

UNIVERSITÉ DE NANTES
FACULTÉ DE MEDECINE
École doctorale BIOLOGIE SANTÉ

Année 2012

N° attribué par la bibliothèque

--	--	--	--	--	--	--	--	--	--

Impact du polymorphisme génétique sur
l'expression endothéliale de MICA :
Rôle de la mutation *MICA A5.1* dans le rejet de greffe &
Caractérisation d'un nouvel épissage alternatif de *MICA*

THÈSE DE DOCTORAT
Discipline : Biologie Médecine Santé
Spécialité : Immunologie & Génétique

Présentée et soutenue publiquement par

Pierre TONNERRE
Le 19 novembre 2012, devant le jury ci-dessous

Rapporteurs : Mr le Professeur Seiamak BAHRAM
Mr le Professeur Jean-Luc TAUPIN

Examineurs : Mme le Professeur Sophie CAILLAT-ZUCMAN
Mme le Professeur Nadine GERVOIS

Directeur de Thèse : Mme le Docteur Béatrice CHARREAU
Co-Directeur : Mme le Docteur Gervaise LOIRAND

Table des matières

Liste des abréviations.....	4
Liste des Figures & Tableaux.....	6
Avant-propos.....	8
CHAPITRE I : Introduction Générale.....	10
1-1 Acteurs et mécanismes du rejet de greffe.....	11
1-1.1 Endothélium et rejet.....	11
1-1.1.1 Structure & fonction de l'endothélium.....	11
1-1.1.1a Structure.....	11
1-1.1.1b Fonctions.....	11
1-1.1.2 La cellule endothéliale : Cible & acteur de la réponse immune en allo-transplantation.....	18
1-1.1.3 Les allo-anticorps et leurs cibles en allo-transplantation : Emergence des antigènes « non-HLA ».....	26
1-1.2 Immunosuppression et complications post-transplantation.....	29
1-1.2.1 Les infections post-greffe.....	29
1-1.2.1a Les infections bactériennes, fongiques et parasitaires.....	29
1-1.2.1b Les infections virales.....	30
1-1.2.2 Les cancers en transplantation.....	34
1-2 MHC class I related Chain A (MICA).....	36
1-2.1 Organisation et caractéristiques du gène MICA.....	36
1-2.2 Expression et Régulation de la protéine MICA.....	41
1-2.2.1 Régulation de MICA par les stress cellulaires.....	41
1-2.2.2 Régulation de MICA par les cytokines pro-inflammatoires.....	42
1-2.2.3 Mécanismes de régulation post-traductionnels de MICA.....	43
1-2.2.4 Expression de la forme soluble de MICA.....	44
1-2.3 Fonction des protéines MICA.....	46
1-2.4 MICA, NKG2DLs & les Pathologies Associées.....	51
1-2.4.1 MICA, NKG2DLs et les infections bactériennes et virales.....	57
1-2.4.1a Les infections bactériennes.....	57
1-2.4.1b Les infections virales.....	58
1-2.4.2 MICA, NKG2DLs et immunité anti-tumorale.....	62
1-2.4.3 MICA, NKG2DLs et auto-immunité.....	68
1-2.4.4 MICA, NKG2DLs et rejet de greffe	73
1-3 Objectifs de la thèse.....	77
CHAPITRE II : Impact de la mutation MICA A5.1 sur l'expression endothéliale de MICA : Conséquences sur l'induction d'allo-anticorps post-transplantation rénale.....	81

2-1	Présentation de l'Etude.....	82
2-2	Résultats.....	84
2-2.1	Résumés.....	84
2-2.2	Article 1.....	86
2-2.3	Article 2	90
2-3	Discussion & Perspectives.....	129
CHAPITRE III : Impact de la mutation MICA A5.1 sur la réactivation du BK virus post-transplantation rénale		134
3-1	Présentation de l'étude.....	135
3-2	Matériel et Méthodes.....	138
3-3	Résultats.....	140
3-4	Discussion & Perspectives.....	147
CHAPITRE IV : Identification et caractérisation d'un épissage alternatif du gène MICA.....		149
4-1	Présentation de l'étude.....	150
4-2	Matériel et Méthodes.....	152
4-3	Résultats.....	155
4-4	Discussion et Perspectives.....	163
CHAPITRE V : Le projet proVasc : Identification de molécules et extraits d'origine végétale pour leurs propriétés antioxydantes, anti- inflammatoires et anti-AGE.....		165
5-1	Présentation de l'étude.....	166
5-2	Mise au point d'un test pour la détection des propriétés anti-inflammatoires et antioxydants.....	168
5-3	Mise au point d'un test pour la détection des propriétés anti-AGE.....	174
5-4	Résultats du screening.....	176
Conclusion générale.....		177
Liste des publications et communications scientifiques.....		181
Annexe 1.....		183
Annexe 2.....		210
Annexe 3.....		220
Références Bibliographiques.....		234
Remerciements.....		273

Liste des abréviations

ADCC	Antibody-dependent cellular cytotoxicity
ADN	Acide désoxyribonucléique
AECA	Anti-Endothelial Cell Antibodies
AGE	Advanced glycation end products
ALL	Leucémie lymphoblastique aigüe
AML	Leucémie myéloïde aigüe
Ang-1	Angiopoïétine-1
ARN	Acide ribonucléique
B2M	β2-microglobuline
CD	Cellule dendritique
CE	Cellule Endothéliale
CLL	Leucémie lymphoïde chronique ;
CML	Cellules Musculaires Lisses
CML	Leucémie myéloïde chronique
CMV	Cytomegalovirus
CPA	Cellule présentatrice d'antigène
D/R	Donor/Recipient
DRM	détergent-resistant membrane microdomains
DT1	Diabète de type 1
EBV	Epstein-Bar virus
EDHF	Endothelium-derived hyperpolarizing factor
EGF	Epidermal Growth Factor
ELISA	Enzyme Link Immunosorbent Assay
EPCR	Récepteur à la protéine C
FGF	Fibroblast Growth Factor
FGFR	Fibroblast growth factor receptor
FI/AT	Fibrose interstitielle et atrophie tubulaire
gp	glycoprotéine
GVHD	Graft versus host disease
GW	Granulomatose de Wegener
HHV	Human Herpes virus
HLA	Human Leucocyte Antigen
HS	héparanes sulfates
HSF	Heat Shock Factor
HSPG	heparan sulfate proteoglycan
HSV	Herpes Simplex virus
ICAM-1	Intracellular Adhesion Molecule-1
IEL	Intra-épithélial lymphocyte
IFN	Interferon
Ig	Immunoglobuline
IL	Interleukine
IP-10	Interféron-inducible Protein-10
LPS	Lipopolysaccharides
MC	Maladie Céliaque
MCP-1	Monocyte Chemoattractant Protein-1
MEC	matrice extracellulaire
MHC	Complexe majeur d'histocompatibilité
MIC	MHC class I related chain
MICAs	MICA soluble
MMF	Mycophénolate mofétil
MMP	Matrice metalloprotéinase
MULT-1	Murine UL-16-binding protein-like transcript 1
NAC	N-acétylcystéine
NCA	Néphropathie chronique d'allogreffe

NFkB	Nuclear factor kappa B
NK	Natural killer
NKG2D	NK groupe 2 member D
NKG2DL	NKG2D ligand
NO	Monoxyde d'azote
NOD	Non-obese diabetic
PC	Patients cancéreux
PDTC	pyrrolidine dithiocarbamate
PGI₂	Prostaglandine
PS	Patients sains
PTDL	Post-Transplantation Lymphoproliferative Disorder
Rae	Retinoic acid early inducible
RAET	Retinoic acid early transcrits
SEP	Sclérose en plaque
SNP	Single Nucleotide Polymorphism
T-NH	Lymphome non-Hodgkinien à cellules T
TCR	T cell receptor
TEMPOL	4-Hydroxy-TEMPO
TFP1	Facteur Tissulaire
TGF	Transforming Growth Factor
TLR	Toll like receptor
TM	Thrombomoduline
TNF	Tumor necrosis factor
ULBP	UL16 binding protein
ULBPS	ULBP soluble
VBK	virus BK
VCAM-1	Vascular Cell Adhesion Molecule-1
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
VHB	Virus de l'hépatite B
VHC	Virus de l'hépatite C
VIH	Virus de l'immunodéficience humaine
vWF	Corps de Weibel-Palade
VZV	Varicella Zoster Virus
WT	Wild Type

