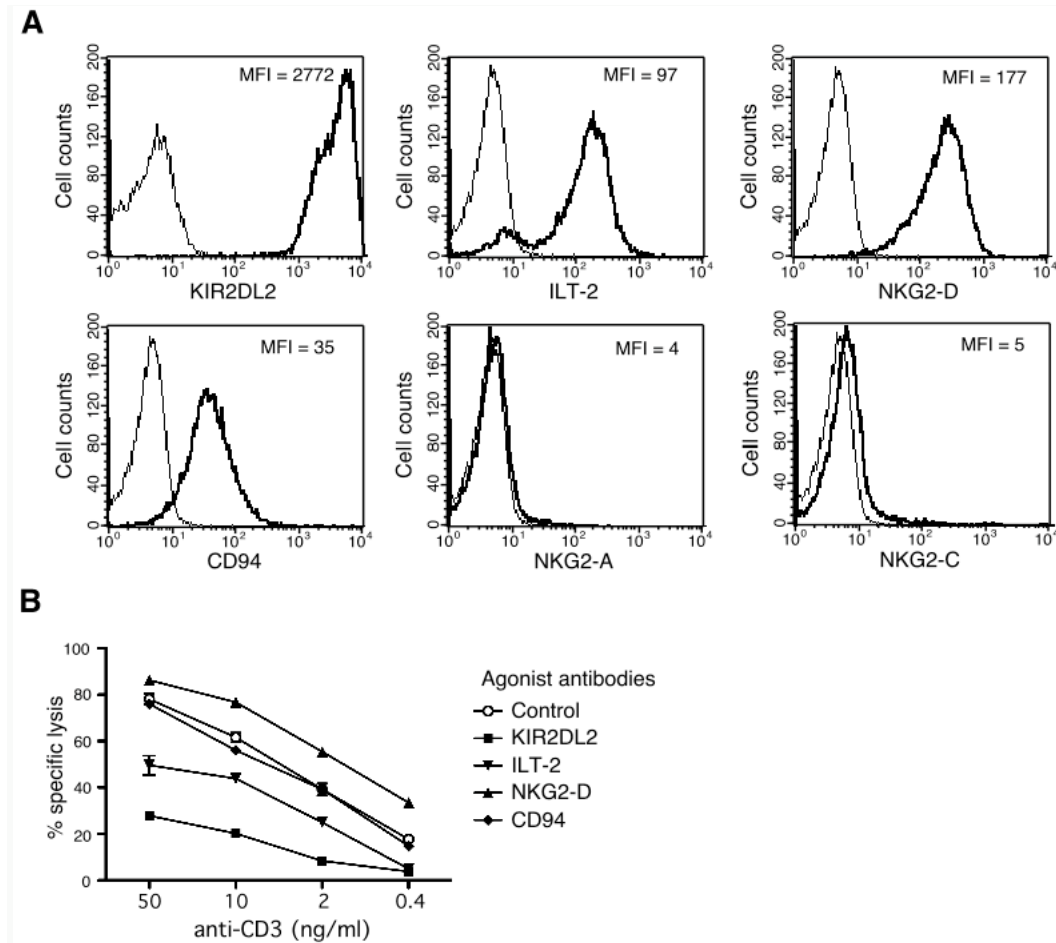


Figure 4. Expression of NK receptors by HLA-E-restricted CD8 T cells and functional characterization

A/ Surface expression of NK receptors by HLA-E-restricted CD8 T cells. MFI of stained T cells (thick line) are indicated. B/ Modulation of HLA-E restricted CD8 T cells reactivity through NKR engagement. ⁵¹Cr-labeled P815 cells were preincubated with the indicated concentration of anti-CD3 antibody in the presence or not of the indicated anti-NKR antibody for 1h. Then, MART.22 T cells were added for 4h. Redirected cytotoxic activity was assessed through measure of Chromium release in the supernatants. Percentages of specific lysis are indicated. Means and standard deviations of triplicate wells are shown for one representative experiments out of three performed.

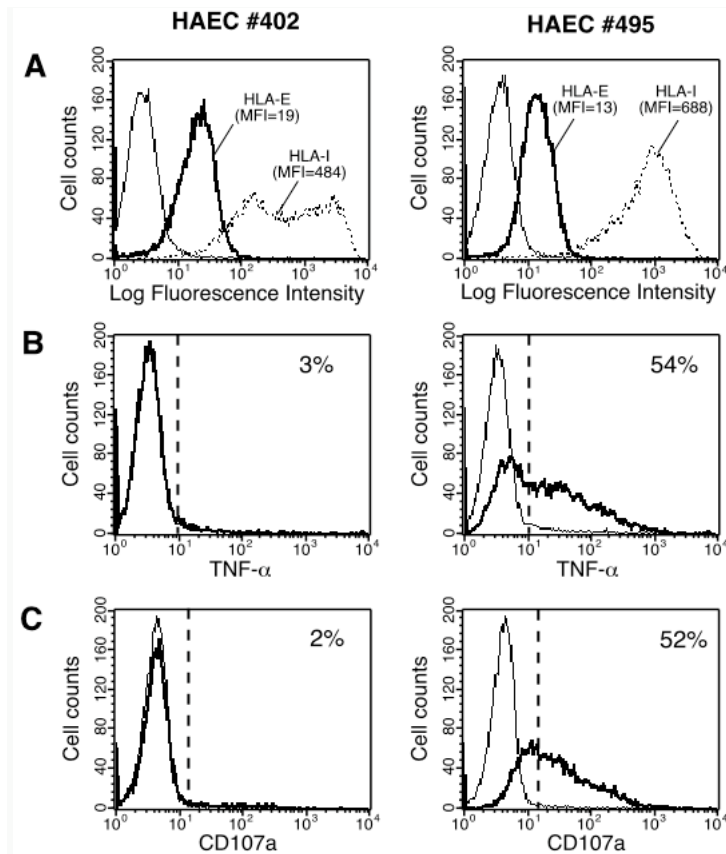


Figure 5. Reactivity of HLA-E-restricted CD8 T cells against allogeneic endothelial cells

A/ Surface expression of HLA-E (thick lines) and total HLA-I (dotted lines) molecules by two representative endothelial cultures (HAEC). MFI are indicated. B/ Cytokine production by HLA-E-restricted CD8 T cells upon stimulation with endothelial cultures. MART.22 T cells were fixed, permeabilized and stained for intracellular TNF- α following 6h of incubation with HAECs (thick line) or not (thin line). Data are expressed as percentage of intracellular cytokine secreting T cells upon stimulation with HAECs. C/ Degranulation of HLA-E-restricted CD8 T cells upon stimulation with endothelial cultures. MART.22 T cells were incubated for 4h with HAECs (thick line) or not (thin line) in the presence of anti-CD107a antibody. Results are expressed as percentages of surface CD107a positive T cells upon stimulation with endothelial cells.

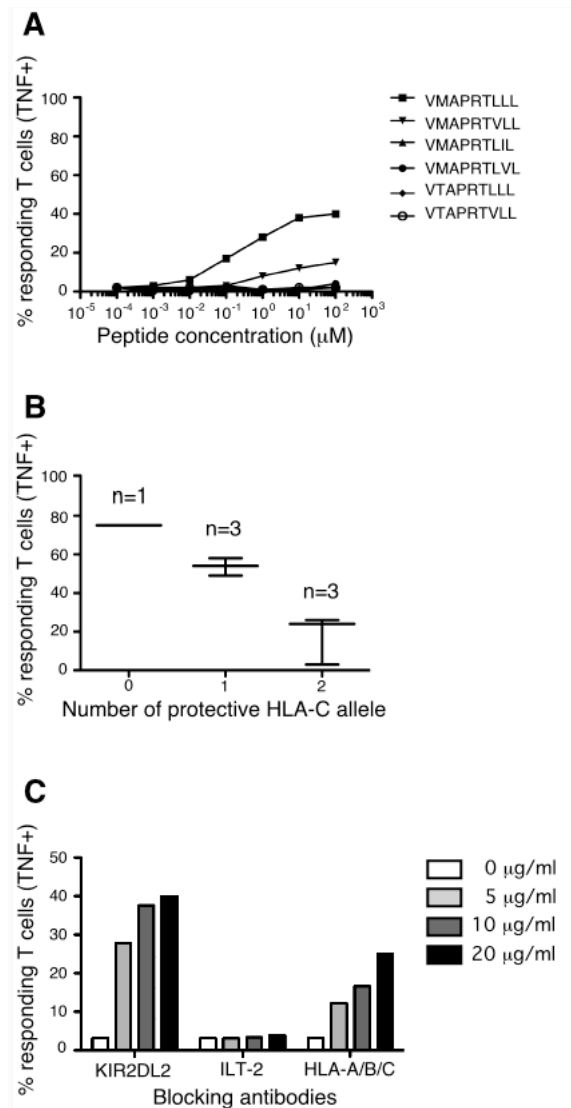


Figure 6. Regulation of HLA-E-restricted CD8 T cells reactivity against allogeneic endothelial cells by NK receptor

A/ Reactivity of HLA-E-restricted T cells against unrecognized endothelial cultures pulsed with synthetic peptides. HAECs were incubated for 1h with range concentrations of the indicated peptides before MART.22 T cells were added. After 6h, T cells were fixed, permeabilized and stained for intracellular TNF- α . Results are expressed as percentage of TNF-producing T cells. B/ Impact of KIR2DL2-ligands expression by HAECs on HLA-E-restricted T cells alloreactivity. Percentages of TNF-producing MART.22 T cells are shown for HAECs with none, one or two protective HLA-C alleles. C/ Reactivity of HLA-E-restricted T cells against unrecognized endothelial cultures in the presence of blocking antibodies. HAECs were incubated with MART.22 T cells in the presence or not of indicated concentrations of blocking antibodies. After 6h, T cells were fixed, permeabilized and stained for intracellular TNF- α . Results are expressed as percentage of TNF-producing T cells.

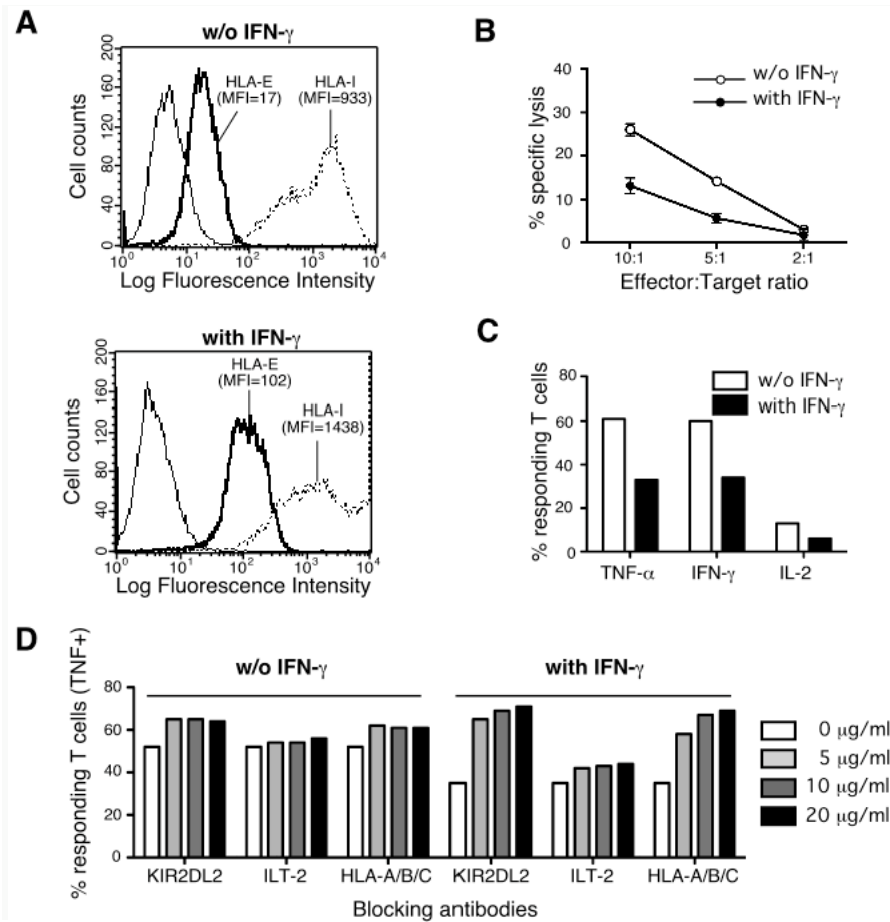
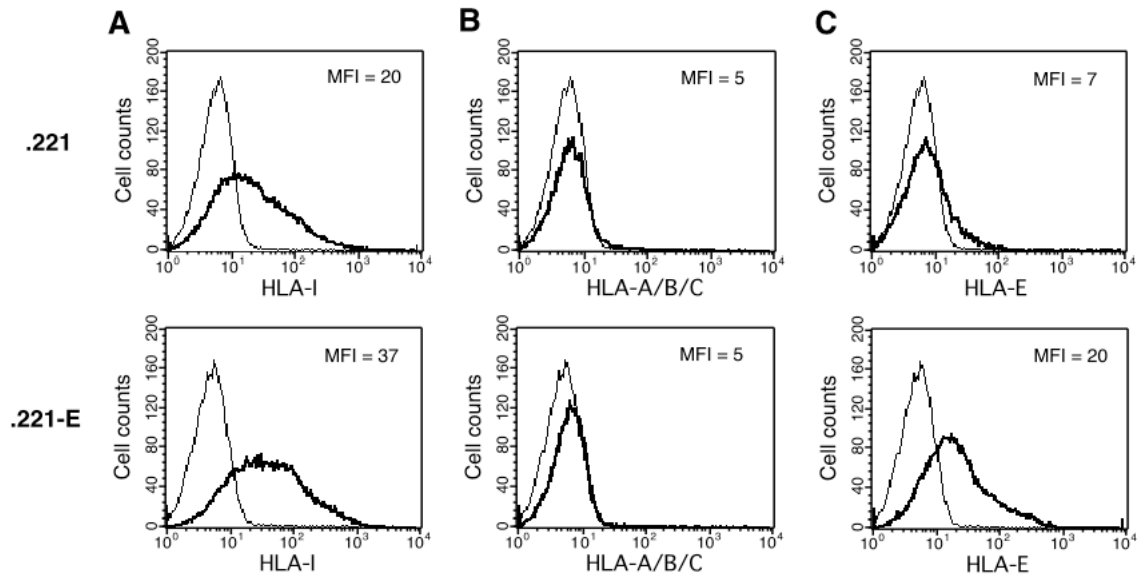


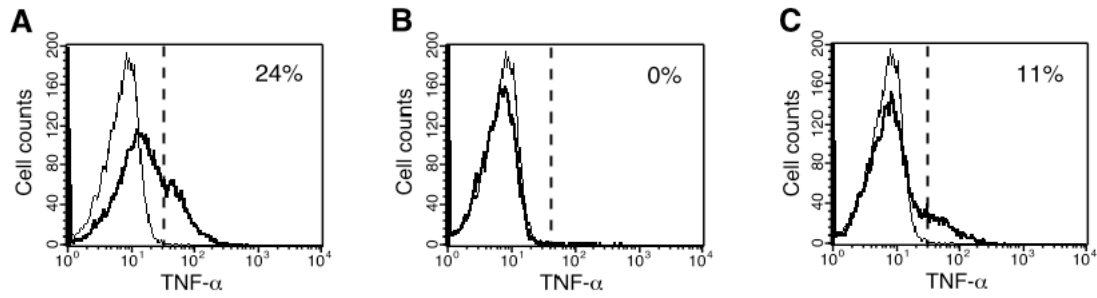
Figure 7. Impact of IFN- γ treatment on allogeneic endothelial cells recognition by HLA-E-restricted CD8 T cells

A/ impact of IFN- γ treatment on surface expression of HLA-E (thick lines) and total HLA-I (dotted lines) molecules by endothelial cultures. MFI are indicated. B/ HLA-E-restricted CD8 T cells cytotoxicity toward endothelial cultures treated or not with IFN- γ . 10^3 ^{51}Cr -labeled HAECs pretreated (closed circles) or not (open circle) with IFN- γ were co-cultured for 4h with T cells at various E:T ratio. Cytotoxic activity was assessed through measure of Chromium release in the supernatants. Percentages of specific lysis are indicated. Means and standard deviations of triplicate wells are shown for one representative experiments out of three performed. C/ HLA-E-restricted CD8 T cells cytokine production upon stimulation with endothelial cultures treated or not with IFN- γ . MART.22 T cells were fixed, permeabilized and stained for intracellular cytokines following 6h of incubation with HAECs pretreated (black bars) or not (white bars) with IFN- γ . Data are expressed as percentages of intracellular cytokine secreting T cells upon stimulation. D/ HLA-E-restricted CD8 T cells cytokine production upon stimulation with endothelial cultures treated or not by IFN- γ , in the presence of blocking antibodies. MART.22 T cells were fixed, permeabilized and stained for intracellular cytokines following incubation for 6h with HAECs pretreated or not with IFN- γ in the presence or not of various amount of blocking antibodies directed against KIR2DL2, ILT-2 and HLA-Ia molecules. Data are expressed as percentages of intracellular TNF secreting T cells upon stimulation.



Supporting Figure 1. Surface expression of HLA-I molecules by B-EBV cell lines transfected (.221-E) or not (.221) with HLA-E

Surface expression of total HLA-I (A), HLA-Ia (B) and HLA-E (C) molecules. MFI are indicated.



Supporting Figure 2. Autoreactivity of HLA-E-restricted T cells in the presence of blocking antibodies

MART.22 T cells were incubated in the presence (thick lines) or in the absence (thin lines) of blocking antibodies (10 μ g/ml) directed against KIR2DL2 (A), ILT-2 (B) and HLA-Ia (C). After 6h, T cells were fixed, permeabilized and stained for intracellular TNF- α . Results are expressed as percentage of TNF-producing T cells when incubated with blocking antibodies.

Tables

Table 1 : Leader sequence peptides derived from HCMV-UL40/HLA-I molecules and recognition by HLA-E-restricted T cell clone

Leader sequence peptide ₃₋₁₁	HLA class I allotypes	MART.22 Reactivity ^a
VMAPRTLVL ^{b,c}	HLA-A* 02 , -A*23, -A*24, -A*25, -A*26, -A*3402, -A*43, -A*66 and -A*69,	-
VMAPRTLLL ^b	HLA-A*01, -A*03, -A*11, -A*29, -A*30, -A*31, -A*32, -A*33, -A*36 -A*74, -Cw*2 and -Cw*15	+++
VMAPRTLIL ^{b,c}	HLA-Cw*01, -Cw*03, -Cw*0401, - Cw*05 , -Cw*06, -Cw*0801-03, -Cw*12, - Cw*14 , -Cw*16 and -Cw*1702	+
VMAPRTVLL	HLA-B*07, -B*08, -B*14, -B*38, -B*39, -B*42, -B*67, -B*73 and -B*81	++
VTAPRTLLL	HLA-B*13, -B*18, -B*27, -B*3542, -B*37, -B*40, - B*44 , -B*47, -B*54, -B*56, -B*58, -B*59, -B*82 and -B*83	-
VTAPRTVLL	HLA-B*15, -B*35, -B*40, -B*41, -B*4418, -B*45, -B*49, -B*50, - B*51 , -B*52, -B*57 and -B*78	-

Autologous HLA class I alleles of the transplant recipient are indicated in bold.

^a MART.22 HLA-E-restricted T cell clone activity in response to .221 cells pulsed with different peptides (see Fig. 3)

^b These peptides are identical to peptides contained in the UL40 ORF from various CMV strains.

^c These peptides have previously been described for their ability to trigger HLA-E restricted CD8 T cell responses.

Table 2 : Characteristics of endothelial cells (HLA class I allotypes and HCMV serologic status of donors) and recognition by HLA-E-restricted T cell clone

HAEC	HLA-Ia allotypes						HLA-E allotypes		HCMV Sero-positivity	MART.22 Reactivity ^a	
	HLA-A		HLA-B		HLA-Cw					TNF- α	CD107a
#112	*0201	*2402	*1801	*5101	*0202	*0701 ^b	*0103	*0103	+	49%	32%
#116	*0201	*2902	*3501	*4402	*0401^c	*0501^b	*0101	*0101	+	24%	8%
#323	*0301	*2402	*4701	*5001	*0602	*0602	ND	ND	-	75%	68%
#331	*0301	*3201	*0702	*3701	*0602	*0702 ^b	*0101	*0103	-	58%	41%
#337	*2402	*3101	*3501	*4001	*0401^c	*0304^b	*0103	*0103	-	26%	10%
#402	*2301	*2902	*4403	*5801	*0701 ^b	*1601^b	*0101	*0103	-	3%	4%
#495	*0101	*0201	*4101	*4402	*0501^b	*1701	ND	ND	+	54%	52%

HLA-Ia alleles susceptible to provide peptides recognized by HLA-E-restricted T cell clone are indicated in bold.

^a HLA-E-restricted T cell clone activity in response to endothelial cells (see Fig. 6)

^b HLA-C allotypes carrying the C1 epitope that are susceptible to bind to KIR2DL2 receptor

^c HLA-Cw0401 allotype that has been shown to interact with KIR2DL2 receptor

2.2 Etude des propriétés fonctionnelles des molécules HLA-E solubles sur les lymphocytes T restreints HLA-E

Nous avons détecté la présence de molécules HLA-Es dans les surnageants de toutes les cultures primaires de cellules endothéliales aortiques testées (fournis par le Dr Béatrice Charreau) et observé qu'elles produisaient comparativement plus de molécules HLA-Es que les cellules tumorales, que ce soit à l'état basal, 75pg/ml versus 21pg/ml (toute origine tumorale confondue), ou en présence d'INF- γ , 284pg/ml versus 76pg/ml. Aussi, nous avons voulu étudier les propriétés des molécules HLA-Es vis-à-vis de la population lymphocytaire monoclonale T $\alpha\beta$ CD8⁺ restreinte par la molécule HLA-E (dénommée MART.22) et isolée à partir d'un patient transplanté (cf. article n°2).

2.2.1 Effet direct sur les lymphocytes T CD8 restreints HLA-E

Dans un premier temps, nous avons cherché à évaluer l'effet direct des molécules HLA-Es sur les lymphocytes T restreints par la molécule HLA-E. Pour cela, nous avons incubé le clone T MART.22 en présence de complexes recombinants monomériques HLA-E/peptide/ β 2m chargés avec des peptides reconnus par le clone T, VMAPRTL³LL (issu des molécules HLA-A*01) ou non, VMAPRTL³VL (issu des molécules HLA-A*02), puis analysé la réponse lymphocytaire en comparaison avec une stimulation par anticorps anti-CD3.

Nous avons tout d'abord observé, en vidéo-microscopie, que la présence de molécules rHLA-Es monomériques chargées avec le peptide reconnu (utilisées à 10 μ g/mL) était associée à une augmentation des concentrations calciques intracellulaires dans le clone MART.22 (**Figure 21**). Cette augmentation est stable dans le temps, mais est cependant caractérisée par un pic calcique précoce de faible amplitude comparativement à celui observé en présence de cibles reconnues (721.221-E) ou d'anticorps anti-CD3 (UCHT1 à 5 μ g/ml). En revanche, l'ajout de complexes recombinants chargés avec un peptide non reconnu n'a aucun effet sur les concentrations calciques intracellulaires du clone T MART.22.

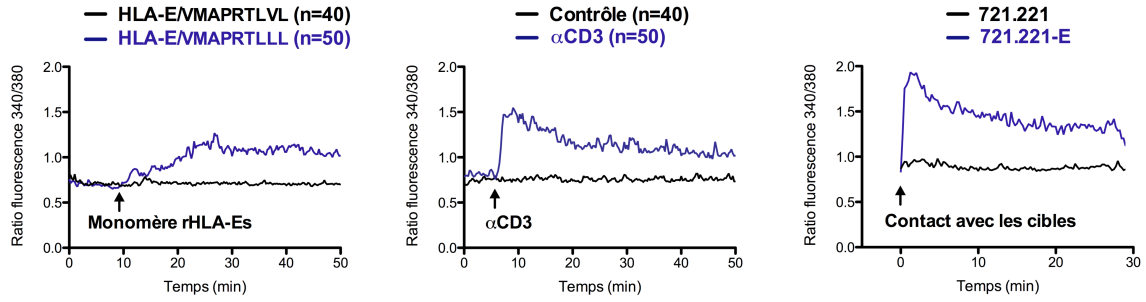


Figure 21: Impact des monomères rHLA-Es sur le flux calcique du clone MART.22

Evolution de calcium libre intracytoplasmique du clone T MART.22 au cours du temps, le nombre de cellules analysées étant indiqué pour chacune des conditions testées

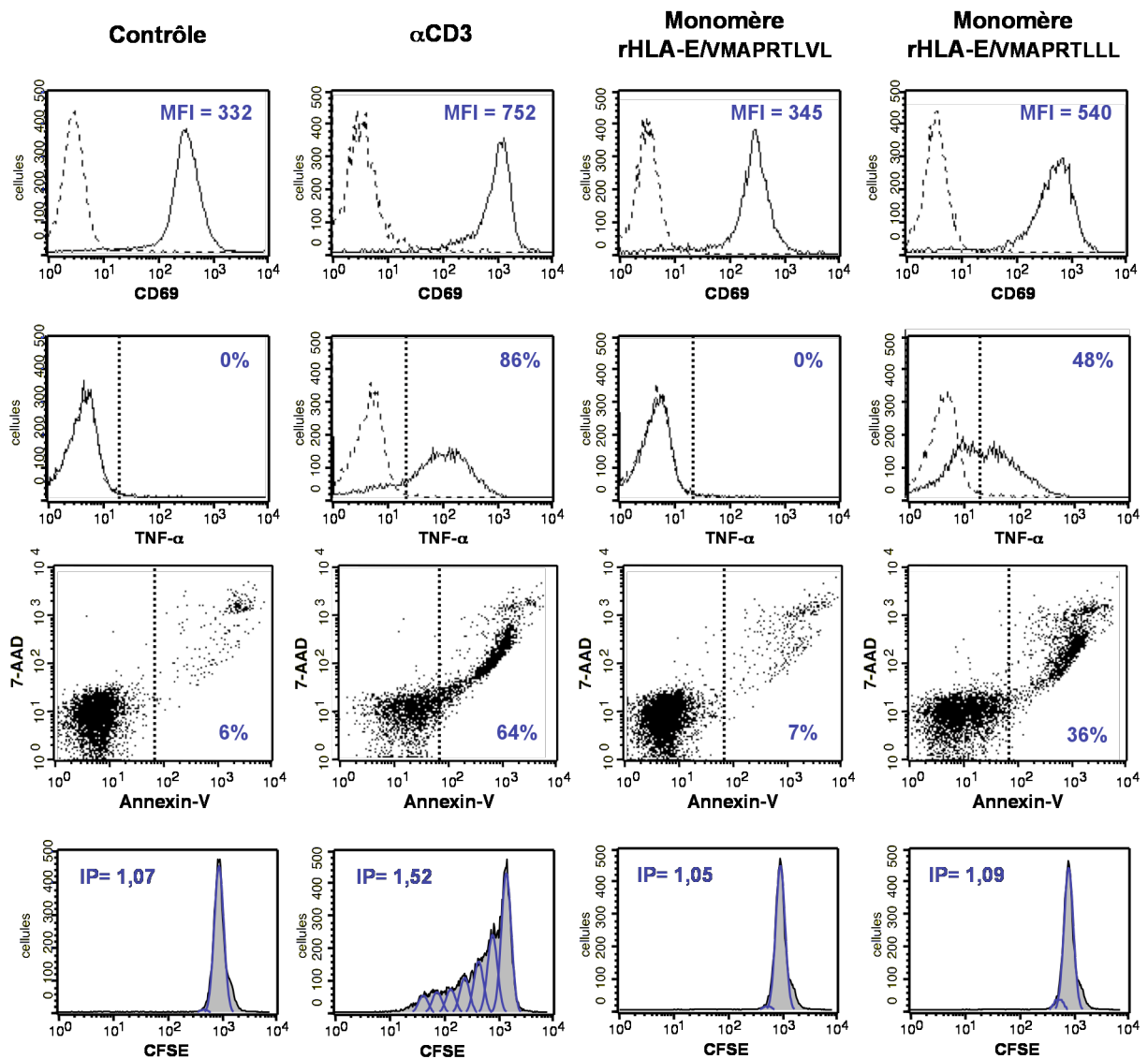


Figure 22 : Impact des monomères rHLA-Es sur les fonctions effectrices du clone MART.22

Expression du marqueur d'activation CD69, réponse cytokinique (TNF- α), apoptose et prolifération cellulaire du clone MART.22 incubé en présence de monomères rHLA-Es (10 μ g/ml) ou d'anti-CD3 immobilisé (1 μ g/ml)

Nous avons alors évalué l'effet des monomères rHLA-Es sur les fonctions effectrices du clone MART.22 (**Figure 22** et résultats non présentés). Les complexes chargés avec le peptide reconnu induisent, d'une part, la surexpression des marqueurs d'activation CD69 et de dégranulation CD107a par l'ensemble des cellules T et, d'autre part, la production de cytokines ainsi que l'apoptose d'une proportion significative des cellules T. En revanche, cet effet n'est pas associé à la prolifération clonale. De façon concordante avec les observations faites en vidéo-microscopie, la réponse effectrice est plus faible comparativement à celle observée suite à l'activation par un anticorps anti-CD3 et aucun effet n'est observé en présence de monomères chargés avec un peptide irrelevant.

Ces observations suggèrent que les molécules HLA-E solubles présentant un peptide antigénique peuvent activer les lymphocytes T restreints par la molécule HLA-E et de spécificité antigénique correspondante, ce qui se traduit par leur dégranulation, la production de cytokines mais également leur délétion clonale par apoptose.

Nous avons alors cherché à savoir si ce mécanisme était spécifique des molécules HLA-E en utilisant des lymphocytes T restreints par des molécules HLA-I classiques (en l'occurrence le clone T $\alpha\beta$ CD8⁺ H2 reconnaissant l'antigène HLA-A*0201/NA17-A₁₋₉). De façon similaire, nous avons observé que le clone T H2 était activé en présence de complexes monomériques présentant le peptide antigénique approprié, tandis que ceux liés à un peptide irrelevant (le peptide MelanA₂₆₋₃₅) n'avaient aucun effet (résultats non présentés).

Ces résultats sont peu concordants avec les données issues de la littérature qui montrent majoritairement que les molécules HLA-I diminuent l'activité cytotoxique et provoquent l'apoptose des lymphocytes T indépendamment de leur spécificité antigénique, en interagissant avec les co-récepteurs CD8 et en induisant l'expression de Fas-L. Dans nos conditions expérimentales, l'activité immunologique des molécules rHLA-Es est strictement dépendante de la présence du peptide antigénique, suggérant un mécanisme sous-jacent dépendant de l'engagement du TCR des lymphocytes T. Néanmoins, étant donné que l'activation lymphocytaire T est décrite comme strictement dépendante de la multimérisation des complexes CD3-TCR, il est peu probable que l'engagement direct des récepteurs TCR par des complexes monomériques solubles soit responsable des effets observés. De plus, nous avons exclu la capacité éventuelle des monomères à se fixer au plastique lors des tests fonctionnels en pré-incubant les puits de culture avec des quantités saturantes de BSA (1mg/ml). Ainsi, nous avons cherché à mieux caractériser les mécanismes responsables de l'effet des molécules HLA-I/peptide sur les lymphocytes T CD8.

L'analyse rétrospective des expériences de vidéo-microscopie montre que l'effet des monomères rHLA-E/peptide sur le clone T MART.22 est dépendant du contact entre les cellules T (**Figure 23**). En effet, tandis que les taux calciques des cellules T établissant des contacts entre-elles augmentent de 1,7 fois en présence de monomères rHLA-E/peptide, ceux des cellules T isolées n'augmentent que de 1,2 fois. Ces observations suggèrent que le mécanisme sous-jacent soit lié à la capacité des lymphocytes T, incubés en présence de complexes HLA-I/peptide, à se présenter les complexes antigéniques entre eux.

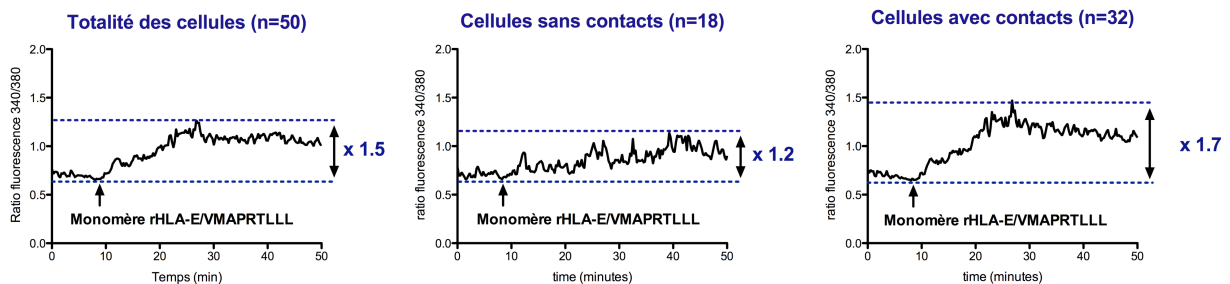


Figure 23 : Influence des contacts cellulaires sur l'effet des monomères rHLA-Es

Evolution du calcium libre intracytoplasmique du clone T MART.22 au cours du temps, le nombre de cellules analysées étant indiqué pour chacune des conditions testées

Afin d'étayer cette hypothèse, nous avons testé la capacité des clones T restreints par HLA-E ou HLA-A*0201 à reconnaître des clones identiques ayant été préalablement incubés pendant 1 heure avec des complexes HLA-I/peptide (à 10 μ g/ml, soit 0,2 μ M) ou les peptides courts correspondants (à 0,2 μ M), puis lavés (**Figure 24**). De manière à discriminer la population "cible" de celle jouant le rôle d'effecteur en cytométrie de flux, cette dernière a été marquée par une sonde intracellulaire fluorescente (Calcéine). Par ailleurs, afin d'exclure l'éventuelle capacité des protéases du sérum à dégrader les complexes HLA-I/peptide ce qui pourrait conduire à la libération des peptides, nous avons choisi de réaliser l'ensemble des tests fonctionnels suivants en milieu de culture synthétique (AIMV). Comme illustré dans la **figure 24** pour le clone MART.22, nous avons observé que les lymphocytes T préincubés en présence du peptide reconnu, que ce soit sous une forme "libre" ou apprêtée dans un complexe HLA-I/peptide, étaient capables d'induire la production de TNF- α par les lymphocytes T de même spécificité antigénique. Nous avons donc conclu que l'effet des monomères HLA-I/peptide était lié à un transfert de l'antigène vers les lymphocytes T qui pouvaient, alors, développer des réponses lymphocytaires fratricides.

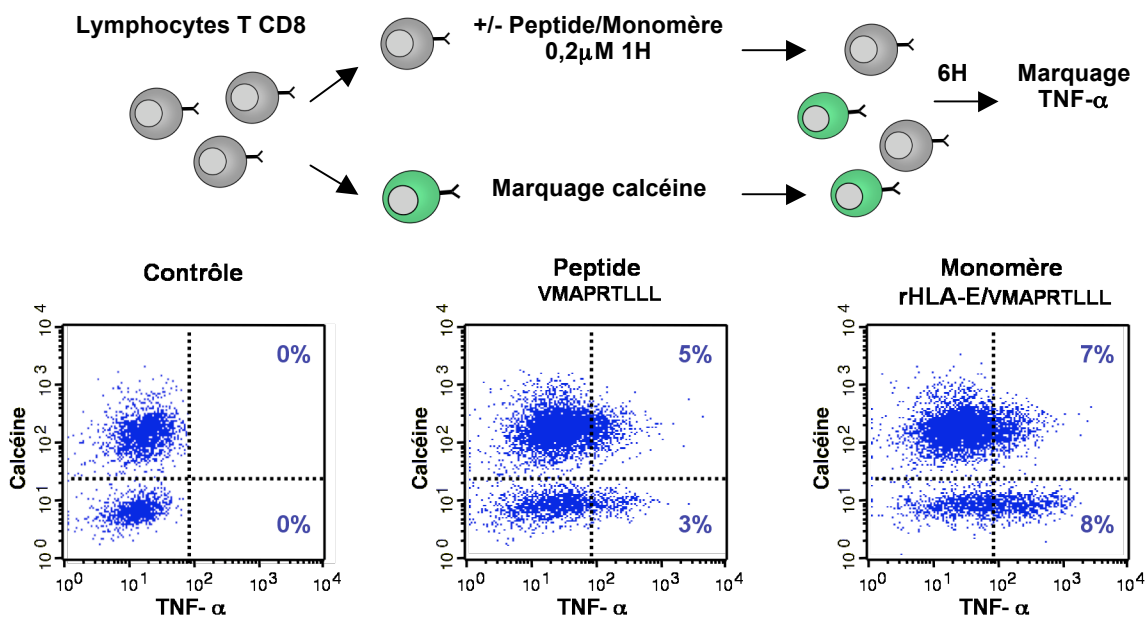


Figure 24 : Capacité du clone MART.22 incubé en présence de monomères rHLA-Es à présenter le complexe antigénique

Réponse cytokinique (TNF- α) du clone MART.22 calcéine⁺ stimulé pendant 6H par le clone MART.22 calcéine⁻ ayant été préalablement incubé 1H en présence de peptides ou de monomères rHLA-E/peptide (utilisés à 0,2 μ M)

La démarche suivante fut de rechercher si ce transfert était passif, comme lors du chargement exogène des peptides courts sur les molécules HLA-I membranaires, ou actif. En effet, il est concevable que des complexes HLA-I/peptide monomériques soient internalisés par les lymphocytes T et que, lors de la dégradation de ces complexes dans les compartiments intracellulaires, les peptides puissent être recyclés et apprêtés par les molécules HLA-I endogènes qui pourront, ensuite, être exportées à la membrane.

Pour cela, nous avons utilisé la stratégie expérimentale décrite ci-dessus, et évalué l'effet de la fixation préalable des cellules T (glutaraldéhyde, utilisé entre 0,01 et 0,05%) sur leur capacité à présenter les complexes antigéniques après incubation avec des monomères HLA-I/peptide ou des peptides courts. Les contrôles ont été réalisés en fixant les cellules T après incubation avec les peptides ou complexes HLA-I/peptide. Nous avons observé que la fixation préalable des cellules T n'altérerait pas ou peu leur capacité à présenter les complexes antigéniques suite à leur incubation avec les monomères HLA/peptide, tout comme avec les peptides courts (**Figure 25**).

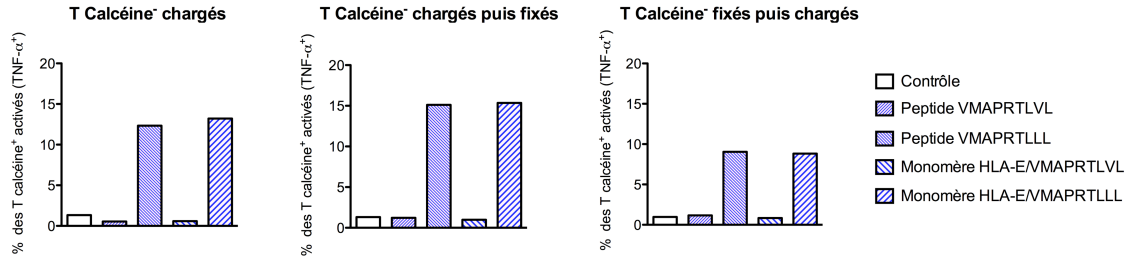


Figure 25 : Impact de la fixation du clone MART.22 sur sa capacité à présenter le complexe antigénique après incubation en présence de monomères rHLA-Es

Réponse cytokinique du clone MART.22 calcéine⁺ stimulé pendant 6H par le clone MART.22 calcéine⁻ ayant été préalablement incubé 1H en présence de peptides ou de monomères rHLA-E/peptide (utilisés à 0,2μM) et ce, avant ou après fixation (glutaraldéhyde 0,02%, 1min)

De façon concordante, l'utilisation de drogues inhibant les processus d'endocytose, cytochalasine D (un inhibiteur de la polymérisation de l'actine altérant les processus de phagocytose, utilisé à 5 et 10μM) et diméthylamiloride (ou DMA, un inhibiteur des pompes à protons Na⁺/H⁺ altérant la pinocytose, testé à 250 et 500μM), n'a pas d'impact sur l'efficacité de ce transfert (résultats non présentés).

Enfin, nous avons comparé l'efficacité de ce transfert avec celui observé en présence de peptides courts synthétiques. Les clones T MART.22 et H2 ont été incubés avec des concentrations variables (de 1x10⁻¹⁰ à 1x10⁻⁶M) de complexes HLA-I/peptides ou de peptides courts correspondants, puis leur activation a été évaluée par marquage intracytoplasmique du TNF-α. Comme illustré dans la **figure 26**, les formes peptidiques "libres" ou complexées induisent le même niveau d'activation des lymphocytes T pour des concentrations comparables, la production de cytokines par les clones T étant détectée pour des concentrations peptidiques ou des complexes HLA-I/peptides supérieures à 50ng/ml.

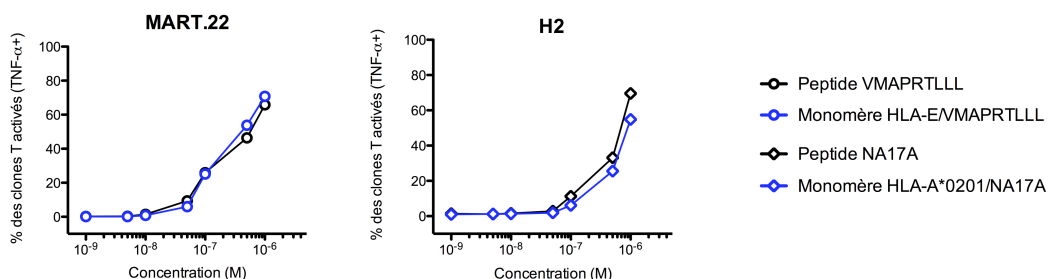


Figure 26 : Effet des monomères HLA-I/peptide sur l'activation des clones MART.22 et H2, en comparaison avec les peptides courts correspondants

Réponse cytokinique (TNF-α) des clones MART.22 et H2 incubés pendant 6H en présence de concentrations variables de peptides ou de monomères HLA-I/peptide

L'ensemble de ces résultats nous a conduits à conclure que l'effet des monomères HLA-I/peptide solubles sur les lymphocytes T CD8 de spécificité antigénique correspondante n'était pas lié à leur internalisation par les cellules T. Deux mécanismes alternatifs peuvent être envisagés pour expliquer les résultats observés. D'une part, il est possible que les peptides se dissocient des monomères recombinants et se chargent alors de manière exogène sur les molécules HLA-I membranaires exprimées par les lymphocytes T. D'autre part, il est également envisageable que les complexes HLA-I/peptide solubles puissent s'associer aux molécules HLA-I membranaires des lymphocytes T et que, sous cette forme, ils engagent efficacement les TCRs de lymphocytes T. À l'appui de cette deuxième hypothèse, plusieurs études ont montré que les molécules HLA-I, classiques ou non, pouvaient former des multimères à la membranaire cellulaire.

Dans le cas où l'effet observé serait lié au chargement exogène des peptides issus des complexes sur les molécules HLA-I membranaires, il est surprenant de constater que l'efficacité du transfert est comparable à celui des peptides courts correspondants. En effet, cela impliquerait qu'une majorité des peptides se dissocient rapidement des monomères.

Aussi, nous avons voulu évaluer l'incidence des conditions expérimentales sur la stabilité des complexes HLA-I/peptides. Pour cela, des complexes recombinants HLA-E ou HLA-A*0201 ont été dilués dans du milieu de culture et incubés à 37°C sur des périodes allant jusqu'à 24 heures. Puis, la présence de complexes HLA-I/ β 2m, de β 2m libre, et d'agrégats de chaînes lourdes a été analysée par HPLC. Dans les temps expérimentaux impartis, nous n'avons pas observé de dégradation significative des complexes HLA-I/peptide.

Toutefois nous ne pouvons exclure que la stabilité des complexes HLA-I/peptide soit modifiée en présence de cellules. En effet, les lymphocytes T pourraient notamment exprimer des protéases susceptibles de favoriser la dégradation des complexes HLA-I/peptide et faciliter ainsi le relargage des peptides.

Par ailleurs, on peut également imaginer que, comparativement aux peptides courts, les complexes HLA-I/peptide s'accumulent préférentiellement à proximité de la membrane cellulaire du fait de leur capacité à se lier avec des molécules membranaires (par exemple TCR, CD8, NKR, récepteur à l'insuline, molécules HLA-I membranaires...), ce qui pourrait potentialiser l'apprêtement des peptides issus des complexes recombinants sur les molécules HLA-I membranaires.

.2.2.2 Impact sur la reconnaissance de cibles par les lymphocytes T CD8 restreints HLA-E

Compte tenu des résultats obtenus précédemment, nous avons voulu évaluer l'impact des molécules HLA-E solubles sur la reconnaissance de cibles cellulaires par les lymphocytes T restreints par la molécule HLA-E.

Pour cela, nous avons tout d'abord étudié l'impact de la présence de molécules rHLA-Es monomériques (utilisées à 10 μ g/ml, soit 0,2 μ M) sur la capacité du clone T MART.22 à lyser des cellules B-EBV spontanément reconnues, ou non. Comme illustré sur la **figure 27**, la présence de monomères rHLA-Es, qu'ils soient associés ou non à des peptides reconnus, n'a pas d'effet significatif sur la capacité du clone MART.22 à lyser la lignée .221-E ou la lignée .221 préalablement chargée avec le peptide court reconnu VMAPRTLVL (utilisé à 10 μ M, pendant 1 heure). En revanche, la présence de monomères rHLA-Es associés au peptide VMAPRTLVL permet d'induire la lyse de la lignée.221 non chargée ou chargée avec un peptide non reconnu.

