

Thèse de Doctorat

Pierre-Jean
GAVLOVSKY

*Mémoire présenté en vue de l'obtention du
grade de Docteur de l'Université de Nantes
sous le label de L'Université Nantes Angers Le Mans*

École doctorale : *Biologie Santé*

Discipline : *Biologie Médecine Santé*

Spécialité : *Immunologie*

Unité de recherche : *INSERM 1064*

Soutenu le *25 septembre 2015*

Thèse N° : *24*

**Polymorphisme et diversité des protéines MICA :
Caractérisation de nouvelles isoformes de MICA et rôle
du variant MICA A5.1 en Transplantation rénale.**

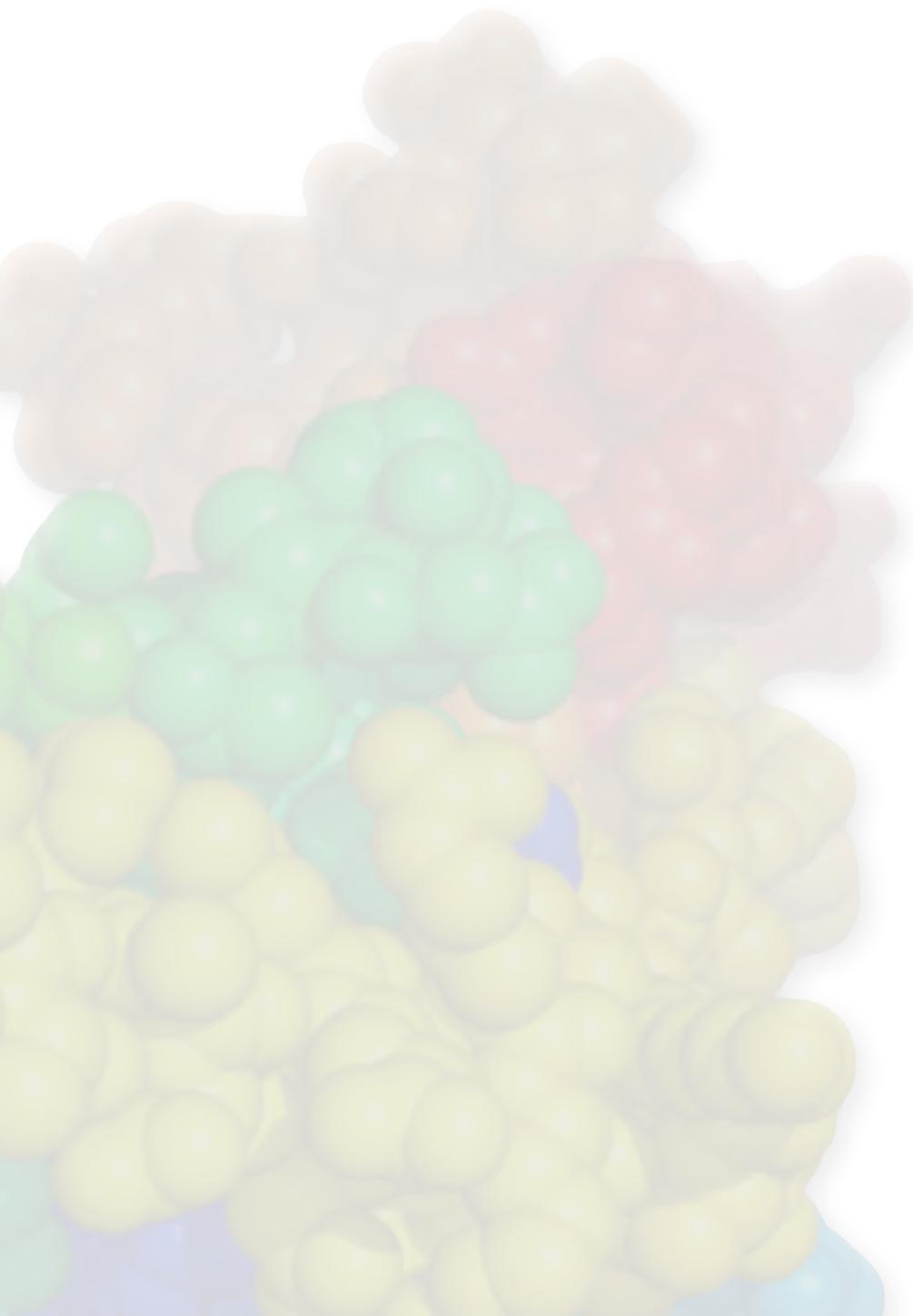
JURY

Rapporteurs : **Anne CAIGNARD**, Docteur, Institut Universitaire d'Hématologie, Hôpital Saint Louis, Paris
Joël LEMAULT, Docteur, Laboratoire d'Immunologie Fondamentale et Appliquée,
Hôpital Saint Louis, Paris

Examineur : **Maryvonne HOURMANT**, Professeur des Universités, Praticien Hospitalier, CHU de Nantes, Nantes

Directeur de Thèse : **Béatrice CHARREAU**, Docteur, Centre de Recherche en Transplantation et Immunologie,
CHU de Nantes, NANTES

Remerciements



Remerciements

Je tiens dans un premier temps à remercier le Dr Anne Caignard ainsi que le Dr Joël LeMaoult pour avoir accepté de rapporter mon manuscrit de thèse et également le Pr Maryvonne Hourmant pour avoir examiné mon travail de thèse.

Je tiens également à remercier le Dr Ignacio Anegon pour m'avoir accueilli au sein de l'unité INSERM 1064, ainsi que le Pr Nadine Gervois et le Dr Anne Cesbron pour leur participation à mes comités de suivi de thèse.

Béatrice, mes remerciements vont tout naturellement à vous pour m'avoir soutenu durant ces trois années de thèse. Votre disponibilité, vos conseils ainsi que votre confiance m'auront permis d'évoluer durant cette période intense. Nos discussions scientifiques ou tout simplement nos échanges sur nos passions communes auront permis d'enrichir grandement notre relation.

Un énorme merci aux membres de mon équipe : Nathalie, tu as été d'une aide précieuse et d'une gentillesse sans faille, mon projet de thèse n'aurait pas pu voir le jour sans toi. Angélique, ton soutien aura été important pour moi durant ces trois dernières années. Mélanie, tu as été la voisine de bureau que tout le monde rêverait d'avoir, adorable et toujours là quand il faut, dans les bons comme dans les mauvais moments. Ton soutien m'aura profondément touché et ton amitié m'a également beaucoup touché. Sarah, les exosomes et les miRNA nous auront réunis, pour le pire et pour le meilleur, surtout le meilleur. Ta bonne humeur, ton rire perçant et ta voix chantante (avec l'accent du Sud, cela va de soi, bien que tu n'aies rien avoir avec cette région si particulière) auront égayés ces deux dernières années. Tu auras également été un soutien important pour moi. Sylvain, courage ! J'espère que tu finiras ta thèse entier, sans accident. Vous avez tous été là pour moi, nous avons partagé de nombreux moments ensemble que je n'oublierais pas. Vous êtes devenus au fil du temps des amis précieux. Un merci spécial aux anciens membres de l'équipe 5 : Mathias pour avoir été un encadrant d'une grande qualité durant mon master 1 et tes conseils toujours justes. Pierre Tonnerre, nous nous sommes croisés, j'arrivais et tu partais. Ce fut court mais enrichissant pour moi de te suivre.

Un merci spécial pour Angèle, une collègue de travail devenue une amie. Tu nous auras appris à tous ce qu'est le courage et la détermination. Maintenant que la page est tournée, nous allons pouvoir reprendre nos projets communs et partager à nouveaux de bons moments.

Vanessa, comment te remercier suffisamment pour tout ce que tu m'as offert ? Ton amitié et ton affection me touchent profondément. Je sais que je peux compter sur toi. Je suis fier de faire en quelque sorte partie de ta famille, avec Lulu, ce petit diable adorable.

Apolline, nous sommes finalement passés très vite du stade collègues au stade amis. Tu es une personne que l'on ne peut qu'aimer. Ton sourire et ta bonne humeur permanente me manqueront. Je te souhaite les meilleures choses pour ta nouvelle famille, avec Gaspard et votre petit Alexis.

Cassie, Kristell, j'ai grâce à vous de merveilleux souvenirs. C'est impossible que l'on se perde de vue, nous avons passé tant de bons moments ensemble (Kristell, promis, je ferai le chapeau à ta thèse). Par contre, c'est terminé le bateau en pleine nuit dans la tempête à dormir sur une moquette à la couleur (et à l'odeur ?) douteuse. Charlotte et Kevin, un grand merci pour les soirées passées ensemble à rire et à danser, vous êtes adorables.

Valentin, avant toute chose, pardon ! En plus d'avoir été un super voisin de bureau avec qui j'ai bien ri, tu es devenu un ami important. Nos parties dans le Paris de la Révolution Française puis à Los Santos auront été un réel plaisir. Bien que piètre tireur, tu auras été un associé de qualité qui m'aura permis de gagner des milliers de dollars (hélas virtuels) lors de nos trafics en tout genre (afin de rassurer tout le monde, trafics tout aussi virtuels).

Fabie et Nico, merci pour votre amitié. Qu'il est agréable de parler de Sciences, puis de BD, de musique, de tout.

Faouzi, un merci spécial pour mon ex-voisin de bureau. J'ai toujours eu une certaine admiration pour ton talent. Je vais pouvoir dire un jour lorsque tu seras célèbre (si ce n'est pas déjà le cas) : « Faouzi Braza ? Oui, je le connais, nous étions dos-à-dos durant notre thèse. Un grand chercheur ce Faouzi ! ».

*Gaëlle P., malgré la distance qui nous sépare, tu es une amie chère qui a toujours été là quand le moral n'était pas là. Promis, une fois mon post-doc trouvé, je pars te rejoindre quelques jours pour faire les ***** (je ne peux décemment pas écrire ce mot dans mes remerciements, mais je suis sûr que tu vois ce que je veux dire) on the beach.*

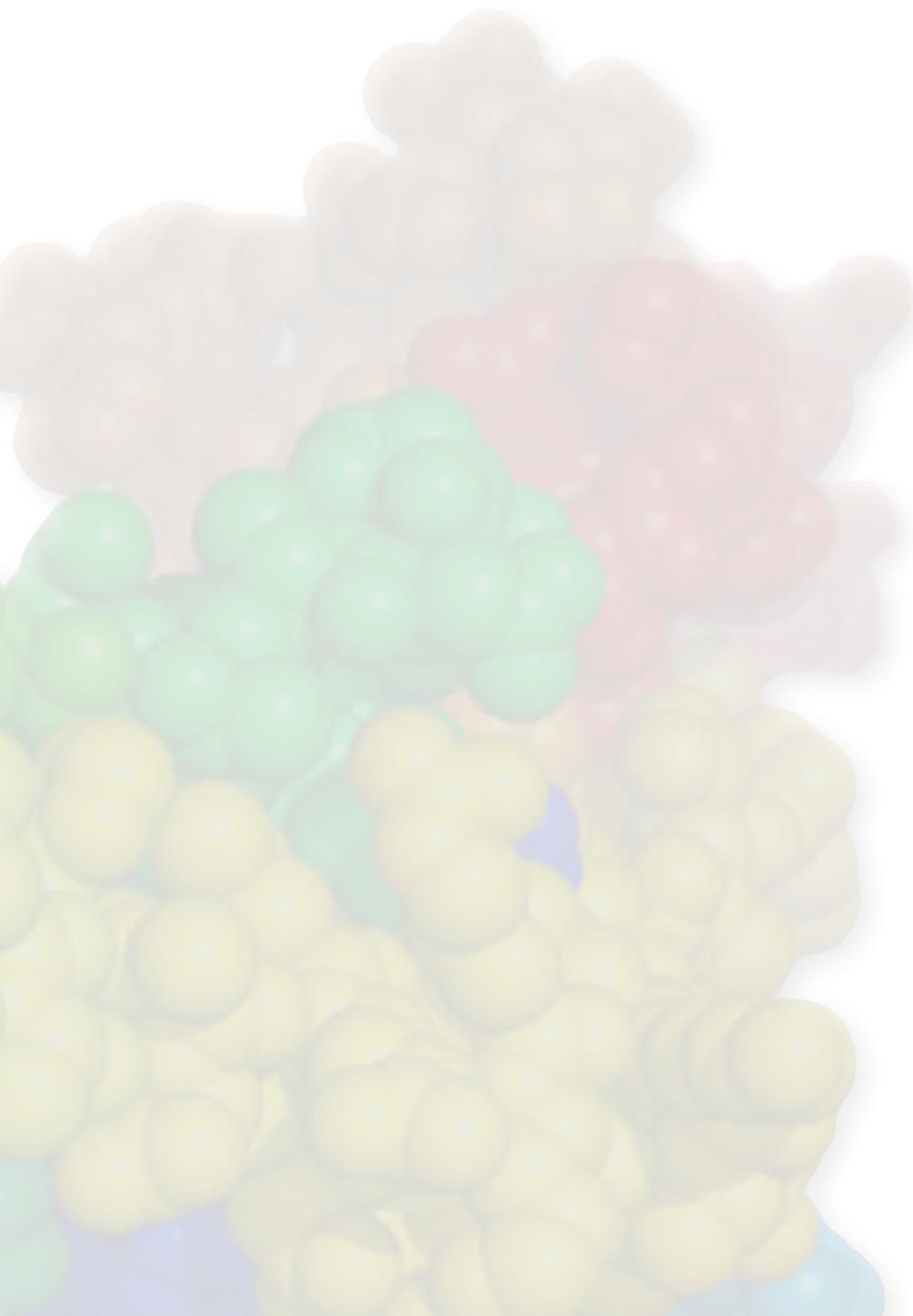
Un grand merci pour mes nombreuses « mères spirituelles » : Laurence Delbos, tu es la gentillesse incarnée, tu auras toujours été là dans la difficulté. Tu m'auras fait aimer ce monstre effrayant qu'est un cytomètre. Sans oublier ton écoute à mon égard. Flora, tu es un autre exemple de la gentillesse incarnée, ton sourire et ton humour me manqueront, c'est certain.

Un grand merci à Alexandra, Laetitia, Marion, Séverine, Annie, Flora, Mélanie(ch), Bryan, Gwen, Joëlle, Jean-Paul, Laura, Mathieu, Sabrina, Virginie, Fred, Lyssia, Nico P, Gaëlle T., Gaëlle B., Laurent, Caroline M., pour votre aide, votre bonne humeur.

Un grand merci à vous deux Philippe et Steven pour votre aide en microscopie et le temps accordé à mon projet. J'ai appris des tas de choses avec vous.

Un grand merci à mes parents pour m'avoir soutenu durant mes études, et ce du début à la fin. J'ai eu énormément de chance de pouvoir faire ce que j'avais envie de faire. C'est quelque chose de précieux et je tiens à vous en remercier sincèrement. Vous avez cru en moi et j'espère que vous serez fier de moi comme je suis fier d'avoir des parents comme vous.

Sommaire

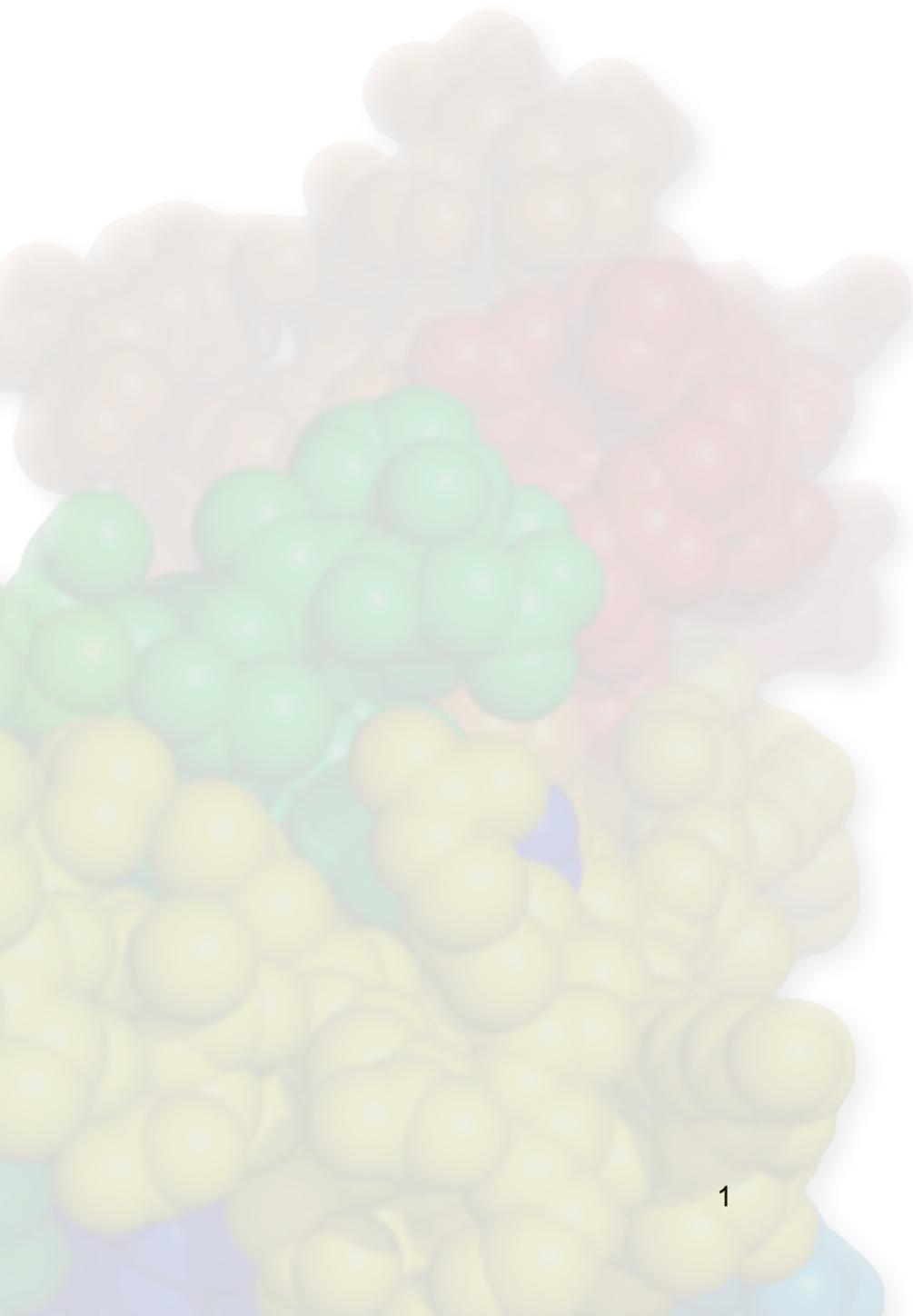


Liste des abréviations	1
Liste des figures & tableaux	4
Avant-propos	6
Introduction	9
1. MICA : gène et polymorphisme	10
1.1. Organisation du gène MICA	10
1.2. Polymorphisme allélique de MICA	11
1.3. Microsatellite de l'exon 5 : définition et importance du variant génétique MICA A5.1	15
2. MICA, protéine du CMH de classe I non classique	19
2.1 Structure de la protéine	19
2.2. Expression cellulaire et tissulaire des protéines MICA	21
2.3. Régulation de l'expression des protéines MICA	22
2.3.1. Régulation transcriptionnelle et post-transcriptionnelle	22
2.3.2. Régulation post-traductionnelle de MICA	24
Glycosylation	24
Ubiquitination	25
Clivage protéolytique de MICA	26
3. MICA : un ligand du récepteur NKG2D	27
3.1. Contribution de l'interaction MICA/NKG2D à l'activation de cellules effectrices	28
3.1.1. Rôle dans l'activation des NK	28
3.1.2. Rôle dans l'activation des lymphocytes T$\gamma\delta$	30
3.1.3. Maturation et co-stimulation des lymphocytes T$\alpha\beta$ CD8+	31
3.2. Les autres ligands du récepteur NKG2D	35

4. Interaction NKG2D/MICA : mécanismes moléculaires	38
4.1. Interactions moléculaires	38
4.2. Voies de signalisation activées par MICA dans les NK	40
5. MICA/NKGD2 : de la reconnaissance à la lyse de la cellule cible	43
5.1. Etape de reconnaissance du NK et de la cellule cible	43
5.2 La phase effectrice	45
5.3 La phase de terminaison	46
6. MICA et pathologies immunes	48
6.1. MICA et immunité anti-tumorale	48
6.2. MICA et pathogènes	52
6.2.1. MICA et infections bactériennes	52
6.2.2. MICA et réponses anti-virales	52
6.2.3. MICA et auto-immunité	56
7. Importance de MICA en Transplantation d'organe	60
Objectifs de la thèse	65
Historiques du travail de recherche et Objectifs de la thèse	66
Résultats	68
Partie 1 : Description et caractérisation de nouvelles isoformes de MICA	
issues d'un épissage alternatif	70
1. Présentation de l'étude	70
2. Résumé de l'article 1	72
3. Article 1	74
4. Résultats complémentaires	111
Partie 2 : Impact de la mutation MICA A5.1 sur la réactivation de	
BK virus post-transplantation rénale	113
1. Présentation de l'étude	114

2. Résumé de l'article 2	117
3. Article 2	119
Discussion et Conclusion générale	157
Discussion	158
1. Mise en évidence d'un épissage alternatif du gène MICA associé à de nouvelles isoformes	158
2. Structure des nouvelles isoformes de MICA et fonctions associées	163
3. Possible relevance clinique de l'allèle MICA*017	171
4. Isoformes de MICA : de nouveaux outils thérapeutiques ?	174
5. Localisation et polarisation de MICA dans le rein	176
Conclusion générale	180
Références bibliographiques	182
Annexes	193
Liste des publications, brevets et communications	194

Liste des abréviations



ADAM : a disintegrin and metalloproteinase
ATM/ATR : ataxia telangiectasia mutated .
ATM and RAD3-related
CD : celiac disease
CE : cellule endothéliale
cGVHD : chronic graft versus host disease
CMH : complexe majeur
d'histocompatibilité
CTL : cytotoxic T cell
DAP-10/12 : DNAX-activated protein 10/12
DRM : detergent rich membrane
microdomain
EBV : Epstein-Barr virus
ERp5 : endoplasmic reticulum protein 5
FcRg : Fc fragment receptor gamma
G-CSF : granulocyte colony stimulating
factor
GPI : glycosylphosphatidylinositol
Grb2 : growth factor receptor-bound protein
2
HBV : hepatitis B virus
HCMV : human cytomegalovirus
HCV : hepatitis C virus
HLA : human leucocyte antigen
HSF1 : heat shock factor protein 1
IE : immediate early protein
IEL : intraepithelial lymphocyte
IFN γ : interferon gamma
ITAM : immunoreceptor tyrosine-based
activation motif

ITIM : immunoreceptor tyrosine-based
inhibition motif
KIR : killer-cell immunoglobulin-like
receptor
KO : knock out
KSHV : Kaposi's sarcoma-associated
herpesvirus
LAT : linker of activated T cells
LFA-1 : lymphocyte function-associated
antigen 1
LPS : lipopolysaccharide
MAPK : mitogen-activated protein kinases
MEK : MAPK/ERK kinase
MHV : mouse hepatitis virus
MICA/B : major histocompatibility complex
class-I related chain A/B
MMP : matrix metalloproteinase
MTOC : microtubule-organizing center
MULT1 : UL16)binding protein-like
transcript 1)
NCR : natural cytotoxicity receptors
NF κ B : nuclear factor-kappa B
NK : natural killer
NKG2D : natural-killer group 2, member D
NKR : natural-killer receptors
NOD : non-obese diabetic
PI3K : phosphoinositide 3-kinase

PLC-g2 : phospholipase C, gamma 2

PSGL-1 : P-selectin glycoprotein ligand-1

Rae : retinoic acid early inducible

RAET : retinoic acid early transcript

Shc : SH2-containing collagen-related

proteins

SHP1/2 : SH2-containing phosphatase 1/2

SLP-76 : SH2 domain-containing leukocyte

protein, 76-kd

SNP : short nucleotide polymorphism

T1D : type 1 diabete

TCR : T cell receptor

TGFb : Transforming growth factor beta

TLR : toll like receptor

TNFa : Tumor necrosis factor alpha

ULBP : UL16-binding proteins

VIH : virus de l'immunodéficience humaine

WASp : Wiskott-Aldrich syndrom protein

Liste des figures & tableaux

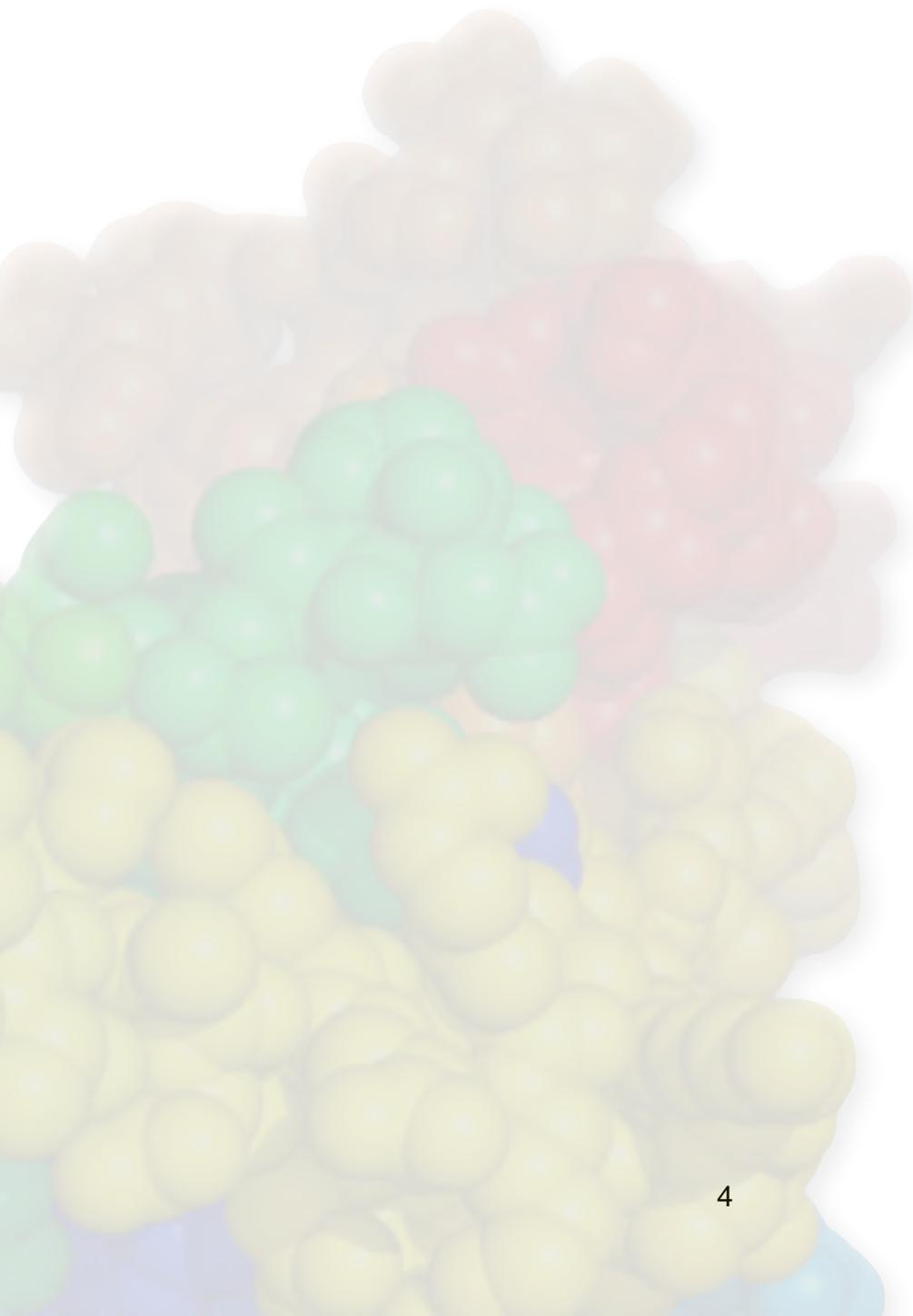
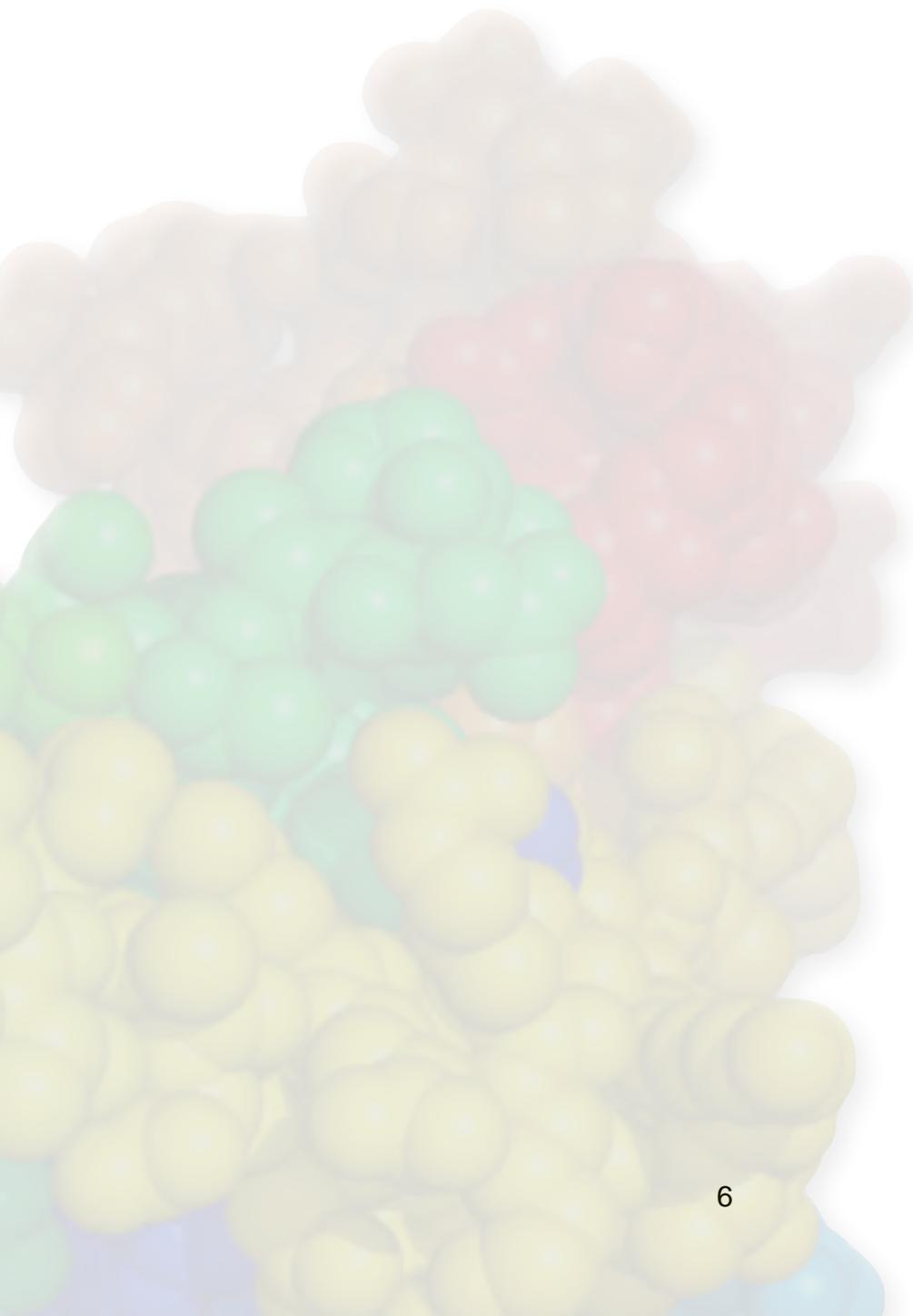


Figure 1 : Organisation du gène <i>MICA</i>.	10
Figure 2 : Fréquence allélique des principaux allèles <i>MICA</i> observés dans une population américaine d'origine caucasienne.	12
Figure 3 : Polymorphisme de <i>MICA</i>.	13
Figure 4 : Mutation <i>MICA</i> A5.1.	16
Figure 5 : Structure 3D des domaines extracellulaires de <i>MICA</i>.	20
Figure 6 : Comparaison des plateformes alpha de HLA-A2 et de <i>MICA</i>.	21
Figure 7 : Régulation de la synthèse de <i>MICA</i>, du gène à la protéine.	23
Figure 8 : Sites de N-glycosylation et ponts disulfures de <i>MICA</i>.	25
Figure 9 : Fonctions du récepteur NKG2D exprimé par les NK, les T CD8+ et les T gamma-delta.	34
Figure 10 : Structures et affinités des différents ligands de NKG2D.	37
Figure 11 : Sites d'interaction entre NKG2D et <i>MICA</i>.	39
Figure 12 : Principaux récepteurs activateurs et inhibiteurs exprimés par les NK.	40
Figure 13 : Voies de signalisation impliquées dans l'activation des NK.	42
Figure 14 : Mise en place de la synapse immunologique entre le NK et sa cible.	47
Figure 15 : Test de dégranulation.	112
Figure 16 : Expression des isoformes issues de <i>MICA</i>*017 dans le rein.	163
Figure 17 : Sites d'interaction potentiels entre <i>MICA</i>-B1 et NKG2D.	165
Figure 18 : Résidus polymorphes conservés par <i>MICA</i>-B2 et <i>MICA</i>-D.	174
Table 1 : Expression du récepteur NKG2D chez l'Homme et chez la souris.	28

Avant-propos



Avant-propos

Le terme de transplantation définit le concept visant à transférer un organe issu d'un donneur à un receveur. Une nuance existe lorsqu'il s'agit de transfert de cellules (cellules de la moelle osseuse par exemple) d'un patient à un autre, le terme de greffe est alors préféré à celui de transplantation. Il existe quatre types de greffe définis sur la base de l'origine du transplant. L'autogreffe fait référence à une greffe où le receveur reçoit un transplant issu de lui-même, c'est notamment le cas lors de greffe de peau chez les grands brûlés où un fragment de peau saine est isolée puis réimplantée aux niveaux des lésions. La greffe de cellules souches hématopoïétiques utilisée pour traiter certains cas de leucémie est également considérée comme une autogreffe où ce sont dans ce cas de figure les cellules issues de la moelle osseuse du patient qui lui sont réimplantées après un traitement de chimiothérapie intensif. L'isogreffe est un cas très particulier puisqu'elle fait référence au transfert d'organe entre deux jumeaux monozygotes. L'allogreffe fait référence au transfert d'organe entre deux individus issus de la même espèce mais différents d'un point de vue génétique. Ce type de greffe est à ce jour le plus répandu mais n'est pas sans conséquence sur le receveur puisque du fait des différences génétiques avec le donneur, un traitement immunosuppresseur est bien souvent indispensable afin d'éviter toute réaction du système immunitaire du receveur vis-à-vis du greffon. Enfin, la xénogreffe regroupe les greffes d'organes entre individus d'espèces différentes. Bien que principalement à l'état expérimental, ce type de greffe est aujourd'hui utilisé avec succès comme traitement des valvulopathies cardiaques consistant à remplacer les valves défectueuses par des valves saines de porc ou de bovin.

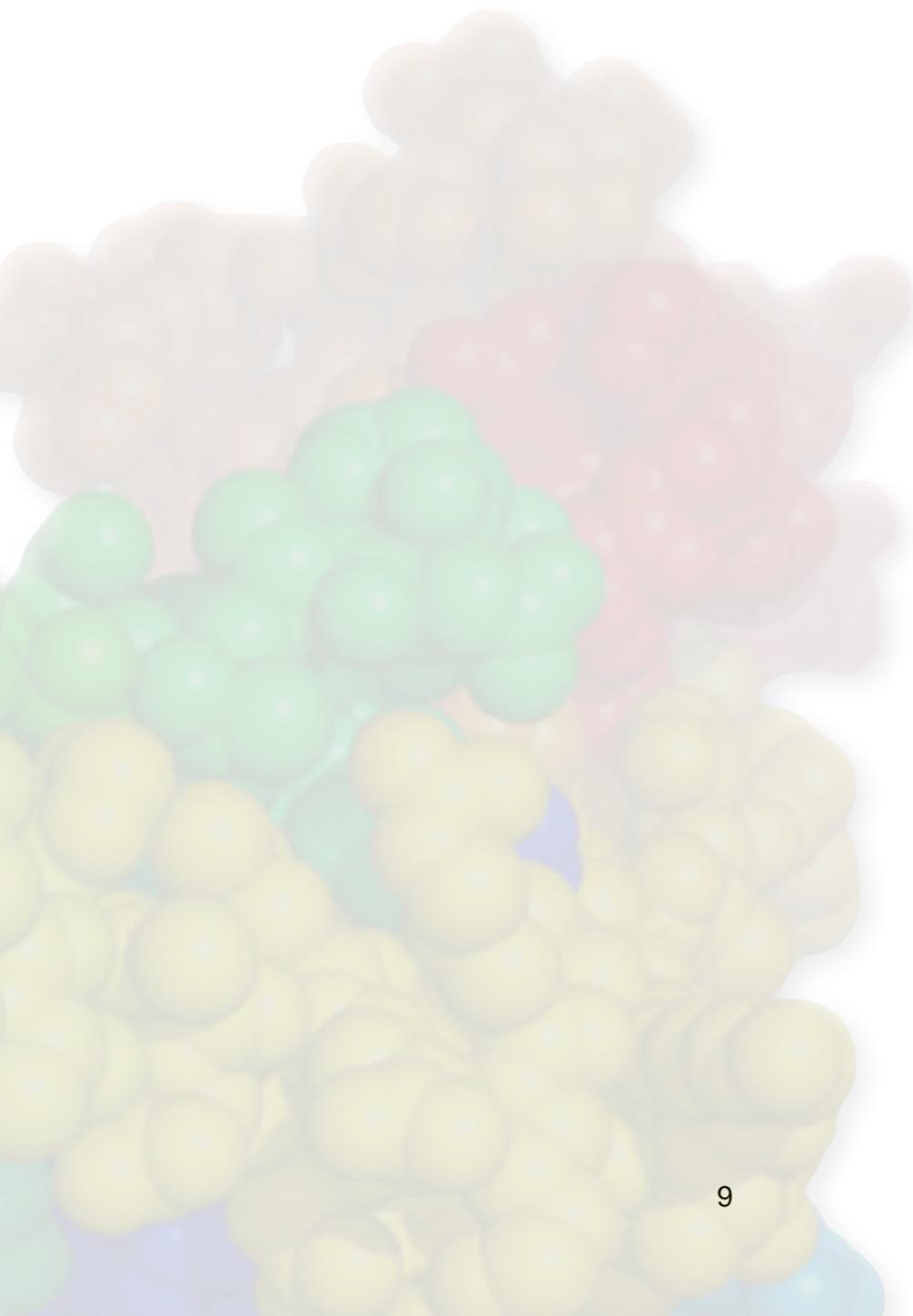
Malgré de nombreux obstacles, la transplantation d'organe reste à ce jour le meilleur traitement pour de nombreuses pathologies ayant conduit à la dysfonction

d'organes vitaux. La compréhension des mécanismes immunologiques du rejet conduisant au développement de nouveaux traitements immunosuppresseurs plus efficaces associés à des techniques chirurgicales plus perfectionnées ainsi qu'à un suivi post greffe rigoureux ont permis d'améliorer sensiblement la survie des greffons. Néanmoins, la faible disponibilité de greffons ainsi que les complications liées aux traitements immunosuppresseur constituent à ce jour une limite.

En 2013, en France, 5 123 greffes d'organes en été pratiquées. Bien que ce chiffre puisse paraître important, le nombre de greffons disponibles est hélas insuffisant face aux 18 976 patients sur liste d'attente (Agence de la Biomédecine, Rapport Annuel 2013). Cette situation critique s'aggrave d'année en année puisqu'en 2012, le nombre de patients en attente de greffe était de 17 693 pour 5 023 greffes réalisées. Cette pénurie croissante de greffons a plusieurs origines avec en premier lieu le nombre important d'opposition au prélèvement de la famille sur un proche décédé (donneur cadavérique ou en état de mort cérébrale). De plus, les progrès réalisés en médecine permettent d'accroître la durée de vie de la population générale et par conséquent d'augmenter également le nombre de demandeurs d'organes. Les progrès de la médecine ont également pour conséquence une augmentation de la survie chez les patients ayant subi un ou plusieurs traumatismes réduisant de ce fait le nombre de greffons disponibles.

Dans ce contexte, il est d'une part capital de sensibiliser la population au don d'organe afin de diminuer le nombre trop important de refus mais il est également important d'élucider les mécanismes du rejet et de la tolérance et de faire évoluer les traitements immunosuppresseurs pour prolonger la survie des greffes et réduire les effets secondaires des traitements. Identifier des facteurs de risques et des marqueurs biologiques ou immunologiques de la fonction du greffon est aussi un objectif important pour une prise en charge personnalisée des patients.

Introduction



Introduction

1. MICA : gène et polymorphisme :

1.1. Organisation du gène *MICA* :

Le groupe de loci auquel appartient le gène *MICA* fut découvert en 1994 par l'équipe de Thomas Spies (Bahram et coll., Proc Nat Acad Sci USA. 1994) qu'il nommera « MHC class I related Chain » (MIC). Le loci MIC est composé de 7 gènes (*MICA*, *MICB*, *MICC*, *MICD*, *MICE*, *MICF* et *MICG*). Seuls les gènes *MICA* et *MICB* sont traduits en protéine, les autres étant des pseudogènes.

Le gène *MICA* est présent et très conservé chez les mammifères à l'exception des rongeurs. Il est situé sur le chromosome 6, à proximité du gène *HLA-B* (46 kb centrométrique et en position anti-parallèle) et du gène *MICB* (70kb centrométrique et dans le même sens que le gène *MICA*). Cette proximité est à l'origine d'un déséquilibre de liaison entre *MICA*, *MICB* et *HLA-B* (Fodil et coll., Immunogenetics. 1996) (Grimaldi et coll., Hum Immunol. 1996) (figure 1).

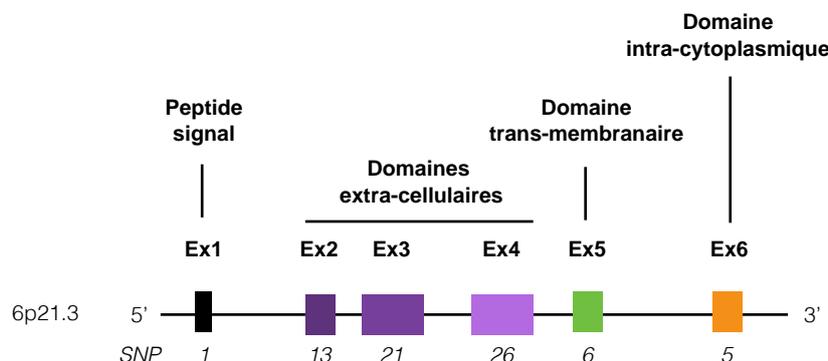


Figure 1 : **Organisation du gène MICA.** Situé à proximité du gène codant pour HLA-B, le gène *MICA* se compose de 6 exons (ex1-ex6) codant respectivement pour le peptide signal, trois domaines extracellulaires $\alpha 1$, $\alpha 2$, $\alpha 3$, un domaine transmembranaire et un domaine intracellulaire. Sous les exons figure le nombre (en italique) de bases polymorphes (single nucleotide polymorphism, SNP) identifiés dans chaque exon. Les polymorphismes du microsatellite de l'exon 5 de sont pas indiqués dans cette figure.

Le gène *MICA*, d'une longueur totale de 40kb, est composé de 6 exons. En comparaison avec les gènes du *HLA* de classe I, le gène *MICA* présente, en fonction des différents domaines extracellulaires, entre 15% et 36% d'homologie de séquence protéique avec ces gènes (Bahram et coll., Proc Nat Acad Sci USA. 1994).

Le premier exon code pour le peptide leader alors que les exons 2, 3 et 4 codent quant à eux pour les domaines extracellulaires alpha 1, 2 et 3. L'exon 5 code pour la région transmembranaire et l'exon 6 pour la région intracytoplasmique. et une région non traduite (3'UTR). L'ensemble des exons représente entre et 1152 et 1170 nucléotides. Cette variation résulte de la présence d'un microsatellite situé dans l'exon 5. Le gène *MICA* possède une répétition du motif GCT codant pour une alanine dans l'exon 5 appelé microsatellite. Ce micro-satellite peut coder pour 4, 5, 6 ou 9 alanines successives et sont nommée respectivement A4, A5, A6, A9 et A10. Ce dernier correspond à une séquence répétée de 4 (A4) à 10 (A10) codons GCT codant pour l'acide aminé alanine (A) (Mizuki et coll., Proc Acad Sci USA. 1997). Ce polymorphisme particulier sera décrit plus en détail dans la suite de mon manuscrit.

1.2. Polymorphisme allélique de MICA :

En juillet 2015, 102 allèles du gène *MICA* (noté de *MICA**001 à *MICA**085) avaient été décrits (<http://hla.alleles.org/data/mica.html>), *MICA* est donc un gène très polymorphe, point commun avec les gènes du CMH de classe I classique *HLA-A*, *HLA-B* et *HLA-C*. Sur l'ensemble du gène *MICA* sont répartis 72 nucléotides polymorphes (SNP), la répartition de ces différents SNP est hétérogène et se situent majoritairement dans les exons 3 (21 SNP) et 4 (25 SNP) codant pour les domaines alpha 2 et alpha 3 de la protéine. La majeure partie de ces SNP conduit à la substitution d'un acide aminé générant la diversité des protéines *MICA*. La fréquence des différents allèles *MICA* est hétérogène, seuls

quelques variants de MICA sont principalement représentés (figure 2). Par exemple, dans une population américaine d'origine caucasienne, l'allèle MICA*008:01 (37,7%) est majoritaire suivi de l'allèle MICA*002:01 (15,3%), MICA*009:01 (7,6%), MICA*010 (7%), MICA*004 (5,5%), MICA*027 (4,9%), MICA*007:01 (4%), MICA*018 (3,5%), MICA*019 (2,5%), MICA*012:01 (2,5%), MICA*017 (2,5%), MICA*011 (2,5%), MICA*001 (1,5%), MICA*016 (1%) et MICA*009:02 (1%) (Petersdorf et coll., Immunogenetics. 1999). Les autres allèles sont extrêmement rares et pour certains retrouvés uniquement chez quelques individus comme par exemple MICA*078 découvert chez un seul individu (Piancatelli et coll., Hum Immunol. 2015). La répartition des allèles est également variable selon le groupe ethnique, ainsi, dans une population brésilienne d'origine amérindienne l'allèle MICA*002:01 (64,1%) est majoritaire et MICA*008:01 (0,6%) est quasiment inexistant dans cette population (La Oliveira et coll., Genes and Immunity. 2008).

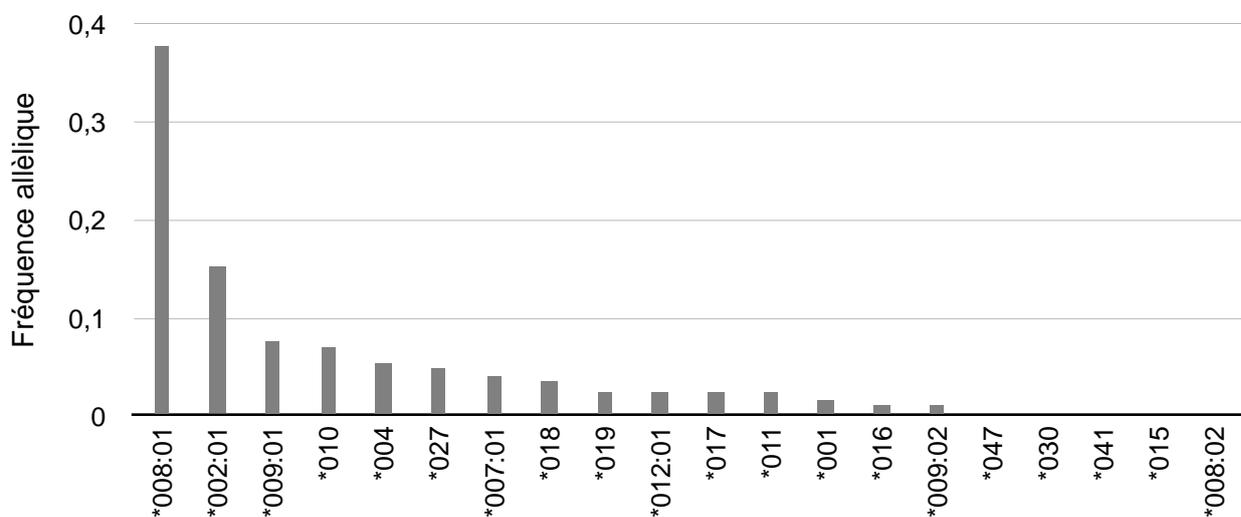


Figure 2. **Fréquence allélique des principaux allèles MICA observés dans une population américaine d'origine caucasienne.** Données issues de la base de données <http://www.allelefreqencies.net>

Nous comptons 83 protéines MICA dont la majorité ne diffèrent que de quelques acides aminés. Il est intéressant de constater que la majorité des résidus polymorphes sont localisés dans les domaines extracellulaires, notamment dans le domaine alpha 2 où

l'on dénombre 17 mutations et le domaine alpha 3 qui en compte 18. De plus, la partie supérieure de la plateforme alpha ne regroupe qu'un ou deux acides aminés polymorphes alors que la partie inférieure de la plateforme en abrite la majorité. Il est important de noter que la majorité des acides aminés polymorphes sont localisés à la surface de la protéine MICA (figure 3). Les résidus polymorphes sont par conséquent exposés et peuvent générer des peptides immunogènes dans un contexte de transplantation, comme nous pouvons l'observer pour les molécules HLA de classe I et II lors d'un mismatch entre le donneur et le receveur. Bien que l'on dénombre 83 protéines MICA différentes, seuls quelques variants ont fait l'objet d'études en relation avec leur singularité. Ainsi, trois types de variants se profilent, premièrement les variants MICA A5.1 dont nous parlerons plus en détail dans le paragraphe suivant, deuxièmement les variants MICA 129 et enfin le variant MICA*010.

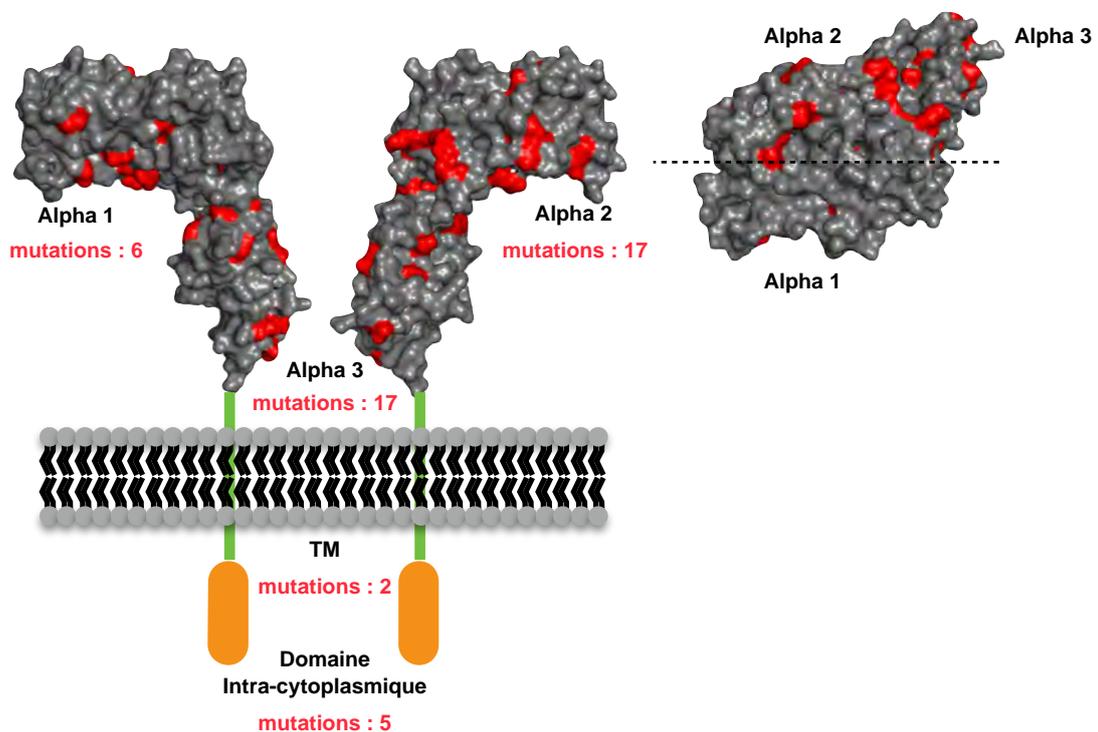


Figure 3 : **Polymorphisme de MICA**. MICA est une protéine hautement polymorphe avec 102 allèles décrits à ce jour. En rouge sont illustrés les résidus polymorphes localisés dans les domaines extra-cellulaire de la protéine. A l'exception d'un résidu, tous sont exposés à la surface de la protéine et principalement localisés dans les domaines alpha 2 et alpha 3. A gauche et au centre, vue de profil de MICA. A droite, vue supérieure de la plateforme alpha de MICA.

Le variant MICA 129 fait référence aux allèles mutés au niveau du résidu 129, qui consiste soit en une valine, soit en une méthionine. A l'heure actuelle, nous comptons 56 allèles de MICA porteurs de la mutation Met129 et 44 allèles de MICA porteurs de la mutation 129Val. Il a été montré que cette substitution a un impact sur l'affinité de MICA pour NKG2D. Le variant Met129 conférerait une meilleure affinité pour NKG2D que le variant Val129 (Steinle et coll., Immunogenetics. 2001). Cet impact sur l'affinité a par conséquent des répercussions sur la réponse immune et il a été associé à plusieurs pathologies. Le variant MICA 129Met/Met a par exemple été associé à la spondylarthrite ankylosante ou la forte affinité de MICA pour NKG2D pourrait être un facteur aggravant de la pathologie (Amroun et coll., Hum Immunol. 2005). A l'inverse, le variant MICA 129Val/Val serait un facteur aggravant de par sa faible affinité pour NKG2D dans un contexte tumoral comme cela a été décrit dans le cancer nasopharyngé (Douik et coll., Hum Immunol. 2009). Dans un contexte de greffe de cellules souches hématopoïétiques, il a été montré que le variant MICA 129Val/Val constitue un facteur de risque pour le développement de la maladie du greffon contre l'hôte (cGVHD : chronic graft versus host disease) bien que les mécanismes impliqués ne soient pas clairement établis. Il semblerait que la faible affinité des variants MICA 129Val/Val conduise à une réponse immune de type Th2 favorisant ainsi une activation B et la génération d'anticorps (Boukouaci et coll., Blood. 2009). Récemment, le variant MICA 129Met/Met a été associé avec le développement de la colite ulcéraire (Zhao et coll., J Gastroenterol Hepatol. 2011).

Le variant MICA*010 caractérisé par la substitution d'une arginine par une proline en position 6, fait parti des allèles dit « null » du fait qu'il conduisent à l'absence de protéine MICA. Néanmoins, une protéine est produite mais du fait d'une instabilité, elle n'est pas exprimée à la membrane et est dégradée rapidement (Li et coll., Immunogenetics. 2000). Cependant, il n'existe aucun travaux relatant un impact de ce variant sur la réponse immune ou dans diverses pathologies.

1.3. Microsatellite de l'exon 5 : définition et importance du variant génétique

MICA A5.1 :

Les protéines MICA se caractérisent également par la présence d'un micro-satellite dans le domaine transmembranaire ayant pour origine la répétition de 4 à 10 alanine (notée A4, A5, A5.1, A6, A9 et A10). A chaque micro-satellite est associé un groupe d'allèles différents. La conséquence de ces variations sont des séquences et des tailles variables du domaine transmembranaire. Ce polymorphisme atypique a également fait l'objet d'étude afin de déterminer son impact dans différents contextes pathologiques. Ainsi, le polymorphisme A4 a été associé à la spondylarthrite ankylosante bien que ce polymorphisme de MICA ne semble pas directement impliqué dans la pathologie mais qu'il s'agit d'une conséquence du déséquilibre de liaison entre MICA et HLA-B (Yabuki et coll., Hum Immunol. 1999). Néanmoins, une étude montre une augmentation de la fréquence de MICA A4 chez les patients HLA-B27 négatifs atteints par cette pathologie (Ricci-Vitiani et coll., J Rheumatol. 2000). Le polymorphisme A4 a également été associé au diabète de type 1 en association avec l'haplotype DR4-DQB1*0401 (Kawabata et coll., Hum Immunol. 2000). Un contexte semble mettre en évidence un rôle protecteur de MICA A4, il s'agit de la maladie de Kawasaki (Huang et coll., Exp Clin Immunogenet. 2000). Le polymorphisme MICA A5 a été décrit dans cette même étude comme étant facteur à risque pour le développement de la maladie de Kawasaki. MICA A5 a également été décrit comme ayant un rôle protecteur dans des infections comme la lèpre (Wang et coll., Int J Lepr Other Mycobact Dis. 1999). Le polymorphisme MICA A6 a également fait l'objet de quelques études et a été associé à la maladie de Behçet (Mizuki et coll., Proc Natl Acad Sci USA. 1997). Enfin, le polymorphisme A9 a également été associé comme facteur de risque dans le diabète de type 1 (Lee et coll. J Pediatr Endocrinol Metab. 2000). Un point commun

avec toutes ces études est l'importance de certains variants HLA-B pour lequel on observe un déséquilibre de liaison avec certains polymorphismes de MICA.

Un polymorphisme du micro-satellite de MICA a particulièrement été décrit, il consiste en l'insertion d'une guanine (G) en position 952, après la seconde répétition du codon GCT dans le micro-satellite du gène MICA (figure 4). Cette insertion a pour conséquence le décalage du cadre ouvert de lecture et la génération d'un codon stop prématuré. La protéine générée est tronquée, perdant la majeure partie du domaine transmembranaire et la totalité de la région intracytoplasmique (Mizuki et coll., Proc Acad Sci USA. 1997). Cette mutation touche uniquement les allèles A5 de MICA et du fait de cette insertion a été nommée mutation A5.1. Plusieurs allèles sont donc porteurs de cette mutation : MICA*008, *023, *028, *054, *058 et *070. L'allèle MICA*008:01 est fortement représenté dans différents groupes ethniques (Katsuyama et coll., Tissue Antigens. 1999) (Petersdorf et coll. Immunogenetics. 1999) (Gao et coll., Hum Immunol. 2006). La fréquence allélique de MICA*008:01 s'élève à 37,7% dans une population américaine d'origine caucasienne (Petersdorf et coll., Immunogenetics. 1999). De ce fait, MICA*008 est considéré comme le variant prototype pour la caractérisation de la mutation A5.1.

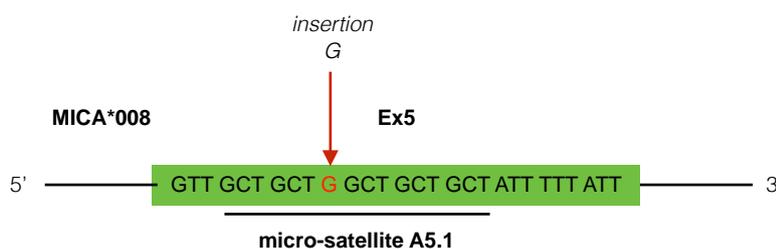


Figure 4 : **Mutation A5.1.** Cet allèle de MICA fait parti des variants conduisant à des formes tronquées de MICA. MICA*008 se caractérise par l'insertion d'un G entre deux codons GCT créant un décalage du cadre de lecture d'une base entrainant un codon stop prématuré dans l'exon 5.