Liste des figures

Figure 1 :	Structure de la paroi des vaisseaux sanguins.....	11
Figure 2 :	Fonctions de l'endothélium vasculaire et molécules associées.....	12
Figure 3 :	Cascade d'adhérence des leucocytes sur l'endothélium.....	17
Figure 4 :	Impact de la reconnaissance des cellules endothéliales par les allo-anticorps sur le rejet de transplantation.....	25
Figure 5 :	Organisation exonique et intronique du gène MICA (A). Comparaison des séquences nucléotidiques des microsatellites A5 et A5 mutés (A5.1) (B).....	37
Figure 6 :	Représentation schématique du polymorphisme des gènes MICA (A) et MICB (B).....	39
Figure 7 :	Comparaison des structures des différents ligands de NKG2D humains et murins.....	48
Figure 8 :	Les mécanismes cellulaires impliqués dans la régulation de MICA.....	50
Figure 9 :	Cloisonnement de la littérature traitant de la molécule MICA par domaines de recherches et en fonction de l'année de publication.....	51
Figure 10 :	Sites de phosphorylation potentiels dans le domaine intracellulaire de MICA.....	131
Figure 11 :	Comparaison des fréquences des génotypes pour le gène MICA des receveurs (A) et des donneurs (B) avec les statuts virologiques des receveurs pour le VBK.....	142
Figure 12 :	Comparaison des fréquences des combinaisons D/R pour la mutation MICA A5.1 en fonction des statuts virologiques des receveurs pour le VBK.....	144
Figure 13 :	Les différentes combinaisons D/R pour le gène MICA et leurs impacts sur la réactivation du VBK post-transplantation.....	145
Figure 14 :	Mise en évidence et caractérisation des transcrits alternatifs de MICA.....	156
Figure 15 :	Association entre la présence des transcrits alternatifs et l'allèle MICA*017 (A), identification de la délétion d'une guanine en 5' de l'intron 4 (B).....	157
Figure 16 :	Quantification des transcrits alternatifs de MICA par RT-qPCR.....	159
Figure 17 :	Alignement & Représentation schématique de la prédiction des séquences en acides aminés codées par les différents transcrits alternatifs de MICA	160

Figure 18 :	Détection des différentes isoformes de MICA par FACS (Image de gauche) et par immunofluorescence (Image de droite) après la transfection de cellules COS.....	161
Figure 19 :	Détection de l'expression de VCAM-1 à la surface des CE par cytométrie de flux, après traitement par TNF α ou LPS.....	169
Figure 20 :	Comparaison des effets d'une dose réponse et du temps d'incubation sur l'induction de VCAM1 par le TNF α	169
Figure 21 :	Effets des anti-oxydants TEMPOL, NAC et PDTC sur l'inhibition de l'expression de VCAM induite par le TNF.....	171
Figure 22 :	Exemple représentatif des résultats obtenus par le test pour la détection des propriétés antioxydantes/inflammatoires.....	172
Figure 23 :	Structure chimique des molécules de la famille des α -oxoaldéhydes.....	174
Figure 24 :	Mesure de la viabilité cellulaire par MTT après traitement des CE avec l'inducteur d'AGE « Glyoxal » et exemple représentatif des effets d'une molécule capable d'inhiber l'effet du Glyoxal.....	175

Liste des tableaux

Tableau 1:	Revue de la littérature décrivant la détection des formes solubles de MICA et des autres ligands de NKG2D dans les séra de patients atteints de cancer.....	65
Tableau 2 :	Séquences des amorces utilisées pour les réactions de PCR et taille attendue des produits amplifiés.....	152

Avant-propos

La Transplantation désigne le transfert d'un organe d'un donneur à un receveur. S'agissant d'un organe vascularisé, cette définition implique le rétablissement de la continuité vasculaire afférente et efférente de l'organe transplanté, via le système vasculaire du receveur. On distingue donc la transplantation de la greffe, qui définit le transfert de tissus ou de cellules. Cependant, l'utilisation du terme « Greffe » pour définir la transplantation d'un organe constitue aujourd'hui un néologisme accepté. L'organe greffé peut alors être désigné sous les termes de greffon ou transplant.

On distingue quatre types de greffe selon les origines ou la proximité génétique du donneur et du receveur. Ainsi, l'**autogreffe** désigne une greffe pour laquelle les individus donneur et receveur sont une seule et même personne. Ce type de greffe constitue la thérapeutique de choix, notamment pour le traitement de graves brûlures par autogreffe de peau, ou l'autogreffe de cellules souches hématopoïétiques pour le traitement de l'aplasie suite à un traitement intensif par chimiothérapie. L'**isogreffe** désigne la greffe entre jumeaux monozygotes, disposant d'un même patrimoine génétique. L'**allogreffe** définit la greffe entre deux individus d'une même espèce, mais génétiquement distincts. Ce type de greffe est la plus répandue et nécessite la prise d'un traitement immunosuppresseur lourd afin de palier la réaction immunitaire du receveur à l'encontre de son greffon. Enfin, la **xénogreffe** désigne la greffe entre individus d'espèces différentes. Ce type de greffe, encore expérimentale pour les greffes d'organes ou de cellules, est utilisé aujourd'hui pour le traitement des valvulopathies cardiaques par la xénogreffe de valves porcine ou bovine.

Limites et Enjeux de la Transplantation :

La transplantation d'organes demeure la seule issue thérapeutique pour nombre de pathologies entraînant la perte de fonction d'organes vitaux. Les progrès scientifiques sur les mécanismes immunologiques du rejet, l'amélioration des techniques chirurgicales, la découverte de nouveaux traitements immunosuppresseurs associés à un suivi post-greffe rigoureux ont permis de considérablement améliorer la survie des greffons à un an post-greffe. Cependant, les progrès dans le domaine de la transplantation se voient limités par une lente amélioration des courbes de survie à long

terme, par des complications liées aux traitements immunosuppresseurs et par une pénurie de greffons persistante.

En effet, en 2010, en France, près de 40 000 personnes vivent avec un organe greffé. Sur les 9109 patients sur liste d'attente, seuls 4708 seront greffés et 273 décèderont faute de greffons disponibles (Agence de la Biomédecine, Rapport annuel, Bilan des activités 2010). Cette pénurie de greffons est la résultante de plusieurs facteurs. Tout d'abord, les progrès majeurs en terme de santé publique réalisés ces 30 dernières années permettent à une population de plus en plus vieillissante, sujette aux maladies chroniques, d'accroître le nombre de patients en attente d'une greffe. D'un autre côté, et pour les mêmes raisons, la diminution de la mortalité suite à un traumatisme ou à un accident vasculaire cérébral diminue le nombre de greffons disponibles. Enfin, l'opposition de la famille au prélèvement sur donneur cadavérique ou en état de mort cérébrale reste un obstacle majeur à la greffe qui concerne 33,7% des donneurs potentiels.

Dans ce contexte, une politique de santé publique est mise en place pour la promotion et la sensibilisation au don d'organes. L'augmentation de la durée de vie du greffon et l'amélioration des traitements immunosuppresseurs constituent également un défi majeur de santé publique. Pour ce faire, les priorités de recherche dans le domaine de la transplantation visent, d'une part, à mieux comprendre les mécanismes immunologiques conduisant aux lésions du rejet chronique et, d'autre part, à caractériser, en amont, de nouvelles cibles moléculaires pour prévenir et suivre le devenir d'une greffe par des méthodes non invasives de biologie moléculaire et de génomique fonctionnelle (Transplantation d'organes – Quelles voies de recherche ?, Expertise collective, Les éditions Inserm, 2009).

CHAPITRE I :

Introduction Générale

1-1 Acteurs et Mécanismes du Rejet de Greffe

1-1.1 Endothélium et Rejet

1-1.1.1 Structure & Fonction de l'Endothélium

1-1.1.1a Structure

La paroi des vaisseaux sanguins se compose de trois sous-parties, de la lumière vers la paroi interne du vaisseau : L'intima, la média et l'adventice (**Figure 1**). L'adventice se compose d'un tissu conjonctif contenant des fibroblastes et des adipocytes. La média est essentiellement constituée de Cellules Musculaires Lisses (CML) vasculaires. L'intima, composée d'une monocouche de cellules endothéliales (CE) reposant sur une membrane basale et une fine couche de tissu conjonctif, forme l'endothélium ou la limitante interne de la paroi des vaisseaux sanguins.

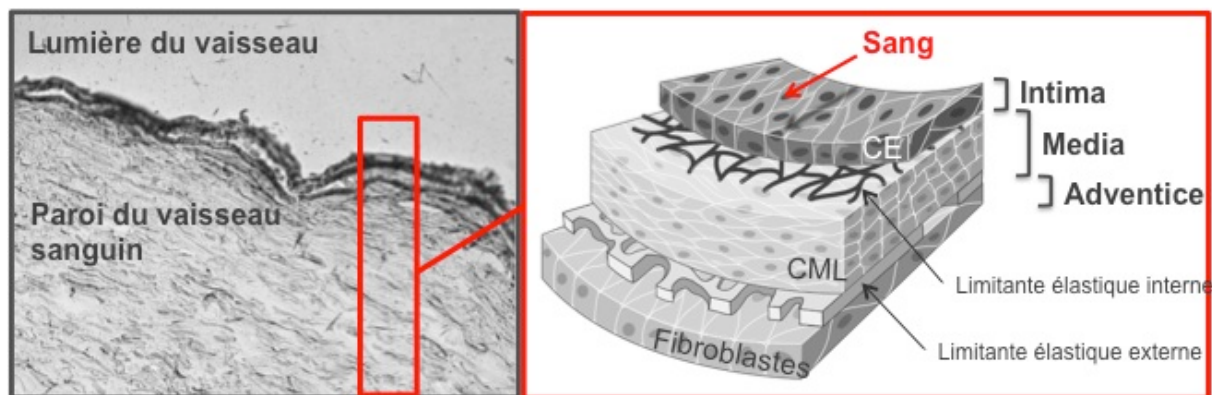


Figure 1 : Structure de la paroi des vaisseaux sanguins.