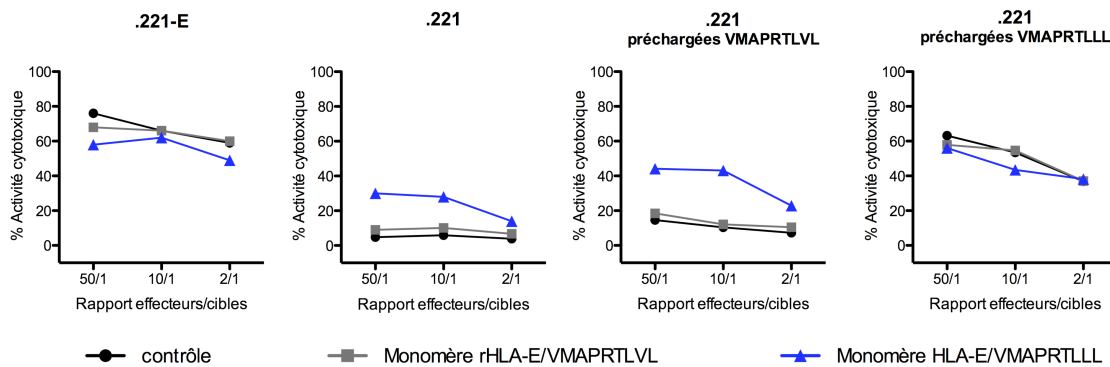


Figure 27 : Impact des monomères rHLA-Es sur la lyse de cibles par le clone MART.22

Activité cytotoxique du clone MART.22 stimulé pendant 4H par des cellules cibles en présence de monomères HLA-E/peptide (utilisés à 0,2 μ M)

Nous avons donc émis l'hypothèse que, de façon similaire à ce que nous avons observé précédemment avec les clones T CD8, l'effet des monomères soit lié au chargement exogène des peptides issus des complexes HLA-I/peptide ou à leur interaction avec les molécules HLA-I membranaires des cellules cibles.

Aussi, nous avons étudié la capacité du clone T MART.22 à reconnaître des cellules exprimant (.221), ou non (HeLa), les molécules HLA-E et ayant été préalablement incubées pendant 1 heure en présence de monomères (10µg/mL, soit 0,2µM) ou des peptides synthétiques correspondants (0,2µM).

Comme présenté dans la **figure 28**, les cellules .221 pré-incubées en présence de monomères chargés en peptides reconnus induisent l'activité cytotoxique et la production de cytokines par le clone MART.22. Le niveau de réponse (cytotoxique et cytokinique) du clone T est comparable à celui observé vis-à-vis des cellules cibles pré-incubées avec les peptides courts correspondants. De plus, il n'est pas affecté par la fixation préalable de cellules cibles (glutaraldéhyde 0,05%, 1 minute) ou par l'utilisation d'inhibiteur d'endocytose (cytochalasine D et DMA) (résultats non présentés).

En revanche, les cellules HeLa (HLA-E déficientes) pré-incubées en présence de peptides, comme de complexes HLA-E/peptide, ne sont pas sensibilisées à la lyse par le clone MART.22.

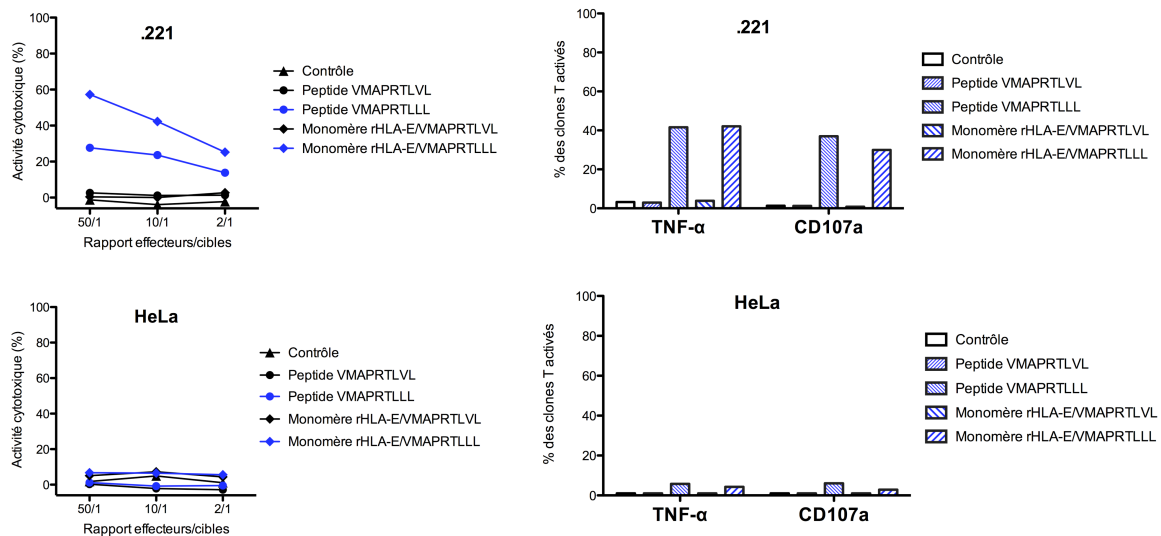


Figure 28 : Reconnaissance par le clone MART.22 de cibles pré-incubées en présence de monomères rHLA-Es

Réponse lytique (activité cytotoxique et dégranulation du CD107a) et cytokinique (TNF-α) du clone MART.22 stimulé pendant 4 à 6h par des cibles ayant préalablement été incubées 1h en présence de peptides ou de monomères HLA-E/peptide (utilisés à 0,2µM).

Des résultats comparables sont observés en utilisant un modèle HLA-I classique. Ainsi, le clone T H2 reconnaît, et ce, indépendamment de leur fixation préalable, les cellules cibles T2 HLA-A*0201 pré-incubées en présence de complexes HLA-A*0201/NA17-A, tandis que les lignées non HLA-A*0201 (.221) ne sont pas reconnues (résultats non présentés).

De plus, en stimulant les clones T MART.22 et H2 avec la lignée T2 (HLA-A*0201 et HLA-E positive) pré-incubée sur des temps variables en présence de peptides courts ou de complexes HLA-I/peptide, nous avons observé une cinétique de réponse identique dans les deux conditions de stimulation et ce, dans deux modèles HLA-I utilisés (**Figure 29**).

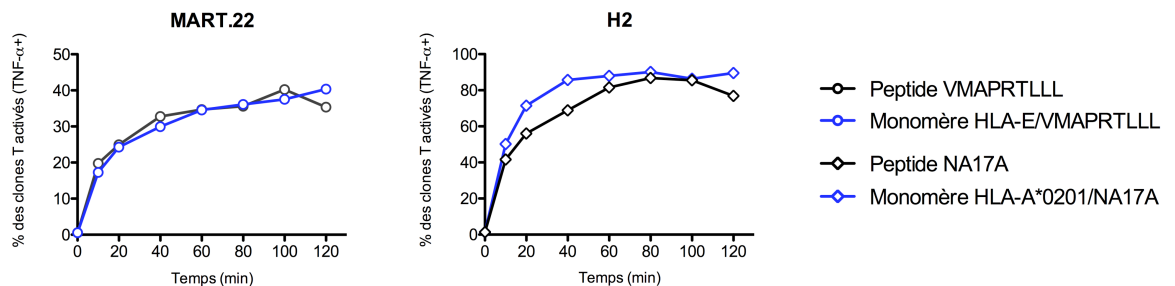


Figure 29 : Cinétique du transfert antigénique vers les cellules cibles

Réponse cytokinique (TNF- α) des clones MART.22 et H2 stimulés pendant 6H par des cellules T2 préalablement incubées en présence de peptides ou de monomères HLA-I/peptide (utilisés à 0,2 μ M) sur des périodes allant jusqu'à 2H

L'ensemble de ces résultats montre que les molécules HLA-Es présentant un peptide antigénique peuvent induire la reconnaissance de cellules cibles par des lymphocytes T CD8 de même spécificité. De plus, il semblerait que les mécanismes sous-jacents soient semblables à ceux impliqués dans l'effet direct des monomères HLA-I/peptides sur les lymphocytes T CD8.

Discussion
&
Perspectives

1. Implication des molécules HLA-E en cancérologie

Actuellement, le traitement des cancers est principalement basé sur la chirurgie (exérèse), la radiothérapie et la chimiothérapie. Ces thérapies restent cependant peu efficaces à des stades avancés de développement tumoral et, pour les dernières, présentent une grande toxicité intrinsèque car elles ne ciblent pas spécifiquement les cellules tumorales.

L'immunothérapie anti-tumorale constitue une stratégie alternative prometteuse au trépied thérapeutique classique. Cette approche repose, d'une part sur l'existence d'antigènes tumoraux et, d'autre part, sur celle d'effecteurs immuns capables de les reconnaître et de développer une réponse cytotoxique vis-à-vis des cellules tumorales. Ainsi, le concept de base de l'immunothérapie des tumeurs consiste à amplifier, sur le plan qualitatif et quantitatif, les effecteurs de la réponse immunitaire anti-tumorale, ceci dans le but d'éradiquer spécifiquement les cellules néoplasiques. Les premiers essais cliniques d'immunothérapie de tumeurs solides ont été menés dans les années 80 par le groupe de Steven Rosenberg, chez des patients atteints de mélanomes métastatiques et réfractaires aux traitements classiques. Ces essais sont basés sur le transfert adoptif de lymphocytes T capables de reconnaître et de tuer les cellules tumorales de mélanome. Les essais cliniques réalisés à ce jour, attestent de l'efficacité de cette approche, pouvant aboutir à une régression cancéreuse significative, bien que les modalités optimales doivent encore être précisées (Rosenberg and Dudley 2009; Labarriere *et al.* 2011; Weber *et al.* 2011; Jotereau *et al.* 2012).

Aussi, afin d'améliorer le développement et le suivi immunologique d'immunothérapies du mélanome que notre groupe développe avec le service de dermatologie du CHU (Pr Brigitte Dréno), nous cherchons à mieux comprendre les mécanismes de régulation de la réponse immunitaire anti-tumorale.

Le concept d'"immunoediting" décrit la dualité du système immunitaire qui permet de protéger l'organisme contre l'apparition de tumeurs, mais qui favorise également l'émergence et la progression de variants tumoraux résistants. En effet, la pression exercée par le système immunitaire associée à l'instabilité génétique des cancers mène au développement de cellules tumorales résistantes et par conséquent de tumeurs faiblement immunogènes (Dunn *et al.* 2004; Kim *et al.* 2007; Schreiber *et al.* 2011).

L'expression des molécules du CMH jouant un rôle majeur dans la capacité des effecteurs immuns à reconnaître les cellules tumorales, la sélection des variants tumoraux ayant une expression altérée des molécules du CMH constitue un mécanisme majeur d'échappement tumoral (Algarra *et al.* 2004; Campoli and Ferrone 2008).

En outre, il semblerait que la capacité des cellules tumorales à produire des molécules HLA-I solubles puisse constituer une stratégie d'immuno-subversion (Tabayoyong and Zavazava 2007; Campoli and Ferrone 2008). En effet, les taux sériques des molécules HLA-I solubles sont augmentés significativement chez les patients atteints de divers cancers et le niveau de ces molécules est corrélé positivement avec la progression tumorale et/ou négativement avec la survie des patients dans plusieurs modèles tumoraux. De plus, plusieurs études ont montré *in vitro* que les molécules HLA-I solubles pouvaient inhiber les réponses effectrices lymphocytaires T et NK.

Ayant observé que les cellules de mélanome produisaient des molécules HLA-E solubles *in vitro*, nous avons étudié la capacité de cellules tumorales d'origines histologiques variées à produire des formes solubles de la molécule HLA-E et cherché à renseigner la valeur pronostique de ces molécules chez les patients atteints de cancer, ainsi que leurs éventuelles propriétés fonctionnelles.

Notre étude a permis de mettre en évidence que les taux sériques des molécules HLA-E solubles étaient augmentés significativement chez les patients atteints de mélanome en comparaison avec les donneurs sains. Dans cette cohorte de 127 patients, nous n'avons pas pu démontrer de corrélation significative entre la concentration de molécules HLA-E sériques et la progression tumorale. Néanmoins, le taux sérique des molécules HLA-E solubles semble augmenter avec la progression tumorale jusqu'au stade III, puis, de façon surprenante, diminuer chez les patients atteints de mélanome de stade IV. Ce profil d'expression est comparable à celui que nous avons précédemment observé par immunohistochimie pour les formes membranaires de HLA-E chez les patients atteints de mélanome (Derre *et al.* 2006). De fait, la détermination du taux sérique des molécules HLA-E solubles chez les patients pourrait permettre d'évaluer indirectement la capacité des tumeurs à exprimer cette molécule, que ce soit sous une forme membranaire ou soluble. Nous cherchons actuellement à documenter l'éventuelle association des molécules HLA-E sériques avec le pronostic et/ou la réponse au traitement de patients atteints de mélanome et inclus, ou non, dans des protocoles d'immunothérapie passive que nous développons avec l'équipe du Pr Brigitte Dréno.

De plus, nous avons montré que les molécules HLA-E solubles étaient produites par des lignées tumorales d'origines histologiques variées, incluant notamment les carcinomes rénaux, colorectaux et du sein et ce surtout en présence de cytokines pro-inflammatoires. Des molécules HLA-E solubles sont donc susceptibles d'être retrouvés *in vivo* dans de nombreux modèles tumoraux et plus particulièrement chez les patients traités par de l'IFN- α ou - γ . L'analyse du statut de ces molécules est notamment en cours chez les patients atteints de carcinomes colorectaux dans le cadre d'une collaboration avec le Dr Céline Bossard (Service d'anatomie et cytologie pathologiques du CHU de Nantes).

La capacité des cellules néoplasiques à produire des molécules HLA-E solubles implique que ces dernières soient présentes dans le microenvironnement tumoral où elles peuvent alors interagir avec les effecteurs immuns recrutés sur les sites tumoraux. Aussi, nous avons cherché à évaluer les propriétés fonctionnelles des molécules HLA-E solubles vis-à-vis d'effecteurs T CD8⁺ CD94/NKG2-A⁺ spécifiques d'antigène de mélanome.

Les formes solubles des molécules HLA-I non classiques (HLA-G) et apparentées (MIC-A) peuvent moduler l'expression membranaire de récepteurs NKR associés à la surface des effecteurs T. Ainsi, les molécules HLA-G solubles stimulent l'expression des récepteurs inhibiteurs ILT-2 à la surface de lymphocytes T CD8 allo-réactifs *in vitro* (Zhong *et al.* 2009). À l'inverse, l'engagement par les molécules MIC-A solubles des récepteurs activateurs NKG2-D induit l'internalisation et la dégradation intracellulaire de ces derniers, limitant ainsi la réactivité anti-tumorale des cellules T $\alpha\beta$ CD8⁺, T $\gamma\delta$ et NK (Groh *et al.* 2002; Wu *et al.* 2004; Marten *et al.* 2006). Nous n'avons cependant pas observé d'impact des molécules HLA-E solubles sur l'expression des récepteurs CD94/NKG2-A par les cellules T $\alpha\beta$ CD8. Néanmoins, ces résultats semblent en adéquation avec les travaux précédents ayant montré que ce récepteur inhibiteur était exprimé de manière particulièrement stable à la surface cellulaire des cellules NK et ce, indépendamment de son engagement par des molécules HLA-E membranaires et de la transduction des signaux intracellulaires dépendants (Borrego *et al.* 2002; Borrego *et al.* 2005; Masilamani *et al.* 2008; Peruzzi *et al.* 2009).

Les molécules HLA-I solubles, classiques ou non, peuvent moduler l'activité et/ou la survie des effecteurs T et NK en se liant aux corécepteurs CD8 et/ou aux récepteurs NKR. En outre, le groupe de Béatrice Charreau a montré, *in vitro*, que les molécules HLA-E solubles présentes dans le surnageant de culture de cellules endothéliales pouvaient inhiber l'activité cytotoxique de cellules NK via leur interaction avec les récepteurs CD94/NKG2-A (Coupel *et al.* 2007). Aussi, nous avons voulu étudier l'effet des molécules HLA-E solubles sur la

réponse effectrice de lymphocytes T $\alpha\beta$ CD8⁺ CD94/NKG2-A⁺ spécifiques d'antigènes de mélanome afin d'évaluer leur impact sur la réponse immunitaire anti-tumorale.

À l'aide de complexes HLA-E/peptide/ β 2m recombinants, nous avons montré que les formes solubles multimériques pouvaient diminuer l'amplitude des réponses calcique et proliférative induites lors de la stimulation d'un clone T CD8 spécifique de l'antigène de mélanome NA17-A. Ces résultats suggèrent que les molécules HLA-E solubles puissent, en se liant avec le CD94/NKG2-A, induire la transduction des signaux inhibiteurs dépendants et moduler ainsi le seuil d'activation des effecteurs lymphocytaires T CD8, au même titre que les formes membranaires.

En revanche, les activités cytotoxiques et cytokiniques ne semblent pas affectées par la présence de molécules HLA-E solubles, que ce soit sous une forme monomérique ou tétramérique. Lors de l'activation lymphocytaire, la voie de signalisation dépendante du calcium joue un rôle déterminant dans la dégranulation lytique et la transcription des gènes codant notamment pour les cytokines. Aussi, il peut paraître surprenant que l'effet des formes tétramériques sur le flux calcique des lymphocytes T CD8 ne soit pas associé à une diminution de leur réponse cytotoxique et cytokinique. Dans les expériences pour lesquelles le clone a été stimulé par des lignées tumorales, il est possible que l'effet des molécules HLA-E solubles soit masqué par l'interaction concomitante des récepteurs CD94/NKG2-A avec les molécules HLA-E membranaires exprimées à la surface des cellules tumorales. D'autre part, notre équipe a montré que l'inhibition de la cytotoxicité des lymphocytes T CD8, via CD94/NKG2-A, était partielle et pouvait être levée si les cellules étaient activées de façon supra-optimale. Enfin, il est envisageable que l'engagement des récepteurs inhibiteurs puisse affecter de façon différentielle le développement des fonctions effectrices selon leurs dépendances relatives au niveau d'activation perçu lors de l'engagement des TCR. En effet, il a été montré que la prolifération cellulaire des lymphocytes T exigeait l'engagement d'un plus grand nombre de complexes TCR-CD3 que celui nécessaire à l'induction de leur dégranulation ou de leur production de cytokine (Valitutti *et al.* 1996; Hemmer *et al.* 1998).

D'autre part, nous n'avons pas observé d'effet significatif en présence de formes monomériques des molécules HLA-E solubles, suggérant que seules des formes multimériques puissent affecter de façon significative la réponse lymphocytaire T CD8. Aussi, se pose la question de l'existence de formes multimériques des molécules HLA-E solubles produites naturellement. Il a précédemment été montré que les molécules HLA-I solubles naturelles pouvaient exister sous des formes multimériques et, dans le cas de la molécule non-classique HLA-G, ces formes liées par des ponts disulfures, présentent une

activité biologique bien supérieure à celle des formes monomériques (Davies *et al.* 1989; Apps *et al.* 2007; Morales *et al.* 2007; Carosella *et al.* 2008; Zhong *et al.* 2009). De façon similaire, des formes multimériques des molécules HLA-E sont produites *in vitro* par les cellules tumorales. En effet, l'analyse, par Western blot non-réducteur, des molécules HLA-E solubles présentes dans le surnageant de culture de lignées de mélanome permet de détecter des formes de poids moléculaire variés allant de 37kDa (chaîne lourde seule) jusqu'à 250kDa. On distingue notamment des bandes de 50kDa qui pourraient représenter des formes liées à la $\beta 2m$, ainsi que des bandes de poids moléculaires compris entre 100 et 250kDa qui pourraient correspondre à des formes multimériques de la molécule HLA-E.

Nous projetons donc de purifier les molécules HLA-E solubles produites *in vitro* afin de documenter d'avantage sous quelle(s) forme(s) celles-ci sont produites et de tester leur activité biologique. En effet, s'il s'avère que les molécules HLA-E solubles naturelles peuvent inhiber significativement la réponse proliférative des effecteurs lymphocytaires T CD8 anti-tumoraux, celles-ci pourraient alors constituer un mécanisme alternatif d'échappement tumoral à la surveillance exercée par le système immunitaire.

Enfin, si nous parvenons à démontrer que les molécules HLA-E solubles peuvent moduler l'issue biologique de l'activation engendrée lors de l'engagement du récepteur TCR des lymphocytes T CD8, les perspectives de ce travail seront, d'une part d'étayer plus précisément les mécanismes d'action de cette inhibition et, d'autre part, d'élargir cette étude aux autres effecteurs immuns anti-tumoraux exprimant le CD94/NKG2-A : cellules NK et $T\gamma\delta$.

Par ailleurs, il a été montré que la transformation tumorale pouvait modifier le répertoire peptidique de la molécule HLA-E. Aussi, nous cherchons actuellement à documenter l'existence des lymphocytes T anti-tumoraux restreints par la molécule HLA-E.

En effet, dans la mesure où l'expression des molécules HLA-E est induite ou augmentée dans de nombreux cancers, l'existence de réponses T anti-tumorales restreintes par cette molécule pourrait contribuer positivement à la surveillance immunitaire des variants tumoraux déficients pour l'expression des molécules HLA-I classiques. A l'appui de cette hypothèse, le groupe de Thorbald Van Hall a montré que des réponses T anti-tumorales restreintes par son homologue murin Qa-1 participaient à la surveillance des tumeurs TAP déficientes *in vivo* (Oliveira *et al.* 2010).

De plus, si des antigènes de tumeurs restreints par la molécule HLA-E étaient identifiés, leur utilisation dans le cadre d'immunothérapies présenterait l'avantage

remarquable de pouvoir s'adresser à l'ensemble des patients, tous haplotypes HLA-I confondus.

Nous envisageons notamment de cribler la réactivité des lymphocytes T CD8 infiltrant les tumeurs de mélanomes vis-à-vis de cellules COS co-transfectées avec la molécule HLA-E et une collection d'ADNc d'antigènes tumoraux déjà décrits.

D'autre part, il a récemment été suggéré que des lymphocytes T restreints par HLA-E et reconnaissant des peptides issus de la protéine associée au stress cellulaire HSP60 pouvaient exister chez l'homme. Aussi, étant donné que les cellules tumorales sur-expriment fréquemment cette molécule *in vitro* et *in vivo* (carcinomes colorectaux, du sein et du col de l'utérus, adénocarcinomes gastriques et de la prostate, adénomes surrenaliens, ostéosarcomes, leucémies et lymphomes) (Chant *et al.* 1995; Franzen *et al.* 1996; Bini *et al.* 1997; Hsu and Hsu 1998; Cornford *et al.* 2000; Uozaki *et al.* 2000; Cappello *et al.* 2002; Cappello *et al.* 2003; Cappello *et al.* 2003; Pignatelli *et al.* 2003; Cappello *et al.* 2005; Castle *et al.* 2005; Mori *et al.* 2005; Thomas *et al.* 2005; He *et al.* 2007; Giaginis *et al.* 2009; Hwang *et al.* 2009; Sedlackova *et al.* 2011), il serait intéressant de renseigner leur existence dans le sang périphérique et/ou les lymphocytes infiltrant les tumeurs des patients atteints de cancer, ainsi que leur potentielle réactivité anti-tumorale.

2. Implication des molécules HLA-E en transplantation

La transplantation d'organe a pris un essor important depuis l'instauration de traitements immunosuppresseurs efficaces et est aujourd'hui largement utilisée dans les cas de défaillance terminale d'organe solide. Cependant, malgré les nombreuses avancées concernant l'appariement des donneurs/receveurs, la conservation des organes, les techniques chirurgicales et la surveillance des complications post-opératoires, les réactions de rejets aigus et chroniques restent la principale cause d'échec des transplantations.

Ces réactions mettent en jeu des allo-antigènes du donneur, majoritairement les molécules HLA, contre lesquels le receveur peut développer des réponses immunitaires humorales et cellulaires potentiellement délétères pour le greffon. En effet, celles-ci vont entraîner des lésions au sein des tissus greffés pouvant aboutir à un dysfonctionnement voire à la perte du greffon à plus ou moins long terme.

De plus, l'immunosuppression utilisée pour prévenir le phénomène de rejet augmente également le risque d'infection chez les patients transplantés. Or, si maintenant les complications infectieuses menacent rarement le pronostic vital des patients, elles peuvent cependant faciliter la survenue des rejets aigus ou chroniques (Fishman 2007; Miller *et al.* 2008).

Ainsi, il a été estimé que plus de 75% des patients recevant une greffe d'organe solide étaient sujets aux infections par le CMV, et de nombreuses études cliniques ont rapporté une relation entre cette infection et le rejet de greffe aigu ou chronique, surtout lorsque la réplication virale se déroule au sein même du greffon (Rowshani *et al.* 2005; Streblow *et al.* 2007; Fisher 2009; Husain *et al.* 2009).

Les mécanismes impliqués dans la relation CMV-rejet sont divers et complexes. Tout d'abord, l'infection ou la réactivation du CMV dans les cellules du greffon entraîne une réaction inflammatoire locale permettant le recrutement de cellules immunocompétentes impliquées dans le contrôle de l'infection. L'inflammation va alors favoriser la surexpression de molécules d'adhérence et des allo-antigènes par les cellules du greffon et, en particulier, à la surface des cellules endothéliales allogéniques, ce qui va promouvoir indirectement l'activation des réponses cellulaires impliquées dans le rejet (Guetta *et al.* 2001; Al-Lamki *et al.* 2008). De plus, plusieurs études ont décrit des réactions croisées des lymphocytes T du receveur vis-à-vis des antigènes viraux et des allo-antigènes (Amir *et al.* 2010; D'Orsogna *et*

al. 2010; Morice *et al.* 2010). De fait, les réponses cellulaires antivirales peuvent également contribuer directement au rejet des cellules allogéniques. Enfin, il a été proposé que les réponses T CD8 restreintes par la molécule HLA-E et induites lors d'infections par le CMV, pourraient favoriser le rejet allogénique si le peptide viral reconnu dérivait également des molécules HLA-I allogéniques du greffon (Pietra *et al.* 2001; Pietra *et al.* 2003).

Aussi, nous avons voulu caractériser l'allo-réactivité de ces réponses T non conventionnelles vis-à-vis de cellules endothéliales allogéniques qui expriment fortement les molécules HLA-E à leur surface et jouent un rôle crucial dans la présentation des allo-antigènes aux lymphocytes T des receveurs d'organe *in vivo*. De plus, ayant observé que les cellules endothéliales pouvaient produire des formes solubles des molécules HLA-E, nous avons étudié leurs propriétés fonctionnelles vis-à-vis des lymphocytes T restreints par cette molécule HLA.

Le groupe de C. Mingari et de L. Moretta a montré que des réponses pauciclones T CD8 restreintes par la molécule HLA-E et dirigées contre des peptides issus de la protéine virale UL40 pouvaient être détectées chez les patients CMV séropositifs (Romagnani *et al.* 2004; Mazzarino *et al.* 2005). De façon concordante, nous avons observé l'apparition d'une population lymphocytaire monoclonale T $\alpha\beta$ CD8⁺ restreinte par la molécule HLA-E chez un patient transplanté rénal en cours d'infection par le CMV. Cette population représente une fraction très importante des cellules du sang périphérique (14% des cellules CD3⁺CD8⁺), présente un phénotype effecteur mémoire CD62L⁻CCR7⁻CD27⁻CD28^{+/-}CD45RA^{low}CD45RO^{high}CD57⁻ et est caractérisée par un fort potentiel cytotoxique ainsi que la capacité de produire de grandes quantités d'IFN- γ et de TNF- α .

De façon intéressante, l'expression des molécules HLA-I classiques est fréquemment diminuée à la surface des cellules infectées par le CMV, limitant ainsi la capacité des lymphocytes T CD8 conventionnels à reconnaître et à éliminer les cellules infectées (Reddehase 2002). À l'inverse, l'expression membranaire des molécules HLA-E est préservée voire augmentée, grâce à la capacité du virus à fournir des peptides pouvant être apprêtés de façon indépendante de TAP. Aussi, le développement de ces réponses T restreintes par la molécule HLA-E pourrait jouer un rôle crucial dans le contrôle de cette infection virale et ce, notamment, chez les patients transplantés qui sont particulièrement sujets aux primo-infections ou à la réactivation d'infections CMV latentes.

Notre étude montre que ces réponses T non conventionnelles pourraient également jouer un rôle délétère chez les patients transplantés en favorisant le rejet d'organes

vascularisés. En effet, les peptides viraux reconnus étant identiques à ceux issus de molécules HLA-A et -C allogéniques, les lymphocytes T induits par l'infection à CMV peuvent reconnaître et tuer des cellules endothéliales allogéniques *in vitro*. Par conséquent, il est probable que, dans le cadre de greffe en semi-compatibilité pour les molécules HLA-I classiques, ces réponses T anti-virales puissent éliminer directement les cellules endothéliales du greffon ce qui pourrait contribuer à la survenue des rejets aigus ou chroniques chez ces patients.

D'autre part, nous avons également investigué l'expression des récepteurs NK et leur impact sur la capacité des lymphocytes T restreints par HLA-E à développer des réponses effectrices. La réactivité de la population lymphocytaire isolée est régulée par plusieurs récepteurs de type NK : KIR2DL2, ILT-2 et NKG2-D. Le récepteur CD94, bien qu'exprimé mais probablement sous la forme d'homodimères, n'est a priori pas fonctionnel. Parmi ces récepteurs, l'expression du KIR2DL2 inhibiteur joue un rôle majeur dans la tolérance au soi de ces lymphocytes T via la reconnaissance des molécules HLA-C autologues. Par conséquent, l'haplotype HLA-C des cellules endothéliales allogéniques joue un rôle déterminant dans la capacité des lymphocytes T restreints HLA-E à les reconnaître et à les éliminer *in vitro*. Ainsi, il apparaît que l'haplotype HLA-C du donneur, qui est encore peu pris en compte dans le cadre de transplantations d'organes solides, est un facteur déterminant dans la susceptibilité des cellules allogéniques à être reconnues par les lymphocytes T restreints par HLA-E et induits par le CMV.

En définitive, ces travaux supportent le concept que les réponses T anti-CMV restreintes par la molécule HLA-E puissent contribuer au rejet d'organes vascularisés chez les patients transplantés. Nous souhaitons désormais élargir cette étude à une cohorte de patients transplantés rénaux, afin de renseigner la fréquence de ces réponses T non conventionnelles, l'impact de la compatibilité HLA-C sur leur alloréactivité et leur éventuelle association avec l'incidence des rejets chez les sujets infectés par le CMV. De plus, les molécules HLA-E étant également fortement exprimées par les cellules d'origine hématopoïétique, il serait intéressant de renseigner leur potentiel rôle dans le cadre de transplantation de cellules hématopoïétiques.

Les cellules endothéliales présentent la capacité de produire des formes solubles de la molécule HLA-E et ce, surtout en présence de cytokines proinflammatoires. Nous avons donc cherché à caractériser leur impact sur les lymphocytes T restreints par la molécule HLA-E et induits par le CMV afin d'évaluer leur rôle potentiel dans les réponses anti-virales ou allogéniques.

À l'aide de monomères HLA-I/peptide/ β 2m recombinants, nous avons montré *in vitro* que les molécules HLA-E solubles exprimant un peptide antigénique pouvaient, d'une part, induire l'activation et la lyse fratricide des lymphocytes T restreints HLA-E et, d'autre part, sensibiliser des cellules à la lyse par ces mêmes lymphocytes T, à condition que les cibles expriment la molécule HLA-E. En revanche, nous n'avons pas observé d'effet en présence de molécules HLA-E solubles chargées avec un peptide irrelevant. Ce mécanisme ne semble pas restreint aux molécules HLA-E solubles puisque nous avons constaté des effets similaires dans un modèle HLA-I classique (HLA-A*0201/NA17-A).

Plusieurs études ont montré que les molécules HLA-I classiques, ou non, pouvaient induire l'apoptose de lymphocytes T CD8. Cependant, dans la majorité des cas, l'effet pro-apoptotique des molécules HLA-I solubles est lié à leur capacité à interagir avec les co-récepteurs CD8 ou les récepteur NK activateurs. Cette interaction induirait la production des formes solubles et membranaires du ligand du récepteur de mort Fas, ce qui se traduit par la délétion des cellules lymphocytaires Fas⁺ (Zavazava and Kronke 1996; Puppo *et al.* 2000; Contini *et al.* 2005). Toutefois, nos travaux suggèrent plutôt que l'effet des molécules HLA-I soluble serait lié au transfert de l'antigène vers les lymphocytes T qui peuvent alors se présenter les complexes antigéniques entre eux et donc développer des réponses fratricides dépendantes de l'engagement de leur TCR.

À ce jour, seule une équipe a décrit des observations similaires aux nôtres (Ge *et al.* 2002; Schott *et al.* 2002; Stone and Stern 2006). Leurs travaux visaient à déterminer la valence du TCR nécessaire à l'activation des lymphocytes T CD8. En effet, il avait été suggéré que l'engagement monovalent des TCRs des lymphocytes T CD8 puisse suffire à initier la transduction des signaux activateurs et le développement de réponses effectrices, contrairement aux lymphocytes T CD4 pour lesquels il avait clairement été montré que la multimérisation/l'oligomérisation des récepteurs TCR était une condition indispensable à leur activation (Sykulev *et al.* 1996; Goldstein *et al.* 1997; Delon *et al.* 1998). À l'aide de splénocytes de souris Rag^{-/-}, exprimant les molécules du CMH-I K^b et un TCR transgénique (2C) reconnaissant à la fois l'antigène SIYRYGL/K^b et l'alloantigène QLSPFPFDL/L^d, ils avaient alors montré *in vitro*, que seul les monomères SIY-K^b pouvaient activer les

lymphocytes T CD8 exprimant le TCR 2C, tandis que les complexes reconnus de manière allogénique n'avaient aucun effet. De plus, les lymphocytes T CD8 issus de souris K^b déficientes n'étaient plus capables de répondre à une stimulation par les complexes antigénique SIYRYYGL/K^b sous une forme monomérique. Aussi, avait-il été proposé que la capacité des monomères CMH-I/peptides à activer des lymphocytes T CD8 fût liée à un transfert du peptide antigénique vers leurs molécules CMH-I membranaires. De plus, ce mécanisme semblait nécessiter l'internalisation préalable de complexes CMH-I/peptide par les lymphocytes T. Nos résultats divergent cependant sur ce dernier point car nous avons observé que la fixation préalable des cellules T, ou de leurs cibles, n'affectait pas l'efficacité de ce transfert, que ce soit pour les monomères HLA-E ou HLA-A*0201.

Deux mécanismes alternatifs peuvent alors être envisagés. D'une part, le transfert antigénique pourrait résulter du relargage des peptides issus de monomères qui se chargeraient, alors, de manière exogène sur les molécules HLA-I membranaires des lymphocytes T ou de leurs cibles. Cependant, le fait que ce transfert soit aussi efficace que celui observé en présence de peptides courts est assez surprenant et ce d'autant plus que les complexes HLA-I/ β 2m solubles semblent relativement stables à 37°C dans les temps expérimentaux impartis. Néanmoins, il a été suggéré que la liaison des molécules HLA-E avec leurs peptides était très labile (le temps de demi-vie étant d'environ 13 minutes à 37°C) mais que les molécules HLA-E "vides" étaient comparativement plus stables et restaient associées plus longtemps à la β 2m que les molécules HLA-I classiques (Kambayashi *et al.* 2004). De façon concordante, nous avons observé qu'il était possible de produire des complexes recombinants HLA-E/ β 2m vides, tandis que cela est impossible pour les molécules HLA-A*0201. Aussi, dans le cas des molécules HLA-E solubles, il est probable qu'une fraction importante des peptides se dissocient rapidement et spontanément des complexes monomériques dans nos conditions expérimentales, ce qui pourrait conduire à leur recyclage sur les molécules HLA-E membranaires. Une autre explication possible serait que les monomères solubles puissent s'associer *in vitro* avec leurs homologues membranaires et que, sous cette forme, ils puissent alors engager de manière efficace les TCRs des lymphocytes T. En effet, il a précédemment été montré que les molécules HLA, classiques ou non et de type I ou II, pouvaient former des multimères à la membrane. Par exemple, les molécules HLA-B27 et HLA-G peuvent former de homodimères et/ou des multimères de chaînes lourdes via la liaison covalente de cystéines des domaines extracellulaires par des ponts disulfures. Dans le cas des molécules HLA-A27, ces dimères, qui ne sont pas associés à la β 2m, peuvent

cependant présenter des peptides (Allen *et al.* 1999; Boyson *et al.* 2002; Bird *et al.* 2003; Gonen-Gross *et al.* 2003; Shiroishi *et al.* 2006; Lenart *et al.* 2012). De plus, ces complexes multimériques présenteraient aussi une avidité supérieure à celle des formes monomériques pour les récepteurs de type LIR (Gonen-Gross *et al.* 2003; Shiroishi *et al.* 2006; Giles *et al.* 2012). D'autre part, il a été montré que les molécules HLA-II pouvaient former des "superdimères" issus de la multimérisation des hétérodimères de chaînes lourdes α et β . Ces multimères interagissent par des liaisons non-covalentes et peuvent impliquer différents domaines des chaînes α et β . De façon intéressante, les substitutions nucléotidiques abrogeant les interactions en cis entre les molécules HLA-II peuvent altérer leur capacité à stimuler des lymphocytes T CD4 de façon antigène spécifique et plusieurs travaux suggèrent que l'oligomérisation préalable des molécules du CMH-II est nécessaire à l'engagement productif des complexes CD3-TCR (Schafer *et al.* 1995; Nydam *et al.* 1998; Lindstedt *et al.* 2001; Hayball and Lake 2005).

En définitive, il apparaît que les molécules HLA-I solubles présentent des propriétés immunologiques liées à leur capacité à "véhiculer" des peptides antigéniques. Ainsi, nos résultats suggèrent qu'elles pourraient à la fois conduire à l'élimination inappropriée de cellules du soi saines, mais également contribuer à la délétion clonale des lymphocytes T de spécificité antigénique correspondante. Aussi, les perspectives de ces travaux sont de chercher à mieux déterminer les mécanismes sous-jacents impliqués dans l'effet des monomères HLA-I/peptides, et de documenter si les molécules HLA-I solubles produites naturellement présentent les mêmes propriétés fonctionnelles et pourraient donc influencer sur le développement des réponses à médiation cellulaire, *in vivo*.

Bibliographie

- Adamashvili, I., R. Wolf, *et al.* (2003). "Soluble HLA-I (s-HLA-I) synthesis in systemic lupus erythematosus." *Rheumatol Int* 23(6): 294-300.
- Adamashvili, I. M., P. A. Fraser, *et al.* (1996). "Association of serum concentration of soluble class I HLA with HLA allotypes." *Transplantation* 61(6): 984-987.
- Adamashvili, I. M., J. C. McDonald, *et al.* (1995). "Soluble class I HLA antigens in patients with rheumatoid arthritis and their families." *J Rheumatol* 22(6): 1025-1031.
- Adams, E. J. and P. Parham (2001). "Species-specific evolution of MHC class I genes in the higher primates." *Immunol Rev* 183: 41-64.
- Al-Lamki, R. S., J. R. Bradley, *et al.* (2008). "Endothelial cells in allograft rejection." *Transplantation* 86(10): 1340-1348.
- Albitar, M., M. Johnson, *et al.* (2007). "Levels of soluble HLA-I and beta2M in patients with acute myeloid leukemia and advanced myelodysplastic syndrome: association with clinical behavior and outcome of induction therapy." *Leukemia* 21(3): 480-488.
- Albitar, M., J. M. Vose, *et al.* (2007). "Clinical relevance of soluble HLA-I and beta2-microglobulin levels in non-Hodgkin's lymphoma and Hodgkin's disease." *Leuk Res* 31(2): 139-145.
- Alcover, A. and B. Alarcon (2000). "Internalization and intracellular fate of TCR-CD3 complexes." *Crit Rev Immunol* 20(4): 325-346.
- Aldrich, C. J., J. R. Rodgers, *et al.* (1988). "Regulation of Qa-1 expression and determinant modification by an H-2D-linked gene, Qdm." *Immunogenetics* 28(5): 334-344.
- Algarra, I., A. Garcia-Lora, *et al.* (2004). "The selection of tumor variants with altered expression of classical and nonclassical MHC class I molecules: implications for tumor immune escape." *Cancer Immunol Immunother* 53(10): 904-910.
- Allen, R. L., C. A. O'Callaghan, *et al.* (1999). "Cutting edge: HLA-B27 can form a novel beta 2-microglobulin-free heavy chain homodimer structure." *J Immunol* 162(9): 5045-5048.
- Allison, J. P., M. A. Pellegrino, *et al.* (1977). "Biologic and chemical characterization of HLA antigens in human serum." *J Immunol* 118(3): 1004-1009.
- Alvarez-Cermeno, J., J. M. Echevarria, *et al.* (1989). "Soluble class I antigens in serum and CSF of patients with varicella-zoster virus meningitis." *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 52(10): 1194-1196.
- Amiot, L., S. Ferrone, *et al.* (2011). "Biology of HLA-G in cancer: a candidate molecule for therapeutic intervention?" *Cell Mol Life Sci* 68(3): 417-431.
- Amir, A. L., L. J. D'Orsogna, *et al.* (2010). "Allo-HLA reactivity of virus-specific memory T cells is common." *Blood* 115(15): 3146-3157.
- Amirghofran, Z., A. K. Sheikhi, *et al.* (2002). "Soluble HLA class I molecules in malignant pleural and peritoneal effusions and its possible role on NK and LAK cytotoxicity." *J Cancer Res Clin Oncol* 128(8): 443-448.
- Anderson, G., J. J. Owen, *et al.* (1994). "Thymic epithelial cells provide unique signals for positive selection of CD4+CD8+ thymocytes in vitro." *J Exp Med* 179(6): 2027-2031.
- Andre, P., C. Brunet, *et al.* (1999). "Differential regulation of killer cell Ig-like receptors and CD94 lectin-like dimers on NK and T lymphocytes from HIV-1-infected individuals." *Eur J Immunol* 29(4): 1076-1085.
- Anfossi, N., P. Andre, *et al.* (2006). "Human NK cell education by inhibitory receptors for MHC class I." *Immunity* 25(2): 331-342.
- Angelini, D. F., R. Zambello, *et al.* (2011). "NKG2A inhibits NKG2C effector functions of gammadelta T cells: implications in health and disease." *J Leukoc Biol* 89(1): 75-84.
- Antoun, A., S. Jobson, *et al.* (2009). "Ethnic variability in human leukocyte antigen-E haplotypes." *Tissue Antigens* 73(1): 39-45.
- Apps, R., L. Gardner, *et al.* (2007). "A homodimeric complex of HLA-G on normal trophoblast cells modulates antigen-presenting cells via LILRB1." *Eur J Immunol* 37(7): 1924-1937.
- Arlettaz, L., J. Villard, *et al.* (2004). "Activating CD94:NKG2C and inhibitory CD94:NKG2A receptors are expressed by distinct subsets of committed CD8+ TCR alphabeta lymphocytes." *Eur J Immunol* 34(12): 3456-3464.
- Arnaiz-Villena, A., G. Vargas-Alarcon, *et al.* (2007). "HLA-E polymorphism in Amerindians from Mexico (Mazatecos), Colombia (Wayu) and Chile (Mapuches): evolution of MHC-E gene." *Tissue Antigens* 69 Suppl 1: 132-135.

- Aulitzky, W. E., H. Grosse-Wilde, *et al.* (1991). "Enhanced serum levels of soluble HLA class I molecules are induced by treatment with recombinant interferon-gamma (IFN-gamma)." *Clin Exp Immunol* 86(2): 236-239.
- Bahri, R., F. Hirsch, *et al.* (2006). "Soluble HLA-G inhibits cell cycle progression in human alloreactive T lymphocytes." *J Immunol* 176(3): 1331-1339.
- Bahri, R., A. Naji, *et al.* (2009). "Dendritic cells secrete the immunosuppressive HLA-G molecule upon CTLA4-Ig treatment: implication in human renal transplant acceptance." *J Immunol* 183(11): 7054-7062.
- Bai, A., J. Broen, *et al.* (1998). "The pathway for processing leader-derived peptides that regulate the maturation and expression of Qa-1b." *Immunity* 9(3): 413-421.
- Barakonyi, A., K. T. Kovacs, *et al.* (2002). "Recognition of nonclassical HLA class I antigens by gamma delta T cells during pregnancy." *J Immunol* 168(6): 2683-2688.
- Barr, V. A., L. Balagopalan, *et al.* (2006). "T-cell antigen receptor-induced signaling complexes: internalization via a cholesterol-dependent endocytic pathway." *Traffic* 7(9): 1143-1162.
- Bassani-Sternberg, M., E. Barnea, *et al.* (2010). "Soluble plasma HLA peptidome as a potential source for cancer biomarkers." *Proc Natl Acad Sci U S A* 107(44): 18769-18776.
- Basturk, B., F. Karakayali, *et al.* (2006). "Human leukocyte antigen-G, a new parameter in the follow-up of liver transplantation." *Transplant Proc* 38(2): 571-574.
- Battistini, L., G. Borsellino, *et al.* (1997). "Phenotypic and cytokine analysis of human peripheral blood gamma delta T cells expressing NK cell receptors." *J Immunol* 159(8): 3723-3730.
- Becker, J. C., C. S. Vetter, *et al.* (2000). "Differential expression of CD28 and CD94/NKG2 on T cells with identical TCR beta variable regions in primary melanoma and sentinel lymph node." *Eur J Immunol* 30(12): 3699-3706.
- Behrens, D., K. Lange, *et al.* (2001). "Donor-derived soluble MHC antigens plus low-dose cyclosporine induce transplantation unresponsiveness independent of the thymus by down-regulating T cell-mediated alloresponses in a rat transplantation model." *Transplantation* 72(12): 1974-1982.
- Benevolo, M., M. Mottolese, *et al.* (2011). "High expression of HLA-E in colorectal carcinoma is associated with a favorable prognosis." *J Transl Med* 9: 184.
- Bertone, S., F. Schiavetti, *et al.* (1999). "Transforming growth factor-beta-induced expression of CD94/NKG2A inhibitory receptors in human T lymphocytes." *Eur J Immunol* 29(1): 23-29.
- Beziat, V., B. Descours, *et al.* (2010). "NK cell terminal differentiation: correlated stepwise decrease of NKG2A and acquisition of KIRs." *PLoS One* 5(8): e11966.
- Bianchini, M., E. Levy, *et al.* (2006). "Comparative study of gene expression by cDNA microarray in human colorectal cancer tissues and normal mucosa." *Int J Oncol* 29(1): 83-94.
- Billadeau, D. D., K. M. Brumbaugh, *et al.* (1998). "The Vav-Rac1 pathway in cytotoxic lymphocytes regulates the generation of cell-mediated killing." *J Exp Med* 188(3): 549-559.
- Bini, L., B. Magi, *et al.* (1997). "Protein expression profiles in human breast ductal carcinoma and histologically normal tissue." *Electrophoresis* 18(15): 2832-2841.
- Binstadt, B. A., K. M. Brumbaugh, *et al.* (1996). "Sequential involvement of Lck and SHP-1 with MHC-recognizing receptors on NK cells inhibits FcR-initiated tyrosine kinase activation." *Immunity* 5(6): 629-638.
- Bird, L. A., C. A. Peh, *et al.* (2003). "Lymphoblastoid cells express HLA-B27 homodimers both intracellularly and at the cell surface following endosomal recycling." *Eur J Immunol* 33(3): 748-759.
- Bjorkstrom, N. K., T. Lindgren, *et al.* (2011). "Rapid expansion and long-term persistence of elevated NK cell numbers in humans infected with hantavirus." *J Exp Med* 208(1): 13-21.
- Bland, F. A., M. K. Lemberg, *et al.* (2003). "Requirement of the proteasome for the trimming of signal peptide-derived epitopes presented by the nonclassical major histocompatibility complex class I molecule HLA-E." *J Biol Chem* 278(36): 33747-33752.
- Blaschitz, A., H. Hutter, *et al.* (2001). "HLA Class I protein expression in the human placenta." *Early Pregnancy* 5(1): 67-69.
- Bonorino, P., V. Leroy, *et al.* (2007). "Features and distribution of CD8 T cells with human leukocyte antigen class I-specific receptor expression in chronic hepatitis C." *Hepatology* 46(5): 1375-1386.