Fonctionnellement, le variant MICA*008 se distingue des autres variants de MICA par de nombreuses caractéristiques. L'expression de MICA*008 diffère de celle des autres variants de MICA sur deux points, la localisation et le niveau d'expression de la protéine. Il a été démontré que MICA*008 est exprimé au pôle apical des cellules épithéliales

intestinales, alors que les variants non A5.1 analysés ne sont retrouvés qu'au pôle basolatéral de ce type de cellule (Suemizu et coll., Proc Natl Acad Sci USA. 2002). Notre équipe a par ailleurs montrée que le niveau d'expression du variant MICA*008 est plus élevé dans la cellule endothéliale en comparaison avec les variants MICA non A5.1 (Tonnerre et coll., J Am Soc Nephrol. 2013). Par ailleurs, dans un contexte d'allo-transplantation, nous montrons que cette sur-expression du variant MICA*008 conduit à une forte allo-immunisation anti-MICA du receveur lorsque seul le donneur est porteur de la mutation ayant pour conséquence une perte de fonction des transplants plus importantes en comparaison avec des transplants MICA non A5.1. Le variant MICA*008 est également caractérisé par une libération majoritairement sous forme d'exosomes (Ashiru et coll., Cancer Res. 2010). Dans un contexte tumoral, cette étude montre que les exosomes exprimant MICA*008 libérés par les cellules cancéreuses diminuent fortement NKG2D exprimé par les NK. MICA*008 porté par des exosomes est par conséquent un facteur de risque car associé à un mécanisme d'échappement tumoral. Ces caractéristiques uniques à MICA*008 peuvent être expliquées par l'association de ce variant avec une ancre GPI en modifiant sa localisation à la membrane (Ashiru et coll., Biochem. 2013). Lors d'une autre étude, le polymorphisme MICA A5.1 a été associé à une augmentation des formes solubles de MICA et d'une diminution de la survie de patients ayant un carcinome (Tamaki et coll., Clin Immunol. 2009).

Néanmoins, le variant MICA*008 semble également être associé à un meilleur contrôle de certaines tumeurs dans des circonstances bien définies. En effet, les traitements usuels de chimiothérapies utilisés dans cette pathologie ont comme effet collatéral une augmentation de la métalloprotéase ADAM10. Cette augmentation induit une hausse du clivage protéolytique de MICA et par conséquent une diminution des réponses NK vis-à-vis des cellules tumorales. Dans ce contexte particulier, MICA*008 semble protecteur puisqu'il n'est pas clivé par les métalloprotéases et permet ainsi le

maintien d'une réponse immune efficace (Zingoni et coll., J Immunol. 2015).

Due à la perte complète du domaine intracytoplasmique, d'autres caractéristiques uniques ont été attribuées au variant MICA*008. Les virus détournent souvent les mécanismes de protection de la cellule hôte à leur avantage et MICA fait partie de leur nombreuses cibles. C'est le cas du virus HCMV qui via l'immuno-évasine UL140 est capable de retenir MICA dans le Golgi des cellules infectées (Zou et coll., J Immunol. 2005) (Chalupny et coll., Biochem Biophys Res Commun. 2006) (Ashiru et coll., J Virol. 2009). L'UL140 reconnaît spécifiquement MICA par son domaine intracytoplasmique. De ce fait, MICA*008 échappe à ce contrôle par le HCMV et permet le maintien d'une réponse immune anti-virale efficace. Le KSHV a également développé des mécanismes d'échappement ciblant MICA. Ce virus est capable d'ubiquitiner via deux ubiquitines ligases K3 et K5 la région intracytoplasmique de MICA pour induire sa dégradation précoce et ainsi limiter son expression à la membrane. Tout comme avec le HCMV, MICA*008 n'ayant pas de région intracytoplasmique échappe à ce mécanisme et est maintenu à la membrane des cellules infectées (Thomas et coll., Proc Natl Acad Sci USA. 2008).

Enfin, le variant MICA A5.1 a été associé dans des études de population à diverses maladies auto-immunes comme le diabète de type 1 (Kawabata et coll., Hum Immunol. 2000) ou le psoriasis (Choi et coll., Tissue Antigens. 2000). Cependant, les mécanismes impliqués dans ces pathologies ne sont pas déterminés.

2. MICA, protéine du CMH de classe I non classique :

2.1. Structure de la protéine :

Les protéines MICA sont des glycoprotéines présentant un poids moléculaire variant entre 33 et 42kDa selon le polymorphisme du microsatellite de l'exon 5 (Li et Coll., Immunity. 1999). D'un point de vue structural, MICA est composé de deux domaines structuraux distincts : deux domaines alpha (alpha 1 et alpha 2) formant une plateforme appelée « plateforme alpha » connectée au moyen d'un peptide linker de quatre résidus à un troisième domaine alpha (alpha 3) de type C-type immunoglobuline (Figure 5). Le peptide linker confère à la plateforme alpha une importante flexibilité. La plateforme alpha est composée de quatre hélices alpha parallèles interrompues par un peptide et reposant sur un feuillet beta. Bien que MICA ne présente aucun peptide, les quatre hélices alpha définissent un sillon similaire au sillon peptidique retrouvé sur les molécules HLA de classe I classiques. Cette incapacité à lier un peptide peut être expliquée par une poche peptidique trop étroite pour accueillir un peptide et/ou par la présence dans cette même poche d'acides aminés présentant une polarité défavorable à la liaison avec un peptide.

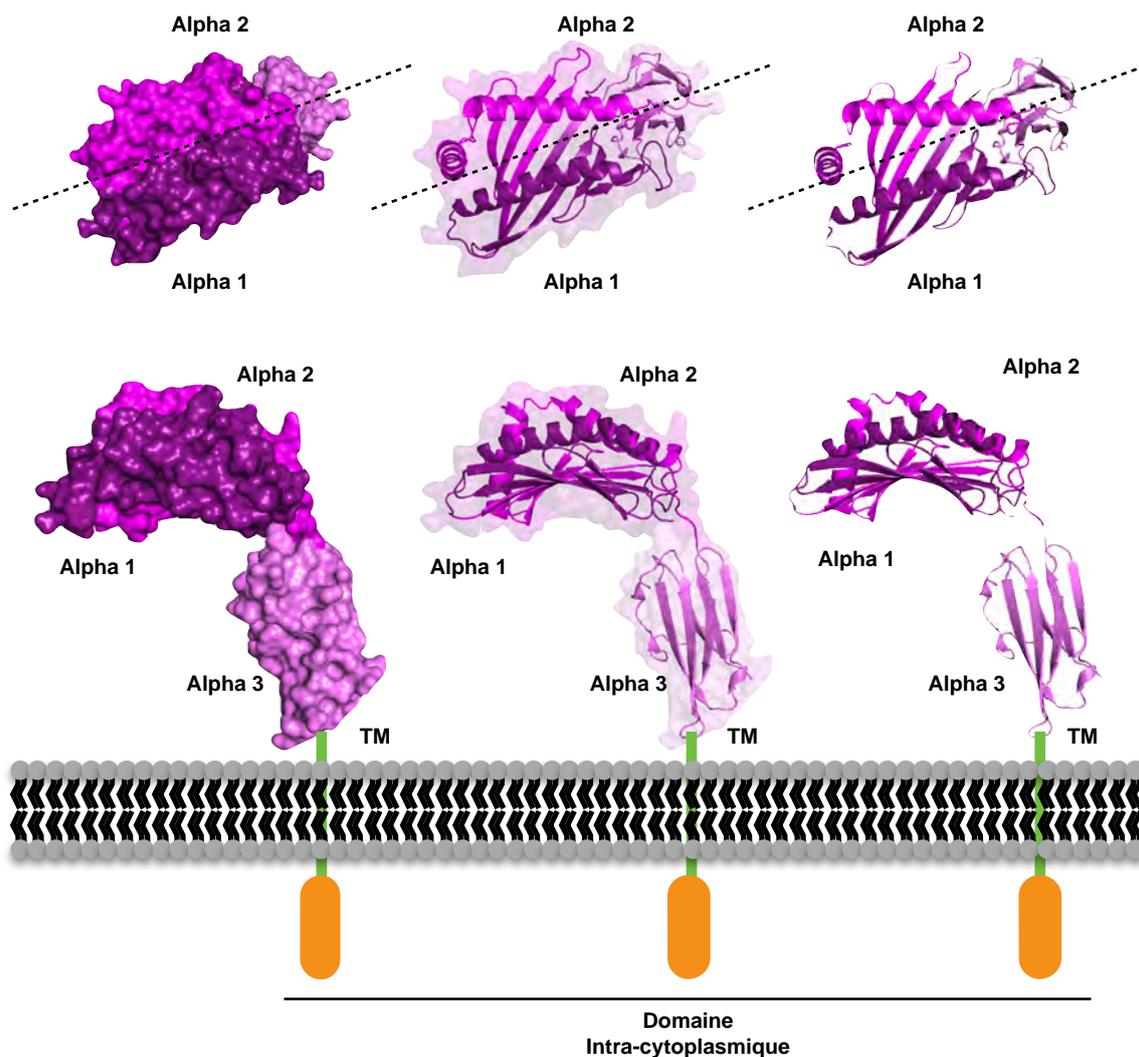


Figure 5 : **Structure 3D des domaines extracellulaires de MICA.** La protéine MICA est composée de trois domaines extracellulaires alpha 1, alpha 2 et alpha 3. En haut, vue de profil, en bas, vue supérieure. Malgré la présence d'un sillon formé par les domaines alpha 1 et alpha 2, MICA ne présente aucun peptide. De plus, MICA n'est pas associé à la β 2-microglobuline. Le trait en pointillé délimite le domaine alpha 1 et le domaine alpha 2. La structure 3D a été réalisée au moyen du logiciel Pymol.

Malgré seulement 15 à 36% d'homologie de séquence avec les molécules du HLA classe I, la plateforme alpha ainsi que le domaine alpha 3 de MICA présentent une étonnante homologie de structure avec celles du HLA (Bahram et Coll., Proc Acad Sci USA. 1994) (figure 6). Cependant contrairement aux molécules du HLA, la protéine MICA n'est pas associée à la β 2-microglobuline ce qui explique aussi son incapacité à présenter des peptides. Cette protéine étant importante pour la stabilité des molécules de classe I, d'autres mécanismes doivent exister pour stabiliser la protéine MICA, comme par exemple avec des N-glycosylations, nombreuses dans les domaines

extracellulaires de la protéine MICA (Groh et Coll., Proc Acad Sci USA. 1996) (Andresen et Coll., Journal of Immunology. 2012).

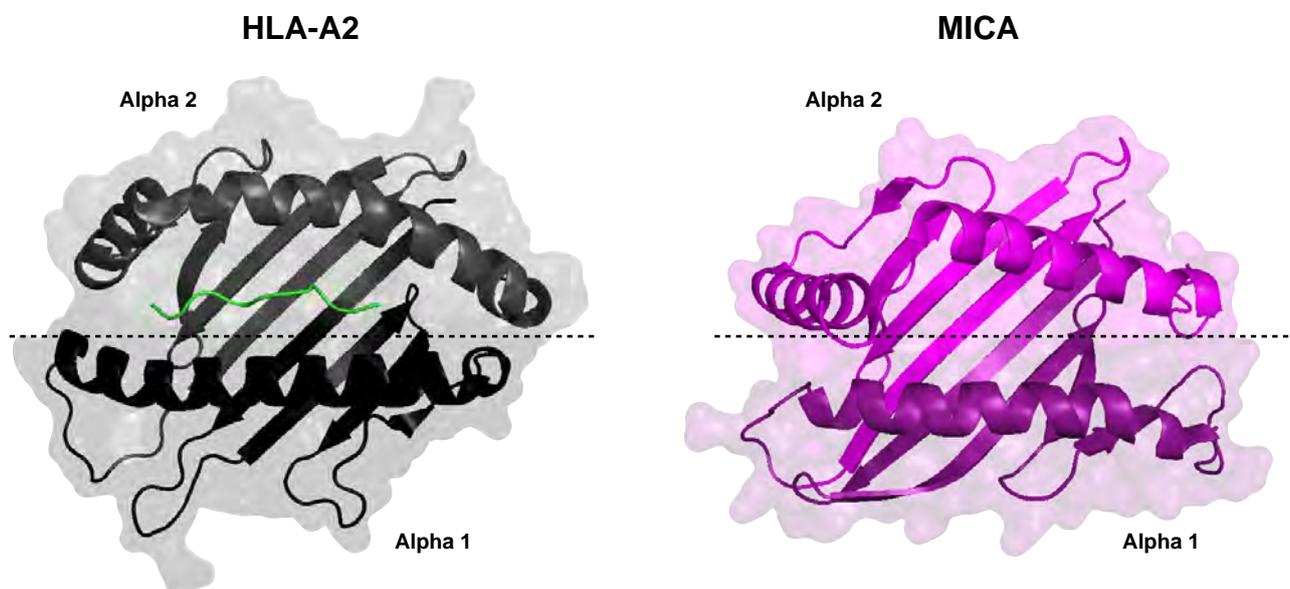


Figure 6 : **Comparaison des plateformes alpha de HLA-A2 et de MICA.** Malgré une faible homologie de séquence, les molécules de classe I classiques et non classiques ont la particularité de conserver une structure similaire basée sur deux ou trois hélices alpha formant un sillon dont le fond est formé par un feuillet beta partagé par les domaines alpha 1 et alpha 2. Le domaine alpha 3 et la β 2-microglobuline (pour HLA-A2 uniquement) ne sont pas illustrés. En vert, le peptide dans le sillon peptidique du HLA-A2. En pointillé, la délimitation des domaines alpha 1 et alpha 2.

2.2. Expression cellulaire et tissulaire des protéines MICA :

Dans des conditions physiologiques, l'expression de la protéine MICA à la membrane est restreinte à un petit nombre de cellules. Initialement restreinte aux cellules épithéliales intestinales qui ont permis sa mise en évidence (Groh et coll., Proc Acad Sci USA. 1996), l'expression basale de MICA a été étendue à d'autres types cellulaires incluant les fibroblastes, cellules endothéliales, monocytes, kératinocytes (Zwirner et coll., Immunogenetics. 1998) (Zwirner et coll., Hum. Immunol. 1999), macrophages (Nedvetzki et coll., Blood. 2007), cellules dendritiques (Jinushi et coll., J Immunol. 2003). Plus récemment une expression de MICA dans les lymphocytes T activés a été montrée (Cerboni et coll., Blood. 2007). L'expression de MICA par ces différents types cellulaires

est à nuancer, elle est constitutive à la surface des cellules endothéliales, épithéliales, et des fibroblastes, et induite suite à un signal activateur à la surface des cellules dendritiques, des monocytes, des kératinocytes et des lymphocytes T. L'induction de l'expression de MICA est possible par toute cellule subissant un stress cellulaire. En effet, une analyse exhaustive de l'expression MICA dans un large panel de cellules et de tissus sains ou pathologiques a permis la détection de transcrits MICA dans la plupart des échantillons testés à l'exception du système nerveux central (Schrambach et coll., Plos One. 2007)

2.3. Régulation de l'expression des protéines MICA :

2.3.1. Régulation transcriptionnelle et post-transcriptionnelle :

L'expression de la protéine MICA est induite dans des contextes de stress cellulaire tels que la transformation tumorale, l'altération de l'ADN, le stress oxydatif, le choc thermique ou encore les infections virales et bactériennes. La transformation tumorale, les infections virales ou encore les rayonnements provoquent des dommages à l'ADN et activent la voie ATM/ATR qui à son tour active le gène MICA ainsi que les autres ligands du récepteur NKG2D (Gasser et Coll., Nature. 2005). Néanmoins, les mécanismes impliqués dans ce processus restent à ce jour mal connus. Le choc thermique induit quant à lui l'interaction de HSF1 avec le promoteur du gène MICA et induit son expression (Groh et coll., Proc Acad Sci USA. 1996) (Venkataraman et coll., J Immunol. 2007). Les infections bactériennes ou tout autre stress générant des ligands pour les différents TLR peuvent également induire l'expression de MICA via l'activation de la voie NFkB (Molinero et coll., J. Immunol. 2004) (Kloss et coll., J. Immunol. 2008) (Lin et coll., J. Biol. Chem. 2012) (figure 7).

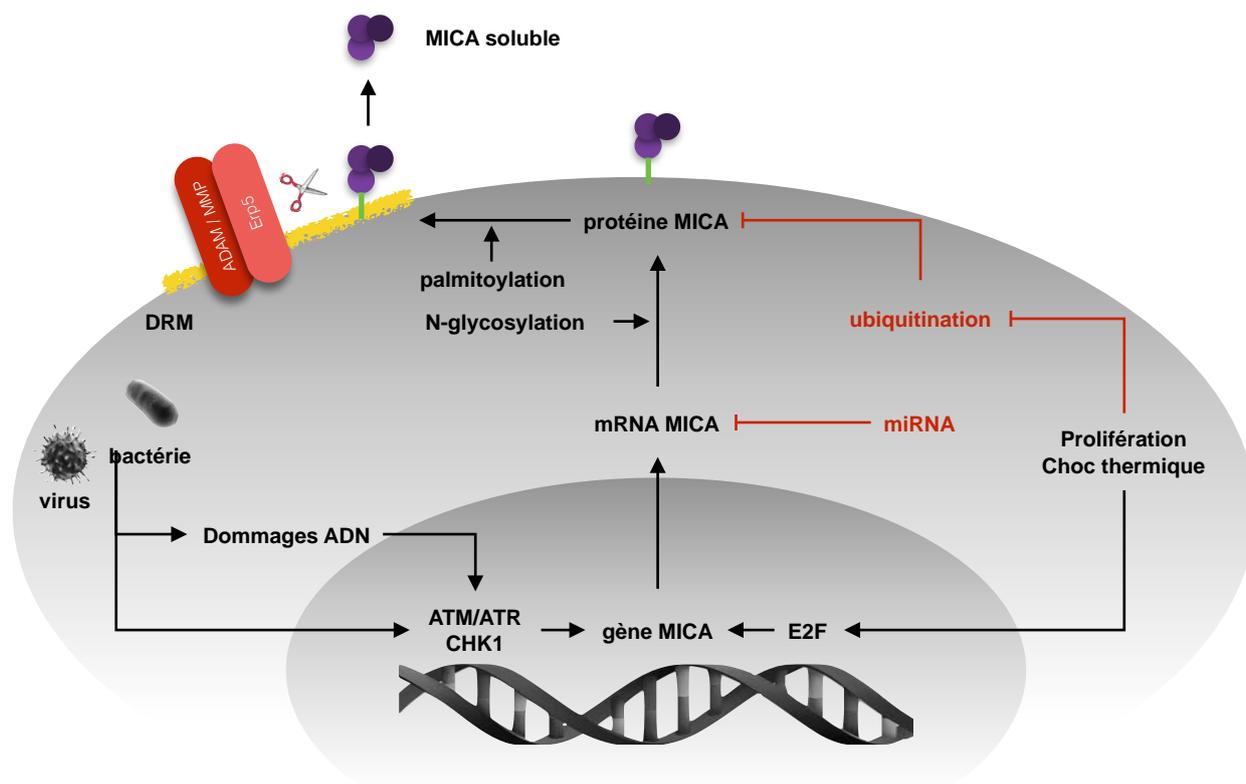


Figure 7 : **Régulation de la synthèse de MICA, du gène à la protéine.** Les infections virales ou bactériennes induisent des dommages dans le génome de la cellule et activent les voies en réponse des dommages à l'ADN comme la voie ATR/ATM ou encore CHK1 intervenant dans le cycle cellulaire. Les infections peuvent également activer directement ces voies. De plus, la transformation tumorale peut elle aussi induire l'activation des voies ATR/ATM et CHK1 en plus d'activer la synthèse de MICA via E2F. L'activation du gène MICA conduit à la synthèse de mRNA pouvant être la cible de miRNA endogènes ou viraux. Les mRNA ayant échappés au miRNA vont à leur tour être traduit en protéines. La protéine MICA peut subir à ce stade des ubiquitinations conduisant à sa dégradation. Ce processus est un processus normal mais peut être dérivé par certains virus comme le VSK (Virus du Sarcome de Kaposi). Si la protéine n'est pas dégradée, elle est palmitoylée et recrutée dans les DRM (detergent rich membrane, en jaune sur la figure) où elle sera co-localisée avec les métalloprotéases et les ADAM mais également avec la thio-isomérase ERp5 pouvant cliver MICA.

En plus des mécanismes liés aux dommages de l'ADN, l'expression de la protéine MICA peut également être modulée par diverses cytokines, notamment pro-inflammatoires. Différents travaux ont tenté de mettre en évidence les diverses cytokines pouvant être impliquées dans la régulation de MICA. Par exemple, le TNF α augmente l'expression de MICA après activation de CE, cela à été mis en évidence par le groupe de Christopher O'Callaghan (Lin et coll., J. Biol. Chem. 2012). L'impact d'autres cytokines pro-inflammatoires sur l'expression de MICA dans les lymphocytes T CD4+ a été rapporté par l'équipe Norberto Zwirner. Ces travaux démontrent que l'IL-2, -4 et -15 induisent une

augmentation de l'expression intracellulaire de MICA. Néanmoins, ils n'observent qu'une faible expression de MICA à la surface de ces mêmes lymphocytes T (Molinero et coll., Hum. Immunol. 2006).

Des cytokines sont également impliquées dans la régulation négative de l'expression de MICA. Diverses études ont montré que l'IFN γ induit la diminution de l'expression de MICA sur des cellules tumorales (Zhang et coll., Int. Immunopharmacol. 2005) (Schwinn et coll., Int. J. Cancer. 2009). L'IL 10 a également été décrite par le groupe de Maria-Carmen Molina pour avoir un rôle sur la modulation de l'expression de MICA sur des cellules de mélanome. (Serrano et coll., Immunol. Cell. Biol. 2011). Un nouveau mécanisme de régulation reposant sur les miARN a été décrit pour MICA par Noam Stern-Ginossar qui montre que lorsque l'on inhibe DICER et DROSHA, deux enzymes capitales dans la genèse des miARN, il en résulte une augmentation de l'expression de MICA. (Stern-Ginossar et coll., Nat. Immunol. 2008). Sept miRNA ont été décrits à ce jour : miR-17-5p, miR-20a, miR93, miR-520b, miR106b-5p, miR-372 et miR 373-3p. Tous ces miRNA reconnaissent une séquence localisée dans la région 3'UTR des mRNA codant pour MICA ou MICB.

2.3.2. Régulation post-traductionnelle de MICA

- **Glycosylation :**

La régulation de l'expression de MICA comporte également des mécanismes post-traductionnels. La protéine MICA présente 8 sites de N-glycosylation (Bahram et coll., Proc Natl Acad Sci USA. 1994) et les travaux de l'équipe de Soren Skov montrent que la glycosylation de MICA, notamment sur l'asparagine 8 (Asp8), est capitale pour

l'expression à la membrane de la protéine. (Andersen et coll., J. Immunol. 2012)
(Møllergaard et coll., J. Biol. Chem.) (figure 8).

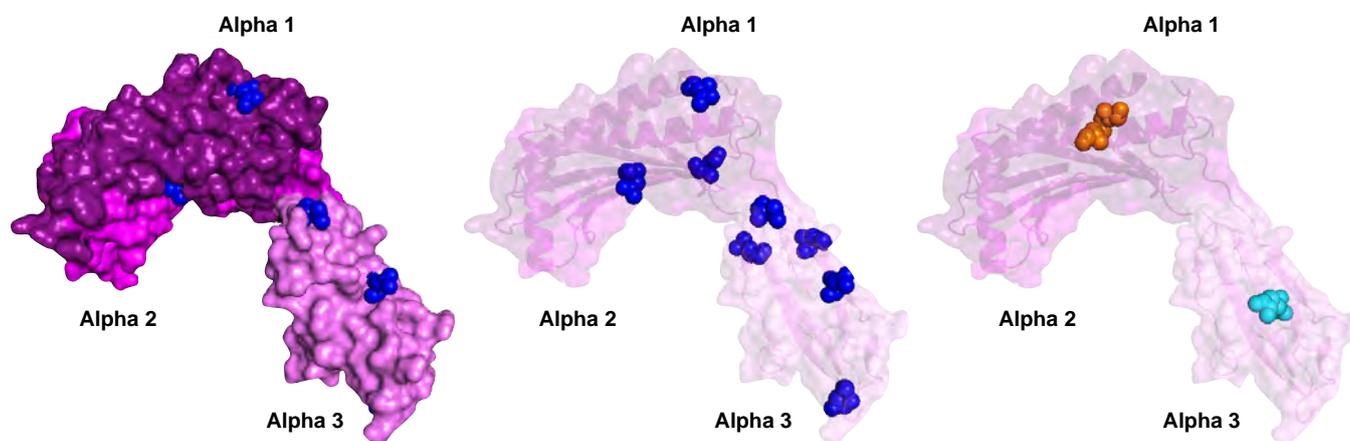


Figure 8 : **Sites de N-glycosylation et ponts disulfures de MICA.** La protéine MICA possède 8 sites de N-glycosylation décrits (en bleu foncé), localisés sur les asparagines (N) Asp8, Asp56, Asp102, Asp187, Asp197, Asp211, Asp238, Asp266. Ces 8 sites sont localisés dans la partie extracellulaire de MICA et jouent un rôle important pour la stabilisation de l'interaction avec NKG2D (alpha 1 : 2 sites ; alpha 2 : 1 site ; alpha 3 : 5 sites). MICA possède également deux ponts disulfures décrits, un stabilisant la plateforme alpha, l'autre le domaine alpha 3 (en orange et en cyan).

- **Ubiquitination :**

L'ubiquitination est un second mécanisme de régulation de l'expression de MICA. En effet, il a été montré que la fixation d'ubiquitine aux lysines du domaine intracytoplasmique de MICA conduit à la dégradation de MICA par le protéasome. De façon intéressante, de nombreux virus ont développé des mécanismes d'échappement en dérivant ce mécanisme à leur profit. C'est ce que démontre l'équipe de Paul Lehner dans une étude sur les mécanismes d'évasion de l'herpès virus associé au sarcome de Kaposi. Ce virus développe une stratégie visant l'ubiquitine ligase E3 conduisant à la dégradation de MICA et in fine à une baisse de reconnaissance des cellules infectées par des cellules

NK (Thomas et coll., Biochem. Soc. Trans. 2008). Le variant MICA A5.1 semble modifier la polarisation de l'expression de la protéine MICA. C'est ce que montrent les travaux de l'équipe de Hidetoshi Inoko. Leur hypothèse repose sur une perturbation d'adressage due à la perte du domaine intra-cytoplasmique de la protéine MICA A5.1. Dans ce contexte, MICA A5.1 est exprimée au pôle baso-latéral au lieu d'être exprimée au pôle apical des cellules épithéliales intestinales. Néanmoins, les hypothèses formulées par Hidetoshi Inoko ne font pas appel ni à la glycosylation, ni à l'ubiquitination de MICA. Dernièrement, les travaux d'Omodele Ashiru ont montré que MICA*008 pouvait être exprimé à la membrane via un groupement GPI et que cette liaison expliquerait également la présence privilégiée de cet allèle sur les exosomes (Ashiru et coll., Biochem J. 2013).

- **Clivage protéolytique de MICA :**

En plus de l'expression membranaire de MICA, la protéine existe également sous une forme soluble (sMICA). La découverte de cette forme fut faite par les équipes d'Alexander Steinle et de Thomas Spies en 2002 (Groh et coll., Nature. 2002) (Salih et coll., J. Immunol. 2002). Ces deux premières études mettent en avant la libération d'une forme soluble de MICA issue d'un clivage protéolytique de la forme membranaire. La forme soluble de MICA est en effet composée uniquement des domaines extracellulaires de la protéine, à savoir les domaines alpha-1, -2 et -3. La libération de la forme soluble de MICA se déroule en plusieurs étapes successives. La première étape correspond au recrutement de MICA au niveau des domaines membranaires riches en cholestérol et sphingolipides nommés DRM ou radeaux lipidiques. Le recrutement dans ces régions est dépendant de la palmitoylation de MICA

au niveau de deux résidus cystéines successifs. Le second mécanisme fait intervenir une enzyme, ERp-5 localisée dans les DRM et qui va former avec le domaine alpha-3 de MICA un complexe modifiant la conformation de la protéine MICA et permettre ainsi son clivage par des métalloprotéinases (Kaiser et coll., Nature. 2007). Le troisième et dernier mécanisme correspond au clivage protéolytique dans les DRM où sont regroupées différentes métalloprotéases (Tellier et coll., Exp. Cell Res. 2006). Il existe principalement deux métalloprotéases, MMP9 et MMP14, ainsi que trois désintégrines métalloprotéases, ADAM9, -10 et -17 impliquées dans le clivage de MICA (Waldhauer et coll., Cancer Res. 2008) (Liu et coll., J. Immunol. 2010) (Sun et coll., Cell. Biot. Int. 2011). La forme soluble de MICA participe à de nombreuses pathologies, notamment dans la progression tumorale. Je reviendrai sur ce point dans une partie dédiée.

3. MICA : un ligand du récepteur NKG2D :

Le récepteur NKG2D fut pour la première fois mis en évidence sur les cellules NK (table 1). Sa fonction de récepteur activateur fut découverte suite à la caractérisation de son interaction avec l'un de ses ligands, MICA (Bauer et coll., Science. 1999). En effet, il a été démontré que l'expression de MICA par des cellules tumorales augmente de façon significative leur élimination par les NK et ce au moyen du récepteur NKG2D. Chez la souris, une étude conduite en 2000 a mis en évidence l'expression de NKG2D sur les NK et a également mis en évidence pour la première fois des ligands du récepteur murin, H-60 et Rae-1.

Table 1. Expression du récepteur NKG2D chez l'Homme et chez la souris.

Type cellulaire	Expression	
	Souris	Homme
NK	100 %	100 %
Lymphocytes T CD8+	Avant activation : 0% Après activation : 100%	100 %
Lymphocytes T CD4+	Rare	Rare
Lymphocytes T $\gamma\delta$	Rate : 25% IEL : 0% T $\gamma\delta$ épiderme : 100%	T $\gamma\delta$ périphérique (sang) : 100% IEL : 100%
Macrophages	Avant activation : 0% Après activation : 100%	0% (Macrophages et monocytes)

3.1. Contribution de l'interaction MICA/NKG2D à l'activation de cellules effectrices :

3.1.1. Rôle dans l'activation des NK :

L'expression de ces ligands par des cellules cibles augmente de façon significative leur élimination par les NK, mais également induit la sécrétion d'IFN γ (Diefenbach et coll., Nat. Immunol. 2000). D'autres études ont été menées sur le rôle de NKG2D dans l'élimination des cellules tumorales et ont montré que bloquer l'interaction du récepteur avec ses ligands au moyen d'un anticorps bloquant réduit de façon significative la lyse des cellules tumorales (Jamieson et coll., Immunity. 2002). Ce résultat important suggère que NKG2D joue un rôle important dans la reconnaissance et la lyse des cellules tumorales mais qu'il n'est pas le seul récepteur impliqué dans ce processus. D'autres récepteurs ont ainsi été associés à l'activation des cellules NK, dont NKp46 et 2B4. Ces deux récepteurs activateurs agissent en synergie avec le récepteur NKG2D exprimé par les NK (Bryceson et coll., Blood. 2006). Néanmoins, il a été démontré que des NK traités avec de l'IL-2 ou de l'IL-15 peuvent s'activer suite à l'interaction de NKG2D avec l'un de ses ligands, et ce

sans l'intervention d'autres récepteurs activateurs. L'importance des NK et du récepteur activateur NKG2D est désormais avérée dans l'immunité anti-tumorale. Une étude conduite en 2008 dans un modèle de souris KO pour le gène codant pour NKG2D montre que ce récepteur n'est pas indispensable au développement des NK mais capital pour l'immunosurveillance des tumeurs. En effet, les souris déficientes pour NKG2D développent rapidement des tumeurs en comparaison avec le groupe contrôle, et ce malgré une expression de ligands du récepteur NKG2D par les cellules tumorales comparable entre les deux groupes (Guerra et coll., *Immunity*. 2008). Les conséquences de l'activation des NK via NKG2D ne se limitent pas à la lyse des cellules tumorales, les NK libèrent également de grande quantité d'IFN γ , de TNF α et de G-CSF mais aussi de nombreuses chimiokines. L'IFN γ par exemple va permettre d'augmenter l'expression des molécules de classe I à la surface des cellules tumorales et permettre ainsi leur reconnaissance puis leur élimination par les lymphocytes T CD8+. Le TNF α est quant à lui impliqué dans l'induction de l'apoptose des cellules tumorales via l'activation de la caspase 8 (Peter et coll., *Cell Death & Differentiation*. 2003). De plus, l'action croisée de l'IFN γ et du TNF α libérés par les NK favorise la sénescence des cellules tumorales (Braumuller et coll., *Nature*. 2013). L'IFN γ libéré par les NK suite à leur activation via NKG2D peut également moduler la réponse adaptative, notamment en participant à la maturation des cellules dendritiques et en orientant la polarisation des T CD4+ vers un profil Th1 (Martin-Fontecha et coll., *Nature Immunology*. 2004) (Adam et coll., *Blood*. 2005). Les NK sont également impliqués dans l'élimination des cellules dendritiques exprimant faiblement les molécules de classe I, notamment celles ayant un défaut de maturation (Piccioli et coll., *JEM*. 2002). L'élimination des cellules infectées par des virus constitue une autre fonction des NK, passant entre autre par NKG2D. Une étude récente montre que le VIH-1 exprime la protéine virale Vpr capable d'induire l'expression des ligands de NKG2D par les lymphocytes T CD4+ infectés ayant pour conséquence une reconnaissance accrue des

cellules infectées par les NK (Richard et coll., Blood. 2010). Des travaux menés par notre équipe sur l'impact des CE issues de cultures primaires sur la fonction des NK révèlent que les CE modulent l'expression du récepteur NKG2D exprimé par les NK (Chauveau et coll., J Innate Immun. 2014). Cette modulation du récepteur sans activation de la CE s'explique par l'expression constitutive de MICA par les CE. L'activation des CE suite à un traitement au TNF α augmente significativement l'expression de MICA et se traduit par une modulation plus importante du récepteur NKG2D. Ces observations sont à mettre en relation avec l'importance des CE en transplantation puisqu'elles constituent une interface cellulaire entre le donneur et le receveur et sont des cibles des cellules effectrices T CD8+ et NK (figure 9).

3.1.2. Rôle dans l'activation des lymphocytes T $\gamma\delta$:

La fonction de NKG2D lorsqu'il est exprimé par les lymphocytes T gamma-delta diffère légèrement. En effet, ces cellules arborent différents récepteurs activateurs, dont le plus important et le mieux décrit est le TCR gamma delta. Contrairement aux NK, les lymphocytes gamma-delta reçoivent divers signaux hiérarchisés selon leur importance dans l'activation de la cellule. Quatre types de signaux existent, le signal 1 est associé à l'engagement du TCR avec l'un de ses antigènes (peptides, lipides, phosphoantigènes) et constitue le signal clé dans l'activation du lymphocyte gamma-delta. Le signal 2 est dû à l'interaction des différents co-récepteurs activateurs dont les plus connus sont le CD28 et le CD27 avec leur ligands respectifs, le CD80 et le CD86. Le signal 3 provient de l'interaction des cytokines, comme l'IL-2, l'IL-7, l'IL-15, l'IL-12 et l'IL-18, avec leurs différents récepteurs. Enfin, le signal 4 provient de l'interaction des NKR avec leurs ligands. Parmi ces NKR se trouve le récepteur NKG2D qui a une fonction à part entière dans l'activation des lymphocytes gamma-delta. En effet, l'interaction de NKG2D avec l'un

de ses ligands, MICA, conduit à une fonction co-stimulatrice sur des lymphocytes T gamma-delta Vg2Vd2 (Das et coll., Immunity. 2001). Cette étude montre ainsi une forte similitude fonctionnelle entre NKG2D et la molécule de co-stimulation CD28. Une nouvelle étude réalisée en 2010 sur la sous-population Vg9Vd2 de T gamma-delta révèle que l'engagement de NKG2D avec ses ligands n'induit pas de flux calcique dans le lymphocyte alors que l'engagement conjoint de NKG2D et du TCR augmente de façon significative le flux calcique généré (Nédellec et coll., J Immunol. 2010). Néanmoins, divers travaux suggèrent que NKG2D peut également activer les T gamma-delta sans intervention du TCR. C'est par exemple le cas de recherches conduites en 2005 sur la population Vg9Vd2 qui montrent que des transfectants murins exprimant le ligand MICA sont capables d'activer cette sous population de T gamma-delta, sans engagement du TCR (Rincon-Orozco et coll., J Immunol. 2005). Une étude *in vivo* chez la souris et sur une autre population de T gamma-delta, Vg5Vd1, suggère que NKG2D peut activer cette population de T gamma-delta après induction de Rae-1 sur des cellules tumorales murines, sans intervention du TCR (Strid et coll., Nature Immunol. 2008). Une expérience similaire fut réalisée deux ans plus tôt par une autre équipe, également sur la population Vg5Vd1, et montre que ces lymphocytes peuvent être activés via NKG2D et avoir une activité cytotoxique sur des lignées de cellules tumorales (Nitahara et coll., J Invest Dermatol. 2006). De façon intéressante, des études ont montrées que les populations de T gamma-delta Vd1+ pouvaient s'activer suite à la reconnaissance par leur TCR de la protéine MICA (Wu et coll., J Immunol. 2002) ou de la protéine ULBP-3 (Poggi et coll., Cancer Res. 2004). De plus, il semble que les T gamma-delta Vg9Vd2 puissent reconnaître directement le ligand ULBP-4 (Kong. coll., Blood. 2009). Une étude récente a montré que l'induction de l'expression de MICA et de MICB par des cellules cancéreuses d'origine ovarienne augmente de façon significative leur élimination par les T gamma-delta Vg2Vd2 (Lu et coll., Biochim Biophys Acta. 2014). L'ensemble de ces observations montrent une fonction

particulière du récepteur NKG2D lorsqu'il est exprimé par les lymphocytes T gamma-delta, avec dans un cas un rôle co-activateur et dans un autre un rôle activateur. La place qu'occupe NKG2D dans l'activation des lymphocytes T gamma-delta est toujours discutée, les mécanismes à l'origine de cette dualité restent méconnus. Néanmoins, ce système pourrait fonctionner de façon indépendante l'un de l'autre et permettre aux lymphocytes T gamma-delta d'apporter une réponse appropriée en fonction du contexte dans lequel ils se trouvent.

3.1.3. Maturation et co-stimulation des lymphocytes T $\alpha\beta$ CD8+ :

Le récepteur NKG2D est également exprimé par tous les lymphocytes T CD8+ alpha-beta chez l'Homme, et uniquement par les T CD8+ alpha beta activés chez la souris. La première caractérisation de la fonction du récepteur NKG2D sur ce type de lymphocytes de l'immunité adaptative fut réalisée en 2001 (Groh et coll., Nat Immunol. 2001). Cette équipe montre que les lymphocytes T CD8+ présentent une activité cytotoxique plus importante vis à vis de cellules infectées par le HCMV. L'infection par ce virus conduit à une sur-expression de MICA par les cellules infectées. Ce résultat suggère que l'interaction de NKG2D avec MICA conduit à une meilleure réponse cytotoxique des T CD8+ vis à vis des cellules cibles. Des travaux sur les protéines adaptatrices liées à NKG2D, en particulier DAP-10, montrent que les T CD8+ issus de souris déficientes pour DAP-10 perdent l'expression de NKG2D et sont incapables de fournir une réponse cytotoxique vis à vis de cellules tumorales (Gilfillan et coll., Nat Immunol. 2002). En 2003, une équipe mis en évidence un rôle possible du récepteur NKG2D dans la maturation des T CD8+ dans le thymus (Hüe et coll., J Immunol. 2003). Cette équipe montre que les précurseurs des T CD8+, les thymocytes CD45RA+ CD62L+ CCR7+ CD69-, sont reconnus par des tétramères MICA via NKG2D. De plus, les corpuscules de Hassal dans

la médulla du thymus expriment MICA, renforçant ainsi l'hypothèse d'un rôle de NKG2D dans la maturation des T CD8+. Lorsque MICA est sur-exprimé dans ces structures, notamment lors d'un thymome, la fréquence des T CD8+ diminue. Ce dernier point suggère un rôle régulateur de NKG2D sur la maturation des T CD8+. Un nouveau rôle du récepteur NKG2D sur les T CD8+ fut avancé en 2004 (Somersalo et coll., J clin Invest. 2004). Dans cette étude, il est montré que NKG2D via MICA pourrait participer à la stabilité de la synapse immunologique entre le T CD8+ et sa cible. Différentes études ont été menées pour valider l'importance de NKG2D dans la co-stimulation des T CD8+, notamment en diminuant l'expression du récepteur par des siRNA (Karimi et coll., J Immunol. 2005). Ces résultats confirment les observations faites précédemment, les T CD8+ n'exprimant plus NKG2D sont moins cytotoxiques vis à vis de lignée de cellules tumorales. Les T CD8+ sont également impliqués dans l'élimination des cellules infectées par des virus, et NKG2D intervient également dans ce contexte. Une étude sur les réponses immunitaires anti-MHV montre que les CTL présentent une meilleure cytotoxicité vis-à-vis des cellules infectées en comparaison avec des CTL dont NKG2D a été bloqué avec un anticorps (Walsh et coll., J Virol. 2008).

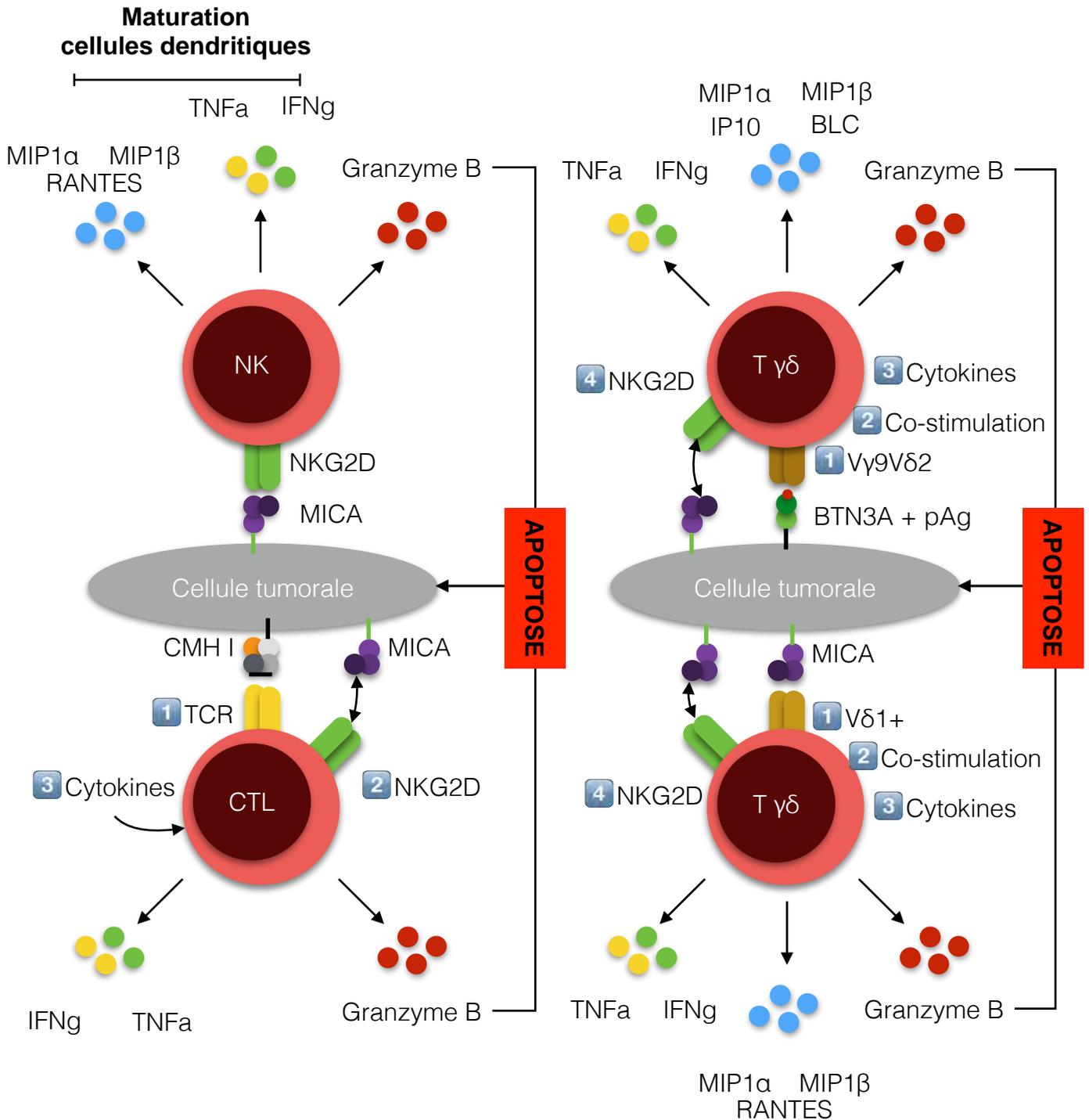


Figure 9 : **Fonctions du récepteur NKG2D exprimé par les NK, les T CD8+ et les T gamma-delta.** Les NK reconnaissent les cellules tumorales via NKG2D et l'un de ses ligands. Cette interaction a lieu durant les étapes précoces de la tumorigénèse et va conduire à l'activation des NK puis à la libération de granzyme B conduisant à l'apoptose de la cellule tumorale. L'activation des NK va également conduire à la production de TNFα et d'IFNγ qui vont permettre la maturation des cellules dendritiques et initier une réponse adaptative de type Th1. Les CTL ainsi générés vont à leur tour rentrer en contact avec les cellules tumorales via l'interaction du TCR avec les molécules de classe I associées à un peptide. NKG2D joue dans ce cas de figure le rôle de récepteur de co-stimulation, au même titre que le CD28. Le troisième signal est généré par les diverses cytokines libérés par d'autres cellules du système immunitaire. Les lymphocytes T γδ forment différentes sous-populations caractérisées par des TCR arborant des chaînes différentes. Chaque TCR peut reconnaître différents ligands comme le TCR Vγ9Vδ2 capable de reconnaître les phosphoantigènes présentés par la molécule BTN3A exprimée par les cellules tumorales. Dans ce cas de figure, NKG2D intervient en second plan comme molécule de co-stimulation. Les TCR équipés de la chaîne Vδ1+ ont la particularité de reconnaître directement MICA et d'induire l'activation du T γδ.

3.2. Les autres ligands du récepteur NKG2D :

Le récepteur NKG2D a la particularité d'avoir plusieurs ligands différents, contrairement aux autres récepteurs qui en général n'en possèdent qu'un, voire deux. Chez l'Homme 8 ligands ont été caractérisés pour le récepteur NKG2D : MICA, MICB, ULBP-1, -2, -3, -4, -5, -6. Le gène codant pour MICB présente un polymorphisme modéré, 41 allèles du gène codant pour 29 protéines ont été décrits à ce jour (<https://www.ebi.ac.uk/ipd/imgt/hla/stats.html>). Les protéines ULBP sont quant à elles codées par le gène *RAET1* localisé dans la région 6q24.2-25.3 du chromosome 6 (Radosavljevic et coll. Genomics. 2002). Dix gènes forment le locus *RAET1* et seulement 6 codent pour des protéines fonctionnelles, ULBP-1 (*RAET1I*), ULBP-2 (*RAET1H*) ULBP-3 (*RAET1N*), ULBP-4 (*RAET1E*), ULBP-5 (*RAET1G*) et ULBP-6 (*RAET1L*). Les gènes codant pour les protéines ULBP, en comparaison aux allèles MIC, sont très peu polymorphes. Les protéines MICA, MICB, ULBP-4 et -5 sont des glycoprotéines transmembranaires alors que les glycoprotéines ULBP-1, -3 et -6 sont ancrées à la membrane au moyen d'un groupement GPI. ULBP-2 a la particularité de pouvoir être exprimée à la membrane sous une forme transmembranaire ou ancrée à la membrane via un groupement GPI (Fernandez-Messina et coll., J Cell Sci. 2011). Des homologues murins aux ULBP existent et correspondent aux protéines *Rae1* mais aucun homologue correspondant à MICA et MICB n'ont été identifiés à ce jour (Cerwenka et coll., Immunity. 2000). D'autres ligands du récepteurs NKG2D ont néanmoins été caractérisés, à savoir H60a, H60b, H60c, MULT1, *Rae1* α , *Rae1* β , *Rae1* γ , *Rae1* δ et *Rae1* ϵ (Diefenbach et coll., Nat Immunol. 2000) (Carayannopoulos et coll., J Immunol. 2002). Les protéines H60a, H60b et MULT1 sont des protéines transmembranaires alors que les autres sont exclusivement associées à la membrane via un groupement GPI (Takada et coll., J Immunol. 2008). Tous les ligands du récepteur NKG2D, qu'ils soient humains ou murins, sont caractérisés par leur structure

très conservée composée de deux domaines extracellulaires alpha 1 et alpha 2 formant une plateforme avec laquelle NKG2D va pouvoir interagir. Les protéines MICA et MICB se démarquent des autres ligands puisqu'elles possèdent un domaine alpha 3 de type immunoglobuline entre la plateforme alpha et le domaine transmembranaire. Une autre caractéristique commune à tous ces ligands est le fait qu'ils ne présentent aucun peptide et qu'ils ne sont pas associés à la beta-2-microglobuline. L'affinité des différents ligands pour NKG2D est de l'ordre du micromolaire au nanomolaire, malgré une homologie de séquence d'environ 25%. L'expression des ligands de NKG2D, qu'ils soient humains ou murins est induite par la transformation tumorale ou par les infections virales et bactériennes. La figure 10 présente la structure et l'affinité des différents ligands de NKG2D.

Ligand humains	MICA	MICB	ULBP1	ULBP2	ULBP3	ULBP4	ULPB5	ULBP6
Structure domaines extra-cellulaires	$\alpha 1, \alpha 2, \alpha 3$ 	$\alpha 1, \alpha 2, \alpha 3$ 	$\alpha 1, \alpha 2$ 	$\alpha 1, \alpha 2$ 	$\alpha 1, \alpha 2$ 	$\alpha 1, \alpha 2$ 	$\alpha 1, \alpha 2$ 	$\alpha 1, \alpha 2$ 
Ancrage à la membrane	TM+Cyt	TM+Cyt	GPI	GPI	GPI	TM+Cyt	TM+Cyt	GPI
Affinité pour NKG2D (Kd)	0,5 μ M	0,5 μ M	1,1 μ M	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d

Ligand murins	H60	MULT1	Rae1 ϵ	Rae1 α	Rae1 β	Rae1 γ	Rae1 δ
Structure domaines extra-cellulaires	$\alpha 1, \alpha 2, \alpha 3$ 	$\alpha 1, \alpha 2, \alpha 3$ 	$\alpha 1, \alpha 2$ 	$\alpha 1, \alpha 2$ 	$\alpha 1, \alpha 2$ 	$\alpha 1, \alpha 2$ 	$\alpha 1, \alpha 2$ 
Ancrage à la membrane	TM+Cyt	TM+Cyt	GPI	GPI	GPI	TM+Cyt	TM+Cyt
Affinité pour NKG2D (Kd)	0,02 μ M	0,004 μ M	0,02 μ M	0,5 μ M	0,5 μ M	0,5 μ M	0,5 μ M

Figure 10 : **Structures et affinités des différents ligands de NKG2D.** MICA et MICB sont les seuls ligands de NKG2D chez l'Homme à posséder un domaine $\alpha 3$. Ces deux ligands se caractérisent également par l'absence de $\beta 2$ -microglobuline et sont ancrés à la membrane via leur domaine trans-membranaire. En parallèle de MICA et de MICB, les ULBP ne possèdent que deux domaines $\alpha 1$ et $\alpha 2$. Les ULBP1/2/3/6 se différencient des ULBP4/5 par un ancrage à la membrane au moyen d'une ancre GPI. La souris présente des ligands de NKG2D comme H60 homologue à MICA ou encore MULT1 homologue aux ULBP et sont tout deux ancrés à la membrane via leur domaine trans-membranaire. Tous les ligands murins se caractérisent par un domaine $\alpha 1$ et $\alpha 2$ uniquement. Les ligands Rae1 sont tous ancrés à la membrane via une ancre GPI. L'affinité pour NKG2D donnée en μ M montre que les ligands murins présentent une meilleure affinité pour le récepteur que leurs homologues humains.

4. Interaction NKG2D/MICA : mécanismes moléculaires :

4.1. Interactions moléculaires :

Les travaux de Benjamin MacFarland et de Roland K. Strong ont permis de comprendre comment fonctionne d'un point de vue moléculaire l'interaction entre NKG2D et ses différents ligands. Leurs études sur l'interaction entre NKG2D et MICA notamment montrent que le complexe formé par ces protéines s'organise de la manière suivante : un ligand monomérique interagit avec un récepteur homodimérique (Li et coll., Nat Immunol. 2001). Chaque NKG2D monomérique contacte un nombre équivalent de résidus présentés par le ligand par des interactions principalement de type électrostatiques et hydrophobiques. Ils ont pu définir ainsi 6 zones contactées par chaque monomère de NKG2D à la surface de MICA, majoritairement retrouvé au niveau de la plateforme alpha. Ils retrouvent cette configuration à la fois sur ULBP3 et RAE-1 β . Il est par ailleurs intéressant de constater que l'interaction entre NKG2D et ses différents ligands, MICA et ULBP3, fait intervenir généralement les mêmes acides aminés sur le récepteur malgré des différences importantes entre les ligands. L'interaction entre NKG2D et MICA s'articule autour de deux tyrosines (Y152 et Y199), et ce pour chaque monomère du récepteur, constituant ainsi un point clé dans l'interaction entre NKG2D et ses ligands (MacFarland et coll., Immunity. 2003). Ces deux tyrosines sont par ailleurs conservées chez la souris, témoignant ainsi de leur importance dans l'interaction NKG2D/MICA. L'équipe de Roland Strong montre également que ces tyrosines peuvent former plusieurs types de liaisons, comme par exemple des liaisons hydrogènes, des liaisons hydrophobiques avec différents résidus présentés par les différents ligands du récepteur NKG2D. Ils montrent ainsi dans leurs différentes études que NKG2D a la capacité d'interagir spécifiquement avec un panel de ligands tout en étant tolérant face à leur profonde diversité de séquence. De plus, ils

apportent une nouvelle approche vis à vis de l'interaction entre NKG2D et ses différents ligands. Historiquement, le modèle dit « induced-fit » semblait le plus séduisant pour expliquer la tolérance du récepteur NKG2D vis à vis de ses différents ligands puisqu'il prévoie un « ajustement » du récepteur à son ou ses ligands. MacFarland et Strong montrent que l'énergie nécessaire à l'interaction de NKG2D avec ses ligands est incompatible avec le modèle « induced-fit » et vont plus loin en proposant un modèle basé sur une interaction rigide, où le récepteur NKG2D ne s'adapte pas à ses ligands, et suggèrent que l'interaction repose en partie sur les deux résidus tyrosines de NKG2D, formant un véritable noyau central stabilisant l'interaction (figure 11).

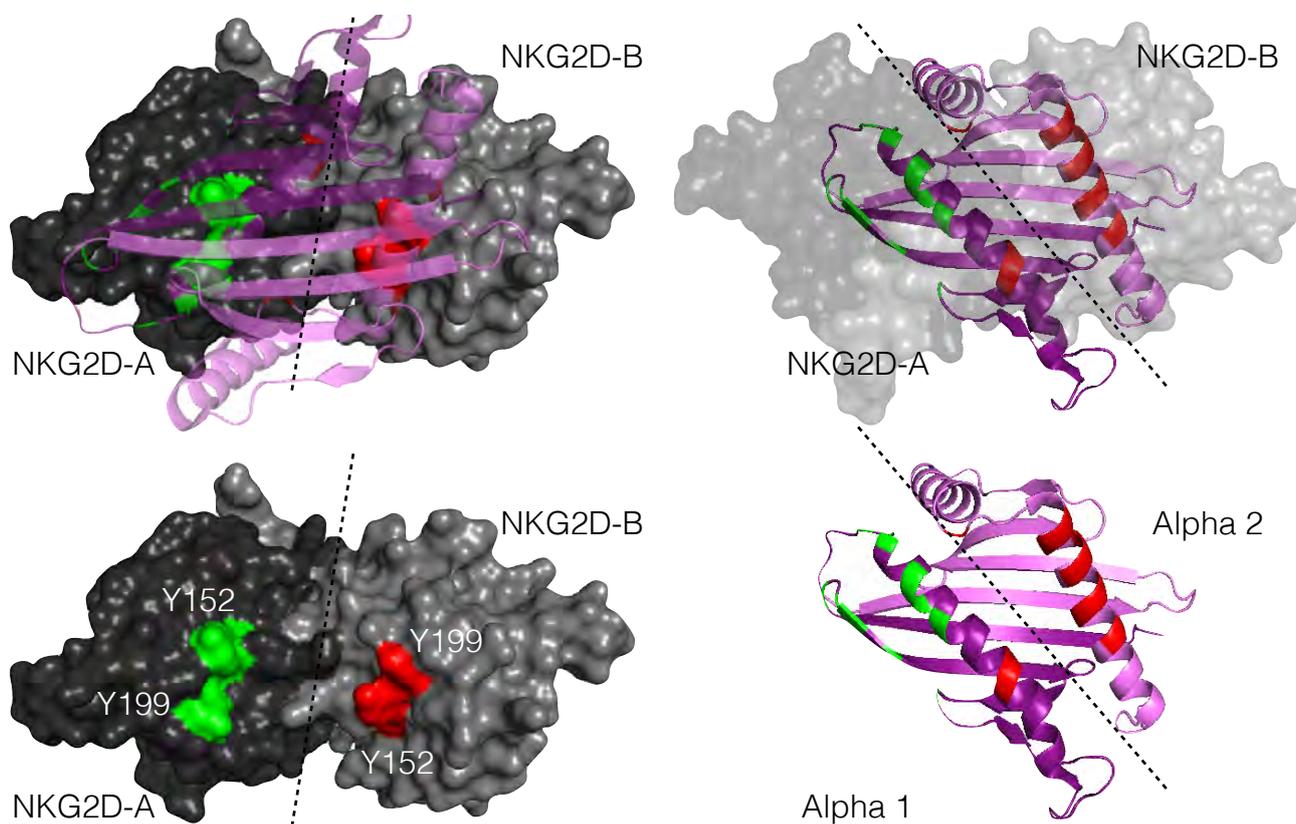


Figure 11 : **Sites d'interaction entre NKG2D et MICA.** NKG2D sous sa forme dimérique va contacter la plateforme alpha de MICA composée des domaines alpha 1 (violet foncé) et alpha 2 (violet clair). L'interaction en NKG2D et ses ligands est régie par deux tyrosines au centre de chaque monomère de NKG2D. Les tyrosines sont figurées en vert pour le monomère A et en rouge pour le monomère B de NKG2D. D'autres résidus de NKG2D sont impliqués dans l'interaction avec MICA mais ne sont pas illustrés. A gauche une vue de l'interface entre NKG2D et MICA. A droite la plateforme alpha de MICA vue de dessus. En vert sont figurés les points de contacts du monomère NKG2D-A sur le domaine alpha 1 de MICA, en rouge, les points de contacts du monomère NKG2D-B sur le domaine alpha 2 de MICA. Par ailleurs, NKG2D interagi majoritairement avec les hélices alpha des domaines alpha 1 et alpha 2, structures les plus exposées de la protéine. L'interaction entre NKG2D et MICA se présente également sous un angle d'environ 45°.