1-1.1.1b Fonctions

Cette localisation particulière de l'endothélium, entre le sang et les tissus environnants, lui confère des fonctions physiologiques indispensables à la vie telles que : le contrôle de l'hémostase, du tonus, de la perméabilité ainsi que de la croissance vasculaire mais aussi la régulation de la réponse immune et de l'inflammation (**Figure 2**). La diversité des fonctions de l'endothélium en font un organe d'une grande

complexité, en perpétuel interaction avec son environnement et capable de répondre rapidement aux éventuelles agressions afin de maintenir l'homéostasie vasculaire.

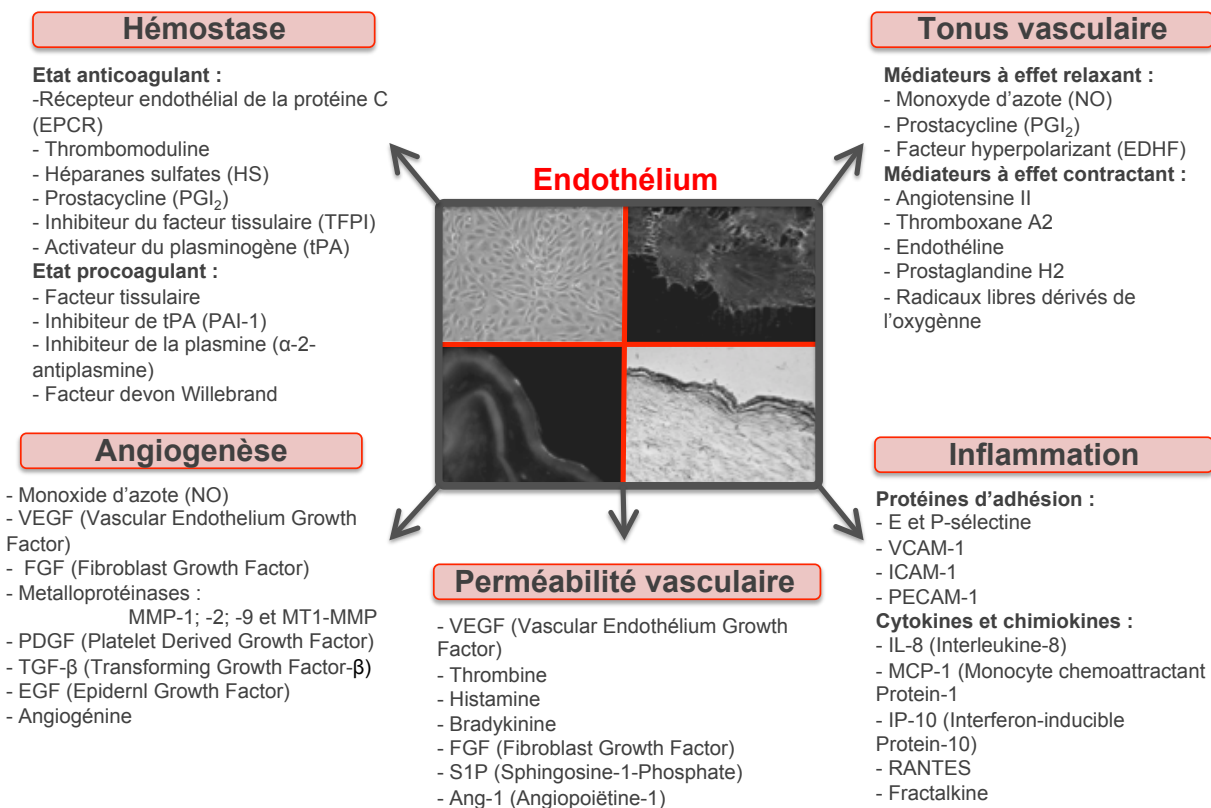


Figure 2 : Fonctions de l'endothélium vasculaire et molécules associées

L'hémostase : Au repos, l'endothélium quiescent présente des fonctions anticoagulante et antithrombotique afin de maintenir la fluidité sanguine. Ainsi, les CE au repos se caractérisent par l'expression de molécules aux propriétés anticoagulantes telles que la thrombomoduline (TM) qui fixe la thrombine libre, le récepteur à la protéine C (EPCR) permettant l'activation de la protéine C pour une action fibrinolytique, les héparanes sulfates (HS), formant avec l'antithrombine un complexe protéique inhibiteur de la thrombine, la prostacycline (PGI_2) inhibant l'agrégation et le dépôt des plaquettes, l'inhibiteur du facteur tissulaire (TFPI), ou encore l'activateur tissulaire du plasminogène (tPA), une protéase catalysant la dégradation du plasminogène en plasmine. Lors d'une lésion vasculaire, les CE vont acquérir des propriétés procoagulantes. Les CE vont alors synthétiser du facteur tissulaire mais également sécréter des inhibiteurs du tPA (PAI-1) ou de son produit, la plasmine (α -2-antiplasmine). Cet état procoagulant de l'endothélium va être complété par la libération

de facteur de von Willebrand (vWF) contenu dans les corps de Weibel-Palade des CE. Le vWF ainsi libéré va alors permettre l'activation des plaquettes. (pour revue : Aird, Circ Res. 2007).

Le tonus vasculaire : En réponse aux forces mécaniques et aux médiateurs neuro-humoraux, les CE vont synthétiser une variété de facteurs aux effets relaxant ou contractant selon le contexte physiologique. Au repos, l'endothélium vasculaire a un effet vasorelaxant sur les CML. En effet, la CE synthétise du monoxyde d'azote (NO) à partir de l'oxygène et d'arginine. La libération de NO par l'endothélium agit directement sur les CML sous-jacentes, provoquant la diminution du calcium intracellulaire, soit la relaxation du muscle lisse vasculaire. La synthèse de NO par la CE, bien que constitutive, peut être régulée par des forces mécaniques que constituent les contraintes de cisaillement exercées par le flux sanguin, mais également en réponse aux médiateurs neuro-humoraux tels que l'acétylcholine ou l'histamine et certaines hormones comme la bradykinine, la vasopressine et la catécholamine (Gewaltig et Kojda., Cardiovasc Res. 2002). Outre l'effet anti-thrombotique de la prostacycline (PGI₂), celle-ci exerce également un effet relaxant sur les CML (Delpy et coll., Br J Pharmacol. 1996), tout comme le facteur hyperpolarisant (EDHF : Endothelium-derived hyperpolarizing factor) de nature chimique encore inconnue (Jin et coll., J Pharmacol Sci. 2011).

A l'inverse, les CE vont pouvoir synthétiser des facteurs aux effets vasoconstricteurs tels que l'angiotensine II, le tromboxane A₂, la prostaglandine H₂ et l'endothéline. Toutes ces molécules ont pour même mécanisme d'action la libération du calcium intracellulaire et/ou l'activation des protéines G de la famille Rho, en particulier la protéine RhoA, dans les CML (Loirand et coll., Trends Cardiovasc Med. 2006). Ainsi, de l'activation des CML s'en suit la phosphorylation de la myosine et l'initiation de la contraction des CML (Gewaltig et Kojda., Cardiovasc Res. 2002) (Saito et coll., Eur J Pharmacol. 2003). Les radicaux libres dérivés de l'oxygène et libérés par les CE ont également un effet vasocontractant en inhibant la synthèse de NO (Shimizu et coll., Br J Pharmacol. 1994).

L'angiogenèse : La croissance vasculaire est un mécanisme physiologique qui se définit par la formation de nouveaux vaisseaux sanguins en l'absence d'un réseau vasculaire préexistant, c'est la vasculogenèse, qui se distingue de l'angiogenèse ou la

formation de vaisseaux à partir d'un réseau vasculaire préexistant. Contrairement à l'angiogenèse, la vasculogenèse est un processus intervenant uniquement au cours de l'embryogenèse (pour revue : Risau et Flamme., Annu Rev Cell Dev Biol. 1995). L'angiogenèse intervient dans de nombreux processus physiopathologiques comme la cicatrisation et la régénération vasculaire ou la croissance tumorale et la libération de métastases. Chronologiquement, l'angiogenèse s'initie par la vasodilatation du vaisseau sanguin sous l'effet du NO, puis l'augmentation de la perméabilité vasculaire par la synthèse de VEGF, et enfin la dégradation de la matrice extracellulaire (MEC) à la suite de la libération de métalloprotéinases telles que MMP-1 (Matrix Metalloprotease-1); -2 ; -9 et MT1-MMP (Membrane Type 1-MMP) contenues dans les vésicules de Weibel-Palade des CE (Rundhaug, J Cell Mol Med. 2005). La dégradation de la MEC permet la libération de facteurs pro-angiogéniques tels que le VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor) et le FGF (Fibroblast Growth Factor). Les CE ainsi activées, n'étant plus liées à la membrane basale, prolifèrent et migrent en un bourgeonnement précurseur d'un nouveau vaisseau. Le contrôle de l'angiogenèse est principalement régi par l'expression de facteurs pro-angiogéniques dont le VEGF et le FGF sont les principaux. D'autres comme le PDGF (Platelet Derived Growth Factor), le TGF- β (Transforming Growth Factor- β), l'EGF (Epidermal Growth Factor), l'angiogénine ou encore l'interleukine-8 (IL-8) sont sécrétés au cours de l'inflammation par les mastocytes, les macrophages ou les kératinocytes. L'interaction de ces molécules avec leur récepteur respectif à la surface des CE induit la prolifération et/ou la migration des CE (Carmeliet et coll. Nature. 2000) (Pober et coll. Physiol Rev.1990) (Gerritsen et coll. FASEB J. 1993).