- Borelli, S. D., E. Ferreira, *et al.* (1999). "Specific sHLA in healthy donors and donor-specific sHLA in renal transplant patients." *Hum Immunol* 60(5): 430-434.
- Borrego, F., J. Kabat, *et al.* (2002). "NK cell CD94/NKG2A inhibitory receptors are internalized and recycle independently of inhibitory signaling processes." *J Immunol* 169(11): 6102-6111.
- Borrego, F., A. Lopez-Beltran, *et al.* (1994). "Downregulation of Fc gamma receptor IIIA alpha (CD16-II) on natural killer cells induced by anti-CD16 mAb is independent of protein tyrosine kinases and protein kinase C." *Cell Immunol* 158(1): 208-217.
- Borrego, F., M. Masilamani, *et al.* (2005). "The cell biology of the human natural killer cell CD94/NKG2A inhibitory receptor." *Mol Immunol* 42(4): 485-488.
- Bossard, C., S. Bezieau, *et al.* (2012). "HLA-E/beta2 microglobulin overexpression in colorectal cancer is associated with recruitment of inhibitory immune cells and tumor progression." *Int J Cancer* 131(4): 855-863.
- Boucraut, J., T. Guillaudeux, *et al.* (1993). "HLA-E is the only class I gene that escapes CpG methylation and is transcriptionally active in the trophoblast-derived human cell line JAR." *Immunogenetics* 38(2): 117-130.
- Boullier, S., Y. Poquet, *et al.* (1998). "Phosphoantigen activation induces surface translocation of intracellular CD94/NKG2A class I receptor on CD94- peripheral Vgamma9 Vdelta2 T cells but not on CD94- thymic or mature gammadelta T cell clones." *Eur J Immunol* 28(11): 3399-3410.
- Bouwer, H. G., K. F. Lindahl, *et al.* (1994). "An H2-T MHC class Ib molecule presents Listeria monocytogenes-derived antigen to immune CD8+ cytotoxic T cells." *J Immunol* 152(11): 5352-5360.
- Bouwer, H. G., M. S. Seaman, *et al.* (1997). "MHC class Ib-restricted cells contribute to antilisterial immunity: evidence for Qa-1b as a key restricting element for Listeria-specific CTLs." *J Immunol* 159(6): 2795-2801.
- Boyington, J. C., A. N. Riaz, *et al.* (1999). "Structure of CD94 reveals a novel C-type lectin fold: implications for the NK cell-associated CD94/NKG2 receptors." *Immunity* 10(1): 75-82.
- Boyson, J. E., R. Erskine, *et al.* (2002). "Disulfide bond-mediated dimerization of HLA-G on the cell surface." *Proc Natl Acad Sci U S A* 99(25): 16180-16185.
- Boyson, J. E., S. N. McAdam, *et al.* (1995). "The MHC E locus in macaques is polymorphic and is conserved between macaques and humans." *Immunogenetics* 41(2-3): 59-68.
- Braud, V., E. Y. Jones, *et al.* (1997). "The human major histocompatibility complex class Ib molecule HLA-E binds signal sequence-derived peptides with primary anchor residues at positions 2 and 9." *Eur J Immunol* 27(5): 1164-1169.
- Braud, V. M., D. S. Allan, *et al.* (1998). "HLA-E binds to natural killer cell receptors CD94/NKG2A, B and C." *Nature* 391(6669): 795-799.
- Braud, V. M., D. S. Allan, *et al.* (1998). "TAP- and tapasin-dependent HLA-E surface expression correlates with the binding of an MHC class I leader peptide." *Curr Biol* 8(1): 1-10.
- Brieva, J. A., L. M. Villar, *et al.* (1990). "Soluble HLA class I antigen secretion by normal lymphocytes: relationship with cell activation and effect of interferon-gamma." *Clin Exp Immunol* 82(2): 390-395.
- Brooks, A. G., F. Borrego, *et al.* (1999). "Specific recognition of HLA-E, but not classical, HLA class I molecules by soluble CD94/NKG2A and NK cells." *J Immunol* 162(1): 305-313.
- Brooks, A. G., P. E. Posch, *et al.* (1997). "NKG2A complexed with CD94 defines a novel inhibitory natural killer cell receptor." *J Exp Med* 185(4): 795-800.
- Brostjan, C., T. Bellon, *et al.* (2002). "Differential expression of inhibitory and activating CD94/NKG2 receptors on NK cell clones." *J Immunol Methods* 264(1-2): 109-119.
- Bukur, J., B. Malenica, *et al.* (2003). "Altered expression of nonclassical HLA class Ib antigens in human renal cell carcinoma and its association with impaired immune response." *Hum Immunol* 64(11): 1081-1092.
- Burgess, S. J., K. Maasho, *et al.* (2008). "The NKG2D receptor: immunobiology and clinical implications." *Immunol Res* 40(1): 18-34.
- Byers, A. M., N. P. Andrews, *et al.* (2006). "CD94/NKG2A expression is associated with proliferative potential of CD8 T cells during persistent polyoma virus infection." *J Immunol* 176(10): 6121-6129.

- Cambier, J. C. (1995). "Antigen and Fc receptor signaling. The awesome power of the immunoreceptor tyrosine-based activation motif (ITAM)." *J Immunol* 155(7): 3281-3285.
- Campoli, M. and S. Ferrone (2008). "HLA antigen changes in malignant cells: epigenetic mechanisms and biologic significance." *Oncogene* 27(45): 5869-5885.
- Campoli, M. and S. Ferrone (2008). "Tumor escape mechanisms: potential role of soluble HLA antigens and NK cells activating ligands." *Tissue Antigens* 72(4): 321-334.
- Cantoni, C., R. Biassoni, *et al.* (1998). "The activating form of CD94 receptor complex: CD94 covalently associates with the Kp39 protein that represents the product of the NKG2-C gene." *Eur J Immunol* 28(1): 327-338.
- Cao, M., S. M. Yie, *et al.* (2011). "Plasma soluble HLA-G is a potential biomarker for diagnosis of colorectal, gastric, esophageal and lung cancer." *Tissue Antigens* 78(2): 120-128.
- Cappello, F., M. Bellafiore, *et al.* (2002). "Expression of 60-kD heat shock protein increases during carcinogenesis in the uterine exocervix." *Pathobiology* 70(2): 83-88.
- Cappello, F., S. David, *et al.* (2005). "The expression of HSP60 and HSP10 in large bowel carcinomas with lymph node metastase." *BMC Cancer* 5: 139.
- Cappello, F., A. Palma, *et al.* (2003). "Biological aggressiveness evaluation in prostate carcinomas: immunohistochemical analysis of PCNA and p53 in a series of Gleason 6 (3+3) adenocarcinomas." *Eur J Histochem* 47(2): 129-132.
- Cappello, F., F. Rappa, *et al.* (2003). "Immunohistochemical evaluation of PCNA, p53, HSP60, HSP10 and MUC-2 presence and expression in prostate carcinogenesis." *Anticancer Res* 23(2B): 1325-1331.
- Carbone, E., G. Terrazzano, *et al.* (1996). "Natural killer clones recognize specific soluble HLA class I molecules." *Eur J Immunol* 26(3): 683-689.
- Carena, I., A. Shamshiev, *et al.* (1997). "Major histocompatibility complex class I molecules modulate activation threshold and early signaling of T cell antigen receptor-gamma/delta stimulated by nonpeptidic ligands." *J Exp Med* 186(10): 1769-1774.
- Carosella, E. D., B. Favier, *et al.* (2008). "Beyond the increasing complexity of the immunomodulatory HLA-G molecule." *Blood* 111(10): 4862-4870.
- Carretero, M., C. Cantoni, *et al.* (1997). "The CD94 and NKG2-A C-type lectins covalently assemble to form a natural killer cell inhibitory receptor for HLA class I molecules." *Eur J Immunol* 27(2): 563-567.
- Carretero, M., M. Llano, *et al.* (2000). "Mitogen-activated protein kinase activity is involved in effector functions triggered by the CD94/NKG2-C NK receptor specific for HLA-E." *Eur J Immunol* 30(10): 2842-2848.
- Carretero, M., G. Palmieri, *et al.* (1998). "Specific engagement of the CD94/NKG2-A killer inhibitory receptor by the HLA-E class Ib molecule induces SHP-1 phosphatase recruitment to tyrosine-phosphorylated NKG2-A: evidence for receptor function in heterologous transfectants." *Eur J Immunol* 28(4): 1280-1291.
- Cascino, I., F. Paladini, *et al.* (2007). "Identification of previously unrecognized predisposing factors for ankylosing spondylitis from analysis of HLA-B27 extended haplotypes in Sardinia." *Arthritis Rheum* 56(8): 2640-2651.
- Castle, P. E., R. Ashfaq, *et al.* (2005). "Immunohistochemical evaluation of heat shock proteins in normal and preinvasive lesions of the cervix." *Cancer Lett* 229(2): 245-252.
- Cecchetti, S., F. Spadaro, *et al.* (2007). "Functional role of phosphatidylcholine-specific phospholipase C in regulating CD16 membrane expression in natural killer cells." *Eur J Immunol* 37(10): 2912-2922.
- Chambers, B., P. Grufman, *et al.* (2007). "Induction of protective CTL immunity against peptide transporter TAP-deficient tumors through dendritic cell vaccination." *Cancer Res* 67(18): 8450-8455.
- Chang, C., A. Rodriguez, *et al.* (1995). "Molecular characterization of human CD94: a type II membrane glycoprotein related to the C-type lectin superfamily." *Eur J Immunol* 25(9): 2433-2437.
- Chant, I. D., P. E. Rose, *et al.* (1995). "Analysis of heat-shock protein expression in myeloid leukaemia cells by flow cytometry." *Br J Haematol* 90(1): 163-168.

- Charlton, R. K. and C. M. Zmijewski (1970). "Soluble HL-A7 antigen: localization in the beta-lipoprotein fraction of human serum." *Science* 170(3958): 636-637.
- Chen, A., Y. Shen, *et al.* (2011). "Expression of the nonclassical HLA class I and MICA/B molecules in human hepatocellular carcinoma." *Neoplasma* 58(5): 371-376.
- Chen, C. H., H. T. Liao, *et al.* (2010). "Human leukocyte antigen-G in ankylosing spondylitis and the response after tumour necrosis factor-alpha blocker therapy." *Rheumatology (Oxford)* 49(2): 264-270.
- Chen, W., L. Zhang, *et al.* (2007). "Perceiving the avidity of T cell activation can be translated into peripheral T cell regulation." *Proc Natl Acad Sci U S A* 104(51): 20472-20477.
- Chen, X. Y., W. H. Yan, *et al.* (2008). "The 14 bp deletion polymorphisms in HLA-G gene play an important role in the expression of soluble HLA-G in plasma." *Tissue Antigens* 72(4): 335-341.
- Cho, H., H. J. Choi, *et al.* (2011). "Nonconventional CD8+ T cell responses to *Listeria* infection in mice lacking MHC class Ia and H2-M3." *J Immunol* 186(1): 489-498.
- Chun, T., C. J. Aldrich, *et al.* (1998). "Constitutive and regulated expression of the class IB molecule Qa-1 in pancreatic beta cells." *Immunology* 94(1): 64-71.
- Cirulli, V., J. Zalatan, *et al.* (2006). "The class I HLA repertoire of pancreatic islets comprises the nonclassical class Ib antigen HLA-G." *Diabetes* 55(5): 1214-1222.
- Clements, J. L., B. Yang, *et al.* (1998). "Requirement for the leukocyte-specific adapter protein SLP-76 for normal T cell development." *Science* 281(5375): 416-419.
- Cohen, G. B., R. T. Gandhi, *et al.* (1999). "The selective downregulation of class I major histocompatibility complex proteins by HIV-1 protects HIV-infected cells from NK cells." *Immunity* 10(6): 661-671.
- Colmenero, P., A. L. Zhang, *et al.* (2007). "Qa-1(b)-dependent modulation of dendritic cell and NK cell cross-talk in vivo." *J Immunol* 179(7): 4608-4615.
- Connolly, D. J., L. A. Cotterill, *et al.* (1993). "A cDNA clone encoding the mouse Qa-1a histocompatibility antigen and proposed structure of the putative peptide binding site." *J Immunol* 151(11): 6089-6098.
- Contini, P., M. Ghio, *et al.* (2000). "Soluble HLA class I/CD8 ligation triggers apoptosis in EBV-specific CD8+ cytotoxic T lymphocytes by Fas/Fas-ligand interaction." *Hum Immunol* 61(12): 1347-1351.
- Contini, P., M. Ghio, *et al.* (2005). "Apoptosis of antigen-specific T lymphocytes upon the engagement of CD8 by soluble HLA class I molecules is Fas ligand/Fas mediated: evidence for the involvement of p56lck, calcium calmodulin kinase II, and Calcium-independent protein kinase C signaling pathways and for NF-kappaB and NF-AT nuclear translocation." *J Immunol* 175(11): 7244-7254.
- Contini, P., M. Ghio, *et al.* (2003). "Soluble HLA-A,-B,-C and -G molecules induce apoptosis in T and NK CD8+ cells and inhibit cytotoxic T cell activity through CD8 ligation." *Eur J Immunol* 33(1): 125-134.
- Contini, P., M. R. Zocchi, *et al.* (2007). "In vivo apoptosis of CD8(+) lymphocytes in acute myeloid leukemia patients: involvement of soluble HLA-I and Fas ligand." *Leukemia* 21(2): 253-260.
- Cooper, M. A., T. A. Fehniger, *et al.* (2001). "The biology of human natural killer-cell subsets." *Trends Immunol* 22(11): 633-640.
- Cooper, M. A., T. A. Fehniger, *et al.* (2001). "Human natural killer cells: a unique innate immunoregulatory role for the CD56(bright) subset." *Blood* 97(10): 3146-3151.
- Cornford, P. A., A. R. Dodson, *et al.* (2000). "Heat shock protein expression independently predicts clinical outcome in prostate cancer." *Cancer Res* 60(24): 7099-7105.
- Correale, J., M. McMillan, *et al.* (1997). "Antigen presentation by autoreactive proteolipid protein peptide-specific T cell clones from chronic progressive multiple sclerosis patients: roles of costimulatory B7 molecules and IL-12." *J Neuroimmunol* 72(1): 27-43.
- Coupel, S., A. Moreau, *et al.* (2007). "Expression and release of soluble HLA-E is an immunoregulatory feature of endothelial cell activation." *Blood* 109(7): 2806-2814.
- Creput, C., G. Le Friec, *et al.* (2003). "Detection of HLA-G in serum and graft biopsy associated with fewer acute rejections following combined liver-kidney transplantation: possible implications for monitoring patients." *Hum Immunol* 64(11): 1033-1038.

- Crew, M. D., M. J. Cannon, *et al.* (2005). "An HLA-E single chain trimer inhibits human NK cell reactivity towards porcine cells." *Mol Immunol* 42(10): 1205-1214.
- Crisa, L., M. T. McMaster, *et al.* (1997). "Identification of a thymic epithelial cell subset sharing expression of the class Ib HLA-G molecule with fetal trophoblasts." *J Exp Med* 186(2): 289-298.
- D'Ombra, M. C., D. S. Hansen, *et al.* (2007). "gammadelta-T cells expressing NK receptors predominate over NK cells and conventional T cells in the innate IFN-gamma response to *Plasmodium falciparum* malaria." *Eur J Immunol* 37(7): 1864-1873.
- D'Orazio, S. E., D. G. Halme, *et al.* (2003). "Class Ia MHC-deficient BALB/c mice generate CD8+ T cell-mediated protective immunity against *Listeria monocytogenes* infection." *J Immunol* 171(1): 291-298.
- D'Orsogna, L. J., D. L. Roelen, *et al.* (2010). "Alloreactivity from human viral specific memory T-cells." *Transpl Immunol* 23(4): 149-155.
- Danzer, M., H. Polin, *et al.* (2009). "Clinical significance of HLA-E*0103 homozygosity on survival after allogeneic hematopoietic stem-cell transplantation." *Transplantation* 88(4): 528-532.
- Darmochwal-Kolarz, D., B. Kolarz, *et al.* (2012). "The concentrations of soluble HLA-G protein are elevated during mid-gestation and decreased in pre-eclampsia." *Folia Histochem Cytobiol* 50(2): 14751.
- Das, A. and E. O. Long (2010). "Lytic granule polarization, rather than degranulation, is the preferred target of inhibitory receptors in NK cells." *J Immunol* 185(8): 4698-4704.
- Datema, G., A. Mulder, *et al.* (1999). "Detection and characterization of HLA class I molecules in the supernatant of an hepatocarcinoma cell line and of EBV-transformed B cell lines." *Hum Immunol* 60(5): 435-441.
- Davies, A., S. Kalb, *et al.* (2003). "A peptide from heat shock protein 60 is the dominant peptide bound to Qa-1 in the absence of the MHC class Ia leader sequence peptide Qdm." *J Immunol* 170(10): 5027-5033.
- Davies, A., S. Lopez-Briones, *et al.* (2004). "Infection-induced expansion of a MHC Class Ib-dependent intestinal intraepithelial gammadelta T cell subset." *J Immunol* 172(11): 6828-6837.
- Davies, H. S., S. G. Pollard, *et al.* (1989). "Soluble HLA antigens in the circulation of liver graft recipients." *Transplantation* 47(3): 524-527.
- de Kruijf, E. M., A. Sajet, *et al.* (2010). "HLA-E and HLA-G expression in classical HLA class I-negative tumors is of prognostic value for clinical outcome of early breast cancer patients." *J Immunol* 185(12): 7452-7459.
- De Maria, A., A. Ferraris, *et al.* (1997). "Expression of HLA class I-specific inhibitory natural killer cell receptors in HIV-specific cytolytic T lymphocytes: impairment of specific cytolytic functions." *Proc Natl Acad Sci U S A* 94(19): 10285-10288.
- de Matos, C. T., L. Berg, *et al.* (2007). "Activating and inhibitory receptors on synovial fluid natural killer cells of arthritis patients: role of CD94/NKG2A in control of cytokine secretion." *Immunology* 122(2): 291-301.
- DeCloux, A., A. S. Woods, *et al.* (1997). "Dominance of a single peptide bound to the class I(B) molecule, Qa-1b." *J Immunol* 158(5): 2183-2191.
- Della Chiesa, M., M. Vitale, *et al.* (2003). "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." *Eur J Immunol* 33(6): 1657-1666.
- Delon, J., N. Bercovici, *et al.* (1998). "Imaging antigen recognition by naive CD4+ T cells: compulsory cytoskeletal alterations for the triggering of an intracellular calcium response." *Eur J Immunol* 28(2): 716-729.
- Demaria, S. and Y. Bushkin (2000). "Soluble HLA proteins with bound peptides are released from the cell surface by the membrane metalloproteinase." *Hum Immunol* 61(12): 1332-1338.
- Demaria, S., L. D. DeVito-Haynes, *et al.* (1999). "Peptide-conformed beta2m-free class I heavy chains are intermediates in generation of soluble HLA by the membrane-bound metalloproteinase." *Hum Immunol* 60(12): 1216-1226.

- Demaria, S., R. Schwab, *et al.* (1994). "Soluble beta 2-microglobulin-free class I heavy chains are released from the surface of activated and leukemia cells by a metalloprotease." *J Biol Chem* 269(9): 6689-6694.
- Derre, L., M. Corvaisier, *et al.* (2006). "Expression and release of HLA-E by melanoma cells and melanocytes: potential impact on the response of cytotoxic effector cells." *J Immunol* 177(5): 3100-3107.
- Derre, L., M. Corvaisier, *et al.* (2002). "Expression of CD94/NKG2-A on human T lymphocytes is induced by IL-12: implications for adoptive immunotherapy." *J Immunol* 168(10): 4864-4870.
- DeVito-Haynes, L. D., S. Demaria, *et al.* (1998). "The metalloproteinase-mediated pathway is essential for generation of soluble HLA class I proteins by activated cells in vitro: proposed mechanism for soluble HLA release in transplant rejection." *Hum Immunol* 59(7): 426-434.
- DeVito-Haynes, L. D., E. Jankowska-Gan, *et al.* (1996). "Donor-derived human leukocyte antigen class I proteins in the serum of heart transplant recipients." *J Heart Lung Transplant* 15(10): 1012-1026.
- DeVito-Haynes, L. D., E. Jankowska-Gan, *et al.* (1997). "Soluble HLA class I in epithelial lining fluid of lung transplants: associations with graft outcome." *Hum Immunol* 52(2): 95-108.
- DeVito-Haynes, L. D., E. Jankowska-Gan, *et al.* (2000). "Soluble donor HLA class I and beta 2m-free heavy chain in serum of lung transplant recipients: steady-state levels and increases in patients with recurrent CMV infection, acute rejection episodes, and poor outcome." *Hum Immunol* 61(12): 1370-1382.
- DeVito-Haynes, L. D., E. Jankowska-Gan, *et al.* (1994). "Monitoring of kidney and simultaneous pancreas-kidney transplantation rejection by release of donor-specific, soluble HLA class I." *Hum Immunol* 40(3): 191-201.
- Di Cristofaro, J., S. Buhler, *et al.* (2011). "Linkage disequilibrium between HLA-G*0104 and HLA-E*0103 alleles in Tswa Pygmies." *Tissue Antigens* 77(3): 193-200.
- Dobbe, L. M., N. J. Stam, *et al.* (1988). "Biochemical complexity of serum HLA class I molecules." *Immunogenetics* 27(3): 203-210.
- Dong, Y., J. Lieskovska, *et al.* (2003). "Soluble nonclassical HLA generated by the metalloproteinase pathway." *Hum Immunol* 64(8): 802-810.
- Dorfman, J. R. and D. H. Raulet (1998). "Acquisition of Ly49 receptor expression by developing natural killer cells." *J Exp Med* 187(4): 609-618.
- Doxiadis, I., U. Westhoff, *et al.* (1989). "Quantification of soluble HLA class I gene products by an enzyme linked immunosorbent assay." *Blut* 59(5): 449-454.
- Dulphy, N., C. Rabian, *et al.* (2002). "Functional modulation of expanded CD8+ synovial fluid T cells by NK cell receptor expression in HLA-B27-associated reactive arthritis." *Int Immunol* 14(5): 471-479.
- Dunn, G. P., L. J. Old, *et al.* (2004). "The immunobiology of cancer immunosurveillance and immunoediting." *Immunity* 21(2): 137-148.
- Dustin, L. B., D. R. Plas, *et al.* (1999). "Expression of dominant-negative src-homology domain 2-containing protein tyrosine phosphatase-1 results in increased Syk tyrosine kinase activity and B cell activation." *J Immunol* 162(5): 2717-2724.
- Enqvist, M., G. Nilsson, *et al.* (2011). "Selenite induces posttranscriptional blockade of HLA-E expression and sensitizes tumor cells to CD94/NKG2A-positive NK cells." *J Immunol* 187(7): 3546-3554.
- Fainardi, E., R. Rizzo, *et al.* (2006). "Intrathecal synthesis of soluble HLA-G and HLA-I molecules are reciprocally associated to clinical and MRI activity in patients with multiple sclerosis." *Mult Scler* 12(1): 2-12.
- Fainardi, E., R. Rizzo, *et al.* (2003). "Presence of detectable levels of soluble HLA-G molecules in CSF of relapsing-remitting multiple sclerosis: relationship with CSF soluble HLA-I and IL-10 concentrations and MRI findings." *J Neuroimmunol* 142(1-2): 149-158.
- Fang, M., M. T. Orr, *et al.* (2011). "CD94 is essential for NK cell-mediated resistance to a lethal viral disease." *Immunity* 34(4): 579-589.
- Ferlazzo, G., M. L. Tsang, *et al.* (2002). "Human dendritic cells activate resting natural killer (NK) cells and are recognized via the NKp30 receptor by activated NK cells." *J Exp Med* 195(3): 343-351.

- Fernandez, N. C., E. Treiner, *et al.* (2005). "A subset of natural killer cells achieves self-tolerance without expressing inhibitory receptors specific for self-MHC molecules." *Blood* 105(11): 4416-4423.
- Ferreira, A., M. L. Villar, *et al.* (1988). "Quantification of soluble serum HLA class I antigens in healthy volunteers and AIDS patients." *Clin Chim Acta* 174(2): 207-211.
- Ferrone, S., K. K. Mittal, *et al.* (1977). "Immunogenicity of HLA antigens purified from serum." *Transplantation* 23(1): 7-15.
- Filaci, G., P. Contini, *et al.* (1997). "Soluble HLA class I and class II molecule levels in serum and cerebrospinal fluid of multiple sclerosis patients." *Hum Immunol* 54(1): 54-62.
- Finlay, B. B. and G. McFadden (2006). "Anti-immunology: evasion of the host immune system by bacterial and viral pathogens." *Cell* 124(4): 767-782.
- Fisher, R. A. (2009). "Cytomegalovirus infection and disease in the new era of immunosuppression following solid organ transplantation." *Transpl Infect Dis* 11(3): 195-202.
- Fishman, J. A. (2007). "Infection in solid-organ transplant recipients." *N Engl J Med* 357(25): 2601-2614.
- Foley, B., S. Cooley, *et al.* (2012). "Cytomegalovirus reactivation after allogeneic transplantation promotes a lasting increase in educated NKG2C⁺ natural killer cells with potent function." *Blood* 119(11): 2665-2674.
- Fons, P., S. Chabot, *et al.* (2006). "Soluble HLA-G1 inhibits angiogenesis through an apoptotic pathway and by direct binding to CD160 receptor expressed by endothelial cells." *Blood* 108(8): 2608-2615.
- Fort, M. M., M. W. Leach, *et al.* (1998). "A role for NK cells as regulators of CD4⁺ T cells in a transfer model of colitis." *J Immunol* 161(7): 3256-3261.
- Forte, P., B. C. Baumann, *et al.* (2005). "HLA-E expression on porcine cells: protection from human NK cytotoxicity depends on peptide loading." *Am J Transplant* 5(9): 2085-2093.
- Franzen, B., S. Linder, *et al.* (1996). "Expression of tropomyosin isoforms in benign and malignant human breast lesions." *Br J Cancer* 73(7): 909-913.
- Fregni, G., A. Perier, *et al.* (2011). "Unique functional status of natural killer cells in metastatic stage IV melanoma patients and its modulation by chemotherapy." *Clin Cancer Res* 17(9): 2628-2637.
- Fruci, D., P. Giacomini, *et al.* (2008). "Altered expression of endoplasmic reticulum aminopeptidases ERAP1 and ERAP2 in transformed non-lymphoid human tissues." *J Cell Physiol* 216(3): 742-749.
- Fujii, T., A. Ishitani, *et al.* (1994). "A soluble form of the HLA-G antigen is encoded by a messenger ribonucleic acid containing intron 4." *J Immunol* 153(12): 5516-5524.
- Furukawa, H., T. Yabe, *et al.* (1999). "Cell surface expression of HLA-E molecules on PBMC from a TAP1-deficient patient." *Tissue Antigens* 53(3): 292-295.
- Galiani, M. D., E. Aguado, *et al.* (1999). "Expression of killer inhibitory receptors on cytotoxic cells from HIV-1-infected individuals." *Clin Exp Immunol* 115(3): 472-476.
- Gansuud, B., M. Hagihara, *et al.* (2000). "Inhibition of Epstein-Barr virus (EBV)-specific CD8⁺ cytotoxic T lymphocyte (CTL) activity by soluble HLA class I in vitro." *Clin Exp Immunol* 119(1): 107-114.
- Garcia, P., M. Llano, *et al.* (2002). "Human T cell receptor-mediated recognition of HLA-E." *Eur J Immunol* 32(4): 936-944.
- Garrido, C., I. Algarra, *et al.* (2010). "Alterations of HLA class I expression in human melanoma xenografts in immunodeficient mice occur frequently and are associated with higher tumorigenicity." *Cancer Immunol Immunother* 59(1): 13-26.
- Gati, A., N. Guerra, *et al.* (2003). "CD158 receptor controls cytotoxic T-lymphocyte susceptibility to tumor-mediated activation-induced cell death by interfering with Fas signaling." *Cancer Res* 63(21): 7475-7482.
- Ge, Q., J. D. Stone, *et al.* (2002). "Soluble peptide-MHC monomers cause activation of CD8⁺ T cells through transfer of the peptide to T cell MHC molecules." *Proc Natl Acad Sci U S A* 99(21): 13729-13734.

- Geissler, E. K., C. Graeb, *et al.* (2000). "Effective use of donor MHC class I gene therapy in organ transplantation: prevention of antibody-mediated hyperacute heart allograft rejection in highly sensitized rat recipients." *Hum Gene Ther* 11(3): 459-469.
- Geraghty, D. E., M. Stockschleider, *et al.* (1992). "Polymorphism at the HLA-E locus predates most HLA-A and -B polymorphism." *Hum Immunol* 33(3): 174-184.
- Geraghty, D. E., X. H. Wei, *et al.* (1990). "Human leukocyte antigen F (HLA-F). An expressed HLA gene composed of a class I coding sequence linked to a novel transcribed repetitive element." *J Exp Med* 171(1): 1-18.
- Ghio, M., P. Contini, *et al.* (2009). "Soluble HLA-I-mediated secretion of TGF-beta1 by human NK cells and consequent down-regulation of anti-tumor cytolytic activity." *Eur J Immunol* 39(12): 3459-3468.
- Ghio, M., P. Contini, *et al.* (2010). "sHLA-I contaminating molecules as novel mechanism of ex vivo/in vitro transcriptional and posttranscriptional modulation of transforming growth factor-beta in CD8+ T lymphocytes and neutrophils after intravenous immunoglobulin treatment." *Transfusion* 50(3): 547-555.
- Ghio, M., P. Contini, *et al.* (2008). "Immunomodulatory effects of blood transfusions: the synergic role of soluble HLA Class I free heavy-chain molecules detectable in blood components." *Transfusion* 48(8): 1591-1597.
- Giaginis, C., S. S. Daskalopoulou, *et al.* (2009). "Heat Shock Protein-27, -60 and -90 expression in gastric cancer: association with clinicopathological variables and patient survival." *BMC Gastroenterol* 9: 14.
- Giles, J., J. Shaw, *et al.* (2012). "HLA-B27 Homodimers and Free H Chains Are Stronger Ligands for Leukocyte Ig-like Receptor B2 than Classical HLA Class I." *J Immunol* 188(12): 6184-6193.
- Glienke, J., Y. Sobanov, *et al.* (1998). "The genomic organization of NKG2C, E, F, and D receptor genes in the human natural killer gene complex." *Immunogenetics* 48(3): 163-173.
- Gobin, S. J. and P. J. van den Elsen (2000). "Transcriptional regulation of the MHC class Ib genes HLA-E, HLA-F, and HLA-G." *Hum Immunol* 61(11): 1102-1107.
- Goldstein, J., H. Mostowsky, *et al.* (1997). "Naive alloreactive CD8 T cells are activated by purified major histocompatibility complex class I and antigenic peptide." *Eur J Immunol* 27(4): 871-878.
- Gomez-Casado, E., J. Martinez-Laso, *et al.* (1997). "Description of a new HLA-E (E*01031) allele and its frequency in the Spanish population." *Hum Immunol* 54(1): 69-73.
- Goncalves, M. A., M. Le Discorde, *et al.* (2008). "Classical and non-classical HLA molecules and p16(INK4a) expression in precursors lesions and invasive cervical cancer." *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 141(1): 70-74.
- Gonen-Gross, T., H. Achdout, *et al.* (2003). "Complexes of HLA-G protein on the cell surface are important for leukocyte Ig-like receptor-1 function." *J Immunol* 171(3): 1343-1351.
- Gooden, M., M. Lampen, *et al.* (2011). "HLA-E expression by gynecological cancers restrains tumor-infiltrating CD8(+) T lymphocytes." *Proc Natl Acad Sci U S A* 108(26): 10656-10661.
- Goodier, M. R., C. M. Mela, *et al.* (2007). "NKG2C+ NK cells are enriched in AIDS patients with advanced-stage Kaposi's sarcoma." *J Virol* 81(1): 430-433.
- Grimsley, C., A. Kawasaki, *et al.* (2002). "Definitive high resolution typing of HLA-E allelic polymorphisms: Identifying potential errors in existing allele data." *Tissue Antigens* 60(3): 206-212.
- Grimsley, C., K. A. Mather, *et al.* (1998). "HLA-H: a pseudogene with increased variation due to balancing selection at neighboring loci." *Mol Biol Evol* 15(12): 1581-1588.
- Grimsley, C. and C. Ober (1997). "Population genetic studies of HLA-E: evidence for selection." *Hum Immunol* 52(1): 33-40.
- Groh, V., J. Wu, *et al.* (2002). "Tumour-derived soluble MIC ligands impair expression of NKG2D and T-cell activation." *Nature* 419(6908): 734-738.
- Gros, F., F. Cabillic, *et al.* (2008). "Soluble HLA-G molecules impair natural killer/dendritic cell crosstalk via inhibition of dendritic cells." *Eur J Immunol* 38(3): 742-749.
- Gros, F., Y. Sebti, *et al.* (2006). "Soluble HLA-G molecules increase during acute leukemia, especially in subtypes affecting monocytic and lymphoid lineages." *Neoplasia* 8(3): 223-230.

- Grotzke, J. E., M. J. Harriff, *et al.* (2009). "The Mycobacterium tuberculosis phagosome is a HLA-I processing competent organelle." *PLoS Pathog* 5(4): e1000374.
- Grumet, F. C., S. Krishnaswamy, *et al.* (1994). "Soluble form of an HLA-B7 class I antigen specifically suppresses humoral alloimmunization." *Hum Immunol* 40(3): 228-234.
- Guetta, E., E. M. Scarpati, *et al.* (2001). "Effect of cytomegalovirus immediate early gene products on endothelial cell gene activity." *Cardiovasc Res* 50(3): 538-546.
- Guillaudeux, T., A. M. Rodriguez, *et al.* (1995). "Methylation status and transcriptional expression of the MHC class I loci in human trophoblast cells from term placenta." *J Immunol* 154(7): 3283-3299.
- Guilloux, Y., S. Lucas, *et al.* (1996). "A peptide recognized by human cytolytic T lymphocytes on HLA-A2 melanomas is encoded by an intron sequence of the N-acetylglucosaminyltransferase V gene." *J Exp Med* 183(3): 1173-1183.
- Guma, M., A. Angulo, *et al.* (2004). "Imprint of human cytomegalovirus infection on the NK cell receptor repertoire." *Blood* 104(12): 3664-3671.
- Guma, M., C. Cabrera, *et al.* (2006). "Human cytomegalovirus infection is associated with increased proportions of NK cells that express the CD94/NKG2C receptor in aviremic HIV-1-positive patients." *J Infect Dis* 194(1): 38-41.
- Gunturi, A., R. E. Berg, *et al.* (2005). "The role of TCR stimulation and TGF-beta in controlling the expression of CD94/NKG2A receptors on CD8 T cells." *Eur J Immunol* 35(3): 766-775.
- Gunturi, A., R. E. Berg, *et al.* (2003). "Preferential survival of CD8 T and NK cells expressing high levels of CD94." *J Immunol* 170(4): 1737-1745.
- Gustafson, K. S. and G. D. Ginder (1996). "Interferon-gamma induction of the human leukocyte antigen-E gene is mediated through binding of a complex containing STAT1alpha to a distinct interferon-gamma-responsive element." *J Biol Chem* 271(33): 20035-20046.
- Haga, J. A., J. X. She, *et al.* (1991). "Biochemical characterization of 39-kDa class I histocompatibility antigen in plasma. A secretable membrane protein derived from transmembrane domain deletion." *J Biol Chem* 266(6): 3695-3701.
- Hagihara, M., T. Shimura, *et al.* (1997). "Serum concentrations of soluble HLA-class I and CD8 forms in patients with viral hepatic disorders." *J Gastroenterol* 32(3): 338-343.
- Hagihara, M., T. Shimura, *et al.* (1993). "Clinical significance of serum soluble HLA class I antigens in systemic lupus erythematosus." *Tokai J Exp Clin Med* 18(1-2): 61-64.
- Halary, F., M. A. Peyrat, *et al.* (1997). "Control of self-reactive cytotoxic T lymphocytes expressing gamma delta T cell receptors by natural killer inhibitory receptors." *Eur J Immunol* 27(11): 2812-2821.
- Hanak, L., O. Slaby, *et al.* (2009). "Expression pattern of HLA class I antigens in renal cell carcinoma and primary cell line cultures: methodological implications for immunotherapy." *Med Sci Monit* 15(12): CR638-643.
- Hansen, T. H. and M. Bouvier (2009). "MHC class I antigen presentation: learning from viral evasion strategies." *Nat Rev Immunol* 9(7): 503-513.
- Harrison, D., J. H. Phillips, *et al.* (1991). "Involvement of a metalloprotease in spontaneous and phorbol ester-induced release of natural killer cell-associated Fc gamma RIII (CD16-II)." *J Immunol* 147(10): 3459-3465.
- Hayball, J. D. and R. A. Lake (2005). "The immune function of MHC class II molecules mutated in the putative superdimer interface." *Mol Cell Biochem* 273(1-2): 1-9.
- Haynes, L. D., Y. Bushkin, *et al.* (2002). "Interferon-gamma drives the metalloproteinase-dependent cleavage of HLA class I soluble forms from primary human bronchial epithelial cells." *Hum Immunol* 63(10): 893-901.
- He, X. and J. Le (1995). "Alternative splicing of HLA class I transcripts induced by IFN-gamma and TNF in fibroblasts: release of soluble HLA class I heavy chain and an associate protein." *Cell Immunol* 162(1): 159-168.
- He, Y., Y. Wu, *et al.* (2007). "Proteomics-based identification of HSP60 as a tumor-associated antigen in colorectal cancer." *Proteomics Clin Appl* 1(3): 336-342.
- Heidari, M. H., M. G. Novin, *et al.* (2011). "Increase in concentration of soluble HLA-G in high-quality embryos after intracytoplasmic sperm injection." *Anat Cell Biol* 44(4): 331-336.

- Heinrichs, H. and H. T. Orr (1990). "HLA non-A,B,C class I genes: their structure and expression." *Immunol Res* 9(4): 265-274.
- Heinzel, A. S., J. E. Grotzke, *et al.* (2002). "HLA-E-dependent presentation of Mtb-derived antigen to human CD8+ T cells." *J Exp Med* 196(11): 1473-1481.
- Hemmer, B., I. Stefanova, *et al.* (1998). "Relationships among TCR ligand potency, thresholds for effector function elicitation, and the quality of early signaling events in human T cells." *J Immunol* 160(12): 5807-5814.
- Higuma-Myojo, S., Y. Sasaki, *et al.* (2005). "Cytokine profile of natural killer cells in early human pregnancy." *Am J Reprod Immunol* 54(1): 21-29.
- Hillebrand, K., T. Moritz, *et al.* (1994). "Soluble HLA class I and beta-2-microglobulin plasma concentrations during interferon treatment of chronic myelogenous leukemia." *Vox Sang* 67(3): 310-314.
- Hirankarn, N., I. Kimkong, *et al.* (2004). "HLA-E polymorphism in patients with nasopharyngeal carcinoma." *Tissue Antigens* 64(5): 588-592.
- Hoare, H. L., L. C. Sullivan, *et al.* (2008). "Subtle changes in peptide conformation profoundly affect recognition of the non-classical MHC class I molecule HLA-E by the CD94-NKG2 natural killer cell receptors." *J Mol Biol* 377(5): 1297-1303.
- Hoare, H. L., L. C. Sullivan, *et al.* (2006). "Structural basis for a major histocompatibility complex class Ib-restricted T cell response." *Nat Immunol* 7(3): 256-264.
- Hodgkinson, A. D., B. A. Millward, *et al.* (2000). "The HLA-E locus is associated with age at onset and susceptibility to type 1 diabetes mellitus." *Hum Immunol* 61(3): 290-295.
- Hosseini, E., A. P. Schwarzer, *et al.* (2012). "The Impact of HLA-E Polymorphisms in Graft-versus-Host Disease following HLA-E Matched Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplantation." *Iran J Allergy Asthma Immunol* 11(1): 15-21.
- Houchins, J. P., T. Yabe, *et al.* (1991). "DNA sequence analysis of NKG2, a family of related cDNA clones encoding type II integral membrane proteins on human natural killer cells." *J Exp Med* 173(4): 1017-1020.
- Houlihan, J. M., P. A. Biro, *et al.* (1995). "The human amnion is a site of MHC class Ib expression: evidence for the expression of HLA-E and HLA-G." *J Immunol* 154(11): 5665-5674.
- Hsu, P. L. and S. M. Hsu (1998). "Abundance of heat shock proteins (hsp89, hsp60, and hsp27) in malignant cells of Hodgkin's disease." *Cancer Res* 58(23): 5507-5513.
- Hu, D., K. Ikizawa, *et al.* (2004). "Analysis of regulatory CD8 T cells in Qa-1-deficient mice." *Nat Immunol* 5(5): 516-523.
- Huang, J., P. Burke, *et al.* (2010). "Soluble HLA-G inhibits myeloid dendritic cell function in HIV-1 infection by interacting with leukocyte immunoglobulin-like receptor B2." *J Virol* 84(20): 10784-10791.
- Huang, Z., H. Hyodo, *et al.* (2009). "Effect of progesterone on HLA-E gene expression in JEG-3 choriocarcinoma cell line." *Am J Reprod Immunol* 61(3): 221-226.
- Hunziker, R. D., F. Lynch, *et al.* (1997). "Split tolerance to the MHC class I molecule H-2Dd in animals transgenic for its soluble analog." *Hum Immunol* 52(2): 82-94.
- Husain, S., C. E. Pietrangeli, *et al.* (2009). "Delayed onset CMV disease in solid organ transplant recipients." *Transpl Immunol* 21(1): 1-9.
- Hviid, T. V., R. Rizzo, *et al.* (2004). "HLA-G and IL-10 in serum in relation to HLA-G genotype and polymorphisms." *Immunogenetics* 56(3): 135-141.
- Hwang, Y. J., S. P. Lee, *et al.* (2009). "Expression of heat shock protein 60 kDa is upregulated in cervical cancer." *Yonsei Med J* 50(3): 399-406.
- Inostroza, J., J. Ferrada, *et al.* (1997). "Soluble histocompatibility class I antigens and beta 2-microglobulin in pregnant females and cord blood samples." *Hum Immunol* 54(1): 63-68.
- Isakov, N. (1997). "ITIMs and ITAMs. The Yin and Yang of antigen and Fc receptor-linked signaling machinery." *Immunol Res* 16(1): 85-100.
- Ishitani, A. and D. E. Geraghty (1992). "Alternative splicing of HLA-G transcripts yields proteins with primary structures resembling both class I and class II antigens." *Proc Natl Acad Sci U S A* 89(9): 3947-3951.