4.2. Voies de signalisation activées par MICA dans les NK :

Chez l'Homme, dix récepteurs activateurs ou associés à l'activation des NK ont été décrits (pour revue : Viver et coll., Nat Immunol. 2008) (figure 12).

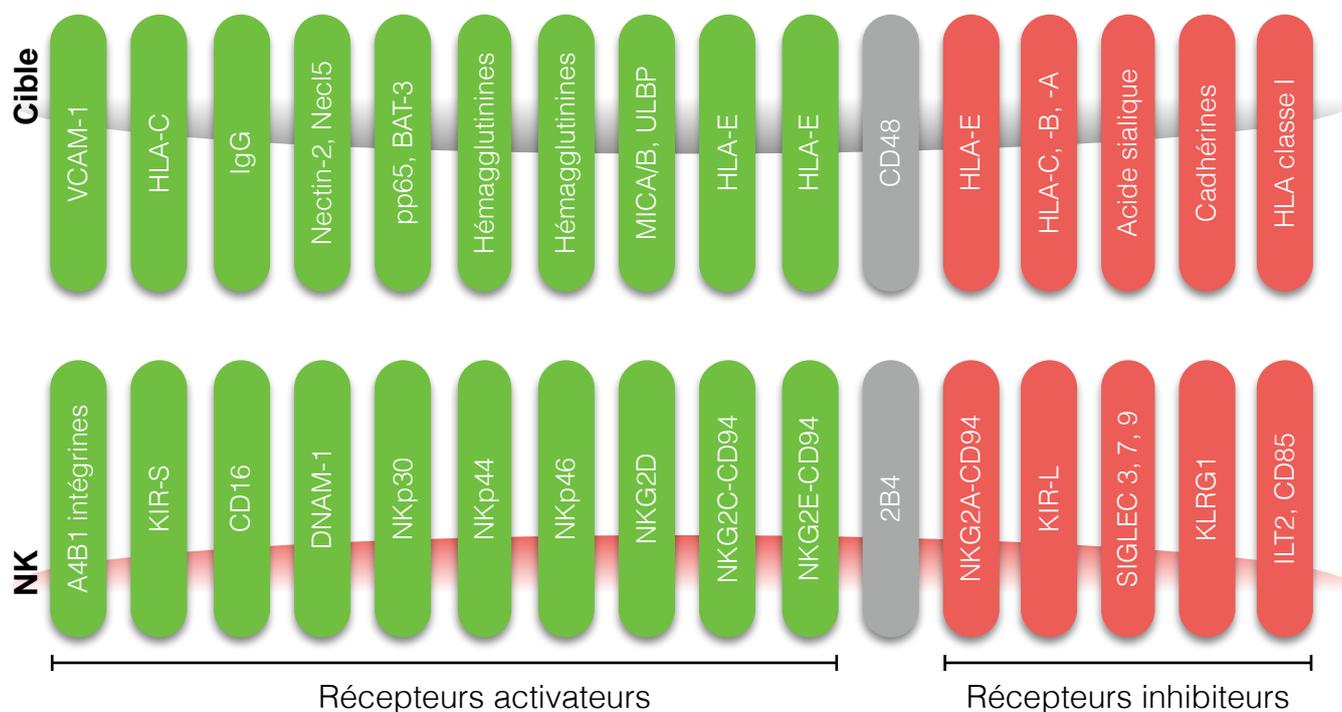


Figure 12 : **Principaux récepteurs activateurs et inhibiteurs.** La réponse du NK est dépendante de nombreux signaux apportés par de nombreux récepteurs activateurs ou inhibiteurs. La résultante de tout ces signaux conduira ou non à l'activation du NK. Les récepteurs activateurs se caractérisent par des séquences intra-cytoplasmiques ITAM (immunoreceptor tyrosine-based activation motif) et les récepteurs inhibiteurs par des séquences intra-cytoplasmiques ITIM (immunoreceptor tyrosine-based inhibition motif). Les cytokines ne sont pas représentées sur ce schéma mais sont importantes pour la régulation des fonctions des NK.

NKG2D est couplé à la membrane de façon non-covalente avec la protéine adaptatrice DAP10, premier élément de la signalisation induite par NKG2D. DAP10 est une protéine adaptatrice trans-membranaire caractérisée par un motif YINM. L'importance de cette protéine adaptatrice dans la signalisation NKG2D fut démontrée en 2002 dans une étude utilisant des souris déficientes DAP10 (Gilfillan et coll., Nat Immunol. 2002). Ces animaux présentent un développement normal des NK mais la fonction cytotoxique passant par NKG2D est fortement diminuée sans être totalement abrogée. L'interaction entre NKG2D et l'un de ses ligands va phosphoryler DAP10 et permettre le recrutement

des protéines de signalisation Grb-2, PLC-g2, SLP-76, PI3K et Vav-1 (Billadeau et coll., Nature Immunol. 2003). L'ensemble de ces protéines de signalisation converge vers la protéine Rac, élément clé dans l'activation de la voie MAPK. Cette signalisation permet de réorganiser le cytosquelette du NK afin de permettre la création de la synapse immunologique, la localisation des granules cytotoxiques au niveau de cette même synapse et leur exocytose. Le couple NKG2D-DAP10 n'est pas le seul à activer la voie de signalisation MAPK, d'autres récepteurs activateurs via d'autres protéines de signalisation convergent pour activer Rac. C'est le cas de tous les récepteurs couplés à des protéines adaptatrice ayant un motif ITAM, comme le CD16, le NKp46, le NKp30 sont couplés au FcRγ et au CD3z. Les récepteurs NKp44, les KIR activateurs et NKG2C-CD94 sont quant à eux couplés à DAP12 (Moretta et coll., 2001). L'activation de ces différents récepteurs activateurs va conduire au recrutement de la protéine adaptatrice Syk qui à son tour va activer les protéines SLP-76, LAT, Shc et Grb2. Tout comme pour la voie de signalisation initiée par NKG2D, ces récepteurs activateurs vont également pouvoir activer la voie MAPK via Vav mais également plus en aval de cette voie via l'activation en cascade des protéines Sos, Ras, Raf et MEK. Les protéines Vav (Vav-1, -2 et -3) constituent un carrefour dans la signalisation initiée par les NCR et NKG2D, deux études importantes avec des souris déficientes pour Vav-1 ou pour Vav-2/3 montrent à quel point ces protéines sont cruciales dans la fonction cytotoxique des NK (Colucci et coll., J Exp Med. 2001). En effet, les résultats obtenus chez les souris Vav-1 ^{-/-} montrent une absence de cytotoxicité via une inhibition de DAP-10 malgré une production d'IFN γ normale et ceux obtenus pour des souris Vav-2/3 ^{-/-} montrent une inhibition de la cytotoxicité via une inhibition de DAP12 et de FcR γ et une production de cytokines altérée.

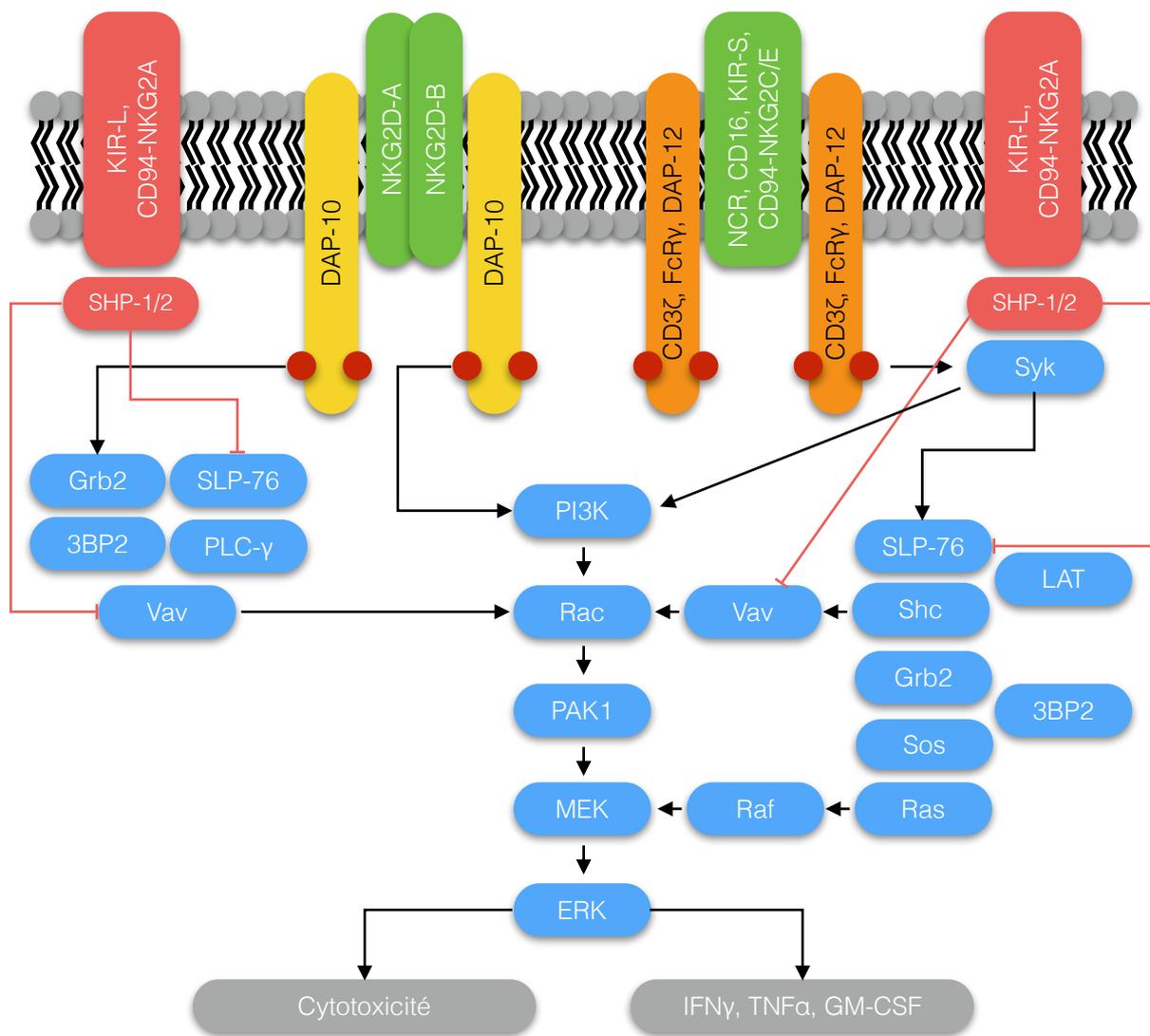


Figure 13 : **Voies de signalisation impliquées dans l'activation des NK.** Les NK disposent de deux types de motifs activateurs, le motif ITAM porté par le CD3 ζ , le FcR γ et DAP-12 ainsi que le motif YINM porté par DAP-10. Les récepteurs activateurs sont illustrés en vert et les récepteurs inhibiteurs en rouge. Les récepteurs inhibiteurs caractérisés par leur motif ITIM vont pouvoir recruter les phosphatases SHP1/2 qui vont à leur tour déphosphoryler les protéines clés dans la cascade d'activation comme Vav ou SLP-76. La finalité de ces différentes voies de signalisation va être d'une part la libération des granules cytotoxiques contenant le granzyme B et la perforine et d'autre part la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires comme l'IFN γ ou le TNF α .

A la surface des NK, les récepteurs activateurs cohabitent avec les récepteurs inhibiteurs, formant ainsi un vaste réseau permettant à la cellule de sonder son environnement et prendre une décision adaptée au contexte. Chez l'homme, les principaux récepteurs inhibiteurs sont les KIR inhibiteurs et le complexe CD94/NKG2A. Tout deux arborent des motifs ITIM dans leur domaine intracytoplasmique pouvant recruter deux protéines de signalisation importantes, SHP-1 et SHP-2. Ces deux protéines sont

des phosphatases dont les substrats sont principalement les protéines Vav et SLP-76. En déphosphorylant ces protéines de signalisation, SHP-1 et SHP-2 empêchent la transduction du signal activateur, et par conséquent l'activation de la cellule (figure 13).

5. MICA/NKG2D : de la reconnaissance à la lyse de la cellule cible :

La fonction principale des NK consiste en l'élimination des cellules infectées par des virus ou bien des cellules subissant une transformation tumorale. Avant cette étape critique et irréversible, les NK doivent passer différents points de contrôle afin de savoir si oui ou non la cellule contactée doit être éliminée. Ce processus peut être découpé en trois grandes étapes : la reconnaissance de la cellule cible, la phase effectrice et enfin l'étape correspondant à un retour à la normale du NK (figure 14).

5.1. Etape de reconnaissance du NK et de la cellule cible :

Afin de pouvoir infiltrer les tissus, les NK expriment un large panel de récepteurs aux chimiokines libérées entre autre par des cellules telles que les macrophages et les cellules dendritiques. Une fois sur place, les NK vont pouvoir patrouiller afin de déterminer quelles cellules sont à préserver et quelles cellules sont à éliminer. Pour ce faire, il a récemment été mis en évidence que les NK développent de longs prolongements cytoplasmiques appelés nanotubes (Chauveau et coll. Proc Natl Acad Sci USA. 2010). Ces structures fines et non adhérentes constituent de véritables extensions capables de sonder l'environnement du NK et d'optimiser ses déplacements en les tractant vers les cellules exprimant le plus de ligands de stress. De plus, la présence de nanotubes sur les NK a été associée avec une meilleure cytotoxicité, ce qui suggère que ces structures particulières sont capables de libérer des granules cytotoxiques. Ce dernier point est

appuyé par le fait que l'on retrouve au niveau de la synapse entre un nanotube et une cellule cible NKG2D et DAP10, deux éléments importants dans l'activation du NK. Néanmoins, les mécanismes impliqués dans ce processus restent à ce jour mal connus.

Une fois la cellule à éliminer identifiée, le NK va mettre en place tout un système garantissant sa stabilité pour permettre la mise en place de la seconde étape. Ce système repose sur différents récepteurs interagissant avec des ligands exprimés par la cellule cible, comme par exemple le CD62L, PSGL-1, LFA-1, CD2 mais également des récepteurs activateurs comme DNAM-1, NKG2D et les NCR. Il est intéressant de noter que les récepteurs intervenant dans l'adhésion du NK sur sa cible sont également, en partie, des récepteurs clés dans l'activation des fonctions cytotoxiques du NK (Bryceson et coll., Blood. 2009). La synapse immunologique va se mettre en place sous le contrôle principal de LFA-1 qui une fois activé va permettre le recrutement de tyrosines kinases, la production de PIP(4,5)P2 et la réorganisation de la F-actine tout en inhibant toutes voies de signalisation impliquées dans la migration du NK (Mace et coll., Blood. 2010). La réorganisation de la F-actine est importante notamment pour l'activation d'autres protéines de signalisation comme Vav1 qui joue un rôle central dans l'activation du NK (Riteau et coll., J Exp Med. 2003). C'est précisément à ce moment où le NK est à proximité de sa cible que les interactions entre les récepteurs activateurs, les récepteurs inhibiteurs et leurs ligands vont se produire afin d'orienter ou non le NK vers la dégranulation. Si les signaux activateurs sont plus nombreux que les signaux inhibiteurs, le NK va libérer le contenu d'une première vague de granules stockés en vue d'une réponse rapide sans que MTOC ne se soit encore réorganisé. Néanmoins, cette étape peut être considérée comme préliminaire à la cytotoxicité. Une fois les premiers granules lytiques libérés, les réorganisations du cytosquelette du NK continuent, en particulier MTOC dont la fonction va être d'organiser les microtubules sur lesquels vont circuler les granules lytiques nouvellement formés (Tuli et coll., Mol Biol Cell. 2013). Une fois ces réorganisations

terminées, les granules lytiques sont localisés au niveau de la synapse immunologique et sont prêts à être libérés.

5.2. La phase effectrice :

Lors de la phase effectrice, le NK va libérer massivement ses granules cytotoxiques et lyser la cellule cible. Le cytosquelette d'actine du NK a totalement été réorganisé sous le contrôle de WASp et de la protéine Rho GTPase Cdc42 pour permettre à son tour la réorganisation des micro-tubules sur lesquels vont se déplacer les granules cytotoxiques pour migrer vers la synapse immunologique (Orange et coll., Proc Natl Acad Sci USA. 2002). De plus, cette réorganisation va définir précisément la synapse immunologique dans laquelle vont co-localiser les différents récepteurs activateurs et inhibiteurs ainsi que les protéines de signalisation correspondantes (Beemiller et coll. Nat Immunol. 2012). Des micro-domaines contenant le récepteur NKG2D et sa protéine adaptatrice DAP10 se retrouvent principalement au centre de la synapse mais également dans la périphérie de cette dernière alors que le récepteur activateur 2B4 est quant à lui exclusivement retrouvé au centre, suggérant des mécanismes de localisation spécifique à chaque récepteur et non un mécanisme global. A l'issue de l'interaction entre le ligand et son récepteur activateur, MICA et NKG2D par exemple, vont permettre l'activation de deux voies de signalisation : la voie de la PI3K et la voie de la phospholipase C γ (Bryceson et coll., J Innate Immun. 2011). Ces deux voies de signalisation différentes ont pour finalité de mobiliser le calcium intracellulaire indispensable pour la mobilité et la fusion des granules cytotoxiques. En parallèle de la migration des granules, l'interaction des récepteurs activateurs avec leurs ligands, notamment NKp30, va également permettre la synthèse de perforine et de granzymes en activant des facteurs de transcription tel que NF κ B (Pandey et coll., J Immunol. 2007). La réorganisation du cytosquelette du NK s'accompagne

également d'une polarisation des organites au niveau de la synapse, notamment l'appareil de Golgi qui va apporter rapidement les granules cytotoxiques nouvellement générés. Les mitochondries vont également migrer vers la synapse immunologique afin de maintenir un flux de calcium constant nécessaire à la signalisation et à la dégranulation (Abarca-Rojano et coll., Immunol Let. 2009) (Maul-Pavicic et coll., Proc Natl Acad Sci USA. 2011). La phase effectrice se termine lorsque les granules arrivent au niveau de la synapse pour fusionner avec la membrane plasmique du NK et libérer la perforine et le granzyme B. Lors de la phase effectrice, un phénomène particulier peut avoir lieu, il s'agit de la trogocytose (Nakamura et coll., Proc Natl Acad Sci USA. 2013). En effet, les cellules NK et leur cible sont extrêmement proches et des transferts de membrane peuvent avoir lieu entre les deux cellules. Des ligands de récepteurs activateurs, comme MICA, qui vont pouvoir être ainsi transférés de la cible au NK et participer à l'arrêt de la phase effectrice en éliminant une partie des NK activés.

5.3. La phase de terminaison :

La phase de terminaison fait suite à la phase effectrice afin de permettre un retour à la normale des NK activés. C'est également durant cette période que la cellule cible va réellement entrer en apoptose suite à l'intégration du granzyme B facilité par la perforine. Cette dernière a également une fonction clé dans le processus de terminaison car elle va provoquer un inversement de la membrane plasmique de la cellule cible et ainsi exposer les phosphatidylsérines. Ces phospholipides particuliers vont induire un signal au NK favorisant le processus de terminaison via l'interaction avec CD300a (Simhadri et coll., Blood. 2012). La terminaison est également initiée plus en amont avec l'internalisation et la dégradation des récepteurs NKG2D et CD16 ayant interagi avec leurs ligands, ce qui

conduit ainsi à une baisse progressive du signal activateur (Romee et coll., Blood. 2013).
 La phase de terminaison prend fin avec le détachement du NK de sa cible.

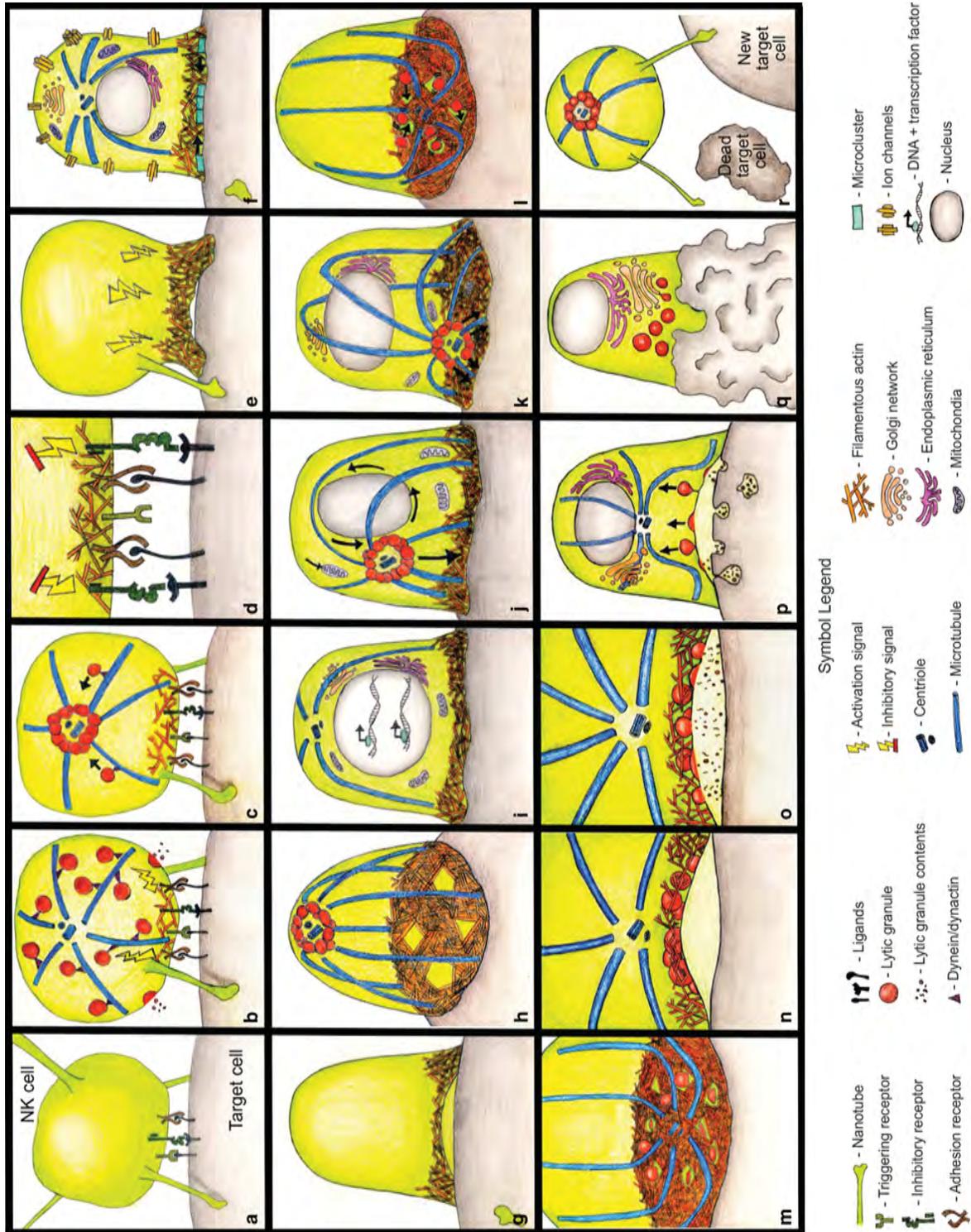


Figure 14 : Mise en place de la synapse immunologique entre un NK et sa cible. Les illustrations allant de a à d correspondent à l'étape de reconnaissance, de e à p l'étape effectrice et enfin de q à r l'étape de terminaison. Figure issue de la revue *Cell biological steps and checkpoints in accessing NK cell cytotoxicity*, Mace et coll., *Immunology and Cell Biology*, 2014.

6. MICA et pathologies immunes :

De nombreuses études rapportent l'implication de MICA dans diverses pathologies. Nous retrouvons ainsi MICA impliquée dans l'immunité anti-tumorale, le contrôle des infections bactériennes et virales (pour revue, Diefenbach et coll., Curr. Biol. 1999). Paradoxalement, MICA peut être aussi à l'origine ou du moins être un acteur majeur du développement d'une pathologie. On notera par exemple le rôle de MICA en transplantation, où son polymorphisme peut être à l'origine d'une allo-immunisation pouvant conduire au rejet de greffe, ou encore dans le développement de maladies auto-immunes (pour revue : Luo et coll., clin Transplant. 2014 ; Cerwenka & Lanier, Tissue Antigens. 2003).

6.1. MICA et immunité anti-tumorale :

Lors des processus tumoraux, MICA est régulièrement exprimée à la surface des cellules tumorales. C'est ce qu'a démontré Veronika Groh dans ses travaux sur différentes tumeurs et l'expression des ligands du récepteur NKG2D dont MICA (Groh et coll., Proc Acad Sci USA. 1999). L'expression de MICA à la surface des cellules tumorales serait liée à l'altération de l'ADN causée par le processus de transformation tumorale. Il est relativement évident de mettre en relation le contexte tumoral et l'expression de MICA où l'objectif est d'alerter le système immunitaire d'une situation anormale. Les travaux de Stefan Bauer apportent la preuve expérimentale *in vitro* en montrant que des cellules tumorales exprimant MICA et/ou d'autres ligands du récepteur NKG2D sont reconnues et éliminées par des cellules NK (Bauer et coll., Science. 1999). De plus, cela a été démontré *in vivo* dans un modèle murin par le groupe de Lewis Lanier. En effet, les souris rejettent préférentiellement les tumeurs exprimant RAE-1, un ligand du récepteur NKG2D, en

comparaison avec des tumeurs n'exprimant aucun ligand du récepteur NKG2D. Les travaux de Diefenbach apportent des conclusions similaires dans un modèle murin avec le ligand H60, ligand homologue à MICA. Ces résultats soutiennent l'idée que les NK participent activement à la reconnaissance et à l'élimination des tumeurs, et ce au moyen de ligands comme RAE-1 chez la souris et MICA chez l'Homme (Cerwenka et coll., Proc. Acad. Sci. USA. 2001) (Diefenbach et coll., Nature. 2001). De nouvelles études menées notamment par Mark J. Smyth avec des anticorps neutralisant NKG2D et par Nadia Guerra avec des souris déficientes pour NKG2D montrent l'importance du récepteur dans la surveillance des cellules tumorales. En effet, ces deux études montrent que les souris ayant reçu des anticorps bloquants anti-NKG2D ou des souris déficientes pour NKG2D ont une susceptibilité accrue de développer une tumeur (Smyth et coll., J. Exp. Med. 2005) (Guerra et coll., Immunity. 2008).

En parallèle de ce rôle clé dans les réponses anti-tumorales, MICA est également souvent impliqué dans les mécanismes d'échappement tumoral. De nombreuses études montrent que la forme soluble de MICA possède une fonction immunosuppressive en modulant l'expression du récepteur NKG2D. Les travaux de Gumireddy mettent en avant le rôle de la thiol isomérase ERp5, dont l'implication sur le clivage de MICA est documentée, dans le développement des métastases chez des patientes atteintes d'un cancer du sein (Gumireddy et coll., Proc. Acad. Sci. USA. 2007). Une seconde étude importante menée par Masahisa Jinushi montre l'implication de la forme soluble de MICA chez des patients atteints de myélome multiple. Dans cette étude, il est montré que la présence de MICA soluble est corrélée à la sur-expression de ERp5 et que la présence de forme soluble de MICA est associée à une progression de la pathologie (Jinushi et coll., Proc. Acad. Sci. USA. 2008). Une étude récente menée par l'équipe de Charles H. Graham montre que l'hypoxie, phénomène fréquent dans les processus tumoraux, induit une augmentation de l'expression de la métalloprotéase ADAM10, connue pour être

impliquée dans le clivage de MICA (Barsoum et coll., Cancer Res. 2011). En effet, l'augmentation de l'expression d'ADAM10 corrèle avec l'augmentation de la forme soluble de MICA dans le sang des patients testés. Une nouvelle étude publiée en 2013 par l'équipe de Dieter Kabelitz montre que la métalloprotéase ADAM17, tout comme ADAM10 est également exprimée par certaines cellules tumorales et peut induire la libération de forme soluble de MICA (Chitadze et coll., Int. J. Cancer. 2013). Avec ADAM10 et ADAM17, une autre métalloprotéase, ADAM9, est impliquée dans la libération de la forme soluble de MICA. C'est ce que démontrent Keisuke Kohga et de Tomohide Tatsumi dans une étude sur l'implication de l'IL-1 β dans la libération de la forme soluble de MICA chez des patients atteints d'un carcinome hépatocellulaire (Kohga et coll., Cancer Immunol. Immunother. 2012). Leurs résultats montrent que l'augmentation d'IL-1b dans le sérum des patients est corrélée avec l'augmentation de la forme soluble de MICA mais aussi qu'elle induit l'augmentation de l'expression de la métalloprotéase ADAM9.

Un nouveau mécanisme d'échappement tumoral a émergé depuis quelques années, il s'agit des exosomes. Les tumeurs sont en effet capables de libérer en grande quantité d'exosomes (microparticules de quelques dizaines de nanomètres). Les travaux d'Aled Clayton font partie des premiers à s'intéresser à ce phénomène encore mal connu (Clayton et Tabi, Blood Cells Mol. Dis. 2005) (Clayton et coll., J. Immunol. 2008). Il montre dans ses études sur les exosomes issus de cellules tumorales que ceux-ci expriment MICA, MICB mais également du TGF- β . MICA et MICB exprimés par les exosomes modulent l'expression du récepteur NKG2D conduisant ainsi à une diminution de la cytotoxicité des NK vis à vis des cellules tumorales. Le TGF- β est quant à lui connu pour ses effets sur la progression tumorale en instaurant un contexte tolérogène. Les travaux de Günter Eisele montrent effectivement que le TGF- β constitue également un autre mécanisme d'échappement développé par les cellules tumorales, notamment les cellules issues de gliomes (Eisele et coll., Brain. 2006). Il montre que le TGF- β induit une

diminution de l'expression de MICA ainsi que celle de deux autres ligands du récepteur NKG2D, ULBP2 et ULBP4. Les travaux d'Omodele Ashiru apportent une nouvelle vision sur les exosomes et MICA. En effet, ils montrent que l'on retrouve exprimé préférentiellement MICA*008 à la surface des exosomes par rapport aux autres allèles de MICA et que ces exosomes peuvent induire la modulation du récepteur NKG2D, conduisant ainsi à la progression tumorale (Ashiru et coll., Cancer Res. 2010).

Une étude menée par le groupe de Thomas Spies en 2011 révèle que certaines tumeurs avancées peuvent exprimer le récepteur NKG2D lorsque ses ligands sont exprimés de façon persistante (Benitez et coll., Proc Natl Acad SCI USA. 2011). Le récepteur est couplé à la protéine adaptatrice DAP10 et est par conséquent fonctionnel. Il montre également que ces mêmes cellules expriment les ligands du récepteur NKG2D, et peuvent ainsi activer les voies de signalisation en aval. Thomas Spies et son groupe observent une augmentation de la prolifération des cellules tumorales NKG2D+ ainsi qu'une augmentation du métabolisme cellulaire conduisant à une progression tumorale. Un autre mécanisme pouvant expliquer la progression tumorale peut également s'expliquer par la diminution de la présentation des ligands de NKG2D aux cellules immunitaires.

Certains types de tumeurs ont développé d'autres stratégies pour échapper au système immunitaire en ciblant les gènes, en particulier ceux codant pour des ligands du récepteur NKG2D. L'équipe de Beatriz Suarez-Alvarez a montré que plusieurs lignées cellulaires issues de leucémies myéloïdes aiguës peuvent moduler l'expression de MICA et des ULBP-1, -2 et -3. C'est également le cas d'une lignée cellulaire issue de leucémie lymphoïde aiguë vis à vis du ligand ULBP-1 ou encore issue de cancer du sein vis à vis du ligand ULBP-3. Cette étude démontre que la baisse d'expression de ces différents ligands est corrélée avec une forte méthylation du gène codant pour ces mêmes ligands (Baragaño Raneros et coll., Genes and Immunity. 2015).

6.2. MICA et pathogènes :

6.2.1. MICA et infections bactériennes :

Les données relatant l'expression de MICA suite à une infection bactérienne sont peu nombreuses. Néanmoins, les travaux de Das sur l'infection par *Mycobacterium tuberculosis* révèlent que cette bactérie induit une sur-expression de MICA à la surface des cellules épithéliales infectées mais aussi des cellules dendritiques (Das et coll., Immunity. 2001). Une autre étude montre que le LPS induit une forte expression de MICA à la surface de macrophages (Eissman et coll., J. Immunol. 2010). Le mécanisme impliqué fait intervenir le TLR-4 ainsi qu'une diminution des miARNs impliqués dans la régulation de MICA.

6.2.2. MICA et réponses anti-virales :

Contrairement au rôle émergent de MICA dans le contrôle des infections bactériennes, l'implication de MICA dans l'élimination des cellules infectées par des virus est bien documentée. Le contrôle par l'axe MICA-NKG2D des cellules infectées par des virus fait partie des fonctions bien établies de MICA depuis longtemps. MICA intervient comme une alerte visant à activer rapidement l'immunité innée et notamment les cellules NK dont l'objectif premier est de limiter le développement du virus incriminé en éliminant les cellules infectées. En général, les protéines virales indispensables à l'activation des différents gènes viraux vont également induire l'activation des gènes codant pour un ou plusieurs ligands du récepteur NKG2D, MICA dans certains cas. C'est ce que démontre Thomas Spies dans une étude sur l'implication du HCMV sur l'activation du promoteur MICA/B (Venkataraman et coll., J. Immunol. 2007). Dans ses travaux, il met en évidence

l'implication des protéines précoces IE1 et IE2, synthétisées respectivement par les gènes UL123 et UL122, sur l'activation des gènes MICA et MICB.

Au cours de l'évolution, les virus ayant développé des mécanismes de protection vis-à-vis du système immunitaire ont été sélectionnés. Il est intéressant de noter que parmi ces mécanismes il existe principalement des systèmes d'échappement ciblant un ou plusieurs ligands du récepteur NKG2D, montrant ainsi l'importance de ces protéines dans le contrôle des virus par le système immunitaire. Inversement, la diversité des virus pourrait expliquer la raison pour laquelle NKG2D possède autant de ligands à la fonction redondante. Parmi les mécanismes d'échappement viraux connus, il existe les protéines virales et les miARN viraux, tout en sachant que ces mécanismes peuvent co-exister.

Plusieurs virus comme le HCMV, le KSHV, le VIH ou encore le HBV et le HCV sont connus pour utiliser des protéines virales ciblant un ou plusieurs ligands du récepteur NKG2D. Le HCMV produit une protéine virale, UL16, capable de diminuer sélectivement l'expression de MICB, de ULBP1 et 2 (Welte et coll., Eur. J. Immunol. 2003). L'UL16 est responsable de la rétention dans le Golgi de ces trois ligands du récepteur NKG2D conduisant ainsi à une diminution de leur expression à la surface. Néanmoins, l'expression de MICA n'est pas modulée par cette protéine virale. Six ans plus tard, Robert Eagle ajoute ULBP6 à la liste des ligands de NKG2D modulés par UL16 (Eagle et coll., Eur. J. Immunol. 2009). Le groupe d'Alexander Steinle montre en 2006 que l'UL16 cible spécifiquement MICB, ULBP1 et ULBP2 via le domaine extracellulaire alpha2 (Spreu et coll., J. Immunol. 2006). Jan Chalupny met en évidence en 2006 une protéine virale issue du HCMV capable de moduler spécifiquement MICA, il s'agit de UL142 (Chalupny et coll., Biochem. Biophys. Res. Commun. 2006). Omodele Ashiru a mis en évidence par la suite le mécanisme impliqué et montra que l'UL142 provoque la rétention de MICA dans le cis-Golgi des cellules infectées par le HCMV (Ashiru et coll., J. Virol. 2009). Peu d'études sur le polymorphisme de MICA et le HCMV ont été menées, néanmoins une retient l'attention,

il s'agit des travaux de Yizhou Zou (Zou et coll., J. Immunol. 2005). Il montre que MICA*008 n'est pas modulé par le HCMV alors que MICA*027 l'est, bien qu'il présente une forte homologie avec MICA*008. Yizhou Zou émet alors l'hypothèse que le domaine intra-cytoplasmique de MICA est la cible d'une protéine virale responsable de la diminution de son expression, la protéine virale en question étant UL142. Les travaux de Noam Stern-Ginossar mettent en avant un second mécanisme utilisé par le HCMV pour échapper au système immunitaire, il s'agit du miARN UL112 (Stern-Ginossar et coll., Science. 2007). Ce miARN cible préférentiellement MICB et induit une diminution de son expression à la surface des cellules infectées.

Contrairement au HCMV, le KSHV a développé une autre stratégie visant à moduler l'expression de MICA. C'est ce que montre Mair Thomas dans une étude sur l'impact du KSHV sur l'expression de MICA (Thomas et coll., Bioch. Soc. Trans. 2008). Dans cette étude, il met en évidence que le KSHV est capable de produire deux enzymes de type ubiquitine ligase E3, appelées K3 et K5, dont la fonction est d'ubiquitinyler les résidus lysine des protéines à dégrader. La cible de l'enzyme K5 étant MICA, son ubiquitinylation va conduire à sa dégradation précoce menant à une diminution de son expression à la membrane et in fine une réduction des réponses NK vis à vis des cellules infectées. Mair Thomas a également analysé l'impact du KSHV sur le polymorphisme A5.1 et de façon intéressante conclue que ce polymorphisme de MICA n'est pas modulé par le KSHV. Tout comme pour le HCMV, c'est la perte du domaine intracellulaire qui semble être à l'origine de cette résistance. Daphna Nachmani montre que le KSHV, comme le HCMV, produit un miARN, miRNA-K12-7 capable de moduler spécifiquement les ARNm codant pour MICB, induisant ainsi une diminution de son expression à la surface des cellules infectées. Cette même équipe identifie au cours de cette étude un autre miARN impliqué dans la modulation de MICB, mais cette fois produit par l'EBV, le miARN miR-BART2-5p (Nachmani et coll., Cell Host & Microbe, 2009).

Le VIH utilise également des mécanismes d'échappement visant à diminuer l'expression de MICA à la surface des cellules infectées. Les travaux de Cristina Cerboni ont montré que la modulation de l'expression de MICA, mais aussi ULBP1 et ULBP2 est induite par la protéine virale Nef avec pour conséquence une diminution de la cytotoxicité des NK vis à vis des cellules infectées (Cerboni et coll., J Gen Virol. 2007). Néanmoins, les mécanismes impliqués dans la modulation de MICA par Nef restent à définir.

Le HCV a lui aussi développé des stratégies visant à se protéger du système immunitaire, en ciblant en particulier les ligands du récepteur NKG2D. Il a été démontré que le HCV produit une protéase, la NS3/A4, qui cible MICA et MICB dans une moindre mesure et provoque la diminution de leur expression par les cellules infectées (Wen et coll., Cell Mol Immunol. 2008). Néanmoins, les mécanismes impliqués dans cette régulation sélective de MICA et de MICB restent inconnus.

Enfin, une étude récente a montré que le BK et le JC virus ont également développés une stratégie visant un ligand du récepteur NKG2D, ULBP3. Yoav Bauman fut le premier à mettre en évidence l'existence d'un miARN, le miR-J1-3p, capable de cibler spécifiquement la région 3'UTR de l'ARNm codant pour l'ULBP3, provoquant sa dégradation et par conséquent, la diminution de l'expression de la protéine à la surface des cellules infectées (Bauman et coll., Cell Host Microbe. 2011).

6.2.3. MICA et auto-immunité :

Le système immunitaire est impliqué dans de nombreux mécanismes ayant pour objectifs de maintenir un équilibre relatif et prévenir toute situation pouvant devenir pathologique. Pour cela, il doit être capable de discerner ce que l'on appelle communément le « soi » du « non-soi ». Le récepteur NKG2D et ses différents ligands ont été impliqués dans de nombreuses maladies auto-immunes, comme par exemple le diabète de type I, la polyarthrite rhumatoïde, le lupus érythémateux disséminé, la sclérose en plaque, la maladie de Crohn ou encore la maladie coeliaque (Pour revue, Caillat-Zucman, Hum. Immunol. 2006).

Le diabète de type I (T1D) est une maladie auto-immune chronique caractérisée par la destruction des îlots de Langerhans localisés dans le pancréas. Cette destruction conduit à une diminution de la libération d'insuline dans le sang causant une hyperglycémie. En 2003, les travaux menés par l'équipe de Lewis Lanier sur des souris NOD en comparaison avec des animaux non diabétiques montrent une régulation différente d'un ligand du récepteur NKG2D, Rae-1. En effet, les îlots de Langerhans, chez les souris NOD, expriment fortement Rae-1 alors que les animaux contrôles n'expriment pas ce ligand (Ogasawara et coll., Immunity. 2003). Un an plus tard, ce même groupe montre que la pathologie est associée à un infiltrat lymphocytaire de type T CD8 exprimant le récepteur NKG2D. De façon intéressante, cette équipe montre la même année que les îlots de Langerhans issus des souris pré-diabétiques expriment Rae-1, c'est à dire à un stade précoce de la pathologie. Afin de valider cette observation, le groupe de Lewis Lanier traite les souris NOD à un stade pré-diabétique avec un anticorps bloquant mais non déplétant le récepteur NKG2D et observe une absence complète de diabète chez les animaux traités (Ogasawara et coll., Immunity. 2004). En 2007, l'équipe menée par Diane Mathis met en évidence que les NK, chez des patients diabétiques, présentent un

phénotype altéré, notamment une baisse de l'expression du récepteur NKG2D (Rodacki et coll., Diabete. 2007). Ces résultats sont à mettre en relation avec ceux obtenus quelques années plutôt par l'équipe de Lewis Lanier sur les souris NOD montrant une baisse de l'expression du récepteur NKG2D pouvant être corrélée avec l'expression du ligand Rae-1 chez ses animaux diabétiques. En 2012, l'équipe d'Andrey S. Shaw montre dans un modèle de souris transgénique exprimant le ligand Rae-1 au niveau des îlots bêta, un recrutement des lymphocytes T cytotoxiques NKG2D+. De plus, cette équipe démontre que le recrutement des CTL est dépendant de l'expression du ligand Rae-1 et indépendant de la reconnaissance d'un antigène, appuyant ainsi l'implication des ligands du récepteur NKG2D dans l'attraction des CTL NKG2D+ au sein du pancréas. Ils montrent également que les CTL infiltrants le pancréas vont à leur tour attirer d'autres lymphocytes, notamment NKG2D- au sein du pancréas (Markiewicz et coll., Immunity. 2012).

A ce jour, l'implication des ligands du récepteur NKG2D dans un contexte de T1D reste méconnu. Par ailleurs, les causes menant à l'expression de ces ligands normalement absents sont également inconnus, certaines études montrent qu'une infection virale pourrait participer à l'expression de ce type de ligand et conduire à un T1D. C'est par exemple le cas d'un virus de type entérovirus pouvant infecter les cellules des îlots bêta du pancréas, activer les réponses immunitaires innées et conduire à l'élimination de ces îlots (Tauriainen et coll., Semin Immunopathol. 2011). Néanmoins, le T1D est une maladie aux origines multifactorielles, dont NKG2D n'est potentiellement qu'un acteur. Cette hypothèse est soutenue par l'association de certaines molécules du CMH de classe II avec le T1D : l'haplotype HLA DR4-DQ8 (HLA DRB1*04-DQA1*0301-DQB1*0302), l'haplotype HLA DR3-DQ2 (DRB1*03-DQA1*0501-DQB1*0201) et l'haplotype HLA DRB1*15-DQA1*0102-DQB1*0602. Les haplotypes HLA DR4-DQ8 et DR3-DQ2 ont été associés avec la progression du T1D alors que le HLA DRB1*15-DQA1*0102-DQB1*0602 semble protecteur dans ce contexte. Différentes études ont montré une association entre

le T1D et certains allèles MICA, notamment MICA A5 (Nikitina et coll., Ann. N. Y. Acad. Sci. 2004) et MICA A5.1 (Berzina et coll., Ann. N. Y. Acad. Sci. 2002) . Néanmoins, le rôle de MICA dans le T1D n'est pas décrit et il est difficile de déterminer l'impact de son polymorphisme dans cette pathologie, les différentes associations observées pouvant être dues au déséquilibre de liaison entre la gène MICA et le gène HLA-B (Bratanic et coll., Tissue Antigens. 2010).

La polyarthrite rhumatoïde est principalement causée par une activation anormale des lymphocytes T CD4+ provoquant une forte inflammation et conduisant à la destruction des joints synoviaux. Le groupe de Thomas Spies met en évidence en 2003 une population de lymphocytes T CD4+ autoréactifs exprimant le récepteur NKG2D chez les patients atteints de polyarthrite rhumatoïde en comparaison à des individus sains. Cet équipe montre par ailleurs que les synoviocytes expriment anormalement les ligands MICA et MICB pouvant induire la libération de cytokines pro-inflammatoires par les lymphocytes T CD4 NKG2D+ autoréactifs (Groh et coll., Proc. Natl. Acad. Sci. 2003). Par ailleurs, les forts taux de MICA solubles semblent ne pas avoir d'impact sur la modulation du récepteur NKG2D comme cela est abondamment décrit, nous pouvons expliquer ce phénomène par des taux élevés d'IL-15 et de TNF- α retrouvés chez les patients atteints de polyarthrite rhumatoïde et qui peuvent participer à l'expression et au maintien de l'expression de NKG2D par les lymphocytes T CD4+ autoréactifs. Les lymphocytes T CD4+ NKG2D+ vont par la suite maintenir un état inflammatoire en activant notamment les lymphocytes infiltrants, les macrophages et les fibroblastes.

La maladie cœliaque (CD) est également une maladie auto-immune touchant le système digestif, plus précisément les intestins. La gliadine, une molécule assimilée au gluten, a été décrite comme pouvant être à l'origine de la pathologie (Hüe et coll. Immunity. 2004) (Martin-Pagola et coll., Immunogenetics. 2004) (Koning et coll., Springer SEmin. Immunopathol. 2005). Différentes études montrent que cette protéine peut fournir

des peptides pouvant interagir avec deux molécules du CMH de classe II associée à la pathologie, HLA DQ2 et DQ8. Il a également été démontré que des lymphocytes T CD4+ spécifiques des peptides issus de la gliadine existent et peuvent s'activer suite à la reconnaissance des complexes CMH-peptides DQ2 ou DQ8 présentés par des cellules présentatrices d'antigène situées dans la *lamia propria*. L'une des conséquences de cette activation est la production d'IFN γ par ces T CD4+ instaurant un environnement pro-inflammatoire pouvant être un élément important dans le développement de la pathologie. La CD est également caractérisée par un important infiltrat de lymphocytes T CD8+ appelés lymphocytes intra-épithéliaux (IEL) du fait de leur localisation, mais également par des concentrations en IL-15 supérieures à celles observées chez des individus sains. Il a également été montré que l'épithélium intestinal sur-exprime MICA dans les phases actives de la pathologie. L'ensemble de ces observations suggèrent que le système NKG2D-MICA peut être impliqué activement dans la CD. En effet, l'IL-15 induit l'expression du récepteur NKG2D par les IEL mais également l'expression de MICA par les cellules épithéliales intestinales. Par ailleurs, une étude a montré que les IEL, dans ce contexte, présentaient un phénotype NK caractérisé par une expression importante de NKG2D mais également que ces lymphocytes pouvaient éliminer les cellules épithéliales intestinales indépendamment d'un antigène. Au fil des différentes études, NKG2D, MICA et l'IL-15 apparaissent comme un ensemble de facteurs associés les uns aux autres dans la CD, d'une manière probablement analogue à la polyarthrite rhumatoïde.

7. Importance de MICA en Transplantation d'organe :

La protéine MICA est caractérisée par de nombreux résidus polymorphes principalement localisés dans les domaines extra-cellulaires. Ce polymorphisme important a conduit à associer MICA au groupe des antigènes mineurs du groupe d'histocompatibilité. Associé au polymorphisme, l'expression de MICA par les cellules endothéliales a conduit à imaginer un rôle de cette protéine en transplantation (Zwirner et coll., Hum Immunol. 1999). En effet, différentes études montrent une allo-immunisation contre le donneur dans le cadre d'une greffe d'organe mais également d'une allo-immunisation contre le receveur suite à une greffe de moelle.

L'impact de MICA en transplantation a été documenté dans plusieurs études, notamment lors de greffes rénales et cardiaques. Une étude pré-greffe a été menée sur 139 patients transplantés rénaux avec un suivi de 3 mois et montrent une augmentation du nombre de rejet aiguë chez les patients présentant des anticorps anti-MICA avant une transplantation rénale en comparaison avec des patients n'ayant pas d'anticorps anti-MICA avant la greffe (Sumitran-Holgersson et coll., Hum Immunol. 2002). Une seconde étude menée sur 727 patients également transplantés rénaux avec un suivi de 3 mois, 6 mois, un an et deux ans confirme les observations de la première étude (Sanchez-Zapardiel et coll., Transplantation. 2013). Néanmoins, une étude conduite sur 29 patients transplantés rénaux montre une absence de corrélation entre présence d'anticorps anti-MICA avant la greffe et le rejet (Yao et coll., Chin Med J. 2011). Une étude réalisée sur 425 patients suivis à un, cinq et dix ans après la greffe montre la aussi une absence de corrélation entre présence d'anticorps anti-MICA pré-greffe, rejet aiguë et survie du greffon (Lemy et coll., Transplantation. 2010). Une étude sur la survie menée par Zou et collègues sur 1 an post-greffe sur 1910 patients transplantés rénaux montre une augmentation de la survie chez les patients n'ayant pas d'anticorps anti-MICA pré-greffe

en comparaison au groupe de patients ayant des anticorps anti-MICA pré-greffe (Zou et coll., N Engl J Med. 2007). (Lemy et coll., Transplantation. 2010). De plus, ce groupe a montré une forte augmentation d'anti-MICA pré-greffe chez les patients ayant subis des transfusions sanguines ou bien une première greffe, mais également chez les femmes ayant été enceintes deux fois ou plus. Ces résultats contradictoires sont probablement dus à l'absence de typage MICA systématique qui ne permet pas de définir un possible mismatch entre le donneur et le receveur pour MICA. En effet dans ce contexte la détection des anticorps anti-MICA ne permet pas de préjuger de leur fixation sur les cellules du greffon.

Des études ont également été menées chez des patients transplantés rénaux pour mettre en évidence l'impact d'anticorps anti-MICA apparus après greffe. Les travaux de Panigrahi et collègues sur 185 patients transplantés rénaux suivis sur deux ans montrent une augmentation du rejet de greffe chez les individus s'étant immunisés contre MICA sans anticorps anti-HLA du donneur contrairement aux individus sans anticorps anti-MICA. Ses travaux montrent également une meilleure survie des greffons chez les patients n'ayant pas d'anticorps anti-MICA contrairement à ceux s'étant immunisés contre MICA (Panigrahi et coll., Hum Immunol. 2007). De nouvelles études confirment les résultats de Panigrahi et collègues sur l'impact des anticorps anti-MICA apparus post-greffe sur le rejet aiguë (Suarez-Alvarez et Coll., Transplantation. 2009). Les travaux de Cox et collègues sur 442 patients suivis sur une durée moyenne de 5,9 ans montrent que seuls les patients ayant des anticorps anti-HLA du donneur et des anti-MICA apparus après la greffe ont un risque plus élevé de faire un rejet aiguë. Les patients n'ayant que des anti-MICA n'ont, dans cette étude, pas de risque plus élevé de faire un rejet aiguë (Cox et Coll., Hum Immunol. 2011). Trois études publiées en 2012 sur des patients immunisés contre MICA après leur greffe et suivis 1 an et 10 ans ne montrent aucun effet de ses anticorps post-greffe sur l'incidence du rejet aiguë (Lemy et coll., Transplantation. 2012) (Solgi et coll.,

Transpl Immunol. 2012) (Li et Coll., Exp Clin Transplant. 2012). A nouveau la nécessité de corréler le typage MICA des donneurs et receveurs à la détection des anticorps paraît un point important pour la compréhension du rôle des anticorps.

L'impact d'anticorps anti-MICA après une transplantation cardiaque a également fait l'objet de plusieurs études. Des études menées sur des patients transplantés cardiaques suivis un an après la greffe montrent une corrélation entre la présence d'anticorps anti-MICA et le rejet aiguë (Suarez-Alvarez et coll., Transpl Immunol. 2006) (Suarez-Alvarez et coll., Transplant. 2007) (Nath et coll., Hum Immunol. 2010) (Pavlova et coll., Tissue Antigen. 2010) (Zhang et coll., Transplantation. 2011). Ces premières observations ont été faites sur de petits effectifs, allant de 31 à 72 patients et seulement sur un an post-greffe. Néanmoins, une étude sur 188 patients transplantés cardiaques sur l'impact des anticorps anti-MICA pré et post-greffe, sans anticorps anti-HLA du donneur, montre qu'il n'y a pas de corrélation entre la présence d'anticorps anti-MICA et le rejet aiguë (Smith et coll., Am J Transplant. 2009). Cette étude est à pondérer du fait que les sérums ont été collectés de façon irrégulière sur les 5 années d'observation. De plus, cette équipe n'observe aucune expression de MICA sur les biopsies issues des patients testés. Tout comme dans un contexte de transplantation rénale, les observations faites en transplantation cardiaque semblent s'orienter vers un impact délétère des anticorps anti-MICA sur la greffe, et ce malgré quelques études discordantes. Toutes ces études reposent sur la technologie du Luminex utilisant des billes sur lesquelles sont fixées des protéines non glycosylées, dont l'expression est sans commune mesure avec l'expression physiologique des protéines sur des cellules. De plus, toutes ces études suivent des protocoles différents, compliquant de fait leur comparaison.

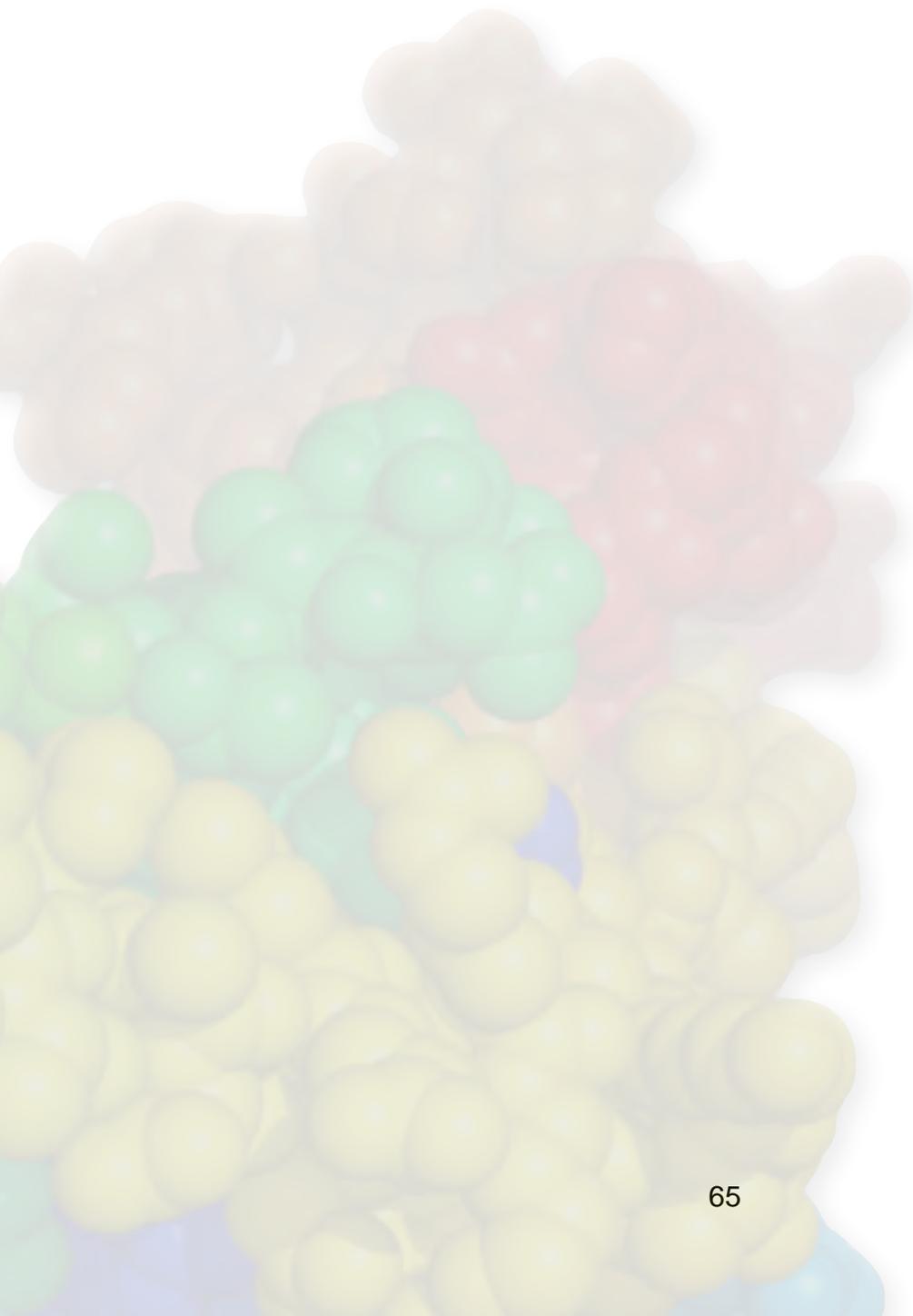
Une étude a identifié des épitopes immunodominants sur MICA pour tenter d'expliquer l'immunisation anti-MICA chez les patients transplantés. Pour se faire, ils ont divisés la séquence codant pour la région extracellulaire de MICA en peptides de 12

acides aminés, recouvrant le précédent peptide sur 7 résidus. En utilisant la technique PepSets, ils montrent que MICA possède 9 régions différentes réactives vis-à-vis d'anticorps anti-MICA issus de sérum de 50 patients transplantés rénaux. Quatre de ces régions présentent un haut degré de polymorphisme par rapport au cinq autres séquences non polymorphes. Parmi ces quatre régions polymorphes, trois résidus semblent être associés à la spécificité des anticorps anti-MICA contre un groupe d'allèle donné, il s'agit des résidus 173 (E/K), 175 (S/G) et 181 (R/T). Une mutation de l'un de ces résidus modifie la réactivité des anticorps testés vis-à-vis du peptide. De plus, les résultats montrent que les patients transplantés présentent rarement des anticorps anti-MICA spécifiques de leurs propres allèles MICA, suggérant des anticorps anti-MICA spécifiques du donneur. Néanmoins, cette étude possède certaines limites, comme le fait d'analyser la réactivité de sérums vis à-vis de peptides de petite taille, étant de fait sous forme linéaire. La structure n'est donc pas prise en compte dans cette étude, où des peptides peuvent se situer dans la protéine et être inaccessible pour un anticorps.