La perméabilité vasculaire : L'endothélium est constitué d'une monocouche de CE qui forme une barrière cellulaire, semi-perméable, entre le sang et les tissus environnants, régulant de façon sélective le passage et le transport des ions, des macromolécules ou de protéines plasmatiques (Pour revue : Komarova et Malik, Annu Rev Physiol. 2010). Ces molécules peuvent emprunter deux voies distinctes pour échanger au travers de l'endothélium :

La première de ces voies est la voie dite « **paracellulaire** ». Celle-ci utilise les jonctions inter-endothéliales adhérentes et permet uniquement le passage de petites molécules (Mehta et coll., Physiol Rev. 2006). Ces jonctions sont formées en majeure partie par la liaison homophile entre deux molécules de VE-cadhérine. Ce sont des

protéines transmembranaires liées dans leurs domaines intracellulaires aux caténines, elles-mêmes associées au cytosquelette d'actine. En fonction des stimuli que reçoit l'endothélium, les CE vont pouvoir augmenter ou diminuer leur perméabilité paracellulaire. Ainsi le VEGF, l'histamine, la thrombine ou la bradykinine vont accroître la perméabilité paracellulaire en modifiant l'organisation du cytosquelette d'actine, ce qui aura pour effet de diminuer la stabilité des adhésions homophiles de VE-cadhérine. Au contraire, le FGF, la Sphingosine-1-phosphate (S1P), l'Angiopoïétine-1 (Ang-1) favorisent la formation des jonctions paracellulaires, en inhibant la transduction du signal induit par le VEGF ou en favorisant l'expression de la VE-cadhérine, c'est en particulier le cas de S1P.

Le transfert des macromolécules telles que l'albumine ou encore l'insuline, au travers de l'endothélium, est réalisé par voie « transcellulaire ». Celle-ci se résume au transport des macromolécules, à travers la CE, de son pôle apical vers son pôle baso-latéral *via* des vésicules riches en caveoline-1 : les Cavéoles (Minshall et coll., Histochem Cell Biol. 2002). Le transport par voie transcellulaire débute par la reconnaissance de la macromolécule par son récepteur à la surface de la CE. Le couple récepteur/ligand est alors acheminé au niveau des régions membranaires riches en cholestérol et sphingolipides, appelées DRMs (détergent-resistant membrane microdomains) ou « Lipide rafts ». Le recrutement de caveoline-1 initie alors la formation de la cavéole et sa séquestration. Le transport de la cavéole de la face apicale vers la face baso-latérale est alors assuré par l'association de molécules de caveoline-1 de la cavéole au cytosquelette d'actine. Les macromolécules sont ensuite libérées dans l'espace interstitiel par exocytose, soit la fusion de la cavéole à la membrane baso-latérale.

L'inflammation : Lors d'un traumatisme, d'une lésion tissulaire ou d'une infection, l'inflammation au niveau du tissu va induire une activation endothéliale localement (Pober et coll., Transplantation. 1990). Cette activation peut être divisée en deux catégories, dépendantes du temps.

L'activation de type 1 est rapide (quelques minutes) et ne nécessite pas la synthèse d'ARNm. En effet, celle-ci met en jeu la libération de molécules préformées contenues dans les vésicules de stockage de la CE. Elle est induite par les ligands de récepteurs couplés aux protéines G, tels que l'histamine, la thrombine ou les lipopolysaccharides (LPS), et l'activation de kinase Rho-dépendantes aboutissant à

l'ouverture des canaux calciques. L'accumulation d'ions calciques dans la CE permet (1) la libération de NO et de PGI₂, molécules impliquées dans la vasodilatation des vaisseaux, puis (2) la phosphorylation des chaînes légères de la myosine puis la modification du cytosquelette d'actine avec pour conséquences : une augmentation de la perméabilité vasculaire par l'inhibition de la formation des jonctions paracellulaires et l'exocytose des vésicules de stockage aboutissant à l'expression membranaire de la protéine d'adhésion leucocytaire P-sélectine. Cette dernière permet alors le recrutement local des polynucléaires neutrophiles puis des leucocytes (Pober et coll., Nat Rev Immunol. 2007).

L'activation de type 2 est plus tardive et s'initie après la libération de cytokines pro-inflammatoires, principalement le TNF α et l'IL-1, par les leucocytes activés (Pober et Cotran, Transplantation. 1990). La fixation de ces cytokines avec leur récepteur respectif à la surface des CE conduit, par cascade de phosphorylations, à l'activation des facteurs de transcription dont NF κ B et AP1 (Chen et Goeddel, Science. 2002) (Martin et Wesche, Biochim Biophys Acta. 2002). Ces facteurs de transcription vont permettre la synthèse d'autres molécules d'adhésion telles que E-sélectine puis ICAM-1 (Intracellular Adhesion Molecule-1), VCAM-1 (Vascular Cell Adhesion Molecule-1) ainsi que des chimiokines : IL-8 puis MCP-1 (Monocyte Chemoattractant Protein-1), IP-10 (Interféron-inducible Protein-10), CCL5 (ou RANTES) et la fractalkine ; l'ensemble permettant l'attraction et l'adhésion des leucocytes à la surface de l'endothélium. Une fois recrutés, l'extravagation des leucocytes vers les tissus inflammés se fait au travers l'endothélium, soit au niveau des jonctions intercellulaires, via l'homo-interaction PECAM-1 leucocytaire / PECAM-1 endothéliale, soit au travers de la CE (**Figure 3**) (pour revue : Ley et coll., Nat Rev Immunol. 2007).

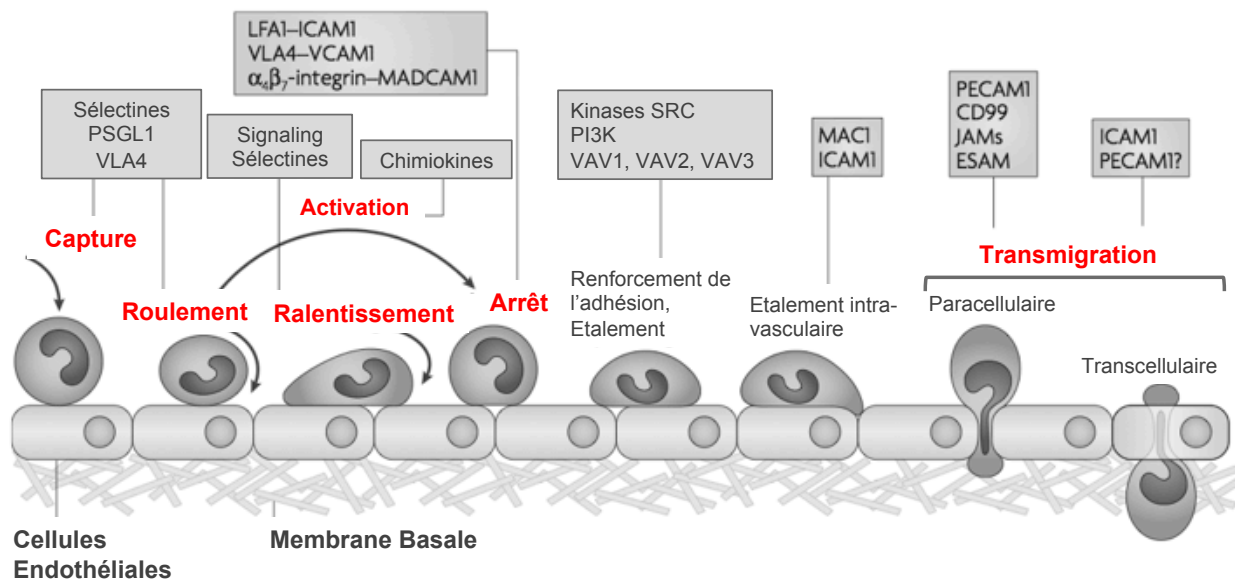


Figure 3 : Cascade d'adhérence des leucocytes sur l'endothélium

D'après Ley et coll., Nat Rev Immunol. 2007

L'endothélium est constamment soumis à des contraintes mécaniques et des stress biologiques (infection, inflammation). Ces phénomènes peuvent, dans certains cas, aboutir à une dysfonction endothéliale et le dérèglement d'une ou de plusieurs fonction(s) liée(s) à l'endothélium. L'activation endothéliale a donc été largement documentée dans de nombreux processus pathologiques tels que l'athérosclérose (pour revue : Lusis, Nature. 2000), l'angiogenèse tumorale (pour revue : Carmeliet et coll. Nature. 2000), le choc septique (pour revue : Annane et coll. Lancet. 2005) et le rejet d'allo-transplantation (pour revue : Aird., Transplantation. 2006).