- Ishitani, A., N. Sageshima, *et al.* (2003). "Protein expression and peptide binding suggest unique and interacting functional roles for HLA-E, F, and G in maternal-placental immune recognition." *J Immunol* 171(3): 1376-1384.
- Jabri, B., N. P. de Serre, *et al.* (2000). "Selective expansion of intraepithelial lymphocytes expressing the HLA-E-specific natural killer receptor CD94 in celiac disease." *Gastroenterology* 118(5): 867-879.
- Jabri, B., J. M. Selby, *et al.* (2002). "TCR specificity dictates CD94/NKG2A expression by human CTL." *Immunity* 17(4): 487-499.
- Jacobs, R., G. Hintzen, *et al.* (2001). "CD56bright cells differ in their KIR repertoire and cytotoxic features from CD56dim NK cells." *Eur J Immunol* 31(10): 3121-3127.
- Jagessar, S. A., N. Heijmans, *et al.* (2012). "Unravelling the T-cell-mediated autoimmune attack on CNS myelin in a new primate EAE model induced with MOG34-56 peptide in incomplete adjuvant." *Eur J Immunol* 42(1): 217-227.
- Jassem, R. M., W. S. Shani, *et al.* (2012). "HLA-G polymorphisms and soluble HLA-G protein levels in women with recurrent pregnancy loss from Basrah province in Iraq." *Hum Immunol*.
- Jay, D. C., L. M. Reed-Loisel, *et al.* (2008). "Polyclonal MHC Ib-restricted CD8+ T cells undergo homeostatic expansion in the absence of conventional MHC-restricted T cells." *J Immunol* 180(5): 2805-2814.
- Jee, B. C., C. S. Suh, *et al.* (2011). "Soluble human leukocyte antigen G level in fluid from single dominant follicle and the association with oocyte competence." *Yonsei Med J* 52(6): 967-971.
- Jiang, H., N. S. Braunstein, *et al.* (2001). "CD8+ T cells control the TH phenotype of MBP-reactive CD4+ T cells in EAE mice." *Proc Natl Acad Sci U S A* 98(11): 6301-6306.
- Jiang, H., S. M. Canfield, *et al.* (2010). "HLA-E-restricted regulatory CD8(+) T cells are involved in development and control of human autoimmune type 1 diabetes." *J Clin Invest* 120(10): 3641-3650.
- Jiang, H. and L. Chess (2006). "Regulation of immune responses by T cells." *N Engl J Med* 354(11): 1166-1176.
- Jiang, H., S. Curran, *et al.* (2003). "Regulatory CD8+ T cells fine-tune the myelin basic protein-reactive T cell receptor V beta repertoire during experimental autoimmune encephalomyelitis." *Proc Natl Acad Sci U S A* 100(14): 8378-8383.
- Jiang, H., H. Kashleva, *et al.* (1998). "T cell vaccination induces T cell receptor Vbeta-specific Qa-1-restricted regulatory CD8(+) T cells." *Proc Natl Acad Sci U S A* 95(8): 4533-4537.
- Jiang, H., R. Ware, *et al.* (1995). "Murine CD8+ T cells that specifically delete autologous CD4+ T cells expressing V beta 8 TCR: a role of the Qa-1 molecule." *Immunity* 2(2): 185-194.
- Jiang, H., Y. Wu, *et al.* (2005). "An affinity/avidity model of peripheral T cell regulation." *J Clin Invest* 115(2): 302-312.
- Jin, H. L., C. R. Li, *et al.* (2012). "Clinical Relevance of sHLA-G-Mediated With Better Graft Acceptance in Early Posttransplantation." *Transplant Proc* 44(5): 1259-1261.
- Jinushi, M., T. Takehara, *et al.* (2004). "Negative regulation of NK cell activities by inhibitory receptor CD94/NKG2A leads to altered NK cell-induced modulation of dendritic cell functions in chronic hepatitis C virus infection." *J Immunol* 173(10): 6072-6081.
- Jinushi, M., T. Takehara, *et al.* (2007). "Natural killer cell and hepatic cell interaction via NKG2A leads to dendritic cell-mediated induction of CD4 CD25 T cells with PD-1-dependent regulatory activities." *Immunology* 120(1): 73-82.
- John, T., M. A. Black, *et al.* (2008). "Predicting clinical outcome through molecular profiling in stage III melanoma." *Clin Cancer Res* 14(16): 5173-5180.
- Joly, E. and V. Rouillon (2006). "The orthology of HLA-E and H2-Qa1 is hidden by their concerted evolution with other MHC class I molecules." *Biol Direct* 1: 2.
- Joncker, N. T., N. C. Fernandez, *et al.* (2009). "NK cell responsiveness is tuned commensurate with the number of inhibitory receptors for self-MHC class I: the rheostat model." *J Immunol* 182(8): 4572-4580.
- Jonges, L. E., P. Albertsson, *et al.* (2001). "The phenotypic heterogeneity of human natural killer cells: presence of at least 48 different subsets in the peripheral blood." *Scand J Immunol* 53(2): 103-110.

- Joosten, S. A., K. E. van Meijgaarden, *et al.* (2010). "Mycobacterium tuberculosis peptides presented by HLA-E molecules are targets for human CD8 T-cells with cytotoxic as well as regulatory activity." *PLoS Pathog* 6(2): e1000782.
- Jotereau, F., N. Gervois, *et al.* (2012). "Adoptive transfer with high-affinity TCR to treat human solid tumors: how to improve the feasibility?" *Target Oncol* 7(1): 3-14.
- Kaiser, B. K., F. Barahmand-Pour, *et al.* (2005). "Interactions between NKG2x immunoreceptors and HLA-E ligands display overlapping affinities and thermodynamics." *J Immunol* 174(5): 2878-2884.
- Kaiser, B. K., J. C. Pizarro, *et al.* (2008). "Structural basis for NKG2A/CD94 recognition of HLA-E." *Proc Natl Acad Sci U S A* 105(18): 6696-6701.
- Kambayashi, T., J. R. Kraft-Leavy, *et al.* (2004). "The nonclassical MHC class I molecule Qa-1 forms unstable peptide complexes." *J Immunol* 172(3): 1661-1669.
- Kawamura, T., K. Takeda, *et al.* (2009). "NKG2A inhibits invariant NKT cell activation in hepatic injury." *J Immunol* 182(1): 250-258.
- Kim, D. K., J. Kabat, *et al.* (2004). "Human NKG2F is expressed and can associate with DAP12." *Mol Immunol* 41(1): 53-62.
- Kim, H. J. and H. Cantor (2011). "Regulation of self-tolerance by Qa-1-restricted CD8(+) regulatory T cells." *Semin Immunol* 23(6): 446-452.
- Kim, R., M. Emi, *et al.* (2007). "Cancer immunoediting from immune surveillance to immune escape." *Immunology* 121(1): 1-14.
- Kim, S., K. Iizuka, *et al.* (2002). "In vivo developmental stages in murine natural killer cell maturation." *Nat Immunol* 3(6): 523-528.
- Kim, S., J. Poursine-Laurent, *et al.* (2005). "Licensing of natural killer cells by host major histocompatibility complex class I molecules." *Nature* 436(7051): 709-713.
- Kimkong, I., A. Mutirangura, *et al.* (2003). "Distribution of human leukocyte antigens-E alleles in Thailand." *J Med Assoc Thai* 86 Suppl 2: S230-236.
- King, A., D. S. Allan, *et al.* (2000). "HLA-E is expressed on trophoblast and interacts with CD94/NKG2 receptors on decidual NK cells." *Eur J Immunol* 30(6): 1623-1631.
- Kirszenbaum, M., P. Moreau, *et al.* (1994). "An alternatively spliced form of HLA-G mRNA in human trophoblasts and evidence for the presence of HLA-G transcript in adult lymphocytes." *Proc Natl Acad Sci U S A* 91(10): 4209-4213.
- Knapp, L. A., L. F. Cadavid, *et al.* (1998). "The MHC-E locus is the most well conserved of all known primate class I histocompatibility genes." *J Immunol* 160(1): 189-196.
- Koelman, C. A., A. B. Coumans, *et al.* (2000). "Correlation between oral sex and a low incidence of preeclampsia: a role for soluble HLA in seminal fluid?" *J Reprod Immunol* 46(2): 155-166.
- Koller, B. H., D. E. Geraghty, *et al.* (1988). "HLA-E. A novel HLA class I gene expressed in resting T lymphocytes." *J Immunol* 141(3): 897-904.
- Koopman, L. A., H. D. Kopcow, *et al.* (2003). "Human decidual natural killer cells are a unique NK cell subset with immunomodulatory potential." *J Exp Med* 198(8): 1201-1212.
- Kopantzev, E. P., G. S. Monastyrskaya, *et al.* (2008). "Differences in gene expression levels between early and later stages of human lung development are opposite to those between normal lung tissue and non-small lung cell carcinoma." *Lung Cancer* 62(1): 23-34.
- Kostyu, D. D., D. V. Dawson, *et al.* (1993). "Deficit of HLA homozygotes in a Caucasian isolate." *Hum Immunol* 37(3): 135-142.
- Kovats, S., E. K. Main, *et al.* (1990). "A class I antigen, HLA-G, expressed in human trophoblasts." *Science* 248(4952): 220-223.
- Kraft, J. R., R. E. Vance, *et al.* (2000). "Analysis of Qa-1(b) peptide binding specificity and the capacity of CD94/NKG2A to discriminate between Qa-1-peptide complexes." *J Exp Med* 192(5): 613-624.
- Krangel, M. S. (1985). "Unusual RNA splicing generates a secreted form of HLA-A2 in a mutagenized B lymphoblastoid cell line." *EMBO J* 4(5): 1205-1210.
- Krangel, M. S. (1986). "Secretion of HLA-A and -B antigens via an alternative RNA splicing pathway." *J Exp Med* 163(5): 1173-1190.
- Krangel, M. S. (1987). "Two forms of HLA class I molecules in human plasma." *Hum Immunol* 20(2): 155-165.

- Krangel, M. S., D. Pious, *et al.* (1984). "Characterization of a B lymphoblastoid cell line mutant that secretes HLA-A2." *J Immunol* 132(6): 2984-2991.
- Kren, L., P. Fabian, *et al.* (2012). "Multifunctional immune-modulatory protein HLA-E identified in classical Hodgkin lymphoma: possible implications." *Pathol Res Pract* 208(1): 45-49.
- Kren, L., K. Muckova, *et al.* (2010). "Production of immune-modulatory nonclassical molecules HLA-G and HLA-E by tumor infiltrating ameboid microglia/macrophages in glioblastomas: a role in innate immunity?" *J Neuroimmunol* 220(1-2): 131-135.
- Kren, L., I. Valkovsky, *et al.* (2012). "HLA-G and HLA-E specific mRNAs connote opposite prognostic significance in renal cell carcinoma." *Diagn Pathol* 7(1): 58.
- Kubota, A., S. Kubota, *et al.* (1999). "Diversity of NK cell receptor repertoire in adult and neonatal mice." *J Immunol* 163(1): 212-216.
- Kurepa, Z. and J. Forman (1997). "Peptide binding to the class Ib molecule, Qa-1b." *J Immunol* 158(7): 3244-3251.
- Kurepa, Z., C. A. Hasemann, *et al.* (1998). "Qa-1b binds conserved class I leader peptides derived from several mammalian species." *J Exp Med* 188(5): 973-978.
- Kurepa, Z., J. Su, *et al.* (2003). "Memory phenotype of CD8+ T cells in MHC class Ia-deficient mice." *J Immunol* 170(11): 5414-5420.
- Kusumi, M., T. Yamashita, *et al.* (2006). "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." *J Reprod Immunol* 70(1-2): 33-42.
- Labarriere, N., A. Khammari, *et al.* (2011). "Is antigen specificity the key to efficient adoptive T-cell therapy?" *Immunotherapy* 3(4): 495-505.
- Lafarge, X., V. Pitard, *et al.* (2005). "Expression of MHC class I receptors confers functional intracolon heterogeneity to a reactive expansion of gammadelta T cells." *Eur J Immunol* 35(6): 1896-1905.
- Lajoie, J., J. Hargrove, *et al.* (2006). "Genetic variants in nonclassical major histocompatibility complex class I human leukocyte antigen (HLA)-E and HLA-G molecules are associated with susceptibility to heterosexual acquisition of HIV-1." *J Infect Dis* 193(2): 298-301.
- Lampen, M. H., M. C. Verweij, *et al.* (2010). "CD8+ T cell responses against TAP-inhibited cells are readily detected in the human population." *J Immunol* 185(11): 6508-6517.
- Lanier, L. L., B. Corliss, *et al.* (1998). "Association of DAP12 with activating CD94/NKG2C NK cell receptors." *Immunity* 8(6): 693-701.
- Laouini, D., A. Casrouge, *et al.* (2000). "V beta T cell repertoire of CD8+ splenocytes selected on nonpolymorphic MHC class I molecules." *J Immunol* 165(11): 6381-6386.
- Lazetic, S., C. Chang, *et al.* (1996). "Human natural killer cell receptors involved in MHC class I recognition are disulfide-linked heterodimers of CD94 and NKG2 subunits." *J Immunol* 157(11): 4741-4745.
- Le Bouteiller, P., P. Fons, *et al.* (2007). "Soluble HLA-G and control of angiogenesis." *J Reprod Immunol* 76(1-2): 17-22.
- Le Discorde, M., P. Moreau, *et al.* (2003). "Expression of HLA-G in human cornea, an immune-privileged tissue." *Hum Immunol* 64(11): 1039-1044.
- Le Drean, E., F. Vely, *et al.* (1998). "Inhibition of antigen-induced T cell response and antibody-induced NK cell cytotoxicity by NKG2A: association of NKG2A with SHP-1 and SHP-2 protein-tyrosine phosphatases." *Eur J Immunol* 28(1): 264-276.
- Le Fricc, G., F. Gros, *et al.* (2004). "Capacity of myeloid and plasmacytoid dendritic cells especially at mature stage to express and secrete HLA-G molecules." *J Leukoc Biol* 76(6): 1125-1133.
- Le Maux, A., G. Noel, *et al.* (2008). "Soluble human leukocyte antigen-G molecules in peripheral blood haematopoietic stem cell transplantation: a specific role to prevent acute graft-versus-host disease and a link with regulatory T cells." *Clin Exp Immunol* 152(1): 50-56.
- Le Rond, S., C. Azema, *et al.* (2006). "Evidence to support the role of HLA-G5 in allograft acceptance through induction of immunosuppressive/ regulatory T cells." *J Immunol* 176(5): 3266-3276.
- Le Rond, S., A. Gonzalez, *et al.* (2005). "Indoleamine 2,3 dioxygenase and human leukocyte antigen-G inhibit the T-cell alloproliferative response through two independent pathways." *Immunology* 116(3): 297-307.

- Le Rond, S., J. Le Maoult, *et al.* (2004). "Alloreactive CD4+ and CD8+ T cells express the immunotolerant HLA-G molecule in mixed lymphocyte reactions: in vivo implications in transplanted patients." *Eur J Immunol* 34(3): 649-660.
- Leavenworth, J. W., C. Schellack, *et al.* (2010). "Analysis of the cellular mechanism underlying inhibition of EAE after treatment with anti-NKG2A F(ab')₂." *Proc Natl Acad Sci U S A* 107(6): 2562-2567.
- Lee, N. and D. E. Geraghty (2003). "HLA-F surface expression on B cell and monocyte cell lines is partially independent from tapasin and completely independent from TAP." *J Immunol* 171(10): 5264-5271.
- Lee, N., D. R. Goodlett, *et al.* (1998). "HLA-E surface expression depends on binding of TAP-dependent peptides derived from certain HLA class I signal sequences." *J Immunol* 160(10): 4951-4960.
- Lee, N., A. Ishitani, *et al.* (2010). "HLA-F is a surface marker on activated lymphocytes." *Eur J Immunol*.
- Leleu, X., G. Le Fric, *et al.* (2005). "Total soluble HLA class I and soluble HLA-G in multiple myeloma and monoclonal gammopathy of undetermined significance." *Clin Cancer Res* 11(20): 7297-7303.
- Lemberg, M. K., F. A. Bland, *et al.* (2001). "Intramembrane proteolysis of signal peptides: an essential step in the generation of HLA-E epitopes." *J Immunol* 167(11): 6441-6446.
- Lenart, I., D. B. Guiliano, *et al.* (2012). "The MHC Class I heavy chain structurally conserved cysteines 101 and 164 participate in HLA-B27 dimer formation." *Antioxid Redox Signal* 16(1): 33-43.
- Lesport, E., J. Baudhuin, *et al.* (2009). "Human melanoma cell secreting human leukocyte antigen-G5 inhibit natural killer cell cytotoxicity by impairing lytic granules polarization toward target cell." *Hum Immunol* 70(12): 1000-1005.
- Lesport, E., J. Baudhuin, *et al.* (2011). "Inhibition of human gamma delta [corrected] T-cell antitumoral activity through HLA-G: implications for immunotherapy of cancer." *Cell Mol Life Sci* 68(20): 3385-3399.
- Levy, E. M., M. Bianchini, *et al.* (2008). "Human leukocyte antigen-E protein is overexpressed in primary human colorectal cancer." *Int J Oncol* 32(3): 633-641.
- Levy, E. M., G. Sycz, *et al.* (2009). "Cetuximab-mediated cellular cytotoxicity is inhibited by HLA-E membrane expression in colon cancer cells." *Innate Immun* 15(2): 91-100.
- Lewinsohn, D. M., M. R. Alderson, *et al.* (1998). "Characterization of human CD8+ T cells reactive with Mycobacterium tuberculosis-infected antigen-presenting cells." *J Exp Med* 187(10): 1633-1640.
- Lewinsohn, D. M., A. L. Briden, *et al.* (2000). "Mycobacterium tuberculosis-reactive CD8+ T lymphocytes: the relative contribution of classical versus nonclassical HLA restriction." *J Immunol* 165(2): 925-930.
- Li, B. L., A. Lin, *et al.* (2009). "Characterization of HLA-G expression in renal cell carcinoma." *Tissue Antigens* 74(3): 213-221.
- Li, J., I. Goldstein, *et al.* (2001). "Induction of TCR Vbeta-specific CD8+ CTLs by TCR Vbeta-derived peptides bound to HLA-E." *J Immunol* 167(7): 3800-3808.
- Li, L., B. A. Sullivan, *et al.* (2004). "Differential requirement for tapasin in the presentation of leader- and insulin-derived peptide antigens to Qa-1b-restricted CTLs." *J Immunol* 173(6): 3707-3715.
- Lian, R. H., M. Maeda, *et al.* (2002). "Orderly and nonstochastic acquisition of CD94/NKG2 receptors by developing NK cells derived from embryonic stem cells in vitro." *J Immunol* 168(10): 4980-4987.
- Liem, L. M., C. A. Koelman, *et al.* (1997). "Elevated serum HLA class I levels coincide with acute and chronic graft-versus-host disease." *Bone Marrow Transplant* 20(3): 227-234.
- Lieto, L. D., F. Borrego, *et al.* (2003). "Human CD94 gene expression: dual promoters differing in responsiveness to IL-2 or IL-15." *J Immunol* 171(10): 5277-5286.
- Lieto, L. D., K. Maasho, *et al.* (2006). "The human CD94 gene encodes multiple, expressible transcripts including a new partner of NKG2A/B." *Genes Immun* 7(1): 36-43.

- Lila, N., C. Amrein, *et al.* (2002). "Human leukocyte antigen-G expression after heart transplantation is associated with a reduced incidence of rejection." *Circulation* 105(16): 1949-1954.
- Lila, N., A. Carpentier, *et al.* (2000). "Implication of HLA-G molecule in heart-graft acceptance." *Lancet* 355(9221): 2138.
- Lila, N., N. Rouas-Freiss, *et al.* (2001). "Soluble HLA-G protein secreted by allo-specific CD4+ T cells suppresses the allo-proliferative response: a CD4+ T cell regulatory mechanism." *Proc Natl Acad Sci U S A* 98(21): 12150-12155.
- Lilienfeld, B. G., M. D. Crew, *et al.* (2007). "Transgenic expression of HLA-E single chain trimer protects porcine endothelial cells against human natural killer cell-mediated cytotoxicity." *Xenotransplantation* 14(2): 126-134.
- Lin, A., H. Xu, *et al.* (2007). "Modulation of HLA expression in human cytomegalovirus immune evasion." *Cell Mol Immunol* 4(2): 91-98.
- Lin, Y. J., L. Wan, *et al.* (2009). "HLA-E gene polymorphism associated with susceptibility to Kawasaki disease and formation of coronary artery aneurysms." *Arthritis Rheum* 60(2): 604-610.
- Lindaman, A., A. Dowden, *et al.* (2006). "Soluble HLA-G molecules induce apoptosis in natural killer cells." *Am J Reprod Immunol* 56(1): 68-76.
- Lindstedt, R., N. Monk, *et al.* (2001). "Amino acid substitutions in the putative MHC class II "dimer of dimers" interface inhibit CD4+ T cell activation." *J Immunol* 166(2): 800-808.
- Liu, H., M. Rhodes, *et al.* (2000). "On the dynamics of TCR:CD3 complex cell surface expression and downmodulation." *Immunity* 13(5): 665-675.
- Liu, X. X., F. H. Pan, *et al.* (2012). "Characterization of HLA-E polymorphism in four distinct populations in Mainland China." *Tissue Antigens* 80(1): 26-35.
- Llano, M., N. Lee, *et al.* (1998). "HLA-E-bound peptides influence recognition by inhibitory and triggering CD94/NKG2 receptors: preferential response to an HLA-G-derived nonamer." *Eur J Immunol* 28(9): 2854-2863.
- Lo Monaco, E., L. Sibilio, *et al.* (2008). "HLA-E: strong association with beta2-microglobulin and surface expression in the absence of HLA class I signal sequence-derived peptides." *J Immunol* 181(8): 5442-5450.
- Lo Monaco, E., E. Tremante, *et al.* (2011). "Human leukocyte antigen E contributes to protect tumor cells from lysis by natural killer cells." *Neoplasia* 13(9): 822-830.
- Lo, W. F., H. Ong, *et al.* (1999). "T cell responses to Gram-negative intracellular bacterial pathogens: a role for CD8+ T cells in immunity to Salmonella infection and the involvement of MHC class Ib molecules." *J Immunol* 162(9): 5398-5406.
- Lo, W. F., A. S. Woods, *et al.* (2000). "Molecular mimicry mediated by MHC class Ib molecules after infection with gram-negative pathogens." *Nat Med* 6(2): 215-218.
- Lohwasser, S., P. Hande, *et al.* (1999). "Cloning of murine NKG2A, B and C: second family of C-type lectin receptors on murine NK cells." *Eur J Immunol* 29(3): 755-761.
- Lohwasser, S., B. Wilhelm, *et al.* (2000). "The genomic organization of the mouse CD94 C-type lectin gene." *Eur J Immunogenet* 27(3): 149-151.
- Lopez-Verges, S., J. M. Milush, *et al.* (2011). "Expansion of a unique CD57(+)NKG2Chi natural killer cell subset during acute human cytomegalovirus infection." *Proc Natl Acad Sci U S A* 108(36): 14725-14732.
- Lu, L., H. J. Kim, *et al.* (2008). "Regulation of CD8+ regulatory T cells: Interruption of the NKG2A-Qa-1 interaction allows robust suppressive activity and resolution of autoimmune disease." *Proc Natl Acad Sci U S A* 105(49): 19420-19425.
- Ludajic, K., A. Rosenmayr, *et al.* (2009). "Association of HLA-E polymorphism with the outcome of hematopoietic stem-cell transplantation with unrelated donors." *Transplantation* 88(10): 1227-1228.
- Luque, J., M. I. Torres, *et al.* (2006). "Soluble HLA-G in heart transplantation: their relationship to rejection episodes and immunosuppressive therapy." *Hum Immunol* 67(4-5): 257-263.
- Lury, D., H. Epstein, *et al.* (1990). "The human class I MHC gene HLA-F is expressed in lymphocytes." *Int Immunol* 2(6): 531-537.
- Lutz, C. T., M. B. Moore, *et al.* (2005). "Reciprocal age related change in natural killer cell receptors for MHC class I." *Mech Ageing Dev* 126(6-7): 722-731.

- Maier, S., M. Grzeschik, *et al.* (2000). "Implications of HLA-E allele expression and different HLA-E ligand diversity for the regulation of NK cells." *Hum Immunol* 61(11): 1059-1065.
- Mallet, V., A. Blaschitz, *et al.* (1999). "HLA-G in the human thymus: a subpopulation of medullary epithelial but not CD83(+) dendritic cells expresses HLA-G as a membrane-bound and soluble protein." *Int Immunol* 11(6): 889-898.
- Malmberg, K. J., V. Levitsky, *et al.* (2002). "IFN-gamma protects short-term ovarian carcinoma cell lines from CTL lysis via a CD94/NKG2A-dependent mechanism." *J Clin Invest* 110(10): 1515-1523.
- Marin, R., F. Ruiz-Cabello, *et al.* (2003). "Analysis of HLA-E expression in human tumors." *Immunogenetics* 54(11): 767-775.
- Marten, A., M. von Lilienfeld-Toal, *et al.* (2006). "Soluble MIC is elevated in the serum of patients with pancreatic carcinoma diminishing gammadelta T cell cytotoxicity." *Int J Cancer* 119(10): 2359-2365.
- Martini, F., C. Agrati, *et al.* (2005). "HLA-E up-regulation induced by HIV infection may directly contribute to CD94-mediated impairment of NK cells." *Int J Immunopathol Pharmacol* 18(2): 269-276.
- Masilamani, M., S. Narayanan, *et al.* (2008). "Uncommon endocytic and trafficking pathway of the natural killer cell CD94/NKG2A inhibitory receptor." *Traffic* 9(6): 1019-1034.
- Masilamani, M., C. Nguyen, *et al.* (2006). "CD94/NKG2A inhibits NK cell activation by disrupting the actin network at the immunological synapse." *J Immunol* 177(6): 3590-3596.
- Matsunami, K., S. Miyagawa, *et al.* (2000). "Protection against natural killer-mediated swine endothelial cell lysis by HLA-G and HLA-E." *Transplant Proc* 32(5): 939-940.
- Matsunami, K., S. Miyagawa, *et al.* (2002). "Modulation of the leader peptide sequence of the HLA-E gene up-regulates its expression and down-regulates natural killer cell-mediated swine endothelial cell lysis." *Transplantation* 73(10): 1582-1589.
- Matte, C., J. Lacaille, *et al.* (2000). "HLA-G and HLA-E polymorphisms in an indigenous African population. The ZVITAMBO Study Group." *Hum Immunol* 61(11): 1150-1156.
- Mazzarino, P., G. Pietra, *et al.* (2005). "Identification of effector-memory CMV-specific T lymphocytes that kill CMV-infected target cells in an HLA-E-restricted fashion." *Eur J Immunol* 35(11): 3240-3247.
- McMahon, C. W., A. J. Zajac, *et al.* (2002). "Viral and bacterial infections induce expression of multiple NK cell receptors in responding CD8(+) T cells." *J Immunol* 169(3): 1444-1452.
- Mela, C. M., C. T. Burton, *et al.* (2005). "Switch from inhibitory to activating NKG2 receptor expression in HIV-1 infection: lack of reversion with highly active antiretroviral therapy." *AIDS* 19(16): 1761-1769.
- Menier, C., M. Rabreau, *et al.* (2004). "Erythroblasts secrete the nonclassical HLA-G molecule from primitive to definitive hematopoiesis." *Blood* 104(10): 3153-3160.
- Menier, C., N. Rouas-Freiss, *et al.* (2010). "Recent advances on the non-classical major histocompatibility complex class I HLA-G molecule." *Tissue Antigens* 75(3): 201-206.
- Meresse, B., S. A. Curran, *et al.* (2006). "Reprogramming of CTLs into natural killer-like cells in celiac disease." *J Exp Med* 203(5): 1343-1355.
- Meyers, J. H., A. Ryu, *et al.* (2002). "Cutting edge: CD94/NKG2 is expressed on Th1 but not Th2 cells and costimulates Th1 effector functions." *J Immunol* 169(10): 5382-5386.
- Michaelsson, J., C. Teixeira de Matos, *et al.* (2002). "A signal peptide derived from hsp60 binds HLA-E and interferes with CD94/NKG2A recognition." *J Exp Med* 196(11): 1403-1414.
- Michelin, S., C. E. Gallegos, *et al.* (2009). "Ionizing radiation modulates the surface expression of human leukocyte antigen-G in a human melanoma cell line." *Hum Immunol* 70(12): 1010-1015.
- Miller, D. M., T. B. Thornley, *et al.* (2008). "Viral infection: a potent barrier to transplantation tolerance." *Clin Dev Immunol* 2008: 742810.
- Miller, J. D., M. Peters, *et al.* (2002). "CD94/NKG2 expression does not inhibit cytotoxic function of lymphocytic choriomeningitis virus-specific CD8+ T cells." *J Immunol* 169(2): 693-701.
- Miller, J. D., D. A. Weber, *et al.* (2003). "Analysis of HLA-E peptide-binding specificity and contact residues in bound peptide required for recognition by CD94/NKG2." *J Immunol* 171(3): 1369-1375.

- Millo, E., G. Pietra, *et al.* (2007). "Purification and HPLC-MS analysis of a naturally processed HCMV-derived peptide isolated from the HEK-293T/HLA-E+/U140+ cell transfectants and presented at the cell surface in the context of HLA-E." *J Immunol Methods* 322(1-2): 128-136.
- Mingari, M. C., M. Ponte, *et al.* (1998). "HLA class I-specific inhibitory receptors in human T lymphocytes: interleukin 15-induced expression of CD94/NKG2A in superantigen- or alloantigen-activated CD8+ T cells." *Proc Natl Acad Sci U S A* 95(3): 1172-1177.
- Mingari, M. C., M. Ponte, *et al.* (1997). "HLA-class I-specific inhibitory receptors in human cytolytic T lymphocytes: molecular characterization, distribution in lymphoid tissues and co-expression by individual T cells." *Int Immunol* 9(4): 485-491.
- Mingari, M. C., F. Schiavetti, *et al.* (1996). "Human CD8+ T lymphocyte subsets that express HLA class I-specific inhibitory receptors represent oligoclonally or monoclonally expanded cell populations." *Proc Natl Acad Sci U S A* 93(22): 12433-12438.
- Mingari, M. C., C. Vitale, *et al.* (1997). "Interleukin-15-induced maturation of human natural killer cells from early thymic precursors: selective expression of CD94/NKG2-A as the only HLA class I-specific inhibitory receptor." *Eur J Immunol* 27(6): 1374-1380.
- Mitsdoerffer, M., B. Schreiner, *et al.* (2005). "Monocyte-derived HLA-G acts as a strong inhibitor of autologous CD4 T cell activation and is upregulated by interferon-beta in vitro and in vivo: rationale for the therapy of multiple sclerosis." *J Neuroimmunol* 159(1-2): 155-164.
- Mittelbronn, M., P. Simon, *et al.* (2007). "Elevated HLA-E levels in human glioblastomas but not in grade I to III astrocytomas correlate with infiltrating CD8+ cells." *J Neuroimmunol* 189(1-2): 50-58.
- Mizuno, S., J. A. Trapani, *et al.* (1988). "Isolation and nucleotide sequence of a cDNA clone encoding a novel HLA class I gene." *J Immunol* 140(11): 4024-4030.
- Monneret, G., N. Voirin, *et al.* (2007). "Soluble human leukocyte antigen-G5 in septic shock: marked and persisting elevation as a predictor of survival." *Crit Care Med* 35(8): 1942-1947.
- Morales, P. J., J. L. Pace, *et al.* (2007). "Synthesis of beta(2)-microglobulin-free, disulphide-linked HLA-G5 homodimers in human placental villous cytotrophoblast cells." *Immunology* 122(2): 179-188.
- Morandi, F., E. Ferretti, *et al.* (2010). "A novel mechanism of soluble HLA-G mediated immune modulation: downregulation of T cell chemokine receptor expression and impairment of chemotaxis." *PLoS One* 5(7): e11763.
- Morandi, F., I. Levreri, *et al.* (2007). "Human neuroblastoma cells trigger an immunosuppressive program in monocytes by stimulating soluble HLA-G release." *Cancer Res* 67(13): 6433-6441.
- Moretta, A., R. Biassoni, *et al.* (1997). "Major histocompatibility complex class I-specific receptors on human natural killer and T lymphocytes." *Immunol Rev* 155: 105-117.
- Mori, D., Y. Nakafusa, *et al.* (2005). "Differential expression of Janus kinase 3 (JAK3), matrix metalloproteinase 13 (MMP13), heat shock protein 60 (HSP60), and mouse double minute 2 (MDM2) in human colorectal cancer progression using human cancer cDNA microarrays." *Pathol Res Pract* 201(12): 777-789.
- Morice, A., B. Charreau, *et al.* (2010). "Cross-reactivity of herpesvirus-specific CD8 T cell lines toward allogeneic class I MHC molecules." *PLoS One* 5(8): e12120.
- Mosaad, Y. M., Y. Abdel-Dayem, *et al.* (2011). "Association between HLA-E *0101 homozygosity and recurrent miscarriage in Egyptian women." *Scand J Immunol* 74(2): 205-209.
- Moser, J. M., J. Gibbs, *et al.* (2002). "CD94-NKG2A receptors regulate antiviral CD8(+) T cell responses." *Nat Immunol* 3(2): 189-195.
- Munoz-Cobo, B., C. Solano, *et al.* (2012). "Functional profile of cytomegalovirus (CMV)-specific CD8+ T cells and kinetics of NKG2C+ NK cells associated with the resolution of CMV DNAemia in allogeneic stem cell transplant recipients." *J Med Virol* 84(2): 259-267.
- Murdaca, G., P. Contini, *et al.* (2009). "Behavior of non-classical soluble HLA class G antigens in human immunodeficiency virus 1-infected patients before and after HAART: comparison with classical soluble HLA-A, -B, -C antigens and potential role in immune-reconstitution." *Clin Immunol* 133(2): 238-244.

- Nagarajan, N. A., F. Gonzalez, *et al.* (2012). "Nonclassical MHC class Ib-restricted cytotoxic T cells monitor antigen processing in the endoplasmic reticulum." *Nat Immunol* 13(6): 579-586.
- Naji, A., A. Durrbach, *et al.* (2007). "Soluble HLA-G and HLA-G1 expressing antigen-presenting cells inhibit T-cell alloproliferation through ILT-2/ILT-4/FasL-mediated pathways." *Hum Immunol* 68(4): 233-239.
- Naji, A., S. Le Rond, *et al.* (2007). "CD3+CD4^{low} and CD3+CD8^{low} are induced by HLA-G: novel human peripheral blood suppressor T-cell subsets involved in transplant acceptance." *Blood* 110(12): 3936-3948.
- Naji, A., C. Menier, *et al.* (2012). "Neoplastic B-cell growth is impaired by HLA-G/ILT2 interaction." *Leukemia*.
- Nattermann, J., G. Feldmann, *et al.* (2006). "Surface expression and cytolytic function of natural killer cell receptors is altered in chronic hepatitis C." *Gut* 55(6): 869-877.
- Nattermann, J., H. D. Nischalke, *et al.* (2005). "The HLA-A2 restricted T cell epitope HCV core 35-44 stabilizes HLA-E expression and inhibits cytolysis mediated by natural killer cells." *Am J Pathol* 166(2): 443-453.
- Nattermann, J., H. D. Nischalke, *et al.* (2005). "HIV-1 infection leads to increased HLA-E expression resulting in impaired function of natural killer cells." *Antivir Ther* 10(1): 95-107.
- Nguyen, S., V. Beziat, *et al.* (2009). "HLA-E upregulation on IFN-gamma-activated AML blasts impairs CD94/NKG2A-dependent NK cytolysis after haplo-mismatched hematopoietic SCT." *Bone Marrow Transplant* 43(9): 693-699.
- Nguyen, S., N. Dhedin, *et al.* (2005). "NK-cell reconstitution after haploidentical hematopoietic stem-cell transplantations: immaturity of NK cells and inhibitory effect of NKG2A override GvL effect." *Blood* 105(10): 4135-4142.
- Nielsen, N., N. Odum, *et al.* (2012). "Cytotoxicity of CD56(bright) NK cells towards autologous activated CD4⁺ T cells is mediated through NKG2D, LFA-1 and TRAIL and dampened via CD94/NKG2A." *PLoS One* 7(2): e31959.
- Noci, I., B. Fuzzi, *et al.* (2005). "Embryonic soluble HLA-G as a marker of developmental potential in embryos." *Hum Reprod* 20(1): 138-146.
- Nocito, M., C. Montalban, *et al.* (1997). "Increased soluble serum HLA class I antigens in patients with lymphoma." *Hum Immunol* 58(2): 106-111.
- Noppen, C., C. Schaefer, *et al.* (1998). "C-type lectin-like receptors in peptide-specific HLA class I-restricted cytotoxic T lymphocytes: differential expression and modulation of effector functions in clones sharing identical TCR structure and epitope specificity." *Eur J Immunol* 28(4): 1134-1142.
- Nydam, T., T. K. Wade, *et al.* (1998). "Mutations in MHC class II dimer of dimers contact residues: effects on antigen presentation." *Int Immunol* 10(8): 1237-1249.
- O'Callaghan, C. A., J. Tormo, *et al.* (1998). "Structural features impose tight peptide binding specificity in the nonclassical MHC molecule HLA-E." *Mol Cell* 1(4): 531-541.
- Ogasawara, K., J. A. Hamerman, *et al.* (2003). "Impairment of NK cell function by NKG2D modulation in NOD mice." *Immunity* 18(1): 41-51.
- Ohya, K., K. Kondo, *et al.* (1990). "Polymorphism in the human class I MHC locus HLA-E in Japanese." *Immunogenetics* 32(3): 205-209.
- Oliveira, C. C., P. A. van Veelen, *et al.* (2010). "The nonpolymorphic MHC Qa-1b mediates CD8⁺ T cell surveillance of antigen-processing defects." *J Exp Med* 207(1): 207-221.
- Olteanu, H., B. C. Schur, *et al.* (2010). "Expression of natural killer receptors in T- and NK-cells: comparison of healthy individuals, patients with prior stem cell transplant, and patients undergoing chemotherapy." *Leuk Lymphoma* 51(3): 481-487.
- Orange, J. S., M. S. Fassett, *et al.* (2002). "Viral evasion of natural killer cells." *Nat Immunol* 3(11): 1006-1012.
- Orr, M. T., J. Wu, *et al.* (2010). "Development and function of CD94-deficient natural killer cells." *PLoS One* 5(12): e15184.
- Ortega, C., P. Romero, *et al.* (2004). "Role for NKG2-A and NKG2-C surface receptors in chronic CD4⁺ T-cell responses." *Immunol Cell Biol* 82(6): 587-595.
- Ota, T., K. Takeda, *et al.* (2005). "IFN-gamma-mediated negative feedback regulation of NKT-cell function by CD94/NKG2." *Blood* 106(1): 184-192.

- Ouyang, Q., G. Baerlocher, *et al.* (2007). "Telomere length in human natural killer cell subsets." *Ann N Y Acad Sci* 1106: 240-252.
- Paladini, F., F. Belfiore, *et al.* (2009). "HLA-E gene polymorphism associates with ankylosing spondylitis in Sardinia." *Arthritis Res Ther* 11(6): R171.
- Palmieri, G., V. Tullio, *et al.* (1999). "CD94/NKG2-A inhibitory complex blocks CD16-triggered Syk and extracellular regulated kinase activation, leading to cytotoxic function of human NK cells." *J Immunol* 162(12): 7181-7188.
- Palmisano, G. L., E. Contardi, *et al.* (2005). "HLA-E surface expression is independent of the availability of HLA class I signal sequence-derived peptides in human tumor cell lines." *Hum Immunol* 66(1): 1-12.
- Panoutsakopoulou, V., K. M. Huster, *et al.* (2004). "Suppression of autoimmune disease after vaccination with autoreactive T cells that express Qa-1 peptide complexes." *J Clin Invest* 113(8): 1218-1224.
- Paolini, R., A. Serra, *et al.* (1999). "Tyrosine kinase-dependent ubiquitination of CD16 zeta subunit in human NK cells following receptor engagement." *Eur J Immunol* 29(10): 3179-3187.
- Park, C. K., T. R. Park, *et al.* (1997). "Viral loads and E2/NS1 region sequences of hepatitis C virus in hepatocellular carcinoma and surrounding liver." *Korean J Intern Med* 12(1): 28-33.
- Park, G. M., S. Lee, *et al.* (2004). "Soluble HLA-G generated by proteolytic shedding inhibits NK-mediated cell lysis." *Biochem Biophys Res Commun* 313(3): 606-611.
- Park, K. S., J. S. Park, *et al.* (2007). "HLA-E*0101 and HLA-G*010101 reduce the risk of Behcet's disease." *Tissue Antigens* 69(2): 139-144.
- Park, S. H., D. Guy-Grand, *et al.* (1999). "Selection and expansion of CD8alpha/alpha(1) T cell receptor alpha/beta(1) intestinal intraepithelial lymphocytes in the absence of both classical major histocompatibility complex class I and nonclassical CD1 molecules." *J Exp Med* 190(6): 885-890.
- Pellegrino, M. A., S. Ferrone, *et al.* (1974). "Evaluation of two sources of soluble HL-A antigens: platelets and serum." *Eur J Immunol* 4(4): 250-255.
- Pellegrino, M. A., F. Indiveri, *et al.* (1982). "Immunogenicity of serum HLA antigens in allogeneic combinations." *Transplantation* 33(5): 530-533.
- Pende, D., R. Castriconi, *et al.* (2006). "Expression of the DNAM-1 ligands, Nectin-2 (CD112) and poliovirus receptor (CD155), on dendritic cells: relevance for natural killer-dendritic cell interaction." *Blood* 107(5): 2030-2036.
- Perarnau, B., M. F. Saron, *et al.* (1999). "Single H2Kb, H2Db and double H2KbDb knockout mice: peripheral CD8+ T cell repertoire and anti-lymphocytic choriomeningitis virus cytolytic responses." *Eur J Immunol* 29(4): 1243-1252.
- Perera, L., L. Shao, *et al.* (2007). "Expression of nonclassical class I molecules by intestinal epithelial cells." *Inflamm Bowel Dis* 13(3): 298-307.
- Perez-Villar, J. J., M. Carretero, *et al.* (1996). "Biochemical and serologic evidence for the existence of functionally distinct forms of the CD94 NK cell receptor." *J Immunol* 157(12): 5367-5374.
- Perrin, G., D. Speiser, *et al.* (2002). "Sister cytotoxic CD8+ T cell clones differing in natural killer inhibitory receptor expression in human astrocytoma." *Immunol Lett* 81(2): 125-132.
- Persson, C. M., E. Assarsson, *et al.* (2008). "Critical role of Qa1b in the protection of mature dendritic cells from NK cell-mediated killing." *Scand J Immunol* 67(1): 30-36.
- Peruzzi, G., M. Masilamani, *et al.* (2009). "Endocytosis as a mechanism of regulating natural killer cell function: unique endocytic and trafficking pathway for CD94/NKG2A." *Immunol Res* 43(1-3): 210-222.
- Petrie, E. J., C. S. Clements, *et al.* (2008). "CD94-NKG2A recognition of human leukocyte antigen (HLA)-E bound to an HLA class I leader sequence." *J Exp Med* 205(3): 725-735.
- Petroziello, J., A. Yamane, *et al.* (2004). "Suppression subtractive hybridization and expression profiling identifies a unique set of genes overexpressed in non-small-cell lung cancer." *Oncogene* 23(46): 7734-7745.
- Pickl, W. F., O. Majdic, *et al.* (1993). "The soluble pool of beta 2-microglobulin free HLA class I alpha-chains. Qualitative and quantitative characterization." *J Immunol* 151(5): 2613-2622.

- Pietra, G., C. Romagnani, *et al.* (2001). "The analysis of the natural killer-like activity of human cytolytic T lymphocytes revealed HLA-E as a novel target for TCR alpha/beta-mediated recognition." *Eur J Immunol* 31(12): 3687-3693.
- Pietra, G., C. Romagnani, *et al.* (2003). "HLA-E-restricted recognition of cytomegalovirus-derived peptides by human CD8+ cytolytic T lymphocytes." *Proc Natl Acad Sci U S A* 100(19): 10896-10901.
- Pignatelli, D., J. Ferreira, *et al.* (2003). "Immunohistochemical study of heat shock proteins 27, 60 and 70 in the normal human adrenal and in adrenal tumors with suppressed ACTH production." *Microsc Res Tech* 61(3): 315-323.
- Plas, D. R., R. Johnson, *et al.* (1996). "Direct regulation of ZAP-70 by SHP-1 in T cell antigen receptor signaling." *Science* 272(5265): 1173-1176.
- Plougastel, B. and J. Trowsdale (1997). "Cloning of NKG2-F, a new member of the NKG2 family of human natural killer cell receptor genes." *Eur J Immunol* 27(11): 2835-2839.
- Poccia, F., B. Cipriani, *et al.* (1997). "CD94/NKG2 inhibitory receptor complex modulates both anti-viral and anti-tumoral responses of polyclonal phosphoantigen-reactive V gamma 9V delta 2 T lymphocytes." *J Immunol* 159(12): 6009-6017.
- Poggi, A., P. Contini, *et al.* (2005). "Regulation of gammadelta T cell survival by soluble HLA-I: involvement of CD8 and activating killer Ig-like receptors." *Eur J Immunol* 35(9): 2670-2678.
- Pollard, S. G., H. S. Davies, *et al.* (1989). "Soluble class I antigen in human bile." *Transplantation* 48(4): 712-714.
- Poon, K., D. Montamat-Sicotte, *et al.* (2005). "Expression of leukocyte immunoglobulin-like receptors and natural killer receptors on virus-specific CD8+ T cells during the evolution of Epstein-Barr virus-specific immune responses in vivo." *Viral Immunol* 18(3): 513-522.
- Prigione, I., F. Penco, *et al.* (2011). "HLA-G and HLA-E in patients with juvenile idiopathic arthritis." *Rheumatology (Oxford)* 50(5): 966-972.
- Prod'homme, V., P. Tomasec, *et al.* (2012). "Human cytomegalovirus UL40 signal peptide regulates cell surface expression of the NK cell ligands HLA-E and gpUL18." *J Immunol* 188(6): 2794-2804.
- Provatopoulou, X., E. Kalogera, *et al.* (2012). "Soluble human leukocyte antigen-G expression in patients with ductal and lobular breast malignancy." *Anticancer Res* 32(3): 1021-1026.
- Puppo, F., D. Bignardi, *et al.* (1999). "Beta2-micro-free HLA class I heavy chain levels in sera of healthy individuals. Lack of association with beta2-micro-associated HLA class I heavy chain levels and HLA phenotype." *Tissue Antigens* 53(3): 253-262.
- Puppo, F., S. Brenci, *et al.* (1996). "Serum HLA class I antigen levels in allogeneic bone marrow transplantation: a possible marker of acute GVHD." *Bone Marrow Transplant* 17(5): 753-758.
- Puppo, F., S. Brenci, *et al.* (1994). "Increased level of serum HLA class I antigens in HIV infection. Correlation with disease progression." *Hum Immunol* 40(4): 259-266.
- Puppo, F., P. Contini, *et al.* (2000). "Soluble human MHC class I molecules induce soluble Fas ligand secretion and trigger apoptosis in activated CD8(+) Fas (CD95)(+) T lymphocytes." *Int Immunol* 12(2): 195-203.
- Puppo, F., M. Costa, *et al.* (1999). "Determination of soluble HLA-G and HLA-A, -B, and -C molecules in pregnancy." *Transplant Proc* 31(4): 1841-1843.
- Puppo, F., A. Orlandini, *et al.* (1990). "HLA class I soluble antigen serum levels in HIV-positive subjects--correlation with cellular and serological parameters." *Cancer Detect Prev* 14(3): 321-323.
- Puppo, F., A. Picciotto, *et al.* (1995). "Behavior of soluble HLA class I antigens in patients with chronic hepatitis C during interferon therapy: an early predictor marker of response?" *J Clin Immunol* 15(4): 179-184.
- Pyo, C. W., L. M. Williams, *et al.* (2006). "HLA-E, HLA-F, and HLA-G polymorphism: genomic sequence defines haplotype structure and variation spanning the nonclassical class I genes." *Immunogenetics* 58(4): 241-251.
- Qiu, J., P. I. Terasaki, *et al.* (2006). "Soluble HLA-G expression and renal graft acceptance." *Am J Transplant* 6(9): 2152-2156.