En résumé, les polymorphismes alléliques et du microsatellite de l'exon 5 du gène MICA génèrent des protéines MICA pouvant présenter une certaine diversité de structure et de fonction. L' expression basale des protéines MICA est restreinte à certains types cellulaires. Pour pouvoir être exprimée à la membrane d'une cellule, les protéines MICA doivent subir différents contrôles, certains au niveau transcriptionnel (facteurs de transcription), post-transcriptionnel (miRNA) et pour finir au niveau post-traductionnel (N-glycosylation, ubiquitination). Une fois tous ces points de contrôles franchis, la protéine MICA est exprimée à la membrane. A ce niveau, un dernier mécanisme intervient, il s'agit du clivage protéolytique de la protéine MICA par des métalloprotéinases de type MMP ou ADAM. Ce clivage ne peut se faire qu'après migration de MICA dans les DRM et passe par une palmitoylation de la protéine.

Tous ces mécanismes de régulation font écho à la fonction de MICA, un ligand de stress capable d'activer les cellules de l'immunité innée et adaptative via NKG2D. La protéine MICA et son récepteur NKG2D sont impliqués dans le contrôle de nombreux processus pathologiques, comme la transformation tumorale ou encore les infections virales et bactériennes, mais peuvent également être impliqués dans des maladies auto-immunes, renforçant ainsi l'importance capitale d'une régulation efficace de MICA. MICA est également associé au rejet de greffe en induisant notamment une réponse humorale spécifique du donneur lors d'un mismatch entre le donneur et le receveur.

Objectifs de la thèse



Objectifs de la thèse

Historique du travail de recherche et Objectifs de la thèse :

Ma thèse s'est déroulée dans le laboratoire INSERM UMR1064 au sein de l'équipe 5. Ce travail s'intègre dans la thématique de l'équipe qui est de mettre en évidence le rôle de la cellule endothéliale dans la réponse immune en allo-transplantation notamment de définir la contribution des molécules du HLA de classe I non classiques HLA-E ou MICA exprimées par l'endothélium du greffon.

Concernant l'expression endothéliale de MICA, une première étude conduite sur l'impact fonctionnel du polymorphisme de MICA sur la réponse immune fut initiée dans notre équipe par Pierre Tonnerre au cours de sa thèse. Son travail a permis de mettre en avant certaines spécificités associées au variant MICA A5.1 exprimé par les CE dans un contexte de transplantation rénale (Tonnerre et coll., JASN, 2013). Ces travaux montrent que le variant MICA A5.1 est associé à une sur-expression ou accumulation de la protéine MICA à la surface des CE qui a pour conséquence d'augmenter l'activation des NK via NKG2D. Ils montrent également que le variant MICA A5.1 exprimé par les CE est libéré, sous forme circulante, majoritairement dans des exosomes et non suite à un clivage protéolytique. Cette étude suggère également que les CE d'un donneur porteur du variant MICA A5.1 sont des cibles privilégiées pour des anticorps anti-MICA dans un contexte d'allogreffe rénale. Enfin, le génotypage de MICA dans une cohorte de couples de donneur/receveur (D/R) a permis d'identifier un mismatch D/R pour MICA A5.1 (*DMICA A5.1/R MT WT*) comme un facteur de risque pour la fonction rénale à long terme associé avec une fréquence plus élevée d'immunisation anti-MICA. Ce travail accrédite le concept que certains polymorphismes alléliques, ici MICA*008 associé au variant A5.1, codent

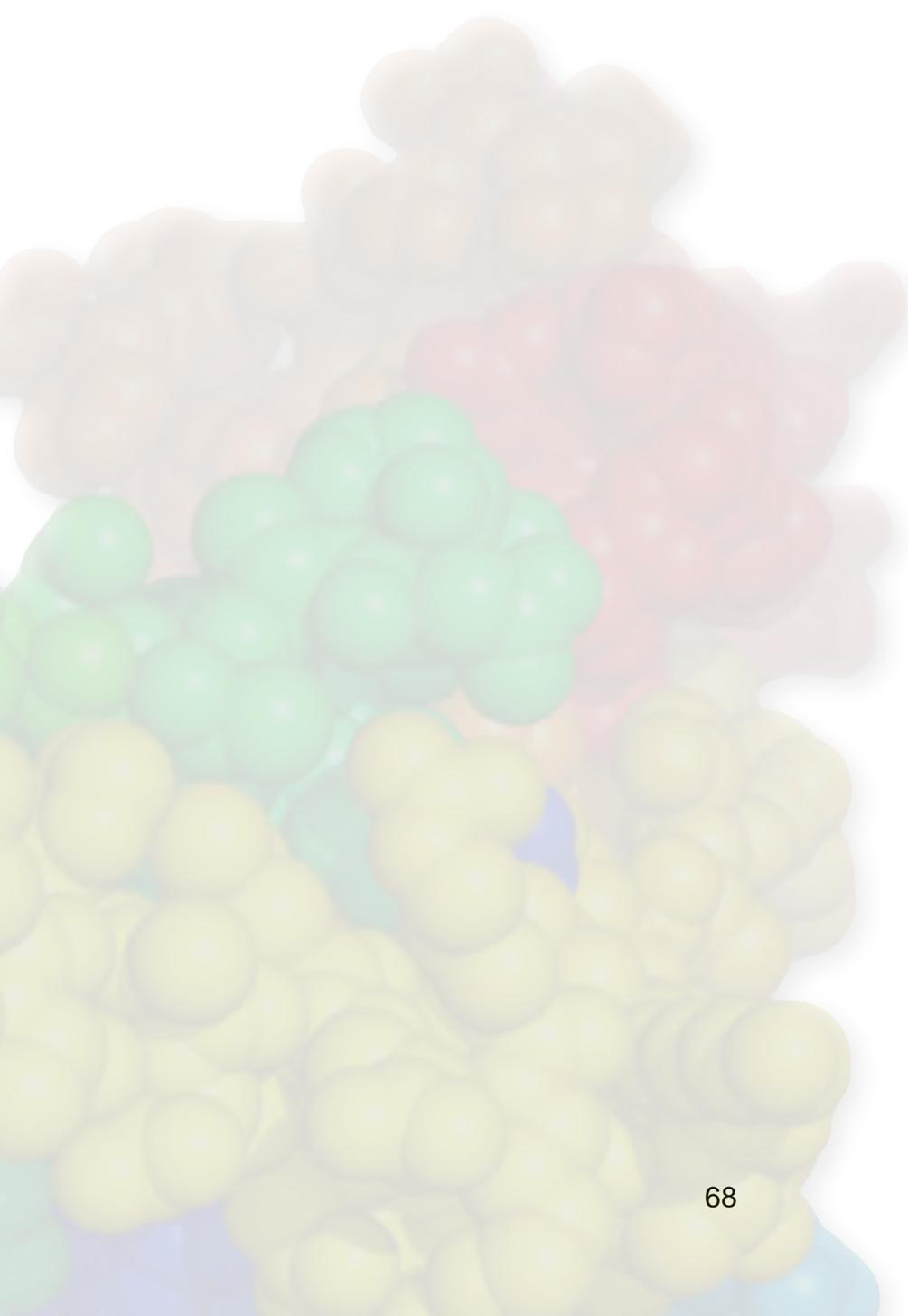
pour des protéines MICA différentes des formes natives et que ces différences de structure, de clivage peuvent avoir des conséquences importantes sur leur expression et donc la fonction de MICA au cours de la réponse immune. Un autre exemple de relation allèle/structure/fonction a été apporté par la mise en évidence dans notre équipe d'un épissage alternatif du gène *MICA* associé à deux allèles MICA*015 et MICA*017. Ces travaux ont constitué les bases de mon projet de thèse.

L'objectif principal de ma thèse a été de caractériser biochimiquement et fonctionnellement de nouvelles isoformes de MICA découvertes par notre équipe. Les résultats obtenus sont présentés dans la première partie des résultats. Ce travail a fait l'objet d'une **publication actuellement en révision** et d'un **brevet déposé** (cf liste de publications).

Le second objectif de ma thèse a été d'apporter ma contribution à une étude visant à analyser l'impact du variant génétique MICA5.1 sur la réactivation du BK virus dans un contexte de transplantation rénale. Mon travail a été de mettre en évidence l'expression de MICA dans le rein par des techniques d'imageries et d'analyses semi-quantitatives. Les résultats obtenus sont détaillés dans la seconde partie des résultats. Ce travail a également fait l'objet d'un **article actuellement soumis pour publication**.

Au cours de ma thèse **j'ai également collaboré à deux études** l'une analysant l'expression et la régulation de MICA par les cellules endothéliales humaines, et l'autre, l'activation sélective des NK NKG2C+ par les cellules endothéliales infectées par le CMV. Ces études ont donné lieu deux articles publiés (Chauveau A. et al., *J. Innate Immunity*, 2014) ou en cours de publication (Djaoud Z. et al, 2015, article soumis).

Résultats



*Partie 1 : Description et
caractérisation de nouvelles
isoformes fonctionnelles de MICA
issues d'un épissage alternatif*

Partie 1. Description et caractérisation de nouvelles isoformes fonctionnelles de MICA issues d'un épissage alternatif

1. Présentation de l'étude :

Le polymorphisme allélique de MICA induit dans certains cas des variants aux fonctions uniques, comme par exemple le variant MICA A5.1 associé à l'allèle MICA*008 codant pour une protéine ancrée à la membrane par un groupement GPI, ou le variant MICA*010 aboutissant à une protéine instable non exprimée. Certains acides aminés polymorphes comme le résidu Met/Val129 ont également un impact notable sur la fonction de MICA puisque la substitution Met/Val 129 peut avoir un impact sur l'affinité de MICA pour le récepteur NKG2D.

Le travail présenté dans cette partie montre que certains allèles *MICA* sont aussi associés à des transcrits résultants d'un épissage alternatif. Cette observation réalisée par notre équipe constitue le point de départ de ma thèse qui a eu pour objectif de caractériser les protéines MICA issues de transcrits alternatifs. De nombreux outils ont été produits pour cette étude et en particulier des plasmides pour la transfection transitoire puis l'obtention de clones stables pour des analyses biochimiques et fonctionnelles. Les nouvelles isoformes MICA sont des protéines qui se différencient de la protéine native (codée par exemple par MICA*001) par la perte d'un ou de deux domaines α et par la présence de séquences correspondant à de nouveaux polypeptides. Ces variations ont été une difficulté pour la détection et donc l'analyse des transfectants en raison de l'absence de réactifs tels que des anticorps capables de reconnaître ces différentes isoformes. Pour contourner ce problème des plasmides contenant différents Tag (FLAG, His, GFP) ont été construits au cours de ma thèse pour les études biochimiques et

fonctionnelles. Une collaboration avec le Pr. Benjamin MacFarland de l'Université de Seattle nous a permis de définir l'affinité des isoformes MICA. Pour définir la capacité de ces nouvelles protéines MICA à se lier et possiblement à activer le récepteur NKG2D pour le récepteur NKG2D, différentes techniques ont été utilisées incluant des analyses de flux de calcium et de vitesse de cellules NK vivantes par vidéo-microscopie réalisées avec le concours de la plateforme Micropicell de la SFR de l'Université de Nantes.

Dans cette étude, nous apportons la démonstration qu'au moins deux allèles MICA (MICA*015 et MICA*017) codent pour un panel de protéines MICA « non conventionnelles » et la description biochimique et fonctionnelle de 5 nouvelles isoformes de MICA. Ce travail a fait l'objet d'un **brevet** et les résultats obtenus lors de cette étude sont présentés dans **l'article 1** qui suit.

2. Résumé de l'article 1 :

Alternative Splice Transcripts For MHC Class I-Like MICA Encode Novel NKG2D Ligands With Agonist Or Antagonist Function

Pierre-Jean Gavlovsky, Pierre Tonnerre, Nathalie Gérard, Steven Nedellec, Andrew W. Daman, Benjamin J. McFarland and Béatrice Charreau

(Article en révision dans the Journal of Immunology au 12/07/2015)

Les protéines MICA/B ainsi que les ULBP sont des ligands du récepteur activateur NKG2D impliqué dans les réponses anti-tumorales et anti-virales. Contrairement aux ULBP, les protéines MICA/B possèdent un domaine alpha 3. Nous avons identifiés 5 nouveaux transcrits alternatifs de MICA codant pour 5 nouvelles isoformes : MICA-A, MICA-B1, MICA-B2, MICA-C et MICA-D. Les transcrits alternatifs de MICA ont été associés aux allèles MICA*015 et MICA*017 et sont la conséquence d'une délétion (G) localisée au niveau du site donneur en 5' de l'intron 4 conduisant à la délétion partielle ou complète des exons 3 et/ou 4. Ces délétions conduisent à la perte du domaine alpha 3 pour toutes les isoformes et du domaine alpha 2 pour la majorité d'entre elles (MICA-A, MICA-B1, MICA-C et MICA-D). Les cellules endothéliales ainsi que des cellules d'origine hématopoïétiques génèrent des transcrits alternatifs de MICA endogènes. MICA-B1, MICA-B2 et MICA-D interagissent avec NKG2D par résonance plasmonique de surface et sont exprimées à la surface des cellules. Fonctionnellement, MICA-B2 contient deux domaines extracellulaires (alpha 1 et alpha 2) et constitue un ligand agoniste du récepteur NKG2D. Nous observons que MICA-D est une nouvelle protéine tronquée de MICA avec une faible affinité pour NKG2D malgré la perte des domaines alpha 2 et alpha 3. MICA-D peut fonctionnellement bloquer l'activation via NKG2D en entrant en compétition avec une

forme native de MICA ou l'isoforme MICA-B2. Les fonctions de MICA-B1 restent à définir. En conclusion, nous décrivons de nouvelles isoformes de MICA. Ces protéines tronquées sont capables d'interagir avec NKG2D de façon agoniste ou antagoniste et pourraient donc affecter différemment la réponse immune et conduire à la création d'outils innovants pour l'immunothérapie.

3. Article 1 :

ALTERNATIVE SPLICE TRANSCRIPTS FOR MHC CLASS I-LIKE MICA ENCODE NOVEL NKG2D LIGANDS WITH AGONIST OR ANTAGONIST FUNCTION^{1,2}

Pierre-Jean Gavlovsky^{†,§*}, Pierre Tonnerre^{†,§,||*}, Nathalie Gérard^{†,§}, Steven Nedellec^{§,¶},
Andrew W. Daman^{††} , Benjamin J. McFarland[‡], Béatrice Charreau^{†,§}

[†]INSERM, UMR1064, LabEx Transplantex, LabEx IGO and Nantes, F44000 France; [#]
CHU Nantes, Institut de Transplantation et de Recherche en Transplantation–
Urologie-Néphrologie, ITUN, Nantes, F44000 France; [§]LUNAM: Université de Nantes,
Faculté de Médecine, Nantes, F44000 France. F44000 France. [¶]Plateforme
MicroPICell SFR Santé –IRT, Nantes, France. [‡]Department of Chemistry and
Biochemistry, Seattle Pacific University, Seattle, WA, USA 98119.

*both first authors contributed equally to the work and are listed by alphabetical order

^{||}P.T. Present address: Gastrointestinal Unit, Massachusetts General Hospital and Harvard Medical
School, Boston, MA, USA.

^{††}A.W.D. Present address: Fred Hutchinson Cancer Research Center, Seattle, WA, USA.

Short title (50 words): New functional MICA isoforms

Corresponding author: Dr. Béatrice Charreau, PhD

INSERM UMR1064, 30 bd J. Monnet, 44093 Nantes cedex 01, France.

Phone: +33 2 40 08 74 16; Fax: +33 2 40 08 74 11

E-mail: Beatrice.Charreau@univ-nantes.fr

Abstract (243 words)

Major histocompatibility complex (MHC) class I chain-related proteins A and B (MICA and MICB) and UL16 Binding Proteins (ULBPs) are ligands of the activating NKG2D receptor involved in cancer and immune surveillance of infection. Structurally, MICA/B proteins contain an $\alpha 3$ domain, while ULBP proteins do not. We identified novel alternative splice transcripts (AST) for MICA encoding five novel MICA isoforms: MICA-A, -B1, -B2, -C, and -D. Alternative splicing associates with MICA *015 and *017 and results from a point deletion (G) in the 5' splice donor site of MICA intron 4 leading to exon 3 and exon 4 skipping and/or deletions. These changes delete the $\alpha 3$ domain in all isoforms, and the $\alpha 2$ domain in the majority of isoforms (A, B1, C, and D). Endothelial and hematopoietic cells contained endogenous AST and isoforms. MICA-B1, -B2 and -D bound NKG2D by surface plasmon resonance and were expressed at the cell surface. Functionally, MICA-B2 contains two extracellular domains ($\alpha 1$ and $\alpha 2$) and is a novel potent agonist ligand for NKG2D. We found that MICA-D is a new truncated form of MICA with weak affinity for NKG2D despite lacking $\alpha 2$ and $\alpha 3$ domains. MICA-D may functionally impair NKG2D activation by competing with full-length MICA or MICA-B2 for NKG2D engagement. Our study established NKG2D binding for recombinant MICA-B1 but found no function for this isoform. New truncated MICA isoforms exhibit a range of functions that may drive unexpected immune mechanisms and provide new tools for immunotherapy.

Introduction

The classical HLA class I loci within the MHC (*HLA-A*, *-B*, *-C*) are characterized by their ubiquitous expression and their wide polymorphism. By contrast, the human MHC class I chain-related genes (*MICA* and *MICB*), located within the HLA class I region of chromosome 6, show a restricted cell and tissue distribution (1, 2). *MICA* are constitutively expressed at cell surface of intestinal epithelium, endothelial cells (ECs), monocytes and fibroblasts, but are not present on CD4⁺ and CD8⁺ T or B cells unless activated (3, 4). Expression of *MICA* proteins is considerably dysregulated and increased in tumor cells of various types, particularly in those of an epithelial origin, suggesting a role for *MICA* in the immune escape of tumors. Early evidence for heat- and virus-induced up-regulation of *MIC* protein cell-surface expression has led to the concept that *MIC* proteins are markers of stress in the epithelia (5).

Functionally, *MICA*, unlike classical HLA class I molecules, do not bind β 2-microglobulin (β 2-m) and are independent of any transporter-associated protein (TAP), which excludes a role for *MICA* in peptide binding and antigen presentation (2). *MICA* is a ligand for the activating immunoreceptor NKG2D, a highly conserved C-type lectin-like membrane glycoprotein expressed in humans and mice on natural killer (NK) cells, as well as on $\gamma\delta$ and $\alpha\beta$ CD8(+) T cells (6-8). NKG2D participates in both innate and adaptive immunity. Its physiological roles facilitate surveillance against microbial and viral infections and cancer. It is also involved in the pathogenesis of some autoimmune diseases (Type 1 diabetes (T1D), celiac disease (CD), rheumatoid arthritis (RA)) and in allograft rejection (7, 9, 10). Depending upon the situation, development of strategies to either block or to enhance the interactions between NKG2D and its ligands may have important implications for human health and disease (11).

The *MIC* genes are highly polymorphic (12, 13) and more than 101 alleles have been reported (www.ebi.ac.uk/ipd/imgt/hla). It is likely that the polymorphic MICA molecule may be targeted by specific antibodies and T cells in solid organ grafts (14) (15, 16). We recently showed that MICA polymorphic variant can trigger selective MICA expression on endothelial cells (ECs), promoting alloimmune response in solid organ transplantation (17). Nevertheless, the specific impact that MICA gene polymorphism can play on NKG2D-mediated immune responses is almost unknown.

The estimated number of genes that encode more than one protein as a result of alternative splicing of a pre-mRNA has steadily risen over time. Recent studies using high-throughput sequencing indicate that 95–100% of human pre-mRNAs that contain sequence corresponding to more than one exon are processed to yield multiple mRNAs (18). Although the functional relevance of mRNA isoforms is still unclear, in many studies, alternative splicing clearly gives rise to functionally distinct isoforms (19). Alternatively spliced isoforms are known to exist for HLA-A and B (20), as well as HLA-G (21) and some MHC class I-related genes such as EPCR (22) and MR1 (23). In a previous study, Zou and Stasny reported on alternate transcripts for *MICA* and *MICB* in the colon carcinoma cell line HCT 116. In these cells, they found 2 cDNAs encoding a 1161-bp cDNA, representing full-length *MICA* or *MICB*, and a shorter variant of 873 bp. The sequences of the short cDNAs correspond to *MICA* or *MICB* alleles lacking exon 3. These putative additive transcripts were called *MICA2* and *MICB2* (24). Their relevance remains unclear.

In this study, we provide the first description of five alternative splice transcripts encoding novel MICA isoforms. These isoforms are characterized by the partial or complete deletion of $\alpha 2$ and/or $\alpha 3$ extracellular domains of native MICA. All forms retain the $\alpha 1$ domain. Out of frame deletions generate novel amino acid (AA) sequences in the

C-term of isoforms A and C encoding intracellular proteins. Isoform MICA-D includes only the α 1 domain, transmembrane and intracytoplasmic domains. MICA-B1 contains the α 1 domain, a novel AA sequence and the transmembrane and intracytoplasmic domains. MICA-B2 corresponds to the native MICA protein with no α 3 extracellular domain. Alternative splice transcripts associated with MICA*015 and *017 are characterized by a point deletion in the intron 4 splice donor site. Here we report for the first time the occurrence of alternative splicing in association with *MICA* gene polymorphism and we demonstrate that the isoforms MICA-B2 and MICA-D are new ligands for NKG2D with agonist and antagonist function, respectively.

Materials and Methods

Cloning and expression of MICA splicing variants

Total RNA from primary EC cultures was extracted with TriZol and trace amounts of DNA were removed by DNase I digestion and RNA clean-up steps (Life Technologies SAS, Saint Aubin, France). After reverse transcription, the full cDNAs and splice variants were amplified by PCR with *Taq* DNA polymerase (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) with primers targeting the start and stop codon of the full length MICA*001 sequence (PCR product: 1264bp). The primers used were MICA5UTR / 5'-> 3' = GTC GGG GCC ATG GGG CT, MICA3UTR/ 5'->3' = TCA TAG GTC AGG AAA CTG AGG. PCR products were separated on an agarose gel and extracted by phenol/chloroform method before ligation using a Strataclone™ PCR cloning kit (Stratagene, Massy, France) for plasmid production, sequencing, and subcloning. Cloning was achieved into a pCMV-3Tag epitope tagging mammalian expression vector containing three copies of FLAG in 3' (Stratagene). Large scale production of endotoxin-free plasmids was performed using a Nucleobond™ kit (Macherey-Nalgene EURL, Hoerd, France).

Cell isolation, culture and transfections

Primary cultures of human vascular ECs (HAEC) were isolated and characterized as we previously described (25). ECs were cultured in Endothelial Cell Basal Medium (ECBM) supplemented with 10% fetal calf serum (FCS), 0.004 mL/mL ECGS/Heparin, 0.1 ng/mL hEGF, 1 ng/mL hbFGF, 1 µg/mL hydrocortisone, 50 µg/mL gentamicin, and 50 ng/mL amphotericin B (C-22010, PromoCell, Heidelberg, Germany). ECs were used between passage 2 and 5. WIN, OMN, COS-7, CHO and HEK cell lines were from ATCC (ATCC, LGC Standards S.a.r.l., Molsheim, France) and were grown in DMEM medium

supplemented with 10% FCS. The human NK cell line, NKL, was grown in RPMI 1640 media supplemented with 10% FCS, 4 mM glutamine, 1 mM sodium pyruvate, and 200 U/mL rIL-2 (R&D Systems). The NKL cell line was kindly provided by Dr. Eric Vivier (IML, Marseille, France). For NKG2D analysis, NKL were incubated with confluent cell monolayers. NKG2D expression by NKL was then measured by FACS. PBMC from random healthy volunteers were purified by Ficoll/Hypaque density centrifugation. Transfections were performed in COS, CHO, and HEK cells using DEAE dextran or lipofectamine Plus reagents according to the manufacturer's recommendations (Invitrogen, Life Technologies SAS). Stable CHO transfectants were obtained by G418 selection. Transgene expression was confirmed by immunostaining with anti-Flag mAbs or anti-MICA mAbs when applicable.

Reagents and antibodies

The following mAbs were used: anti-MICA (AMO1) and MICA/B (BAM01, BAMO3) were from BamOmab (Tubingen, Germany), anti-GAPDH (both from Chemicon, Val de Fontenay, France); anti-NKG2D mAbs were purchased from R&D Systems (Lille, France); and anti-Flag (M2) was from Sigma-Aldrich (Saint-Quentin Fallavier, France). FITC and PE-conjugated anti-mouse F(ab')₂ and anti-human IgG were from Jackson ImmunoResearch Laboratories (West Grove, PE). For inhibition of soluble MICA release, ECs were treated with galardin (GM6001, 50µg/ml, Sigma-Aldrich) or GI254023X (kindly provided by GSK) for the indicated period of time.

MICA genotyping

Human random control DNA panels (HRC) from European collection of cell cultures (ECACC, Sigma) were used to determine MICA genotype and allele frequencies in

apparently healthy randomly selected subjects. MICA typing was performed from genomic DNA as previously described (26). MICA exons were amplified with the following primers: MICA1-F 5'-ACGCGTTGTCTGTCCTGGAA-3' and MICA1-R 5'-GAGGTGCAAAGGGAAGATG-3' for exon 1; MICA2-F 5'-ATTCCTGCCCCAGGAAGGTTGG-3' and MICA2-R 5'-AGACAGGTCCCTGCTCTCTG-3' for exon 2; MICA3-F 5'-TTCGGGAATGGAGAAGTCACTGC-3' and MICA3-R 5'-AAATGCCTTCATCCATAGCACAG-3' for exon 3; MICA4-F 5'-GACTTGCAGGTCAGGGGTCCC-3' and MICA4-R 5'-TGTCCTACCCTGGCCTGACC-3' for exon 4; MICA5-F 5'-CCTTTTTTTCAGGGAAAGTGC-3' and MICA5-R 5'-CCTTACCATCTCCAGAAACTGC-3' for exon 5; and MICA6-F 5'-GATGTTGATGGAGTGATGGGA-3' and MICA6-R 5'-ATGTTGATCAGGATGGTCTCGATC-3' for exon 6.

PCR for *MICA* promoter, exons 1, 5, 6, and 5'UTR were performed using 100ng of DNA, 12.5mM dNTPs, 1x *Taq* buffer, 2mM MgCl₂, 0.1U *Taq* DNA polymerase (Invitrogen, Carlsbad, CA) and 10pM of each oligonucleotide. For *MICA* exons 2, 3 and 4, we first performed a PCR using 100ng DNA, 15pM of each primer (27), 12.5mM dNTPs, 1 U of Herculase® *Taq* (Stratagene, La Jolla, CA). Then nested PCR analyses were performed using 1µL of PCR product and conditions reported above for exons 1, 5 and 6. PCR amplifications were carried out with a PTC200 (BIO-RAD laboratories, Hercules, CA) thermocycler. PCR products were run on 1% agarose gels for control. DNA sequencing was performed (Sequencing Core Facility INSERM/IFR26, Nantes, France) using a 48-capillary AB®3730 automatic system (Applied Biosystems, Foster City, CA) and analyzed using ChromasPro 1.5® software (Digital River GmbH, Shannon, Ireland).

RNA isolation and RTPCR

Total RNA was isolated using the Trizol reagent (Invitrogen). After phenol-chloroform extraction and ethanol precipitation, total RNA (2µg) was treated with RNase-free Turbo-DNase® (Ambion) before reverse transcription (RT). Treated RNA was then reverse transcribed with mMLV reverse Transcriptase (Invitrogen) according to the manufacturer's instructions. RTPCR for the detection of transcripts for MICA WT and isoforms were run for 35-40 cycles (Tm: 56°C) using the following primers: MICA5UTR / 5'-> 3' = GTC GGG GCC ATG GGG CT and MICA3UTR/ 5'->3' = TCA TAG GTC AGG AAA CTG AGG. Specific primers were designed for the selective amplification of MICA alternative transcripts by RTPCR in cell samples (WIN, OMW, PBL, HAEC). PCR products were separated by agarose gel and stained with ethidium bromide.

Equilibrium affinities by surface plasmon resonance (SPR)

DNA sequences were designed for the four MICA isoforms from the N-terminus of each to the beginning of the transmembrane domain (or to the polycysteine sequence near the end of the sequence in the case of isoform C, which lacks a transmembrane domain), with a C-terminal six-histidine sequence as a His-tag. These sequences were synthesized (Genscript, New Jersey, USA) and inserted into pGS-21a vectors between NdeI and XhoI sites, and chemically competent One Shot BL21 cells (Invitrogen, USA) were transformed with the resulting plasmids.

Recombinant proteins were expressed, refolded, and purified from these cells as previously described (28). Briefly, 3L of cell culture was induced with IPTG and cells were incubated for 3h at 37°C. After lysis with BeadBeater homogenizers, enzymes, and surfactants, cell pellets with inclusion bodies were solubilized in 8M urea and glutathione, then refolded by stepwise dialysis over 5 days, dialyzed into running buffer and purified by

Ni-NTA chromatography (for MICA isoforms) or ion-exchange chromatography (for NKG2D), followed by size-exclusion chromatography (SEC) purification in HBS-EP buffer. Proteins were >95% pure according to SDS-PAGE analysis and homogeneous in size by SEC. Isoform C produced little protein after Ni-NTA purification and did not produce significant SEC fractions in the 50 KDa range, so it could not be used for SPR analysis.

Proteins were analyzed in standard HBS-EP+ buffer at 25°C using a BIAcore T100 (Fred Hutchinson Cancer Research Center, Seattle, WA, kindly provided by Della Friend and Roland Strong). MICA isoforms were amine-coupled to BIAcore CM5 chips and NKG2D was prepared in serial dilutions from 0.11 to 6.9 µM. At a flow rate of 50 µL/min, NKG2D aliquots were injected for 90 sec with 6 min time for dissociation until the signal returned to baseline without regeneration. FC1 was amine-coupled without protein and was used as an internal blank. Buffer-subtracted data was processed with BIAevaluation 3.2. Each Kd was determined at equilibrium from a group of 4-6 injections, and the Kds reported in the text are averages of 5-6 replicated groups (see **Figure S1**).

Immunoblotting

Cells were lysed on ice in 20 mmol/L Tris-HCl (pH 7.4), 137 mmol/L NaCl, 0.05% Triton X-100, 1 mmol/L supplemented with protease inhibitors (PIC, Sigma–Aldrich).. Cell lysates (20 µg) or culture supernatants (15µl) were resolved by SDS-PAGE (12%) and subjected to immunoblot analysis using specific antibodies for ant-FLAG M2, MICA/MICB (BAMO1), or GAPDH as primary antibodies and secondary horseradish peroxidase-labeled anti-mouse antibodies (Cell Signaling Technology, St Quentin-en-Yveline, France). Antibody-bound proteins were detected using an ECL kit (Amersham) and luminescent image analyzer LAS-4000 (Fujifilm, Tokyo, Japan). Image analysis was performed with Multi Gauge software (Fujifilm).

Flow cytometry

For MICA analysis, cells ($1-2 \times 10^5$ cells/sample) were harvested, washed twice with PBS containing 1% BSA and 0.1% NaN₃, and then incubated on ice for 30 min with a saturating concentration of anti-MICA antibodies (AMO1). For intracellular staining (Flag), cells were previously fixed in 1% paraformaldehyde, permeabilized with saponin (0.5%) before incubation with antibodies in the presence of saponin (0.1%). For NKG2D modulation, NKL were cocultured with transfected or control cells for 15h. After incubation, NKL were harvested and incubated with anti-NKG2D (R&D Systems) mAbs as primary antibodies. After three washes, cells were incubated with a PE- or FITC-labeled F(ab')₂ IgG (Jackson Lab.) at 4°C for 30 min. Cells were fixed in 1% paraformaldehyde. Negative controls were performed using an isotype-matched IgG control. Fluorescence was measured on 10,000 cells/sample using a fluorescence activated cell sorter (FACScanto II®: Becton Dickinson, Mountain View, CA) and analyzed using FlowJo® software (Tree Star, Inc. Ashland, OR). Data are depicted in histograms plotting median or geometric fluorescence intensity (MFI) on a four-decade logarithmic scale (x-axis) *versus* cell number (y-axis).

Immunofluorescence, intracellular Ca²⁺ signaling and live imaging

For immunofluorescence, ECs were grown to confluence on glass coverslips. Cultures were washed with PBS and fixed for 20 min in 4% paraformaldehyde. Cells were incubated ON at 4°C with blocking buffer (4% BSA in PBS) and then incubated with an anti-MICA (AMO1) mAbs or irrelevant IgG (both 10 µg/mL) for 1 h. Cells were then incubated with FITC-conjugated goat anti-mouse or anti-human antibodies (5 µg/mL, Jackson Lab.) for 1 h. Nuclear staining was performed using Draq5 (Biostatut Ltd, Shephed, UK). Slides were washed in PBS and mounted with ProLong® antifade reagent (Molecular Probes). Fluorescence microscopy was performed with a Nikon confocal

microscope (Nikon instruments, Champigny Sur Marne, France), using a *60x1.4 oil p-aplo* lens and analyzed using NIS Element Viewer™ software.

The strength and kinetics of NKG2D agonist-induced increases in cytosolic Ca²⁺ have been measured in single NKL cells cultured on CHO transfectant monolayers using fluorescent videomicroscopy with fura-2 (Life technologies) as a Ca²⁺ indicator. Stable CHO transfected cell lines were plated (2.10⁴ cells/well) into 8-well ibiTreat® μ -plates (ibidi GmbH, Martinsreid, Germany) and incubated with fura-2-labeled NKL (1 μ M, 2.10⁴ cells/well). Mock transfected CHO were used as a negative control. The fluorescence intensity increase was measured (excitation at 340nm and 380nm). Measurements of intracellular Ca²⁺ responses were performed at 37°C with a DMI 6000 B microscope (Leica Microsystems, Wetzlar, Germany) equipped with a 20x/0.75 objective. Cells were illuminated every 10 s with a xenon lamp by using 340/10 nm and 380/10 nm excitation filters. Emission at 510 nm was used for analysis of Ca²⁺ responses and captured with a Cool Snap HQ2 camera (Roper, Tucson, AZ) and analyzed with Metafluor 7.1 imaging software (Molecular Device, US) and Imaris® software (Bitplane AG, Zurich, Switzerland). Four independent experiments were performed and analyzed.

Statistical analysis

The data are expressed as mean \pm SEM and compared using one way ANOVA Kruskal-Wallis test (with Dunn's multiple comparison post-test) if there were more than two conditions or with two-way ANOVA with Bonferroni multiple comparison tests. A p value <0.05 was considered statistically significant different. In all figures, (*) denotes p<0.05.

Results

Identification of 5 novel splice transcripts and isoforms for MICA in human endothelial cells

By investigating MICA transcripts in cultured endothelial cells (ECs) using RT-PCR we observed the presence of additive PCR products amplified using a primer pair encompassing the full length coding sequence for MICA*001 (1216bp, see “Material and Methods”). Five additive transcripts were found ranging from 688bp to 1118bp (**Figure 1**). Sequences of the 5 alternative transcripts (AT) for MICA that we identified as MICA-A, MICA-B1, MICA-B2, MICA-C and MICA-D NCBI GenBank BankIt submission ID: #1831421, #1833449, 1833461, #1833464, #1833466, respectively.

The human *MICA* gene structure includes six exons. The original translation initiation methionine (ATG) of the MICA is located in exon 1 at position 1. Structurally, exon1 encodes a leader peptide while exon2, exon3 and exon4 code for the 3 extracellular domains α 1, α 2, and α 3, respectively. The transmembrane (TM) domain is encoded in exon5 while exon 6 encodes the cytoplasmic (CYT) domain and a 3' untranslated region (UTR) (**Figure 1B**).

In comparison, DNA sequence for MICA-A includes 1118bp. Exon1 and exon2 are conserved, but compared to full length MICA *001 exon3 is partially deleted between position 325 and 463. Deletion generates a change in open reading frame (ORF) leading to a premature stop codon at position 637. The sequence predicts a protein of 189AA, with a conserved leader peptide and α 1 domain followed by a new polypeptide region (104AA) with no homology in sequence databases. The DNA sequence for MICA-B1 includes 867bp. Similar to MICA-A, exons 1 and 2 are conserved, but exon3 and exon4 are partially deleted between the positions 325(AA86) and 463(AA132). However, a second deletion (between AA positions 220 and 275) rescues the ORF and allows normal DNA sequence

for exon5 and exon6. The predicted protein for MICA-B1 isoform contains 265AA and comprises the conserved leader peptide, α 1 domain, TM and CYT domains, but includes a novel polypeptide region instead of α 2 and α 3 domains. This novel domain includes 89 AA and exhibits no homology in sequence databases. The MICA-B2 cDNA includes 888bp and is homologous to the wild type MICA sequence, except that exon 4 is deleted, probably as a result of exon 4 skipping during splicing. Consequently, this alternative transcript corresponds to a MICA isoform of 272AA (30.4kDa) similar to the wild type protein, but with no α 3 extracellular domain. Similar to MICA-A, MICA-C (594bp) conserved sequences only include exon 1 and exon 2 encoding leader peptide and α 1 domain. Partial deletion within exon 3 between position 325 (AA86) and 463 (AA132) causes a change in ORF, generating a new sequence and a premature stop codon in exon5. Exon 4 is completely deleted. Interestingly, due to change in ORF, ALA repeats (n=9) are replaced by CYS repeats (n=9) in the polymorphic region of exon 5. This sequence predicts a protein of 174AA (19.7kDa), with a conserved leader peptide and α 1 domain, and a novel polypeptide region, but no α 2 and α 3 domains, TM, or CYT regions. The novel protein sequence includes 89AA and exhibits no homology in sequence databases. The MICA-D alternate transcript (600bp) displays a complete deletion of exons 3 and 4, most probably resulting from exon skipping, with a conserved ORF. Consequently, the predicted MICA-D isoform possess 176AA (19.0kDa) and comprises a conserved leader peptide, α 1 domain, TM and CYT regions, but no α 2 and α 3 domains. The structures of the new AT and predicted proteins are shown in **Figure 1B and 1C**, and a summary of mRNA and protein features is reported in the **Table I**.

Alternative splice transcripts associate with alleles *MICA* *015 and *017 and result from a point deletion in the intron 4 splice donor site

To investigate whether *MICA* gene polymorphism accounts for the occurrence of the novel *MICA* transcripts, genotypes of *MICA* in our cultures of human ECs were determined by PCR and sequencing as we previously reported (17, 26). Alternative *MICA* transcripts were found associated with two *MICA* alleles *015 and *017 out of the 20 alleles tested (supplemental **Table 1**). No alternative transcripts were found associated with the most frequent *MICA* alleles (*MICA**002, *004, *008,*009, *011). The presence of a repeat of 9 alanines (A9) except for *MICA*-C (where alanine repeats are replaced by 9 cysteine repeats) also argue in favor with an association of the AT with the alleles *015 and *017 that both contain the A9 repeat. Sequencing of DNA obtained by PCR amplification of *MICA* introns and exons from cells carrying the *015 or *017 *MICA* alleles revealed a point deletion of the first 5'base (G) of the intron4 donor splice site (**Figure 1D**). Consistent with our findings previous studies have reported on *MICA* gene mutation or deletion at the exon 4/intron 4 junction (29). Nevertheless, to our knowledge, we provide here the first evidence for a link between this mutation and the presence of alternative splicing transcripts associated with both alleles *MICA**015 and *017. Indeed, deletion in the intron 4 donor splice site is consistent with alternative splicing. Alternative splicing can alter the mRNA product in several ways. At the simplest level, an exon can be removed (exon skip), lengthened or shortened (alternative 5'AS or 3'AS splicing). Thus, observed mechanisms of alternative splicing alteration include exon skipping, intron retention, and the use of an alternative splice donor or acceptor site. Here, we speculate that partial deletion of the donor splice site induces exon 3 and/or 4 skipping (*MICA*-B2 and *MICA*-D) as well as alternative 5'AS or 3'AS (*MICA*-A, B1, C).

To confirm the association of AT with the genetic variant*015 and *017, the presence of the AT was assessed by RTPCR on mRNAs issued from ECs (n=2) heterozygous for both

alleles. As illustrated in the **Figures 2A and 2B**, alternative transcripts were detected in all samples. We also found AT in two lymphoblastoid cell lines OMW and WIN, homozygous for MICA*015 and *017, respectively. Thus, the presence of AT in ECs from MICA*015 or*017 individuals but also in lymphocytes (PBL) suggests that these MICA isoforms are not restricted to a cell type (i.e. ECs) but instead are expressed in both hematopoietic and non hematopoietic cells. Importantly, in cells homozygous for the mutation and expressing *MICA* AT no mRNA for *MICA* WT was detected.

Next, we sought to determine the allelic frequency for MICA*015 and *017 in a population of healthy Caucasian donors (n=186). MICA genotyping identified 12 MICA*017 alleles out of 372 tested (allelic frequency: 3.22%), corresponding to 12 donors carrying one MICA*017 allele. A single heterozygous carrier of the MICA*015 allele was found in this population (allelic frequency: 0.27%). Consistent with previous reports (30), these data establish MICA*015 and *017 as rare and low frequency alleles, respectively.

MICA-B1, -B2 and -D are stably expressed isoforms

To characterize these novel MICA isoforms, full cDNAs for each AST were cloned into a pCMV-TAG/4A/FlagM2 plasmid for transfection experiments. Next, transfections were performed for biochemical studies. Cell lysates were resolved by SDS-PAGE and immunoblotted with an anti-Flag antibody. A representative Western blotting is provided in the **Figure 2C** and reveals that all isoforms with the exception of MICA-C are detected in the transfectants. Unlike **MICA-B1, -B2 and -D** isoforms, MICA-A seems to be expressed at a low rate, which could suggest a lack of protein stability. Relative molecular weights of the isoforms are in the range of estimated molecular weights calculated from the predicted AA sequences.

Next, immunostaining with an anti-Flag antibody and flow cytometry analysis confirmed that most isoforms are expressed in transfected cells as stable proteins, with the exception

of MICA-A, which was not significantly detected (**Figure 2D**). In contrast, cells expressing MICA-C were consistently found. These data could confirm that MICA-A alternate transcripts do not lead to a stable protein. In contrast, although not detectable by Western blot, MICA-C appears to produce stable protein in transfectants. Protein localization was examined after immunostaining by confocal microscopy. Consistent with the predicted sequences, the lack of TM and CYT domains in MICA-A and MICA-C impairs their expression at the cell surface. As expected, MICA-B1, -B2 and -D, which possess intact TM and CYT domains, were located at the cell membrane. (**Figure 2E**)

MICA-B1, -B2, and -D refold *in vitro* and bind NKG2D

The extracellular domains of MICA-B1, -B2, -C and -D isoforms were produced as recombinant soluble proteins in *E. Coli*. After refolding by dialysis, MICA-C did not refold correctly and was not further analyzed. The binding of the remaining three isoforms to NKG2D was measured by surface plasmon resonance (SPR). We found equilibrium K_d values showing that MICA-D and MICA-B2 bind NKG2D weakly (K_d : $20 \pm 7 \mu\text{M}$ and $14 \pm 7 \mu\text{M}$, respectively), and that MICA-D binds NKG2D despite its lack of $\alpha 2$ and $\alpha 3$ domains (**Table II and supplemental Figure S1**). MICA-B1 binds as tightly as wild-type MICA (K_d : $5 \pm 1 \mu\text{M}$, compare to $4 \mu\text{M}$ for WT (28), showing that the lack of an $\alpha 3$ domain does not necessarily reduce the strength of the MICA-B1/NKG2D interaction. Therefore, these three proteins form protein-protein interactions with NKG2D with physiologically relevant affinities, despite their different domain architectures.

MICA-B2 and MICA-D are functional agonist and antagonist ligands for NKG2D

Since MICA-A and MICA-C are not cell surface proteins, we only focused on MICA-B1, -B2 and -D for the functional analyses. First, we found that anti-MICA antibodies

directed against the $\alpha 1$ and $\alpha 2$ domains are able to bind only to MICA-B2 expressed on transfectants (**Figure 3A**), consistent with the lack of $\alpha 2$ domain in MICA-B1 and MICA-D. The ability of isoforms to downmodulate NKG2D expression on NK cells was then explored using CHO transfected cells. As reported on the **Figure 3B**, MICA-B2 efficiently decreases NKG2D in cocultures (53.1% inhibition, $*p<0.05$) similar to wild type MICA*002(66.6% inhibition, $*p<0.05$). No significant changes were found for MICA-B1 (12.2% inhibition) and MICA-D (10.1% inhibition). Using a metalloproteinase inhibitor, we demonstrated that MICA-B2 cell surface expression was sensitive to metalloproteinases (**supplemental figure S2**). Unexpectedly, this finding indicates that MICA $\alpha 3$ domain was dispensable for MICA cleavage and solubilization.

To determine whether MICA-B1 or MICA-D could interact with NKG2D receptor without inducing a modulation, we sought to transfect the human HEK293 cell line, which basally expresses MICA. Coculture of NK cells with untransfected HEK cells strongly decreases NKG2D levels on NK cells (>50% decrease) (**Figure 3C**). Transfection of MICA-B2 further enhances the downmodulation, consistent with the ability of B2 to bind and activate NKG2D ($56.2 \pm 4.2\%$ versus mock transfection, $p<0.05$). MICA-B1 has no effect. In contrast with MICA-B2, MICA-D transfectants significantly inhibit NKG2D downmodulation mediated by wild type MICA expressed by HEK cells ($19.4 \pm 3.4\%$ versus mock transfection, $p<0.05$).

To investigate further the activity of MICA isoforms toward NKG2D receptor, we monitored intracellular Ca^{2+} in NK cells incubated with CHO transfectants by live videomicroscopy using Fura-2 probe. Fluorescence of this calcium-sensitive dye is transiently altered upon binding to calcium. As illustrated in **Figure 4A**, MICA-B2 and wild type MICA (*002) induced a significant rise in intracellular Ca^{2+} signaling in NK cells, but not MICA-B1 or MICA-D (**movies are shown as supplemental figures S3, S4, S5, S6, S7**). Motility of NK cells was further quantified in these experiments by the analysis of

single cell speed and Ca^{2+} ratio on unactivated and activated NK cell subsets, according to conditions. As expected, NK speed was significantly reduced after cognate contact with MICA*002 or MICA-B2 transfectants in activated NK cells (**Figure 4B**). Thus MICA-B2 triggers NKG2D mediated signaling and cellular activation. Although no Ca^{2+} signal was observed in NK incubated with MICA-B1 or MICA-D, a significant reduction in NK cell speed was measured for MICA-D (**Figure 4C**), supporting the idea that MICA-D interacts with NK in a NKG2D-dependent manner without activating the receptor. Representative results from single analyses are shown in **Figure 4D**.

Discussion

NKG2D displays only limited sequence similarity to other NKG2 family members and CD94 (20–30% of homology), has not been demonstrated to directly interact with MHC class I proteins, and forms homodimers (31, 32). The NKG2D receptor is expressed on all NK cells and on CD8 TCR $\alpha\beta$ and TCR $\gamma\delta$ T cells (5), implying a broad role in immune responses. NKG2D can deliver an activation signal to NK cells and, under some conditions, can act as a costimulatory receptor for TCR-mediated activation of T cells in a similar manner as CD28 (33, 34). NKG2D ligands include MICA, MICB, and ULBPs (1-6) in humans (1, 35). These ligands share structural and sequence homologies with classical HLA class I (1, 2). Structurally, MICA encompasses 3 immunoglobulin-like alpha domains: α 1, α 2, and α 3 domains similar to the alpha domains in HLA-A, -B and -C.

Here we described five novel isoforms for the non-classical MHC molecule MICA. We demonstrate that these MICA isoforms result from alternative splicing transcripts caused most probably by a deletion of the first base (G) of the intron 4 splice donor site. This deletion induces exon 3 and exon 4 skipping and/or partial or total deletion. We found deletion of the intron 4 splice donor site associated with at least two alleles: *MICA**015 and *017. Although we cannot exclude the possibility that other alleles carry this mutation, neither the deletion in intron 4 nor the presence of AT was detected in the most frequent *MICA* alleles (*MICA**002, *004, *008, *009, *011). Initial identification of the alleles *MICA**015 and *017 reported on a guanine deletion at the 3' end of exon 4 as a common feature for both alleles (29). It was subsequently speculated that this change will not affect the splicing pattern, because the splicing consensus sequences are still conserved, but rather that it will cause a frameshift in mRNA. However, our findings suggest that the deleted guanine was in fact the 5' end guanine of intron4 splice donor site. The presence

of alternative splicing transcripts that we found associated with both alleles strongly supports this hypothesis. Importantly, in cells homozygous for *MICA*015* or **017* alleles, no full length transcript for MICA was found. Although no pathology was clearly associated with MICA alleles **015* and **017*, previous reports proposed that the MICA A9 repeat is a possible genetic risk factor for psoriasis (36, 37). *MICA*017* and *MICA*015* were exclusively found in panels that carry *HLA-B*57* and *-B*45*, respectively (29). Consistently, in our study both EC donors heterozygous for *MICA*017* also carry one *HLA-B*57* allele.

Among the five isoforms that we identified, MICA-A and MICA-C lack TM and CYT domains, and are not expressed at the cell membrane but instead seem retained in the cytoplasm. No intracellular function has been reported yet for NKG2DL. However, regulatory mechanisms of NKG2DL are multiple and include both transcriptional, translational, posttranslational processes (38). Regulation by miRNAs targeting the 3'UTR of MICA has been reported (39). One can speculate that these MICA isoforms, which retain wild type 3'UTR, could also be regulatory through miRNA's bindings. The possible regulatory functions of these new isoforms still need investigation. The function of the new polypeptide encoded in C/N-term of the $\alpha 1$ domain as well as the possibility that these proteins can be released or secreted in the extracellular medium should be tested.

MICA-B1, B2 and MICA-D are expressed at the cell membrane and, based on SPR assays, interact with the NKG2D receptor with similar affinity to wild-type MICA. The stoichiometry of the NKG2D/NKG2DL complexes is 2:1, where one NKG2D homodimer binds a single monomeric NKG2DL, whether H60, RAE-1 or MICA (40). Each NKG2D monomer (NKG2D-A and -B) predominately contacts either the $\alpha 1$ or $\alpha 2$ domains of MICA or ULBP, with the two sub-site interactions contributing approximately equally to the overall interaction, unlike the CD8/MHC class I interaction(40).

Our findings provide the first evidence that isoforms MICA-B2 and MICA-D are new ligands for NKG2D. Interestingly, the overall structure of MICA-B2 resembles ULBP rather than MICA in that it contains only $\alpha 1$ and $\alpha 2$ domains. While ULBP 1, 2, and 3 are GPI-linked proteins, ULBP 4 and 5 are transmembrane proteins. Thus, structurally, the MICA-B2 isoform (featuring only $\alpha 1$ and $\alpha 2$ domains, transmembrane and cytoplasmic domains) is closer to ULBP4 and 5. The functional ability of ULBPs to trigger a NKG2D-dependent activating signal in NK cells established a basis for NKG2D engagement in the absence of $\alpha 3$ domain, and supports the idea that MICA-B2 is a functional NKG2D ligand. Since MICA-B2 efficiently binds and activates NKG2D *in vitro*, we can hypothesize that MICA-B2 plays a role in immune processes *in vivo*.

Wild type MICA proteins can be released from the cell membrane as a result of proteolysis, mostly achieved by metalloproteinases such as ADAM10 (41-45). Consequently, cells expressing high levels of MICA can produce a soluble form of MICA from the enzymatic cleavage of the membrane-bound proteins. This process impairs activation of effector cells expressing NKG2D and thus is involved in pathological conditions including tumor and metastasis progression (46). We observed that broad metalloproteinase inhibition, using galardin or a ADAM10 inhibitor, increased MICA-B2 levels at the cell surface (**supplemental Figure S2**), supporting the idea that MICA-B2 can be released as a soluble form. Palmitoylation of two cysteine residues (Cys306 and Cys307) in the intracellular domain of MICA was reported as necessary for the recruitment of MICA into membrane cholesterol-enriched microdomains that promote proteolytic shedding of MICA (47). These two cysteines are conserved in the isoforms MICA-B1, -B2, -D but are absent in the isoforms MICA-A and C. On another hand, the cleavage site for ADAM10 is located within the $\alpha 3$ extracellular domain of MICA (48). Lack of $\alpha 3$ domain

seems not to impair shedding by metalloproteinase ADAM10. Owing to the importance of soluble MICA in immune evasion processes in cancer and infections, this observation could be of importance. Cell and tissue specificity of isoform expression and its regulatory control remain to be explored.

Substitutions distant from the interaction surfaces may also affect binding, presumably through indirect conformational changes. The methionine-to-valine substitution at position 129 in the $\alpha 2$ domain of MICA, a conservative substitution which has no atom closer than 21 Å to any atom of NKG2D, has been experimentally shown to have a 30-fold effect on the affinity for NKG2D (31). In our samples, the MICA-B2 isoform of the MICA*017 allele includes a methionine at position 129 yet binds NKG2D with affinity as strong as wild-type. (Position 129 was not conserved in the other four isoforms.) Also, some of the characterized *MIC* allelic differences are known to dramatically affect folding and cell-surface expression of MICA. The arginine-to-proline substitution at position six in *MICA*010* results in no protein expression for this allele (49), which illustrates the ability of proline substitutions to disrupt the platform β -sheet. It remains unclear exactly how NKG2D can tolerate such plasticity in ligand binding sites while retaining specificity and significant affinities.

For MICA-B1, we observed biophysical interaction with recombinant proteins by SPR, but not cell activation in our experimental conditions. The three isoforms tested by SPR exhibit only slight differences in interaction kinetics (see **Figure S1**), so speed of binding is unlikely to explain the differences among isoforms. We observed cell activation with MICA-B2, which has an intact $\alpha 2$ domain sequence, but not MICA-B1, in which that domain is replaced by a different sequence, despite a tighter *in vitro* affinity of NKG2D for MICA-B1. Therefore, protein-protein affinity is not the only requirement for cell activation.

Interestingly, recent data revealed that soluble MULT1, a mouse NKG2D ligand, competitively blocks the NKG2D receptor, preventing NK cell desensitization and therefore augmenting tumor rejection mediated through distinct NK activating receptors (50). Together these findings support efforts to evaluate the potential of soluble NKG2D ligands for immunotherapy of cancer.

Our functional study provides preliminary evidence for an antagonist function of the isoform containing only the α 1 domain (MICA-D) by interacting with the NKG2D receptor without engaging signaling. We plan to explore this further. Blockade of NKG2D has been proposed as a therapeutic approach to avoid autoimmune disease (51).

Concerning the clinical relevance of our findings, although no immune disorder has been reported with HLAB57, we note that the genetic polymorphism that has the greatest impact on immune control of human immunodeficiency virus (HIV) infection is expression of HLA-B*57 (52). The mechanism for this protective effect remains poorly understood (53, 54). Viral control is linked to the expression of certain alleles encoding HLA class I molecules (particularly HLA-B*57, HLA-B*27, and HLA-B*5801), which suggests an immunological basis related to the function of CD8⁺ T cells. The mechanistic basis for the association remains unclear. Here we speculate that MICA polymorphism MICA*015 and MICA*017 linked to HLA-B57 could be an as-yet-unexplored immunodominant factor involved in immune control of HIV infection. Consistent with this hypothesis, in a recent GWAS, the haplotype analysis of the elite controller groups revealed a combined effect of *HLAB*5701/MICA*017*, *HLA-C*, and *MICA* alleles (55).

To conclude, we identified a panel of novel, allele-specific, MICA isoforms. Some of these MICA isoforms display significant affinity for NKG2D despite lacking α 3 and even α 2

domains and exhibit a range of functions that may drive unexpected immune mechanisms and provide new tools for immunotherapy.

Acknowledgments

Della Friend and Roland Strong assisted with BIAcore analyses at the Fred Hutchinson Cancer Research Center (Seattle, WA).

References

1. Bahram, S., N. Mizuki, H. Inoko, and T. Spies. 1996. Nucleotide sequence of the human MHC class I MICA gene. *Immunogenetics* 44: 80-81.
2. Groh, V., S. Bahram, S. Bauer, A. Herman, M. Beauchamp, and T. Spies. 1996. Cell stress-regulated human major histocompatibility complex class I gene expressed in gastrointestinal epithelium. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93: 12445-12450.
3. Zwirner, N. W., M. A. Fernandez-Vina, and P. Stastny. 1998. MICA, a new polymorphic HLA-related antigen, is expressed mainly by keratinocytes, endothelial cells, and monocytes. *Immunogenetics* 47: 139-148.
4. Zwirner, N. W., K. Dole, and P. Stastny. 1999. Differential surface expression of MICA by endothelial cells, fibroblasts, keratinocytes, and monocytes. *Hum Immunol* 60: 323-330.
5. Bauer, S., V. Groh, J. Wu, A. Steinle, J. H. Phillips, L. L. Lanier, and T. Spies. 1999. Activation of NK cells and T cells by NKG2D, a receptor for stress-inducible MICA. *Science* 285: 727-729.
6. Raulet, D. H. 2003. Roles of the NKG2D immunoreceptor and its ligands. *Nat Rev Immunol* 3: 781-790.
7. Ogasawara, K., and L. L. Lanier. 2005. NKG2D in NK and T cell-mediated immunity. *J Clin Immunol* 25: 534-540.
8. Gonzalez, S., A. Lopez-Soto, B. Suarez-Alvarez, A. Lopez-Vazquez, and C. Lopez-Larrea. 2008. NKG2D ligands: key targets of the immune response. *Trends Immunol* 29: 397-403.
9. Caillat-Zucman, S. 2006. How NKG2D ligands trigger autoimmunity? *Hum Immunol* 67: 204-207.
10. Suarez-Alvarez, B., A. Lopez-Vazquez, J. M. Baltar, F. Ortega, and C. Lopez-Larrea. 2009. Potential role of NKG2D and its ligands in organ transplantation: new target for immunointervention. *Am J Transplant* 9: 251-257.
11. Mondelli, M. U. 2012. NKG2D and its ligands: key to immunotherapy of liver cancer? *J Hepatol* 56: 308-310.
12. Stephens, H. A. 2001. MICA and MICB genes: can the enigma of their polymorphism be resolved? *Trends Immunol* 22: 378-385.
13. Bahram, S., H. Inoko, T. Shiina, and M. Radosavljevic. 2005. MIC and other NKG2D ligands: from none to too many. *Curr Opin Immunol* 17: 505-509.
14. Hankey, K. G., C. B. Drachenberg, J. C. Papadimitriou, D. K. Klassen, B. Philosophe, S. T. Bartlett, V. Groh, T. Spies, and D. L. Mann. 2002. MIC expression in renal and pancreatic allografts. *Transplantation* 73: 304-306.
15. Sumitran-Holgersson, S., H. E. Wilczek, J. Holgersson, and K. Soderstrom. 2002. Identification of the nonclassical HLA molecules, mica, as targets for humoral immunity associated with irreversible rejection of kidney allografts. *Transplantation* 74: 268-277.
16. Collins, R. W., H. A. Stephens, M. A. Clare, and R. W. Vaughan. 2002. High resolution molecular phototyping of MICA and MICB alleles using sequence specific primers. *Hum Immunol* 63: 783-794.
17. Tonnerre, P., N. Gerard, M. Chatelais, C. Poli, S. Allard, S. Cury, C. Bressollette, A. Cesbron-Gautier, and B. Charreau. 2013. MICA variant promotes allosensitization after kidney transplantation. *J Am Soc Nephrol* 24: 954-966.
18. Nilsen, T. W., and B. R. Graveley. 2010. Expansion of the eukaryotic proteome by alternative splicing. *Nature* 463: 457-463.
19. Wang, Z., and C. B. Burge. 2008. Splicing regulation: from a parts list of regulatory elements to an integrated splicing code. *RNA* 14: 802-813.
20. Krangel, M. S. 1986. Secretion of HLA-A and -B antigens via an alternative RNA splicing pathway. *J Exp Med* 163: 1173-1190.
21. 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: 3947-3951.