1-1.1.2 La Cellule Endothéliale : Cible & Acteur de la Réponse Immune en Allo-Transplantation

Lors de la transplantation d'un organe vascularisé (rein, cœur, foie, poumon, pancréas), les CE du greffon forment une interface cellulaire entre l'organe greffé et le patient transplanté. Les CE constituent alors le premier type cellulaire en contact avec les acteurs du système immunitaire du receveur et deviennent, par conséquent, les premières cibles cellulaires de la réponse immune de receveur à l'encontre de son greffon. En plus des diverses fonctions physiologiques de l'endothélium pouvant être altérées suite à l'inflammation résultant de l'acte de prélèvement et de l'ischémie-reperfusion, celui-ci, par l'expression des alloantigènes du donneur, a clairement été associé aux différents types de rejets de greffe : hyperaigu, aigu et chronique (Poher et coll., Transplantation. 1996).

Classification des rejets :

Le rejet hyperaigu est dû à une immunisation du receveur, pré-transplantation, à l'encontre d'un ou de plusieurs antigène(s) du donneur. Il s'agit d'une réaction immunitaire violente à l'encontre du greffon qui survient dans les minutes suivant la greffe. Les anticorps préformés sont le plus souvent dirigés contre les antigènes des groupes sanguins (A et B) et sont donc qualifiés de « naturels » par opposition aux anticorps dits « acquis » dirigés, quant à eux, contre les antigènes du HLA. La survenue de ces derniers étant souvent précédée d'une grossesse ou d'une transfusion sanguine.

Ainsi, de part l'expression des molécules du HLA de classe I et II, les CE du greffon constituent les premières cibles des anticorps allo-réactifs naturels ou acquis post-transplantation. L'interaction des allo-anticorps avec leurs cibles entraînant, de façon synergique, (1) l'activation du complément, induisant la lyse des CE et la destruction de l'endothélium et (2) l'activation endothéliale et l'acquisition d'un statut procoagulant entraînant une thrombose des vaisseaux. L'ensemble aboutissant à la perte du greffon (Cai et coll., Hum Immunol. 2005).

Ce type de rejet est devenu très rare du fait du typage systématique des antigènes des groupes sanguins, des molécules du HLA et de l'association des donneurs et des receveurs en fonction de leurs compatibilités. La caractérisation des anticorps

préexistants chez les receveurs, pré-transplantation, est également devenu une donnée indispensable à l'attribution d'un greffon. Cependant, compte tenu de la grande variabilité inter-individuelle des molécules du HLA, la compatibilité entre donneur et receveur ne peut être totale et une immunisation post-greffe pourra donner lieu à un épisode de rejet.

Le rejet aigu est dû à une immunisation du receveur à l'encontre de son greffon post-transplantation. Il s'agit là d'une réponse immunitaire dite adaptative qui, par définition, survient dans les semaines à plusieurs mois après la greffe. Le rejet aigu met en jeu les cellules de l'immunité ; Les lymphocytes T, c'est le rejet aigu à médiation cellulaire, ou/et les lymphocytes B, c'est le rejet aigu à médiation humorale.

La chronologie du **rejet aigu cellulaire** débute par la migration des Cellules Présentatrices d'Antigènes (CPA), en particulier les Cellules Dendritiques (CD) du donneur, du greffon vers les organes lymphoïdes secondaires du receveur. Là, les CD vont présenter aux lymphocytes T naïfs les allo-antigènes du donneur. S'en suivent, une activation et une prolifération lymphocytaire des T alloréactifs. Ces derniers, migrent alors vers le greffon, attirés par les chimiokines, notamment produites par l'endothélium activé, puis l'infiltrant. A ce stade, l'infiltrat cellulaire n'est pas restreint aux T allo-réactifs. Les macrophages, les monocytes, les neutrophiles et les cellules NK vont également pouvoir infiltrer le greffon et maintenir la réponse T spécifique de l'allo-antigène. Les premières cellules lésées seront les CE, premières cibles des T alloréactifs puisque présentant les allo-antigènes via les HLA de classe I et II (Briscoe et coll., Curr Opin Immunol. 1998). L'ensemble de ces cellules infiltrant le greffon provoque des lésions tissulaires, la thrombose des vaisseaux puis la perte de la fonction du greffon.

Les traitements immunosuppresseurs utilisés de façon préventive, les corticostéroïdes, les inhibiteurs de la voie de synthèse de novo des purines (Mycophénolate mofétil (MMF)), les anticalcineurines (cyclosporine ou tacrolimus) pourront être associés, dans le cas d'un rejet aigu cellulaire avéré à des traitements ciblant spécifiquement les lymphocytes T par l'utilisation d'anticorps monoclonaux dirigés contre le récepteur à l'IL-2 ou la molécule CD3, ou l'utilisation d'anticorps polyclonaux anti-lymphocytaires (thymoglobuline), permettant la déplétion de la population lymphocytaire T, mais ciblant également les lymphocytes B, les CD et bloquant les molécules d'adhésion leucocytaire (ICAM-1, -2, -3, intégrine alpha4/b7...).

Le **rejet aigu à médiation humorale** s'initie par la reconnaissance spécifique d'un lymphocyte B naïf circulant, via son immunoglobuline de surface, d'un antigène du donneur. Le complexe Immunoglobuline de surface/Allo-antigène est ensuite internalisé puis ledit antigène est présenté à la surface du lymphocyte B via le CMH de classe II. Seule l'interaction prolongée du lymphocyte B avec le TCR d'un lymphocyte T effecteur spécifique du même antigène, en présence de signaux de costimulation (CD40/CD40L), précède l'activation du lymphocyte B allo-réactif et la formation d'un centre germinatif (pour revue : Montgomery et coll., Semin Immunol., 2011). Le rejet aigu à médiation humorale est caractérisé (1) par des lésions tissulaires sévères avec infiltration de neutrophiles, macrophages, et/ou monocytes et thrombose des vaisseaux. (2) Un dépôt de C4d constitue également un marqueur caractéristique du rejet humoral aigu qui est souvent associé à (3) la présence d'anticorps circulants dirigés contre le donneur (Racusen et Haas., Clin J Am Soc Nephrol. 2006) (Süsal et Opelz, Methods Mol Biol. 2012). Là encore, les CE du donneur demeurent la première cible des allo-anticorps, et l'activation endothéliale qui en résulte participe activement au maintien de l'inflammation favorisant la survenue du rejet (pour revue : Colvin et Smith., Nat Rev Immunol. 2005).

Le traitement curatif du rejet aigu humoral consiste, en plus du traitement immunosuppresseur préventif (corticostéroïdes, inhibiteur de la voie de synthèse de novo des purines (MMF), inhibiteurs des calcineurines (cyclosporine ou tacrolimus)), en l'élimination des anticorps alloréactifs circulants par plasmaphérèse et injection intraveineuse d'immunoglobulines (IVIg). Celui-ci peut être associé, selon les cas, à l'utilisation d'anticorps monoclonaux anti-CD20 (Rituximab) ciblant spécifiquement les lymphocytes B et/ou des anticorps anti-lymphocytaires; Thymoglobuline (Pescovitz et coll., Am J Transplant. 2006) (pour revue : Montgomery et coll., Semin Immunol. 2011).

L'attribution des greffons en faveur d'une compatibilité donneur/receveur la meilleure possible, l'identification des mécanismes du rejet aigu, à médiation cellulaire ou humorale, permettant d'adapter les traitements immunosuppresseurs au cas par cas, ont permis de considérablement diminuer l'incidence du rejet aigu jusqu'à atteindre le chiffre de 5% pour la transplantation rénale à un an post-greffe.

De nos jours la survie des greffons à un an post-greffe est supérieure à 90%.

Cependant la survie du greffon décroît significativement de près de 5% chaque année au-delà de la première année. **Le rejet chronique ou dysfonction chronique** du greffon, également connu sous le terme de Néphropathie Chronique d'Allo-greffe (NCA), en transplantation rénale, demeure la principale cause de perte du greffon passée la première année post-transplantation. Celle-ci se caractérise par des atteintes histologiques caractéristiques associant fibrose interstitielle et atrophie tubulaire (FI/AT) (Solez et coll., Am J Transplant. 2007) avec des atteintes glomérulaires dans le cas d'une transplantation rénale (Ramirez et coll., Am J Transplant. 2006) (Thaunat et coll., Transplantation. 2008).