- Rebmann, V., D. Bartsch, *et al.* (2009). "Soluble total human leukocyte antigen class I and human leukocyte antigen-G molecules in kidney and kidney/pancreas transplantation." *Hum Immunol* 70(12): 995-999.
- Rebmann, V., A. Busemann, *et al.* (2003). "Detection of HLA-G5 secreting cells." *Hum Immunol* 64(11): 1017-1024.
- Rebmann, V., J. Lemaoult, *et al.* (2005). "Report of the Wet Workshop for Quantification of Soluble HLA-G in Essen, 2004." *Hum Immunol* 66(8): 853-863.
- Rebmann, V., J. LeMaoult, *et al.* (2007). "Quantification and identification of soluble HLA-G isoforms." *Tissue Antigens* 69 Suppl 1: 143-149.
- Rebmann, V., K. Pfeiffer, *et al.* (1999). "Detection of soluble HLA-G molecules in plasma and amniotic fluid." *Tissue Antigens* 53(1): 14-22.
- Rebmann, V., J. Regel, *et al.* (2003). "Secretion of sHLA-G molecules in malignancies." *Semin Cancer Biol* 13(5): 371-377.
- Rebmann, V., M. Switala, *et al.* (2010). "Soluble HLA-G is an independent factor for the prediction of pregnancy outcome after ART: a German multi-centre study." *Hum Reprod* 25(7): 1691-1698.
- Rebmann, V., K. van der Ven, *et al.* (2001). "Association of soluble HLA-G plasma levels with HLA-G alleles." *Tissue Antigens* 57(1): 15-21.
- Reddehase, M. J. (2002). "Antigens and immunoevasins: opponents in cytomegalovirus immune surveillance." *Nat Rev Immunol* 2(11): 831-844.
- Reed, E., A. E. Beer, *et al.* (1991). "The alloantibody response of pregnant women and its suppression by soluble HLA antigens and anti-idiotypic antibodies." *J Reprod Immunol* 20(2): 115-128.
- Renna Molajoni, E., F. Puppo, *et al.* (1995). "Serum HLA class I soluble antigens: a marker of acute rejection following liver transplantation." *Transplant Proc* 27(1): 1155-1156.
- Rhynes, V. K., J. C. McDonald, *et al.* (1993). "Soluble HLA class I in the serum of transplant recipients." *Ann Surg* 217(5): 485-489; discussion 489-491.
- Riederer, I., W. Sievert, *et al.* (2010). "Irradiation-induced up-regulation of HLA-E on macrovascular endothelial cells confers protection against killing by activated natural killer cells." *PLoS One* 5(12): e15339.
- Rizzo, R., L. Melchiorri, *et al.* (2007). "HLA-G expression is a fundamental prerequisite to pregnancy." *Hum Immunol* 68(4): 244-250.
- Rodriguez, A., M. Carretero, *et al.* (1998). "Structure of the human CD94 C-type lectin gene." *Immunogenetics* 47(4): 305-309.
- Romagnani, C., G. Pietra, *et al.* (2004). "HLA-E-restricted recognition of human cytomegalovirus by a subset of cytolytic T lymphocytes." *Hum Immunol* 65(5): 437-445.
- Romagnani, C., G. Pietra, *et al.* (2002). "Identification of HLA-E-specific alloreactive T lymphocytes: a cell subset that undergoes preferential expansion in mixed lymphocyte culture and displays a broad cytolytic activity against allogeneic cells." *Proc Natl Acad Sci U S A* 99(17): 11328-11333.
- Romero, P., C. Ortega, *et al.* (2001). "Expression of CD94 and NKG2 molecules on human CD4(+) T cells in response to CD3-mediated stimulation." *J Leukoc Biol* 70(2): 219-224.
- Rosenberg, S. A. and M. E. Dudley (2009). "Adoptive cell therapy for the treatment of patients with metastatic melanoma." *Curr Opin Immunol* 21(2): 233-240.
- Rouas-Freiss, N., P. Moreau, *et al.* (2005). "HLA-G proteins in cancer: do they provide tumor cells with an escape mechanism?" *Cancer Res* 65(22): 10139-10144.
- Rouas-Freiss, N., P. Moreau, *et al.* (2007). "Expression of tolerogenic HLA-G molecules in cancer prevents antitumor responses." *Semin Cancer Biol* 17(6): 413-421.
- Rowshani, A. T., F. J. Bemelman, *et al.* (2005). "Clinical and immunologic aspects of cytomegalovirus infection in solid organ transplant recipients." *Transplantation* 79(4): 381-386.
- Saez-Borderias, A., N. Romo, *et al.* (2009). "IL-12-dependent inducible expression of the CD94/NKG2A inhibitory receptor regulates CD94/NKG2C+ NK cell function." *J Immunol* 182(2): 829-836.
- Saito, S., K. Motoyoshi, *et al.* (1993). "Localization and production of human macrophage colony-stimulating factor (hM-CSF) in human placental and decidual tissues." *Lymphokine Cytokine Res* 12(2): 101-107.

- Saito, S., K. Nishikawa, *et al.* (1993). "Cytokine production by CD16-CD56bright natural killer cells in the human early pregnancy decidua." *Int Immunol* 5(5): 559-563.
- Sakaguchi, K., N. Koide, *et al.* (1992). "Soluble HLA class I antigens in sera of patients with chronic hepatitis." *Gastroenterol Jpn* 27(2): 206-211.
- Salcedo, M., P. Bousso, *et al.* (1998). "The Qa-1b molecule binds to a large subpopulation of murine NK cells." *Eur J Immunol* 28(12): 4356-4361.
- Salcedo, M., F. Colucci, *et al.* (2000). "Role of Qa-1(b)-binding receptors in the specificity of developing NK cells." *Eur J Immunol* 30(4): 1094-1101.
- Salerno-Goncalves, R., M. Fernandez-Vina, *et al.* (2004). "Identification of a human HLA-E-restricted CD8+ T cell subset in volunteers immunized with Salmonella enterica serovar Typhi strain Ty21a typhoid vaccine." *J Immunol* 173(9): 5852-5862.
- Salerno-Goncalves, R., R. Wahid, *et al.* (2010). "Ex Vivo kinetics of early and long-term multifunctional human leukocyte antigen E-specific CD8+ cells in volunteers immunized with the Ty21a typhoid vaccine." *Clin Vaccine Immunol* 17(9): 1305-1314.
- Sandusky, M. M., B. Messmer, *et al.* (2006). "Regulation of 2B4 (CD244)-mediated NK cell activation by ligand-induced receptor modulation." *Eur J Immunol* 36(12): 3268-3276.
- Sasaki, H., X. C. Xu, *et al.* (1999). "HLA-E and HLA-G expression on porcine endothelial cells inhibit xenoreactive human NK cells through CD94/NKG2-dependent and -independent pathways." *J Immunol* 163(11): 6301-6305.
- Schafer, P. H., S. K. Pierce, *et al.* (1995). "The structure of MHC class II: a role for dimer of dimers." *Semin Immunol* 7(6): 389-398.
- Schleypen, J. S., M. Von Geldern, *et al.* (2003). "Renal cell carcinoma-infiltrating natural killer cells express differential repertoires of activating and inhibitory receptors and are inhibited by specific HLA class I allotypes." *Int J Cancer* 106(6): 905-912.
- Schott, E., N. Bertho, *et al.* (2002). "Class I negative CD8 T cells reveal the confounding role of peptide-transfer onto CD8 T cells stimulated with soluble H2-Kb molecules." *Proc Natl Acad Sci U S A* 99(21): 13735-13740.
- Schreiber, R. D., L. J. Old, *et al.* (2011). "Cancer immunoediting: integrating immunity's roles in cancer suppression and promotion." *Science* 331(6024): 1565-1570.
- Schulte, D., M. Vogel, *et al.* (2009). "The HLA-E(R)/HLA-E(R) genotype affects the natural course of hepatitis C virus (HCV) infection and is associated with HLA-E-restricted recognition of an HCV-derived peptide by interferon-gamma-secreting human CD8(+) T cells." *J Infect Dis* 200(9): 1397-1401.
- Schutt, P., B. Schutt, *et al.* (2010). "Prognostic relevance of soluble human leukocyte antigen-G and total human leukocyte antigen class I molecules in lung cancer patients." *Hum Immunol* 71(5): 489-495.
- Seaman, M. S., B. Perarnau, *et al.* (1999). "Response to *Listeria monocytogenes* in mice lacking MHC class Ia molecules." *J Immunol* 162(9): 5429-5436.
- Seaman, M. S., C. R. Wang, *et al.* (2000). "MHC class Ib-restricted CTL provide protection against primary and secondary *Listeria monocytogenes* infection." *J Immunol* 165(9): 5192-5201.
- Sebti, Y., G. Le Friec, *et al.* (2003). "Soluble HLA-G molecules are increased in lymphoproliferative disorders." *Hum Immunol* 64(11): 1093-1101.
- Sebti, Y., A. Le Maux, *et al.* (2007). "Expression of functional soluble human leukocyte antigen-G molecules in lymphoproliferative disorders." *Br J Haematol* 138(2): 202-212.
- Sedlackova, L., M. Spacek, *et al.* (2011). "Heat-shock protein expression in leukemia." *Tumour Biol* 32(1): 33-44.
- Selmani, Z., A. Naji, *et al.* (2008). "Human leukocyte antigen-G5 secretion by human mesenchymal stem cells is required to suppress T lymphocyte and natural killer function and to induce CD4+CD25highFOXP3+ regulatory T cells." *Stem Cells* 26(1): 212-222.
- Sensi, M., G. Pietra, *et al.* (2009). "Peptides with dual binding specificity for HLA-A2 and HLA-E are encoded by alternatively spliced isoforms of the antioxidant enzyme peroxiredoxin 5." *Int Immunol* 21(3): 257-268.
- Sher, G., L. Keskinetepe, *et al.* (2005). "Influence of early ICSI-derived embryo sHLA-G expression on pregnancy and implantation rates: a prospective study." *Hum Reprod* 20(5): 1359-1363.

- Sher, G., L. Keskinetepe, *et al.* (2005). "Soluble human leukocyte antigen G expression in phase I culture media at 46 hours after fertilization predicts pregnancy and implantation from day 3 embryo transfer." *Fertil Steril* 83(5): 1410-1413.
- Sher, G., L. Keskinetepe, *et al.* (2004). "Expression of sHLA-G in supernatants of individually cultured 46-h embryos: a potentially valuable indicator of 'embryo competency' and IVF outcome." *Reprod Biomed Online* 9(1): 74-78.
- Sheu, B. C., S. H. Chiou, *et al.* (2005). "Up-regulation of inhibitory natural killer receptors CD94/NKG2A with suppressed intracellular perforin expression of tumor-infiltrating CD8+ T lymphocytes in human cervical carcinoma." *Cancer Res* 65(7): 2921-2929.
- Shi, W. W., A. Lin, *et al.* (2011). "Plasma soluble human leukocyte antigen-G expression is a potential clinical biomarker in patients with hepatitis B virus infection." *Hum Immunol* 72(11): 1068-1073.
- Shilling, H. G., K. L. McQueen, *et al.* (2003). "Reconstitution of NK cell receptor repertoire following HLA-matched hematopoietic cell transplantation." *Blood* 101(9): 3730-3740.
- Shimura, T., S. Tsutsumi, *et al.* (2001). "Clinical significance of soluble form of HLA class I molecule in Japanese patients with pancreatic cancer." *Hum Immunol* 62(6): 615-619.
- Shiroishi, M., D. Kohda, *et al.* (2006). "Preparation and crystallization of the disulfide-linked HLA-G dimer." *Biochim Biophys Acta* 1764(5): 985-988.
- Silva, T. G., J. C. Crispim, *et al.* (2011). "Expression of the nonclassical HLA-G and HLA-E molecules in laryngeal lesions as biomarkers of tumor invasiveness." *Histol Histopathol* 26(12): 1487-1497.
- Singer, G., V. Rebmann, *et al.* (2003). "HLA-G is a potential tumor marker in malignant ascites." *Clin Cancer Res* 9(12): 4460-4464.
- Singh, P. B., R. E. Brown, *et al.* (1987). "MHC antigens in urine as olfactory recognition cues." *Nature* 327(6118): 161-164.
- Sipak-Szmigiel, O., E. Ronin-Walknowska, *et al.* (2007). "Antigens HLA-G, sHLA-G and sHLA-class I in reproductive failure." *Folia Histochem Cytobiol* 45 Suppl 1: S137-141.
- Sivakumar, P. V., A. Gunturi, *et al.* (1999). "Cutting edge: expression of functional CD94/NKG2A inhibitory receptors on fetal NK1.1+Ly-49- cells: a possible mechanism of tolerance during NK cell development." *J Immunol* 162(12): 6976-6980.
- Sobanov, Y., J. Glienke, *et al.* (1999). "Linkage of the NKG2 and CD94 receptor genes to D12S77 in the human natural killer gene complex." *Immunogenetics* 49(2): 99-105.
- Soloski, M. J., A. DeCloux, *et al.* (1995). "Structural and functional characteristics of the class IB molecule, Qa-1." *Immunol Rev* 147: 67-89.
- Soloski, M. J. and E. S. Metcalf (2001). "The involvement of class Ib molecules in the host response to infection with Salmonella and its relevance to autoimmunity." *Microbes Infect* 3(14-15): 1249-1259.
- Spaggiari, G. M., R. Carosio, *et al.* (2001). "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." *Eur J Immunol* 31(6): 1656-1665.
- Spaggiari, G. M., P. Contini, *et al.* (2002). "Soluble HLA class I induces NK cell apoptosis upon the engagement of killer-activating HLA class I receptors through FasL-Fas interaction." *Blood* 100(12): 4098-4107.
- Speiser, D. E., M. J. Pittet, *et al.* (1999). "In vivo expression of natural killer cell inhibitory receptors by human melanoma-specific cytolytic T lymphocytes." *J Exp Med* 190(6): 775-782.
- Speiser, D. E., D. Valmori, *et al.* (1999). "CD28-negative cytolytic effector T cells frequently express NK receptors and are present at variable proportions in circulating lymphocytes from healthy donors and melanoma patients." *Eur J Immunol* 29(6): 1990-1999.
- Srivastava, R., M. J. Chorney, *et al.* (1987). "Structure, expression, and molecular mapping of a divergent member of the class I HLA gene family." *Proc Natl Acad Sci U S A* 84(12): 4224-4228.
- Stangl, S., C. Gross, *et al.* (2008). "Influence of Hsp70 and HLA-E on the killing of leukemic blasts by cytokine/Hsp70 peptide-activated human natural killer (NK) cells." *Cell Stress Chaperones* 13(2): 221-230.

- Stebbins, C. C., C. Watzl, *et al.* (2003). "Vav1 dephosphorylation by the tyrosine phosphatase SHP-1 as a mechanism for inhibition of cellular cytotoxicity." *Mol Cell Biol* 23(17): 6291-6299.
- Steffensen, R., O. B. Christiansen, *et al.* (1998). "HLA-E polymorphism in patients with recurrent spontaneous abortion." *Tissue Antigens* 52(6): 569-572.
- Stevens, J., E. Joly, *et al.* (2001). "Peptide binding characteristics of the non-classical class Ib MHC molecule HLA-E assessed by a recombinant random peptide approach." *BMC Immunol* 2: 5.
- Stevenson, F. K., W. A. Douglass, *et al.* (1990). "Soluble histocompatibility antigens in synovial fluids of patients with rheumatoid arthritis." *Clin Exp Immunol* 80(1): 32-37.
- Stone, J. D. and L. J. Stern (2006). "CD8 T cells, like CD4 T cells, are triggered by multivalent engagement of TCRs by MHC-peptide ligands but not by monovalent engagement." *J Immunol* 176(3): 1498-1505.
- Streblow, D. N., S. L. Orloff, *et al.* (2007). "Acceleration of allograft failure by cytomegalovirus." *Curr Opin Immunol* 19(5): 577-582.
- Strong, R. K., M. A. Holmes, *et al.* (2003). "HLA-E allelic variants. Correlating differential expression, peptide affinities, crystal structures, and thermal stabilities." *J Biol Chem* 278(7): 5082-5090.
- Su, J., R. E. Berg, *et al.* (2005). "Thymus-dependent memory phenotype CD8 T cells in naive B6.H-2Kb^{-/-}Db^{-/-} animals mediate an antigen-specific response against *Listeria monocytogenes*." *J Immunol* 175(10): 6450-6457.
- Sullivan, B. A., P. Kraj, *et al.* (2002). "Positive selection of a Qa-1-restricted T cell receptor with specificity for insulin." *Immunity* 17(1): 95-105.
- Sullivan, B. A., L. M. Reed-Loisel, *et al.* (2004). "Homeostatic proliferation of a Qa-1b-restricted T cell: a distinction between the ligands required for positive selection and for proliferation in lymphopenic hosts." *J Immunol* 173(10): 6065-6071.
- Sullivan, L. C., H. L. Hoare, *et al.* (2006). "A structural perspective on MHC class Ib molecules in adaptive immunity." *Trends in immunology* 27(9):413-20.
- Sullivan, L. C., C. S. Clements, *et al.* (2007). "The heterodimeric assembly of the CD94-NKG2 receptor family and implications for human leukocyte antigen-E recognition." *Immunity* 27(6): 900-911.
- Swanson, P. A., 2nd, C. D. Pack, *et al.* (2008). "An MHC class Ib-restricted CD8 T cell response confers antiviral immunity." *J Exp Med* 205(7): 1647-1657.
- Sykulev, Y., M. Joo, *et al.* (1996). "Evidence that a single peptide-MHC complex on a target cell can elicit a cytolytic T cell response." *Immunity* 4(6): 565-571.
- Szeready, L., A. Barakonyi, *et al.* (2003). "Gamma/delta T-cell subsets, NKG2A expression and apoptosis of Vdelta2⁺ T cells in pregnant women with or without risk of premature pregnancy termination." *Am J Reprod Immunol* 50(6): 490-496.
- Tabayoyong, W. B. and N. Zavazava (2007). "Soluble HLA revisited." *Leuk Res* 31(2): 121-125.
- Takao, S., T. Ishikawa, *et al.* (2010). "The rapid induction of HLA-E is essential for the survival of antigen-activated naive CD4 T cells from attack by NK cells." *J Immunol* 185(10): 6031-6040.
- Takei, F., K. L. McQueen, *et al.* (2001). "Ly49 and CD94/NKG2: developmentally regulated expression and evolution." *Immunol Rev* 181: 90-103.
- Tamouza, R., M. Busson, *et al.* (2006). "Homozygous status for HLA-E*0103 confers protection from acute graft-versus-host disease and transplant-related mortality in HLA-matched sibling hematopoietic stem cell transplantation." *Transplantation* 82(11): 1436-1440.
- Tamouza, R., V. Rocha, *et al.* (2005). "Association of HLA-E polymorphism with severe bacterial infection and early transplant-related mortality in matched unrelated bone marrow transplantation." *Transplantation* 80(1): 140-144.
- Tang, X., I. Maricic, *et al.* (2007). "Anti-TCR antibody treatment activates a novel population of nonintestinal CD8 alpha alpha⁺ TCR alpha beta⁺ regulatory T cells and prevents experimental autoimmune encephalomyelitis." *J Immunol* 178(10): 6043-6050.
- Tang, X., I. Maricic, *et al.* (2006). "Regulation of immunity by a novel population of Qa-1-restricted CD8alpha alpha⁺TCRalpha beta⁺ T cells." *J Immunol* 177(11): 7645-7655.
- Terrazzano, G., M. Sica, *et al.* (2007). "Gliadin regulates the NK-dendritic cell cross-talk by HLA-E surface stabilization." *J Immunol* 179(1): 372-381.

- Thomas, R., H. Z. Low, *et al.* (2012). "NKG2C Deletion Is a Risk Factor of HIV Infection." *AIDS Res Hum Retroviruses*.
- Thomas, X., L. Campos, *et al.* (2005). "Expression of heat-shock proteins is associated with major adverse prognostic factors in acute myeloid leukemia." *Leuk Res* 29(9): 1049-1058.
- Tilburgs, T., B. J. van der Mast, *et al.* (2009). "Expression of NK cell receptors on decidual T cells in human pregnancy." *J Reprod Immunol* 80(1-2): 22-32.
- Tomasec, P., V. M. Braud, *et al.* (2000). "Surface expression of HLA-E, an inhibitor of natural killer cells, enhanced by human cytomegalovirus gpUL40." *Science* 287(5455): 1031.
- Tompkins, S. M., J. R. Kraft, *et al.* (1998). "Transporters associated with antigen processing (TAP)-independent presentation of soluble insulin to alpha/beta T cells by the class Ib gene product, Qa-1(b)." *J Exp Med* 188(5): 961-971.
- Toomey, J. A., M. Salcedo, *et al.* (1999). "Stochastic acquisition of Qa1 receptors during the development of fetal NK cells in vitro accounts in part but not in whole for the ability of these cells to distinguish between class I-sufficient and class I-deficient targets." *J Immunol* 163(6): 3176-3184.
- Torres, M. I., M. A. Lopez-Casado, *et al.* (2006). "New advances in coeliac disease: serum and intestinal expression of HLA-G." *Int Immunol* 18(5): 713-718.
- Tripathi, P. and S. Agrawal (2007). "The role of human leukocyte antigen E and G in HIV infection." *AIDS* 21(11): 1395-1404.
- Tripathi, P., S. Naik, *et al.* (2006). "HLA-E and immunobiology of pregnancy." *Tissue Antigens* 67(3): 207-213.
- Trundley, A. and A. Moffett (2004). "Human uterine leukocytes and pregnancy." *Tissue Antigens* 63(1): 1-12.
- Truong, M. J., V. Gruart, *et al.* (1992). "Cloning and expression of a cDNA encoding a non-classical MHC class I antigen (HLA-E) in eosinophils from hypereosinophilic patients." *J Immunol* 148(2): 627-632.
- Tsuchiya, N., M. Shiota, *et al.* (1996). "Elevated serum level of soluble HLA class I antigens in patients with systemic lupus erythematosus." *Arthritis Rheum* 39(5): 792-796.
- Tsuji, K., M. Kusama, *et al.* (1985). "Biological significance of Ss (serum soluble) HLA-class I antigens in bone marrow transplantation." *Tokai J Exp Clin Med* 10(2-3): 169-174.
- Ugurel, S., V. Rebmann, *et al.* (2001). "Soluble human leukocyte antigen--G serum level is elevated in melanoma patients and is further increased by interferon-alpha immunotherapy." *Cancer* 92(2): 369-376.
- Uhrberg, M., N. M. Valiante, *et al.* (2001). "The repertoire of killer cell Ig-like receptor and CD94:NKG2A receptors in T cells: clones sharing identical alpha beta TCR rearrangement express highly diverse killer cell Ig-like receptor patterns." *J Immunol* 166(6): 3923-3932.
- Ulbrecht, M., A. Couturier, *et al.* (1999). "Cell surface expression of HLA-E: interaction with human beta2-microglobulin and allelic differences." *Eur J Immunol* 29(2): 537-547.
- Ulbrecht, M., T. Honka, *et al.* (1992). "The HLA-E gene encodes two differentially regulated transcripts and a cell surface protein." *J Immunol* 149(9): 2945-2953.
- Ulbrecht, M., J. Kellermann, *et al.* (1992). "Impaired intracellular transport and cell surface expression of nonpolymorphic HLA-E: evidence for inefficient peptide binding." *J Exp Med* 176(4): 1083-1090.
- Ulbrecht, M., S. Maier, *et al.* (2004). "Truncated HLA-G isoforms are retained in the endoplasmic reticulum and insufficiently provide HLA-E ligands." *Hum Immunol* 65(3): 200-208.
- Ulbrecht, M., S. Martinozzi, *et al.* (2000). "Cutting edge: the human cytomegalovirus UL40 gene product contains a ligand for HLA-E and prevents NK cell-mediated lysis." *J Immunol* 164(10): 5019-5022.
- Ulbrecht, M., S. Modrow, *et al.* (1998). "Interaction of HLA-E with peptides and the peptide transporter in vitro: implications for its function in antigen presentation." *J Immunol* 160(9): 4375-4385.
- Uozaki, H., T. Ishida, *et al.* (2000). "Expression of heat shock proteins in osteosarcoma and its relationship to prognosis." *Pathol Res Pract* 196(10): 665-673.
- Urdahl, K. B., J. C. Sun, *et al.* (2002). "Positive selection of MHC class Ib-restricted CD8(+) T cells on hematopoietic cells." *Nat Immunol* 3(8): 772-779.

- Urosevic, M. and R. Dummer (2008). "Human leukocyte antigen-G and cancer immunoediting." *Cancer Res* 68(3): 627-630.
- Vales-Gomez, M., H. T. Reyburn, *et al.* (1999). "Kinetics and peptide dependency of the binding of the inhibitory NK receptor CD94/NKG2-A and the activating receptor CD94/NKG2-C to HLA-E." *EMBO J* 18(15): 4250-4260.
- Valiante, N. M., J. H. Phillips, *et al.* (1996). "Killer cell inhibitory receptor recognition of human leukocyte antigen (HLA) class I blocks formation of a pp36/PLC-gamma signaling complex in human natural killer (NK) cells." *J Exp Med* 184(6): 2243-2250.
- Valitutti, S., S. Muller, *et al.* (1996). "Different responses are elicited in cytotoxic T lymphocytes by different levels of T cell receptor occupancy." *J Exp Med* 183(4): 1917-1921.
- Van Beneden, K., A. De Creus, *et al.* (2002). "Expression of inhibitory receptors Ly49E and CD94/NKG2 on fetal thymic and adult epidermal TCR V gamma 3 lymphocytes." *J Immunol* 168(7): 3295-3302.
- Van Beneden, K., F. Stevenaert, *et al.* (2001). "Expression of Ly49E and CD94/NKG2 on fetal and adult NK cells." *J Immunol* 166(7): 4302-4311.
- van Hall, T., C. C. Oliveira, *et al.* (2010). "The other Janus face of Qa-1 and HLA-E: diverse peptide repertoires in times of stress." *Microbes Infect* 12(12-13): 910-918.
- van Hall, T., E. Z. Wolpert, *et al.* (2006). "Selective cytotoxic T-lymphocyte targeting of tumor immune escape variants." *Nat Med* 12(4): 417-424.
- van Rood, J. J., A. van Leeuwen, *et al.* (1970). "Anti HL-A2 inhibitor in normal human serum." *Nature* 226(5243): 366-367.
- van Stijn, A., A. T. Rowshani, *et al.* (2008). "Human cytomegalovirus infection induces a rapid and sustained change in the expression of NK cell receptors on CD8+ T cells." *J Immunol* 180(7): 4550-4560.
- Vance, R. E., A. M. Jamieson, *et al.* (2002). "Implications of CD94 deficiency and monoallelic NKG2A expression for natural killer cell development and repertoire formation." *Proc Natl Acad Sci U S A* 99(2): 868-873.
- Vance, R. E., A. M. Jamieson, *et al.* (1999). "Recognition of the class Ib molecule Qa-1(b) by putative activating receptors CD94/NKG2C and CD94/NKG2E on mouse natural killer cells." *J Exp Med* 190(12): 1801-1812.
- Vance, R. E., J. R. Kraft, *et al.* (1998). "Mouse CD94/NKG2A is a natural killer cell receptor for the nonclassical major histocompatibility complex (MHC) class I molecule Qa-1(b)." *J Exp Med* 188(10): 1841-1848.
- Vance, R. E., D. M. Tanamachi, *et al.* (1997). "Cloning of a mouse homolog of CD94 extends the family of C-type lectins on murine natural killer cells." *Eur J Immunol* 27(12): 3236-3241.
- Varthaman, A., M. Clement, *et al.* (2011). "Physiological induction of regulatory Qa-1-restricted CD8+ T cells triggered by endogenous CD4+ T cell responses." *PLoS One* 6(6): e21628.
- Veiga-Castelli, L. C., E. C. Castelli, *et al.* (2012). "A novel HLA-E allele, E*01:03:05, identified in two Brazilian individuals." *Tissue Antigens*.
- Veiga-Castelli, L. C., E. C. Castelli, *et al.* (2012). "Non-classical HLA-E gene variability in Brazilians: a nearly invariable locus surrounded by the most variable genes in the human genome." *Tissue Antigens* 79(1): 15-24.
- Verbruggen, L. A., V. Rebmann, *et al.* (2006). "Soluble HLA-G in rheumatoid arthritis." *Hum Immunol* 67(8): 561-567.
- Vetter, C. S., P. T. Straten, *et al.* (2000). "Expression of CD94/NKG2 subtypes on tumor-infiltrating lymphocytes in primary and metastatic melanoma." *J Invest Dermatol* 114(5): 941-947.
- Vidovic, D., M. Roglic, *et al.* (1989). "Qa-1 restricted recognition of foreign antigen by a gamma delta T-cell hybridoma." *Nature* 340(6235): 646-650.
- Villar, L. M., G. Roy, *et al.* (1989). "Detection of soluble class I molecules (non HLA-A or HLA-B) in serum, spleen membranes and lymphocytes in culture." *Eur J Immunol* 19(10): 1835-1839.
- Voss, S. D., J. Daley, *et al.* (1998). "Participation of the CD94 receptor complex in costimulation of human natural killer cells." *J Immunol* 160(4): 1618-1626.
- Wada, H., N. Matsumoto, *et al.* (2004). "The inhibitory NK cell receptor CD94/NKG2A and the activating receptor CD94/NKG2C bind the top of HLA-E through mostly shared but partly distinct sets of HLA-E residues." *Eur J Immunol* 34(1): 81-90.

- Walsh, C. E., E. J. Ryan, *et al.* (2011). "Differential expression of NK receptors CD94 and NKG2A by T cells in rheumatoid arthritis patients in remission compared to active disease." *PLoS One* 6(11): e27182.
- Wang, E. C., B. McSharry, *et al.* (2002). "UL40-mediated NK evasion during productive infection with human cytomegalovirus." *Proc Natl Acad Sci U S A* 99(11): 7570-7575.
- Wang, X., A. Ottosson, *et al.* (2009). "Proteasome inhibition induces apoptosis in primary human natural killer cells and suppresses NKp46-mediated cytotoxicity." *Haematologica* 94(4): 470-478.
- Wang, Y., H. Xu, *et al.* (2007). "High expression of NKG2A/CD94 and low expression of granzyme B are associated with reduced cord blood NK cell activity." *Cell Mol Immunol* 4(5): 377-382.
- Ware, R., H. Jiang, *et al.* (1995). "Human CD8+ T lymphocyte clones specific for T cell receptor V beta families expressed on autologous CD4+ T cells." *Immunity* 2(2): 177-184.
- Warren, H. S. (1999). "Using carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester to monitor human NK cell division: analysis of the effect of activating and inhibitory class I MHC receptors." *Immunol Cell Biol* 77(6): 544-551.
- Weber, J., M. Atkins, *et al.* (2011). "White paper on adoptive cell therapy for cancer with tumor-infiltrating lymphocytes: a report of the CTEP subcommittee on adoptive cell therapy." *Clin Cancer Res* 17(7): 1664-1673.
- Wei, X. H. and H. T. Orr (1990). "Differential expression of HLA-E, HLA-F, and HLA-G transcripts in human tissue." *Hum Immunol* 29(2): 131-142.
- Weiss, E. H., A. Cannich, *et al.* (1998). "Unique biochemical properties of human leukocyte antigen-E allow for a highly specific function in immune recognition." *Am J Reprod Immunol* 40(3): 177-182.
- Weiss, E. H., B. G. Lilienfeld, *et al.* (2009). "HLA-E/human beta2-microglobulin transgenic pigs: protection against xenogeneic human anti-pig natural killer cell cytotoxicity." *Transplantation* 87(1): 35-43.
- Weng, P. J., Y. M. Fu, *et al.* (2011). "Elevation of plasma soluble human leukocyte antigen-G in patients with chronic hepatitis C virus infection." *Hum Immunol* 72(5): 406-411.
- Westhoff, U., I. Doxiadis, *et al.* (1989). "Soluble HLA class I concentrations and GVHD after allogeneic marrow transplantation." *Transplantation* 48(5): 891-893.
- Wilhelm, B. T., J. R. Landry, *et al.* (2003). "Transcriptional control of murine CD94 gene: differential usage of dual promoters by lymphoid cell types." *J Immunol* 171(8): 4219-4226.
- Williams, N. S., A. Kubota, *et al.* (2000). "Clonal analysis of NK cell development from bone marrow progenitors in vitro: orderly acquisition of receptor gene expression." *Eur J Immunol* 30(7): 2074-2082.
- Wischhusen, J., M. A. Friese, *et al.* (2005). "HLA-E protects glioma cells from NKG2D-mediated immune responses in vitro: implications for immune escape in vivo." *J Neuroimmunol Exp Neurol* 64(6): 523-528.
- Wischhusen, J., A. Waschbisch, *et al.* (2007). "Immune-refractory cancers and their little helpers--an extended role for immunetolerogenic MHC molecules HLA-G and HLA-E?" *Semin Cancer Biol* 17(6): 459-468.
- Wlasiuk, P., A. Stec, *et al.* (2012). "Expression of soluble HLA-G in multiple myeloma patients and patients with renal failure." *Leuk Res* 36(7): 881-883.
- Wojtasiak, M., C. M. Jones, *et al.* (2004). "Persistent expression of CD94/NKG2 receptors by virus-specific CD8 T cells is initiated by TCR-mediated signals." *Int Immunol* 16(9): 1333-1341.
- Wolpert, F., P. Roth, *et al.* (2012). "HLA-E contributes to an immune-inhibitory phenotype of glioblastoma stem-like cells." *J Neuroimmunol*.
- Wooden, S. L., S. R. Kalb, *et al.* (2005). "Cutting edge: HLA-E binds a peptide derived from the ATP-binding cassette transporter multidrug resistance-associated protein 7 and inhibits NK cell-mediated lysis." *J Immunol* 175(3): 1383-1387.
- Wu, J. D., L. M. Higgins, *et al.* (2004). "Prevalent expression of the immunostimulatory MHC class I chain-related molecule is counteracted by shedding in prostate cancer." *J Clin Invest* 114(4): 560-568.
- Wu, Y., Z. Zheng, *et al.* (2009). "The specificity of T cell regulation that enables self-nonsel discrimination in the periphery." *Proc Natl Acad Sci U S A* 106(2): 534-539.

- Yan, W. H. (2011). "Human leukocyte antigen-G in cancer: are they clinically relevant?" *Cancer Lett* 311(2): 123-130.
- Yang, C. W., T. G. Kim, *et al.* (1995). "Serum soluble HLA class I antigen levels in hemodialysis patients and following renal transplantation." *Am J Nephrol* 15(4): 290-294.
- Yeager, M., S. Kumar, *et al.* (1997). "Sequence convergence in the peptide-binding region of primate and rodent MHC class Ib molecules." *Mol Biol Evol* 14(10): 1035-1041.
- Yewdell, J. W. and A. B. Hill (2002). "Viral interference with antigen presentation." *Nat Immunol* 3(11): 1019-1025.
- Yie, S. M., H. Balakier, *et al.* (2005). "Secretion of human leukocyte antigen-G by human embryos is associated with a higher in vitro fertilization pregnancy rate." *Fertil Steril* 83(1): 30-36.
- Yokoyama, W. M. and S. Kim (2006). "Licensing of natural killer cells by self-major histocompatibility complex class I." *Immunol Rev* 214: 143-154.
- Zarkhin, V., A. Talisetti, *et al.* (2010). "Expression of soluble HLA-G identifies favorable outcomes in liver transplant recipients." *Transplantation* 90(9): 1000-1005.
- Zavazava, N., H. Bottcher, *et al.* (1993). "Soluble MHC class I antigens (sHLA) and anti-HLA antibodies in heart and kidney allograft recipients." *Tissue Antigens* 42(1): 20-26.
- Zavazava, N. and M. Kronke (1996). "Soluble HLA class I molecules induce apoptosis in alloreactive cytotoxic T lymphocytes." *Nat Med* 2(9): 1005-1010.
- Zavazava, N., G. Leimenstoll, *et al.* (1990). "Measurement of soluble MHC class I molecules in renal graft patients: a noninvasive allograft monitor." *J Clin Lab Anal* 4(6): 426-429.
- Zavazava, N., B. Wobst, *et al.* (1994). "Soluble MHC class I molecules in human body fluids." *J Clin Lab Anal* 8(6): 432-436.
- Zhang, J., L. Pan, *et al.* (2012). "Non-classical MHC-Iota genes in chronic hepatitis B and hepatocellular carcinoma." *Immunogenetics* 64(3): 251-258.
- Zhang, J., A. K. Somani, *et al.* (2000). "Roles of the SHP-1 tyrosine phosphatase in the negative regulation of cell signalling." *Semin Immunol* 12(4): 361-378.
- Zhang, W., J. Sloan-Lancaster, *et al.* (1998). "LAT: the ZAP-70 tyrosine kinase substrate that links T cell receptor to cellular activation." *Cell* 92(1): 83-92.
- Zhao, L., L. Fan, *et al.* (2001). "[Analysis on HLA-E polymorphism in Shanghai Han population]." *Zhonghua Yi Xue Yi Chuan Xue Za Zhi* 18(6): 444-447.
- Zhao, X. Y., X. J. Huang, *et al.* (2007). "Reconstitution of natural killer cell receptor repertoires after unmanipulated HLA-mismatched/haploidentical blood and marrow transplantation: analyses of CD94:NKG2A and killer immunoglobulin-like receptor expression and their associations with clinical outcome." *Biol Blood Marrow Transplant* 13(6): 734-744.
- Zhen, Z. J., J. P. Fang, *et al.* (2004). "[Analysis on HLA-E polymorphism in Guangdong Han population]." *Zhongguo Shi Yan Xue Ye Xue Za Zhi* 12(6): 783-787.
- Zhong, M., X. Weng, *et al.* (2009). "Dimerization of soluble HLA-G by IgG-Fc fragment augments ILT2-mediated inhibition of T-cell alloresponse." *Transplantation* 87(1): 8-15.
- Zhu, C. B., C. X. Wang, *et al.* (2011). "Serum sHLA-G levels: a useful indicator in distinguishing colorectal cancer from benign colorectal diseases." *Int J Cancer* 128(3): 617-622.

Annexes

Annexe 1

Clinical Cancer Research (2011)

« Unique functional status of natural killer cells in metastatic stage IV melanoma patients and its modulation by chemotherapy »

Fregni G, Perier A, Pittari G, Jacobelli S, Sastre X, Gervois N, Allard M, Bercovici N, Avril MF, Caignard A.

Unique Functional Status of Natural Killer Cells in Metastatic Stage IV Melanoma Patients and Its Modulation by Chemotherapy

Giulia Fregni¹, Aurélie Perier¹, Gianfranco Pittari⁵, Simon Jacobelli², Xavier Sastre³, Nadine Gervois⁴, Mathilde Allard⁴, Nadège Bercovici¹, Marie Françoise Avril^{1,2}, and Anne Caignard¹

Abstract

Purpose: Immunotherapy is an alternative for metastatic melanoma patients resistant to chemotherapy. Natural killer (NK) cells are powerful antileukemia effectors and their role in solid tumors is suspected. NK cell activation is regulated by a balance between activating receptors, which detect stress molecules on tumor cells, and HLA-I specific inhibitory receptors. Here, we studied the phenotype and function of NK cells in stage IV metastatic melanoma patients.

Experimental Design: Circulating NK cells from 35 healthy donors and 51 patients were studied: 24 patients before chemotherapy (prechemotherapy), 17 patients 1 month after 1 to 4 lines of chemotherapy (postchemotherapy), and 10 patients analyzed pre- and postchemotherapy. NK functionality was carried out toward 2 primary metastatic melanoma cell lines, analyzed for the expression of NK receptor ligands.

Results: NK cells from prechemotherapy patients exhibit an NKp46^{dim}/NKG2A^{dim} phenotype. In contrast, NK cells from postchemotherapy patients display high expression of NKp46 and NKG2A receptors. Purified NK cells from patients are efficiently activated in response to melanoma cells. Melanoma cells express different level of NKG2D ligands and HLA-I molecules. In agreements with their phenotype, NK cells from pre- and postchemotherapy patients present distinct functional status toward these primary melanoma cells. A dynamic label free assay was used to determine the pathways involved in the lysis of melanoma cells by IL-2-activated NK cells. NKG2D, NCR (natural cytotoxicity receptor), and DNAM-1 are involved in the NK-mediated lysis of melanoma cells.

Conclusions: These results provide new arguments and clues to design NK cell-based immunotherapeutic strategies for melanoma patients. *Clin Cancer Res*; 17(9); 2628–37. ©2011 AACR.

Introduction

Melanomas are highly metastatic tumors for which the treatment is still unsatisfactory. The main way of dissemination is the lymph and the invasion of sentinel lymph node is correlated to prognosis. Metastatic melanomas are resistant to chemotherapy and radiotherapy, but immunotherapy remains an alternative for metastatic patients. However, most of the immunotherapeutic trials, aimed at boosting cytotoxic T cells specific for the melanoma antigens, led to overall limited benefit in terms of survival in

several randomized phase III studies (1–3) as these effectors are frequently anergic *in situ* (4, 5).

Besides antigen-specific T cells, natural killer (NK) cells are potent cytolytic effectors that play a role in the innate and adaptive antitumor immune responses. As they can be efficiently expanded *in vitro*, NK cells can be used in autologous and allogeneic settings and constitute interesting reagents for adoptive cellular therapy. First identified as a distinct subpopulation of lymphocytes endowed with the capacity to kill tumor cells without prior sensitization, NK cells are now considered as highly sophisticated detectives of harmful changes in cellular self- and pivotal catalyzers of adaptive T-cell responses. For instance, NK cells are considered as the major source of IFN- γ *in vivo* and NK-derived IFN- γ is crucial in priming T helper 1 responses (6, 7).

Human NK cells are CD3⁻CD56⁺ lymphocytes that represent 5% to 20% of circulating lymphocytes. Two major NK cell subpopulations according to the expression level of the adhesion molecule CD56 (neural cell adhesion molecule) and the expression of CD16 (Fc γ R) are defined: CD56^{dim}CD16⁺ and CD56^{bright}CD16⁻ subsets. The CD56^{dim} population predominates in blood (90% of NK cells) and at site of inflammation, exhibits a high cytotoxic potential, and broadly expresses MHC-I specific inhibitory receptors. In contrast, CD56^{bright} subset

Authors' Affiliations: ¹Institut Cochin, INSERM U1016, CNRS UMR 8104, Université Paris Descartes; ²APHP, Department of Dermatology, Hôpital Cochin; ³Department of Tumor pathology, Institut Curie, Paris; ⁴Institut de Recherche Thérapeutique de l'Université de Nantes (IRT) – UMR 892 INSERM/Université Nantes, Nantes, France; and ⁵Department of Immunology, Memorial Sloan-Kettering Cancer Center, New York, New York

Note: Supplementary data for this article are available at Clinical Cancer Research Online (<http://clincancerres.aacrjournals.org/>).

Corresponding Author: Anne Caignard, INSERM U1016, Institut Cochin, Department of Immunohematology, 27 rue du Faubourg Saint-Jacques, 75014 Paris, France. Phone: 33-(0)-140516527, Fax: 33-(0)-140516535. E-mail: anne.caignard@inserm.fr

doi: 10.1158/1078-0432.CCR-10-2084

©2011 American Association for Cancer Research.

Translational Relevance

Immunotherapy is a valuable alternative for metastatic melanoma patients resistant to chemotherapy. Natural killer (NK) cells are efficient antitumor cytotoxic effectors. We show that circulating NK cells from stage IV melanoma patients display unique phenotype and functionality toward melanoma cells. In patients treated with chemotherapy, we observe modifications of the NK phenotype and functions. We identify the receptors involved in the activation of NK cells by melanoma cells. Our data outline that NK cells are involved in the immune response toward melanoma and bring new experimental arguments for their use in immunotherapy strategies for melanoma patients.

predominates in lymph nodes (95% of NK cells), produces cytokines on activation, displays a low cytotoxic potential, and is considered to be a precursor stage of terminally CD56^{dim} NK cells (8, 9).

NK activation depends on an intricate balance between activating and inhibitory signals that determines whether the target will be susceptible to NK-mediated lysis (10, 11). Three main natural cytotoxicity receptors (NCR) involved in NK cell activation were identified: NKp46 and NKp30, expressed by resting NK cells, and NKp44, induced after stimulation by cytokines. A specific ligand for NKp30, B7H6 was recently identified (12). However, the NCR ligands on tumor cells are not yet well defined and there is no specific mAbs to measure their expression. Recombinant NCR-Fc molecules are available for the detection of NCR ligands, although binding has low affinity. In addition, the use of blocking anti-NCR mAbs in functional assays confirms the implication of NCR in the lysis of various tumor cells (13). Activation of NK cells is triggered by additional receptors. NKG2D, expressed by a majority of peripheral NK cells, binds MHC-related antigens (MIC)-A/B molecules, and UL16-binding proteins (ULBP1-4), induced on membrane of stressed cells. DNAX accessory molecule 1 (DNAM-1), an adhesion molecule belonging to the immunoglobulin superfamily, promotes many of these functions *in vitro*. NK cells require DNAM-1 for the elimination of tumor cells that are comparatively resistant to NK cell-mediated cytotoxicity caused by the paucity of other NK cell-activating ligands (14). Simultaneous engagement of NKp46 and DNAM-1 induces the cytotoxicity and cytokine secretion by resting NK cells (15).

NK cell activation is controlled by inhibitory NK HLA-I specific NK receptors: KIR (killer Ig type receptor), present on NK CD56^{dim} subset and the ubiquitous C lectin-type CD94/NKG2A receptor that binds to HLA-E molecules (16). KIR receptors, CD158a and b, recognize HLA-Cw4 (C2 type) and HLA-Cw3 (C1 type) molecules respectively (17, 18).

Reports in the literature indicate that melanoma cells express different molecules that trigger NK cells (19). The

frequent alterations of HLA-I molecule expression by melanoma cells may also contribute to NK cell activation.

Moreover, activation of endogenous NK cells with interleukin (IL)-2 and adoptive transfer of *in vitro* activated autologous NK cells mediate antitumor activity in experimental and clinical settings (20). NK cells can cure human melanoma lung metastases in nude mice treated with chronic indomethacin therapy combined with multiple rounds of IL-2 (21). There is an inverse relationship between NK cell activity and magnitude of lymphocyte infiltration as well as partial regression of the primary tumor in melanoma patients in some cases (22), suggesting that NK cell activity may be an additional prognostic factor in melanoma patients.