22. Saposnik, B., E. Lesteven, A. Lokajczyk, C. T. Esmen, M. Aiach, and S. Gandrille. 2008. Alternative mRNA is favored by the A3 haplotype of the EPCR gene PROCR and generates a novel soluble form of EPCR in plasma. *Blood* 111: 3442-3451.
23. Riegert, P., V. Wanner, and S. Bahram. 1998. Genomics, isoforms, expression, and phylogeny of the MHC class I-related MR1 gene. *J Immunol* 161: 4066-4077.
24. Zou, Y., and P. Stastny. 2002. Alternatively spliced forms of MICA and MICB lacking exon 3 in a human cell line and evidence of presence of similar RNA in human peripheral blood mononuclear cells. *Immunogenetics* 54: 671-674.
25. Coupel, S., F. Leboeuf, G. Boulday, J. P. Soulillou, and B. Charreau. 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.
26. Tonnerre, P., N. Gerard, M. Chatelais, and B. Charreau. 2010. MICA gene polymorphism in kidney allografts and possible impact of functionally relevant variants. *Transplant Proc* 42: 4318-4321.
27. Katsuyama, Y., M. Ota, H. Ando, S. Saito, N. Mizuki, J. Kera, S. Bahram, Y. Nose, and H. Inoko. 1999. Sequencing based typing for genetic polymorphisms in exons, 2, 3 and 4 of the MICA gene. *Tissue Antigens* 54: 178-184.
28. Lengyel, C. S., L. J. Willis, P. Mann, D. Baker, T. Kortemme, R. K. Strong, and B. J. McFarland. 2007. Mutations designed to destabilize the receptor-bound conformation increase MICA-NKG2D association rate and affinity. *J Biol Chem* 282: 30658-30666.
29. Obuchi, N., M. Takahashi, T. Nouchi, M. Satoh, T. Arimura, K. Ueda, J. Akai, M. Ota, T. Naruse, H. Inoko, F. Numano, and A. Kimura. 2001. Identification of MICA alleles with a long Leu-repeat in the transmembrane region and no cytoplasmic tail due to a frameshift-deletion in exon 4. *Tissue Antigens* 57: 520-535.
30. Xu, X., W. Xia, L. Tian, Y. Chen, H. Ding, Y. Shao, J. Deng, J. Wang, Y. Huang, S. Santoso, Y. Fu, and X. Ye. 2012. Distribution of MICA haplotypes in a Chinese Han population. *Hum Immunol* 73: 75-79.
31. Steinle, A., P. Li, D. L. Morris, V. Groh, L. L. Lanier, R. K. Strong, and T. Spies. 2001. Interactions of human NKG2D with its ligands MICA, MICB, and homologs of the mouse RAE-1 protein family. *Immunogenetics* 53: 279-287.
32. Li, P., D. L. Morris, B. E. Willcox, A. Steinle, T. Spies, and R. K. Strong. 2001. Complex structure of the activating immunoreceptor NKG2D and its MHC class I-like ligand MICA. *Nat Immunol* 2: 443-451.
33. Groh, V., R. Rhinehart, J. Randolph-Habecker, M. S. Topp, S. R. Riddell, and T. Spies. 2001. Costimulation of CD8 α T cells by NKG2D via engagement by MIC induced on virus-infected cells. *Nat Immunol* 2: 255-260.
34. Ehrlich, L. I., K. Ogasawara, J. A. Hamerman, R. Takaki, A. Zingoni, J. P. Allison, and L. L. Lanier. 2005. Engagement of NKG2D by cognate ligand or antibody alone is insufficient to mediate costimulation of human and mouse CD8 $^{+}$ T cells. *J Immunol* 174: 1922-1931.
35. Kubin, M., L. Cassiano, J. Chalupny, W. Chin, D. Cosman, W. Fanslow, J. Mullberg, A. M. Rousseau, D. Ulrich, and R. Armitage. 2001. ULBP1, 2, 3: novel MHC class I-related molecules that bind to human cytomegalovirus glycoprotein UL16, activate NK cells. *Eur J Immunol* 31: 1428-1437.
36. Gonzalez, S., J. Martinez-Borra, J. C. Torre-Alonso, S. Gonzalez-Roces, J. Sanchez del Rio, A. Rodriguez Perez, C. Brautbar, and C. Lopez-Larrea. 1999. The MICA-A9 triplet repeat polymorphism in the transmembrane region confers additional susceptibility to the development of psoriatic arthritis and is independent of the association of Cw*0602 in psoriasis. *Arthritis Rheum* 42: 1010-1016.
37. Romphruk, A. V., A. Romphruk, C. Choonhakarn, C. Puapairoj, H. Inoko, and C. Leelayuwat. 2004. Major histocompatibility complex class I chain-related gene A in Thai psoriasis patients: MICA association as a part of human leukocyte antigen-B-Cw haplotypes. *Tissue Antigens* 63: 547-554.
38. Champsaur, M., and L. L. Lanier. 2010. Effect of NKG2D ligand expression on host immune responses. *Immunol Rev* 235: 267-285.

39. Stern-Ginossar, N., and O. Mandelboim. 2009. An integrated view of the regulation of NKG2D ligands. *Immunology* 128: 1-6.
40. Strong, R. K. 2002. Asymmetric ligand recognition by the activating natural killer cell receptor NKG2D, a symmetric homodimer. *Mol Immunol* 38: 1029-1037.
41. Groh, V., J. Wu, C. Yee, and T. Spies. 2002. Tumour-derived soluble MIC ligands impair expression of NKG2D and T-cell activation. *Nature* 419: 734-738.
42. Salih, H. R., H. G. Rammensee, and A. Steinle. 2002. Cutting edge: down-regulation of MICA on human tumors by proteolytic shedding. *J Immunol* 169: 4098-4102.
43. Salih, H. R., S. Holdenrieder, and A. Steinle. 2008. Soluble NKG2D ligands: prevalence, release, and functional impact. *Front Biosci* 13: 3448-3456.
44. Waldhauer, I., D. Goehlsdorf, F. Gieseke, T. Weinschenk, M. Wittenbrink, A. Ludwig, S. Stevanovic, H. G. Rammensee, and A. Steinle. 2008. Tumor-associated MICA is shed by ADAM proteases. *Cancer Res* 68: 6368-6376.
45. Sun, D., X. Wang, H. Zhang, L. Deng, and Y. Zhang. 2011. MMP9 mediates MICA shedding in human osteosarcomas. *Cell Biol Int* 35: 569-574.
46. Holdenrieder, S., P. Stieber, A. Peterfi, D. Nagel, A. Steinle, and H. R. Salih. 2006. Soluble MICA in malignant diseases. *Int J Cancer* 118: 684-687.
47. Aguera-Gonzalez, S., C. C. Gross, L. Fernandez-Messina, O. Ashiru, G. Estes, H. C. Hang, H. T. Reyburn, E. O. Long, and M. Vales-Gomez. 2011. Palmitoylation of MICA, a ligand for NKG2D, mediates its recruitment to membrane microdomains and promotes its shedding. *Eur J Immunol* 41: 3667-3676.
48. Wang, X., A. D. Lundgren, P. Singh, D. R. Goodlett, S. R. Plymate, and J. D. Wu. 2009. A six-amino acid motif in the alpha3 domain of MICA is the cancer therapeutic target to inhibit shedding. *Biochem Biophys Res Commun* 387: 476-481.
49. Li, Z., V. Groh, R. K. Strong, and T. Spies. 2000. A single amino acid substitution causes loss of expression of a MICA allele. *Immunogenetics* 51: 246-248.
50. Deng, W., B. G. Gowen, L. Zhang, L. Wang, S. Lau, A. Iannello, J. Xu, T. L. Rovis, N. Xiong, and D. H. Raulet. 2015. Antitumor immunity. A shed NKG2D ligand that promotes natural killer cell activation and tumor rejection. *Science* 348: 136-139.
51. Ogasawara, K., J. A. Hamerman, L. R. Ehrlich, H. Bour-Jordan, P. Santamaria, J. A. Bluestone, and L. L. Lanier. 2004. NKG2D blockade prevents autoimmune diabetes in NOD mice. *Immunity* 20: 757-767.
52. Kloverpris, H. N., A. Stryhn, M. Harndahl, M. van der Stok, R. P. Payne, P. C. Matthews, F. Chen, L. Riddell, B. D. Walker, T. Ndung'u, S. Buus, and P. Goulder. 2012. HLA-B*57 Micropolymorphism shapes HLA allele-specific epitope immunogenicity, selection pressure, and HIV immune control. *J Virol* 86: 919-929.
53. Feinberg, M. B., and R. Ahmed. 2012. Born this way? Understanding the immunological basis of effective HIV control. *Nat Immunol* 13: 632-634.
54. Kloverpris, H. N., M. Harndahl, A. J. Leslie, J. M. Carlson, N. Ismail, M. van der Stok, K. H. Huang, F. Chen, L. Riddell, D. Steyn, D. Goedhals, C. van Vuuren, J. Frater, B. D. Walker, M. Carrington, T. Ndung'u, S. Buus, and P. Goulder. 2012. HIV control through a single nucleotide on the HLA-B locus. *J Virol* 86: 11493-11500.
55. Le Clerc, S., O. Delaneau, C. Coulonges, J. L. Spadoni, T. Labib, V. Laville, D. Ulveling, J. Noirel, M. Montes, F. Schachter, S. Caillat-Zucman, and J. F. Zagury. 2014. Evidence after imputation for a role of MICA variants in nonprogression and elite control of HIV type 1 infection. *J Infect Dis* 210: 1946-1950.

Figure legends

Figure 1. Allele specific MICA alternate splicing: identification of 5 novel MICA alternate transcripts (A) A representative detection of MICA alternative transcripts in cell cultures. RNAs were purified from two EC cultures bearing MICA 002//009 or *010/*017 haplotype, retrotranscribed and amplified using primers encompassing the full length MICA cDNA (1264bp). PCR products were separated on agarose gel and stained with ethidium bromide. **(B)** A schematic representation of wild type *MICA* gene structure and mRNA and of five alternative splice transcripts MICA-A, MICA-B1, MICA-B2, MICA-C and MICA-D. **(C)** A schematic representation of wild type *MICA* protein and isoforms MICA-A, MICA-B1, MICA-B2, MICA-C and MICA-D. **(D)** Allele specific deletion at the 5' end donor splice site of *MICA* intron 4 identified in *MICA* *015 and *017.

Figure 2. Detection of MICA alternate transcripts in cells and biochemical characterization of MICA isoforms.

Detection of MICA alternative transcripts in cells bearing the MICA *015 or *017 alleles by RT-PCR. RNAs were purified from two MICA homozygous cell lines (OMW MICA*015/*015 and WIN MICA*017/*017) and two heterozygous EC cultures (MICA*010/*017 and *018/*017). Two irrelevant EC cultures were used as negative controls. RT-PCR were performed using primers encompassing the full length MICA cDNA (1264bp). PCR products were separated on agarose gel and stained with ethidium bromide. SM: size marker. **(B)** Detection of MICA alternate transcripts in ECs, leukemia cell lines (OMW, WIN) and freshly isolated PBLs using allele specific primers. **(C-D)** COS cells were transfected with plasmids containing full length cDNA for MICA WT (*002) or isoforms MICA-A, -B1, -B2, -C and -D in frame with a Flag peptide (M2) in 3'. **(C)** After transfection (48h), cells were lysed for protein analysis. Cell lysates were separated by SDS-PAGE, Proteins were immunoblotted with an anti-FLAG (upper panel), or anti-GAPDH (lower panel) antibodies. Size markers are indicated (kDa). **(D)** Transfected cells were analyzed by flow cytometry after immunostaining with anti-Flag Abs. **(E)** Transfected cells were grown on coverslips, fixed and immunostained with anti-Flag Abs (green). Nuclei are stained with propidium iodide (red). Specimens were analyzed by

confocal fluorescence microscopy and the Image J free software. Results showing orthogonal views of confocal Z-stack series are representative of at least 3 independent experiments.

Figure 3. MICA-B2 and MICA-D are new functional ligands for NKG2D.

(A) Isoform MICA-B2 is detectable using anti-MICA mAbs. COS cells were transfected with cDNA encoding WT MICA or MICA isoforms. MICA extracellular detection was achieved 48h post-transfection using anti-MICA recognizing $\alpha 1$ and $\alpha 2$ domains (AMO1). COS cells transfected with the WT cDNA for MICA are used as positive controls. Detection of MICA isoform expression was analyzed by flow cytometry. Median of fluorescence intensity (MFI) are indicated. **(B)** MICA-B2 downmodulates NKG2D on NK cells. CHO cells were stably transfected with plasmids encoding WT MICA or MICA isoforms cDNAs. NKL were cocultured with adherent monolayers of established transfected cell lines for 15h. After coculture, NKL were harvested, immunostained with anti-NKG2D mAbs and analyzed by flow cytometry. Results are expressed as means \pm SD from 3 independent experiments. **(C)** MICA-D impairs NKG2D downmodulation mediated on NK cells by WT MICA expressed on HEK cells. HEK cells were transiently transfected with plasmids encoding WT MICA or MICA isoforms cDNAs. Twenty four hours post-transfection, NKL were cocultured with adherent monolayers of transfected cells for 15h. After coculture, NKL were harvested, immunostained with anti-NKG2D mAbs and analyzed by flow cytometry. Results are expressed as means \pm SD from 3 independent experiments.

Figure 4. MICA-B2 activates NK cells and MICA-D impairs NK motility without activating NKG2D. Intracellular Ca^{2+} signal was monitored using fura-2 –labeled NKL cells (green) incubated with adherent monolayers of stable CHO transfectants. Activation of Ca^{2+} signaling (red) was recorded by live videomicroscopy for 20 min. **(A)** Representative pictures/videograms of Ca^{2+} signals in NKL incubated with untransfected CHO or MICA transfectants (MICA WT *002, B1, B2 and D). Ratiometric properties of the Fura-2 dye allow various color representation of cells depending of the intensity of intracellular Ca^{2+} fluxes. Unactivated cells appear in blue and turn progressively in green/yellow/red when activated **(B)** A quantitative analysis of NKL motility

following contact with MICA*002 or MICA-B2 transfectants, * $p < 0.05$ versus mock control. **(C)** A quantitative analysis of NKL motility following contact with MICA*002 or MICA-B2 transfectants and mock control, * $p < 0.05$ versus mock control. **(B-C)** Quantification was performed on 10 cells/field and results represent the sum of 4 independent experiments. **(D)** Representative Ca^{2+} ratios and speed in single cell with (activated) or without (non activated) Ca^{2+} signaling.

Figure 5. Overview of the findings.

Footnotes

¹Sources of support:

This work was performed in the context of the IHU-Cesti, LabEx IGO and LabEx Transplantex projects which received French government financial support managed by the National Research Agency (ANR) *via* the "Investment Into The Future" programs ANR-10-IBHU-005, ANR-11-LABX-0016-01 and ANR-11-LABX-0070. The IHU-Cesti project is also supported by Nantes Metropole and the Pays de la Loire Region. This study is also supported by the "Fondation Centaure" (RTRS) which supports a French transplantation research network. PJG was supported by a fellowship from the IHU-Cesti project.

²Abbreviations:

ADAM: a disintegrin and metalloproteinase

AT: alternative transcripts

AST: alternative splice transcripts

CYT: cytoplasm

EC: endothelial cells

MICA: MHC class I related chain A

NK: natural killer cells

NKG2DL: NKG2D ligand

ORF: open reading frame

TM: transmembrane

ULBP: UL16 binding protein

Figure 1

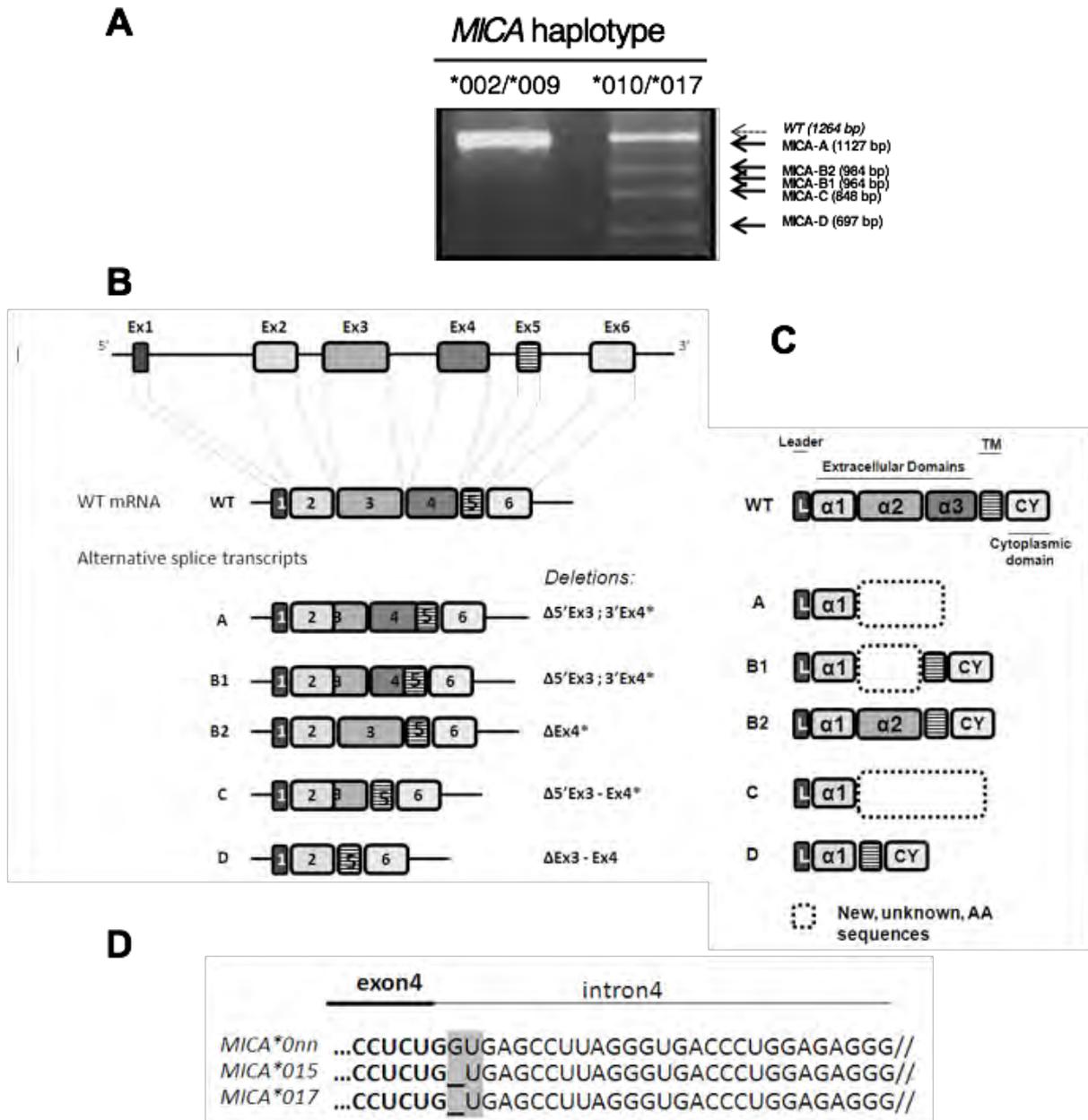


Figure 3

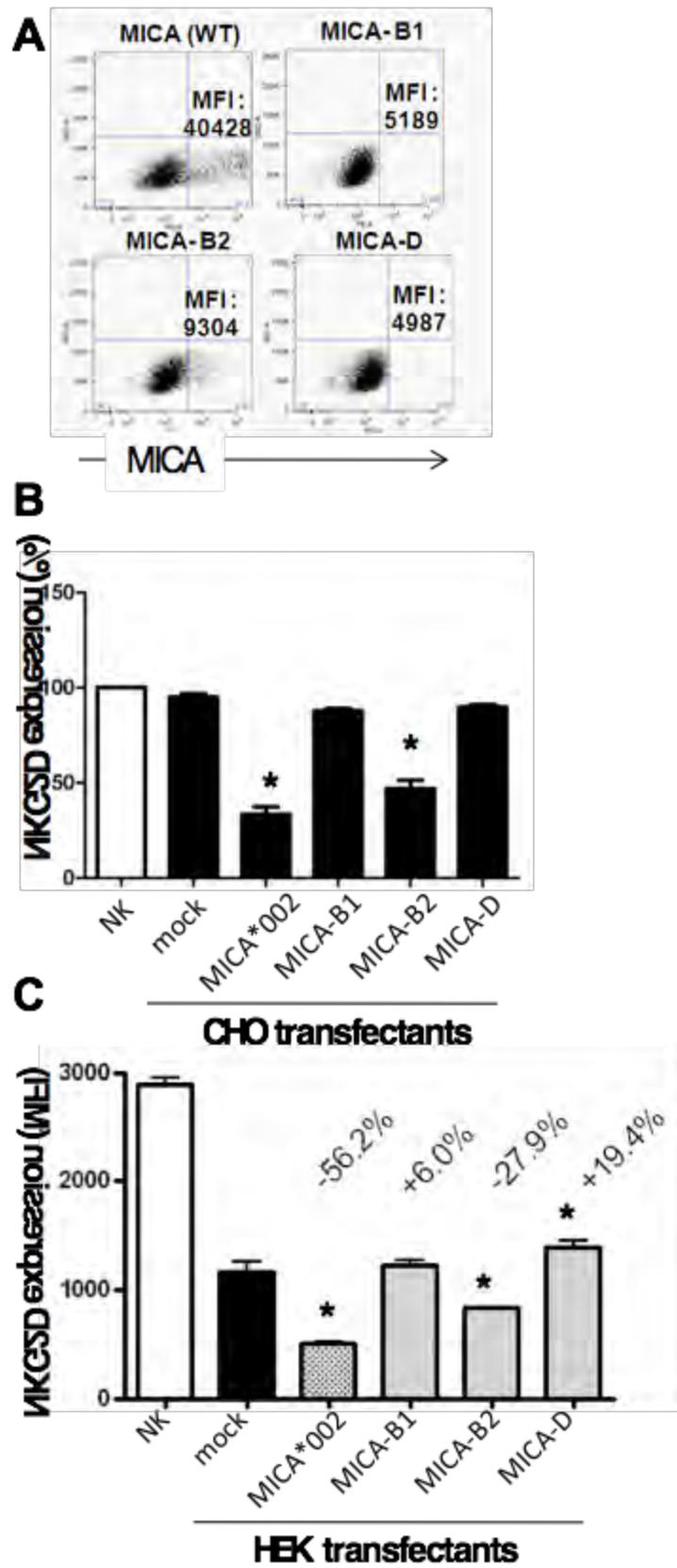


Figure 4

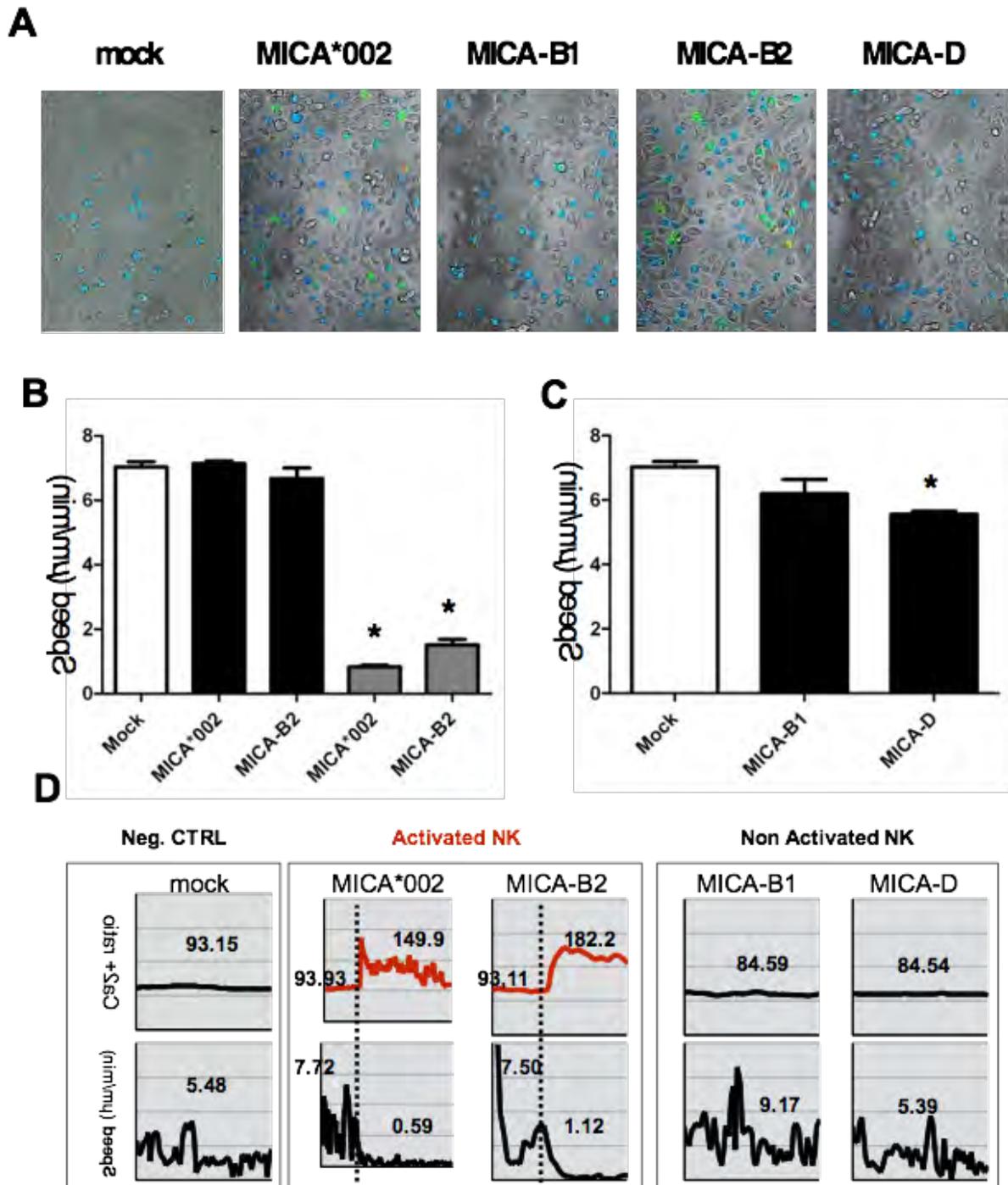
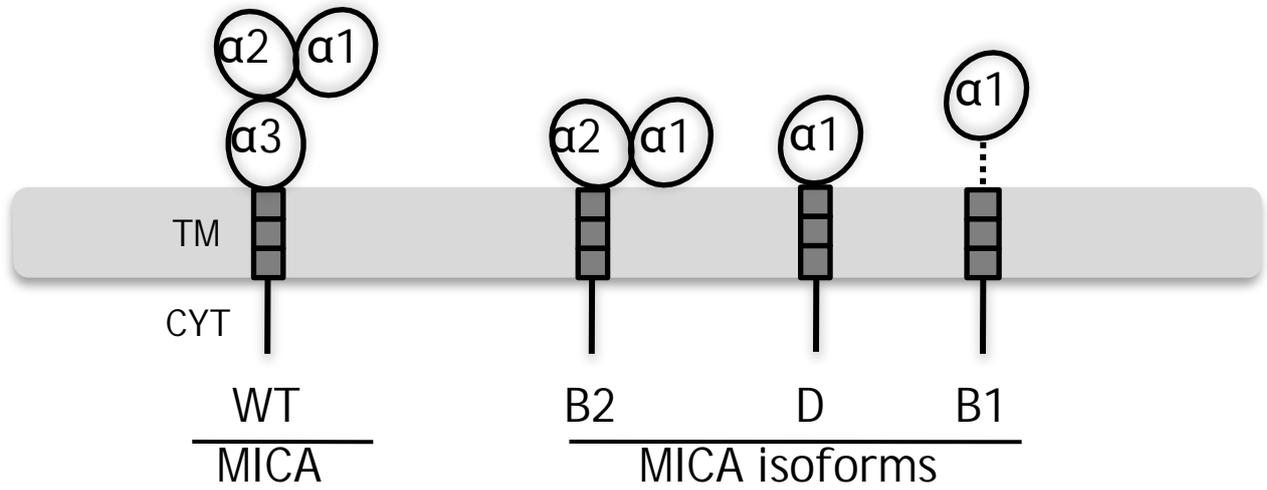


Figure 5

NKG2D

affinity (Kd)	4 μ M agonist	14 μ M agonist	20 μ M antagonist	5 μ M ?
------------------	----------------------	-----------------------	--------------------------	----------------



4. Résultats complémentaires :

Le test de dégranulation (CD107a) a été réalisé avec les transfectants stables ainsi que des NK issus de PBMC humains purifiés par tri magnétique (Human NK isolation kit, Milteniy). Les NK sont pré-activés une nuit avec 20ng/ml d'IL15 humaine. Après 6 heures de co-culture à raison d'un NK pour une cible (ratio 1:1) en présence d'un anticorps anti-CD107a PE, les cellules sont récoltées puis l'expression du CD107a sur les NK est analysée par cytométrie en flux (figure 15).

Nos résultats montrent une activation des NK en présence des CHO (contrôle négatif) en comparaison avec les NK seuls. La co-culture avec les CHO exprimant MICA*002 (contrôle positif) conduit à une activation supérieure des NK en comparaison avec le contrôle négatif. L'isoforme MICA-B2 est capable d'activer les NK et ce de manière comparable au contrôle positif. L'isoforme MICA-B1 parvient à activer les NK mais de façon moins efficace que le contrôle positif ou encore MICA-B2. De façon intéressante, l'isoforme MICA-D permet de diminuer l'activation basale observée avec les NK en présence de CHO.

En résumé, ces résultats appuient le fait que l'isoforme MICA-D est un ligand antagoniste de MICA et que MICA-B2 est à l'inverse un ligand agoniste de MICA. Les résultats obtenus avec MICA-B1 suggèrent également que cette isoforme est un ligand agoniste de MICA.

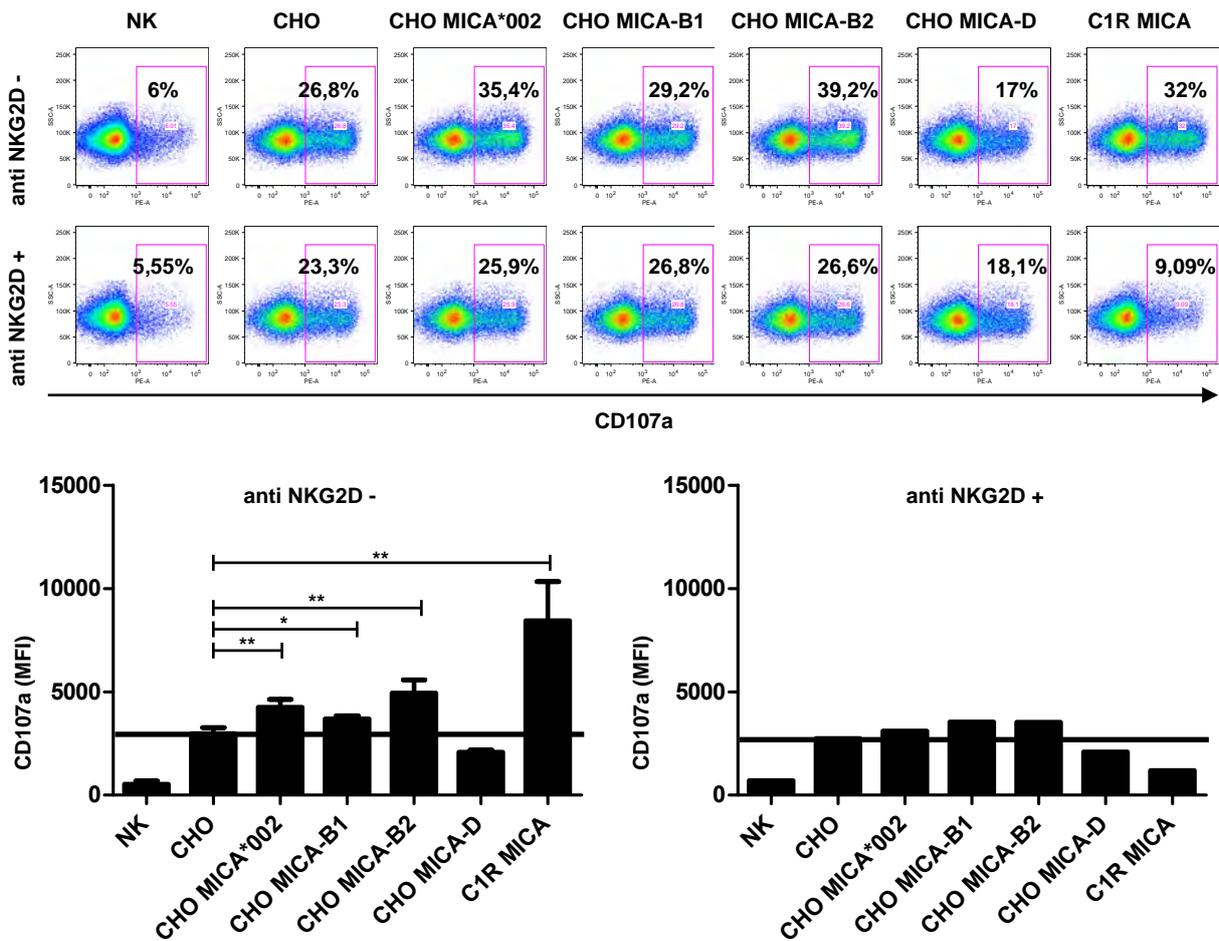
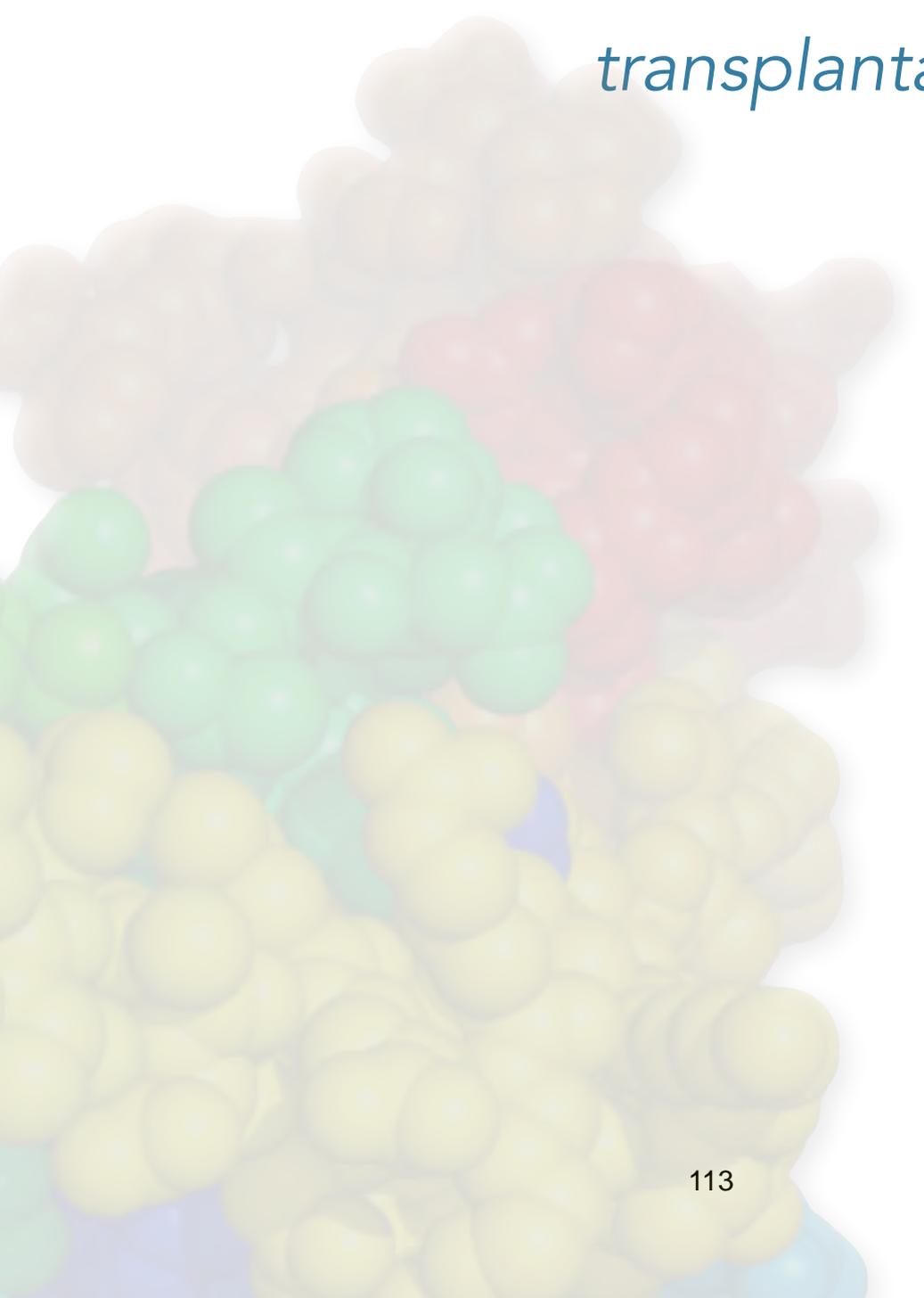


Figure 15 : **Test de dégranulation (CD107a)**. En haut, dot plot représentatif d'une expérience (n=4 pour les expériences sans anticorps anti-NKG2D ; n=1 pour les expériences de blocage avec un anticorps anti-NKG2D). Les valeurs en pourcentages correspondent au nombre de NK CD107a positifs. Le test de blocage est réalisé en ajoutant 10µg/ml d'anticorps anti-NKG2D lors de l'expérience de dégranulation. En bas, moyennes de fluorescence de 4 expériences de dégranulation indépendantes et de l'expérience de blocage par un anticorps anti-NKG2D. (* : p=0,0317 ; ** : p=0,0079)

Partie 2 :

*Impact de la mutation MICA A5.1
sur la réactivation du BK virus post-
transplantation rénale*



PARTIE 2 : Impact de la mutation MICA A5.1 sur la réactivation du BK virus post-transplantation rénale

1. Présentation de l'étude :

La survie de la greffe est souvent réduite par des mécanismes de rejet humoraux et/ou cellulaires nécessitant une immunosuppression efficace pour leur contrôle. Les traitements immunosuppresseurs diminuent la survenue du rejet mais fragilisent le système immunitaire et rendent le patient transplanté plus vulnérable à diverses pathologies infectieuses.

Le BK virus est un virus à ADN double brin appartenant à la famille des *Poliomaviridae*. Il a été découvert en 1971 chez un patient transplanté rénal et ses initiales « BK » ont été utilisées pour nommer ce nouveau virus. Entre 80 et 90% de la population est infectée par ce virus dont la primo-infection a lieu durant l'enfance et de façon asymptomatique. Du à son tropisme pour les cellules épithéliales tubulaires rénales ainsi que pour l'urothélium, le BK virus est latent dans le tractus réno-urinaire (Jiang et coll., J Virol. 2009). La réactivation du BK virus post-transplantation rénale est à l'heure actuelle une complication fréquente touchant entre 20 et 60% des patients (Bressolette-Bodin et coll. Am J Transplant. 2005). Dans les premiers stades de la pathologie, la charge virale augmente dans les urines des patients transplantés et on détecte la présence de cellules urothéliales infectées appelées decoy cells. Cette phase précoce n'est pas systématiquement associée à une dysfonction du greffon. A un stade plus avancé, le BK virus est détecté dans le sang suite à une réplication intense. Ce statut précède la survenue de la néphropathie associée au virus BK (NVBK) et est observé chez 6 à 8% des patients (Hirsch et coll. N Engl J Med. 2002).

Les facteurs liés à la réactivation du BK sont multiples : l'immunosuppression (Prosser et Hariharan, *Transplant.* 2009), l'absence d'une immunité humorale anti-BK virus du receveur (Smith et coll., *Am J Transplant.* 2009), les micro-lésions ischémiques et/ou les épisodes de rejet (Mylonakis et coll., *Transplantation.* 2001), l'incompatibilité HLA entre le donneur et le receveur (Awadalla et coll., *Am J Transplant.* 2004) et les mutation du virus au cours de sa réplication (Gosert et coll., *J Exp Med.* 2008).

Les traitements anti-viraux contre le BK virus étant peu efficaces, la diminution de l'immunosuppression reste à ce jour la meilleure solution pour contrôler la réplication du virus. Les conséquences de cette stratégie sont une baisse de la charge virale dans les urines et dans le sang (Funk et coll., *J Infect Dis.* 2006) ainsi que l'apparition de lymphocytes T CD4+ ET T CD8+ dirigés contre les antigènes viraux VP1 et l'antigène grand T (Binggeli et coll., *Am J transplant.* 2007).

Les mécanismes immunologiques impliqués dans le contrôle de l'infection sont à ce jour mal connus. De nombreuses études ont néanmoins mise en évidence que la plupart des virus développent des stratégies leur permettant d'échapper à la surveillance par le système immunitaire. Les cibles principales des virus sont les ligands du récepteur activateur NKG2D à savoir MICA/B ainsi que les ULBP (Eagle et Trowsdle, *Nat Rev Immunol.* 2007) (Champsaur et Lanier. *Immunol Rev.* 2010). Le CMV a par exemple développé une protéine appelée UL142 capable d'empêcher l'expression à la membrane de MICA en la séquestrant dans l'appareil de Golgi (Chalupny et coll., *Biochem Biophys Res Commun.* 2006) (Ashiru et coll., *J Virol.* 2009). Le KSV a également développé un mécanisme d'échappement ciblant MICA via la production d'une protéine virale K5 capable d'ubiquitiner la partie intra-cytoplasmique de MICA et d'induire sa dégradation (Thomas et coll., *Proc Natl Acad Sci USA.* 2008). Dans ces deux situations, il en résulte une diminution de l'activation des NK entraînant une élimination moins efficace des cellules infectées. Les variants MICA A5.1 semble cependant échapper à ces deux

mécanismes d'échappement, notamment due à la perte du domaine intra-cytoplasmique, ne permettant pas aux virus de contrôler son expression à la membrane (Zou et coll., J Immunol. 2005) et (Thomas et coll., Proc Natl Acad Sci USA. 2008).

L'objectif de cette étude a été de déterminer l'impact du variant MICA A5.1 sur la réactivation du BK virus suite à une transplantation rénale. Dans cette étude a été réalisé le génotypage MICA sur une cohorte de couples de donneurs et de receveurs. Un suivi de la virurie et de la virémie ainsi que des échantillons d'ADN étaient disponibles. Une analyse statistique visant à comparer le statut infectieux à l'expression du variant MICA A5.1 a été réalisée.

Mon objectif dans cette étude conduite par Pierre Tonnerre lors de sa thèse a été d'apporter la preuve expérimentale de l'expression et de la localisation de MICA dans le rein. Ces résultats reposent sur l'analyse semi-quantitative de coupes histologiques de rein normaux observées par microscopie confocale. Les résultats obtenus lors de cette étude sont présentés dans l'article 2 qui suit.

2. Résumé de l'article 2 :

MICA variant influences the immune control of BK polyomavirus reactivation after kidney transplantation

Pierre Tonnerre, Nathalie Gérard, Pierre-Jean Gavlovsky, Simon Mazalrey, Maryvonne Hourmant, Marie-Luce Chesneau, Anne Cesbron Gautier, Karine Renaudin, Céline Bressollette, Béatrice Charreau

(article soumis pour publication)

La réactivation du BK virus est fréquente chez les patients transplantés rénaux sous traitement immunosuppresseur et peut conduire à une néphropathie associée au BK virus (PVAN, polyomavirus associated nephropathy) et au rejet du greffon. Identifier des facteurs de risques favorisant à la réactivation du BK virus est indispensable pour une prévention efficace.

Dans cette étude nous montrons que le variant MICA A5.1 associé à l'allèle MICA le plus fréquent (MICA*008) est exprimé dans le rein et peut affecter variablement la réactivation si porté par le donneur ou le receveur. Nous avons analysé le génotype MICA A5.1, en association avec l'immunisation anti-MICA les taux sériques de MICA soluble, au sein d'une cohorte de couples donneurs/receveurs incluant des receveurs ne présentant pas de réactivation du BK virus, des receveurs avec une réactivation intermédiaire et des receveurs avec une forte réactivation du BK virus post-greffe. Statistiquement, nous montrons que les patients parvenant à contrôler l'infection par le BK virus ont majoritairement reçu un transplant MICA A5.1 alors que les patients développant une réactivation sévère du BK virus ou une PVAN ont reçu un greffon issu de donneur non MICA A5.1 (*wild type*, WT). Ces résultats suggèrent un rôle protecteur du variant MICA

A5.1 dans certains contextes et probablement dû aux caractéristiques atypiques de la protéine MICA A5.1, sur la progression de l'infection par le BK virus et/ou le contrôle immun de l'infection. La combinaison « donneur MICA A5.1 / receveur MICA WT » semble la combinaison optimale pour le contrôle de l'infection par le BK virus et corrèle avec l'apparition d'anticorps anti-MICA et des taux sériques de MICA soluble faibles. L'opsonisation des formes solubles, immunosuppressives, de MICA par les anticorps anti-MICA pourrait constituer un mécanisme impliqué dans la protection vis-à-vis du BK virus en préservant les fonctions cytotoxiques des cellules NKG2D+. En conclusion, le variant MICA A5.1 semble impliqué sélectivement dans le contrôle immun de l'infection par le BK virus dans les cellules rénales cibles et chez le receveur. Ces observations suggèrent qu'un mismatch donneur/receveur pour le variant MICA A5.1 est un facteur important influençant le contrôle de la réactivation du BK virus et la survie de la greffe.

3. Article 2 :

MICA variant influences the immune control of BK polyomavirus reactivation after kidney transplantation

Pierre Tonnerre^{1,2,3*}, Nathalie Gérard^{1,2,3}, Pierre-Jean Gavlovsky^{1,2,3}, Simon Mazalrey⁴, Maryvonne Hourmant^{2,3}, Marie-Luce Chesneau⁵, Anne Cesbron Gautier⁵, Karine Renaudin⁶, Céline Bressollette^{¶4}, Béatrice Charreau^{¶1,2,3}

¹INSERM, UMR1064, LabEx Transplantex, LabEx IGO and Nantes, F44000 France;

²CHU Nantes, Institut de Transplantation et de Recherche en Transplantation–Urologie-Néphrologie, ITUN, Nantes, F44000 France; ³LUNAM· Université de Nantes, Faculté de Médecine, Nantes, F44000 France. F44000 France.

⁴EA4271, Université de Nantes, UFR Pharmacie, Nantes, F44000 France, ⁵Laboratoire HLA, Etablissement Français du sang, LabEx Transplantex, Nantes, ⁶Laboratoire d'Anatomopathologie, CHU de Nantes, Université de Nantes, Faculté de Médecine, Nantes, F44000 France.

[¶] both last/senior authors contributed equally to the work

*P.T. Present address: Gastrointestinal Unit, Massachusetts General Hospital and Harvard Medical School, Boston, MA, USA.

[¶] both last/senior authors contributed equally to the work

*P.T. Present address: Gastrointestinal Unit, Massachusetts General Hospital and Harvard Medical School, Boston, MA, USA.

Short title (50 words): MICA variant influences BK polyomavirus reactivation

Correspondings authors:

Dr. Béatrice Charreau, PhD

INSERM UMR1064, 30 bd J. Monnet, 44093 Nantes cedex 01, France.

Phone: +33 2 40 08 74 16; Fax: +33 2 40 08 74 11

E-mail: Beatrice.Charreau@univ-nantes.fr

Dr. Celine Bressollette, MD, PhD

EA4271 Immunovirologie et polymorphisme génétique, 1 rue Gaston Veil, Université de Nantes, Laboratoire de Virologie, CHU Nantes, 9 quai Moncousu, 44000 Nantes, France

Phone :+33 2 40 08 41 22/ fax +33 2 40 08 41 39

Email : celine.bressollette@univ-nantes.fr

Abstract

BK polyomavirus (BKPyV) frequently reactivates in kidney transplant recipients with immunosuppressive regimen and triggers BKPyV-associated nephropathy (PVAN) and graft rejection. Determining effective risk factors for BKPyV reactivation is required to achieve efficient prevention.

Here we report that major changes in MHC class I related chain A (MICA) proteins, related the most common *MICA A5.1* genetic variant, expressed in kidney transplant could affect diversely the outcome of infection in the graft or in the recipient. This study investigated MICA A5.1 genotype in association with MICA immunization and soluble MICA in a cohort of transplant donor/recipient pairs including recipients with no reactivation (controllers), mild or severe BKPyV reactivation post-graft. We show that BKPyV controllers more frequently received a transplant carrying the *MICA A5.1* variant while severe BKPyV reactivation and PVAN increased in recipients carrying a transplant from a wild type (WT) donor. It is likely that, due to their atypical structural features, MICA A5.1 proteins may orientate virus control and protect transplant from BKPyV infection. The “Donor MICA A5.1/Recipient MICA WT” combination appears optimal for the control of BKPyV reactivation and correlates to the occurrence of anti-MICA antibodies and a parallel reduction of soluble MICA. Opsonization of immunosuppressive soluble MICA by anti-MICA antibodies could be an effective mechanism involved in the protection toward BKPyV reactivation. Thus *MICA A5.1* displays specific roles in the immune control of BKPyV in target renal cells and in host and a mismatch between transplant donor and recipient for *MICA A5.1* is critical to control BKPyV infection and graft survival.

Key words: BK polyomavirus, kidney, transplantation, MICA

Significance Statement. Authors must submit a 120-word-maximum

Prevent BKPyV reactivation post kidney transplantation is a current challenge that still require the identification of risk factors. This study establishes *MICA* gene as an operational immunogenetic factor influencing BKPyV reactivation. When expressed in the kidney transplant, structural changes in MICA proteins associated with the common *MICA* gene variant A5.1 affect the outcome of infection. *MICA A5.1* variant is found protective toward BKPyV infection when carried by the transplant donor in particular in recipient carrying wild type MICA alleles, reflecting specific control of MICA A5.1 on immune responses including MICA immunization and soluble MICA in the host. Thus a mismatch between donor and recipient for *MICA A5.1* is a critical factor to consider to prevent BKPyV reactivation.

Introduction

BK polyomavirus (BKPyV) is a non-enveloped virus with a circular, double-stranded DNA genome of approximately 5 kb (for review see (1)). The genome is functionally divided into an early region, encoding large and small T-antigens, a late region encoding the structural proteins (VP1-3) as well as the agnoprotein, and a non-coding control region. BKPyV replication is typically found in renal tubular epithelial cells (2-4). Although BKPyV is not clearly associated with disease in immunocompetent individuals, the virus frequently reactivates in kidney transplant recipients (KTRs) with immunosuppressive regimen and currently poses a major challenge to transplantation. Symptomatic reactivation may result in polyomavirus-associated nephropathy (PVAN) and graft loss, and late-onset hemorrhagic cystitis (5, 6). Immune and genetic factors controlling BKPyV reactivation remain elusive.

MICA is expressed in solid organ transplants and plays a role in alloimmunity by inducing anti-MICA alloantibodies (7, 8). MICA is also a key player in innate and adaptive immunity and contributes to the control of viral infection as a ligand for the activating NK receptor NKG2D (9, 10). MICA downregulation at the surface of infected cells is an escape mechanism used by several viruses (i.e. HCMV, HIV) to evade the immune responses (11-13). Recent findings support protective effects of NK activating receptors in BKPyV infection (14). However, the possible involvement of MICA, a major target for HCMV immunoevasins, in BKPyV reactivation is still unknown.

MICA gene is highly polymorphic and more than 101 alleles have been described so far (15). The A5.1 variant results in a frameshift mutation that generates a premature stop codon that truncates the MICA transmembrane domain and cytoplasmic tail (16). This

feature subsequently affects MICA subcellular localization (17), membrane anchorage (18), surface expression (19) and release of soluble MICA (sMICA) molecules (20). *MICA* A5.1 genetic variant associates with 10 alleles *MICA**008, *023, *028, *053, *058, *070, *073, *080, *082 and *085; *MICA**008 being by far the most frequent allele of many populations (up to 40% of individuals carry at least one *MICA**008 allele) (21-23). Regarding the immune response, functional consequences of carrying *MICA**008/A5.1 allele compared to full length wild type (WT) *MICA* alleles remain poorly understood.

Allotransplantation poses the challenges of a possible mismatch for *MICA* between the transplant donor and the recipient. The immune impact of *MICA* mismatch in kidney transplantation remains mostly uncovered. Our previous study demonstrated that a mismatch between donor (D) and recipient (R) for *MICA**008 /A5.1 could be a risk factor for long term transplant survival due to enhanced anti-MICA sensitization of transplant recipients (19). Here, we hypothesized that structural changes featuring *MICA* A5.1 proteins could affect BKPyV reactivation post-transplantation through atypical modulation of anti-viral immune responses. The present study examined the expression and subcellular localization of *MICA* in kidney biopsies and cells and retrospectively investigated *MICA* genotypes and the presence of anti-MICA antibodies and sMICA in a cohort of 144 kidney transplant donor/recipient pairs according to the occurrence of BKPyV infection post-transplantation.

Results

Predominant expression for MICA in renal tubule epithelial cells, the natural targets of BKPyV infection.

Although an exhaustive description of tissue distribution for MICA is still lacking, basal MICA expression seems, in contrast to classical HLA class I, restricted to some cell types in physiological conditions. Since initial study that confined MICA to intestinal mucosa epithelial cells lining the villi (24), basal MICA was further detected in several organs such as heart, kidney and pancreas (25) and in various cell types including monocytes, fibroblasts, endothelial cells (ECs) (26). To date no descriptive analysis of expression for MICA in kidney has been reported and only a partial analysis upon allograft rejection has been described yet (26). Thus we sought to establish the cellular localization of MICA basal expression in a normal kidney by immunofluorescence. Here we show (**Figure 1**) that, in normal kidney, MICA is most predominantly expressed by epithelial cells in renal tubules and by some vascular ECs. Expression in tubule epithelium seems higher in intensity than in the endothelium where glomerular and arterial ECs were stained (**Figure 1A**). Among renal tubules both proximal and distal tubular epithelial cells were stained. Sustained MICA expression on tubular epithelial cells was further confirmed by flow cytometer analysis performed on primary cultures of human renal proximal epithelial cells (HRPTECs) (**Figure 1B**). In tubules, MICA staining concentrated at the apical side of tubular epithelial cell revealing a yet unknown polarity for MICA in renal cells (**Figure 1C**). Since epithelial tubular cells are natural targets for BKPyV infection and replication (27), we postulate that qualitative or quantitative changes in MICA proteins expressed in kidney transplant could affect the efficacy and the outcome of infection. In contrast to full length *MICA* alleles, *MICA5.1* is distinct from the other alleles because it has an insertion of a guanine at position 952 within exon 5 introducing a premature stop codon that result in the

expression of a truncated MICA protein with no transmembrane domain and no intracytoplasmic tail (17) (**Figure 1D**). Changes in protein structure and biochemical properties encoded by MICA A5.1, compared to full length wild type (WT) MICA proteins have been reported (17, 18) but their functional impact is not fully elucidated. As illustrated Figure 1E, expression of MICA A5.1 mutation at cell level associated with elevated MICA expression, consistent with our previous results (19).

Study cohort.

To define the influence of *MICA* genetic variant on the risk of post-transplant BKPyV infection, our cohort study included 144 kidney transplant donor/recipient pairs, grafted between 2010 and 2012, and with at least 1-year of follow-up for BKPyV monitoring post-transplantation. Transplant recipients include a group of patients without BKPyV reactivation (BKPyV controllers, n=57), a group of patients with mild BKPyV infection (positive viruria and negative viremia; n=35) and a third group of recipients with severe BKPyV infection (positive viruria and positive viremia; n=52). Histologically confirmed PVAN on renal biopsy were found in 14 out of the 52 (26.92%) recipients among the viremia group. Banked donor and recipient biological samples (serum and DNA) were used for *MICA* genotyping, anti-MICA sensitization analysis, and quantification of sMICA. Characteristics of the cohort are summarized in **Table 1**. There was no significant difference in recipient or donor age, percentages in male gender in donors and recipients or HLA mismatches. The majority of patients received similar preconditioning and maintenance therapies. The mean follow-up periods were 29, 36 and 38 months in viremic, viruric and controller groups, respectively.

Recipients transplanted with renal graft carrying MICA A5.1 mutation have a lower risk or BKPyV reactivation.

MICA genotyping was performed retrospectively for donors and recipients of the cohort as we previously described (19). Firstly, we examined in transplant donors (D) and in recipients (R) respectively the impact of carrying none (WT/WT), one (WT/A5.1) or two (A5.1/A5.1) *MICA A5.1* alleles on BKPyV reactivation and outcome. To this aim, the frequency of the WT/WT, WT/A5.1 and A5.1/A5.1 haplotypes in donors and recipients was calculated for the 3 groups of patients (**Figure 2A**). In recipients we found a roughly similar distribution for the three haplotypes among the groups. In contrast, a significantly higher prevalence of donors carrying at least one *MICA A5.1* allele was observed in transplanted recipients without BKPyV reactivation post-graft (77.19%) as compared to recipients with BKPyV viremia (49.99%) ($p=0.0119$). These data suggest that intragraft *MICA* expression may have a significant incidence on BKPyV infection after transplantation and may also indicate a protective role for the variant *MICA A5.1* toward BKPyV reactivation.

Mismatch for MICA A5.1 genetic variant between transplant donor and recipient is critical for BKPyV reactivation and PVAN.

Considering that *MICA* expression in the transplanted organ may influence the outcome of anti-viral immune response in the graft recipients we sought to investigate the effect of a mismatch between donor (D) and recipient (R) pairs for the genetic variant *MICA A5.1*. To this aim, 4 combinations were examined including the 2 well-matched pairs DWT/RWT and DA5.1/RA5.1 and the 2 mismatched combinations: DWT/RA5.1 and DA5.1/RWT. The number of patient's pairs within the 4 combinations is depicted on the **Figure 2BA** significant change in the distribution of the combination was found between the BKPyV controllers and recipients with BKPyV viremia, $p=0.0112$. Major changes in the distribution occur for the two mismatched combinations DWT/RA5.1 and DA5.1/RWT. A

net increase in the percentage of DWT/RA5.1 was found in recipients with BKPyV viremia (27.0%) as compared to BKPyV negative patients (10.50%) with an intermediate effect for recipients with mild infection (BKPyV viruria, 14.3%). Distribution for DWT/RWT exhibits a similar increase (10.5% in controllers, 14.3% for virurics and 23.1% for viremics). Interestingly, in the subgroup of viremic patients who developed a PVAN (n=14), the DWT/RA5.1 and DWT/RWT combinations were found together in 57.14% of patients. On the other hand, an opposite gradual decrease in the percentage of DA5.1/RWT combination in severe (11.5%) and mild (17.1%) BKPyV infection compared to BKPyV negative recipients (31.6%) suggests that this combination associates with a lower risk of BKPyV reactivation post renal transplantation. Again, in our cohort PVAN rarely associates with DA5.1/RWT combination (1 PVAN out of 14; 7.14%) further supporting the concept that this combination could be protective. The predominant well-matched DA5.1/RA5.1 combination shows only few variations among the groups.