Les facteurs de risques associés au rejet chronique d'allogreffe peuvent être d'origines immunologiques et/ou non immunologiques (Libby et Pober., Immunity. 2001). Parmi les facteurs non immunologiques, on considère en premier lieu l'âge du donneur, la présence de microlésions dues à l'ischémie reperfusion puis à la néphrotoxicité des anticalcineurines, la survenue d'infections et l'ensemble des facteurs environnementaux pouvant altérer les fonctions vitales du receveur (Tabagisme, dyslipidémie...). Concernant les mécanismes immunologiques associés au rejet chronique, le rôle des lymphocytes T a depuis longtemps été identifié dans la survenue des lésions du rejet chronique. En effet, le blocage de la costimulation des lymphocytes T (CD40/CD40L ; CD28/CTLA4/B7) dans des modèles de souris transgéniques KO ou par l'utilisation d'anticorps monoclonaux a permis de considérablement augmenter la survie du greffon à long terme (Guillot et coll., J Immunol. 2002) (pour revue : Poirier et coll., Am J Transplant, 2012). Récemment, grâce aux nouvelles techniques de détection des anticorps circulants comme le LUMINEX, la survenue tardive d'anticorps allo-réactifs, a été largement documentée chez les receveurs présentant un rejet chronique histologiquement avéré (Thaunat., Transpl Immunol. 2012). La présence de dépôts capillaires de C4d dans les biopsies de patients transplantés rénaux suggère un rôle important des anticorps dans le rejet chronique d'allo-greffe (Regele et Bohmig., Curr Opin Nephrol Hypertens. 2003), tout comme la description récente de la formation de structures cellulaires qualifiées « d'organes lymphoïdes tertiaires » au niveau du greffon et contenant des lymphocytes B activés synthétisant des allo-anticorps (Thaunat et coll., Proc Natl Acad Sci. 2005). Cependant la présence d'anticorps circulants n'est pas systématiquement associée à un dépôt de C4d. D'autres mécanismes dépendant des allo-anticorps ont été incriminés pour expliquer les lésions du rejet chronique. En effet,

comme dans tous les types de rejet, les CE du donneur vont être la cible privilégiée des anticorps allo-réactifs. Leur fixation à la CE peut, dans certains cas, en particulier lorsque que le titre sérique des anticorps est faible, induire l'activation et la prolifération endothéliale. Les CE du donneur vont alors s'activer, exprimer des molécules impliquées dans les mécanismes d'adhésion lymphocytaire. Les CE vont également synthétiser des facteurs de croissance (FGF, VEGF, TGF- β , endothéline I...) (Rossini et coll., *Kidney Int.* 2005) stimulant les cellules musculaires lisses et les myofibroblastes (Haurani et coll., *Hypertension.* 2008 ; Wynn., *J Pathol.* 2008), cellules responsables de la synthèse de la matrice extracellulaire, particulièrement observées dans les coupes histologiques du rejet chronique.

Le traitement du rejet chronique est intimement lié à la nature et l'origine des lésions observées et se fait donc au cas par cas. La diminution et/ou la modification de l'immunosuppression pourront être envisagées si le patient souffre de lésions liées à la néphrotoxicité des anticalcineurines. Dans ce cas, l'utilisation d'un inhibiteur de la voie mTOR (Sirolimus ou Rapamycine) semble être une alternative efficace (Najafian et Kasiske., *Curr Op Nephrol Hypertens.* 2008). Si le rejet est dû à une cause d'ordre immunologique, l'immunosuppression pourra être adaptée en fonction des caractéristiques du rejet (humoral ou cellulaire).

Les mécanismes de lésion de l'endothélium par les allo-anticorps :

Il existe plusieurs mécanismes par lesquels les anticorps dirigés contre le greffon peuvent induire une lésion de l'endothélium (pour revue : Colvin et Smith, *Nat Rev Immunol.* 2005). Le premier résulte de l'activation du complément. Chronologiquement, après reconnaissance de sa cible à la surface des CE, la région Fc des anticorps est reconnue par la sous-unité C1q du complexe protéique C1 circulant, composé des sous-unités C1q, C1r et C1s. L'affinité du C1q pour la partie Fc des immunoglobulines (Ig) est dépendante du type et du nombre d'immunoglobulines en complexe avec leur cible. Le C1q reconnaît les régions Fc des IgG3 et IgG1, plus faiblement les IgG2 et IgG4, et celle des IgM lorsque celles-ci sont en complexe avec l'antigène. L'activation de C1 entraîne en cascade la formation du complexe d'attaque membranaire C5b-9, responsable de la lyse de la CE. Il s'agit là de la voie classique d'activation du complément. Les sous-unités C3a et C5a, libérées à la suite de l'activation du complément, vont agir directement sur les CE en se fixant à leur récepteur respectif et activer les CE entraînant l'acquisition d'un

statut pro-inflammatoire par l'expression de molécules d'adhésions (E-selectine, VCAM-1, ICAM-1...) et la libération de cytokines et chimiokines (IL-1 α , IL-6, IL-8, RANTES...) et initiant ainsi un processus de thrombose des vaisseaux du greffon (Albrecht et coll., *Am J Pathol.* 2004) (Monsinjon et coll., *FASEB J.* 2003). Les sous-unités C5a et C5b vont également pouvoir agir de façon indirecte sur l'endothélium du greffon en stimulant la libération locale d'histamine par les mastocytes et de prostaglandine E₂ par les macrophages (Nakashima et coll., *J Immunol.* 2002). Par ailleurs, des doses sublytiques de C5b-9 ont été décrites comme provoquant l'activation des CE qui vont alors synthétiser des chimiokines et des facteurs de croissance tels que le PDGF (platelet-derived growth factor) et le bFGF (basic fibroblast growth factor) (Benzaquen et coll., *J Exp Med.* 1994) (Selvan et coll., *J Immunol.* 1998). Au cours de cette cascade d'activation du complément, la sous-unité C4b inactivée, ou C4d, reste fixée à la surface du tissu endommagé, ce qui en fait un marqueur de l'activation du complément lorsque celle-ci est observée par immunohistochimie ou immunofluorescence sur les biopsies des greffons (Collins et coll., *J Am Soc Nephrol.* 1999) (Bohmig et coll., *J Am Soc Nephrol.* 2002). Cependant la présence de C4d dans les biopsies des greffons n'est pas suffisante, ni indispensable, pour établir un diagnostic de rejet à médiation humorale (Loupy et coll., *Am J Transplant.* 2009) (Loupy et coll., *Am J Transplant.* 2011).

En effet, la fixation des anticorps sur l'endothélium du greffon peut entraîner la lyse de l'endothélium sans faire intervenir le complément. Les anticorps en complexe avec leurs épitopes à la surface de la CE peuvent interagir, via leur région Fc, avec les cellules NK, les monocytes ou encore les T $\gamma\delta$ qui expriment à leur surface des récepteurs Fc. L'interaction Fc/récepteur Fc entraînant l'activation de la cellule effectrice et la lyse de la cellule cible. Ce mécanisme se définit par la cytotoxicité cellulaire dépendante des anticorps, ou ADCC (Antibody-dependent cellular cytotoxicity) (pour revue des différents types de récepteurs Fc et de leurs fonctions : Woof et Burton., *Nat Rev Immunol.* 2004). Le rôle de l'ADCC dans les lésions du rejet humoral n'a pas, jusqu'à présent, été clairement établi chez l'homme. Très récemment, Hirohashi et collaborateurs, par l'utilisation de plusieurs modèles murins déficients en cellules NK ou en sous-unité C3 du complément, ont montré l'importance des NK et de la région Fc des anticorps anti-donneur dans les lésions thrombotiques apparues ici post-transplantation cardiaques (Hirohashi et coll., *Am J Transplant.* 2012). De façon intéressante, Yuan et collègues ont corrélé le polymorphisme du récepteur Fc CD32 à un

plus fort risque de survenue du rejet aigu, après transplantation rénale (Yuan et coll., Transplantation. 2004).

Les anticorps, seuls, peuvent être à l'origine des lésions observées au cours du rejet à médiation humorale. En effet, le groupe de Elaine Reed a publié une série d'articles montrant les effets de la fixation des anticorps sur l'activation et la prolifération endothéliale. Ces études ont décrit, en particulier, un mécanisme au cours duquel les anticorps anti-HLA de classe I induisent l'expression des protéines à effets anti-apoptotiques BCL-2 et BCL-xL, via les voies de phosphorylation PI3K/Akt (Jin et coll., Hum Immunol. 2004). La synthèse de FGFR (Fibroblast growth factor receptor) a également été documentée dans les mêmes conditions (Harris et coll., J Immunol. 1997) (Jindra et coll., Transplantation. 2006). Cet état d'activation de la CE étant associé à une augmentation de la prolifération cellulaire. Notre équipe a aussi mis en évidence un effet des anticorps anti-HLA de classe I et II sur la prolifération des CE via l'activation de la voie RhoA-PI3K et PKC (Coupel et coll., J Am Soc Nephrol. 2004) (Le Bas-Bernardet et coll., Transplantation. 2004). Plus tôt, Le Bas-Bernardet et collaborateurs avaient montré un effet pro-apoptotique des anticorps, non HLA, dirigés contre les CE (Le Bas-Bernardet et coll., Am J Transplant. 2003)

L'ensemble de ces études suggère un rôle important de l'activation endothéliale par les anticorps anti-donneur, post-transplantation, dans les lésions du rejet chronique à médiation humorale, en particulier lorsque celui-ci est diagnostiqué par la présence d'anticorps, une absence de dépôt de C4d ainsi qu'une inflammation et une thrombose des micro-vaisseaux (Hill et coll., J Am Soc Nephrol. 2011) (**Figure 4**).