A prerequisite for the intelligent implementation of NK cells in antitumor regimen is a thorough molecular understanding of how NK cells recognize malignant cells and how tumors manage to subvert NK cell-mediated recognition and elimination. Here we investigated the phenotype and function of peripheral NK cells in a series of metastatic melanoma patients that had or not received prior chemotherapy. We also characterized 2 melanoma cell lines derived from 2 different lymph node metastases for their susceptibility to activated NK-mediated recognition and lysis.

Material and Methods

Collection of samples, peripheral blood mononuclear cell isolation, and NK cell immunoselection

Blood samples (20–25 mL in EDTA collection tubes) from metastatic stage IV melanoma patients were obtained before or after chemotherapy, after written informed consent. Blood samples from healthy donors (HD) were analyzed as controls. For phenotype analysis (HD, $n = 22$; prechemotherapy patients, $n = 18$; postchemotherapy patients, $n = 17$), peripheral blood mononuclear cells (PBMC) were isolated by Ficoll-Paque PLUS (GE Healthcare Bio-Sciences AB) density gradient centrifugation. For function analysis, a 1-step immunoselection kit was used to enrich NK cells (purity of $70 \pm 10\%$ of CD56⁺ cells) from patient (prechemotherapy, $n = 13$; postchemotherapy, $n = 13$) and healthy donor ($n = 11$) peripheral blood samples (RosetteSep; Stem Cell Technologies). For xCELLigence assay, donor NK cells were purified by negative immunoselection using the NK selection kit (Miltenyi Biotec). Purified NK cells ($0.5\text{--}1 \times 10^6/\text{mL}$) were cultured in RPMI 1640 medium (GIBCO Invitrogen) supplemented with IL-2 (10 ng/mL; R&D System) and 10% human serum AB (Biowest) for 6 to 12 days. Primary melanoma cell lines were derived by enzymatic dissociation of regional metastatic lymph nodes from 2 stage III melanoma patients and maintained in DMEM medium supplemented with 10% FCS (GIBCO Invitrogen). K562 cells ($0.3\text{--}1 \times 10^6/\text{mL}$) were maintained in RPMI 1640 supplemented with 10% FCS.

Sera were collected from 5 mL of blood in 24 patients (prechemotherapy, $n = 14$; postchemotherapy, $n = 10$)

and 20 healthy donors. Tumor cell supernatants were collected from 10^6 cells cultured for 48 hours in 6-well plates in serum free medium.

Flow cytometry analyses

Peripheral NK cells were characterized *ex vivo* by multi-color flow cytometry analyses using CD3-PerCP/CD56-APC mAbs combinations (BD Pharmingen). NK cells (gated on CD3⁻CD56⁺ in lymphocyte FSC/SSC subset) were labeled with PE conjugated mAbs: NKp46, NKp30, NKp44, NKG2D (BD Pharmingen), CD16, CD158a, CD158b, NKG2A (Beckman Coulter). DNAM-1 was analyzed by a 2-step staining with primary anti-DNAM-1 mAb (R&D System) and secondary goat anti-mouse IgG-FITC (Beckman Coulter). The percentages of positive cells and the expression levels (ratio between the specific and control isotype staining; MFI ratio) were determined on more than 3,000 NK-gated events.

Melanoma cells were labeled with HLA-ABC-FITC (Beckman Coulter), CD112-PE (BD Pharmingen), and CD155-PE (R&D System). Indirect staining was carried out with anti-MICA, -MICB, -ULBP1, -ULBP2, -ULBP3 (R&D System), -HLA-E (MEM/E-08), -HLA-G (87G; Exbio) mAbs followed by incubation with a secondary goat anti-mouse IgG-FITC (Beckman Coulter). NKp30-Fc, NKp46-Fc, (R&D System) chimeric proteins were used and the anti-human IgG Fc-specific-FITC antibody (Jackson Immuno Research) as secondary reagent. Cells were collected with Cellquest software on a FACSCalibur flow cytometer (BD Pharmingen) and analyzed with FlowJo software. Electronic compensation was set up with single positive staining, to correct for fluorochrome spectral overlap.

CD107a degranulation and IFN- γ secretion assays

In brief, 4×10^4 enriched resting or IL-2-activated (10 ng/mL for 5 days) NK cells were cultured at 1:1 effector/target ratio for 5 hours at 37°C with K562, MelC or MelS cells in V-bottom plates. Cells were then labeled for 25 minutes at 4°C with 2 μ L of CD56-PE (Beckman Coulter), CD3-PerCP, and CD107a-FITC (BD Pharmingen), fixed with 2% paraformaldehyde in PBS and collected on a FACSCalibur flow cytometer. Results are expressed as the percentage of CD107a positive NK-gated cells. After the coculture, supernatants were collected to measure the IFN- γ secretion using DuoSet ELISA kit (R&D Systems). Baseline NK cell degranulation and IFN- γ secretion were determined in absence of targets.

Detection of soluble molecules and cytokines

Serum samples and melanoma cell supernatants were tested for the presence of MICA, HLA-E, and HLA-G soluble molecules by ELISA tests. Seric concentrations of IL-1b, IL-6, TNF- α , IL-8, IL-10, and IL-12 cytokines were measured by CBA Human inflammation kit (BD Pharmingen).

xCELLigence assays

The xCELLigence System (Roche) monitors cellular events in real-time without the incorporation of labels.

The system measures electrical impedance across interdigitated microelectrodes integrated on the bottom of tissue culture E-Plates. The impedance measurement provides quantitative information about the status of the adherent cells, including cell number, viability, and morphology. For cell-mediated lysis assay, adherent targets (10,000) were seeded into the wells of 96X E-Plates in 100 μ L of media. Cell adhesion and growth were monitored for 4 hours. IL-2-activated NK cells were added at different concentrations in a volume of 50 μ L/well. Cocultures were assessed by the system with a measure every 5 minutes for up to 20 hours. In some experiments, cocultures were carried out at 2:1 E/T ratio and in presence of 10 μ g/mL of mAbs: NKG2D, NKp30, NKp46, DNAM-1, and NKG2A or isotype controls (R&D Systems). NK cells were incubated with mAbs 20 minutes before the coculture. Results are expressed as percentages of quadruplicate of lysis determined from Cellular Index (CI) normalized with RTCA Software (nCI): % of lysis = $[\text{nCI (no effector)} - \text{nCI (effector)}] / \text{nCI (no effector)} \times 100$. Modulations of lysis by blocking mAbs are calculated as: (% of lysis in blocking mAbs condition) $\times 100 /$ (% of lysis in isotype control mAb condition) - 100.

Statistics

Statistical tests and graphics were generated by Prism version 5 (GraphPad Software Inc.). Nonparametric Mann-Whitney (M-W) test was used to compare medians of absolute numbers of NK and CD3⁺ cells between unpaired pre- and postchemotherapy patients (*, $P \leq 0.05$; **, $P < 0.01$). The nonparametric Kruskal-Wallis (K-W) test was used to compare the medians of percentages of lymphocyte subsets and antigen expression levels on NK cells in the 3 groups (HD and prechemotherapy/postchemotherapy patients). Equal variances between groups were compared using Bartlett's test. Degranulation percentages and cytokine concentrations were determined in the 3 coculture conditions (toward MelC, MelS, or K562 cell lines) for each individual group (HD and prechemotherapy/postchemotherapy patients) with the nonparametric repeated-measures Friedman (Fr) test. For K-W and Fr tests the differences between any pair of the 3 groups were assessed by Dunn's multiple comparison test and, in accord with their degree/level of significance, indicated in the graphs as *, **, and ***, respectively.

Results

Altered distribution of peripheral NK and T cells in melanoma patients treated or not with chemotherapy

Here, we conducted extensive studies to compare the circulating lymphocyte cell subsets (NK and T cells) between healthy donors and metastatic stage IV melanoma patients treated or not with chemotherapy. The characteristics of the patients (detailed in Supplementary Tables S1 and S2) are summarized in Table 1. Ten patients detailed in Supplementary Table S3 were studied pre- and postchemotherapy. Lymphocyte absolute numbers (AN) were

Table 1. Summary of patient characteristics

		Prechemo median (min–max)	Postchemo median (min–max)
Gender	M	24	20
	F	10	7
Age, y		62 (22–84)	65 (34–90)
Lymphocyte count, μL		1,620 (740–4,640)	995 (340–2,538)
Delay PM [†] – stage IV, mo		14 (0–84)	24 (0–444)
LDH		375 (134–3,525)	433 (115–5,000)
Chemotherapy treatment (number of chemotherapy line at moment of sample*)	0	34	
	1		11
	2		9
	3		6
	4		1
Stage IV (TNM classification [‡])	M1a	4	4
	M1b	6	5
	M1c	24	18

[†]PM = Primary melanoma. *Chemotherapy treatments: 1, Dacarbazine; in case of brain metastases, Fotemustine, 2nd line: Fotemustine, 3rd line: Cisplatin and 4th line: Vincristine and CCNU or Cyclophosphamide. [‡]TNM Classification of Malignant Tumors.

reduced in postchemotherapy patients compared to prechemotherapy patients (M–W test, $P < 0.0001$, Table 1) and to a previously studied series of healthy donors where the median value of lymphocytes was of 2,150 counts/ mm^3 (range = 1,100–3,400; ref. 23).

Percentages of CD3⁺ T cells were reduced in the 2 groups of patients compared to healthy donors (K–W test, $P = 0.0006$, Fig. 1A). The percentages and AN of CD3⁺ T cells were comparable between pre- and postchemotherapy patients. The activated CD3⁺/CD56⁺ T cell subset was higher in prechemotherapy than in postchemotherapy patients and healthy donors (median values of 9% vs. 3% and 5% respectively; K–W test, $P = 0.0076$, data not shown).

In contrast to CD3⁺ T cells, the proportion of NK cells in lymphocyte population was larger in prechemotherapy patients compared to healthy donors (increased variance, Bartlett's test, $P = 0.0002$). Postchemotherapy patients displayed reduced percentage and AN of NK cells compared to prechemotherapy patients (M–W test, $P = 0.0035$, Fig. 1B). Regarding the CD56^{dim} and CD56^{bright} subsets, there is an increased proportion of CD56^{dim} NK subset in prechemotherapy patients compared to healthy donors and postchemotherapy patients (K–W test, $P < 0.0001$, Fig. 1C). Thus, the reduced AN of NK cell in postchemotherapy patients is likely the consequence of the decreased numbers of CD56^{dim} NK cells compared to prechemotherapy patients (M–W test, $P = 0.0028$) as both groups display similar AN of CD56^{bright} cells (data not shown). In autologous setting, there was a decreased percentage of NK cells and CD56^{dim} subset after treatment,

while the changes of CD3⁺ T cells (%) appeared not related to treatment (Fig. 1, right columns).

Prechemotherapy patient NK cells display a unique NKp46^{dim}/NKG2A^{dim} phenotype

NK cells were characterized *ex vivo* for the expression of activating receptors. The percentages of NKp46⁺ NK cells were lower in prechemotherapy patients compared to healthy donors (K–W test, $P = 0.0153$), and the MFI ratio reduced compared to postchemotherapy patients and healthy donors (K–W test, $P = 0.0043$; Fig. 2A). There was a trend for lower percentage of NKp30⁺ NK cells in prechemotherapy patients but the difference with the 2 other groups was not statistically significant (Supplementary Fig. S1). In the 3 groups, NKp44 was faintly expressed *ex vivo* by NK cells (data not shown). NKG2D, CD16, and DNAM-1 were expressed by 80% to 100% of NK cells from healthy donors and patients (Supplementary Fig. S1). Interestingly, we showed that NK cells from prechemotherapy patients displayed low percentage of NKG2A compared to healthy donors (Bartlett's test, $P = 0.0252$, Fig. 2B). In contrast, the postchemotherapy patient NK cells exhibited high percentage (K–W test, $P = 0.0070$) and MFI values of NKG2A (K–W test, $P < 0.0001$) that were increased compared to prechemotherapy patients and healthy donors (Fig. 2B). There was a high positive correlation between the expression levels (MFI ratio) of NKp46 and NKG2A in patients (Fig. 2C). Moreover, the expression levels of NKp46 receptor were negatively correlated to the lymphocyte counts that are reduced posttreatment (data not shown). The percentages of CD158a⁺ NK cells were

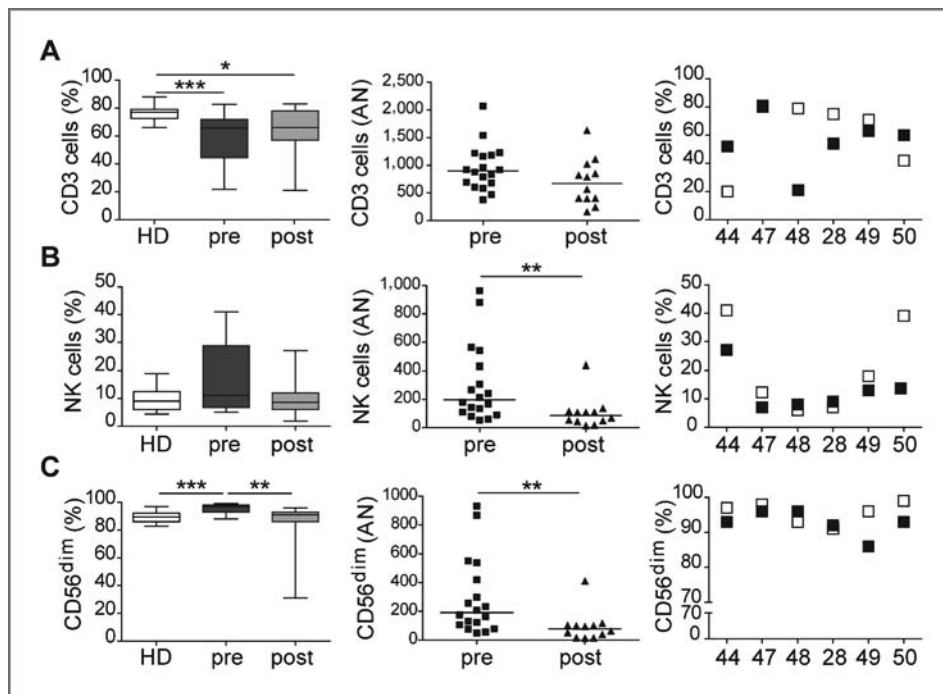


Figure 1. Peripheral blood CD3⁺ T cells (A) and CD3⁻ CD56⁺ NK cells (B) in healthy donors (HD) and in melanoma patients studied before (prechemotherapy, squares) or after (postchemotherapy, triangles). The CD56^{dim} subset, gated on NK cell population, is depicted in panel C. Cell percentages are represented by "box and whisker (min to max; horizontal lines represent median values)" graphs and AN in scattered dot plots. Horizontal dashes represent median values. Right panels depict paired prechemotherapy (white squares) and postchemotherapy (black squares) analyses from 6 patients (identified by ID number).

reduced in postchemotherapy patients (K-W test, $P = 0.0081$, Supplementary Fig. S1) compared to prechemotherapy and healthy donors, while CD158b expression was similar in the 3 groups (Supplementary Fig. S1). In autologous setting, chemotherapy affected the expression level of NKP46, the percentage and expression levels of NKG2A, and the percentage of CD158a, thus strengthening our conclusions from unpaired patients (Fig. 3).

We show that NK cells from nontreated metastatic stage IV melanoma patients display a unique NKp46^{dim}/NKG2A^{dim} phenotype, while a NKp46^{high}/NKG2A^{high}/CD158a^{low} phenotype, compatible with a less mature phenotype of NK cells in these patients, characterized NK cells from postchemotherapy patients.

Prechemotherapy patient NK cells display a unique functional pattern

NK cells were immunoselected from PBMC from 26 melanoma patients (13 prechemotherapy and 13 postchemotherapy) and 11 healthy donors. Enriched NK cells were stimulated by primary melanoma cell lines (MelC, MelS), derived from metastatic lymph nodes and the classic NK target, K562 cell line (HLA-I negative). The percentages of degranulating NK cells were assessed by flow cytometry, and IFN- γ secretion measured by ELISA (Fig. 4A). Resting NK cells from healthy donors, pre- and postchemotherapy patients displayed distinct functional status.

Healthy donor NK cells degranulated with a similar efficiency in response to the 3 targets (Fig. 4A). Prechemotherapy patient NK cells were endowed with a high lytic potential toward MelC cells and degranulated with lower

efficiency in response to MelS and K562 (Fr test, $P = 0.0023$, Fig. 4A). Postchemotherapy patient NK cells also efficiently degranulated toward MelC and less toward MelS (Fr test, $P = 0.0036$). The degranulation level in response to K562 was comparable in the 3 series analyzed (mean 20%–25%). Thus, resting NK cells from melanoma patients efficiently degranulated in response to melanoma cells. MelC actively triggered degranulation of NK cells from prechemotherapy patients: this response was mediated by the prominent CD56^{dim} NK cell subset (Supplementary Fig. S2). IL-2-activated NK cells exhibited higher percentage of degranulation. IL-2-activated NK cells from healthy donors and patients displayed comparable functionality: the percentages of degranulation in response to K562 and MelC were similar, lower toward MelS. However, higher basal degranulation of NK cells without targets accounted for this increase, particularly in donor NK cells (data not shown).

The IFN- γ secretion patterns by resting NK cells from the 3 groups toward melanoma and K562 cell lines were distinct (Fig. 4A). Donor NK cells secreted IFN- γ in response to MelC (mean of 44 pg/mL) and K562 cells (42 pg/mL). MelS did not induce secretion superior to background kit level (10 pg/mL; Fr test, $P = 0.0377$). The prechemotherapy patient NK cells secreted IFN- γ in response to MelC (48 pg/mL), while responses to MelS and K562 were not significant (3 and 12 pg/mL respectively; Fr test, $P = 0.0023$). Postchemotherapy patient NK cells secreted low IFN- γ amounts toward MelC (28 pg/mL) and K562 (19 pg/mL); MelS did not induce IFN- γ secretion (3 pg/mL; Fr Test, $P = 0.0231$). IL-2-activated NK cells from healthy donors, pre- and

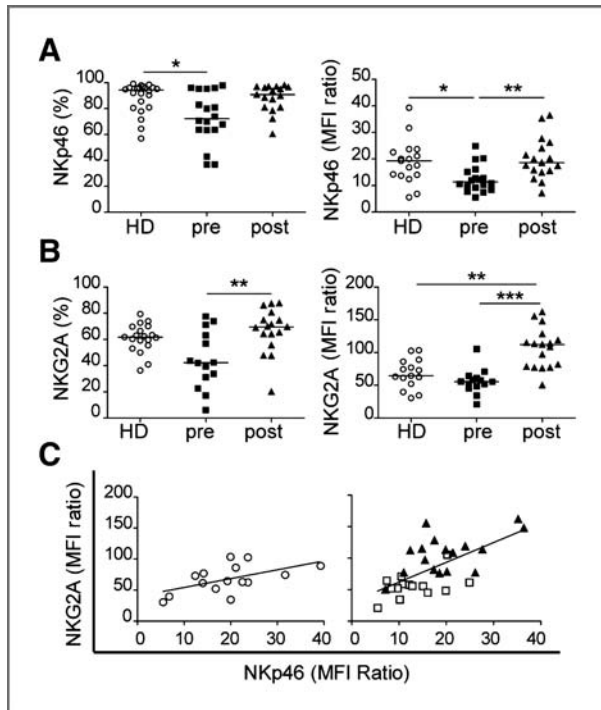


Figure 2. *Ex vivo* expression of NKp46 (A) and NKG2A (B) receptors by NK cells from healthy donors (HD, white circles), and melanoma patients prechemotherapy (squares) and postchemotherapy (triangles). Results are expressed as percentages and MFI ratio determined as described in the Materials and Methods section. Horizontal dashes represent median values. The correlation between expression levels of NKp46 and NKG2A is shown by linear regression lines in HD (white circles) and in prechemotherapy (gray squares) and postchemotherapy (black triangles) melanoma patients (C).

postchemotherapy patients secreted high levels of IFN- γ in response to K562 (359, 163, and 113 pg/mL, respectively) while no secretion in response to MelC or MelS cells was induced (data not shown).

In autologous settings, degranulation and IFN- γ secretion by NK cells toward melanoma cells were decreased after chemotherapy (Fig. 4B).

Soluble seric molecules in melanoma patients

Seric soluble MICA molecules (sMICA) measured by Elisa (detection threshold 0.1 ng/mL; ref. 24) were detected in 6/20 healthy donors (0.2–32 pg/mL) and in 5/24 melanoma patients (0.5–24 ng/mL). There was no detectable (<5 ng/mL) soluble HLA-G molecules in the sera of healthy donors and patients. Soluble HLA-E molecules (>20 pg/mL) measured by ELISA (25) were detected in 5/20 healthy donors (22–81 pg/mL) and 6/24 patients (24–378 pg/mL). Low concentrations of inflammatory cytokines (IL-1b, IL-6, TNF- α , IL-8, IL-10, and IL-12) were detected in the sera from patients and healthy donors (data not shown). Thus, melanoma patients did not exhibit increased inflammatory seric cytokines and some patients may display soluble HLA-E molecules.

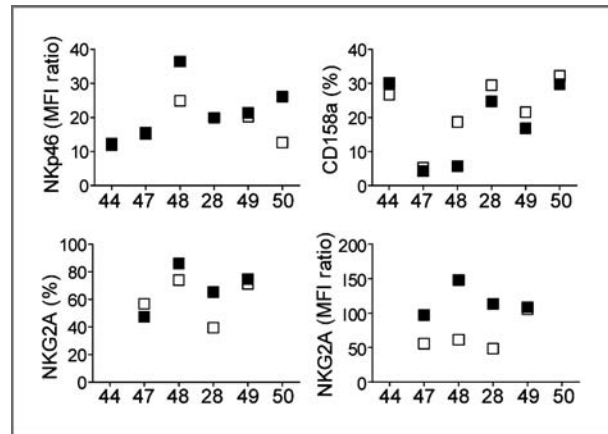


Figure 3. Phenotypic analyses in paired prechemotherapy (white squares)/postchemotherapy (black squares) melanoma patients (ID number as in Supplementary Table S3). The expression of NKp46 (MFI ratio), CD158a (%), and NKG2A (%), MFI ratio) is shown for each patient studied.

Receptors involved in the NK-mediated lysis of melanoma cells

The expression of the ligands for NK receptors was analyzed in melanoma cells (Fig. 5A). MelC cells expressed MICA and MICB molecules as well as ULBP2 and 3 but not ULBP1 (data not shown). MelS cells only expressed low levels of MICA, MICB, and ULBP3. MelC and MelS cells did not secrete sMICA (data not shown). Regarding the ligands of DNAM-1, CD112 was expressed by MelC not by MelS; a weak expression of CD155 was present on the 2 cell lines. No NKp30-Fc and NKp46-Fc binding was detected on MelC or MelS cells: transcripts for B7H6 (1 NKp30 ligand) were detected in MelS cells (data not shown). K562 expresses NCR and NKG2D ligands and displays low HLA-I expression (26). MelC and MelS cells expressed classical HLA-I (HLA-A/B/C) molecules, with a higher MFI on MelC than on MelS. MelC cells faintly expressed membrane HLA-E and secreted low concentrations of soluble HLA-E molecules (25 pg/mL). MelC and MelS did not express HLA-G molecules (not shown) nor secrete soluble HLA-G molecules.

The NK-mediated lysis of melanoma cells was assessed by xCELLigence, a label-free, real-time monitoring assay of adherent cell lysis by measure of impedance, with a high sensitivity comparable to Cr⁵¹ release (27). Figure 5B shows the dynamic lysis (expressed as percentages) of MelC and MelS efficiently lysed by IL-2-activated NK cells at low E/T ratio.

To determine the receptors involved in melanoma lysis, NK cells were incubated for 20 minutes with single or combined anti-NK receptor mAbs. Treated NK cells were added to adherent targets into the plates and the lysis was monitored. The results of the blocking experiments are expressed as percentages of modulation of the lysis after 5 hours and are summarized in Figure 5C. Anti-NKG2D decreased the lysis of MelC and MelS cells (40%). Anti-NKp30 decreased the lysis of MelS in agreements with the high transcript level of the B7H6 ligand in these cells.

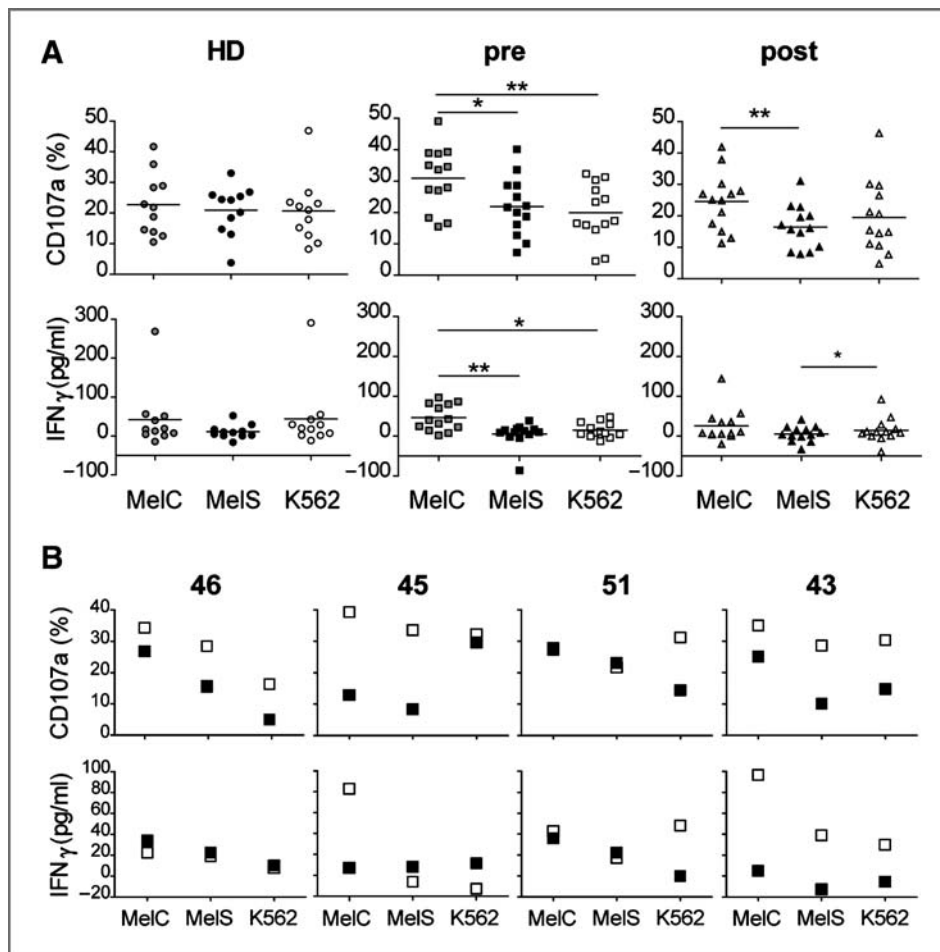


Figure 4. *Ex vivo* functional capacities of immunoselected NK cells from healthy donors (HD, circles), prechemotherapy (squares), and postchemotherapy (triangles) melanoma patients. A, percentages of CD107a⁺ degranulating NK cells and target-induced IFN- γ secretion toward MelC (gray painted), MelS (black), and K562 (white) targets. B, paired prechemotherapy/postchemotherapy functional analyses of NK cells in 4 patients: % of CD107a and IFN- γ secretion.

Anti-NKp46 decreased the lysis of MelC. Single blockage by anti-DNAM-1 exerted a modest effect in both cell lines. However, simultaneous blockage of NKG2D with DNAM-1 or NKp30 and NKp46 efficiently inhibited the lysis of MelC. Blockage of NKp30 with NKG2D or with DNAM-1 and NKp46 abrogated the lysis of MelS. The effects of activating receptors and inhibitory NKG2A mAbs used separately on the dynamic measure of melanoma cell lysis are depicted in Supplementary Figure S3: NKG2A induced a modest increase of melanoma cell lysis by IL-2-activated NK cells.

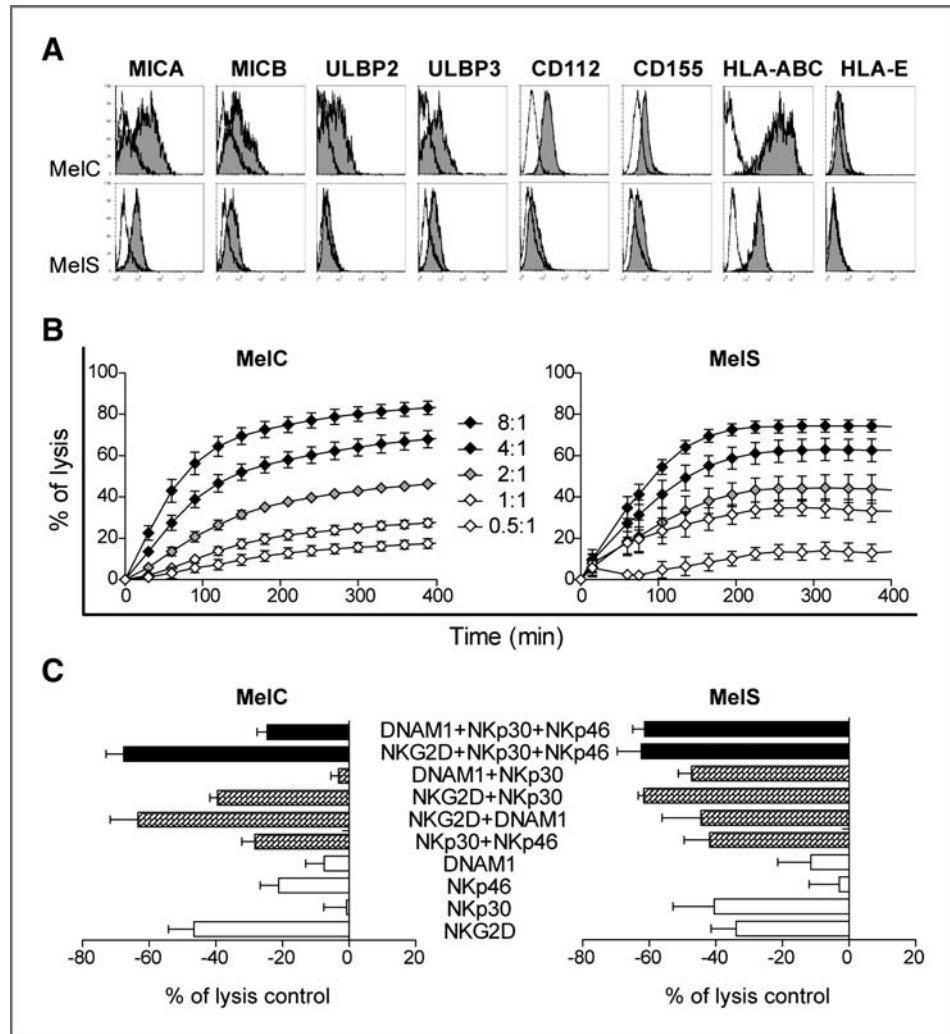
Discussion

In the present studies, we provide several original findings on the phenotypic and functional status of circulating resting NK cells in metastatic stage IV melanoma patients. First, we show that, before treatment, NK cells from these patients exhibit a unique NKp46^{dim}NKG2A^{dim} phenotype. Following treatment with chemotherapy, there is a high expression of NKp46 and NKG2A by melanoma patient NK cells. Thus, the balance between the activating (NKp46, NKp30, NKG2D) and the inhibitory NKG2A receptors on

NK cells and the expression level of NK ligands by melanoma cells likely explain the distinct *ex vivo* functional patterns of pre- and postchemotherapy patient NK cells toward melanoma cells. In addition, the functional assays with blocking antireceptors mAbs corroborate the *ex vivo* data on the hierarchy of activating receptors. Compared to healthy donors, NK cells from prechemotherapy melanoma patients are efficiently activated by MelC that likely trigger NKG2D with concomitant weak engagement of inhibitory NKG2A. The reduced degranulation toward MelC and MelS by postchemotherapy NK cells is likely due to the higher NKG2A/HLA-I interactions.

Several recent studies have reported various alterations in NK cells from melanoma patients. Low expression of CD161 and NKG2D activating NK receptors was previously associated with impaired NK cell cytotoxicity in metastatic melanoma patients (28). In metastatic melanoma patients with evidence of disease, a decrease expression of CD16, NKp30, and NKp46 and no alteration of NKG2D were reported (29). In these studies, reference to previous treatments was not documented and may thus explain the discrepancies with our results. Thus, the peculiar phenotype of circulating NK cells in stage IV

Figure 5. A, phenotypic analyses of primary melanoma MelC and MelS cell lines, derived from metastatic lymph nodes. B, MelC and MelS lysis (%) by IL-2-activated NK cells from healthy donor (1 of 2 experiments is shown), assessed with a dynamic label free assay (xCELLigence) that monitor by cell impedance. Lysis was measured at different E/T ratios (black to white scale). Mean of quadruplicate values and standard error (SD) for each every 30 minutes measures are shown. C, the involvement of NK receptors in the lysis of MelC and MelS targets was determined in the presence of 10 μ g/mL control isotype (IgG), or specific mAbs. IL-2-activated NK cells were added to adherent 10,000 MelC or MelS, at an E/T ratio of 2:1. Percentages of lysis inhibition are calculated at $T = 300$ minutes in presence of anti-NKG2D, anti-NKp30, anti-NKp46, anti-DNAM-1, alone or combined as indicated in the legends (mean values and SD of 2 independent experiments).



melanoma patients was never described earlier, in melanoma or other solid tumors (26, 30). We hypothesized that, in stage IV melanoma patients, the invasion of various organs by tumor cells may interfere with the activation of NK. Particularly, the presence of tumor cells in lymph nodes may alter the differentiation of NK cells. In addition, soluble factors produced by circulating tumor cells may induce modulation of the NK cell phenotype (tumor editing of NKp46 and NKG2A). It was previously reported that NK cell activity changes in stage I and II melanoma lymph nodes (31, 32) indicating the involvement of NK cells in early phase of melanoma development. Further investigations to study these NK cells in stage I to III patients are required.

In contrast, NK cells from postchemotherapy melanoma patients are characterized by a high NKG2A expression and a restored NKp46, indicating a clear impact of chemotherapy on the phenotype and functions of NK cells. Moreover, no other tested variable (age: <55, >55, <70, and >70; gender; stage: M1a, M1b, or M1c; lymphocyte counts: <1,000,

>1,000, <2,000, and >2,000; tumor evolution: interval between primary melanoma and stage IV: < or >12 months; and survival) apart from chemotherapy was found to differentially affect the expression (% and level) of NKG2A and NKp46 receptors. It is worth noting that, even if the tumor stage parameter did not affect significantly the NK phenotype, the effect of chemotherapy on NKp46 appeared pronounced in advanced M1c patients (Supplementary Fig. S4).

The comparable and low proportions of CD3⁺NKG2A⁺ T cells (>5%, data not shown) in patients indicate that the induction of NKG2A is specific to NK cells. No seric inflammatory cytokines were detected in patients before or after chemotherapy. Moreover, postchemotherapy patients were analyzed 4 to 6 weeks after the last course of chemotherapy, excluding a direct effect of drugs on peripheral NK cells, but compatible with changes in the differentiation and/or maturation of NK cells. The autologous paired pre/post analyses confirm the observation on unpaired series of patients on the effect of chemotherapy on NK status.

Interestingly, these unique NK populations in patients are endowed with peculiar *ex vivo* functions: resting NK cells from pre- and postchemotherapy patients are able to efficiently lyse primary lymph node–derived melanoma cells. Furthermore, we show that certain melanoma cells may trigger IFN- γ secretion by resting NK cells in patients.

The above studies on resting NK cells outline that the pattern of NK ligands expressed by primary metastatic melanoma cells may modulate their susceptibility to NK-mediated lysis. The recent collaborative studies (33) outline that lymph node metastases are highly susceptible to NK cell lysis and that NCR and DNAM-1 are involved in the lysis, whereas NKG2D is not. They showed that all human metastatic lymph node–derived melanoma cells express ligands for NKp46 and DNAM-1, while NKG2D ligand expression was variable among the cell lines studied. Expression of DNAM-1 and NKG2D ligands by a large panel of melanoma cell lines was also reported (19) and correlation between NKG2D function and expression of ligands on melanoma cells was shown (34). Moreover, Markel and colleagues (35) reported that NKG2D plays a major role in the lysis of melanoma cells derived from metastatic lesions. NKp30 also contributes to the lysis of melanoma cells. To determine the activating receptors involved in melanoma lysis by IL-2–activated donor NK cells, we used a sensible dynamic label free assay. Our blocking experiments show that simultaneous triggering of NKG2D and DNAM-1 is crucial for melanoma lysis whereas NCR involvement may vary from 1 cell line to another. The strong expression of NKG2D and DNAM-1 by prechemotherapy NK cells may account for their efficiency toward MelC and MelS. In IL-2–activated NK cells, NKG2A also participates in the control of melanoma cell lysis.

NK cells are not typically found in large numbers in advanced human neoplasms. However, their numbers

increase following activation *in vivo* (20) or adoptive transfer (36). In addition, the level of NK infiltration positively correlates with prognosis in squamous cell lung carcinoma (37), and colorectal tumors (38). NK cells have been detected in melanoma after tumor-infiltrating lymphocyte (TIL) isolation, and these NK cells were much more potent than CD3⁺ TILs to kill melanoma cell lines (39). Previously reported correlation between histologic features and NK activity suggests that NK cells may represent an additional prognosis factor (22).

The presence of unique melanoma-reactive NK cells in stage IV patients and their modulation by chemotherapy are strong arguments for the involvement of these immune cells in melanoma, and widen their interest in immunotherapy strategies for melanoma patients.

Disclosure of Potential Conflicts of Interest

No potential conflicts of interest were disclosed.

Acknowledgments

This work was supported by grants from INSERM, la Fondation pour la Recherche Médicale (FRM), la Société Française de Dermatologie (SFD), and la Ligue Nationale contre le Cancer (Comité Ile de France). G. Fregni had a grant from Cancerpole IdF and A. Perier from FRM. The authors thank Drs. F. Boitier, N. Franck, I. Gorin, N. Wallet-Faber, and Prof. N. Dupin for including patients in the studies and Dr. V. Fourchette, surgeon in Institut Curie for providing samples of lymph nodes metastases. They also thank Dr. N. Freiss-Rouass for measurement of seric HLA-G, Dr. S. Caillat-Zucmann for seric MICA molecules, C. Fauriat for B7H6 transcript analysis in melanoma cell lines, Dr. S. Grabar for helpful discussion and advices for statistical analysis, and the immunobiology platform of Institut Cochin.

The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. This article must therefore be hereby marked *advertisement* in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

Received August 10, 2010; revised December 7, 2010; accepted January 2, 2011; published OnlineFirst January 11, 2011.

References

- Hodi FS, O'Day SJ, McDermott DF, Weber RW, Sosman JA, Haanen JB, et al. Improved survival with ipilimumab in patients with metastatic melanoma. *N Engl J Med* 2010;363:711–23.
- Schadendorf D, Ugurel S, Schuler-Thurner B, Nestle FO, Enk A, Bröcker EB, et al. Dacarbazine (DTIC) versus vaccination with autologous peptide-pulsed dendritic cells (DC) in first-line treatment of patients with metastatic melanoma: a randomized phase III trial of the DC study group of the DeCOG. *Ann Oncol* 2006;17:563–70.
- Testori A, Richards J, Whitman E, Mann GB, Lutzky J, Camacho L, et al. Phase III comparison of vitespen, an autologous tumor-derived heat shock protein gp96 peptide complex vaccine, with physician's choice of treatment for stage IV melanoma: the C-100-21 Study Group. *J Clin Oncol* 2008;26:955–62.
- Boon T, Coullie PG, Van den Eynde BJ, van der Bruggen P. Human T cell responses against melanoma. *Annu Rev Immunol* 2006;24:175–208.
- Gajewski TF, Meng Y, Harlin H. Immune suppression in the tumor microenvironment. *J Immunother* 2006;29:233–40.
- Martin-Fontecha A, Thomsen LL, Brett S, Gerard C, Lipp M, Lanzavecchia A, et al. Induced recruitment of NK cells to lymph nodes provides IFN- γ for T(H)1 priming. *Nat Immunol* 2004;5:1260–5.
- Mocikat R, Braumüller H, Gumy A, Egeter O, Ziegler H, Reusch U, et al. Natural killer cells activated by MHC class I(low) targets prime dendritic cells to induce protective CD8 T cell responses. *Immunity* 2003;19:561–9.
- Fehniger TA, Cooper MA, Nuovo GJ, Cella M, Facchetti F, Colonna M, et al. CD56bright natural killer cells are present in human lymph nodes and are activated by T cell-derived IL-2: a potential new link between adaptive and innate immunity. *Blood* 2003;101:3052–7.
- Frey M, Packianathan NB, Fehniger TA, Ross ME, Wang WC, Stewart CC, et al. Differential expression and function of L-selectin on CD56bright and CD56dim natural killer cell subsets. *J Immunol* 1998;161:400–8.
- Moretta L, Moretta A. Unravelling natural killer cell function: triggering and inhibitory human NK receptors. *EMBO J* 2004;23:255–9.
- Lanier L. Turning on natural killer cells. *J Exp Med* 2000;191:1259–62.
- Brandt CS, Baratin M, Yi EC, Kennedy J, Gao Z, Fox B, et al. The B7 family member B7-H6 is a tumor cell ligand for the activating natural killer cell receptor NKp30 in humans. *J Exp Med* 2009;206:1495–503.
- Moretta A, Bottino C, Vitale M, Pende D, Cantoni C, Mingari MC, et al. Activating receptors and coreceptors involved in human natural killer cell-mediated cytotoxicity. *Annu Rev Immunol* 2001;19:197–223.

14. Gilfillan S, Chan CJ, Cella M, Haynes NM, Rapaport AS, Boles KS, et al. DNAM-1 promotes activation of cytotoxic lymphocytes by nonprofessional antigen-presenting cells and tumors. *J Exp Med* 2008;205:2965-73.
15. Bryceson YT, March ME, Ljunggren HG, Long EO. Synergy among receptors on resting NK cells for the activation of natural cytotoxicity and cytokine secretion. *Blood* 2006;107:159-66.
16. Braud VM, Allan DS, O'Callaghan CA, Söderström K, D'Andrea A, Ogg GS, et al. HLA-E binds to natural killer cell receptors CD94/NKG2A, B and C. *Nature* 1998;391:795-9.
17. Natarajan K, Dimasi N, Wang J, Mariuzza RA, Margulies DH, et al. Structure and function of natural killer cell receptors: multiple molecular solutions to self, nonself discrimination. *Annu Rev Immunol* 2002;20:853-85.
18. Moretta L, Moretta A, Killer immunoglobulin-like receptors. *Curr Opin Immunol* 2004;16:626-33.
19. Casado JG, Pawelec G, Morgado S, Sanchez-Correa B, Delgado E, Gayoso I, et al. Expression of adhesion molecules and ligands for activating and costimulatory receptors involved in cell-mediated cytotoxicity in a large panel of human melanoma cell lines. *Cancer Immunol Immunother* 2009;58:1517-26.
20. Albertsson PA, Basse PH, Hokland M, Goldfarb RH, Nagelkerke JF, Nannmark U, et al. NK cells and the tumour microenvironment: implications for NK-cell function and anti-tumour activity. *Trends Immunol* 2003;24:603-9.
21. Lala PK, Elkashab M, Kerbel RS, Parhar RS. Cure of human melanoma lung metastases in nude mice with chronic indomethacin therapy combined with multiple rounds of IL-2: characteristics of killer cells generated *in situ*. *Int Immunol* 1990;2:1149-58.
22. Hersey P, Hobbs A, Edwards A, McCarthy WH, McGovern VJ. Relationship between natural killer cell activity and histological features of lymphocyte infiltration and partial regression of the primary tumor in melanoma patients. *Cancer Res* 1982;42:363-8.
23. Pittari G, Fregni G, Roguet L, Garcia A, Vataire AL, Wittnebel S, et al. Early evaluation of natural killer activity in post-transplant acute myeloid leukemia patients. *Bone Marrow Transplant* 2010;45:862-71.
24. Hüe S, Monteiro RC, Berrhi-Aknin S, Caillat-Zucman S. Potential role of NKG2D/MHC class I-related chain A interaction in intrathymic maturation of single-positive CD8 T cells. *J Immunol* 2003;171:1909-17.
25. Derré L, Corvaisier M, Charreau B, Moreau A, Godefroy E, Moreau-Aubry A, et al. Expression and release of HLA-E by melanoma cells and melanocytes: potential impact on the response of cytotoxic effector cells. *J Immunol* 2006;177:3100-7.
26. Gati A, Da Rocha S, Guerra N, Escudier B, Moretta A, Chouaib S, et al. Analysis of the natural killer mediated immune response in metastatic renal cell carcinoma patients. *Int J Cancer* 2004;109:393-401.
27. Zhu J, Wang X, Xu X, Abassi YA. Dynamic and label-free monitoring of natural killer cell cytotoxic activity using electronic cell sensor arrays. *J Immunol Methods* 2006;309:25-33.
28. Konjević G, Mirjacić Martinović K, Vuletić A, Jović V, Jurišić V, Babović N, et al. Low expression of CD161 and NKG2D activating NK receptor is associated with impaired NK cell cytotoxicity in metastatic melanoma patients. *Clin Exp Metastasis* 2007;24:1-11.
29. Markel G, Seidman R, Besser MJ, Zabari N, Ortenberg R, Shapira R, et al. Natural killer lysis receptor (NKLRL)/NKLRL-ligand matching as a novel approach for enhancing anti-tumor activity of allogeneic NK cells. *PLoS One* 2009;4:e5597.
30. Schleyen JS, Von Geldern M, Weiss EH, Kotzias N, Rohrmann K, Schendel DJ, et al. Renal cell carcinoma-infiltrating natural killer cells express differential repertoires of activating and inhibitory receptors and are inhibited by specific HLA class I allotypes. *Int J Cancer* 2003;106:905-12.
31. Hersey P, Edwards A, McCarthy WH. Tumour-related changes in natural killer cell activity in melanoma patients. Influence of stage of disease, tumour thickness and age of patients. *Int J Cancer* 1980;25:187-94.
32. Farzad Z, Cochran AJ, McBride WH, Gray JD, Wong V, Morton DL, et al. Lymphocyte subset alterations in nodes regional to human melanoma. *Cancer Res* 1990;50:3585-8.
33. Lakshmikanth T, Burke S, Ali TH, Kimpfner S, Ursini F, Ruggeri L, et al. NCRs and DNAM-1 mediate NK cell recognition and lysis of human and mouse melanoma cell lines *in vitro* and *in vivo*. *J Clin Invest* 2009;119:1251-63.
34. Pende D, Rivera P, Marcenaro S, Chang CC, Biassoni R, Conte R, et al. Major histocompatibility complex class I-related chain A and UL16-binding protein expression on tumor cell lines of different histotypes: analysis of tumor susceptibility to NKG2D-dependent natural killer cell cytotoxicity. *Cancer Res* 2002;62:6178-86.
35. Markel G, Ortenberg R, Seidman R, Sapoznik S, Koren-Morag N, Besser MJ, et al. Systemic dysregulation of CEACAM1 in melanoma patients. *Cancer Immunol Immunother* 2009;59:215-30.
36. Geller MA, Cooley S, Judson PL, Ghebre R, Carson LF, Argenta PA, et al. A phase II study of allogeneic natural killer cell therapy to treat patients with recurrent ovarian and breast cancer. *Cytotherapy* 2011;13:98-107.
37. Villegas FR, Coca S, Villarrubia VG, Jiménez R, Chillón MJ, Jareño J, et al. Prognostic significance of tumor infiltrating natural killer cells subset CD57 in patients with squamous cell lung cancer. *Lung Cancer* 2002;35:23-8.
38. Menon AG, Janssen-van Rhijn CM, Morreau H, Putter H, Tollenaar RA, van de Velde CJ, et al. Immune system and prognosis in colorectal cancer: a detailed immunohistochemical analysis. *Lab Invest* 2004;84:493-501.
39. Azogui O, Avril MF, Margulis A, Guillard M, Caillou B, Prade M, et al. Tumor-infiltrating CD3- NK cells are more effective than CD3+ T cells in killing autologous melanoma cells. *J Invest Dermatol* 1991;97:425-9.