In our study group 14 patients experienced PVAN. Subsequent univariate analysis showed a significant association between the combinations DWT/RA5.1 and DWT/RWT and a higher risk for PVAN with a cumulative incidence of 31.19% at 5 years compared to DA5.1/RA5.1 (7.69%) and DA5.1RWT (3.33%); $p=0.0430$ (**Figure 2C**). Our data also indicate that DWT/RA5.1 and DWT/RWT associate with PVAN occurring beyond the first year post-transplantation.

Anti-MICA sensitization in transplant recipients associates with low prevalence of BKPyV reactivation.

We previously reported that D/R mismatch for *MICA A5.1* promotes anti-MICA immunization in kidney transplant recipients resulting from sustained MICA expression on *MICA 5.1* graft's endothelial cells (19). Here, we further investigated a possible relationship between MICA immunization and BKPyV reactivation in our cohort. **Figure 3A** shows that

frequency of MICA immunized recipients was significantly higher in recipients with no BKPyV reactivation (24.55%) *versus* recipients suffering severe BKPyV reactivation (9.60%), $p=0.0463$. Antibodies were mostly *de novo* anti-MICA antibodies induced in response to kidney transplantation. Elevated titers of anti-MICA antibodies also associate with an absence of BKPyV reactivation as compare to active BKPyV infection ($p=0.0025$, **Figure 3B**). Again, intermediate values in both antibody frequency and titer were found in patients with mild BKPyV infection (i.e. viremia) further suggesting a link associating MICA immunization and BKPyV infection post-transplantation. Among BKPyV controllers, elevated rate of *de novo* antibodies were significant in the DA5.1/RWT compared to DWT/RA5.1 ($p=0.0447$) and DA5.1/RA5.1 ($p=0.0091$) combinations (**Figure 3C**). Next, the time-course of anti-MICA antibodies induced post-transplantation revealed that MICA immunization rises a peak early during the first month post transplantation and then progressively decreases to stabilize after one year (**Figure 3D**). This early and transient immunization may suggest an innate-like immune function for anti-MICA antibodies rather than an adaptive alloimmunization process.

To further investigate the possible contribution of recipient's immunization status, frequency and titer of anti-HLA class I and class II Abs were also examined (**Supplemental Figure S1**). Sustained BKPyV reactivation associates in our cohort with a higher frequency of anti-HLA class I sensitization (69.22%) in comparison with mild (39.99%) or no (45.61%) virus reactivation ($p=0.0047$ and $p=0.0240$, respectively). Although not statistically significant, a similar trend toward more anti-HLA class II sensitization associated with worse BKPyV evolution is also observed. Together these results support the concept that humoral response against the transplanted organ could selectively participate to BKPyV reactivation with a deleterious impact of anti-HLA response and a protective impact of anti-MICA response.

Soluble MICA is reduced in transplant recipients with no BKPyV reactivation.

Shedding of soluble MICA from tumors impairs immune responses and is a major cause of immune escape promoting cancer (28). Moreover, Jinushi and colleagues suggested that a fine tune balance between soluble MICA and anti-MICA antibodies is critical for an effective control of tumors (29). Therefore, we wondered whether the increase in anti-MICA antibodies might be correlated with alterations in sMICA levels in transplant recipients. Using Elisa we quantified sMICA levels in plasma samples from transplant recipients collected before (M0) and 6 months (M6) after transplantation. Although roughly similar levels of sMICA was present in all patients at M0 (mean values 171.7 vs 172.9 vs 170.8 for controller, viruric and viremic patients, respectively, **Supplemental Figure S2**), a significant decrease in sMICA levels was observed in the BKPyV controller group at M6 post-graft compared to M0 values ($p=0.0182$) while no significant changes were found in KTR with moderate or sustained virus reactivation (**Figure 4A**). Moreover, our data show that, among BKPyV controllers, the significant decrease in sMICA at M6 was restricted to recipients in the DA5.1/RWT combination ($p=0.0068$). To further investigate the relationship between sMICA and anti-MICA immunization, we first distinguished the patients with no variation or an increase of sMICA post-transplantation from those with post-graft decrease of sMICA, and then evaluated the proportion of patients with detectable anti-MICA antibodies (**Figure 4B**). Anti-MICA immunized patients were significantly predominant among the recipients with post-graft decrease of sMICA (15 out of 50; 30%) compared to recipients with increase or maintenance of sMICA (3 out of 32; 9.4%) ($p=0.0314$), emphasizing a possible duality between anti-MICA antibodies and circulating sMICA that may contribute to BKPyV reactivation control.

Discussion

Determining effective risk factors for BKPyV reactivation post-transplantation is required to achieve efficient preventive approaches aimed to avoid PVAN and graft rejection. This study establishes *MICA* gene polymorphism as an effective operational genetic factor influencing BKPyV reactivation after kidney transplantation. Our data indicate that qualitative or quantitative changes in MICA proteins, related to the common *MICA* gene variant A5.1, expressed in kidney transplant could affect the efficacy and the outcome of the anti-viral response and ultimately of the infection.

Cytotoxic NK or CD8⁺T cells have the ability to detect and destroy virally infected cells. NKG2D is a potent activating receptor expressed on NK, CD8⁺T and some subsets of CD4⁺T cells involved in controlling both the innate and the adaptive immune responses to infection, cellular stress and tumor transformation (9, 30). Both human and mouse NKG2D recognize a set of ligands (NKG2DLs), distantly related to MHC class I molecules. In humans, NKG2D transmit an activating or co-stimulatory signal through engagement of ligands that include the MHC class I related molecules MICA, MICB and the UL16-binding proteins (ULBP1–6). Viruses possess an arsenal of immune escape strategies to counteract cellular immunosurveillance and ensure their long-term persistence in infected hosts (31, 32). Although well established for herpesviruses, as exemplified with human cytomegalovirus (HCMV), only few data have been reported on immunoevasion processes mediated by polyoma viruses (BK and JC polyoma viruses). Recently, Mandelboim and colleagues identified miR-J1-3p as a functional inhibitor, common to BKPyV and JCPyV, downregulating the NKG2DL ULBP3 (33). These data suggest that BKPyV may also encode immunoevasins in addition to miRs to control NKG2DLs in infected cells.

Therefore, our first question was to investigate the distribution of MICA proteins in kidney and our findings revealed a strong expression for MICA in kidney with a predominance of MICA in epithelial tubular cells, the natural cell target for BKPyV ((34-36). These data support the idea that changes in MICA structure in tubule epithelial cells may affect NKG2D-mediated immune host responses as well as anti-graft immunity. We found that MICA also polarizes at the apical side of tubule epithelium. Interestingly, MICA is also basally expressed on gut epithelium with a polarized expression (17) that may play a role in celiac disease (37). Thus renal tubule and gut epithelia share both basal and polarized expression of MICA protein. Whether MICA polarization in renal tubular epithelial cells may change according to MICA genetic variants such as MICA A5.1 mutation and be involved in pathologies still remains to be explored.

An important finding of this study established a higher prevalence of donors carrying at least one *MICA A5.1* allele in transplanted patients with no BKPyV reactivation as compared to recipients with BKPyV viremia ($p= 0.0148$) supporting the idea that *MICA A5.1* could be a protective allele toward BKPyV infection. Further, these data suggest that this protection could be provided by intragraft expression of this mutated form of MICA. Consistent with this hypothesis, genotyping donor/recipients pairs identified *MICA A5.1* mismatch as a critical factor for BKPyV reactivation. Our results show that recipients carrying a *MICA WT* genotype transplanted with a kidney from a donor carrying the *A5.1 MICA* variant have a lower risk to reactivate BKPyV and to develop a PVAN. Unlike, combinations carrying a MICA WT donor (DWT/RA5.1 and DWT/RWT) correspond with a high risk group for BKPyV viremia and PVAN.

Our data support a role for MICA D/R matching in the pathogenesis of BKPyV. Only limited and still conflicting data are available on the role of HLA matching in the

pathogenesis of BKPyV in transplanted patients. Some studies reported on HLA-B and HLA-DR correlated with BK viremia (38) but others showed no association (39) or even a protective effect of HLA mismatch (40). Similarly the implication of individual HLA antigens in the course of BKPyV infection remains preliminary (41).

Confirming our previous study (19) in this cohort we observed that kidney transplantation with a mismatch DA5.1/RWT correlates with increased anti-MICA immunization of recipients. This suggests that in the particular context of BKPyV infection postgraft, anti-MICA antibodies could be rather protective than deleterious. In contrast, sustained reactivation correlates with higher prevalence of anti-HLA antibodies. It could be argued that HLA sensitization may promote humoral rejection and the subsequent implementation of immunosuppression creating conditions for BKPyV replication (42). In contrast to anti-HLA, monitoring of anti-MICA response is not routinely performed in most centers. Thus, except in few conditions, early and transient MICA sensitization, as observed in our cohort, should not induce changes in immunosuppressive regimen favoring virus replication.

Questioning the mode of action of anti-MICA antibodies in the particular context of BKPyV reactivation post-transplantation, we speculate that anti-MICA antibodies may play a role as neutralizing antibodies. Although the efficacy of anti-BKPyV neutralizing antibodies is still debating (43), recent data indicated that KTRs who lack antibodies neutralizing one or more BKPyV serotypes are at risk of *de novo* infection after the implementation of immunosuppressive regimen to prevent graft rejection (44). Antibodies can neutralize viral infectivity through various mechanisms, a classic mechanism is antibody binding to virion surface epitopes that inhibit attachment of the virus to cell surface receptor (34). Our findings raise the interesting question of whether anti-MICA

antibodies directed against donor MICA molecules expressed on tubule epithelial cells could be protective by eliminating infected cells via a process such as antibody-dependant cell cytotoxicity (ADCC). The early and transient presence of these antibodies in KTRs (**Figure 3D**) may ensure a timely control of infection by preventing further BKV replication. Interestingly, SV40 VP1 interacts with MHC class I and O-linked glycans and blocking MHC class I antibodies prevent infection (45). Although no link between BKPyV infectivity and MHC has been yet reported we cannot exclude that a similar mechanism takes place in which MICA could be involved. In that case, we speculate that structure of MICA A5.1 mutated proteins may affect infection. This hypothesis remains to be explored.

Our results indicate that drop in sMICA could be temporally linked to the rise in anti-MICA antibodies in the low-risk group of patients. Thus, another role for anti-MICA antibodies could be to neutralize circulating sMICA. In contrast with membrane-bound, sMICA has immunosuppressive properties (28). In several tumors, sMICA is released by proteolytic shedding mediated by metalloproteinases that results in systemic down-regulation of NKG2D on NK and CD8⁺ T cells and evasion of NKG2D-mediated immune recognition. Level of sMICA has a diagnostic value in cancer (46). Like tumors, HIV-1 indirectly suppress NK cell recognition of HIV-1-infected CD4⁺ T-cells by enhancing sMICA release into the serum resulting in a profound impairment of NK cell function (13, 47). Thus reduced sMICA in patients that do not reactivate BKPyV may help to maintain a sustained NKG2D-activation required for virus control. Although our findings suggest an association between sMICA and anti-MICA antibodies, further investigations are required to clarify whether immune complexes were formed *in vivo* and cleared from the circulation.

Qualitative structural changes in MICA proteins translated from MICA A5.1 may also account for impaired virus infectivity and/or improved NKG2D-mediated immune

responses. Ashiru and colleagues showed recently that *MICA*008/A5.1*, is synthesized as a soluble protein that, after further processing, either attaches to the membrane through a GPI anchor or remains soluble in intracellular compartments to later be released by exocytosis (18). The difference in membrane attachment might be critical for intracellular trafficking and/or for immune recognition. For instance, substitution of the GPI anchor of ULBP1 with a TM domain led to a marked reduction in NK recognition (48). Nevertheless, our understanding of this effect is still limited. The GPI anchor probably explains some differences between the cell biology of *MICA*008/A5.1* and other *MICA* alleles as well as the different interactions with several viral immune evasion proteins. The antiviral NKG2D-mediated immune response is impeded by the expression of broad set of viral immunoevasins (31, 32, 49). For instance, human cytomegalovirus (HCMV) encodes glycoproteins UL16 and UL142 that selectively prevent the surface expression of MICB, UL142 interacts directly or indirectly with MICA, altering its trafficking within the cell and consequently decreasing its surface expression (23, 50). In contrast to HCMV only few data are available on immunoevasion processes mediated by polyomaviruses. Recently, Mandelboim and colleagues identified miR-J1-3p as a functional inhibitor, common to BK and JC polyoma viruses, downregulating the NKG2DL ULBP3 (33). Although yet unknown we can suspect that BKPyV encode immunoevasins and/or miRs to control other NKG2DLs in infected cells. In support with *MICA*008/A5.1* being a protective allele Cosman and colleagues showed that HCMV immunoevasin UL142 targets most MICA allelic variants with the exception of the A5.1 mutated allele *MICA*008* (51). Nevertheless, HCMV uses its viral glycoprotein US9 to specifically target MICA A5.1 proteins and thus escapes NKG2D attack (52). However, we can't exclude a mechanism exerted through BKPyV replication to silence MICA proteins expression where MICA A5.1 variants were resistant to it. Thus, elucidating features of MICA A5.1 has important implications for our understanding of the biology and disease associations of this molecule.

Although reduction in T cell-immunosuppression is effective to restore immune control of BKPyV replication, this approach must be balanced against the increased risk of kidney transplant rejection. Here, we identified *MICA A5.1* mutation as a good prognostic factor when carried by the transplant donor in particular when recipient doesn't carry the mutation. In contrast, combinations involving MICA WT donors associated with severe BKPyV infection (viruria and viremia) and PVAN. A summary of our current findings and hypotheses is provided in the **Figure 5**. Our data propose to further investigate the contribution of humoral anti-MICA response to neutralization of the immunosuppressive sMICA and also to elimination of BKPyV-infected tubule epithelial cells. To conclude, we propose *MICA A5.1* D/R matching as a critical factor to consider to avoid BKPyV reactivation. Further basic and clinical studies are needed to define whether a selective matching between transplant donor and recipient could prevent BKPyV reactivation and PVAN and to elucidate the molecular mechanisms involved.

Materials and Methods

Ethics statement

The study was performed according to the guidelines of the local ethics committee (CCPRB, CHU de Nantes, France). Consent was obtained before inclusion in this study to the collection and storage of cells, sera and DNA, (DIVAT BioCollection INSERM, French Health Minister Project N°02G55).

Subjects and Samples

To investigate the impact of *MICA A5.1* mutation on recipient BKPyV infection reactivation, a total of 144 patients who underwent kidney transplantation between 2008 and 2012 at ITUN (CHU de Nantes, France) were included in the study. Donor/recipient pairs with at least one year of BKPyV follow up were included. To allow matching analyses, only donor/recipient pairs with genomic DNA available for MICA typing were selected. Serology for anti-MICA and anti-HLA Class I and class II antibodies before and after transplantation was performed by Luminex® assays (Labscreen, One Lambda, Canoga Park, CA) at the Laboratoire HLA, EFS Pays de la Loire, Nantes, France.

BKPyV monitoring post-transplantation

During the period studied, EDTA whole blood and urine were systematically collected post-transplantation for BKPyV reactivation monitoring. If viremia was higher than 10^7 cop/ml, or in case of positive viremia, a monthly monitoring was performed until viremia clearance. DNA extraction from whole blood was performed on the MagNAPure instrument, using the MagNA Pure LC Total Nucleic Acid Isolation Kit. Urines samples were boiled, centrifuged and diluted at 1:10 with Phosphate Buffer Saline. Extracted DNA was stored at -20°C. Viral DNA detection and quantification were performed using an in-

house quantitative real-time PCR, as previously described (53). BKPyV viruria and viremia lower limits of quantification were 10000 cop/ml of urine, and 500 cop/ml of whole blood.

***MICA A5.1* genotyping**

MICA typing of transplant donors and recipients was performed as we previously described (54) (19). Briefly, *MICA* exon 5 DNA was amplified with the following primers: *MICA 5 - F* 5' - CCTTTT TTTTCAGGGAAAGTG C - 3', *MICA 5 - R* 5' - CCTTACCATCTCCAGAAACTGC-3'. PCR for *MICA* exon 5 were performed using 100ng of DNA, 12.5mM dNTPs, 1x *Taq* buffer, 2mM MgCl₂, 0.1U *Taq* DNA polymerase (Invitrogen, Carlsbad, CA) and 10pM of each oligonucleotide. PCR amplifications were carried out on PTC200 (BIO-RAD laboratories, Hercules, CA) thermocycler. PCR products were run on 1% agarose gels for control. DNA sequencing was performed (Sequencing Core Facility INSERM/SFR Santé F. Bonamy, Nantes, France) using a 48-capillary AB®3730 automatic system (Applied Biosystems, Foster City, CA) and analyzed using ChromasPro 1.5® software (Digital River GmbH, Shannon, Ireland).

Immunofluorescence

Consents were obtained for the collection and use of renal biopsies and/or kidney explants for research purposes. Sections from frozen kidney biopsies issued from 6 donors were immunostained as follows: eight-micrometer-thick sections were dried overnight at room temperature and fixed for 10 min in acetone. When applicable, tissue permeabilization was obtained by incubation in 0.5% saponin. After rehydration in PBS, tissue sections were washed with PBS and blocked with 4% donkey or goat serum diluted in PBS for 1 h. Tissue sections were then incubated with monoclonal anti-MICA/B (D-8, 10µg/ml Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, Germany) antibodies at 4°C for 2h followed by 2h-incubation with anti-mouse Alexa 488-labeled secondary antibodies and 4',

6'-diamidino-2-phenylindole for nuclear staining (DAPI, Invitrogen). Specimens were analyzed by confocal fluorescence microscopy (Nikon A1 RSi, Tokyo, Japan) and quantified using the Fiji open source software (55). Relative MICA levels at apical side were quantified from at least 10 tubules/sections and expressed as means \pm SEM after background normalization.

Flow cytometry

Primary cultures of human renal proximal tubule ECs (American Tissue Culture Collection, ATCC, LGC Standards S.a.r.l., Molsheim, France), human epithelial cells (HEK293) and CHO cell line were grown using epithelial cell growth kit (ATCC) or DMEM supplemented with 10% fetal calf serum (HEK293 and CHO). For phenotype analysis, cells (1–2 \times 10⁵ cells/sample) were harvested using trypsin/EDTA, washed twice with PBS containing 1% BSA and 0.1% NaN₃, and then incubated on ice for 30 min with a saturating concentration of anti-MICA antibodies (AMO1, BamOmab, Tübingen, Germany). After three washes, cells were incubated with a Alexa 488-labeled goat anti-mouse F(ab')₂ IgG (Jackson Lab.) at 4°C for 30 min. Cells were fixed in 1% paraformaldehyde. Negative controls were performed using an isotype-matched IgG control. Fluorescence was measured on 10000 cells/sample using LSR II® (BD Biosciences, Franklin Lakes, USA) and analyzed using FlowJo® software (Tree Star, Inc.). Results shown are representative of at least three independent experiments.

ELISA for soluble MICA

Quantification of sMICA was done using a sandwich-ELISA from Immatics (Tübingen, Germany). In brief, for detection of sMICA the anti-MICA specific monoclonal antibodies AMO1 and BAMO3 were used for capture and detection at 5 and 1 μ g/mL, respectively. Purified recombinant soluble MICA*004 was used as a standard. Assays

were processed using anti-mouse IgG2a-horseradish peroxidase (1:4,000) for revelation and developed using the TMB Peroxidase Substrate Reagent (R&D Systems). Optical density (O.D.) was measured at 450 nm. Experiments were performed on triplicate according to the manufacturer's recommendations and expressed as means±SEM.

Data analysis

Statistical analysis of the association between donors/recipients *MICA WT* or *A5.1* genotype mismatch and BKV infection or *MICA* alloimmunization was performed using Person- χ^2 or Fisher exact test. Quantitative data are expressed as means \pm SEM and were compared using nonparametric Mann Whitney test or Kruskal-Wallis test (with Dunns multiple comparison post-test) if more than two conditions. The cumulative incidence for PVAN based on *MICA* genotype D/R combination was assessed using Log-rank test. Statistical analysis was performed using GraphPad Prism software (GraphPad, San Diego, CA, USA). A value of $p < 0.05$ was considered statistically significant.

Authorship

Conceived and designed the experiments: PT, NG, PJG, ACG, CB and BC. Performed the experiments: PT, NG, PJG, SM, MLC, Analyzed the data: PT, NG, PJG, ACG, CB, BC, KR. Contributed reagents/materials/analysis tools: SM, ACG, MH, KR, CB. Wrote the paper: PT, ACG, CB, BC.

Acknowledgments

The authors thank the MicroPicell imaging core facility (Philippe Hulin and Steven Nedellec; SFR Santé F. Bonamy, University of Nantes) for confocal microscopy and data analysis. This work was realized in the context of the IHU-Cesti, LabEx IGO and LabEx Transplantex projects which received French government financial support managed by

the National Research Agency (ANR) *via* the "Investment Into The Future" programs ANR-10-IBHU-005, ANR-11-LABX-0016-01 and ANR-11-LABX-0070. The IHU-Cesti project is also supported by Nantes Metropole and the Pays de la Loire Region. This study is also supported by the "Fondation Centaure" (RTRS) which supports a French transplantation research network and by The Agence de la Biomédecine. P-J. G. was supported by a fellowship from the IHU-Cesti. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

References

1. Hirsch HH (2005) BK virus: opportunity makes a pathogen. *Clin Infect Dis* 41(3):354-360.
2. Nickleit V, et al. (1999) Polyomavirus infection of renal allograft recipients: from latent infection to manifest disease. *J Am Soc Nephrol* 10(5):1080-1089.
3. Randhawa PS, et al. (1999) Human polyoma virus-associated interstitial nephritis in the allograft kidney. *Transplantation* 67(1):103-109.
4. Grinde B, Gayorfar M, & Rinaldo CH (2007) Impact of a polyomavirus (BKV) infection on mRNA expression in human endothelial cells. *Virus Res* 123(1):86-94.
5. Petrogiannis-Haliotis T, et al. (2001) BK-related polyomavirus vasculopathy in a renal-transplant recipient. *N Engl J Med* 345(17):1250-1255.
6. Hirsch HH, et al. (2002) Prospective study of polyomavirus type BK replication and nephropathy in renal-transplant recipients. *N Engl J Med* 347(7):488-496.
7. Zou Y, Stastny P, Susal C, Dohler B, & Opelz G (2007) Antibodies against MICA antigens and kidney-transplant rejection. *N Engl J Med* 357(13):1293-1300.
8. Suarez-Alvarez B, Lopez-Vazquez A, Baltar JM, Ortega F, & Lopez-Larrea C (2009) Potential role of NKG2D and its ligands in organ transplantation: new target for immunointervention. *Am J Transplant* 9(2):251-257.
9. Ogasawara K & Lanier LL (2005) NKG2D in NK and T cell-mediated immunity. *J Clin Immunol* 25(6):534-540.
10. El-Gazzar A, Groh V, & Spies T (2013) Immunobiology and conflicting roles of the human NKG2D lymphocyte receptor and its ligands in cancer. *J Immunol* 191(4):1509-1515.
11. Cerboni C, et al. (2007) Human immunodeficiency virus 1 Nef protein downmodulates the ligands of the activating receptor NKG2D and inhibits natural killer cell-mediated cytotoxicity. *J Gen Virol* 88(Pt 1):242-250.
12. Ashiru O, et al. (2009) NKG2D ligand MICA is retained in the cis-Golgi apparatus by human cytomegalovirus protein UL142. *J Virol* 83(23):12345-12354.
13. Nolting A, et al. (2010) MHC class I chain-related protein A shedding in chronic HIV-1 infection is associated with profound NK cell dysfunction. *Virology* 406(1):12-20.
14. Trydzenskaya H, et al. (2013) The genetic predisposition of natural killer cell to BK virus-associated nephropathy in renal transplant patients. *Kidney Int*.
15. Stephens HA (2001) MICA and MICB genes: can the enigma of their polymorphism be resolved? *Trends Immunol* 22(7):378-385.
16. Zou Y, Han M, Wang Z, & Stastny P (2006) MICA allele-level typing by sequence-based typing with computerized assignment of polymorphic sites and short tandem repeats within the transmembrane region. *Hum Immunol* 67(3):145-151.
17. Suemizu H, et al. (2002) A basolateral sorting motif in the MICA cytoplasmic tail. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99(5):2971-2976.
18. Ashiru O, et al. (2013) A GPI anchor explains the unique biological features of the common NKG2D-ligand allele MICA*008. *Biochem J* 454(2):295-302.
19. Tonnerre P, et al. (2013) MICA variant promotes allosensitization after kidney transplantation. *J Am Soc Nephrol* 24(6):954-966.
20. Ashiru O, et al. (2010) Natural killer cell cytotoxicity is suppressed by exposure to the human NKG2D ligand MICA*008 that is shed by tumor cells in exosomes. *Cancer Res* 70(2):481-489.
21. Fodil N, et al. (1999) MICA haplotypic diversity. *Immunogenetics* 49(6):557-560.
22. Zhang Y, Lazaro AM, Lavingia B, & Stastny P (2001) Typing for all known MICA alleles by group-specific PCR and SSOP. *Hum Immunol* 62(6):620-631.
23. Chalupny NJ, Rein-Weston A, Dosch S, & Cosman D (2006) Down-regulation of the NKG2D ligand MICA by the human cytomegalovirus glycoprotein UL142. *Biochem Biophys Res Commun* 346(1):175-181.
24. Groh V, et al. (1996) Cell stress-regulated human major histocompatibility complex class I gene expressed in gastrointestinal epithelium. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93(22):12445-12450.

25. Schrambach S, Ardizzone M, Leymarie V, Sibilia J, & Bahram S (2007) In vivo expression pattern of MICA and MICB and its relevance to auto-immunity and cancer. *PLoS One* 2(6):e518.
26. Hankey KG, *et al.* (2002) MIC expression in renal and pancreatic allografts. *Transplantation* 73(2):304-306.
27. Babel N, Volk HD, & Reinke P (2011) BK polyomavirus infection and nephropathy: the virus-immune system interplay. *Nat Rev Nephrol* 7(7):399-406.
28. 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.
29. Jinushi M, *et al.* (2008) MHC class I chain-related protein A antibodies and shedding are associated with the progression of multiple myeloma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105(4): 1285-1290.
30. Gonzalez S, Lopez-Soto A, Suarez-Alvarez B, Lopez-Vazquez A, & Lopez-Larrea C (2008) NKG2D ligands: key targets of the immune response. *Trends Immunol* 29(8):397-403.
31. Lanier LL (2008) Evolutionary struggles between NK cells and viruses. *Nat Rev Immunol* 8(4):259-268.
32. Jonjic S, Babic M, Polic B, & Krmpotic A (2008) Immune evasion of natural killer cells by viruses. *Curr Opin Immunol* 20(1):30-38.
33. Bauman Y, *et al.* (2011) An identical miRNA of the human JC and BK polyoma viruses targets the stress-induced ligand ULBP3 to escape immune elimination. *Cell Host Microbe* 9(2):93-102.
34. Jiang M, Abend JR, Tsai B, & Imperiale MJ (2009) Early events during BK virus entry and disassembly. *J Virol* 83(3):1350-1358.
35. Dalianis T & Hirsch HH (2013) Human polyomaviruses in disease and cancer. *Virology* 437(2):63-72.
36. Low J, Humes HD, Szczypka M, & Imperiale M (2004) BKV and SV40 infection of human kidney tubular epithelial cells in vitro. *Virology* 323(2):182-188.
37. Hue S, *et al.* (2004) A direct role for NKG2D/MICA interaction in villous atrophy during celiac disease. *Immunity* 21(3):367-377.
38. Masutani K, Ninomiya T, & Randhawa P (2013) HLA-A2, HLA-B44 and HLA-DR15 are associated with lower risk of BK viremia. *Nephrol Dial Transplant* 28(12):3119-3126.
39. Ramos E, *et al.* (2002) Clinical course of polyoma virus nephropathy in 67 renal transplant patients. *J Am Soc Nephrol* 13(8):2145-2151.
40. Drachenberg CB, *et al.* (2005) Negative impact of human leukocyte antigen matching in the outcome of polyomavirus nephropathy. *Transplantation* 80(2):276-278.
41. Bohl DL, *et al.* (2005) Donor origin of BK virus in renal transplantation and role of HLA C7 in susceptibility to sustained BK viremia. *Am J Transplant* 5(9):2213-2221.
42. Hirsch HH & Randhawa P (2009) BK virus in solid organ transplant recipients. *Am J Transplant* 9 Suppl 4:S136-146.
43. Pastrana DV, *et al.* (2013) BK polyomavirus genotypes represent distinct serotypes with distinct entry tropism. *J Virol* 87(18):10105-10113.
44. Pastrana DV, *et al.* (2012) Neutralization serotyping of BK polyomavirus infection in kidney transplant recipients. *PLoS Pathog* 8(4):e1002650.
45. Tsai B, *et al.* (2003) Gangliosides are receptors for murine polyoma virus and SV40. *EMBO J* 22(17):4346-4355.
46. Holdenrieder S, *et al.* (2006) Soluble MICA in malignant diseases. *Int J Cancer* 118(3): 684-687.
47. Matusali G, *et al.* (2013) Soluble ligands for the NKG2D receptor are released during HIV-1 infection and impair NKG2D expression and cytotoxicity of NK cells. *FASEB J* 27(6): 2440-2450.
48. Martinez E, Brzostowski JA, Long EO, & Gross CC (2011) Cutting edge: NKG2D-dependent cytotoxicity is controlled by ligand distribution in the target cell membrane. *J Immunol* 186(10):5538-5542.
49. Seidel E, Glasner A, & Mandelboim O (2012) Virus-mediated inhibition of natural cytotoxicity receptor recognition. *Cell Mol Life Sci* 69(23):3911-3920.

50. Zou Y, Bresnahan W, Taylor RT, & Stastny P (2005) Effect of human cytomegalovirus on expression of MHC class I-related chains A. *J Immunol* 174(5):3098-3104.
51. Cosman D, *et al.* (2001) ULBPs, novel MHC class I-related molecules, bind to CMV glycoprotein UL16 and stimulate NK cytotoxicity through the NKG2D receptor. *Immunity* 14(2):123-133.
52. Seidel E, *et al.* (2015) Dynamic Co-evolution of Host and Pathogen: HCMV Downregulates the Prevalent Allele MICA *008 to Escape Elimination by NK Cells. *Cell Rep.*
53. Bressollette-Bodin C, *et al.* (2005) A prospective longitudinal study of BK virus infection in 104 renal transplant recipients. *Am J Transplant* 5(8):1926-1933.
54. Tonnerre P, Gerard N, Chatelais M, & Charreau B (2010) MICA gene polymorphism in kidney allografts and possible impact of functionally relevant variants. *Transplantation proceedings* 42(10):4318-4321.
55. Schindelin J, *et al.* (2012) Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nat Methods* 9(7):676-682.
56. Thomas M, *et al.* (2008) Down-regulation of NKG2D and NKp80 ligands by Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus K5 protects against NK cell cytotoxicity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105(5):1656-1661.

Figure Legends

Figure 1. MICA expression and localization in normal kidney. (A) Representative immunostaining for MICA (in green) in normal kidney showing MICA expression in a glomerule (g), renal tubules (t) and vascular endothelium (e). Nuclei were stained with DAPI (blue). **(B)** Representative MICA expression in renal proximal tubule (initial magnification: x40). Profile plot (right panel) at the indicated section (dashed line) showing accumulation for MICA at the apical (api) side of the cells; lumen (lum) is indicated. **(C)** Flow cytometry analysis comparing MICA expression on human renal proximal tubule epithelial cells (HRPTECs) and renal cell line HEK293. CHO cell line was used as a negative control. **(D)** A schematic representation of exons and protein domains for full length *MICA WT* and *MICA A5.1* genetic variant **(E)** Comparative MICA levels on cultured ECs isolated from heterozygous (WT/A5.1) and homozygous (A5.1/A5.1) donors. Immunostaining for MICA was performed after plating cells on CYTOO® starter plates and revealed using and Alexa488-labeled antibodies (green) and nuclei using DAPI (blue).

Figure 2. Incidence of *MICA A5.1* in transplant donors and recipients and donor/recipient *MICA A5.1* mismatch on BKPyV reactivation. (A) Percentages of recipients (left panel) and donors (right panel) carrying none (homozygous WT), one (heterozygous) or two (homozygous A5.1) *MICA A5.1* alleles in BKPyV controllers (-), viruric (+) and viremic (++) patients. **(B)** Distribution (n, %) of the four donor/recipient combinations within the BKPyV controllers (-), viruric (+), viremic (++) and PVAN patients are presented. **(C)** PVAN Cumulative incidence at 5 years post-transplantation according to *MICA A5.1* D/R combination.

Figure 3. Frequency, strength and time-course of anti-MICA immunization in the kidney transplant recipients. (A) Percentages of recipients with anti-MICA antibodies in BKPyV controllers (-), viruric (+) and viremic (++) patients. Presence of preformed (black) versus *de novo* post-graft induced (red) anti-MICA antibodies is indicated. (B-C) Relative titers (expressed as MFI ratios from Luminex analyses) of anti-MICA antibodies according to BKPyV infection (B) and *MICA A5.1* D/R mismatch (C). Only newly grafted recipients with *de novo* MICA-immunization were included in (C). The number of recipients in the groups is indicated in sector graphs. (D) Time-course of anti-MICA response in MICA-immunized transplant recipients of the cohort; statistical analysis is performed by comparing to M1 values

Figure 4. Plasma levels of soluble MICA in transplant recipients. (A) Plasma levels for sMICA were quantified at M0 and M6 post-transplantation using a dedicated Elisa in BKPyV controllers (-), viruric (+) and viremic (++) patients. Concentration of sMICA according to D/R mismatch are indicated. (B) Comparison of variations in sMICA plasma levels between M0 and M6 (“↗” for an increase; “↘” for a decrease) according to MICA-immunization status of the recipients (“-” for MICA non-immunized; “+” for MICA immunized).

Figure 5: Schematic representation of findings and hypothesis.

Transplant donor and recipient pairs can be divided into 4 combinations according to *MICA A5.1* genotypes: DWT/RA5.1; DWT/RWT; DA5.1/RA5.1 and DA5.1/RWT. We hypothesize that BKPyV might be committed to prevent MICA WT expression, but not the A5.1 variant, since a similar escape of MICA A5.1 from regulation by other virus was previously reported (12, 50, 56) (1). If true, that would lead to an impaired stress signal (2), as would be the

detection of donor's infected cells in DWT/RA5.1 and DWT/RWT combinations. As we previously reported (19), we found higher MICA immunization in DA5.1/RWT as the result of both an increase in MICA antigens in the graft (ie due to MICA expression induced by BKPyV reactivation) and a mismatch for MICA genotypes between donor and recipient (here DA5.1/RWT) **(3)**. We propose a positive effect of anti-MICA antibodies on NK cell-mediated immune surveillance through a direct action on targeted cells (ie ADCC) and/or, indirectly, by opsonizing shedded soluble MICA.

In this model, an optimal control of BKPyV reactivation occurs when both surface MICA expression and anti-MICA immunization are combined (DA5.1/RWT), a partial control of BKPyV reactivation when only membrane MICA expression is induced (DA5.1/RA5.1), and uncontrolled BKPyV reactivation when both membrane-MICA expression and anti-MICA antibodies are missing (DWT/RA5.1 ; DWT/RWT) **(4)**.

Table 1. Demographic and clinical characteristics of the patients.

Patient Characteristics	BKV controler group n=57	BKV viruia group n=35	BKV viremia group n=52	p-value
Donors				
Age (year), median (range)	52 (34-77)	49 (18-77)	56.5 (17-78)	0.0628 ^a
Gender, Male/Femele (% of Male)	37/20 (64.91)	20/15 (57.14)	27/25 (51.92)	0.3839 ^b
Recipients and Follow-up				
Age (year), median (range)	51 (25-74)	52 (31-79)	60 (31-81)	0.0618 ^a
Gender, Male/Femele (% of Male)	38/19 (66.66)	22/13 (62.85)	29/23 (55.76)	0.4992 ^b
Total HLA-A-B-DR mismatches, median (range)	4 (0-6)	4 (0-5)	3 (0-5)	0.1020 ^a
Postgraft follow-up time (month), median (range)	38 (12-60)	36 (12-60)	29 (12-54)	0.1922 ^a
Number of BKV reactivation tests in urine, median (range)	5 (2-10)	5 (2-13)	7 (3-15)	<0.0001 ^a
Number of BKV reactivation tests in serum, median (range)	5 (2-10)	6 (2-13)	7 (3-18)	<0.0001 ^a
Time to postgraft BKV reactivation diagnosis (month), median (range)	NA	6 (1-49)	5 (1-17)	0.857 ^c
Maximum of BKV load in urine (log copies/ml), median (range)	NA	5.2 (2.6-9.6)	9.45 (3.6-10.8)	<0.0001 ^c
Maximum of BKV load in serum (log copies/ml), median (range)	NA	NA	4.3 (2.0-7.2)	NA
BKV associated nephropathy, n (%)	None	None	14 (26.92)	NA
immunosuppressive drugs				
Induction				
ATG-Fresenius® or Thymoglobuline®, n (%)	28 (49.12)	17 (48.57)	28 (53.84)	0.8496 ^b
Basiliximab-Simulect®, n (%)	29 (50.87)	18 (51.42)	24 (46.15)	
Initial and maintenance				
Corticosteroids, n (%)	40 (70.17)	23 (65.71)	39 (75.00)	0.6399 ^b
Mycophenolate mofetil-Cellcept®	52 (91.22)	34 (97.14)	50 (96.15)	0.3869 ^b
Tacrolimus, n (%)	54 (94.73)	34 (97.14)	50 (96.15)	0.9694 ^b
Ciclosporine A or others, n (%)	2 (3.50)	1 (2.85)	2 (3.84)	
Antiviral prophylaxis				
Rovalcyte, n (%)	38 (66.66)	21 (60.00)	37 (71.15)	0.5568 ^b
Ganciclovir, n (%)	1 (1.75)	1 (2.85)	None	1.0000 ^b

^aKruskal Wallis test was used here

^bPearson X² or Fisher exact test were used here

^cMann Whitney test was used here

Figure 1

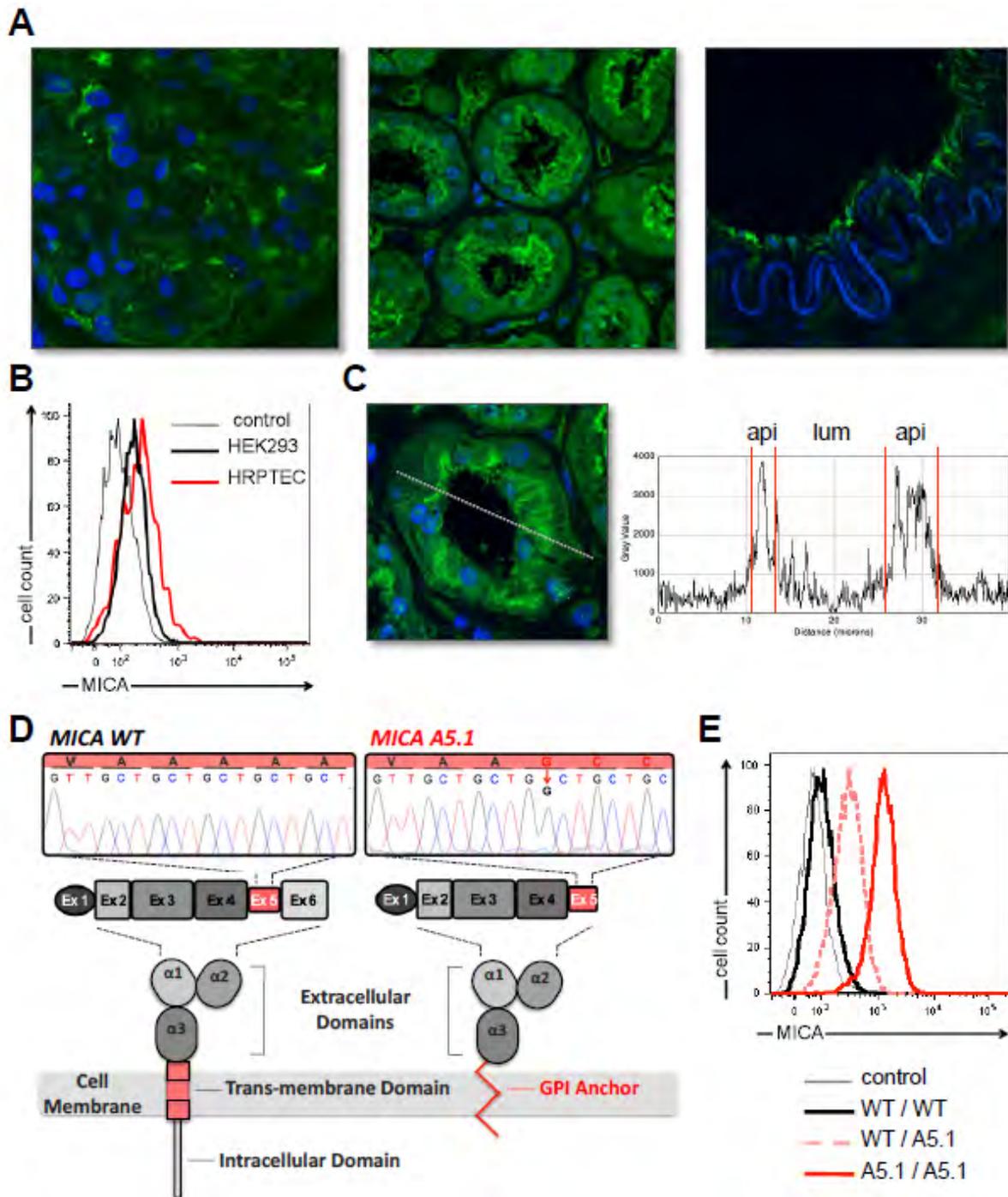


Figure 2

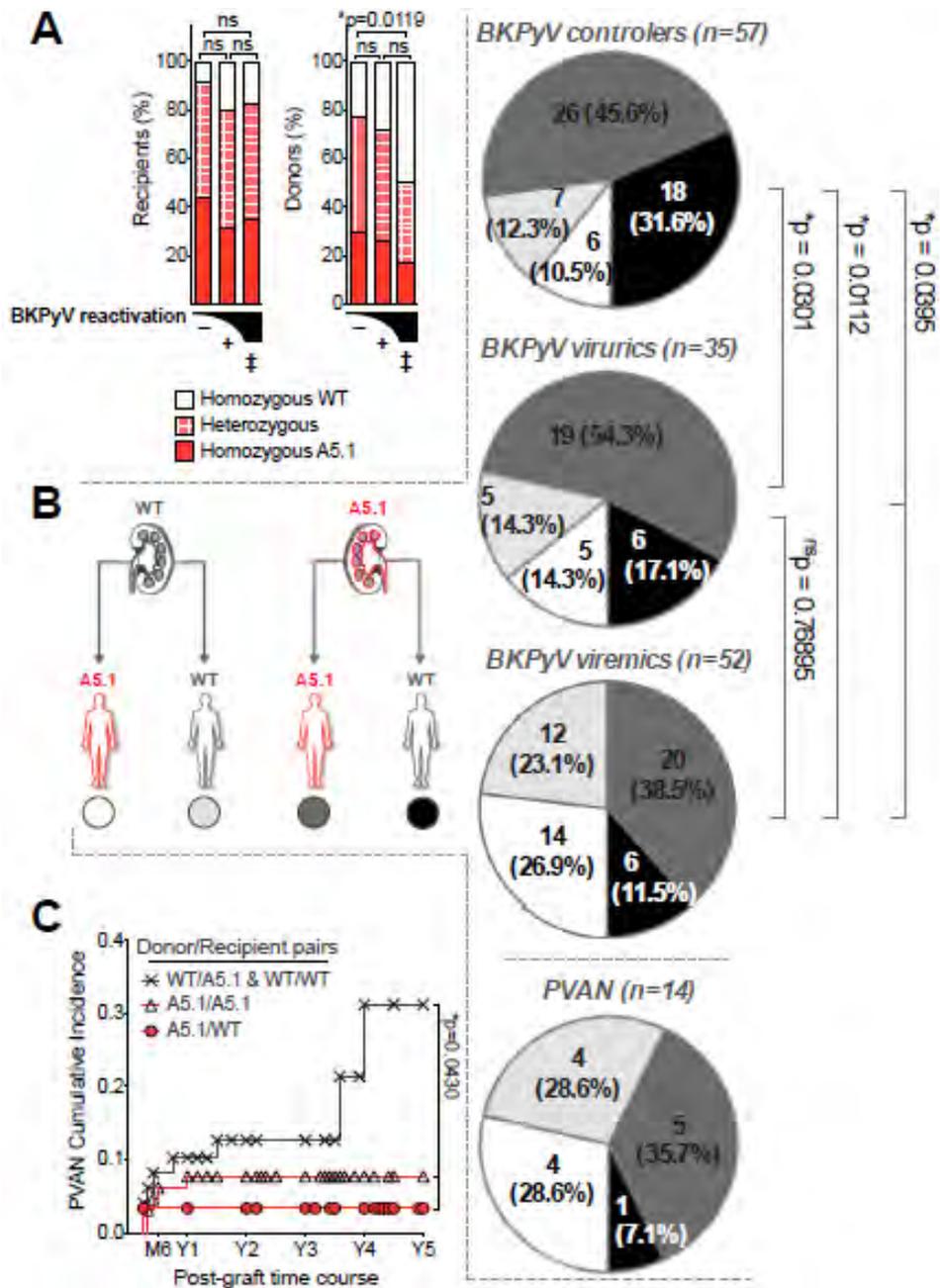


Figure 3

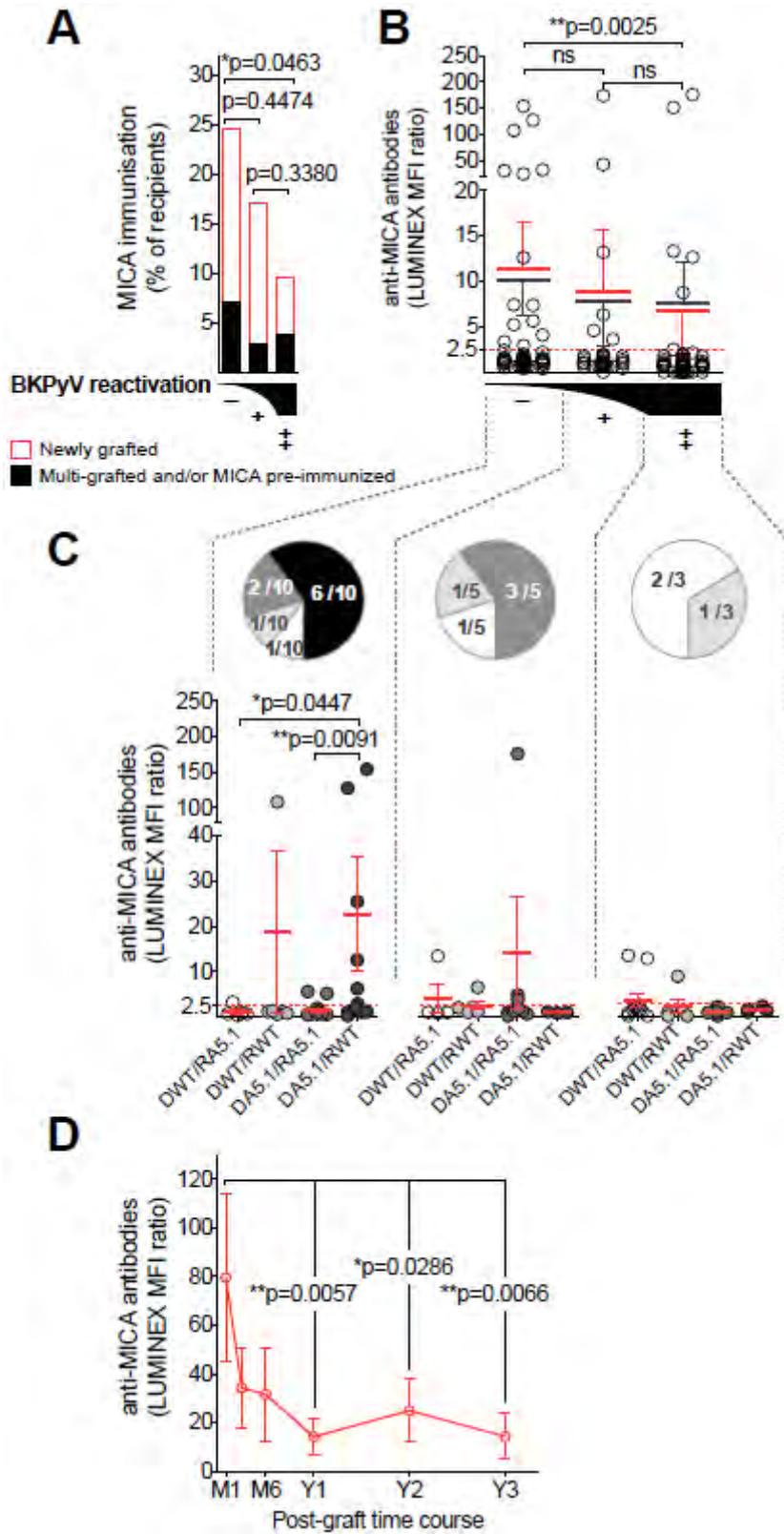


Figure 4

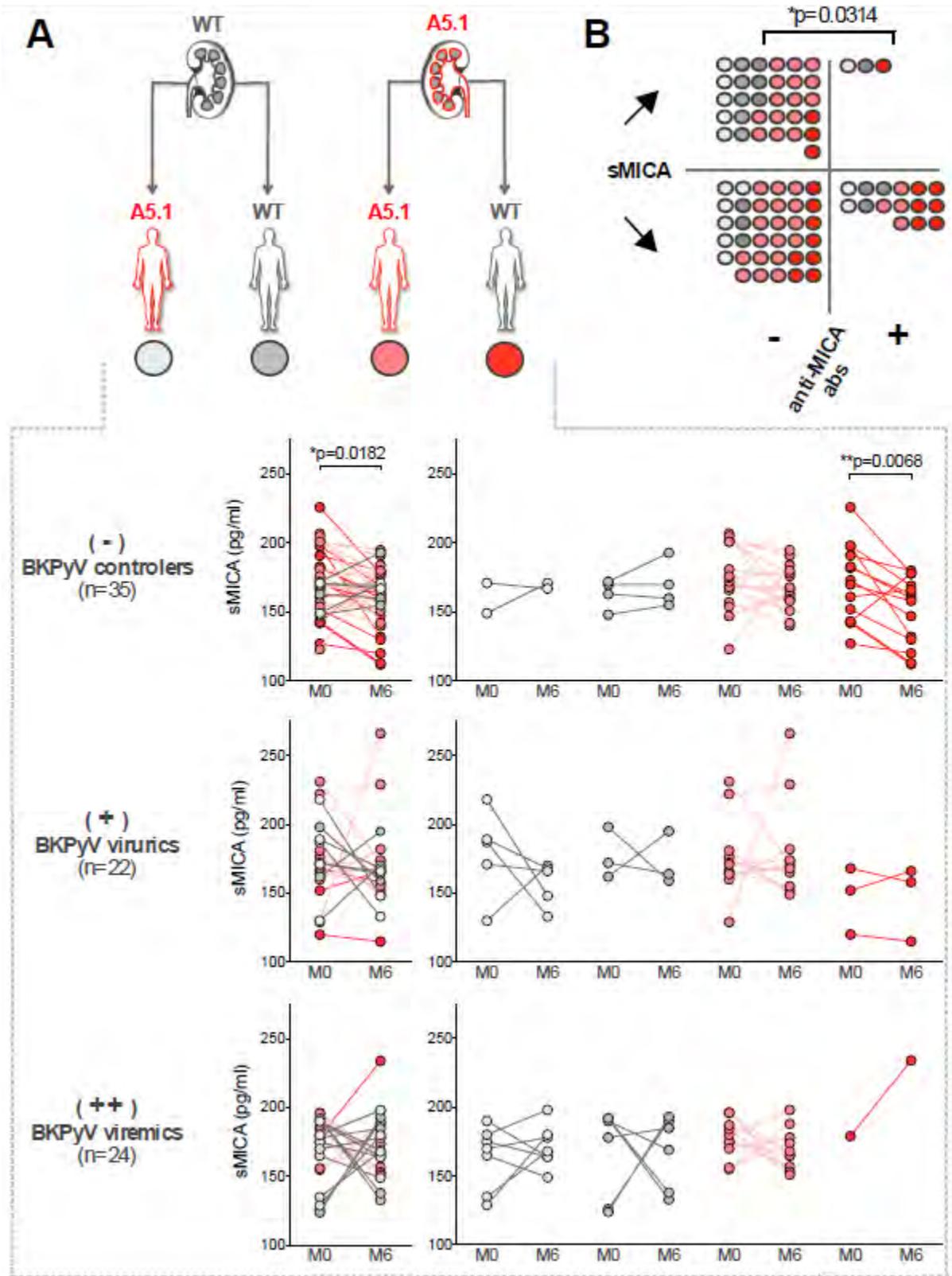
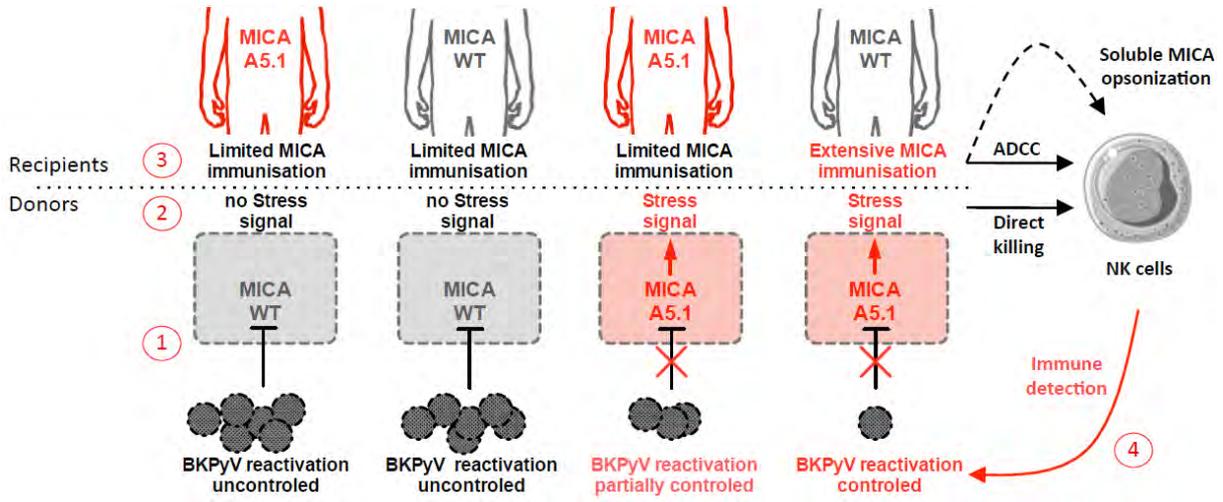


Figure 5



Supplemental Informations

Supplemental Figure S1. Anti-HLA immunization of transplant recipients.

Percentages of recipients with anti-HLA class I (**A**) and anti-HLA class II (**B**) in BKPyV controllers (-), viruric (+) and viremic (++) patients. Respective incidences for non DSA and DSA are shown.

Supplemental Figure S2. Plasma levels of soluble MICA in transplant recipients.

Baseline levels of sMICA at M0 in BKPyV controllers (-), viruric (+) and viremic (++) patients using a dedicated Elisa.