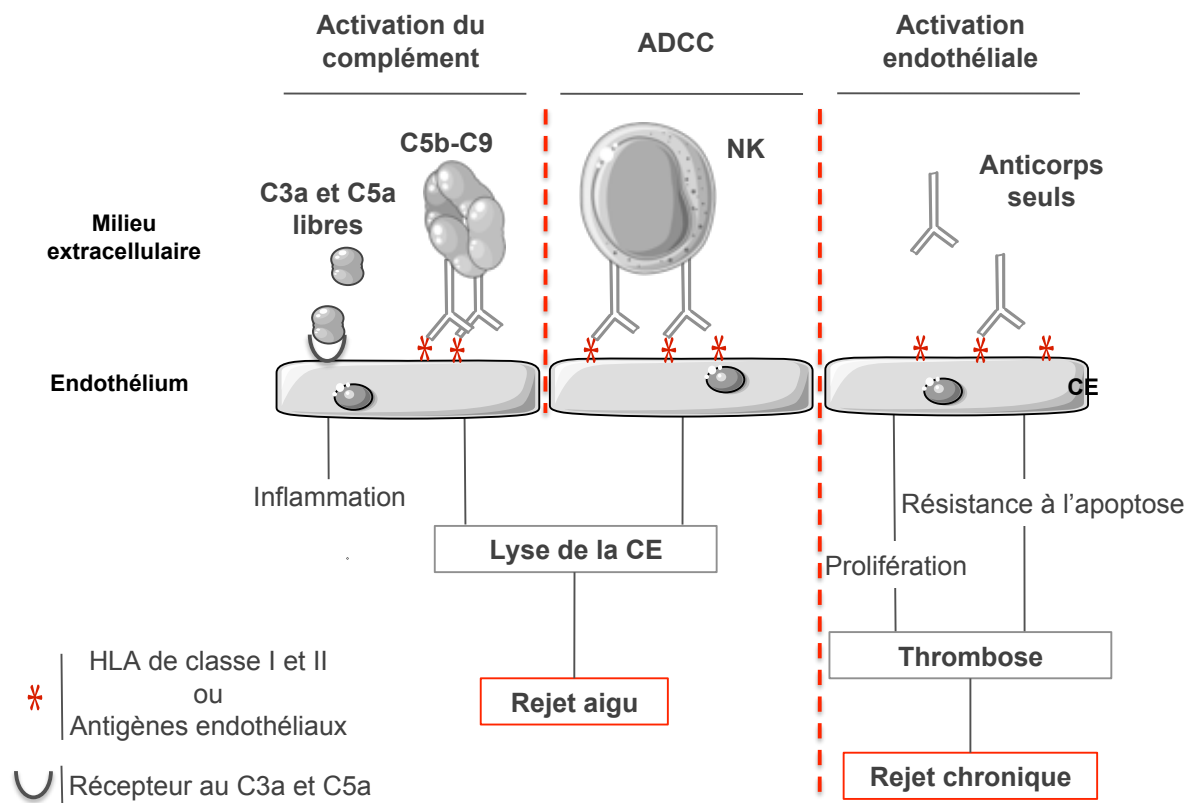


Figure 4 : Impact de la reconnaissance des cellules endothéliales par les allo-anticorps sur le rejet de transplantation.

1-1.1.3 Les Allo-Anticorps et leurs cibles en allo-transplantation : Emergence des antigènes « non-HLA »

La classification des rejets, utilisant les caractéristiques précises des lésions rencontrées et identifiant l'origine de celles-ci (Non-Immunologiques, Immunologiques à médiation cellulaire ou humorale), est primordiale pour la mise en place d'une thérapeutique efficace. Néanmoins, il est évident que la réalité est loin d'être aussi segmentaire. Les lésions peuvent avoir diverses origines et utiliser divers médiateurs. En effet, les allo-anticorps ont depuis longtemps été identifiés comme les médiateurs du rejet (Lee et coll., Transplantation. 2002) et sont retrouvés dans tous les types de rejet y compris dans le rejet aigu cellulaire (Zhang et coll., Transplantation. 2005). Dans la « Théorie Humorale de la Transplantation » (Cai et Terasaki, Hum Immunol. 2005), les auteurs, à travers l'analyse de plusieurs études cliniques, posent les bases d'un concept nouveau en allo-transplantation. Ceux-ci considèrent les anticorps allo-réactifs comme seuls/principaux responsables des lésions. Dans ce scénario, l'infiltrat cellulaire serait alors essentiel pour le maintien ou l'amplification de l'inflammation.

Partant de ce postulat, la question ne serait plus de savoir si il y a ou non présence d'allo-anticorps dans les sérums des receveurs subissant un épisode de rejet, mais de savoir si nous sommes en mesure de les détecter. En effet, la détection de ceux-ci repose uniquement sur des techniques utilisant, soit les cibles de ces anticorps alloréactifs (protéines solubles ou recombinantes) fixées sur des billes (Luminex) ou au fond d'un puits (ELISA), soit directement les cellules sanguines du donneur (cross-match lymphocytaire). Cette dernière technique, bien que présentant plusieurs limites, à savoir (1) de ne mettre en jeu que des antigènes lymphocytaires et non l'ensemble des antigènes du greffon et (2) de ne détecter que les anticorps qui fixent le complément (méthode utilisée pour lyser les cellules de donneur), à l'avantage de déceler une allo-réactivité spécifique du donneur (DSA : Donor-Specific Antibodies) par l'exposition d'une multitude d'antigènes différents à la surface cellulaire. Cette technique semble donc être la plus fiable pour déceler une immunisation délétère avérée pour le greffon (Süsal et Opelz, Methods Mol Biol. 2012). Néanmoins, les techniques utilisant un panel de protéines solubles ou recombinantes pour la détection des anticorps circulants permettent une caractérisation qualitative et quantitative (en particulier pour le Luminex) de ces anticorps (Pour revue des différentes techniques utilisées pour la

détection des anticorps : Bontadini, Methods. 2012). Par ailleurs, ces dernières années, le développement de ces outils, utilisant toujours un plus large spectre de protéines cibles, a permis d'identifier de nouvelles cibles antigéniques reconnues par les anticorps circulants.

En effet, bien que les cibles antigéniques principales soient bien connues ; il s'agit principalement des antigènes des groupes sanguins et des molécules du HLA de classe I et II, de nombreuses études mettent en lumière des anticorps non-HLA dans le sérum de certains transplantés (pour revue : Zhang et Reed, Curr Opin Immunol. 2010). Ainsi, l'étude multicentrique dirigée par le Pr. Gerhard Opelz, analysant les sérums et les survies de 4048 transplantés rénaux de typage HLA identique avec leur donneur, a révélé la présence d'anticorps anti-donneur chez 1047 de ces patients et une survie significativement plus faible à 10 ans post-greffe par comparaison aux patients sans anticorps anti-donneur (Opelz, Lancet. 2005). Plus tard, les travaux de Worthington (Worthington et coll., Transplantation, 2007) ont montré que sur 36 transplantés rénaux présentant une dysfonction du greffon, associée à la présence de C4d, 9 patients présentaient des anticorps anti-HLA dont seulement 3 étaient spécifiques du donneur, suggérant la présence chez ces patients d'anticorps allo-réactifs spécifiques d'antigènes non-HLA.

Des anticorps anti-CE (AECA : Anti-Endothelial Cell Antibodies) ont par ailleurs été identifiés dans les différents types de rejet (hyperaigu, aigu et chronique) ainsi que dans tous types d'organes et leur présence, pré-transplantation, prédit une diminution de la survie du greffon à long terme (Le Bas-Bernardet et coll., Am J Transplant. 2003) (Ismail et coll. Exp Clin Transplant, 2009). Des antigènes non-HLA, endothéliaux ou non, ont depuis peu été documentés avec plus de précision chez nombre de transplantés. Ces nouvelles cibles sont, en particulier, les molécules du CMH de classe I non classique MICA et MICB (MHC Class I related Chain A and B). Ces protéines membranaires, notamment exprimées à la surface des CE, présentent un haut degré de polymorphisme. C'est tout particulièrement le cas des antigènes MICA avec 94 allèles recensés (<http://hla.alleles.org>). La présence d'anticorps allo-réactifs dirigés contre MICA a été corrélée à une diminution de la survie du greffon après transplantation rénale (Zou et coll., N Eng J Med. 2007) (Terasaki et coll., Am J Transplant. 2007), cardiaque (Suarez-Alvarez et coll., Am J Transplant. 2007) (Zhang et coll., Transplantation. 2011) et