Annexe 2

Oncogene (2011)

« Mutations of the von Hippel-Lindau gene confer increased susceptibility to natural killer cells of clear-cell renal cell carcinoma »

Perier A, Fregni G, Wittnebel S, Gad S, Allard M, Gervois N, Escudier B, Azzarone B, Caignard A.

ORIGINAL ARTICLE

Mutations of the von Hippel–Lindau gene confer increased susceptibility to natural killer cells of clear-cell renal cell carcinomaA Perier¹, G Fregni¹, S Wittnebel², S Gad³, M Allard⁴, N Gervois⁴, B Escudier⁵, B Azzarone⁶ and A Caignard¹¹Institut Cochin, INSERM U1016, CNRS UMR 8104, Université Paris Descartes, Paris, France; ²INSERM U753, Institut Gustave Roussy, Villejuif, France; ³Laboratoire de Génétique Oncologique EPHE, INSERM U753, Institut Gustave Roussy, Villejuif, France; ⁴INSERM U892, Nantes, France; ⁵Département d'oncologie Médicale, Institut Gustave Roussy, Villejuif, France and ⁶Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, UMR 542, Université de Paris-Sud, Hôpital Paul Brousse, Villejuif, France

The tumor suppressor gene von Hippel–Lindau (VHL) is involved in the development of sporadic clear-cell renal cell carcinoma (RCC). VHL interferes with angiogenesis and also controls cell adhesion and invasion. Therapies that target VHL-controlled genes are currently being evaluated in RCC patients. RCC is a immunogenic tumor and treatment with interleukin-2 (IL2) or interferon (IFN)- α results in regression in some patients. We used two renal tumor cell lines (RCC6 and RCC4) carrying VHL loss-of-function mutations to investigate the role of mutant VHL in susceptibility to natural killer (NK) cell-mediated lysis. The RCC6 and RCC4 cell lines were transfected with the wild-type gene to restore the function of VHL. The presence of the gene in RCC cells downregulated hypoxia-inducible factor (HIF)-1 α and subsequently decreased vascular endothelial growth factor (VEGF) production. Relative to control transfectants and parental cells, pVHL-transfected cell lines activated resting and IL2-activated NK cells less strongly, as assessed by IFN γ secretion, NK degranulation and cell lysis. NKG2A, a human leukocyte antigen (HLA)-I-specific inhibitory NK receptor, controls the lysis of tumor targets. We show that HLA-I expression in RCC-pVHL cells is stronger than that in parental and controls cells, although the expression of activating receptor NK ligands remains unchanged. Blocking NKG2A/HLA-I interactions substantially increased lysis of RCC-pVHL, but had little effect on the lysis of VHL-mutated RCC cell lines. In addition, in response to IFN α , the exponential growth of RCC-pVHL was inhibited more than that of RCC-pE cells, indicating that VHL mutations may be involved in IFN α resistance. These results indicate that a decreased expression of HLA-I molecules in mutated VHL renal tumor cells sensitizes them to NK-mediated lysis. These results suggest that combined immunotherapy with anti-angiogenic drugs may be beneficial for patients with mutated VHL.

Oncogene advance online publication, 24 January 2011; doi:10.1038/onc.2010.638

Keywords: von Hippel–Lindau mutation; NK cells; renal cell carcinoma; immunotherapy**Introduction**

Metastatic renal cell carcinoma (RCC) of the clear-cell subtype is refractory to conventional chemotherapy. Until recently, after decades of drug testing, only interleukin-2 (IL2) and interferon (IFN)- α had been identified as having activity in RCC, with a 15% response rate (Negrier *et al.*, 1998). Consequently, these agents were the standard first-line treatments for metastatic RCC. High bolus doses of IL2 are effective for RCC patients with good predictive factors (Yang *et al.*, 2003), but also have serious side effects due to the leak syndrome. Furthermore, the mechanisms underlying the tumor regression are largely unknown and biological markers allowing identification of potential responders to immunotherapy are not available.

The identification of sentinel mutations driving carcinogenesis and malignant transformation is crucial for the development of targeted therapeutic strategies. Recent advances in the understanding of the biology and genetics of RCC have led to several novel targeted approaches, with unprecedented response rates (Rini *et al.*, 2009). An early event during the evolution of clear-cell RCC is loss of function of the *VHL* gene, located on chromosome 3p and encoding a 213-amino acid protein (Latif *et al.*, 1993). Inheritance of a defective copy of the *VHL* gene leads to von Hippel–Lindau (VHL) disease and is the most common cause of inherited clear-cell RCC (Gnarra *et al.*, 1994). In addition, up to 75% of patients with sporadic clear-cell RCC have lost *VHL* (for example, chromosome 3p deletion, suppressed expression or loss-of-function base substitutions (Foster *et al.*, 1994)). Thus, loss of *VHL* function is an important sentinel event during RCC pathogenesis. The *VHL* gene is involved in several pathways linked to carcinogenesis, most notably the

Correspondence: Dr A Caignard, INSERM U1016, Institut Cochin, Bâtiment Gustave Roussy, 27 rue du Faubourg Saint Jacques, Paris 75014, France.

E-mail: anne.caignard@inserm.fr

Received 30 June 2010; revised 25 November 2010; accepted 26 December 2010

hypoxia-inducible pathway (Maxwell *et al.*, 1999). The major consequence of the loss of *VHL* function is continuous activation of hypoxia-inducible factors (HIFs), resulting in accumulation of HIF effectors and increased angiogenesis, cell growth, low oxygen survival and ultimately metastasis (Linehan *et al.*, 2009). *VHL* regulates the expression of genes coding for molecules involved in cell–cell contact (Aggelis *et al.*, 2009) and that are implicated in the recognition and activation of immune cells, particularly natural killer (NK) cells.

NK cells are potent cytolytic effectors with role in innate and adaptive antitumor immune responses. NK cells kill tumor cells without prior sensitization and are believed to be the major source of IFN γ *in vivo*; NK-derived IFN γ is crucial in priming T helper 1 responses (Martin-Fontecha *et al.*, 2004). NK cell activation depends on an intricate balance between activating and inhibitory signals that determine whether the target will be susceptible to NK-mediated lysis (Lanier, 2000; Moretta and Moretta, 2004). Natural cytotoxicity receptors control NK cell activation: NKp46 and NKp30, expressed by resting NK cells, and NKp44, induced after stimulation by IL2. Although the ligands of natural cytotoxicity receptors are poorly defined, blocking of natural cytotoxicity receptors with specific antibodies confirms their involvement in the lysis of various tumor cells *in vitro* (Moretta *et al.*, 2001). Activation of NK cells is triggered by additional receptors. One such receptor, NKG2D, expressed by most peripheral NK cells, binds major histocompatibility complex (MHC)-related antigen (MIC)-A/B molecules and UL16-binding proteins (ULBPs), induced on membrane of stressed cells. DNAX accessory molecule 1 (DNAM-1), an adhesion molecule belonging to the immunoglobulin superfamily, promotes many NK functions *in vitro*. It has been reported that DNAM-1 is required for the elimination of tumor cells that express other NK cell-activating ligands only weakly (Gilfillan *et al.*, 2008). In addition, adhesion molecules such as inter-cellular adhesion molecule (ICAM)-1, vascular-cell adhesion molecule (VCAM)-1 and neural-cell adhesion molecule (N-CAM), expressed by tumor cells favor interactions with NK cells through their respective receptors (leukocyte function-associated antigen (LFA)-1, very late antigen (VLA)-4 and CD56).

NK cell activation is negatively controlled by inhibitory human leukocyte antigen (HLA)-I-specific NK receptors. KIR (killer Ig type receptor), expressed by NK subsets, recognize specific HLA-I alleles. The ubiquitous inhibitory C-lectin type CD94/NKG2A receptor is specific for HLA-E molecules; HLA-E present a restricted set of conserved nonameric peptides derived from the signal sequence of other MHC-I molecules (Braud *et al.*, 1998).

We previously showed that RCC cell lines are efficiently killed by patient NK cells (Gati *et al.*, 2004). RCC cells express activating NKG2D ligands and ICAM-1 that control NK-mediated lysis. However, expression of HLA-I molecules may override activating signals by engagement of CD94/NKG2A receptor and

KIR. NK cells are not found in great numbers in advanced human cancers. However, they are numerous among tumor-infiltrating lymphocytes from RCC tumors, where they constitute a greater proportion than in peripheral blood lymphocytes (PBL) (Cozar *et al.*, 2005). The cytotoxic activity of the tumor-infiltrating lymphocytes mainly resides in the CD16^{dim} NK cell population that expresses CD94/NKG2A more strongly than the peripheral NK cells (Schleypen *et al.*, 2003, 2006). Moreover, the response to IL2 in RCC patients can be correlated with the extent of tumor infiltration by NK cells, showing NK cell importance in tumor control (Donskov *et al.*, 2002).

The role of *VHL* in the immunogenicity of renal tumors has never been studied experimentally. To elucidate the possible link between NK functionality and *VHL* gene status in RCC, we investigated how mutant *VHL* regulates the recognition and lysis of RCC cells by NK cells. We describe two cell lines carrying loss-of-function mutations in the *VHL* gene and restoration of wild-type *VHL* function by transfection. We report analyses of tumor phenotype, cytokine secretion and susceptibility to NK cell-mediated recognition of these various cell lines.

Results

VHL status of RCC cell lines and restoration of *VHL* function in *pVHL* transfectants

The entire coding sequence and the promoter region of the *VHL* gene in cell lines RCC4 and RCC6 were sequenced and mutations in exon 1 were thereby detected. RCC4 cells carry the mutation c.194C>G p.Ser65Trp, reported in a patient with VHL disease (VHL Mutation Database: <http://www.umd.be:2020/>). RCC6 cells carry the mutation c.331A>G p.Ser111Gly, previously identified in primary sporadic RCC (Whaley *et al.*, 1994). The second *VHL* alleles in both cell lines appear to have been deleted because both mutations and polymorphisms in the promoter are homozygous (data not shown). Both these mutations are at positions frequently mutated in RCC, and correspond to the β domain required for binding to HIF (Min *et al.*, 2002). HIF-1 α and HIF-2 α were constitutively expressed in RCC6 and hypoxia did not modify their expression whereas they were induced by hypoxia in control RCC7 cells, a cell line with a wild-type *VHL* gene (Figure 1a).

RCC4 cells were transfected with pcDNA3 (Maxwell *et al.*, 1999). RCC6 cells were transfected with a plasmid that contains the full-length cDNA coding for the *VHL* gene, pRC-HAVHL or with the empty vector pRC. RCC6-pE and RCC4-pE cells are the control transfectants (empty vectors) and RCC6-pVHL and RCC4-pVHL cells are those transfected with wild-type *VHL*. Stable transfection of RCC cells with *VHL* resulted in the loss of HIF-1 α expression in basal conditions, whereas -pE transfectants expressed HIF-1 α constitutively (Figure 1b). To control VHL/HIF functionality, we evaluated vascular endothelial growth factor (VEGF) production by the various cell lines; VEGF secretion by

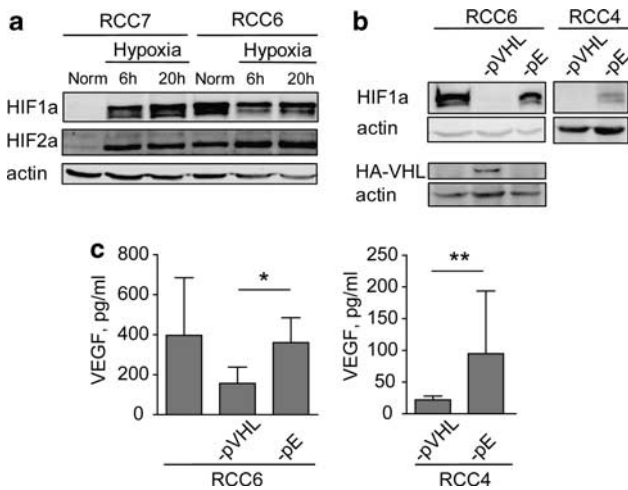


Figure 1 Restoration of *VHL* function in -pVHL-transfected RCC cells. (a) Western blot analysis of HIF-1 α and HIF-2 α in RCC7 and RCC6 cell lines under normoxia and hypoxia. (b) Western blot analysis of HIF-1 α and HA-VHL in transfected RCC6 and RCC4 cells. (c) Secretion of VEGF by RCC4 and RCC6 cells lines and the transfectants, assessed by ELISA. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

RCC-pVHL cells was significantly lower than that by the corresponding RCC-pE cells (Figure 1c).

We also assessed the secretion of two cytokines over-expressed in RCC. IL6, an inflammatory cytokine that acts as a growth factor for renal cells, and the chemoattractant IL8, known to interfere with the recruitment of immune cells (Lahn *et al.*, 1999). RCC6 cells secreted high amounts of IL6 (>2000 pg/ml) and IL8 (3000 pg/ml), and RCC4 cells produced 400 and 500 pg/ml of IL6 and IL8, respectively (Supplementary Figure 1). The restoration of the *VHL* gene did not modify IL6 or IL8 secretion in these cell lines.

Restoration of wild-type *VHL* decreases NK cell-mediated lysis of RCC cells

The lytic potential of NK cells was measured by granule mobilization (CD107a staining) following stimulation by targets (Figure 2a). With fresh NK cells, the percentages of CD107a⁺ cells were lower after exposure to RCC-pVHL cells than after exposure to RCC-pE cells. IL2-activated NK cells displayed greater degranulation and the weaker granule mobilization in response to -pVHL transfectants was maintained. NK-mediated lysis of RCC cell lines was assessed by xCELLigence, a label-free, real-time monitoring assay of adherent cell lysis by measuring impedance (Zhu *et al.*, 2006; Urcan *et al.*, 2009). As shown in Figure 2b, NK-mediated lysis was 30–50% lower for the wild-type VHL transfectants than for the RCC-pE transfectants. Moreover, RCC6 cells were lysed at lower effector/target ratio than RCC4 cells, indicating that RCC6 is more susceptible to NK-mediated lysis (Supplementary Figure 2). The reduced susceptibility of RCC cell lines transfected with the wild-type VHL to lysis by NK cells indicates that the *VHL* mutations they carry, favor NK cell activation and promote NK-mediated lysis.

The activation of NK cells by target cells results in IFN γ secretion (Figure 2c). Fresh and IL2-activated NK

cells secrete significant amounts of IFN γ in response to RCC6 cell lines; resting NK cells responded better to RCC6-pE than to RCC6-pVHL. RCC4 cell lines did not induce IFN γ secretion by fresh NK cells in five independent experiments (data not shown). IL2-activated NK cells secrete IFN γ to RCC4 cells; the response toward RCC4-pE and -pVHL was dependent on donors NK cells.

Restoration of a wild-type *VHL* gene induces expression of HLA-I molecules by RCC cells

We studied the expression of NK ligands by RCC-pE and RCC-pVHL cell lines: activating receptor ligands, adhesion molecules and MHC-I ligands of inhibitory NK receptors were analyzed (Figure 3). Concerning NKG2D ligands, RCC6 and RCC4 cells express MIC-A strongly but less MIC-B. RCC6 cells express ULBP1, 2 and 3 molecules. In RCC4, only ULBP1 and 2 are expressed. RCC6 and RCC4 cell lines also expressed CD112 and CD155, the ligands of DNAM-1.

RCC6-pE cells expressed ICAM-1, N-CAM and VCAM-1 adhesion molecules (Figure 3b). The signals for NCAM and VCAM-1 were stronger in RCC6-pVHL. RCC4-pE expressed ICAM-1 weakly and N-CAM and VCAM-1 were undetectable; the expression of ICAM-1 and VCAM-1 was stronger in RCC4-pVHL cells.

RCC6-pE and RCC4-pE cells strongly expressed classical HLA-I (HLA-A/B/C) molecules and pVHL transfection increased their surface expression (Figure 3c). RCC6 cells lines also expressed the non-classical HLA-G molecule, ligand of ILT2/ILT4/KIR2DL4; the expression by RCC6-pVHL cells was weaker than that by RCC6-pE cells. HLA-E molecules, ligands of NKG2A, were not detected on RCC6-pE cells and were induced on RCC6-pVHL. Thus, the restoration of wild-type VHL function affects expression of HLA-I.

We further investigate whether the transfection of *VHL* affects HLA-I expression in a HIF-dependent manner. We performed small interfering RNA (siRNA) experiments to knock down HIF-1 α (Figure 4). siRNA-HIF-1 α strongly inhibited the expression of HIF-1 α in RCC6 cells, 24 h and up to 96 h after the transfection. This led to a modest and delayed increase of HLA-I molecules, most significant at 72–96 h (Figure 4a). The HLA-I expression by RCC6 and RCC4-pE cell lines was assessed 96 h after the electroporation of siRNA (Figure 4b). As for RCC6, HIF-1 α inhibition increased HLA-I expression in RCC4-pE cells. However, HLA-I membrane expression was faintly increased (Figure 4c) compared with the increase induced by pVHL transfection.

Mutated VHL in RCC cells promotes NK cell activation through decreased expression of HLA-I molecules

To determine the receptor/ligand interactions involved in IL2-activated NK-mediated lysis of RCC cells, we used real-time monitoring of cell lysis assays (xCELLigence) in presence of various mAbs to block receptor/ligand interactions. Results are expressed as percentages of lysis modulation compared with those in the presence of the isotype mAbs (Figure 5a). The difference between -pE and -pVHL was maintained in all the experiments, although the variability between

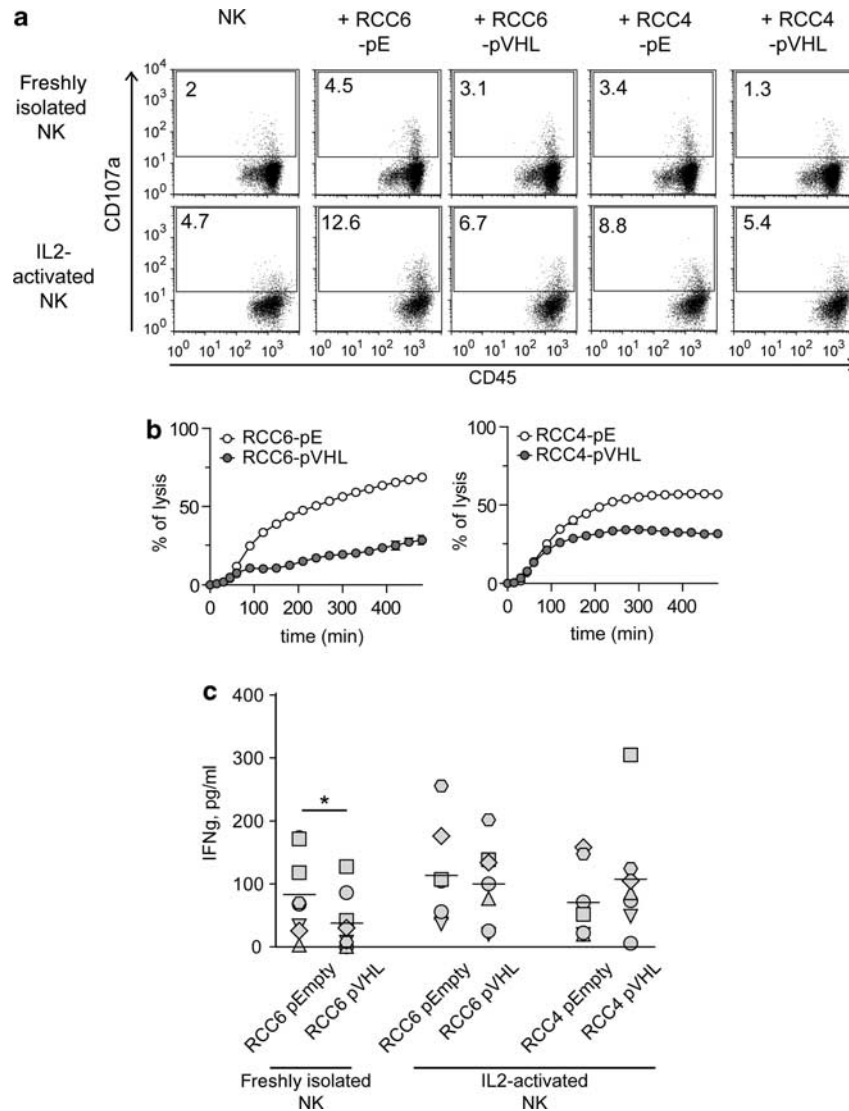


Figure 2 Reduced NK-mediated lysis of -pVHL RCC transfectants. **(a)** Degranulation potential of resting and IL2-activated NK cells in response to stimulation with -pE and -pVHL transfectants of RCC6 and RCC4. One representative experiment of 10 is shown. **(b)** Dynamics of the lysis of RCC6 and RCC4 transfected with -pE (white circles) and -pVHL (gray circles). Lysis of adherent targets by IL2-activated NK cells was studied at an effector/target ratio of 1, was assessed by following impedance, a label-free assay (xCELLigence) and was expressed in percentage of lysis. One representative experiment of three is shown. **(c)** IFN γ secretion by resting and IL2-activated NK cells in response to stimulation with -pE and -pVHL RCC6 and RCC4. Bars indicate mean values. The Wilcoxon matched pairs test was used for data from 8 and 7 independent experiments for resting and IL2-activated NK cells, respectively. *0.01 < P < 0.05

donors contributed to substantial standard errors in the mean values. Anti-NKG2D mAb reduces the lysis of RCC-pE and -pVHL cell lines by 30 and 40%, respectively, indicating that NK-mediated lysis mainly involves NKG2D (Figure 5a). Anti-natural cytotoxicity receptor mAbs (NKP30) diminished the lysis of RCC6-pE cells by 13% and RCC6-pVHL cells by 37%. Consistent with the strong expression level of HLA-I and HLA-E molecules by RCC-pVHL, the addition of NKG2A or HLA-I-specific mAbs dramatically increased NK-mediated lysis of RCC-pVHL cells. In contrast, these mAbs had only a very small effect on the lysis of RCC-pE cells, indicating an expression of HLA-I, too low to counteract the activating receptors on mutated *VHL* cell lines. Figure 5b shows a representa-

tive experiment of the dynamic lysis of RCC-pE and -pVHL cells by IL2-activated NK cells in the presence of NKG2D and NKG2A mAbs. A similar pattern of modulation was observed for NK cell degranulation (Supplementary Figure 3).

The effects of various mAbs on IFN γ secretion by NK cells were also determined (Figure 6). Blockade of NKG2D, NKP30 and NKP46 decreased IFN γ secretion, indicating that they control IFN γ secretion by IL2-activated NK cells. As for cell lysis, the involvement of NKP30 in NK activation was larger for RCC6-pVHL (37%) than for RCC6-pE (17%). Addition of NKG2A or HLA-I-specific mAbs substantially increased IFN γ secretion by NK cells in response to RCC-pVHL cells.

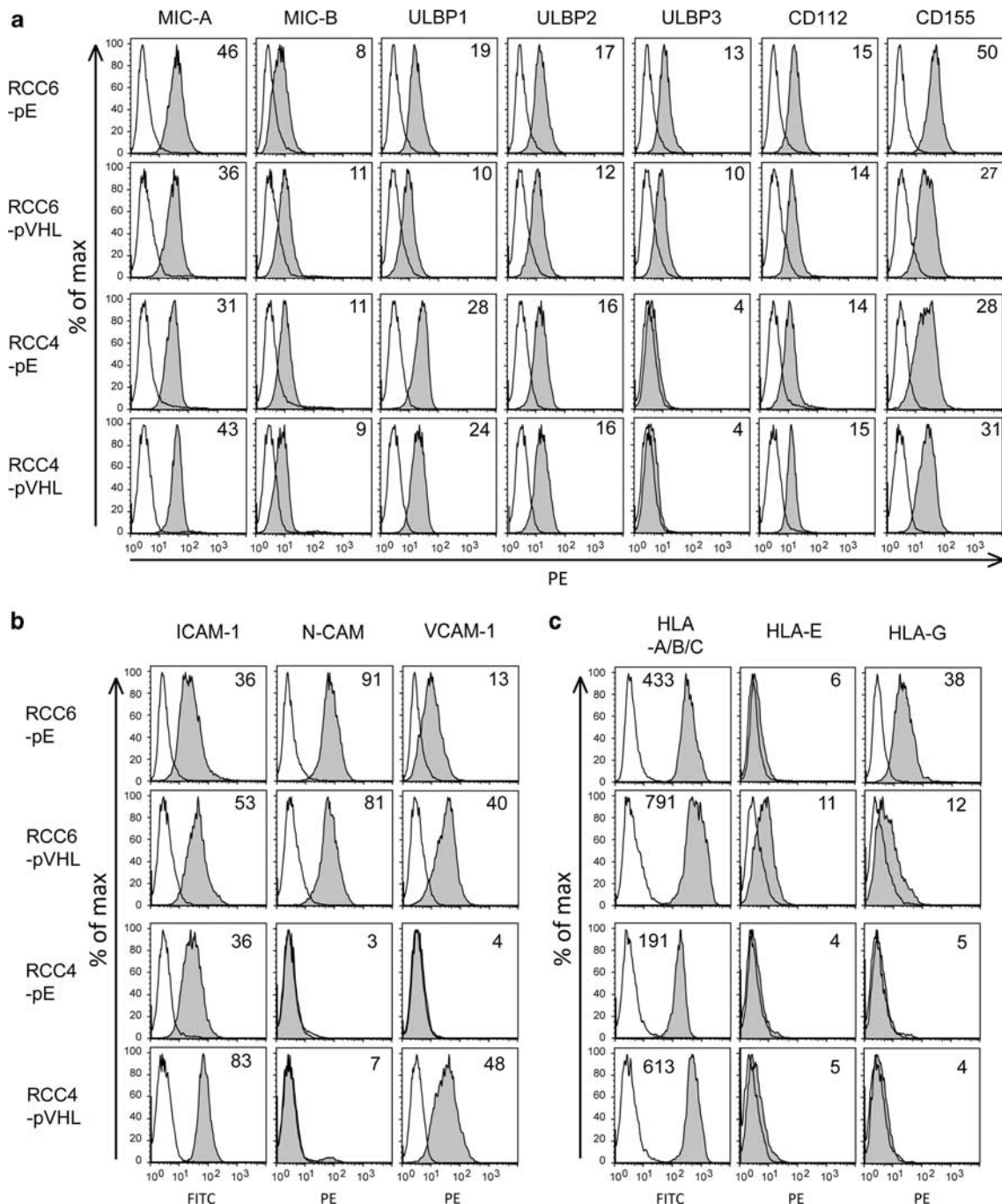


Figure 3 Expression of NK ligands in -pVHL and -pE transfected RCC cell lines. (a) MICA/B, ULBP1–3 molecules (NKG2D ligands), and CD112 and CD155 (DNAM-1 ligands). (b) Adhesion molecules ICAM-1 (CD54), N-CAM (CD56) and VCAM-1 (CD106). (c) HLA-I (A/B/C), HLA-E and HLA-G molecules.

Thus, the lower NK-mediated lysis of RCC-pVHL than RCC-pE is associated with a shift toward inhibition induced by the stronger expression of HLA-I molecules. The observation that anti-HLA-I and anti-NKG2A mAbs affect NK function to a similar extent toward RCC6-pVHL cells, may reflect their expression of HLA-E. The greater NK activity toward RCC4-pVHL in presence of anti-HLA-I than in presence of anti-NKG2A suggests the involvement of additional

NK receptors (such as KIRs). These findings indicate that certain *VHL* gene mutations favor NK cell activation by RCC cells through the decreased abundance of HLA-I molecules.

Responses to IFNs of RCC-pE and RCC-pVHL cells
 IFN α and IFN γ control the expression of HLA-I and adhesion molecules by tumor cells. We therefore evaluated the effects of these cytokines on the phenotype

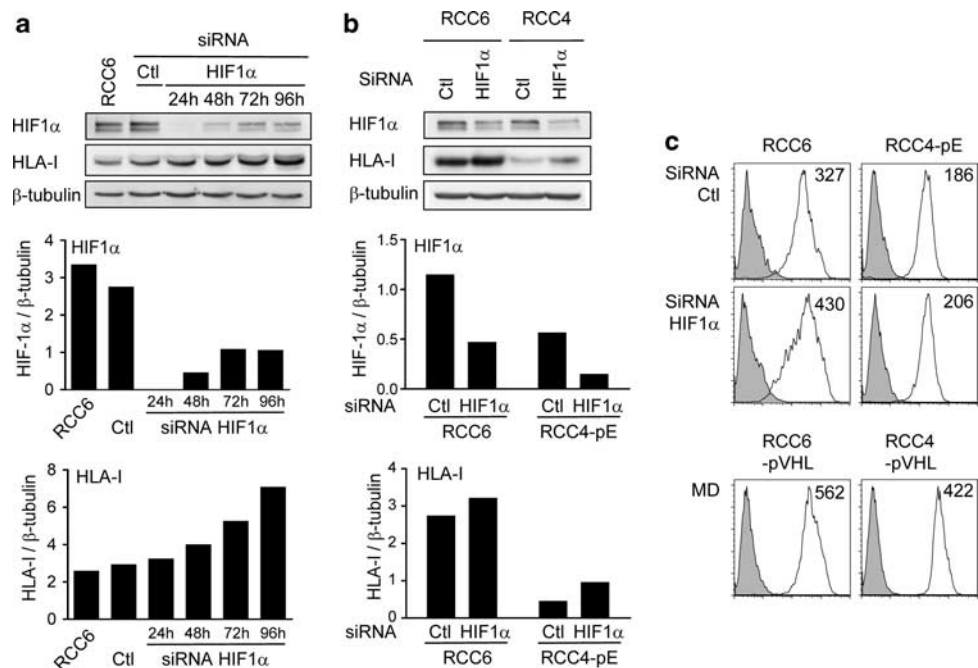


Figure 4 HLA-I expression in RCC cells following HIF-1 α extinction by siRNA. RCC6 and RCC4-pE cells were electroporated with HIF-1 α -siRNA or control siRNA. (a) Time-dependent expression of HLA-I analyzed by western blot in RCC6 cells, 24–96 h after cell transfection. (b) HLA-I expression in RCC6 and RCC4-pE cells analyzed by western blot 96 h after cell transfection with HIF-1 α -siRNA or control siRNA. Graphs below the blots show densitometric quantification of HIF-1 α and HLA-I protein levels normalized to β tubulin. (c) HLA-I surface expression in RCC6 and RCC4-pE 96 h after transfection, compared with RCC-pVHL cell lines.

of RCC cell lines. RCC cells were stimulated for 48 h with 1000 U/ml of IFNs, and this strongly induced HLA-I molecules (mean fluorescence intensity (MFI) fold increase >5) on RCC6-pE and RCC4-pE cells (Figure 7). The magnitude of HLA-I induction was lower (MFI fold increase <3.5) for RCC6-pVHL and RCC4-pVHL cells, leading to similar HLA-I levels on -pVHL and -pE cells treated with IFNs. IFN γ induces HLA-E in RCC6 and RCC4 cells, resulting in similar levels of HLA-E on -pE and -pVHL cells. IFN α slightly increased HLA-E expression by RCC6 cell lines but not by RCC4. IFN α and IFN γ induced HLA-G on RCC6-pE not on RCC6-pVHL; there was no HLA-G induction on RCC4 cell lines. IFN γ also induced ICAM-1 and VCAM-1 in -pE and -pVHL cells, but the expression of CD56 remained unchanged (data not shown). IFNs treatment had no significant effect on either NKG2D or DNAM-1 ligand expression by RCC cells (data not shown). In addition, RCC-pE and -pVHL cells secreted small amounts of soluble HLA-E molecules (10–40 pg/ml), that was increased after treatment with IFNs (data not shown).

IFN α is a recognized treatment for metastatic RCC, so we assessed the proliferation of RCC cells in response to IFN α by dynamic analysis of the cell index by xCELLigence (Figure 8). IFN α inhibited the proliferation of RCC cells in a dose-dependent manner (Figure 8a). Low doses of IFN α inhibited the growth of RCC-pVHL cells more efficiently than the growth of RCC-pE cells (Figure 8b). This suggests that the mutant *VHL* may contribute to RCC cell resistance to IFN α in RCC cells.

Discussion

To facilitate the development of integrated immune targeted therapy, it is necessary to reconsider the role of the NK cell in tumors, taking in account the involved mechanisms leading to carcinogenesis. Here, we report investigations of how genetic alteration of the *VHL* gene determines renal tumor cell immunogenicity, by evaluating the consequences on NK cell activation of a restored wild-type VHL in two RCC cell lines carrying *VHL* mutations. The missense mutation in RCC6 and RCC4 cell lines is in the sequence coding for the β domain of VHL that interacts with HIF-1 α . The transfection of these cell lines with a wild-type *VHL* restored the control of HIF-1 α expression and had an unexpected effect on immunogenicity of RCC cells. Analyses with parental RCC6 cells that behave as pE transfectants further supported the involvement of VHL in NK cell activation (data not shown).

We show that the restoration of VHL function decreased the susceptibility of the two distinct RCC cell lines to lysis by IL2-activated NK cells, indicating that the *VHL* gene mutations carried by these RCC cells favor NK activation. We found that VHL controls NK-mediated lysis and IFN γ secretion through modulation of HLA-I expression. In addition, the regulation of IFN γ secretion is different in RCC4 or RCC6 cell lines. RCC6 but not RCC4 cells, induced IFN γ secretion by fresh NK cells. The engagement of the activating receptor KIR2DL4 by HLA-G expressed by RCC6 may be involved (Rajagopalan *et al.*, 2001), although addition of anti-HLA-G mAbs had no clear effect on

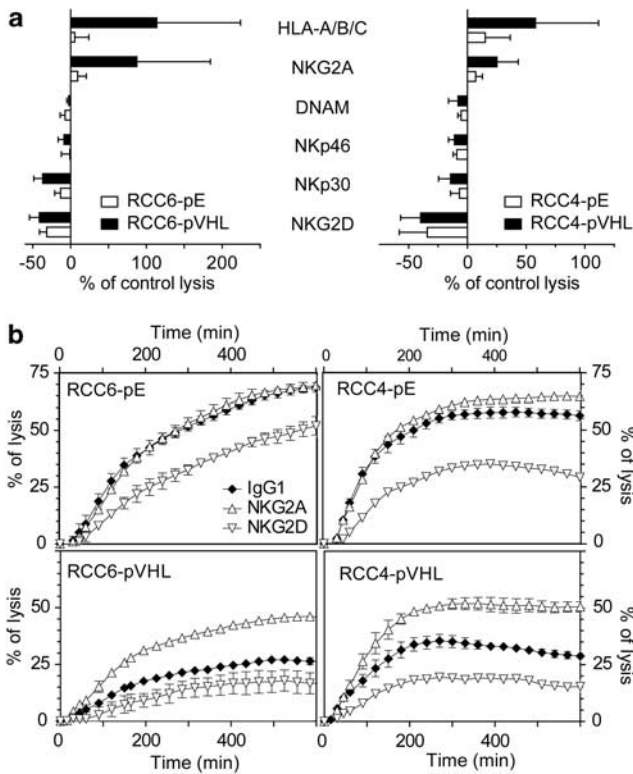


Figure 5 Involvement of NK receptors in the lysis of -pE and -pVHL-transfected RCC cells. IL2-activated NK cells were added to 5000 RCC cells after a 4-h adhesion step at an E:T ratio of 0.5 and 2 for RCC6 and RCC4 cells, respectively. Assays were performed in the presence of 10 µg/ml control isotype (IgG) or specific Abs. (a) Percentages of inhibition calculated at $T=240$ min (mean of $n=3$). (b) Percentages of lysis in the presence of anti-NKG2A (triangle), anti-NKG2D (inverted triangle) or relevant isotype (black diamond) mAbs. One representative experiment of three is shown.

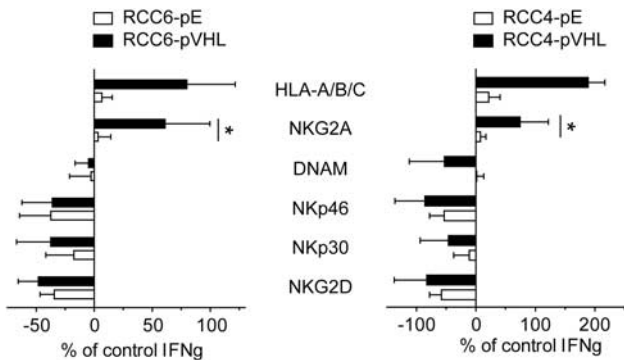


Figure 6 Involvement of NK receptors in IFN γ secretion by IL2-activated NK cells in response to stimulation with -pE and -pVHL-transfected RCC6 and RCC4. The Wilcoxon matched pairs test was used. $*0.01 < P < 0.05$.

IFN γ secretion (data not shown). The response toward RCC4-pE and -pVHL was dependent on donors NK cells. These results suggest that distinct pathways are involved in IFN γ release and cytotoxicity (Chuang *et al.*, 2001; Reefman *et al.*, 2010), and complex interactions between activating and inhibitory receptors account for the global response of heterogeneous NK

cells. Moreover, we showed that NKp46 is more involved in IFN γ secretion than in cytotoxicity.

The main characteristic of RCC cells compared with their pVHL transfectants is a substantially lower expression of HLA-I molecules. Altered expressions of HLA-I and HLA-E molecules by parental and RCC-pE cells, and the results of blocking experiments, suggest that VHL is responsible for the susceptibility of these cells to NK-mediated lysis. The previously reported expression of HLA-G by RCC6 (Ibrahim *et al.*, 2001) is decreased by transfection with the wild-type *VHL* gene, in agreement with the link between HIF-1 stabilization and HLA-G expression by melanoma cells (Mouillot *et al.*, 2007) and trophoblast (Kilburn *et al.*, 2000). Transfection with the wild-type *VHL* had no effect on the expression of ligands for NKG2D and DNAM-1 activating NK receptors. Blocking experiments indicated that of the activating receptors only NKp30 may differently affect lysis of RCC-pE and -pVHL cells. The adhesion molecules ICAM-1 and VCAM-1 were up-regulated in RCC-pVHL cells. Strongly expressed by RCC-pVHL cells, these adhesion molecules may contribute to the magnitude of the NK/RCC target conjugates (data not shown). However, they appear to interfere with NK cell activation only weakly as blocking ICAM-1 (by anti-LFA-1) had a minimal effect on NK cell-mediated lysis (data not shown).

We showed that HIF-1 α extinction induced a weak and delayed increase of HLA-I expression, suggesting that HIF-1 α affect HLA-I expression through the involvement of intermediates. Our results are in accordance with previous reports showing that HIF-1 α stabilization in *VHL*-deficient cell lines and clear-cell RCC results in the repression of endogenous signal transducer of activation of transcription (STAT)1 mediated by stimulated with retinoic acid (STRA)13 (Ivanova *et al.*, 2001; Ivanov *et al.*, 2007). STAT-1 regulates the constitutive expression of LMP2, a protein implicated in HLA-I antigen presentation (Chatterjee-Kishore *et al.*, 2000) likely responsible for the modulation of the HLA-I expression. Moreover, HLA-E promoter contains a STAT1 binding site (Gobin and van den Elsen, 2000). Interestingly, as the extinction of HIF-1 α restored a modest HLA-I induction, our results indicate that mutation of VHL in RCC cells may also control HLA-I expression in a HIF-1 α -independent manner. This suggests new additional HIF independent functions of VHL linked to immunogenicity.

With a weak HLA-I expression controlled by altered/mutated *VHL*, RCC-pE cells should therefore be closer to the threshold where the balance between activation and inhibition can be shifted. By contrast, RCC-pVHL transfectants express HLA-I molecules strongly, tipping the balance toward the inhibitory pathway, and they therefore appear to be normalized by the restored VHL function. Thus, changes in the ratio of activating to inhibitory ligands on these cells can have a very large effect on their recognition by NK cells. Differences in HLA-I expression between cancer cells and the normal surrounding tissue are frequent and are involved in the immune escape and tumor progression. RCC is known

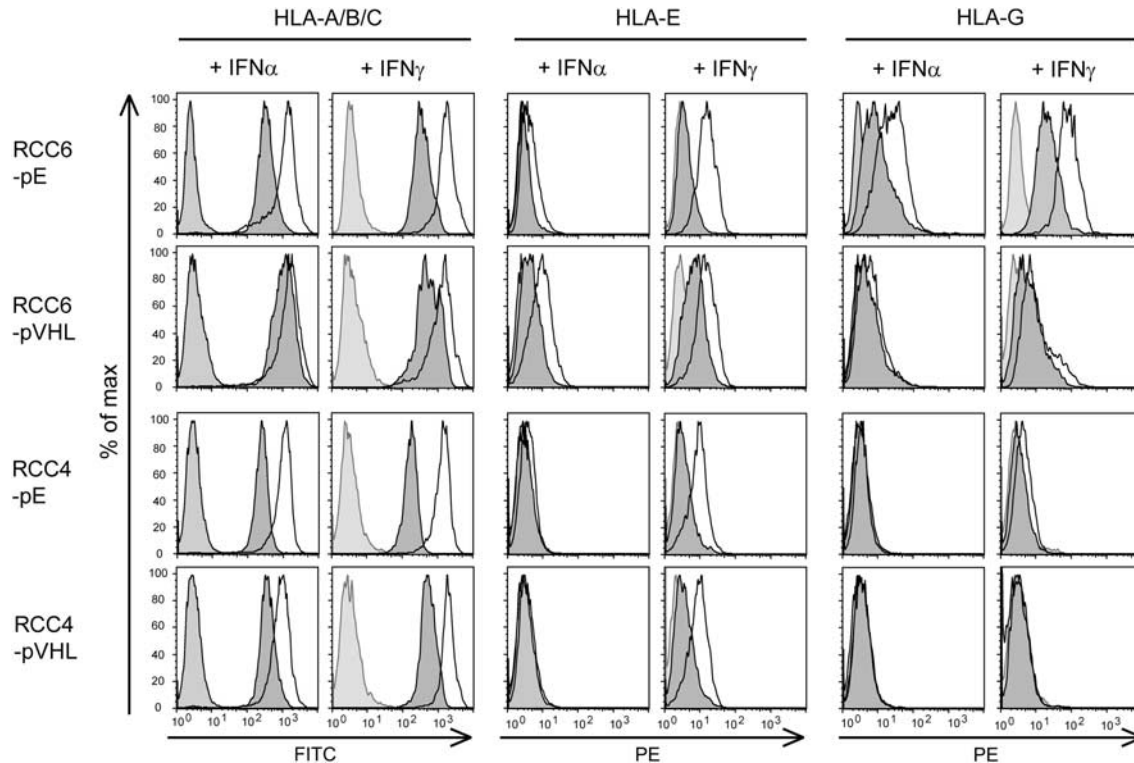


Figure 7 Expression of HLA-A/B/C, HLA-E and HLA-G molecules by RCC cells treated with IFN α and IFN γ (1000 U/ml for 48 h).

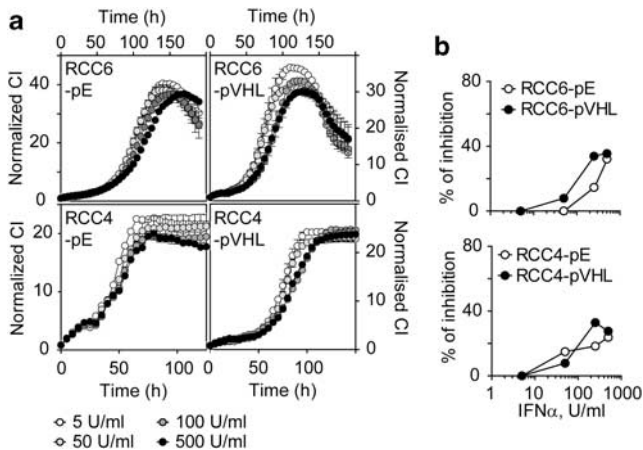


Figure 8 Proliferation of -pE and -pVHL-transfected RCC cells treated with IFN α assessed by dynamic measure of cell impedance (xCELLigence). (a) Normalized CI according to IFN α concentration. (b) IFN α dose-dependent percentage of proliferation inhibition, calculated during the exponential growth phase of RCC-pE (white circles) and RCC-pVHL (black circles) cells. One representative experiment of three is shown.

to downregulate HLA-I and II genes (Osborne *et al.*, 1997; Atkins *et al.*, 2004; Zagzag *et al.*, 2005). Abnormalities in the expression of HLA molecules altering antigen presentation may contribute to tumors evading the adaptive immune response (Seliger *et al.*, 2000), but promote NK activation.