Figure S1

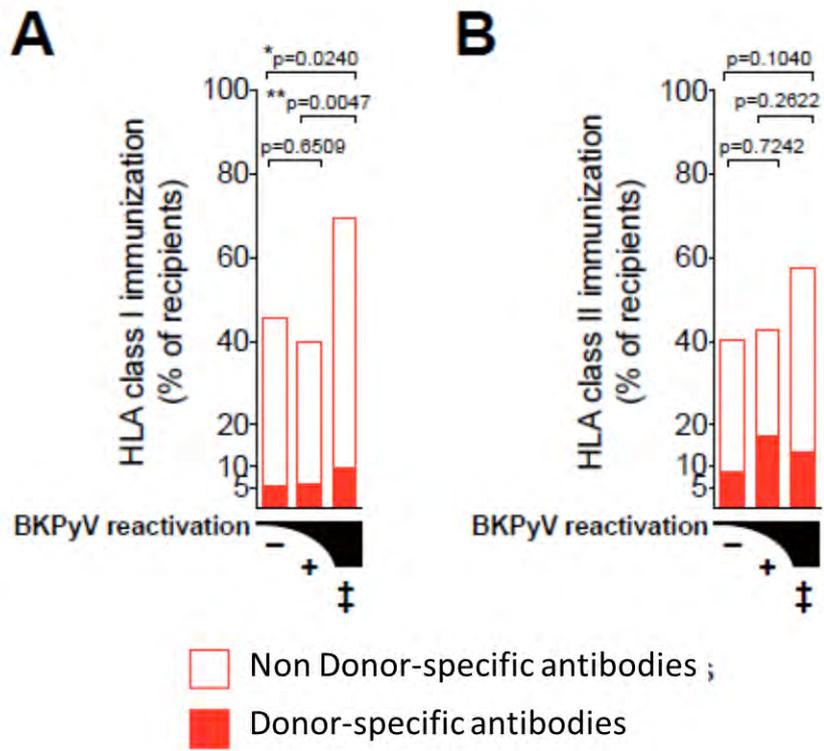
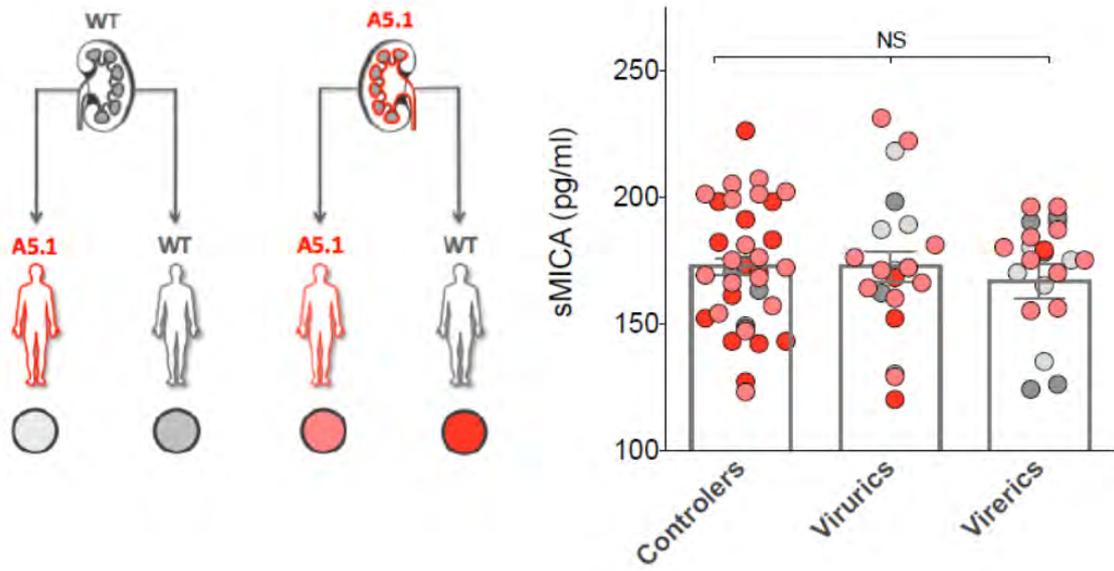
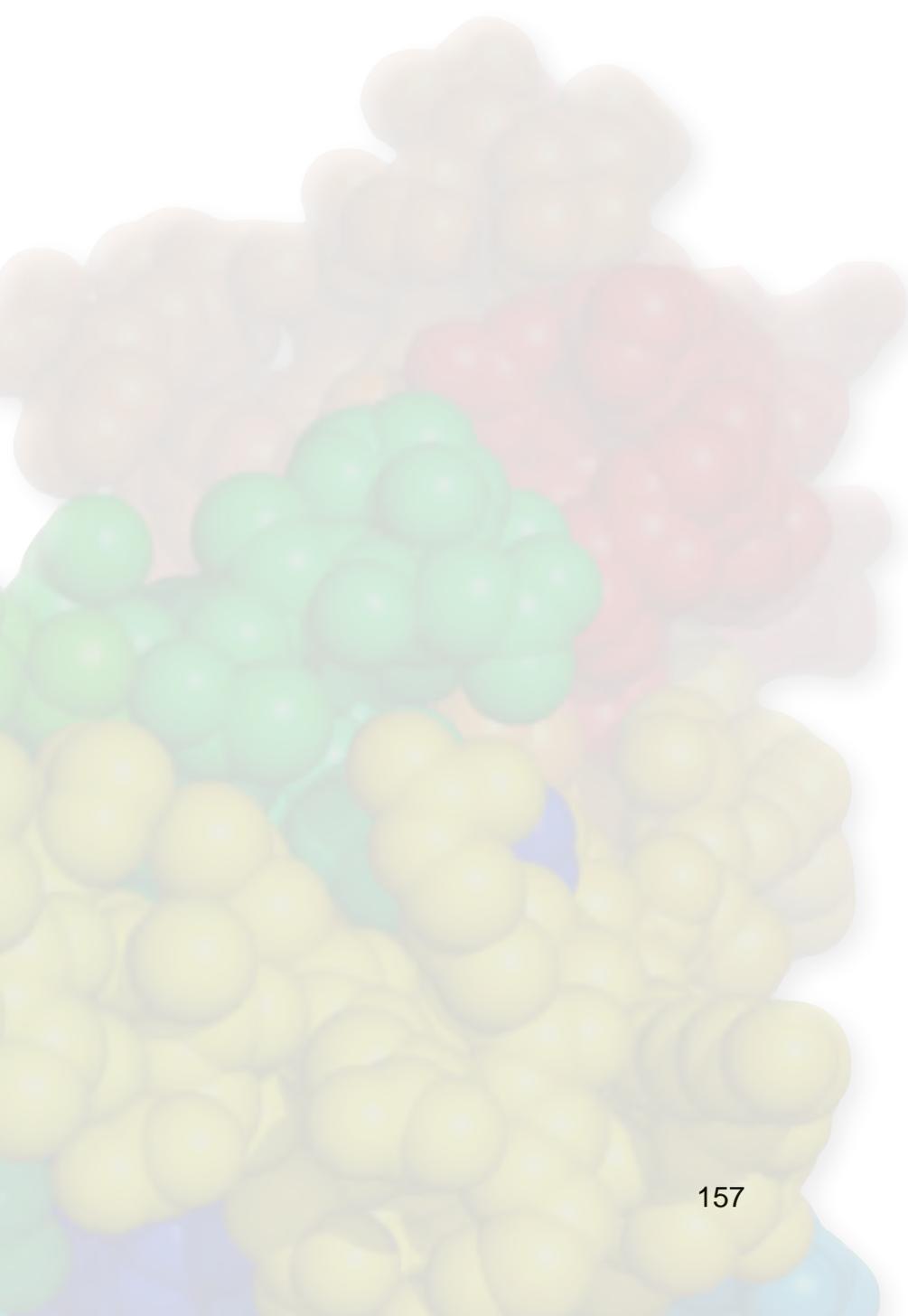


Figure S2



Discussion et Conclusion générale



Discussion

1. Mise en évidence d'un épissage alternatif du gène *MICA* associé à de nouvelles isoformes :

Les isoformes de MICA mises en évidence dans notre étude apportent de nouvelles données sur l'expression transcriptionnelle et protéique et sur les fonctions des molécules MICA dans le système immunitaire. A notre connaissance aucune autre isoforme n'a été caractérisée à ce jour à l'exception de celles rapportées par l'équipe de Stasny en 2002 (Zou et Stasny Immunogenetics 2002). Dans cette étude un transcrit alternatif de 873pb avait été identifié dans la lignée de carcinome colique HT116 et associé à deux isoformes nommées MICA1 et MICA2 qui à ce jour n'ont pas été caractérisées. Notre étude a permis d'associer cet épissage à deux allèles de MICA, MICA*015 et MICA*017. En revanche la présence de transcrits alternatifs n'a pas été trouvée dans des cellules exprimant d'autres allèles de MICA dont les plus fréquents (MICA *008, *002, 004, 009; *010). Nos travaux de séquençage identifient la délétion du premier G de l'intron 4 comme une caractéristique de des allèles MICA*015 et MICA*017 et comme la cause probable de cet épissage alternatif (*cf figure 1D, article 1, partie Résultats*). Cette délétion qui intervient dans le site donneur d'épissage de l'intron 4 semble en effet responsable de l'épissage alternatif que nous avons observé.

L'épissage alternatif permet d'augmenter considérablement la diversité des ARNm synthétisés tout en limitant la complexité du génome. Actuellement, on estime à 24000 le nombre de gènes chez l'Homme pour 100000 protéines synthétisées. De ce fait, il n'est pas surprenant de constater que plus de 90% des gènes sont sujet à un épissage alternatif chez l'Homme. L'épissage alternatif nécessite deux types de séquences: des exons dit constitutifs qui seront toujours préservés et des régions dites alternatives

épissées ou non en fonction des éléments régulateurs. Trois principaux types d'épissages alternatifs existent chez l'Homme, la délétion intégrale d'un exon (exon skipping), la conservation sélective de la région 3' d'un exon (alternative 3' SS selection) et la conservation sélective de la région 5' d'un exon (alternative 5' SS selection). Dans notre étude, l'épissage alternatif associé à la délétion du premier G de l'intron 4 que nous avons observé se traduit par la délétion totale ou partielle des exons 3 et 4 (*cf Figure 1B, article 1, partie Résultats*).

Les différentes méthodes utilisées pour générer des transcrits alternatifs vont favoriser une diversité d'isoformes ayant potentiellement des fonctions différentes. L'impact de l'épissage alternatif sur les protéines générées est varié, il peut conduire à modifier, à terme, certaines fonctions cellulaires, telles que l'apoptose, la prolifération ou l'angiogénèse mais également à modifier le comportement de certains facteurs de transcription en affectant leur affinité pour les séquences promotrices ou pour des cofacteurs. Les isoformes issues d'un épissage alternatif peuvent avoir une localisation cellulaire ou intracellulaire différente de celle de la protéine native, comme une translocation du noyau vers le cytoplasme ou de la membrane à une forme soluble. La perte de fonction est également une conséquence possible de l'épissage alternatif, générant ainsi des protéines pouvant avoir un rôle de régulateur négatif. Les enzymes sont également la cible d'un épissage alternatif avec comme conséquences une perte de l'activité enzymatique, une activité constitutive ou encore une action enzymatique vis-à-vis de nouveaux substrats (Keren et coll., Nat. Rev. Genet. 2010).

Il existe des isoformes pour de nombreuses molécules du HLA dont HLA-A, HLA-B, HLA-G et la molécule apparentée au CMH MR. Des isoformes de certains ligands du récepteur NKG2D ont aussi été décrit chez l'Homme. C'est le cas du ligand ULBP5 qui dans sa forme native possède un domaine $\alpha 1$, un domaine $\alpha 2$, un domaine

transmembranaire et intracytoplasmique (Eagle et coll., Plos One. 2009). Deux isoformes (RAET1G1 et RAET1G2) de ce ligand ont été caractérisées et sont générées par un épissage alternatif du gène codant pour ULBP5/RAET1G. L'isoforme RAET1G1 correspond à une protéine possédant un domaine intracytoplasmique long (environ 100 acides aminés), l'isoforme RAETG2 quant à elle correspond à une protéine tronquée dépourvue des domaines transmembranaire et intracytoplasmique. L'expression de RAET1G1 est restreinte à l'épithélium intestinal, similaire à l'expression de MICA dans ce tissu. L'expression de MICA est augmentée dans la maladie cœliaque, tout comme RAET1G1 ce qui pourrait suggérer un rôle pour cette isoforme dans cette pathologie. Néanmoins, l'expression de RAET1G1 à la membrane semble faible et cette forme est principalement retrouvée dans le cytoplasme. La forme RAET1G2 quant à elle est sécrétée et capable de moduler l'expression du récepteur NKG2D exprimé par les NK. Ces deux isoformes de ULBP5/RAET1G sont plus particulièrement exprimées par les cellules tumorales, suggérant leur participation à un mécanisme potentiel d'échappement tumoral puisque les isoformes RAET1G 1 et G2 sont soit peu exprimées à la surface, soit sécrétées et associées à une fonction antagoniste (Eagle et coll., Plos One. 2009).

Une observation importante de notre étude est l'absence de transcrit MICA sauvage dans les cellules homozygotes pour les allèles MICA*015 (lignée OMW) ou *017 (lignée WIN), suggérant que tous les transcrits produits par ces deux allèles subissent cet épissage « alterne ». Il semble donc que les allèles MICA*015 et *017 se caractérisent par la transcription d'un panel d'ARNm codant pour des formes tronquées, non conventionnelles, de MICA. Cette observation suggère fortement une fonction de MICA altérée ou tout du moins atypique en association avec ces deux allèles. Pour évaluer la relevance clinique de ces isoformes nous avons déterminé la fréquence des allèles MICA*015 et *017 dans notre panel de donneurs en transplantation rénale et dans une

banque d'ADN génomique issue de 100 donneurs sains. Au total, environ 250 individus ont été génotypés pour MICA. Treize individus portant l'allèle MICA*017 ont été identifiés. Aucun homozygote ou hétérozygote MICA*015/*017 n'a été identifié dans notre panel d'étude. Cependant nous avons observé une association préférentielle de l'allèle *017 avec l'allèle « null » *010 chez 5 individus sur 13 porteurs de l'allèle *017. Les causes de cette association restent inconnues.

En revanche la conséquence attendue de ce génotype est une expression exclusive des isoformes MICA chez ces individus, l'absence d'expression protéique étant une caractéristique de MICA*010 considéré comme un allèle « null » (Li et coll., Immunogenetics. 2000). Par conséquent pour poursuivre la caractérisation des isoformes et valider leur expression et fonctions in vivo, il serait important de pouvoir analyser ex vivo le phénotype et la fonction MICA/NKG2D des cellules d'individus MICA*010/*017. Cette étude nous permettrait de valider la capacité globale des isoformes à activer le récepteur NKG2D et peut être aussi à définir une hiérarchie dans les niveaux d'expression relatifs de chacune des isoformes dans les cellules et par conséquent de hiérarchiser leur importance fonctionnelle. En effet ce point n'a pas pu être abordé dans mon travail de thèse qui a été essentiellement réalisé avec des transfectants.

En préambule à cette étude complémentaire, la mise en évidence des formes endogènes des isoformes dans des cellules humaines, endothéliales par exemple, constitue un pré-requis. Le manque d'outils spécifiques, tels que des anticorps spécifiques du domaine $\alpha 1$ de MICA, n'a pas rendu possible la détection de certaines des isoformes (B1 et D) au cours de ma thèse. De plus, la distribution cellulaire et tissulaire des isoformes MICA reste aussi à établir. Au cours de notre étude nous avons montré la présence de transcrits pour ces 5 isoformes de MICA dans des cultures de cellules endothéliales mais aussi de PBMC issus de donneurs sains ainsi que dans 2 lignées

lymphoblastoïdes. Ces nouveaux transcrits de MICA semblent donc exprimés aussi bien dans des cellules hématopoïétiques que dans des cellules endothéliales.

De façon « opportuniste », l'étude de l'expression de MICA dans le rein montrée dans la seconde partie de mon manuscrit m'a cependant permis d'apporter un début de réponse aux questions de la spécificité cellulaire et de l'expression endogène des isoformes MICA. En effet, parmi les 5 biopsies rénales analysées par immunofluorescence, une biopsie était issue d'un patient MICA*010/*017. Le résultat du marquage au moyen d'un anticorps anti-MICA est montré dans figure 16 ci-dessous. Cette expérience montre clairement un marquage spécifique dans les cellules épithéliales des tubules et dans l'endothélium en faveur de l'expression endogène des isoformes codées par MICA*017. Il convient de noter que les anticorps utilisés dans cette analyse ne reconnaissent que la forme MICA-B2, les autres isoformes ayant perdues l'épitope. Ce résultat préliminaire est encourageant mais devra être confirmé.

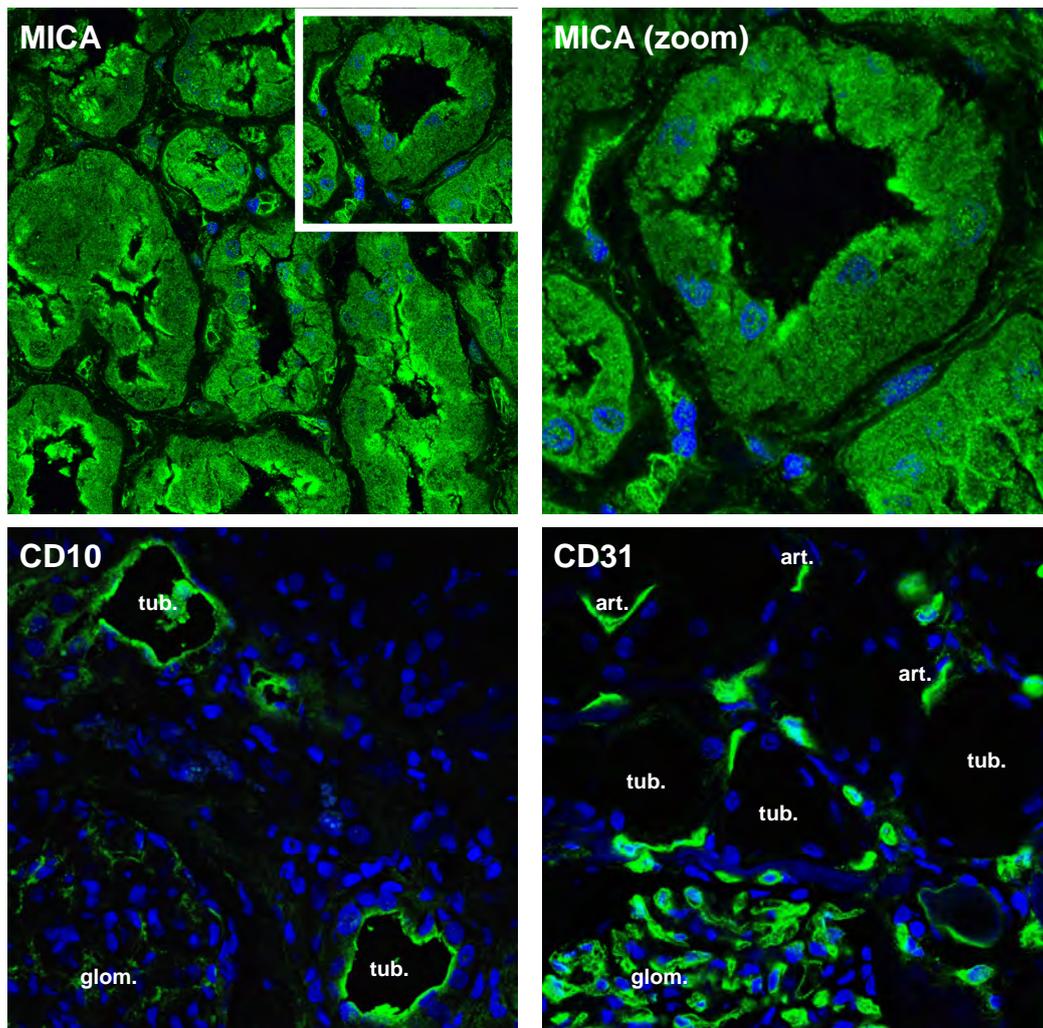


Figure 16 : **Expression des isoformes issues de MICA*017 dans le rein.** Nous observons dans le rein la présence de MICA*017 au niveau des tubules proximaux et distaux où l'expression semble polarisée au pôle apical de la cellule épithéliale. De plus, MICA est exprimé dans les cellules endothéliales des gros vaisseaux, des micro-vaisseaux et plus modestement dans les glomérules. La détection de MICA a été réalisée au moyen d'un anticorps anti-MICA D8 et ne permet la révélation que de l'isoforme MICA-B2. Les marquages anti-CD10 mettent en évidence les bordures en brosses des cellules épithéliales et les marquages anti-CD31 mettent en évidence les cellules endothéliales.

glom. : glomérule ; tub. : tubule ; art. : artère

2 .Structure des nouvelles isoformes MICA et fonctions associées :

Les isoformes de MICA, que nous avons identifiées, se distinguent de la forme MICA sauvage la déléition d'un voire de deux domaine alpha et l'insertion de nouveaux polypeptides selon les isoformes. Nos résultats montrent également que chaque isoforme membranaire possède une fonction unique et apportent de nouvelles informations sur l'interaction de MICA avec NKG2D.

Hypothèses sur l'action de MICA-B1 :

Au cours de ma thèse, peu de résultats ont été obtenus sur la fonction de cette isoforme. Ni les expériences de modulation du récepteur NKG2D ni les analyses de flux calciques n'ont permis de mettre en évidence d'effets significatifs, même si de faibles effets étaient parfois observés.

Cependant nos récentes expériences de dégranulation suggèrent que l'isoforme MICA-B1, malgré un seul domaine $\alpha 1$, conserve la capacité d'activer les NK (figure 15, partie Résultats). Ce résultat est surprenant compte tenu que le dogme actuel sur l'interaction MICA-NKG2D prévoit que les domaines $\alpha 1$ et $\alpha 2$ soient requis pour permettre l'interaction avec NKG2D conduisant à l'activation des NK (Li et coll., Nat Immunol. 2001). Ce phénomène peut s'expliquer par la présence d'un nouveau polypeptide consécutif au domaine $\alpha 1$ et remplaçant le domaine $\alpha 2$, permettant de stabiliser l'interaction entre le domaine $\alpha 1$ de MICA-B1 et NKG2D. Il est possible que des résidus apportés par le nouveau polypeptide interagissent directement avec NKG2D, comme le ferait le domaine $\alpha 2$, avec les résidus présentés par le récepteur décrits lors de l'interaction de MICA, mais potentiellement avec d'autres résidus présentés par NKG2D. Nous avons constaté que le nouveau polypeptide apportait de nombreux résidus hydrophobes, probablement exposés comme le suggère nos analyses ab initio de MICA-B1, pouvant de ce fait interagir avec les deux tyrosines Tyr152 et Tyr199 du récepteur NKG2D. De plus, c'est également l'association du domaine $\alpha 1$ et de ce polypeptide qui conduirait à l'absence de modulation de NKG2D par MICA-B1, où le polypeptide jouerait un rôle de leurre vis-à-vis du récepteur (figure 17).

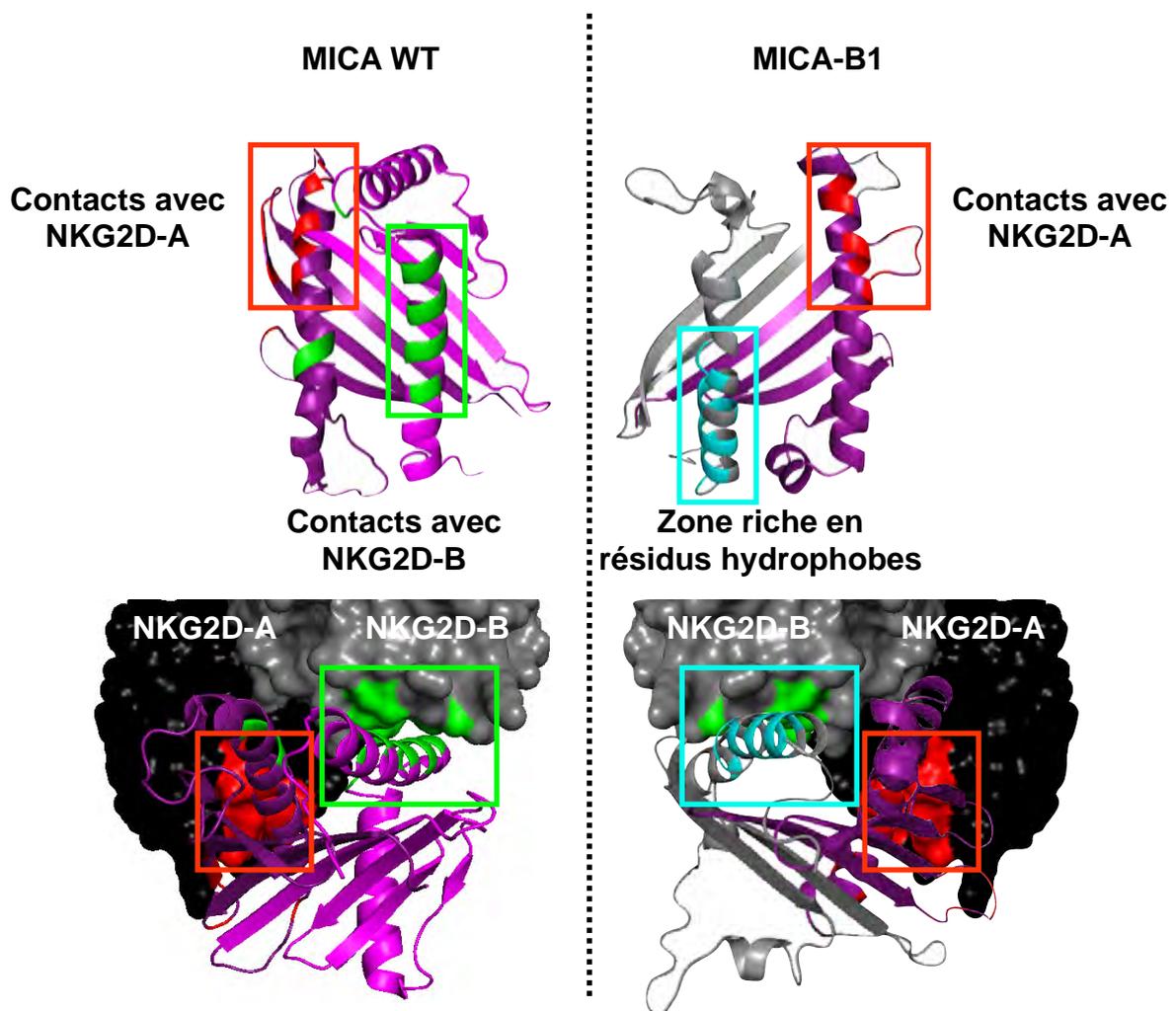


Figure 17 : **Sites d'interaction potentiels entre MICA-B1 et NKG2D.** L'interaction entre MICA et NKG2D est centrée sur deux tyrosines (rouge : tyr152 et tyr199 du monomère A ; vert : tyr152 et tyr199 du monomère B) exprimées par chaque monomère de NKG2D. Chaque couple de tyrosines va pouvoir interagir principalement avec des résidus hydrophobes présentés par les hélices alpha de MICA. D'autres résidus exprimés par NKG2D sont impliqués dans l'interaction avec MICA mais ce sont bien ces quatre tyrosines qui jouent un rôle majeur dans l'interaction. MICA-B1 a la particularité de perdre le domaine alpha 2 et gagne un nouveau polypeptide à la place. D'après des prédictions de structure (Serveur : www.robetta.org, University of Washington), le nouveau polypeptide de MICA-B1 arbore une hélice alpha similaire à celle retrouvée dans le domaine alpha 2 de MICA. De plus, de nombreux résidus hydrophobes (cyan) y sont regroupés et peuvent par conséquent être présentés aux différentes tyrosines de NKG2D.

MICA-D : un ligand antagoniste ou inhibiteur du récepteur NKG2D :

L'isoforme MICA-D, caractérisée par un unique domaine $\alpha 1$ suivi des domaines transmembranaire et intracytoplasmique. Fonctionnellement, cette isoforme n'active pas les NK, mais semble pouvoir néanmoins interagir avec NKG2D comme le montre nos mesures d'affinité. Par ailleurs, MICA-D semble avoir une fonction antagoniste pour

NKG2D contrairement à MICA et aux autres isoformes membranaires. En effet, dans un modèle de compétition où la forme native de MICA active les NK et module le récepteur NKG2D, la présence de MICA-D prévient à la fois l'activation des NK et la modulation du récepteur. Cette inhibition peut s'expliquer par une compétition entre le domaine $\alpha 1$ de MICA-D et la plateforme $\alpha 1/\alpha 2$ de MICA « sauvage ». Il semble donc que MICA-D séquestre une partie des récepteurs NKG2D exprimés par les NK, limitant *in fine* l'activation de ces cellules.

MICA-B2 : un nouveau ligand agoniste de NKG2D exempt de domaine $\alpha 3$:

L'isoforme MICA-B2 n'a perdu que le domaine $\alpha 3$ et elle se comporte comme une forme sauvage de MICA : elle active les NK et module le récepteur NKG2D. Par ailleurs, le domaine $\alpha 3$ apparaît comme un élément d'avantage structural que fonctionnel puisque son absence ne perturbe pas la fonction de MICA qui est d'interagir avec NKG2D et d'activer les NK. Cependant, ce domaine a été décrit comme étant le point d'ancrage pour la thiol isomérase Erp5 qui permet une mise en conformation de MICA optimale pour être clivée par les métalloprotéases (Huergo-Zapico et coll., Cancer Immunol. Immunother. 2012). Nos résultats obtenus avec MICA-B2 suggèrent que l'absence de ce domaine n'entraîne pas une perte de ce clivage protéolytique, suggérant que le domaine $\alpha 3$ joue un rôle protecteur vis-à-vis des métalloprotéases en masquant le site de clivage. On ne peut pas non plus exclure la possibilité de d'autres métalloprotéinases soient impliquées.

Les isoformes MICA-B1 et MICA-D pourraient elles aussi être clivées et potentiellement interagir avec NKG2D à distance sans moduler son expression et sans activer les cellules effectrices ce qui pourrait éventuellement protéger NKG2D d'une modulation par d'autres ligands solubles. Pour appuyer le fait que les isoformes peuvent subir un clivage protéolytique, toutes conservent les cystéines 306C 307C dans leur

région intra-cytoplasmique permettant leur recrutement dans les domaines DRM où se situent entre autre ADAM10 et ERp5, toutes deux impliquées dans la libération de formes solubles de MICA.

MICA-C : isoforme intracellulaire ou défaut d'ancrage à la membrane ?

L'isoforme MICA-C n'a été que très peu étudiée au cours de ma thèse du fait de son expression principalement intracellulaire suggérée par nos résultats obtenus avec des cellules transfectées observées au microscope confocal. Néanmoins, la forte expression de cette protéine par nos transfectants rendait difficile l'observation de la membrane et une forme membranaire ou soluble n'est par conséquent pas à exclure. Cette hypothèse est plausible puisque MICA semble avoir deux mécanismes d'ancrage à la membrane, le premier est le plus classique et repose sur un domaine transmembranaire caractérisés par de nombreux résidus hydrophobes et le second repose sur une ancre GPI pour des protéines dépourvues de domaine transmembranaire. Seul l'allèle MICA*008 semble posséder une ancre GPI, alors que tous les autres allèles de MICA testés n'en possèdent pas (Ashiru et coll., Biochem J. 2013). L'ancre GPI semble par ailleurs conférer à MICA*008 les caractéristiques qu'on lui prête, notamment sa libération via des exosomes alors que les autres allèles de MICA sont libérés suite à un clivage protéolytique. D'autres ligands de NKG2D comme les ULBP1/2/3/6 sont aussi exprimées à la membrane via une ancre GPI alors que les ULBP4/5 le sont via un domaine transmembranaire. Par conséquent, l'ancrage à la membrane via une ancre GPI n'est pas rare et il n'est pas exclu que l'isoforme MICA-C puisse être exprimée à la membrane via ce type d'ancrage de façon stable ou transitoire.

MICA-B2 : une structure proche des ligands ULBP4/5 mais une affinité modeste :

Les similitudes structurales entre MICA-B2 et les protéines ULBP4/5 sont grandes puisqu'elles reposent sur une unique plateforme alpha permettant l'interaction avec NKG2D, d'un domaine transmembranaire et d'un domaine intra-cytoplasmique. Cette comparaison appuie nos observations sur le fait que MICA-B2 est une isoforme fonctionnelle malgré la perte du domaine $\alpha 3$. Des homologues peuvent également être faites avec les ligands murins Rae, H60 et MULT1 caractérisés également par une unique plateforme alpha. Ces ligands possèdent néanmoins une différence par rapport à MICA-B2 puisque leur affinité pour NKG2D est plus forte. Le ligand MULT1 est par ailleurs unique puisqu'il a été décrit que sa forme soluble (sMULT1) peut activer les NK, alors que la littérature abonde de données montrant un impact négatif des formes solubles des divers ligands de NKG2D (Deng et coll., Science. 2015). L'origine de cette activation par la forme soluble de MULT1 reste inconnue, mais pourrait s'expliquer par la forte affinité de ce ligand pour NKG2D. En effet, les ligands murins de NKG2D ont une affinité de l'ordre de 10^{-7} M et MULT1 de l'ordre de 10^{-9} . Cette forte affinité pourrait aboutir à une interaction stable et durable dans le temps pouvant conduire à l'activation des NK. Ce ligand de part sa structure est très similaire à MICA-B2 à laquelle nous pourrions prêter les mêmes fonctions. Si l'affinité est à l'origine de l'activation des NK pas sMULT1, il serait intéressant d'augmenter celle de MICA-B2 pour NKG2D en modifiant quelques acides aminés composant la plateforme alpha et de tester cette forme modifiée afin de montrer si l'affinité est à l'origine de l'activation des NK. Cette manipulation est possible, une équipe a réussi à augmenter de 50 fois l'affinité de MICA pour NKG2D en ne modifiant que quelques résidus dans la séquence protéique de MICA (Henager et coll., Protein Sci., 2012).

Isoformes de MICA : un rôle régulateur ?

La présence de nombreux transcrits alternatifs de MICA pourrait avoir un impact sur la régulation des mRNA de MICA par les différents miRNA connus (Stern-Ginossar et coll., Nat Immunol. 2008). En effet, les allèles MICA*015 et MICA*017 génèrent au moins 5 transcrits alternatifs alors que l'ensemble des autres allèles de MICA n'en génèrent qu'un seul. Un facteur 5 est par conséquent appliqué et pourrait permettre à une partie des mRNA codant pour les isoformes d'échapper à la régulation par les miRNA et conduire à l'expression de protéine dans un contexte normal.

Importance relative de la N-glycosylation pour les fonctions de MICA

Nos résultats concernant l'affinité des isoformes MICA-B1, B2 et D montrent que ces protéines sont légèrement moins affines pour NKG2D que la forme sauvage MICA*002 utilisée comme contrôle positif. Cette diminution peut s'expliquer par les délétions que subissent les isoformes modifiant considérablement la structure de la protéine. Au-delà des modifications de structure, les délétions induites par l'épissage alternatif entraînent la perte d'éléments clés pour l'expression à la membrane comme les N-glycosylations. En effet, inhiber les N-glycosylations conduit à une diminution de l'expression à la membrane de MICA (Andresen et coll., J of Immunol. 2012). Les isoformes de MICA perdent entre 3 et 4 sites de N-glycosylation présents dans la forme native de MICA et sont par conséquent des protéines moins glycosylées. Néanmoins, nous n'observons pas dans nos différents tests une différence significative de l'expression des isoformes en comparaison avec la forme sauvage ce qui suggère que cette absence de glycosylation ne semble pas nuire à l'expression des isoformes MICA, tout du moins dans des transfectants. De même nous avons mis en évidence une activité pour MICA-B2

similaire ou proche de celle observée pour MICA*002, utilisée comme contrôle dans nos expériences, suggérant que le niveau de glycosylation de ces protéines n'est pas essentiel à leur fonction. Une autre étude conduite par le groupe de Skov montre que la thréonine en position 24 conditionne la glycosylation de l'asparagine en position 8. Cette thréonine fait partie des résidus polymorphes de MICA et peut être remplacée par une alanine. Les allèles MICA*015 et MICA*017 ne possèdent pas cette thréonine en position 24 et par conséquent peuvent présenter un défaut de glycosylation de l'asparagine en position 8, réduisant encore d'avantage le nombre de glycosylation sur les isoformes de MICA. L'impact réel de la glycosylation reste donc à étudier et les isoformes MICA pourraient aider à sa compréhension.

Au cours de ma thèse, nous avons aussi commencé la production d'isoformes MICA recombinantes solubles avec la collaboration de la plateforme de la SFR de Nantes. Une production dans *E. Coli* nous a permis de tester l'effet de protéines MICA*002, MICA-B2 et MICA-D non glycosylées. Ces protéines ont été utilisées seules ou en compétition avec des formes glycosylées solubles ou membranaires dans nos tests de modulation du récepteur NKG2D. Les résultats de cette étude (Gavlovsky PJ, et al, *résultats non montrés*) montrent clairement que les formes (sauvages ou isoformes) non glycosylées de MICA sont capable d'interagir avec NKG2D et d'inhiber l'effet agoniste de protéines MICA glycosylées (MICA*002 ou *004). En revanche, incubées seules avec des cellules NK NKG2D+, elles sont incapables d'induire une modulation du récepteur. Cette petite étude montre donc que la glycosylation n'est pas indispensable pour la fixation au récepteur mais par contre elle est nécessaire pour induire sa modulation. Dans le contexte de la caractérisation des isoformes cela peut indiquer que les sites de glycosylation résiduels dans les isoformes et notamment le site Asp8 qui est conservé, sont le minimum requis pour conserver un effet agoniste fonctionnel.

En perspective nous proposons donc que des isoformes non-glycosylées pourraient faire l'objet d'investigation dans le but de développer des outils visant à protéger NKG2D de formes solubles aux fonctions souvent antagonistes. Deux applications potentielles pourraient être développées, premièrement protéger le récepteur NKG2D au moyen de protéines dérivées de MICA solubles non-glycosylées dans un contexte tumoral dans lequel de forts taux de sMICA sont décrits et causent une importante modulation du récepteur et secondairement un « piège » à anticorps dans un contexte de transplantation afin de capter les anticorps anti-MICA tout en ayant un impact mineur sur NKG2D pour prévenir d'un dépôt sur les cellules endothéliales du greffon pouvant conduire à un rejet.

3. Possible relevance clinique de l'allele MICA*017 :

*Association HLAB57/MICA*017 et résistance au HIV :*

Au-delà de la caractérisation fonctionnelle des isoformes de MICA se pose la question de leur relevance clinique. A ce jour aucune description des isoformes de MICA n'a été faite dans la littérature, les allèles MICA*015 et MICA*017 sont par conséquent perçus comme des allèles conventionnels de MICA. Malgré la méconnaissance de ces deux allèles, différentes études s'intéressant au virus HIV ont montré une forte association de l'allèle MICA*017 avec une population de patients contrôlant l'infection appelée « elite controler ». C'est notamment le cas d'une étude publiée en 2014 qui montre une forte association chez les « elite controler » de HLA-B57 et MICA*017 (Le Clerc et coll., J Infect Dis. 2014). Il est néanmoins très difficile de discriminer le rôle de HLA-B57 et de MICA*017 dans les populations « elite controler » puisque ces deux gènes forment un haplotype pour lequel il a été décrit un important déséquilibre de liaison. De plus, les études menées sur HLA-B57 suggèrent qu'il pourrait présenter un ou plusieurs peptides

présentant de nombreux épitopes immuno-dominants issu(s) de la protéine virale gag au système immunitaire ou avoir une meilleure affinité pour un TCR (de Groot et coll., Proc Natl Acad Sci USA. 2010). Le débat est toujours ouvert sur le rôle que pourrait avoir HLA-B57 sur l'origine des populations « elite controler ». Ces études n'intègrent pas le fait que l'allèle MICA*017 soit associé à un profil de protéines MICA non conventionnel pouvant potentiellement affecter les réponses immunes innées et adaptatives. D'autres hypothèses ont été avancées pour expliquer l'impact de MICA*017, l'étude de Le Clerc fait l'hypothèse que MICA*017 serait résistant au clivage protéolytique due à une mutation au niveau du site de clivage avant le domaine transmembranaire conduisant à moins de formes solubles. Notre étude ne montre pas de défaut de clivage et n'est donc pas en faveur de cette hypothèse. On pourrait supposer que les formes solubles des isoformes, notamment MICA-B1 et MICA-D, pourraient ne pas moduler NKG2D, préservant ainsi les fonctions cytotoxiques des NK et les T CD8+. De plus, MICA-B1 et MICA-D pouvant jouer un rôle de leurre pour les métalloprotéases et limiter le clivage de MICA-B2, l'isoforme fonctionnelle. Cette hypothèse est séduisante sachant que les formes solubles de MICA semblent être un élément important dans les mécanismes d'échappement du HIV, aboutissant à la désensibilisation des NK et des T CD8+ (Matusali et coll., FASEB J. 2013). Cependant, l'hypothèse que les transcrits issus de MICA*017 pourrait de façon indépendante ou dépendante de HLA-B57 affecter la réponse anti-virale dans ce groupe de patients est séduisante mais reste à démontrer.

Importance des isoformes MICA en transplantation :

La relevance clinique des isoformes de MICA dans un contexte de transplantation d'organe reste à explorer. Sachant que le polymorphisme de MICA est à l'origine de l'allo-immunisation anti-MICA des patients transplantés, l'ajout d'une séquence totalement

nouvelle pourrait être une cible privilégiée pour des allo-anticorps. C'est le cas de l'isoforme MICA-B1 qui se caractérise par une séquence peptidique nouvelle dans la région extracellulaire et qui pourrait donc être fournir une protéine fortement immunogène dans le cas d'un mismatch donneur/receveur pour MICA*015 ou *017. De plus, les délétions peuvent également démasquer de nouveaux épitopes immunogènes. Un point est néanmoins important, de nombreux résidus polymorphiques se situent dans les domaines $\alpha 2$ et $\alpha 3$ de MICA, domaines en partie délétés dans les isoformes de MICA (figure 18). Ces isoformes sont donc plutôt moins immunogènes que les protéines MICA natives. L'immunogénéicité globale induite par les nouveaux polypeptides et les délétions reste à déterminer. Point important, la fréquence des allèles codant pour ces isoformes, MICA*015 ou *017, est modeste dans la population générale et par conséquent leur impact sera difficile à évaluer. Dans une étude préliminaire, pour aborder la possible reconnaissance des isoformes exprimées par l'endothélium d'un greffon nous avons réalisés *in vitro* un test de crossmatch utilisant des transfectants MICA*002 ou MICA-B2 incubés avec des sérums de patients transplantés possédant une immunisation polyréactive anti-MICA. Le résultat de ce test (Gavlovsky et al, *résultats non montrés*) montre qu'un sérum polyréactif anti-MICA est capable de se fixer sur une cellule exprimant MICA-B2 et identifie donc MICA-B2 comme une cible potentielle pour des anticorps préformés ou induits post-greffe. Ce résultat été obtenu en utilisant comme contrôle avec des cellules COS exprimant MICA*002. Les différences entre MICA*002 et MICA-B2 se portent sur un unique résidu polymorphe, le 91Q (MICA*002) et le 91R (MICA-B2). Au-delà du polymorphisme 91Q/R, nous supposons que la perte du domaine $\alpha 3$ a pu avoir une incidence sur l'immunogénéicité de MICA-B2 en modifiant la structure et démasquant de nouveaux résidus immunogènes.

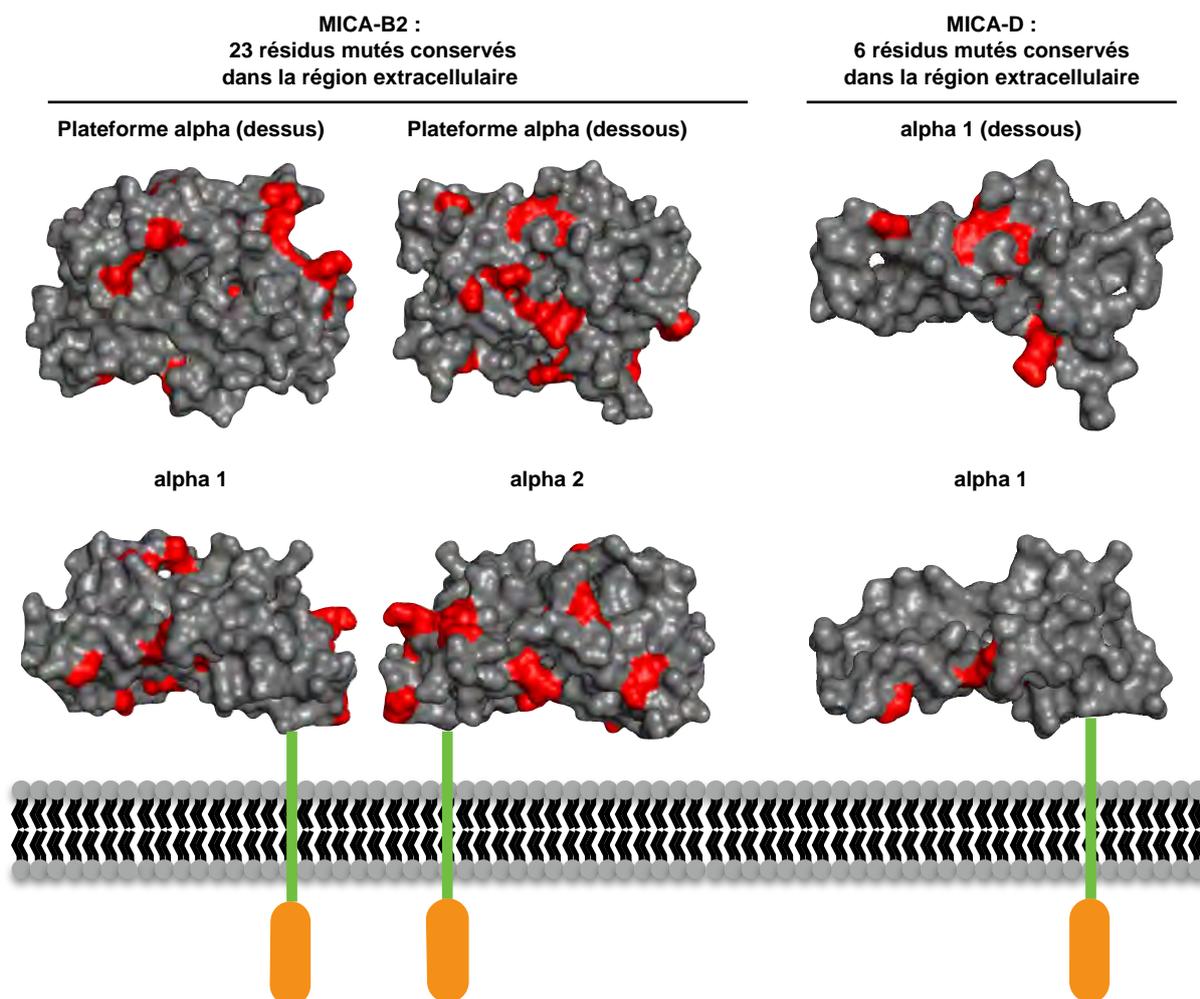


Figure 18 : **Résidus polymorphes conservés par MICA-B2 et MICA-D.** La perte du domaine alpha 3 et du domaine alpha 2 (sauf MICA-B2) a pour conséquence la diminution du nombre de résidus polymorphes présentés par les isoformes de MICA dans un contexte d'allo-transplantation. MICA WT présente 41 sites polymorphes à sa surface. Les isoformes de MICA de part les différentes délétions arborent moins de sites polymorphes (en rouge). Néanmoins, les délétions peuvent faire apparaître d'autres résidus normalement masqués. Tout cela peut avoir une répercussion sur la reconnaissance des isoformes membranaires de MICA par des allo-anticorps.

4. Isoformes de MICA : de nouveaux outils thérapeutiques ?

Le blocage du récepteur NKG2D constitue une solution thérapeutique prometteuse dans de nombreuses pathologies comme la GVHD (Karimi et coll., Blood. 2015) où NKG2D est impliqué dans la survie et la cytotoxicité des T CD8+, l'athéro sclérose (Ikeshita et coll., Exp Mol Pathol. 2014) où les T CD8+ ainsi que les NK jouent un rôle pro-inflammatoire via NKG2D en réponse à la présentation de MICA par les cellules spumeuses, mais également dans certaines maladies auto-immunes comme la

polyarthrite rhumatoïde (Fasth et coll., Eur J Immunol. 2010) caractérisée par l'apparition d'une population de T CD4+ NKG2D+ au niveau des articulations et par l'expression abondante de MICA par les synoviocytes ou la maladie coeliaque (Hüe et coll., Immunity. 2009) où NKG2D exprimé par les lymphocytes intra-épithéliaux conduit à la lyse des cellules épithéliales intestinales exprimant MICA induit par la gliadine. Toutes ces pathologies gravitent autour du système NKG2D-MICA et bloquer cet axe pourrait contribuer à l'amélioration de la maladie. Les isoformes, sous une forme soluble, pourraient être utilisées pour bloquer l'interaction de NKG2D avec ses différents ligands. Une protéine soluble composée d'un seul domaine alpha de MICA pourrait être utilisée pour saturer les récepteurs NKG2D exprimés par les NK, les CTL et certaines populations T CD4+ NKG2D+. La différence avec une protéine soluble classique de MICA, c'est que dans cette situation il y a modulation du récepteur, qui pourrait être un problème en cas d'infection ou de cancer. L'usage d'un seul domaine alpha ou de protéines non-glycosylées pourraient permettre d'éviter la modulation et préserver l'expression du récepteur tout en le bloquant. L'affinité des protéines solubles sera à prendre en compte, afin de favoriser l'interaction entre les protéines solubles modifiées et NKG2D sans figer totalement le complexe.

A l'inverse, stimuler les NK au moyen d'une protéine soluble dérivée de MICA pourrait être intéressant dans des contextes spécifiques comme la cancérologie. Comme évoqué précédemment, une forme soluble d'un ligand de NKG2D activent les NK, il s'agit de MULT1. Ce cas de figure existe chez la souris mais aucune démonstration de ce phénomène ne fut décrit chez l'Homme, malgré cela, le fait qu'un ligand soluble de NKG2D puisse activer les NK est une réalité. Tout l'enjeu sera de comprendre les mécanismes impliqués avec MULT1 et de tenter de les reproduire avec MICA ou un autre ligand de NKG2D. L'hypothèse d'une forte affinité du ligand pour le récepteur fut avancée et la forme soluble de MULT1 semble protéger les NK d'une désensibilisation par les

ligands de NKG2D. Nos travaux sur l'isoforme MICA-B1 montrent qu'il peut y avoir activation des NK sans modulation et ce grâce à un unique domaine $\alpha 1$ associé à un polypeptide remplaçant le domaine $\alpha 2$. Cela nous montre à quel point le système MICA-NKG2D peut être paradoxale, avec d'une part une rigidité dans l'interaction et d'autre part une certaine flexibilité dans l'interaction. Augmenter l'affinité de cette isoforme pour NKG2D et la produire sous forme soluble pourraient peut-être activer les NK ou co-stimuler les CTL sans affecter l'expression du récepteur NKG2D. MICA-D par sa fonction antagoniste pourrait parfaitement jouer le rôle de bouclier contre la désensibilisation de NKG2D suite à une exposition à ses différents ligands. Par ailleurs, la forme soluble de MICA est capable d'induire la libération d'IFN γ par les NK (Boukouaci et coll. Hum Immunol. 2013). La production d'IFN γ par les NK activés par l'IL12/18 fait suite à une exposition à une faible concentration de MICA soluble, notamment dans un contexte de GVHD. Dans ce contexte, la forme soluble de MICA aurait un rôle pro-inflammatoire.

Ces différents exemples montrent qu'un même ligand du récepteur activateur NKG2D peut avoir des fonctions opposées, selon le contexte dans lequel il évolue. Cela ouvre ainsi de nombreuses possibilités visant à utiliser ces ligands comme outils, en jouant sur un contexte (environnement cytokinique, concentration ...) mais également en les modifiant, notamment en jouant sur leur affinité pour NKG2D.

5. Localisation et polarisation de MICA dans le rein :

La protéine MICA a été mise en évidence pour la première fois dans l'intestin à la surface des cellules épithéliales intestinales (Groh et coll., Proc Natl. Acad. Sci. USA. 1996). MICA semble jouer un rôle particulier dans l'intestin et une série d'études montrent, en particulier, que MICA est associée à la maladie cœliaque (Martín-Pagola et coll., Immunogenetics. 2004). La gliadine induirait une augmentation de l'expression de

MICA par les cellules épithéliales intestinales qui seraient par la suite reconnues et détruites par les lymphocytes intra-épithéliaux de façon dépendante de NKG2D. La cellule épithéliale joue donc un rôle central dans la pathologie du fait de l'expression de MICA à sa surface. Le rein compte également des cellules épithéliales spécialisées tapissant les tubules proximaux et distaux.

Une étape importante de notre étude sur l'implication de MICA dans la réactivation du BK virus post-transplantation a été d'analyser l'expression de MICA dans des biopsies rénales afin d'identifier les cellules exprimant MICA. Nous montrons que l'expression de MICA est restreinte et localisée dans les cellules épithéliales des tubules proximaux et distaux et les cellules de l'endothélium micro- (CE glomérulaires et capillaires péri-tubulaires) et macrovasculaire. Bien que difficile à quantifier, il semble que l'expression soit la plus forte, en intensité, dans les cellules épithéliales que dans l'endothélium. Cette distribution cellulaire est particulièrement intéressante dans le contexte de notre étude sur les facteurs de risques liés à la réactivation du BKV chez les transplantés rénaux. En effet, les cellules épithéliales des tubules proximaux, et à un moindre degré les cellules endothéliales, sont les cibles cellulaires privilégiées de l'infection. Ces observations confèrent donc une légitimité pour étudier l'impact de MICA sur la réactivation du BKV. Ces observations faites sur les biopsies rénales issues de 5 donneurs sont importantes et constituent probablement l'analyse la plus précise de MICA dans ce tissu.

De plus, nos observations suggèrent que l'expression de MICA est polarisée dans les cellules épithéliales des tubules proximaux et distaux, avec une expression prédominante au pôle apical de la cellule. La cellule épithéliale tubulaire est une cellule polarisée ; il n'est donc pas surprenant d'observer une compartimentation de MICA à la surface de ce type de cellule, mais de façon surprenante, MICA est localisé au niveau du pôle exposé à l'urine, par conséquent à l'opposé du système immunitaire. A l'inverse, dans l'épithélium intestinal MICA est exprimé au pôle basolatéral de la cellule pour un contact

facilité avec les lymphocytes intra-épithéliaux. Un changement de polarisation a été décrit pour l'allèle MICA*008 (Suemizu et coll., Proc Natl Acad Sci USA. 2002), il semble induit par la mutation A5.1 qui modifie l'ancrage de la protéine dans la membrane est exprimé au niveau apical du à la perte de la séquence responsable de la localisation basolatérale de MICA (Ashiru et coll., Biochem. J. 2013). Dans notre étude, la polarisation apicale de MICA a été observée pour les 5 échantillons avec quelques variations qualitatives ou quantitatives. Par conséquent, pour évaluer la possibilité d'une polarisation dépendante de l'allèle MICA, nous avons déterminé le génotype MICA des 5 individus testés. A ce stade de notre étude nous n'avons pas pu faire de lien entre le génotype MICA, en particulier présence du variant MICA A5.1, et la polarisation. Ces résultats obtenus sur 5 échantillons restent préliminaires et seront à confirmer sur une série plus grande.

Divers stress comme la transformation tumorale peuvent induire une perte de polarisation et aboutir à un défaut de localisation de protéines normalement polarisées. Suite à un stress et compte tenu de la fonction de ligand du récepteur activateur NKG2D, MICA pourrait être exprimé sur l'ensemble de la cellule épithéliale permettant ainsi au système immunitaire de s'activer. Ce phénomène a été décrit dans les cellules épithéliales intestinales lors de la transition épithélio-mésenchymateuse (EMT) correspondant à un processus de transformation tumorale où les cellules épithéliales acquièrent les propriétés des cellules mésenchymales telles que la prolifération cellulaire (Lopez-Soto et coll., Oncoimmunology. 2013). Durant ce processus, les jonctions entre les cellules épithéliales se rompent et les cellules perdent leur polarisation apicale/basolatérale. Cette étude montre aussi que MICA est polarisé au niveau apical dans une situation normale et se retrouve exprimé sur l'ensemble de la cellule lors de la transformation tumorale. Ce mécanisme pourrait également s'appliquer aux cellules épithéliales tubulaires pour lesquelles nous observons une expression apicale de MICA. Lors d'une transformation tumorale ou d'une infection virale, l'expression de MICA pourrait couvrir l'ensemble de la

cellule et la rendre visible auprès du système immunitaire. Nos observations sur une culture primaire de cellules épithéliales tubulaires rénales (HRPTEC) montrent que ces cellules expriment bien MICA (**Figure 1, article 2**). Pour la poursuite de ce travail, ces cellules primaires pourront être polarisées *in vitro* afin d'étudier l'expression de MICA dans des conditions physiologiques et au cours de l'infection par le BK virus.

L'infection par le BK virus pourrait conduire à la perte de cohésion des cellules épithéliales et ainsi de permettre l'expression de MICA sur l'ensemble de la cellule. De plus, très peu de données existent sur l'impact du BK virus sur l'expression de MICA, nous aimerions analyser l'expression de MICA sur des cultures primaires de cellules épithéliales tubulaires rénales infectées ou non par le BK virus. Une étude a montré que le BK virus pouvait induire une diminution de ULBP3 via un miRNA viral conduisant à une baisse de la cytotoxicité des NK vis-à-vis des cellules infectées. Ainsi, le BK virus a développé des mécanismes d'échappement ciblant spécifiquement un ligand du récepteur NKG2D, il est possible qu'il ait développé d'autres mécanismes ciblant MICA. La mutation A5.1 apporte bien souvent une résistance vis à vis de certains virus comme le KSHV puisque ce variant de MICA échappe aux mécanismes d'échappement développés par le virus visant à augmenter sa dégradation via l'ubiquitination de sa région intra-cytoplasmique. Compte tenu de ses propriétés uniques, nous aimerions évaluer l'impact d'une infection par le BK sur le variant MICA A5.1.

Pour finir, nos observations montrant l'expression soutenue de MICA à la surface des cellules épithéliales suggèrent également que dans un contexte de transplantation rénale, ces cellules pourraient être, comme les CE, des cibles pour la fixation des anticorps anti-MICA induits par la greffe. Notre étude montre que la présence d'anticorps anti-MICA est associée à moins de réactivation du BK virus chez les transplantés. Le mode de contribution de ces anticorps à cette protection reste à démontrer.

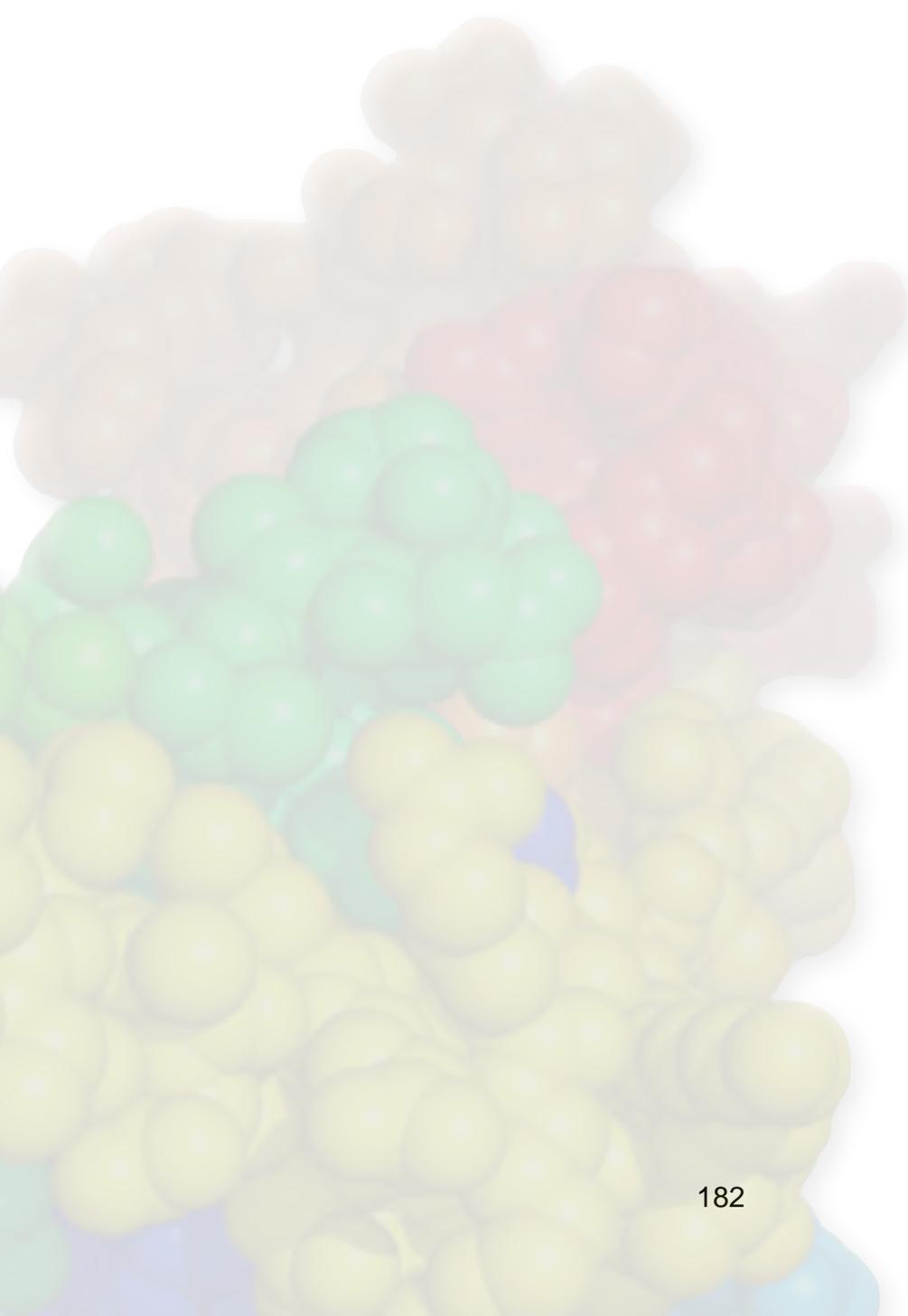
Conclusion générale

Les molécules MICA qui appartiennent au CMH de classe I « like » ou « apparenté » jouent un rôle important dans l'activation et la costimulation de cellules effectrices de l'immunité innée et adaptative, principalement par leur capacité de lier et d'activer le récepteur activateur NKG2D. Le signal induit par l'interaction MICA/NKG2D et sa dysfonction sont impliqués dans de nombreuses pathologies autoimmunes, dans le contrôle et l'échappement tumoral et le contrôle des réponses anti-virales. Le gène codant pour MICA est polymorphe et 102 allèles ont été décrits à ce jour. Ce polymorphisme génétique joue un rôle important en transplantation en favorisant l'induction d'une réponse humorale participant au rejet du greffon. Cependant la contribution des différents allèles à une diversité de protéines MICA reste mal connue au-delà du variant MICA A5.1 associé majoritairement à MICA*008, l'allèle le plus fréquent dans la plupart des populations. Notre étude montre que les allèles MICA*015 et MICA*017 codent pour un panel de 5 isoformes MICA-A, MICA-B1, MICA-B2, MICA-C et MICA-D correspondant à des protéines MICA non conventionnelles déléetées des domaines $\alpha 3$ et pour certaines $\alpha 2$. Ces protéines résultent d'un épissage alternatif issu d'une délétion du site donneur d'épissage de l'intron 4 observée spécifiquement pour ces deux allèles MICA. Nous montrons que trois isoformes (MICA-B1, MICA-B2 et MICA-D) possèdent une affinité, modeste, pour le récepteur NKG2D et constituent donc des nouveaux ligands de NKG2D. MICA-B2 est un nouveau ligand agoniste capable d'induire l'activation de NKG2D. MICA-D est capable de lier NKG2D sans induire de modulation ni d'activation du récepteur mais peut avoir un effet antagoniste/inhibiteur pour l'activation de NKG2D par un agoniste (MICA sauvage ou MICA-B2). Ces travaux apportent de nouvelles données sur la relation structure/fonction des protéines MICA et en particulier sur l'importance du domaine $\alpha 3$ et des sites de N-glycosylation pour l'interaction et l'activation de NKG2D. L'implication clinique de nos

observations reste à étudier, notamment dans le contrôle des infections virales telles que le HIV où une association pour MICA*017/HLA-B57 avec une résistance au virus a été montrée. L'importance de ces variants en transplantation dans le cas d'un mismatch entre donneur et receveur reste à déterminer mais sera probablement limitée par la fréquence faible de ces allèles. Etablir l'expression endogène de ces isoformes et définir l'expression relative de chacune des isoformes dans des cellules normales et leur fonction globale constitue une étape nécessaire pour envisager leur relevance clinique.

Ce travail a aussi permis de décrire une expression restreinte et localisée de MICA dans les cellules épithéliales des tubules proximaux et distaux et les cellules de l'endothélium micro- (CE glomérulaires et capillaires péri-tubulaires) et macrovasculaire. Ces cellules sont les cibles privilégiées du BK virus et ces données pourraient suggérer un rôle spécifique de MICA dans l'infection ou le contrôle de l'infection par ce virus qui reste à explorer. Cette étude contribue à définir MICA, et le mismatch donneur/receveur pour MICA A5.1, comme des facteurs importants pour l'immunisation anti-MICA post-greffe et le risque d'une réactivation du BK virus.

Références bibliographiques



Références bibliographiques

- Abarca-Rojano, Edgar, Saé Muñoz-Hernández, María Maximina Bertha Moreno-Altamirano, et al. 2009 Re-Organization of Mitochondria at the NK Cell Immune Synapse. *Immunology Letters* 122(1): 18–25.
- Adam, Christian, Susan King, Thomas Allgeier, et al. 2005 DC-NK Cell Cross Talk as a Novel CD4+ T-Cell-Independent Pathway for Antitumor CTL Induction. *Blood* 106(1): 338–344.
- Amroun, Habiba, Hachemi Djoudi, Marc Busson, et al. 2005 Early-Onset Ankylosing Spondylitis Is Associated with a Functional MICA Polymorphism. *Human Immunology* 66(10): 1057–1061.
- Andresen, Lars, Sarah Line Skovbakke, Gry Persson, et al. 2012 Deoxy D-Glucose Prevents Cell Surface Expression of NKG2D Ligands through Inhibition of N-Linked Glycosylation. *Journal of Immunology* (Baltimore, Md.: 1950) 188(4): 1847–1855.
- Ashiru, Omodele, Neil J. Bennett, Louise H. Boyle, et al. 2009 NKG2D Ligand MICA Is Retained in the Cis-Golgi Apparatus by Human Cytomegalovirus Protein UL142. *Journal of Virology* 83(23): 12345–12354.
- Ashiru, Omodele, Philippe Boutet, Lola Fernández-Messina, et al. 2010 Natural Killer Cell Cytotoxicity Is Suppressed by Exposure to the Human NKG2D Ligand MICA*008 That Is Shed by Tumor Cells in Exosomes. *Cancer Research* 70(2): 481–489.
- Ashiru, Omodele, Sheila López-Cobo, Lola Fernández-Messina, et al. 2013 A GPI Anchor Explains the Unique Biological Features of the Common NKG2D-Ligand Allele MICA*008. *The Biochemical Journal* 454(2): 295–302.
- Bahram, S., M. Bresnahan, D. E. Geraghty, and T. Spies. 1994 A Second Lineage of Mammalian Major Histocompatibility Complex Class I Genes. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 91(14): 6259–6263.
- Baragaño Raneros, A., V. Martín-Palanco, A. F. Fernandez, et al. 2015 Methylation of NKG2D Ligands Contributes to Immune System Evasion in Acute Myeloid Leukemia. *Genes and Immunity* 16(1): 71–82.
- Barsoum, Ivraym B., Thomas K. Hamilton, Xin Li, et al. 2011 Hypoxia Induces Escape from Innate Immunity in Cancer Cells via Increased Expression of ADAM10: Role of Nitric Oxide. *Cancer Research* 71(24): 7433–7441.
- Bauman, Yoav, Daphna Nachmani, Alon Vitenshtein, et al. 2011 An Identical miRNA of the Human JC and BK Polyoma Viruses Targets the Stress-Induced Ligand ULBP3 to Escape Immune Elimination. *Cell Host & Microbe* 9(2): 93–102.
- Beemiller, Peter, Jordan Jacobelli, and Matthew F. Krummel. 2012 Integration of the Movement of Signaling Microclusters with Cellular Motility in Immunological Synapses. *Nature Immunology* 13(8): 787–795.
- Benitez, Andrea Caballero, Zhenpeng Dai, Henning H. Mann, et al. 2011 Expression, Signaling Proficiency, and Stimulatory Function of the NKG2D Lymphocyte Receptor in Human Cancer Cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108(10): 4081–4086.
- Berzina, L., A. Shtauvere-Brameus, I. Rumba, and C. B. Sanjeevi. 2002 Microsatellite Allele A5.1 of MHC Class I Chain-Related Gene A Is Associated with Latent Autoimmune Diabetes in Adults in Latvia. *Annals of the New York Academy of Sciences* 958: 353–356.
- Billadeau, Daniel D., Jadee L. Upshaw, Renee A. Schoon, Christopher J. Dick, and Paul J. Leibson. 2003 NKG2D-DAP10 Triggers Human NK Cell-mediated Killing via a Syk-Independent Regulatory Pathway. *Nature Immunology* 4(6): 557–564.
- Boukouaci, Wahid, Marc Busson, Régis Peffault de Latour, et al. 2009 MICA-129 Genotype, Soluble MICA, and Anti-MICA Antibodies as Biomarkers of Chronic Graft-versus-Host Disease. *Blood* 114(25): 5216–5224.
- Boukouaci, Wahid, Reem Al-Daccak, Nicolas Dulphy, et al. 2013 Soluble MICA-NKG2D Interaction Upregulates IFN- γ Production by Activated CD3-CD56+ NK Cells: Potential Impact on Chronic Graft versus Host Disease. *Human Immunology* 74(12): 1536–1541.
- Bratanic, N., D. Smigoc Schweiger, A. Mendez, et al. 2010 An Influence of HLA-A, B, DR, DQ, and MICA on the Occurrence of Celiac Disease in Patients with Type 1 Diabetes. *Tissue Antigens* 76(3): 208–215.

- Braumüller, Heidi, Thomas Wieder, Ellen Brenner, et al. 2013 T-Helper-1-Cell Cytokines Drive Cancer into Senescence. *Nature* 494(7437): 361–365.
- Bryceson, Yanan T., Samuel C.C. Chiang, Stephanie Darmanin, et al. 2011 Molecular Mechanisms of Natural Killer Cell Activation. *Journal of Innate Immunity* 3(3): 216–226.
- Bryceson, Yanan T., Hans-Gustaf Ljunggren, and Eric O. Long 2009 Minimal Requirement for Induction of Natural Cytotoxicity and Intersection of Activation Signals by Inhibitory Receptors. *Blood* 114(13): 2657–2666.
- Bryceson, Yanan T., Michael E. March, Hans-Gustaf Ljunggren, and Eric O. Long 2006 Synergy among Receptors on Resting NK Cells for the Activation of Natural Cytotoxicity and Cytokine Secretion. *Blood* 107(1): 159–166.
- Caillat-Zucman, Sophie 2006 How NKG2D Ligands Trigger Autoimmunity? *Human Immunology* 67(3): 204–207.
- Carayannopoulos, Leonidas N., Olga V. Naidenko, Daved H. Fremont, and Wayne M. Yokoyama 2002 Cutting Edge: Murine UL16-Binding Protein-like Transcript 1: A Newly Described Transcript Encoding a High-Affinity Ligand for Murine NKG2D. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 169(8): 4079–4083.
- Cerboni, Cristina, Francesca Neri, Nicoletta Casartelli, et al. 2007 Human Immunodeficiency Virus 1 Nef Protein Downmodulates the Ligands of the Activating Receptor NKG2D and Inhibits Natural Killer Cell-Mediated Cytotoxicity. *The Journal of General Virology* 88(Pt 1): 242–250.
- Cerboni, Cristina, Alessandra Zingoni, Marco Cippitelli, et al. 2007 Antigen-Activated Human T Lymphocytes Express Cell-Surface NKG2D Ligands via an ATM/ATR-Dependent Mechanism and Become Susceptible to Autologous NK-Cell Lysis. *Blood* 110(2): 606–615.
- Cerwenka, A., A. B. Bakker, T. McClanahan, et al. 2000 Retinoic Acid Early Inducible Genes Define a Ligand Family for the Activating NKG2D Receptor in Mice. *Immunity* 12(6): 721–727.
- Cerwenka, A., J. L. Baron, and L. L. Lanier 2001 Ectopic Expression of Retinoic Acid Early Inducible-1 Gene (RAE-1) Permits Natural Killer Cell-Mediated Rejection of a MHC Class I-Bearing Tumor in Vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98(20): 11521–11526.
- Cerwenka, A., and L. L. Lanier 2003 NKG2D Ligands: Unconventional MHC Class I-like Molecules Exploited by Viruses and Cancer. *Tissue Antigens* 61(5): 335–343.
- Chalupny, N. Jan, Annie Rein-Weston, Stephanie Dosch, and David Cosman 2006 Down-Regulation of the NKG2D Ligand MICA by the Human Cytomegalovirus Glycoprotein UL142. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 346(1): 175–181.
- Chauveau, Anne, Anne Aucher, Philipp Eissmann, Eric Vivier, and Daniel M. Davis 2010 Membrane Nanotubes Facilitate Long-Distance Interactions between Natural Killer Cells and Target Cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107(12): 5545–5550.
- Chitadze, Guranda, Marcus Lettau, Jaydeep Bhat, et al. 2013 Shedding of Endogenous MHC Class I-Related Chain Molecules A and B from Different Human Tumor Entities: Heterogeneous Involvement of the “a Disintegrin and Metalloproteases” 10 and 17. *International Journal of Cancer. Journal International Du Cancer* 133(7): 1557–1566.
- Choi, H. B., H. Han, J. I. Youn, T. Y. Kim, and T. G. Kim 2000 MICA 5.1 Allele Is a Susceptibility Marker for Psoriasis in the Korean Population. *Tissue Antigens* 56(6): 548–550.
- Clayton, Aled, J. Paul Mitchell, Jacquelyn Court, et al. 2008 Human Tumor-Derived Exosomes down-Modulate NKG2D Expression. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 180(11): 7249–7258.
- Clayton, Aled, and Zsuzsanna Tabi 2005 Exosomes and the MICA-NKG2D System in Cancer. *Blood Cells, Molecules & Diseases* 34(3): 206–213.
- Le Clerc, Sigrid, Olivier Delaneau, Cédric Coulonges, et al. 2014 Evidence after Imputation for a Role of MICA Variants in Nonprogression and Elite Control of HIV Type 1 Infection. *The Journal of Infectious Diseases* 210(12): 1946–1950.
- Colucci, F., E. Rosmaraki, S. Bregenholt, et al. 2001 Functional Dichotomy in Natural Killer Cell Signaling: Vav1-Dependent and -Independent Mechanisms. *The Journal of Experimental Medicine* 193(12): 1413–1424.
- Cox, Steven T., Henry A. F. Stephens, Raymond Fernando, et al. 2011 Major Histocompatibility Complex Class I-Related Chain A Allele Mismatching, Antibodies, and Rejection in Renal Transplantation. *Human Immunology* 72(10): 827–834.

- Das, H., V. Groh, C. Kuijl, et al. 2001MICA Engagement by Human Vgamma2Vdelta2 T Cells Enhances Their Antigen-Dependent Effector Function. *Immunity* 15(1): 83–93.
- Deng, Weiwen, Benjamin G. Gowen, Li Zhang, et al. 2015Antitumor Immunity. A Shed NKG2D Ligand That Promotes Natural Killer Cell Activation and Tumor Rejection. *Science (New York, N.Y.)* 348(6230): 136–139.
- Diefenbach, A., A. M. Jamieson, S. D. Liu, N. Shastri, and D. H. Raulet 2000Ligands for the Murine NKG2D Receptor: Expression by Tumor Cells and Activation of NK Cells and Macrophages. *Nature Immunology* 1(2): 119–126.
- Diefenbach, A, E R Jensen, A M Jamieson, and D H Raulet 2001Rae1 and H60 Ligands of the NKG2D Receptor Stimulate Tumour Immunity. *Nature* 413(6852): 165–171.
- Diefenbach, A., and D. H. Raulet 1999Natural Killer Cells: Stress Out, Turn On, Tune in. *Current Biology: CB* 9(22): R851–853.
- Douik, Hayet, Arij Ben Chaaben, Neila Attia Romdhane, et al. 2009Association of MICA-129 Polymorphism with Nasopharyngeal Cancer Risk in a Tunisian Population. *Human Immunology* 70(1): 45–48.
- Eagle, Robert A., Gillian Flack, Anthony Warford, et al. 2009Cellular Expression, Trafficking, and Function of Two Isoforms of Human ULBP5/RAET1G. *PLoS ONE* 4(2). <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2637608/>, accessed July 3, 2015.
- Eagle, Robert A., James A. Traherne, James R. Hair, Insiya Jafferji, and John Trowsdale 2009ULBP6/RAET1L Is an Additional Human NKG2D Ligand. *European Journal of Immunology* 39(11): 3207–3216.
- Eisele, Günter, Jörg Wischhusen, Michel Mittelbronn, et al. 2006TGF-Beta and Metalloproteinases Differentially Suppress NKG2D Ligand Surface Expression on Malignant Glioma Cells. *Brain: A Journal of Neurology* 129(Pt 9): 2416–2425.
- Eissmann, Philipp, J. Henry Evans, Maryam Mehrabi, et al. 2010Multiple Mechanisms Downstream of TLR-4 Stimulation Allow Expression of NKG2D Ligands to Facilitate macrophage/NK Cell Crosstalk. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 184(12): 6901–6909.
- Fernández-Messina, Lola, Omodele Ashiru, Sonia Agüera-González, Hugh T. Reyburn, and Mar Valés-Gómez 2011The Human NKG2D Ligand ULBP2 Can Be Expressed at the Cell Surface with or without a GPI Anchor and Both Forms Can Activate NK Cells. *Journal of Cell Science* 124(Pt 3): 321–327.
- Fodil, N., L. Laloux, V. Wanner, et al. 1996Allelic Repertoire of the Human MHC Class I MICA Gene. *Immunogenetics* 44(5): 351–357.
- Gao, Xiaojiang, Richard M. Single, Peter Karacki, et al. 2006Diversity of MICA and Linkage Disequilibrium with HLA-B in Two North American Populations. *Human Immunology* 67(3): 152–158.
- Gasser, Stephan, Sandra Orsulic, Eric J. Brown, and David H. Raulet 2005The DNA Damage Pathway Regulates Innate Immune System Ligands of the NKG2D Receptor. *Nature* 436(7054): 1186–1190.
- Gilfillan, Susan, Emily L. Ho, Marina Cella, Wayne M. Yokoyama, and Marco Colonna 2002aNKG2D Recruits Two Distinct Adapters to Trigger NK Cell Activation and Costimulation. *Nature Immunology* 3(12): 1150–1155.
2002bNKG2D Recruits Two Distinct Adapters to Trigger NK Cell Activation and Costimulation. *Nature Immunology* 3(12): 1150–1155.
- Grimaldi, M. C., J. Clayton, P. Pontarotti, A. Cambon-Thomsen, and B. Crouau-Roy 1996New Highly Polymorphic Microsatellite Marker in Linkage Disequilibrium with HLA-B. *Human Immunology* 51(2): 89–94.
- Groh, V., S. Bahram, S. Bauer, et al. 1996Cell Stress-Regulated Human Major Histocompatibility Complex Class I Gene Expressed in Gastrointestinal Epithelium. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93(22): 12445–12450.
- Groh, Veronika, Anja Bruhl, Hani El-Gabalawy, J. Lee Nelson, and Thomas Spies 2003Stimulation of T Cell Autoreactivity by Anomalous Expression of NKG2D and Its MIC Ligands in Rheumatoid Arthritis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100(16): 9452–9457.
- Groh, Veronika, Jennifer Wu, Cassian Yee, and Thomas Spies 2002Tumour-Derived Soluble MIC Ligands Impair Expression of NKG2D and T-Cell Activation. *Nature* 419(6908): 734–738.

- Groh, V., R. Rhinehart, J. Randolph-Habecker, et al. 2001 Costimulation of CD8 α T Cells by NKG2D via Engagement by MIC Induced on Virus-Infected Cells. *Nature Immunology* 2(3): 255–260.
- Groh, V., R. Rhinehart, H. Secrist, et al. 1999 Broad Tumor-Associated Expression and Recognition by Tumor-Derived Gamma Delta T Cells of MICA and MICB. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96(12): 6879–6884.
- de Groot, Natasja G., Corrine M. C. Heijmans, Yvonne M. Zoet, et al. 2010 AIDS-Protective HLA-B*27/B*57 and Chimpanzee MHC Class I Molecules Target Analogous Conserved Areas of HIV-1/SIVcpz. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107(34): 15175–15180.
- Guerra, Nadia, Ying Xim Tan, Nathalie T. Joncker, et al. 2008 NKG2D-Deficient Mice Are Defective in Tumor Surveillance in Models of Spontaneous Malignancy. *Immunity* 28(4): 571–580.
- Gumireddy, Kiranmai, Fangxian Sun, Andres J. Klein-Szanto, et al. 2007 In Vivo Selection for Metastasis Promoting Genes in the Mouse. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104(16): 6696–6701.
- Henager, Samuel H., Melissa A. Hale, Nicholas J. Maurice, et al. 2012 Combining Different Design Strategies for Rational Affinity Maturation of the MICA-NKG2D Interface. *Protein Science: A Publication of the Protein Society* 21(9): 1396–1402.
- Huang, Y., Y. J. Lee, M. R. Chen, et al. 2000 Polymorphism of Transmembrane Region of MICA Gene and Kawasaki Disease. *Experimental and Clinical Immunogenetics* 17(3): 130–137.
- Huergo-Zapico, Leticia, Ana P Gonzalez-Rodriguez, Juan Contesti, et al. 2012 Expression of ERp5 and GRP78 on the Membrane of Chronic Lymphocytic Leukemia Cells: Association with Soluble MICA Shedding. *Cancer Immunology, Immunotherapy: CII* 61(8): 1201–1210.
- Hüe, Sophie, Jean-Jacques Mention, Renato C. Monteiro, et al. 2004 A Direct Role for NKG2D/MICA Interaction in Villous Atrophy during Celiac Disease. *Immunity* 21(3): 367–377.
- Hüe, Sophie, Renato C. Monteiro, Sonia Berrh-Aknin, and Sophie Caillat-Zucman 2003 Potential Role of NKG2D/MHC Class I-Related Chain A Interaction in Intrathymic Maturation of Single-Positive CD8 T Cells. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 171(4): 1909–1917.
- Ikeshita, Shunji, Yukiko Miyatake, Noriyuki Otsuka, and Masanori Kasahara 2014 MICA/B Expression in Macrophage Foam Cells Infiltrating Atherosclerotic Plaques. *Experimental and Molecular Pathology* 97(1): 171–175.
- Jamieson, Amanda M., Andreas Diefenbach, Christopher W. McMahon, et al. 2002 The Role of the NKG2D Immunoreceptor in Immune Cell Activation and Natural Killing. *Immunity* 17(1): 19–29.
- Jinushi, Masahisa, Tetsuo Takehara, Tatsuya Kanto, et al. 2003 Critical Role of MHC Class I-Related Chain A and B Expression on IFN- α -Stimulated Dendritic Cells in NK Cell Activation: Impairment in Chronic Hepatitis C Virus Infection. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 170(3): 1249–1256.
- Jinushi, Masahisa, Matthew Vanneman, Nikhil C. Munshi, et al. 2008 MHC Class I Chain-Related Protein A Antibodies and Shedding Are Associated with the Progression of Multiple Myeloma. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105(4): 1285–1290.
- Kaiser, Brett K., Daesong Yim, I.-Ting Chow, et al. 2007 Disulphide-Isomerase-Enabled Shedding of Tumour-Associated NKG2D Ligands. *Nature* 447(7143): 482–486.
- Karimi, Mobin A., Jerrod L. Bryson, Lee P. Richman, et al. 2015 NKG2D Expression by CD8+ T Cells Contributes to GVHD and GVT Effects in a Murine Model of Allogeneic HSCT. *Blood* 125(23): 3655–3663.
- Karimi, Mobin, Thai M. Cao, Jeanette A. Baker, et al. 2005 Silencing Human NKG2D, DAP10, and DAP12 Reduces Cytotoxicity of Activated CD8+ T Cells and NK Cells. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 175(12): 7819–7828.
- Katsuyama, Y., M. Ota, H. Ando, et al. 1999 Sequencing Based Typing for Genetic Polymorphisms in Exons, 2, 3 and 4 of the MICA Gene. *Tissue Antigens* 54(2): 178–184.
- Kawabata, Y., H. Ikegami, Y. Kawaguchi, et al. 2000 Age-Related Association of MHC Class I Chain-Related Gene A (MICA) with Type 1 (insulin-Dependent) Diabetes Mellitus. *Human Immunology* 61(6): 624–629.

- Keren, Hadas, Galit Lev-Maor, and Gil Ast 2010Alternative Splicing and Evolution: Diversification, Exon Definition and Function. *Nature Reviews. Genetics* 11(5): 345–355.
- Kloss, Mercedes, Patrice Decker, Katrin M. Baltz, et al. 2008Interaction of Monocytes with NK Cells upon Toll-like Receptor-Induced Expression of the NKG2D Ligand MICA. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 181(10): 6711–6719.
- Kohga, Keisuke, Tomohide Tatsumi, Hinako Tsunematsu, et al. 2012Interleukin-1 β Enhances the Production of Soluble MICA in Human Hepatocellular Carcinoma. *Cancer Immunology, Immunotherapy: CII* 61(9): 1425–1432.
- Kong, Yan, Wei Cao, Xueyan Xi, et al. 2009The NKG2D Ligand ULBP4 Binds to TCR γ 9/delta2 and Induces Cytotoxicity to Tumor Cells through Both TCR γ delta and NKG2D. *Blood* 114(2): 310–317.
- Koning, Frits, Luud Gilissen, and Cisca Wijmenga 2005Gluten: A Two-Edged Sword. *Immunopathogenesis of Celiac Disease. Springer Seminars in Immunopathology* 27(2): 217–232.
- Lee, Y. J., F. Y. Huang, C. H. Wang, et al. 2000Polymorphism in the Transmembrane Region of the MICA Gene and Type 1 Diabetes. *Journal of Pediatric Endocrinology & Metabolism: JPEM* 13(5): 489–496.
- Lemy, Anne, Marc Andrien, Arnaud Lionet, et al. 2012Posttransplant Major Histocompatibility Complex Class I Chain-Related Gene A Antibodies and Long-Term Graft Outcomes in a Multicenter Cohort of 779 Kidney Transplant Recipients. *Transplantation* 93(12): 1258–1264.
- Lemy, Anne, Marc Andrien, Karl M. Wissing, et al. 2010Major Histocompatibility Complex Class 1 Chain-Related Antigen a Antibodies: Sensitizing Events and Impact on Renal Graft Outcomes. *Transplantation* 90(2): 168–174.
- Lin, Da, Hayley Lavender, Elizabeth J. Soilleux, and Christopher A. O'Callaghan 2012NF- κ B Regulates MICA Gene Transcription in Endothelial Cell through a Genetically Inhibitable Control Site. *The Journal of Biological Chemistry* 287(6): 4299–4310.
- Li, P, D L Morris, B E Willcox, et al. 2001Complex Structure of the Activating Immunoreceptor NKG2D and Its MHC Class I-like Ligand MICA. *Nature Immunology* 2(5): 443–451.
- Li, P., S. T. Willie, S. Bauer, et al. 1999Crystal Structure of the MHC Class I Homolog MIC-A, a Gammadelta T Cell Ligand. *Immunity* 10(5): 577–584.
- Liu, Gang, Catherine L Atteridge, Xuanjun Wang, Ashley D Lundgren, and Jennifer D Wu 2010The Membrane Type Matrix Metalloproteinase MMP14 Mediates Constitutive Shedding of MHC Class I Chain-Related Molecule A Independent of A Disintegrin and Metalloproteinases. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 184(7): 3346–3350.
- Li, Z., V. Groh, R. K. Strong, and T. Spies 2000A Single Amino Acid Substitution Causes Loss of Expression of a MICA Allele. *Immunogenetics* 51(3): 246–248.
- Li, Zuwei, Ming Luo, Jianxin Qiu, et al. 2012Detection of Antibodies against Major Histocompatibility Complex Class I-Related Chain A in Long-Term Renal Graft Recipients. *Experimental and Clinical Transplantation: Official Journal of the Middle East Society for Organ Transplantation* 10(3): 239–242.
- López-Soto, Alejandro, Leticia Huergo Zapico, Andrea Acebes-Huerta, Luis Rodrigo, and Segundo Gonzalez 2013Regulation of NKG2D Signaling during the Epithelial-to-Mesenchymal Transition. *Oncoimmunology* 2(9). <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3825733/>, accessed July 16, 2015.
- Lu, Jingwei, Manjusri Das, Suman Kanji, et al. 2014Induction of ATM/ATR Pathway Combined with V γ 2V δ 2 T Cells Enhances Cytotoxicity of Ovarian Cancer Cells. *Biochimica Et Biophysica Acta* 1842(7): 1071–1079.
- Luo, Lei, Zhengyu Li, Weidong Wu, et al. 2014Role of MICA Antibodies in Solid Organ Transplantation. *Clinical Transplantation* 28(2): 152–160.
- Mace, Emily M., Prachi Dongre, Hsiang-Ting Hsu, et al. 2014Cell Biological Steps and Checkpoints in Accessing NK Cell Cytotoxicity. *Immunology and Cell Biology* 92(3): 245–255.
- Markiewicz, Mary A., Erica L. Wise, Zachary S. Buchwald, et al. 2012RAE1 ϵ Ligand Expressed on Pancreatic Islets Recruits NKG2D Receptor-Expressing Cytotoxic T Cells Independent of T Cell Receptor Recognition. *Immunity* 36(1): 132–141.

- Martín-Fontecha, Alfonso, Lindy L. Thomsen, Sara Brett, et al. 2004 Induced Recruitment of NK Cells to Lymph Nodes Provides IFN- γ for TH1 Priming. *Nature Immunology* 5(12): 1260–1265.
- Martín-Pagola, Ainhoa, Gustavo Pérez-Nanclares, Lourdes Ortiz, et al. 2004 MICA Response to Gliadin in Intestinal Mucosa from Celiac Patients. *Immunogenetics* 56(8): 549–554.
- Matusali, Giulia, Hyppolite Kuekou Tchidjou, Giuseppe Pontrelli, et al. 2013 Soluble Ligands for the NKG2D Receptor Are Released during HIV-1 Infection and Impair NKG2D Expression and Cytotoxicity of NK Cells. *FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 27(6): 2440–2450.
- Maul-Pavicic, Andrea, Samuel C. C. Chiang, Anne Rensing-Ehl, et al. 2011 ORAI1-Mediated Calcium Influx Is Required for Human Cytotoxic Lymphocyte Degranulation and Target Cell Lysis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108(8): 3324–3329.
- McFarland, Benjamin J., and Roland K. Strong 2003 Thermodynamic Analysis of Degenerate Recognition by the NKG2D Immunoreceptor: Not Induced Fit but Rigid Adaptation. *Immunity* 19(6): 803–812.
- Mellergaard, Maiken, Sarah Line Skovbakke, Christine L. Schneider, et al. 2014 N-Glycosylation of Asparagine 8 Regulates Surface Expression of Major Histocompatibility Complex Class I Chain-Related Protein A (MICA) Alleles Dependent on Threonine 24. *The Journal of Biological Chemistry* 289(29): 20078–20091.
- Mizuki, N., M. Ota, M. Kimura, et al. 1997 Triplet Repeat Polymorphism in the Transmembrane Region of the MICA Gene: A Strong Association of Six GCT Repetitions with Behçet Disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94(4): 1298–1303.
- Moliner, Luciana L., Mercedes B. Fuertes, María Victoria Girart, et al. 2004 NF-Kappa B Regulates Expression of the MHC Class I-Related Chain A Gene in Activated T Lymphocytes. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 173(9): 5583–5590.
- Moliner, Luciana Lorena, Carolina Inés Domaica, Mercedes Beatriz Fuertes, et al. 2006 Intracellular Expression of MICA in Activated CD4 T Lymphocytes and Protection from NK Cell-Mediated MICA-Dependent Cytotoxicity. *Human Immunology* 67(3): 170–182.
- Moretta, Alessandro, Cristina Bottino, Massimo Vitale, et al. 2001 Activating Receptors and Coreceptors Involved in Human Natural Killer Cell-Mediated Cytotoxicity. *Annual Review of Immunology* 19(1): 197–223.
- Nachmani, Daphna, Noam Stern-Ginossar, Ronit Sarid, and Ofer Mandelboim 2009 Diverse Herpesvirus MicroRNAs Target the Stress-Induced Immune Ligand MICB to Escape Recognition by Natural Killer Cells. *Cell Host & Microbe* 5(4): 376–385.
- Nakamura, Kyohei, Masafumi Nakayama, Mitsuko Kawano, et al. 2013 Fratricide of Natural Killer Cells Dressed with Tumor-Derived NKG2D Ligand. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 110(23): 9421–9426.
- Nath, Dilip S., Nataraju Angaswamy, Haseeb Ilias Basha, et al. 2010 Donor-Specific Antibodies to Human Leukocyte Antigens Are Associated with and Precede Antibodies to Major Histocompatibility Complex Class I-Related Chain A in Antibody-Mediated Rejection and Cardiac Allograft Vasculopathy after Human Cardiac Transplantation. *Human Immunology* 71(12): 1191–1196.
- Nedellec, Steven, Caroline Sabourin, Marc Bonneville, and Emmanuel Scotet 2010 NKG2D Costimulates Human V γ 9V δ 2 T Cell Antitumor Cytotoxicity through Protein Kinase C θ -Dependent Modulation of Early TCR-Induced Calcium and Transduction Signals. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 185(1): 55–63.
- Nedvetzki, Shlomo, Stefanie Sowinski, Robert A. Eagle, et al. 2007 Reciprocal Regulation of Human Natural Killer Cells and Macrophages Associated with Distinct Immune Synapses. *Blood* 109(9): 3776–3785.
- Nikitina-Zake, Liene, Raja Rajalingham, Ingrida Rumba, and Carani B. Sanjeevi 2004 Killer Cell Immunoglobulin-like Receptor Genes in Latvian Patients with Type 1 Diabetes Mellitus and Healthy Controls. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1037(1): 161–169.
- Nitahara, Ayano, Hideki Shimura, Akiko Ito, et al. 2006 NKG2D Ligation without T Cell Receptor Engagement Triggers Both Cytotoxicity and Cytokine Production in Dendritic Epidermal T Cells. *The Journal of Investigative Dermatology* 126(5): 1052–1058.

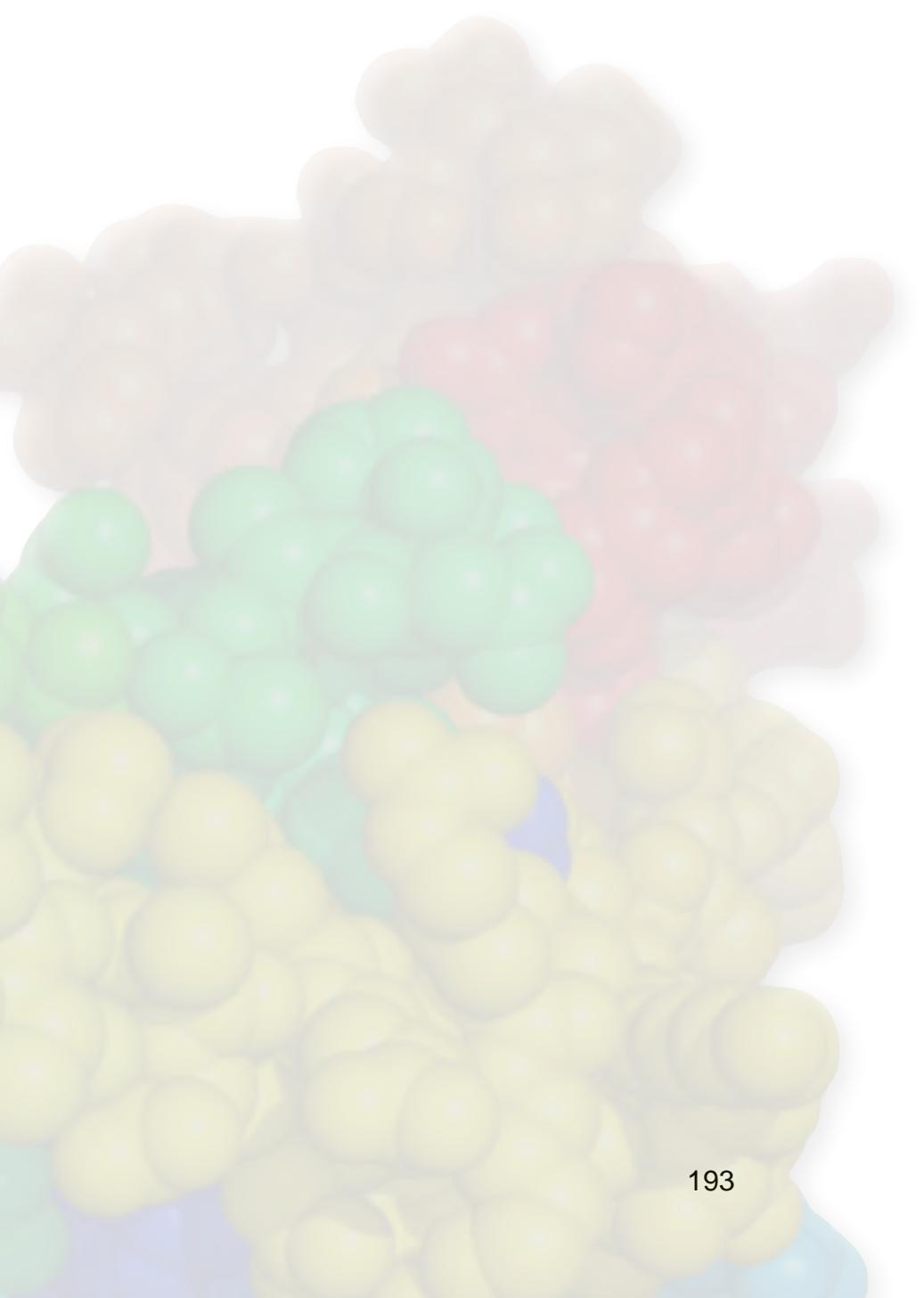
- Ogasawara, Kouetsu, Jessica A Hamerman, Lauren R Ehrlich, et al. 2004NKG2D Blockade Prevents Autoimmune Diabetes in NOD Mice. *Immunity* 20(6): 757–767.
- Oliveira, L. A., F. Ribas, M. G. Bicalho, L. T. Tsuneto, and M. L. Petzl-Erler 2008High Frequencies of Alleles MICA*020 and MICA*027 in Amerindians and Evidence of Positive Selection on Exon 3. *Genes and Immunity* 9(8): 697–705.
- Orange, Jordan S., Narayanaswamy Ramesh, Eileen Remold-O'Donnell, et al. 2002Wiskott-Aldrich Syndrome Protein Is Required for NK Cell Cytotoxicity and Colocalizes with Actin to NK Cell-Activating Immunologic Synapses. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99(17): 11351–11356.
- Pandey, Rahul, Christine M. DeStephan, Lisa A. Madge, Michael J. May, and Jordan S. Orange 2007NKp30 Ligation Induces Rapid Activation of the Canonical NF-kappaB Pathway in NK Cells. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 179(11): 7385–7396.
- Panigrahi, Arundhati, Nivedita Gupta, Jamshaid A. Siddiqui, et al. 2007Post Transplant Development of MICA and Anti-HLA Antibodies Is Associated with Acute Rejection Episodes and Renal Allograft Loss. *Human Immunology* 68(5): 362–367.
- Pavlova, Y. A., I. Malek, E. Honsova, et al. 2010Hepatocyte Growth Factor and Antibodies to HLA and MICA Antigens in Heart Transplant Recipients. *Tissue Antigens* 76(5): 380–386.
- Peter, M. E., and P. H. Krammer 2003The CD95(APO-1/Fas) DISC and beyond. *Cell Death and Differentiation* 10(1): 26–35.
- Petersdorf, E. W., K. B. Shuler, G. M. Longton, T. Spies, and J. A. Hansen 1999Population Study of Allelic Diversity in the Human MHC Class I-Related MIC-A Gene. *Immunogenetics* 49(7-8): 605–612.
- Piancatelli, Daniela, Khadija Oumhani, Imane Benelbarhdadi, et al. 2015MICA*078: A Novel Allele Identified in a Moroccan Individual Affected by Celiac Disease. *Human Immunology* 76(6): 438–441.
- Piccioli, Diego, Silverio Sbrana, Emiliano Melandri, and Nicholas M. Valiante 2002Contact-Dependent Stimulation and Inhibition of Dendritic Cells by Natural Killer Cells. *The Journal of Experimental Medicine* 195(3): 335–341.
- Poggi, Alessandro, Claudia Venturino, Silvia Catellani, et al. 2004Vdelta1 T Lymphocytes from B-CLL Patients Recognize ULBP3 Expressed on Leukemic B Cells and up-Regulated by Trans-Retinoic Acid. *Cancer Research* 64(24): 9172–9179.
- Radosavljevic, Mirjana, Benoît Cuillerier, Michael J. Wilson, et al. 2002A Cluster of Ten Novel MHC Class I Related Genes on Human Chromosome 6q24.2-q25.3. *Genomics* 79(1): 114–123.
- Ricci-Vitiani, L., A. Vacca, I. Potalicchio, et al. 2000MICA Gene Triplet Repeat Polymorphism in Patients with HLA-B27 Positive and Negative Ankylosing Spondylitis from Sardinia. *The Journal of Rheumatology* 27(9): 2193–2197.
- Richard, Jonathan, Sardar Sindhu, Tram N. Q. Pham, Jean-Philippe Belzile, and Eric A. Cohen 2010HIV-1 Vpr up-Regulates Expression of Ligands for the Activating NKG2D Receptor and Promotes NK Cell-Mediated Killing. *Blood* 115(7): 1354–1363.
- Rincon-Orozco, Bladimiro, Volker Kunzmann, Philine Wrobel, et al. 2005Activation of V Gamma 9V Delta 2 T Cells by NKG2D. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 175(4): 2144–2151.
- Riteau, Beatrice, Domingo F. Barber, and Eric O. Long 2003Vav1 Phosphorylation Is Induced by beta2 Integrin Engagement on Natural Killer Cells Upstream of Actin Cytoskeleton and Lipid Raft Reorganization. *The Journal of Experimental Medicine* 198(3): 469–474.
- Rodacki, Melanie, Britta Svoren, Vincent Butty, et al. 2007Altered Natural Killer Cells in Type 1 Diabetic Patients. *Diabetes* 56(1): 177–185.
- Romee, Rizwan, Bree Foley, Todd Lenvik, et al. 2013NK Cell CD16 Surface Expression and Function Is Regulated by a Disintegrin and Metalloprotease-17 (ADAM17). *Blood* 121(18): 3599–3608.
- Salih, Helmut R., Hans-Georg Rammensee, and Alexander Steinle 2002Cutting Edge: Down-Regulation of MICA on Human Tumors by Proteolytic Shedding. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 169(8): 4098–4102.
- Sánchez-Zapardiel, Elena, María J. Castro-Panete, Marcela Castillo-Rama, et al. 2013Harmful Effect of Preformed Anti-MICA Antibodies on Renal Allograft Evolution in Early Posttransplantation Period. *Transplantation* 96(1): 70–78.

- Schrambach, Stéphanie, Marc Ardizzone, Vincent Leymarie, Jean Sibilia, and Seiamak Bahram 2007 In Vivo Expression Pattern of MICA and MICB and Its Relevance to Auto-Immunity and Cancer. *PloS One* 2(6): e518.
- Schwinn, Nicole, Daria Vokhminova, Antje Sucker, et al. 2009 Interferon-Gamma down-Regulates NKG2D Ligand Expression and Impairs the NKG2D-Mediated Cytotoxicity of MHC Class I-Deficient Melanoma by Natural Killer Cells. *International Journal of Cancer. Journal International Du Cancer* 124(7): 1594–1604.
- Serrano, Antonio E., Evelyn Menares-Castillo, Macarena Garrido-Tapia, et al. 2011 Interleukin 10 Decreases MICA Expression on Melanoma Cell Surface. *Immunology and Cell Biology* 89(3): 447–457.
- Simhadri, Venkateswara R., John F. Andersen, Eric Calvo, et al. 2012 Human CD300a Binds to Phosphatidylethanolamine and Phosphatidylserine, and Modulates the Phagocytosis of Dead Cells. *Blood* 119(12): 2799–2809.
- Smith, J. D., V. M. Brunner, S. Jigjidsuren, et al. 2009 Lack of Effect of MICA Antibodies on Graft Survival Following Heart Transplantation. *American Journal of Transplantation: Official Journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons* 9(8): 1912–1919.
- Smyth, Mark J., Jeremy Swann, Erika Cretney, et al. 2005 NKG2D Function Protects the Host from Tumor Initiation. *The Journal of Experimental Medicine* 202(5): 583–588.
- Solgi, Ghasem, Daniel Furst, Joannis Mytilineos, Gholamreza Pourmand, and Ali Akbar Amirzargar 2012 Clinical Relevance of Pre and Post-Transplant Immune Markers in Kidney Allograft Recipients: Anti-HLA and MICA Antibodies and Serum Levels of sCD30 and sMICA. *Transplant Immunology* 26(2-3): 81–87.
- Spreu, Jessica, Thilo Stehle, and Alexander Steinle 2006 Human Cytomegalovirus-Encoded UL16 Discriminates MIC Molecules by Their alpha2 Domains. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 177(5): 3143–3149.
- Steinle, A., P. Li, D. L. Morris, et al. 2001 Interactions of Human NKG2D with Its Ligands MICA, MICB, and Homologs of the Mouse RAE-1 Protein Family. *Immunogenetics* 53(4): 279–287.
- Stern-Ginossar, Noam, Naama Elefant, Albert Zimmermann, et al. 2007 Host Immune System Gene Targeting by a Viral miRNA. *Science (New York, N.Y.)* 317(5836): 376–381.
- Stern-Ginossar, Noam, Chamutal Gur, Moshe Biton, et al. 2008 Human microRNAs Regulate Stress-Induced Immune Responses Mediated by the Receptor NKG2D. *Nature Immunology* 9(9): 1065–1073.
- Strid, Jessica, Scott J. Roberts, Renata B. Filler, et al. 2008 Acute Upregulation of an NKG2D Ligand Promotes Rapid Reorganization of a Local Immune Compartment with Pleiotropic Effects on Carcinogenesis. *Nature Immunology* 9(2): 146–154.
- Suárez-Alvarez, Beatriz, Rebeca Alonso-Arias, Cristina Bravo-Mendoza, et al. 2009 Identification of Epitopes and Immunodominant Regions on the MICA Protein Defined by Alloantibodies from Kidney Transplant Patients. *Transplantation* 88(3 Suppl): S68–77.
- Suárez-Alvarez, Beatriz, Antonio López-Vázquez, Roberto Díaz-Peña, et al. 2006 Post-Transplant Soluble MICA and MICA Antibodies Predict Subsequent Heart Graft Outcome. *Transplant Immunology* 17(1): 43–46.
- Suárez-Alvarez, B, A López-Vázquez, M Zapico Gonzalez, et al. 2007 The Relationship of Anti-MICA Antibodies and MICA Expression with Heart Allograft Rejection: 1842–1848.
- Suemizu, Hiroshi, Mirjana Radosavljevic, Minoru Kimura, et al. 2002 A Basolateral Sorting Motif in the MICA Cytoplasmic Tail. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99(5): 2971–2976.
- Sumitran-Holgersson, S., H. E. Wilczek, J. Holgersson, and K. Söderström 2002 Identification of the Nonclassical HLA Molecules, Mica, as Targets for Humoral Immunity Associated with Irreversible Rejection of Kidney Allografts. *Transplantation* 74(2): 268–277.
- Sun, Dahui, Xu Wang, Haixia Zhang, Lijuan Deng, and Yan Zhang 2011 MMP9 Mediates MICA Shedding in Human Osteosarcomas. *Cell Biology International* 35(6): 569–574.
- Takada, Akio, Shigeru Yoshida, Mizuho Kajikawa, et al. 2008 Two Novel NKG2D Ligands of the Mouse H60 Family with Differential Expression Patterns and Binding Affinities to NKG2D. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 180(3): 1678–1685.

- Tamaki, Shigehiro, Masayoshi Kawakami, Yasutsugu Yamanaka, et al. 2009 Relationship between Soluble MICA and the MICA A5.1 Homozygous Genotype in Patients with Oral Squamous Cell Carcinoma. *Clinical Immunology (Orlando, Fla.)* 130(3): 331–337.
- Tauriainen, Sisko, Sami Oikarinen, Maarit Oikarinen, and Heikki Hyöty 2011 Enteroviruses in the Pathogenesis of Type 1 Diabetes. *Seminars in Immunopathology* 33(1): 45–55.
- Tellier, Edwige, Matthias Canault, Laure Rebsomen, et al. 2006 The Shedding Activity of ADAM17 Is Sequestered in Lipid Rafts. *Experimental Cell Research* 312(20): 3969–3980.
- Thomas, Mair, Mark Wills, and Paul J. Lehner 2008 Natural Killer Cell Evasion by an E3 Ubiquitin Ligase from Kaposi's Sarcoma-Associated Herpesvirus. *Biochemical Society Transactions* 36(Pt 3): 459–463.
- Tonnerre, Pierre, Nathalie Gérard, Mathias Chatelais, et al. 2013 MICA Variant Promotes Allosensitization after Kidney Transplantation. *Journal of the American Society of Nephrology: JASN* 24(6): 954–966.
- Tuli, Amit, Jerome Thiery, Ashley M. James, et al. 2013 Arf-like GTPase Arl8b Regulates Lytic Granule Polarization and Natural Killer Cell-Mediated Cytotoxicity. *Molecular Biology of the Cell* 24(23): 3721–3735.
- Venkataraman, Gopalakrishnan M., Dominic Suci, Veronika Groh, Jeremy M. Boss, and Thomas Spies 2007 Promoter Region Architecture and Transcriptional Regulation of the Genes for the MHC Class I-Related Chain A and B Ligands of NKG2D. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 178(2): 961–969.
- Vivier, Eric, Elena Tomasello, Myriam Baratin, Thierry Walzer, and Sophie Ugolini 2008 Functions of Natural Killer Cells. *Nature Immunology* 9(5): 503–510.
- Waldhauer, Inja, Dennis Goehlsdorf, Friederike Gieseke, et al. 2008 Tumor-Associated MICA Is Shed by ADAM Proteases. *Cancer Research* 68(15): 6368–6376.
- Walsh, Kevin B., Lewis L. Lanier, and Thomas E. Lane 2008 NKG2D Receptor Signaling Enhances Cytolytic Activity by Virus-Specific CD8+ T Cells: Evidence for a Protective Role in Virus-Induced Encephalitis. *Journal of Virology* 82(6): 3031–3044.
- Wang, L. M., A. Kimura, M. Satoh, and S. Mineshita 1999 HLA Linked with Leprosy in Southern China: HLA-Linked Resistance Alleles to Leprosy. *International Journal of Leprosy and Other Mycobacterial Diseases: Official Organ of the International Leprosy Association* 67(4): 403–408.
- Welte, Stefan A., Christian Sinzger, Stefan Z. Lutz, et al. 2003 Selective Intracellular Retention of Virally Induced NKG2D Ligands by the Human Cytomegalovirus UL16 Glycoprotein. *European Journal of Immunology* 33(1): 194–203.
- Wen, Chaoyang, Xiang He, Hongfang Ma, et al. 2008 Hepatitis C Virus Infection Downregulates the Ligands of the Activating Receptor NKG2D. *Cellular & Molecular Immunology* 5(6): 475–478.
- Wu, Jennifer, Veronika Groh, and Thomas Spies 2002 T Cell Antigen Receptor Engagement and Specificity in the Recognition of Stress-Inducible MHC Class I-Related Chains by Human Epithelial $\gamma\delta$ T Cells: 1236–1240.
- Yabuki, K., M. Ota, K. Goto, et al. 1999 Triplet Repeat Polymorphism in the MICA Gene in HLA-B27 Positive and Negative Caucasian Patients with Ankylosing Spondylitis. *Human Immunology* 60(1): 83–86.
- Yao, Qing-Chun, Wei Wang, Xiao-Bei Li, Hang Yin, and Xiao-Dong Zhang 2011 Expression Characteristics of Major Histocompatibility Complex Class I-Related Chain A Antibodies and Immunoabsorption Effect in Sensitized Recipients of Kidney Transplantation. *Chinese Medical Journal* 124(5): 669–673.
- Zhang, Cai, Jian Zhang, Rui Sun, et al. 2005 Opposing Effect of IFN γ and IFN α on Expression of NKG2 Receptors: Negative Regulation of IFN γ on NK Cells. *International Immunopharmacology* 5(6): 1057–1067.
- Zhang, Qiheng, J. Michael Cecka, David W. Gjertson, et al. 2011 HLA and MICA: Targets of Antibody-Mediated Rejection in Heart Transplantation. *Transplantation* 91(10): 1153–1158.
- Zhao, Jie, Yi Jiang, Yuan Lei, et al. 2011 Functional MICA-129 Polymorphism and Serum Levels of Soluble MICA Are Correlated with Ulcerative Colitis in Chinese Patients. *Journal of Gastroenterology and Hepatology* 26(3): 593–598.
- Zingoni, Alessandra, Francesca Cecere, Elisabetta Vulpis, et al. 2015 Genotoxic Stress Induces Senescence-Associated ADAM10-Dependent Release of NKG2D MIC Ligands in Multiple Myeloma Cells. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 195(2): 736–748.

- Zou, Yizhou, Wade Bresnahan, R. Travis Taylor, and Peter Stastny 2005aEffect of Human Cytomegalovirus on Expression of MHC Class I-Related Chains A. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 174(5): 3098–3104.
- 2005bEffect of Human Cytomegalovirus on Expression of MHC Class I-Related Chains A. *The Journal of Immunology* 174(5): 3098–3104.
- Zou, Yizhou, and Peter Stastny 2002Alternatively Spliced Forms of MICA and MICB Lacking Exon 3 in a Human Cell Line and Evidence of Presence of Similar RNA in Human Peripheral Blood Mononuclear Cells. *Immunogenetics* 54(9): 671–674.
- Zou, Yizhou, Peter Stastny, Caner Süsal, Bernd Döhler, and Gerhard Opelz 2007Antibodies against MICA Antigens and Kidney-Transplant Rejection. *The New England Journal of Medicine* 357(13): 1293–1300.
- Zwirner, N. W., K. Dole, and P. Stastny 1999Differential Surface Expression of MICA by Endothelial Cells, Fibroblasts, Keratinocytes, and Monocytes. *Human Immunology* 60(4): 323–330.
- Zwirner, N. W., M. A. Fernández-Viña, and P. Stastny 1998MICA, a New Polymorphic HLA-Related Antigen, Is Expressed Mainly by Keratinocytes, Endothelial Cells, and Monocytes. *Immunogenetics* 47(2): 139–148.

Annexes



Liste des publications, brevets et communications

Publications scientifiques

- 1) Chauveau A, Tonnerre P, Pabois A, **Gavlovsky PJ**, Chatelais M, Coupel S, Charreau B. Endothelial Cell Activation and Proliferation Modulate NKG2D Activity by Regulating MICA Expression and Shedding. *J Innate Immun.* 2014;6(1):89-104
- 2) **Gavlovsky PJ**, Tonnerre P., Gérard N., Nedellec S., Daman A.W., McFarland B.J. and Charreau B. *Alternative Splice Transcripts For MHC Class I-Like MICA Encode Novel NKG2D Ligands with Agonist or Antagonist Function*(2015) **article en revision.**
- 3) Tonnerre P., Gérard N., **Gavlovsky PJ**., Mazalrey S., Hourmant M., Chesneau ML., Cesbron Gautier A., Renaudin K., Bressollette C. and Charreau B. MICA variant influences the immune control of BK polyomavirus reactivation after kidney transplantation. (2015) **article soumis**
- 4) Djaoud Z., **Gavlovsky PJ**., Mehlal S., Bressollette C., Gérard N., Gagne, K., Charreau B. and Retière C. Cytomegalovirus-infected primary endothelial cells preferentially activate NKG2C+ NK cells. (2015) **article soumis.**

Brevets

Demande européenne EP13305955.0du 05 July 2013 et Demande internationale PCT/EP2014/064316 04 July 2014 pour NOVEL ALTERNATIVE SPLICE TRANSCRIPTS FOR MHC CLASS I RELATED CHAIN ALPHA (MICA) AND USES THEREOF

Auteurs : Béatrice Charreau, Nathalie Gérard, Pierre Tonnerre, **Pierre-Jean Gavlovsky**

Participations aux congrès

Characterization of novel MICA isoforms resulting from of MICA gene alternative splicing and providing new ligand for the activating NKG2D immune receptor. **PJ Gavlovsky**, P Tonnerre , N Gerard, B Charreau. **IGO Meeting, July 3-4 2014, Nantes, France.**

Thèse de Doctorat

Pierre-Jean GAVLOVSKY

Polymorphisme et diversité des protéines MICA : Caractérisation de nouvelles isoformes de MICA et rôle du variant MICA A5.1 en transplantation rénale.

MICA gene polymorphism and protein diversity: Characterization of novel MICA isoforms and role of MICA A5.1 variant in renal transplantation.

Résumé

Les molécules du CMH de classe I « like » MICA jouent un rôle important dans l'activation de cellules effectrices de l'immunité innée et adaptative, principalement comme ligands du récepteur activateur NKG2D. Le gène *MICA* est polymorphe (102 allèles décrits) ; ce polymorphisme favorise l'induction d'une réponse humorale participant au rejet en transplantation. Cependant la contribution des différents allèles à une diversité de protéines MICA reste mal connue.

Notre étude montre que les allèles *MICA**015 et *MICA**017 codent pour un panel de 5 isoformes MICA-A, MICA-B1, MICA-B2, MICA-C et MICA-D correspondant à des protéines MICA délétées des domaines $\alpha 3$ et pour certaines $\alpha 2$. Ces protéines résultent d'un épissage alternatif issu d'une délétion dans l'intron 4 observée pour ces deux allèles. Trois isoformes (MICA-B1, MICA-B2 et MICA-D) possèdent une affinité, modeste, pour NKG2D. MICA-B2 est un nouveau ligand agoniste capable d'activer NKG2D. MICA-D est capable de lier NKG2D sans induire ni modulation ni activation du récepteur mais possède un effet antagoniste/inhibiteur pour l'activation de NKG2D par un ligand agoniste. Ces travaux apportent de nouvelles données sur la relation structure/fonction des protéines MICA et en particulier sur l'importance du domaine $\alpha 3$ et des sites de N-glycosylation pour l'interaction et l'activation de NKG2D.

Ce travail décrit aussi l'expression restreinte et localisée de MICA dans les cellules épithéliales des tubules proximaux et distaux et les cellules de l'endothélium micro- et macrovasculaire du rein. Ces cellules sont les cibles privilégiées du BK virus suggérant un rôle spécifique de MICA dans l'infection ou le contrôle de l'infection par ce virus qui reste à explorer.

Mots-clés : CMH de classe I, MICA, isoformes, NKG2D, rein

Abstract

MHC class I "like" MICA play an important role in the activation of effector cells of innate and adaptive immunity, mainly as ligands of NKG2D activating receptor. *MICA* gene is polymorphic (102 alleles described); this polymorphism promotes the induction of humoral responses involved in transplantation rejection. However the contribution of different alleles at a MICA protein diversity remains unclear.

Our study shows that *MICA**015 and *MICA**017 alleles encode a panel of 5-A isoforms that we called MICA-A, MICA-B1, MICA-B2, MICA-C and MICA-D differing from wild type MICA by the deletion of $\alpha 2$ and/or $\alpha 3$ domains. These proteins resulting from alternative splicing due to a deletion within intron 4 observed for both MICA alleles. Three isoforms (MICA-B1, MICA-B2 and MICA-D) display a moderate but real affinity for NKG2D. MICA-B2 is a new agonist ligand capable of activating NKG2D. MICA-D is capable of binding NKG2D without inducing modulation or activation of the receptor but has an antagonistic / inhibitor effect toward NKG2D activation by an agonist ligand. These studies provide new data on the structure/function relationship of MICA protein and especially the importance of the $\alpha 3$ domain and N-glycosylation sites for interaction and activation of NKG2D.

This work also describes the limited and localized expression of MICA in the epithelial cells of proximal and distal tubules and endothelial cells of both micro and macrovessels in the kidney. These cells are the primary targets of BK virus suggesting that MICA proteins may play specific roles in the infection, or control of the infection by the virus that remains to be explored.

Keywords: MHC class I, MICA, isoforms, NKG2D, kidney