Renal tumors produce additional factors that may favor their infiltration by NK cells, consistent with NK cells having a role in RCC. Strong secretion of IL6 by

RCC cells may favor tumor growth (Alberti *et al.*, 2004), but induce an inflammatory environment and recruit NK cells (Wysocki *et al.*, 2010). The chemoattractant cytokine, IL8, in the environment of renal tumors may also favor the recruitment of NK cells (Segeer *et al.*, 2006) and induce their activation together with the membrane IL15 present on renal cells (Wittnebel *et al.*, 2007).

RCC4-pE and RCC6-pE cells proliferation is faintly altered by IFN α while the cytokine exert a larger anti-proliferative effect on -pVHL transfectants, suggesting that responses to IFNs may be influenced by the *VHL* status, and calling the attention to fine-tuning of the biotherapy of RCC (IFN) in a ‘targeted’ manner (Kopper and Timar, 2006).

We report our original data providing evidence that mutant *VHL*, as found in most sporadic RCC, triggers NK cell activation. Although the correlation between *VHL* alteration in sporadic RCC and better survival is still controversial (Yao *et al.*, 2002; Banks *et al.*, 2006; Smits *et al.*, 2008), the absence of *VHL* mutation is associated with tumor aggressiveness and poor survival (Patard *et al.*, 2008, 2009). Our evidence that NK cells are activated differently by targets that bear or not *VHL* mutations are consistent with earlier findings that suggest that somatic *VHL* alteration is associated with better cancer-specific survival among those patients presenting with early stage (pT1 and pT2) clear-cell RCC (Parker *et al.*, 2005). Strong expression of the cancer antigen, carbonic anhydrase IX, associated with *VHL* loss of function (Grabmaier *et al.*, 2004) is correlated with a greater spontaneous immune response

leading to a better outcome in some cases. Furthermore, carbonic anhydrase IX expression strongly predicts the response to IL2-based immunotherapy in metastatic clear-cell RCC (Atkins *et al.*, 2009). These results suggest that determination of the *VHL* gene status in sporadic RCC patients may help choose the appropriate therapeutic strategy because certain *VHL* mutations may condition RCC immunogenicity.

Materials and methods

Cells and treatments

RCC6 and RCC7 cells derived from clear-cell renal tumors were described previously (Viey *et al.*, 2005). Stable transfectants were generated from RCC6 by transfection with pRC-HAVHL or the empty vector, pRC, using lipofectamine 2000 (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), and followed by selection with G418 (3 and 1 mg/ml, respectively). RCC4-pE and RCC4-pVHL cell lines (provided by Dr N Rioux) were cultured with 0.5 mg/ml of G418. NK cells were purified from peripheral blood mononuclear cells (PBMC) by negative immunoselection using an NK selection kit (Miltenyi Biotech, Paris, France) and were cultured with IL2 (10 ng/ml, R&D Systems, Lille, France) for 6–12 days.

To produce hypoxic conditions, cells were incubated in a chamber in the atmosphere containing 0.5% O₂, 5% CO₂ and 94.5% N₂ at 37 °C for 20 h.

To knock down HIF-1 α , RCC cells were electroporated with the ON-TARGETplus SMARTpool siRNA targeting HIF-1 α and the non-targeting pool as a negative control (Dharmacon, Austin, TX, USA); 10⁶ cells were nucleofected using the Nucleofector Kit V (Amaxa Biosystems, Gaithersburg, MD, USA) with 1 μ M of siRNA.

VHL sequencing

A DNA Tissue mini kit (Qiagen, Courtaboeuf, France) was used according to the manufacturer's protocol to extract genomic DNA from RCC cells. The three *VHL* coding exons, with exon–intron junctions, and promoter region, were screened for mutations by direct sequencing as previously described with primers available on request (Gad *et al.*, 2007).

Protein extraction and western blotting

Cells were lysed in NP40 buffer (phosphate buffered saline, 1% Triton, 2 mM EDTA, 50 mM NaF, protease inhibitors cocktail (Roche, Laval, Canada)), sonicated and centrifugated 30 min at 20 000 g. Proteins were separated by SDS–PAGE, electrotransferred onto PVDF membrane (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) and visualized by chemiluminescence (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ, USA). We used anti-HIF-1 α (54/HIF-1 α , BD Pharmingen, San Diego, CA, USA), anti-HIF-2 α (ab199, Abcam, Paris, France) and anti-HLA-I (HC-10). Anti-HA, anti-actin, anti- β -tubulin and secondary peroxidase-conjugated antibodies were from Santa Cruz (Heidelberg, Germany).

Measure of VEGF secretion by RCC cell lines

In total, 1 500 000 cells were cultured in 6-well plates in 2 ml of serum-free medium for 24 h. Cytokine concentrations in the supernatant were determined using ELISA assays from R&D Systems. Comparisons of mean values between groups were performed using unpaired *t*-test: **0.001 < *P* < 0.01, *0.01 < *P* < 0.05.

Phenotype analysis

RCC cells were grown for 48 h in serum-free medium supplemented with or without 1000 U/ml of IFN α (Roferon, Roche) or IFN γ (Miltenyi Biotech), stained and analyzed in a FACSCalibur cytometer (Becton Dickinson, Lincoln Park, NJ, USA). We used the following antibodies: conjugated anti-CD54, anti-CD56, anti-HLA-ABC (B9.12.1) and anti-CD112 from Beckman Coulter (Villepinte, France); anti-CD155 (R&D Systems), unconjugated anti-HLA-G (87G) and anti-HLA-E (MEM/E-08) from Exbio (Vestec, Czech Republic); anti-MIC-A, MIC-B, -ULBP1, -ULBP2, -ULBP3 and -VCAM-1 from R&D Systems; secondary antibodies from Jackson ImmunoResearch (Suffolk, UK).

Measure of IFN γ secretion and degranulation by RCC-stimulated NK cells

NK cells (10⁵ cells) were co-cultured for 4 h with RCC cells at a 1/1 effector/target ratio in the presence of IL2 (10 ng/ml). IFN γ concentration was measured in supernatants using a DuoSet ELISA kit (R&D Systems). To measure NK cell degranulation, cells were labeled with CD107a-FITC (BD Pharmingen) and CD45-APC (Beckman Coulter). Some co-cultures were performed in the presence of 10 μ g/ml of the following mAbs or isotype controls: NKG2D, NKG2A, NKp30, NKp46, DNAM1 (R&D Systems), HLA-ABC (B9.12.1), HLA-G (87G) and HLA-E (MEM/E-08); mAbs were pre-incubated with NK cells (or with target cells for HLA-I blocking) for 15 min before the co-culture. Comparisons of mean values were performed using Wilcoxon matched pairs test and *P* < 0.05 was regarded as significant.

xCELLigence assays

The xCELLigence System (Roche) monitors cellular events in real time without the incorporation of labels. It measures electrical impedance across interdigitated micro-electrodes integrated on the bottom of tissue culture E-Plates. The impedance measurement provides quantitative information about the status of the adherent cells, including cell number, viability and morphology. For cell-mediated lysis assays, adherent targets (5000) were seeded into the wells of 96 \times E-Plates in 100 μ l of medium. Cell adhesion and growth were monitored for 4 h. NK cells were added to various concentrations in a volume of 50 μ l per well. Co-cultures were assessed by the system with a measure every 5 min for up to 20 h. Results, expressed as cellular index (CI), were normalized with RTCA Software (Roche, Applied Science, Mannheim, Germany) (nCI), and are expressed as percentage of specific lysis: % lysis = (nCI (no effector) – nCI (effector))/nCI (no effector) \times 100.

To evaluate the effect of IFN α on RCC cell lines, 2500 cells per well were seeded and allow adhering for 3 h. Various concentrations of IFN α were added and cell proliferation was monitored for up to 3 days. The CI was normalized and percentage of inhibition was calculated during the exponential growth phase.

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

Acknowledgements

This work was supported by grants from INSERM, INCa, la Fondation pour la Recherche Medicale (FRM) and la Ligue Nationale contre le Cancer. AP had a grant from FRM. We thank Dr Nadege Bercovici for helpful discussion and reading of manuscript.

References

- Aggelis V, Craven RA, Peng J, Harnden P, Cairns DA, Maher ER *et al.* (2009). Proteomic identification of differentially expressed plasma membrane proteins in renal cell carcinoma by stable isotope labelling of a von Hippel-Lindau transfectant cell line model. *Proteomics* **9**: 2118–2130.
- Alberti L, Thomachot MC, Bachelot T, Menetrier-Caux C, Puisieux I, Blay JY. (2004). IL-6 as an intracrine growth factor for renal carcinoma cell lines. *Int J Cancer* **111**: 653–661.
- Atkins D, Ferrone S, Schmahl GE, Storkel S, Seliger B. (2004). Down-regulation of HLA class I antigen processing molecules: an immune escape mechanism of renal cell carcinoma? *J Urol* **171**: 885–889.
- Atkins MB, Choueiri TK, Cho D, Regan M, Signoretti S. (2009). Treatment selection for patients with metastatic renal cell carcinoma. *Cancer* **115**: 2327–2333.
- Banks RE, Tirukonda P, Taylor C, Hornigold N, Astuti D, Cohen D *et al.* (2006). Genetic and epigenetic analysis of von Hippel-Lindau (VHL) gene alterations and relationship with clinical variables in sporadic renal cancer. *Cancer Res* **66**: 2000–2011.
- Braud V, Allan D, O'Callaghan C, Soderstrom K, D'Andrea A, Ogg G *et al.* (1998). HLA-E binds to natural killer cell receptors CD94/NKG2A, B and C. *Nature* **391**: 795–799.
- Chatterjee-Kishore M, Wright KL, Ting JP, Stark GR. (2000). How Stat1 mediates constitutive gene expression: a complex of unphosphorylated Stat1 and IRF1 supports transcription of the LMP2 gene. *EMBO J* **19**: 4111–4122.
- Chuang SS, Kumaresan PR, Mathew PA. (2001). 2B4 (CD244)-mediated activation of cytotoxicity and IFN-gamma release in human NK cells involves distinct pathways. *J Immunol* **167**: 6210–6216.
- Cozar JM, Canton J, Tallada M, Concha A, Cabrera T, Garrido F *et al.* (2005). Analysis of NK cells and chemokine receptors in tumor infiltrating CD4T lymphocytes in human renal carcinomas. *Cancer Immunol Immunother* **54**: 858–866.
- Donskov F, Bennedsgaard KM, Von Der Maase H, Marcussen N, Fisker R, Jensen JJ *et al.* (2002). Intratumoural and peripheral blood lymphocyte subsets in patients with metastatic renal cell carcinoma undergoing interleukin-2 based immunotherapy: association to objective response and survival. *Br J Cancer* **87**: 194–201.
- Foster K, Prowse A, van den Berg A, Fleming S, Hulsbeek MM, Crossey PA *et al.* (1994). Somatic mutations of the von Hippel-Lindau disease tumour suppressor gene in non-familial clear cell renal carcinoma. *Hum Mol Genet* **3**: 2169–2173.
- Gad S, Lefevre SH, Khoo SK, Giraud S, Vieillefond A, Vasiliu V *et al.* (2007). Mutations in BHD and TP53 genes, but not in HNF1beta gene, in a large series of sporadic chromophobe renal cell carcinoma. *Br J Cancer* **96**: 336–340.
- Gati A, Da Rocha S, Guerra N, Escudier B, Moretta A, Chouaib S *et al.* (2004). Analysis of the natural killer mediated immune response in metastatic renal cell carcinoma patients. *Int J Cancer* **109**: 393–401.
- Gilfillan S, Chan CJ, Cella M, Haynes NM, Rapaport AS, Boles KS *et al.* (2008). DNAM-1 promotes activation of cytotoxic lymphocytes by nonprofessional antigen-presenting cells and tumors. *J Exp Med* **205**: 2965–2973.
- Gnarra JR, Tory K, Weng Y, Schmidt L, Wei MH, Li H *et al.* (1994). Mutations of the VHL tumour suppressor gene in renal carcinoma. *Nat Genet* **7**: 85–90.
- Gobin SJ, van den Elsen PJ. (2000). Transcriptional regulation of the MHC class Ib genes HLA-E, HLA-F, and HLA-G. *Hum Immunol* **61**: 1102–1107.
- Grabmaier K, A de Weijert MC, Verhaegh GW, Schalken JA, Oosterwijk E. (2004). Strict regulation of CAIX(G250/MN) by HIF-1alpha in clear cell renal cell carcinoma. *Oncogene* **23**: 5624–5631.
- Ibrahim EC, Guerra N, Lacombe MJ, Angevin E, Chouaib S, Carosella ED *et al.* (2001). Tumor-specific up-regulation of the nonclassical class I HLA-G antigen expression in renal carcinoma. *Cancer Res* **61**: 6838–6845.
- Ivanov SV, Salnikow K, Ivanova AV, Bai L, Lerman MI. (2007). Hypoxic repression of STAT1 and its downstream genes by a pVHL/HIF-1 target DEC1/STRA13. *Oncogene* **26**: 802–812.
- Ivanova AV, Ivanov SV, Danilkovitch-Miagkova A, Lerman MI. (2001). Regulation of STRA13 by the von Hippel-Lindau tumor suppressor protein, hypoxia, and the UBC9/ubiquitin proteasome degradation pathway. *J Biol Chem* **276**: 15306–15315.
- Kilburn BA, Wang J, Duniec-Dmuchowski ZM, Leach RE, Romero R, Armant DR. (2000). Extracellular matrix composition and hypoxia regulate the expression of HLA-G and integrins in a human trophoblast cell line. *Biol Reprod* **62**: 739–747.
- Kopper L, Timar J. (2006). Genomics of renal cell cancer—does it provide breakthrough? *Pathol Oncol Res* **12**: 5–11.
- Lahn M, Fisch P, Kohler G, Kunzmann R, Hentrich I, Jesuiter H *et al.* (1999). Pro-inflammatory and T cell inhibitory cytokines are secreted at high levels in tumor cell cultures of human renal cell carcinoma. *Eur Urol* **35**: 70–80.
- Lanier LL. (2000). Turning on natural killer cells. *J Exp Med* **191**: 1259–1262.
- Latif F, Tory K, Gnarra J, Yao M, Duh FM, Orcutt ML *et al.* (1993). Identification of the von Hippel-Lindau disease tumor suppressor gene. *Science* **260**: 1317–1320.
- Linehan WM, Pinto PA, Bratslavsky G, Pfaffenroth E, Merino M, Vocke CD *et al.* (2009). Hereditary kidney cancer: unique opportunity for disease-based therapy. *Cancer* **115**: 2252–2261.
- Martin-Fontecha A, Thomsen LL, Brett S, Gerard C, Lipp M, Lanzavecchia A *et al.* (2004). Induced recruitment of NK cells to lymph nodes provides IFN-gamma for T(H)1 priming. *Nat Immunol* **5**: 1260–1265.
- Maxwell PH, Wiesener MS, Chang GW, Clifford SC, Vaux EC, Cockman ME *et al.* (1999). The tumour suppressor protein VHL targets hypoxia-inducible factors for oxygen-dependent proteolysis. *Nature* **399**: 271–275.
- Min JH, Yang H, Ivan M, Gertler F, Kaelin Jr WG, Pavletich NP. (2002). Structure of an HIF-1alpha-pVHL complex: hydroxyproline recognition in signaling. *Science* **296**: 1886–1889.
- Moretta A, Bottino C, Vitale M, Pende D, Cantoni C, Mingari M *et al.* (2001). Activating receptors and coreceptors involved in human natural killer cell-mediated cytotoxicity. *Annu Rev Immunol* **19**: 197–223.
- Moretta L, Moretta A. (2004). Unravelling natural killer cell function: triggering and inhibitory human NK receptors. *EMBO J* **23**: 255–259.
- Mouillot G, Marcou C, Zidi I, Guillard C, Sangrouber D, Carosella ED *et al.* (2007). Hypoxia modulates HLA-G gene expression in tumor cells. *Hum Immunol* **68**: 277–285.
- Negrier S, Escudier B, Lasset C, Douillard JY, Savary J, Chevreau C *et al.* (1998). Recombinant human interleukin-2, recombinant human interferon alfa-2a, or both in metastatic renal-cell carcinoma. Groupe Francais d'Immunotherapie. *N Engl J Med* **338**: 1272–1278.
- Osborne A, Tschickardt M, Blanck G. (1997). Retinoblastoma protein expression facilitates chromatin remodeling at the HLA-DRA promoter. *Nucleic Acids Res* **25**: 5095–5102.
- Parker AS, Cheville JC, Lohse CM, Igel T, Leibovich BC, Blute ML. (2005). Loss of expression of von Hippel-Lindau tumor suppressor protein associated with improved survival in patients with early-stage clear cell renal cell carcinoma. *Urology* **65**: 1090–1095.
- Patard JJ, Fergelot P, Karakiewicz PI, Klatter T, Trinh QD, Rioux-Leclercq N *et al.* (2008). Low CAIX expression and absence of VHL gene mutation are associated with tumor aggressiveness and poor survival of clear cell renal cell carcinoma. *Int J Cancer* **123**: 395–400.
- Patard JJ, Rioux-Leclercq N, Masson D, Zerrouki S, Jouan F, Collet N *et al.* (2009). Absence of VHL gene alteration and high VEGF expression are associated with tumour aggressiveness and poor survival of renal-cell carcinoma. *Br J Cancer* **101**: 1417–1424.
- Rajagopalan S, Fu J, Long EO. (2001). Cutting edge: induction of IFN-gamma production but not cytotoxicity by the killer cell Ig-like

- receptor KIR2DL4 (CD158d) in resting NK cells. *J Immunol* **167**: 1877–1881.
- Reefman E, Kay JG, Wood SM, Offenhauser C, Brown DL, Roy S *et al.* (2010). Cytokine secretion is distinct from secretion of cytotoxic granules in NK cells. *J Immunol* **184**: 4852–4862.
- Rini BI, Campbell SC, Escudier B. (2009). Renal cell carcinoma. *Lancet* **373**: 1119–1132.
- Schleypen JS, Baur N, Kammerer R, Nelson PJ, Rohrmann K, Grone EF *et al.* (2006). Cytotoxic markers and frequency predict functional capacity of natural killer cells infiltrating renal cell carcinoma. *Clin Cancer Res* **12**: 718–725.
- Schleypen JS, Von Geldern M, Weiss EH, Kotzias N, Rohrmann K, Schendel DJ *et al.* (2003). Renal cell carcinoma-infiltrating natural killer cells express differential repertoires of activating and inhibitory receptors and are inhibited by specific HLA class I allotypes. *Int J Cancer* **106**: 905–912.
- Seeger S, Henger A, Schmid H, Kretzler M, Draganovici D, Brandt U *et al.* (2006). Expression of the chemokine receptor CXCR1 in human glomerular diseases. *Kidney Int* **69**: 1765–1773.
- Seliger B, Maeurer MJ, Ferrone S. (2000). Antigen-processing machinery breakdown and tumor growth. *Immunol Today* **21**: 455–464.
- Smits KM, Schouten LJ, van Dijk BA, Hulsbergen-van de Kaa CA, Wouters KA, Oosterwijk E *et al.* (2008). Genetic and epigenetic alterations in the von Hippel-Lindau gene: the influence on renal cancer prognosis. *Clin Cancer Res* **14**: 782–787.
- Urcan E, Haertel U, Styllou M, Hickel R, Scherthan H, Reichl FX. (2009). Real-time xCELLigence impedance analysis of the cytotoxicity of dental composite components on human gingival fibroblasts. *Dent Mater* **26**: 51–58.
- Viey E, Fromont G, Escudier B, Morel Y, Da Rocha S, Chouaib S *et al.* (2005). Phosphostim-activated gamma delta T cells kill autologous metastatic renal cell carcinoma. *J Immunol* **174**: 1338–1347.
- Whaley JM, Naglich J, Gelbert L, Hsia YE, Lamiell JM, Green JS *et al.* (1994). Germ-line mutations in the von Hippel-Lindau tumor-suppressor gene are similar to somatic von Hippel-Lindau aberrations in sporadic renal cell carcinoma. *Am J Hum Genet* **55**: 1092–1102.
- Wittnebel S, Da Rocha S, Giron-Michel J, Jalil A, Opolon P, Escudier B *et al.* (2007). Membrane-bound interleukin (IL)-15 on renal tumor cells rescues natural killer cells from IL-2 starvation-induced apoptosis. *Cancer Res* **67**: 5594–5599.
- Wysocki PJ, Kazimierzczak U, Suchorska W, Kotlarski M, Malicki J, Mackiewicz A. (2010). Gene-modified tumor vaccine secreting a designer cytokine Hyper-Interleukin-6 is an effective therapy in mice bearing orthotopic renal cell cancer. *Cancer Gene Ther* **17**: 465–475.
- Yang JC, Sherry RM, Steinberg SM, Topalian SL, Schwartzentruber DJ, Hwu P *et al.* (2003). Randomized study of high-dose and low-dose interleukin-2 in patients with metastatic renal cancer. *J Clin Oncol* **21**: 3127–3132.
- Yao M, Yoshida M, Kishida T, Nakaigawa N, Baba M, Kobayashi K *et al.* (2002). VHL tumor suppressor gene alterations associated with good prognosis in sporadic clear-cell renal carcinoma. *J Natl Cancer Inst* **94**: 1569–1575.
- Zagzag D, Salnikow K, Chiriboga L, Yee H, Lan L, Ali MA *et al.* (2005). Downregulation of major histocompatibility complex antigens in invading glioma cells: stealth invasion of the brain. *Lab Invest* **85**: 328–341.
- Zhu J, Wang X, Xu X, Abassi YA. (2006). Dynamic and label-free monitoring of natural killer cell cytotoxic activity using electronic cell sensor arrays. *J Immunol Methods* **309**: 25–33.

Supplementary Information accompanies the paper on the Oncogene website (<http://www.nature.com/onc>)

Annexe 3

Brevet INSERM N° EP12305823.2 (2012)

« Methods and kits for determining whether a cytomegalovirus infection in a transplanted patient is susceptible to induce allograft rejection »

N. Gervois, M. Allard et B. Charreau

METHODS AND KITS FOR DETERMINING WHETHER A CYTOMEGALOVIRUS INFECTION IN A TRANSPLANTED PATIENT IS SUSCEPTIBLE TO INDUCE ALLOGRAFT REJECTION

FIELD OF THE INVENTION

The present invention relates to methods and kits for determining whether a cytomegalovirus infection in a transplanted patient is susceptible to induce allograft rejection.

BACKGROUND OF THE INVENTION

Transplantation is considered as the treatment of choice for many patients suffering with organ failure, for improving survival and quality-of-life even. However rejection of allograft has always been the major obstacle to transplantation success.

Cytomegalovirus (CMV) is a common opportunistic pathogen that persists for life in the human host after primary infection. While CMV infection of immunocompetent individuals generally results in subclinical diseases, it may cause serious life threatening complications in immunocompromised ones. Consequently, transplant patients with immunosuppressive regimens are particularly prone to CMV disease and it is estimated that up to 75% of all patients undergoing solid organ transplantation experience new infection or reactivation of latent CMV infection(1, 2).

CMV infection has been implicated in the development of both acute and chronic allograft rejection and has been associated with decreased allograft and patient survival(3, 4). Although association between CMV infection and allograft rejection is well admitted, the precise mechanisms involved remain uncertain.

CMV could account for graft rejection by triggering the activation of endothelial cells, which are preferential targets of CMV infection(5-7). This might directly increase the expression of MHC, costimulatory and adhesion molecules on the allograft endothelium through the induction of mediators release such as type I IFN. Then, activated graft's EC may attract and activate recipient's cytotoxic T cells, which can trigger rejection(8). CMV infection could also be implicated in the development of allograft rejection because of cross-reactivity of CMV-specific T cells toward allogeneic HLA molecules as we and others have previously documented(9-12). An alternate mechanism has been suggested by studies reporting the existence in CMV seropositive individuals of CD8 T cells that recognize, in a HLA-E restricted-fashion, peptides derived from the leader sequences of both HCMV-UL40 and allogeneic classical HLA-I molecules(13-15). Consequently, while this HLA-E-restricted T cells potentially mediate protection against CMV infection, they may also promote graft rejection through recognition of peptides derived from allogeneic HLA-I molecules presented by HLA-E on graft cells.

One of the most striking features of the non-classical HLA-I molecule HLA-E is its highly conserved nature. Only two allelic forms exist in the Caucasian population, HLA-E*0101 (HLA-E^{107R}) and HLA-E*0103 (HLA-E^{107G}) that differ at one amino acid position(16). As a consequence, HLA-E-bound peptides are highly restricted, comprising mostly signal peptides derived from others HLA-I proteins(17). Class Ib molecules are often considered to have a prominent role in innate immunity. Among this line, surface expression of HLA-E bound to autologous HLA class I derived peptides, indicating the integrity of the MHC I antigen processing machinery and acting as a ligand for CD94-NKG2 receptors, modulate the activation of NK and T cells(18, 19). However, in times of cellular stress or infections, HLA-E is associated with a much more diverse repertoire of peptides, which can be sensed directly

by $\alpha\beta$ TCR(20, 21). Indeed, several studies in human and mice have highlighted a dual role for unclassical HLA-Ib molecules, in that, like classical HLA-Ia molecules (ie HLA-A/B/C), they can mediate adaptative immune responses to bacteria(22, 23), viruses(13, 24, 25), tumors(26) and self-antigens(27, 28).

Although HLA-E is virtually expressed in all tissues, its surface expression profile is more restricted than that of classical HLA-I molecules. It was previously reported that, HLA-E surface expression in normal nonlymphoid organs is mainly restricted to endothelial cells(29). Upon solid organ transplantation, because graft endothelial cells display MHC-peptide complexes at their surface and come in regular contact with recipient circulating T cells, the endothelium of allografts plays a central role in eliciting immune-mediated rejection(8, 30). However, while HLA-E has been shown to behave as a strong transplantation antigen in rodent models(31), whether HLA-E expressed on human graft's tissues could trigger an allogeneic cellular response remains to be documented.

SUMMARY OF THE INVENTION

The present invention relates to a method for determining whether a cytomegalovirus infection in a transplanted patient is susceptible to induce allograft rejection comprising detecting the presence of at least one HLA-E-restricted CD8 $\alpha\beta$ T cell population displaying reactivity against peptides derived from the leader sequences of both HCMV-UL40 protein and allogeneic classical HLA-I molecules in a blood sample of the patient, wherein the presence of said populations indicated that the cytomegalovirus infection in the transplant patient is susceptible to induce allograft rejection.

DETAILED DESCRIPTION OF THE INVENTION

Although association between CMV infection and allograft rejection is well admitted, the precise mechanisms involved remain uncertain. Characterization of alloreactive T cells in CMV seropositive kidney transplant patients allowed us to identify a monoclonal HLA-E-restricted CD8 $\alpha\beta$ T cell population displaying reactivity against peptides derived from the leader sequences of both HCMV-UL40 and allogeneic classical HLA-I molecules. As HLA-E expression in nonlymphoid organs is mainly restricted to endothelial cells, the inventors investigated the reactivity of this HLA-E-restricted T cell population towards allogeneic endothelial cells. They clearly demonstrated that CMV-committed HLA-E-restricted T cells efficiently recognized and killed allogeneic endothelial cells *in vitro*. Therefore, while HLA-E-restricted T cells have potential to contribute to the control of CMV infection, they may also directly mediate graft rejection *in vivo* through recognition of peptides derived from allogeneic HLA-I molecules on graft cells. Moreover, the data indicate that this alloreactivity is tightly regulated by NK receptors, especially by inhibitory KIR2DL2 that strongly prevents TCR-induced activation through recognition of HLA-C molecules. Hence, a better evaluation of the role of CMV-committed HLA-E-restricted T cells in transplantation and of the impact of HLA-genotype, especially HLA-C, on their alloreactivity may represent a risk factor following organ transplantation.

Accordingly, the present invention relates to a method for determining whether a cytomegalovirus infection in a transplanted patient is susceptible to induce allograft rejection comprising detecting the presence of at least one HLA-E-restricted CD8 $\alpha\beta$ T cell population displaying reactivity against peptides derived from the leader sequences of both HCMV-UL40 protein and allogeneic classical HLA-I molecules in a blood sample of the patient,

wherein the presence of said populations indicated that the cytomegalovirus infection in the transplant patient is susceptible to induce allograft rejection.

The patient may be transplanted with any type of solid grafts. Grafts of interest include, but are not limited to: transplanted heart, kidney, lung, liver, pancreas, pancreatic islets, brain tissue, stomach, large intestine, small intestine, cornea, skin, trachea, bone, bone marrow, muscle, or bladder.

Cytomegalovirus (CMV) infection may be diagnosed with any standard methods well known in the art. Typically serology provides indirect evidence of recent CMV infection based upon changes in antibody titers at different time points during a clinical illness. Many different antibody detection techniques are available, including complement-fixation techniques, enzyme-linked immunosorbent assays (ELISA), latex agglutination, radioimmunoassays, and indirect hemagglutination assays (Chou S. Newer methods for diagnosis of cytomegalovirus infection. *Rev Infect Dis* 1990; 12 Suppl 7:S727.). Liquid-phase luciferase immunoprecipitation systems have also been developed to provide qualitative assessments of anti-CMV antibodies (Burbelo PD, Issa AT, Ching KH, *et al.* Highly quantitative serological detection of anti-cytomegalovirus (CMV) antibodies. *Virology* 2009; 6:45). Accordingly, the patient is typically a cytomegalovirus-seropositive transplant patient.

The term “blood sample” means a whole blood sample obtained from the patient. Typically, the peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) are isolated by Ficoll-density gradient centrifugation.

Standard methods well known in the art may be used for detecting the presence of at least one the HLA-E-restricted CD8 $\alpha\beta$ T cell population of the invention in the blood sample. For example, standard methods for detecting the expression of the specific surface markers of the population may be performed. The inventors indeed demonstrated that the population is typically characterized by the classical surface markers of T CD8 cells (e.g. CD3 and CD8) and by the expression of the Killer-Cell Immunoglobulin-like Receptor (KIR) KIR2DL2. The population may also be characterized by CD8 $\alpha\beta^+$ CD62L $^-$ CCR7 $^-$ CD27 $^-$ CD28 $^{+/-}$ CD45RA lo CD45RO hi CD57 $^-$ surface phenotype and the surface expression of ILT-2, NKG2-D and CD94. Accordingly, the detection of at least one HLA-E-restricted CD8 $\alpha\beta$ T cell population of the invention may be determined by using a set of binding partners directed against certain surface marker of the invention (e.g. CD8 and KIR2DL2).

As used herein, the term “binding partner directed against the surface marker” refers to any molecule (natural or not) that is able to bind the Surface marker with high affinity. Said binding partners include but are not limited to antibodies, aptamer, and peptides. The binding partners may be antibodies that may be polyclonal or monoclonal, preferably monoclonal, specifically directed against said Surface marker. In another embodiment, the binding partners may be a set of aptamers.

Polyclonal antibodies of the invention or a fragment thereof can be raised according to known methods by administering the appropriate antigen or epitope to a host animal selected, e.g., from pigs, cows, horses, rabbits, goats, sheep, and mice, among others. Various adjuvants known in the art can be used to enhance antibody production. Although antibodies useful in practicing the invention can be polyclonal, monoclonal antibodies are preferred. Monoclonal antibodies of the invention or a fragment thereof can be prepared and isolated using any technique that provides for the production of antibody molecules by continuous cell lines in culture. Techniques for production and isolation include but are not limited to the hybridoma technique originally; the human B-cell hybridoma technique; and the EBV-hybridoma

technique. In a particular embodiment, antibodies as described in the EXAMPLE may be used.

In another embodiment, the binding partners may be aptamers. Aptamers are a class of molecule that represents an alternative to antibodies in term of molecular recognition. Aptamers are oligonucleotide or oligopeptide sequences with the capacity to recognize virtually any class of target molecules with high affinity and specificity. Such ligands may be isolated through Systematic Evolution of Ligands by EXponential enrichment (SELEX) of a random sequence library. The random sequence library is obtainable by combinatorial chemical synthesis of DNA. In this library, each member is a linear oligomer, eventually chemically modified, of a unique sequence.

The binding partners of the invention such as antibodies or aptamers may be labelled with a detectable molecule or substance, such as preferentially a fluorescent molecule, or a radioactive molecule or any others labels known in the art. Labels are known in the art that generally provide (either directly or indirectly) a signal.

As used herein, the term "labelled", with regard to the antibody or aptamer, is intended to encompass direct labelling of the antibody or aptamer by coupling (i.e., physically linking) a detectable substance, such as a fluorophore (e.g. Fluorescein Isothiocyanate (FITC) or Phycoerythrin (PE) or Allophycocyanin (APC) or Allophycocyanin-Cyanin7 (APC-H7) or Brilliant Violet 421) or a radioactive agent to the antibody or aptamer, as well as indirect labelling of the probe or antibody by reactivity with a detectable substance. Preferably, the antibodies against the Surface marker are already conjugated to a fluorophore (e.g. FITC-conjugated and/or PE-conjugated).

The aforementioned assays may involve the binding of the binding partners (ie. antibodies or aptamers) to a solid support. The solid surface could be a microtitration plate coated with the set of binding partners. Alternatively, the solid surfaces may be beads, such as activated beads, magnetically responsive beads. Beads may be made of different materials, including but not limited to glass, plastic, polystyrene, and acrylic. In addition, the beads are preferably fluorescently labelled. In a preferred embodiment, fluorescent beads are those contained in TruCount(TM) tubes, available from Becton Dickinson Biosciences, (San Jose, California). According to the invention, methods of flow cytometry are preferred methods for measuring the level of Surface markers at the platelet surface. Said methods are well known in the art. For example, fluorescence activated cell sorting (FACS) may be therefore used as described in the EXAMPLE.

In one embodiment, the reactivity of at least one HLA-E-restricted CD8 $\alpha\beta$ T cell population against peptides derived from the leader sequences of HCMV-UL40 protein and allogeneic classical HLA-I molecules may be further determined according to any well known method in the art. For example once isolated, the population may be cultured as described in the EXAMPLE and various assays may be used to determine the alloreactivity against the leader sequences of HCMV-UL40 protein and allogeneic classical HLA-I molecules. Typically, a B-EBV cell line (i.e a B cell immortalized with Epstein Barr virus) transected with a nucleic acid molecule encoding for a HLA-E polypeptide (preferably together with a leader sequence peptide from a HLA-B polypeptide) may be used. The cell line is then pulsed with at least one UL40 peptide as above described and incubated with the isolated CD8 $\alpha\beta$ T cell population of the invention. The production of at least one cytokine or interleukin (e.g. TNF-alpha, IFN-gamma, ...) may be finally assessed, and it is concluded that the isolated HLA-E-restricted CD8 $\alpha\beta$ T cell population of the invention is reactive against peptides derived from the leader sequences of HCMV-UL40 protein (different human CMV strains) when the production of the cytokine or interleukin is detected. Such assays are typically described in the EXAMPLE. Alternatively HLA-E tetramer refolded with an alloreactive HCMV-UL40 peptide may be

used as described in the EXAMPLE for determining whether the populations of the invention is able to recognize the leader sequence of both HCMV-UL40 protein. The UL40 peptide may be selected from the group consisting of VMAPRTLIL (SEQ ID NO:1), VMAPRTLVL (SEQ ID NO:2) and VMAPRTLIL (SEQ ID NO:3).

The method of the invention may further comprise determining the HLA class I typing of transplant donor. Data on the HLA typing of transplant donor may inform about i) the presence of one or several HLA allele(s) whom signal sequence is (are) the same as above mentioned CMV sequences, susceptible to be recognize by CMV-committed HLA-E-restricted CD8 $\alpha\beta$ T cells and ii) the presence of one or several HLA-C allele(s) corresponding to KIR2DL2 ligand. Indeed the presence of at least one monoclonal HLA-E-restricted CD8 $\alpha\beta$ T cell population of the invention with the presence of one or several HLA allele(s) whom signal sequence is (are) the same as above mentioned CMV sequences associated with the absence of a HLA-C ligand for KIR2DL2 in the graft organ indicate that CMV infection is highly susceptible to induce graft rejection (see Table A-C). Methods for determining the HLA class I haplotype (of donors and recipients) and are well known in the art and may be performed on blood samples and involve use of HLA-Class I antibodies or multiplex PCR reactions.

Table A: graft risk rejection considerations when a HLA-E-restricted CD8 $\alpha\beta$ T cell population displaying reactivity against VMAPRTLIL (SEQ ID NO:1) is detected in combination with the HLA typing of transplant donor:

HLA typing of transplant donor	Graft rejection risk
HLA-A*01,-A*03, -A*11, -A*29, -A*30, -A*31, -A*32, -A*33, -A*36 -A*74, -Cw*2 and -Cw*15 with the absence of a HLA-C ligand for KIR2DL2 (HLA-Cw3 and related, 'group1' alleles)	High risk of graft rejection

Table B: graft risk rejection considerations when a HLA-E-restricted CD8 $\alpha\beta$ T cell population displaying reactivity against VMAPRTLVL (SEQ ID NO:2) is detected in combination with the HLA typing of transplant donor:

HLA typing of transplant donor	Graft rejection risk
HLA-A*02, -A*23, -A*24, -A*25, -A*26, -A*3402, -A*43, -A*66 and -A*69 with the absence of a HLA-C ligand for KIR2DL2 (HLA-Cw3 and related, 'group1' alleles)	High risk of graft rejection

Table C: graft risk rejection considerations when a HLA-E-restricted CD8 $\alpha\beta$ T cell population displaying reactivity against VMAPRTLIL (SEQ ID NO:3) is detected in combination with the HLA typing of transplant donor:

HLA typing of transplant donor	Graft rejection risk
HLA-Cw*01, -Cw*03, -Cw*0401, -Cw*05, -Cw*06, -Cw*0801-03, -Cw*12, -Cw*14, -Cw*16 and -Cw*1702 with the absence of a HLA-C ligand for KIR2DL2 (HLA-Cw3 and related, 'group1' alleles)	High risk of graft rejection

The present invention also relates to an agent depleting at least one HLA-E-restricted CD8 $\alpha\beta$ T cell populations as above described for use in the prophylactic treatment of a patient considered at risk for graft rejection by the method of the invention.

Typically, said agent may be an anti-KIR2DL2 monoclonal antibody or a soluble KIR2DL2 ligand.

The agent of the invention may be combined with pharmaceutically acceptable excipients, and optionally sustained-release matrices, such as biodegradable polymers, to form therapeutic compositions.

In the pharmaceutical compositions of the present invention, the active principle, alone or in combination with another active principle, can be administered in a unit administration form, as a mixture with conventional pharmaceutical supports, to animals and human beings. Suitable unit administration forms comprise oral-route forms such as tablets, gel capsules, powders, granules and oral suspensions or solutions, sublingual and buccal administration forms, aerosols, implants, subcutaneous, transdermal, topical, intraperitoneal, intramuscular, intravenous, subdermal, transdermal, intrathecal and intranasal administration forms and rectal administration forms.

Preferably, the pharmaceutical compositions contain vehicles which are pharmaceutically acceptable for a formulation capable of being injected. These may be in particular isotonic, sterile, saline solutions (monosodium or disodium phosphate, sodium, potassium, calcium or magnesium chloride and the like or mixtures of such salts), or dry, especially freeze-dried compositions which upon addition, depending on the case, of sterilized water or physiological saline, permit the constitution of injectable solutions.

The pharmaceutical forms suitable for injectable use include sterile aqueous solutions or dispersions; formulations including sesame oil, peanut oil or aqueous propylene glycol; and sterile powders for the extemporaneous preparation of sterile injectable solutions or dispersions. In all cases, the form must be sterile and must be fluid to the extent that easy syringability exists. It must be stable under the conditions of manufacture and storage and must be preserved against the contaminating action of microorganisms, such as bacteria and fungi.

Solutions comprising compounds of the invention as free base or pharmacologically acceptable salts can be prepared in water suitably mixed with a surfactant, such as hydroxypropylcellulose. Dispersions can also be prepared in glycerol, liquid polyethylene glycols, and mixtures thereof and in oils. Under ordinary conditions of storage and use, these preparations contain a preservative to prevent the growth of microorganisms.

The Agent of the invention can be formulated into a composition in a neutral or salt form. Pharmaceutically acceptable salts include the acid addition salts (formed with the free amino groups of the protein) and which are formed with inorganic acids such as, for example, hydrochloric or phosphoric acids, or such organic acids as acetic, oxalic, tartaric, mandelic, and the like. Salts formed with the free carboxyl groups can also be derived from inorganic bases such as, for example, sodium, potassium, ammonium, calcium, or ferric hydroxides, and such organic bases as isopropylamine, trimethylamine, histidine, procaine and the like.

The carrier can also be a solvent or dispersion medium containing, for example, water, ethanol, polyol (for example, glycerol, propylene glycol, and liquid polyethylene glycol, and the like), suitable mixtures thereof, and vegetable oils. The proper fluidity can be maintained, for example, by the use of a coating, such as lecithin, by the maintenance of the required particle size in the case of dispersion and by the use of surfactants. The prevention of the action of microorganisms can be brought about by various antibacterial and antifungal agents, for example, parabens, chlorobutanol, phenol, sorbic acid, thimerosal, and the like. In many

cases, it will be preferable to include isotonic agents, for example, sugars or sodium chloride. Prolonged absorption of the injectable compositions can be brought about by the use in the compositions of agents delaying absorption, for example, aluminium monostearate and gelatin.

Sterile injectable solutions are prepared by incorporating the active polypeptides in the required amount in the appropriate solvent with various of the other ingredients enumerated above, as required, followed by filtered sterilization. Generally, dispersions are prepared by incorporating the various sterilized active ingredients into a sterile vehicle which contains the basic dispersion medium and the required other ingredients from those enumerated above. In the case of sterile powders for the preparation of sterile injectable solutions, the preferred methods of preparation are vacuum-drying and freeze-drying techniques which yield a powder of the active ingredient plus any additional desired ingredient from a previously sterile-filtered solution thereof.

Upon formulation, solutions will be administered in a manner compatible with the dosage formulation and in such amount as is therapeutically effective. The formulations are easily administered in a variety of dosage forms, such as the type of injectable solutions described above, but drug release capsules and the like can also be employed.

For parenteral administration in an aqueous solution, for example, the solution should be suitably buffered if necessary and the liquid diluent first rendered isotonic with sufficient saline or glucose. These particular aqueous solutions are especially suitable for intravenous, intramuscular, subcutaneous and intraperitoneal administration. In this connection, sterile aqueous media which can be employed will be known to those of skill in the art in light of the present disclosure. For example, one dosage could be dissolved in 1 ml of isotonic NaCl solution and either added to 1000 ml of hypodermoclysis fluid or injected at the proposed site of infusion. Some variation in dosage will necessarily occur depending on the condition of the subject being treated. The person responsible for administration will, in any event, determine the appropriate dose for the individual subject.

The invention will be further illustrated by the following figures and examples. However, these examples and figures should not be interpreted in any way as limiting the scope of the present invention.

CLAIMS

1. A method for determining whether a cytomegalovirus infection in a transplanted patient is susceptible to induce allograft rejection comprising detecting the presence of at least one HLA-E-restricted CD8 $\alpha\beta$ T cell population displaying reactivity against peptides derived from the leader sequences of both HCMV-UL40 protein and allogeneic classical HLA-I molecules in a blood sample of the patient, wherein the presence of said populations indicate that the cytomegalovirus infection in the transplant patient is susceptible to induce allograft rejection.
2. The method of claim 1 which further comprises the step consisting of HLA class I typing of the transplant donor.
3. The method according to claim 2 wherein the i) presence of at least one HLA-E-restricted CD8 $\alpha\beta$ T cell population displaying reactivity against VMAPRTLII (SEQ ID NO:1) in the blood sample of the patient ii) the presence of at least one allele

selected from the group consisting of HLA-A*01,-A*03, -A*11, -A*29, -A*30, -A*31, -A*32, -A*33, -A*36 -A*74, -Cw*2 and -Cw*15 in the HLA typing of the transplant donor and iii) the absence of the of a HLA-C ligand for KIR2DL2 in the HLA typing of the transplant donor indicate that the cytomegalovirus infection in the transplant patient is highly susceptible to induce allograft rejection.

4. The method according to claim 2 wherein the i) presence of at least one HLA-E-restricted CD8 $\alpha\beta$ T cell population displaying reactivity against VMAPRTLVL (SEQ ID NO:2) in the blood sample of the patient ii) the presence of at least one allele selected from the group consisting of HLA-A*02, -A*23, -A*24, -A*25, -A*26, -A*3402, -A*43, -A*66 and -A*69 in the HLA typing of the transplant donor and iii) the absence of the of a HLA-C ligand for KIR2DL2 in the HLA typing of the transplant donor indicate that the cytomegalovirus infection in the transplant patient is highly susceptible to induce allograft rejection.
5. The method according to claim 2 wherein the i) presence of at least one HLA-E-restricted CD8 $\alpha\beta$ T cell population displaying reactivity against VMAPRTLIL (SEQ ID NO:3) in the blood sample of the patient ii) the presence of at least one allele selected from the group consisting of HLA-Cw*01, -Cw*03, -Cw*0401, -Cw*05, -Cw*06, -Cw*0801-03, -Cw*12, -Cw*14, -Cw*16 and -Cw*1702 in the HLA typing of the transplant donor and iii) the absence of the of a HLA-C ligand for KIR2DL2 in the HLA typing of the transplant donor indicate that the cytomegalovirus infection in the transplant patient is highly susceptible to induce allograft rejection.

ABSTRACT OF THE INVENTION

METHODS AND KITS FOR DETERMINING WHETHER A CYTOMEGALOVIRUS INFECTION IN A TRANSPLANTED PATIENT IS SUSCEPTIBLE TO INDUCE ALLOGRAFT REJECTION

The present invention relates to a method for determining whether a cytomegalovirus infection in a transplanted patient is susceptible to induce allograft rejection comprising detecting the presence of at least one HLA-E-restricted CD8 $\alpha\beta$ T cell population displaying reactivity against peptides derived from the leader sequences of both HCMV-UL40 protein and allogeneic classical HLA-I molecules in a blood sample of the patient, wherein the presence of said populations indicated that the cytomegalovirus infection in the transplant patient is susceptible to induce allograft rejection.