pulmonaire (Angaswamy et coll., Hum Immunol. 2010). D'autres antigènes dits « mineurs » car peu ou non polymorphes ont été associés au rejet de greffe. Le potentiel immunogène de ces derniers dépendant uniquement du fait que, normalement non exposés puisque intracellulaires, les lésions et l'inflammation résultantes de l'ischémie-reperfusion puis de la chirurgie, ont pu exposer ces antigènes au système immunitaire du receveur. Mis à part le récepteur à l'angiotensine de type I, exprimé dans les glomérules (Dragun et coll., N Eng J Med. 2005), ces antigènes sont pour la plupart impliqués dans le cytosquelette cellulaire. On retrouve parmi ceux-ci, la vimentine qui est exprimée par les CE et les cellules musculaires lisses vasculaires (Jurcevic et coll., Transplantation 2001), la tubuline K-alpha1 impliquée dans la formation des microtubules dans les cellules épithéliales et la myosine cardiaque. On retrouve également des constituants de la matrice extracellulaire participant au maintien des structures tissulaires, le HSPG perlecan (HSPG : heparan sulfate proteoglycan), les collagènes IV, V et VI (Joosten et coll. Am J Pathol. 2002) (Burlingham et coll., J Clin Invest, 2007) et L'HSPG agrine (Joosten et coll. Am J Transplant. 2005). Très récemment, le groupe de Paul Terasaki a mis en exergue, non seulement la présence dans les sera de transplantés rénaux et hépatiques d'anticorps dirigés contre les molécules peu polymorphes du HLA-E (deux allèles décrits), mais également une cross-réactivité de ces anticorps avec les molécules du HLA de classe I (Ravindranath et coll., Int Immunol. 2012). Ainsi, de part la nature non ou peu polymorphe de ces cibles, la pathogénicité des anticorps dirigés contre les antigènes mineurs semble se situer à la frontière entre auto- et allo-réactivité.

Bien que le rôle des anticorps non-HLA a clairement été identifié dans les différents types de rejets, leur survenue reste peu documentée. Par sa nature hautement polymorphe, la protéine MICA semble être une excellente candidate pour la mise en place d'une immunisation à l'encontre du donneur dans un contexte d'allo-transplantation. Le génotypage de MICA associé à une analyse de la compatibilité entre donneur et receveur demeure le seul et l'unique moyen pour déterminer l'impact réel d'un mismatch MICA sur l'induction d'allo-anticorps post-transplantation. Un effort particulier devra être réalisé en ce sens, ainsi que dans la caractérisation de nouveaux antigènes mineurs et des mécanismes de rejet qui y sont associés (isotypes, activation du complément, activation cellulaire...).

1-1.2 Immunosuppression et Complications Post-Transplantation

Si les progrès de la médecine, l'amélioration des techniques chirurgicales, la limitation des patients à risque par une meilleure analyse de la compatibilité des couples donneur/receveur ont permis de considérablement augmenter la survie des greffons, celle-ci reste très dépendante de l'immunosuppression. L'identification des mécanismes immunologiques impliqués dans les différents types de rejets permet d'adapter ces traitements immunosuppresseurs dans une optique de prolonger au possible la fonction du greffon. Cependant, ces traitements ne sont pas sans risques. Outre les effets toxiques de certains immunosuppresseurs (anti-calciéurines), les receveurs immunodéprimés sont plus sujets aux infections opportunistes, à la réactivation de virus latents et au développement de cancers.

1-1.2.1 Les infections post-greffe

Les infections demeurent les principales causes de complication post-transplantation (Pour revue : Fishman., N Engl J Med. 2007). La survenue de celles-ci est dépendante de plusieurs facteurs incluant les statuts infectieux du donneur et du receveur au moment de la greffe, le type de transplantation et les éventuelles complications chirurgicales au moment de la transplantation qui fragilisent le receveur. Les infections peuvent être opportunistes post-transplantation ou directement transmises du donneur au receveur, mais toujours favorisées par l'immunosuppression.

1-1.2.1a Les infections bactériennes, fongiques et parasitaires

Les infections bactériennes sont les plus fréquentes post-transplantation et surviennent généralement dans les premiers jours suivant la greffe. Il s'agit le plus souvent d'infections bactériennes à *Staphylococcus aureus*, *pseudomonas* ou *enterococcus*. La transmission de *Mycobacterium Tuberculosis* du donneur au receveur a également été documentée (Rose, Can J Infect Dis Med Microbiol. 2005). Bien que moins fréquentes, les infections fongiques par *Candida*, *Aspargillus*, *Clostridium*, *Pneumocystis* ou encore *Cryptococcus*, tout comme les infections parasitaires à

Toxoplasma ou *Leishmania*, surviennent également très tôt après la greffe. Toutes ces infections sont alors rapidement maîtrisées par l'induction d'un traitement antibiotique, antifongique ou antiparasitaire adapté, en prophylaxie ou en curatif.

1-1.2.1b Les infections virales

Les infections virales sont plus problématiques et peuvent avoir de graves effets sur la survie de la greffe. Ces infections résultent soit d'une primo-infection, c'est en particulier le cas lorsque le donneur est séropositif alors que le receveur non, ou d'une réactivation favorisée par l'immunosuppression. Dans ce dernier cas, les virus incriminés sont le plus souvent des virus en latence, résultant d'une primo-infection, la plupart du temps survenue durant la petite enfance et asymptomatique. C'est pourquoi ces virus ont, à l'âge adulte, une forte prévalence. On retrouve parmi ceux-ci, le Cytomégalo virus (CMV), l'Epstein-Bar Virus (EBV), les Herpès virus (HHV-1,-2, -6, -7 et -8), le Varicella Zoster Virus (VZV) et les polyomavirus (JC et BK virus). Les virus des hépatites B et C (VHB, VHC) ainsi que le VIH font également l'objet d'une surveillance accrue post-transplantation.

Les infections à CMV peuvent être des plus sévères particulièrement s'il s'agit d'une primo-infection ou lorsque que le donneur est séropositif pour un receveur séronégatif (Lowance et coll. N Engl J Med. 1999) (Sagedal et coll., Am J Transpl. 2002). La séroprévalence est de l'ordre de 40% parmi la population adulte pour ce virus de la famille des herpesviridae connu aussi sous la dénomination de HHV-5 (Human Herpesvirus-5). Ainsi, la primo-infection ou la réactivation post-transplantation du CMV peut avoir des effets directs ou indirects sur la survie du greffon. En effet, dans le cas d'une infection sévère à CMV ou maladie tissulaire invasive à CMV (Arthurs et coll., Clin Infect Dis. 2008), les lésions de l'organe infecté, résultant d'une forte réplication virale, peuvent amener à la perte de fonction puis au rejet. Les effets indirects sur la survie du greffon résultent d'une infection non maîtrisée et prolongée dans le temps, pouvant aboutir à l'athérosclérose ou au développement d'un syndrome lymphoprolifératif post-transplantation (PTDL : Post-Transplantation Lymphoproliferative Disorder).

Les infections à l'EBV sont également associées à la survenue de PTDL, principalement des lymphomes à lymphocytes B, qui représentent moins de 3% des greffés (Newell et coll., Transplantation. 1996). Ce virus de la famille des herpesviridae (HHV-4), vecteur de la mononucléose infectieuse, est présent sous forme latente chez

près de 90% de la population adulte. Sa réactivation post-transplantation du fait de l'immunosuppression est donc fréquente en l'absence de prophylaxie.

Les herpes virus HSV-1 et -2 ont une séro-prévalence chez l'adulte de, respectivement, 60% et 20% (Xu et coll., J Inf Dis. 2002). Leur réactivation post-transplantation est également fréquente en l'absence de traitement prophylactique et touche alors près de 25 à 35% des transplantés, tous organes confondus (Dummer., Transplantation. 1983) (Kusne et coll., J Inf Dis. 1991). Celles-ci surviennent dans les premiers mois post-transplantation et se limitent à des atteintes tissulaires oro-labiales (HSV-1) ou génitales (HSV-2) en fonction du virus. En l'absence de traitement antiviraux et favorisée par l'immunosuppression, la dissémination du virus peut alors causer des hépatites ou des pneumonies.

La réactivation des **herpes virus HSV-6 et -7**, présent de façon quasi ubiquitaire dans la population adulte, a également été décrite dans les premiers mois suivant la greffe. La réactivation de ces deux virus à tropisme lymphocytaire trouvant latence dans les monocytes, est observée pour tous types d'organes transplantés (35%) et dans une proportion plus importante après greffe de cellules souches hématopoïétiques (60%). Leur réactivation a été associée au rejet de transplantation et à une réactivation du CMV (Singh et coll. Am J Infect Control. 1997).

L'herpes virus HSV-8 est, quant à lui, très peu représenté parmi la population adulte avec une prévalence de moins de 10%. Il s'agit là aussi d'un virus à tropisme lymphocytaire dont la réactivation chez des patients immunodéprimés est associée au développement du Sarcome de Kaposi (Chang et coll., 1994. Science) touchant moins de 5% des transplantés (Ariza-Heredia et Razonable., Transplantation. 2011).

Le Varicella-Zoster Virus (VZV ou HHV-3) a une séroprévalence de l'ordre de 90% au sein de la population adulte. Sa réactivation post-transplantation se traduit par l'apparition de lésions cutanées caractéristiques (Zona) aux sites de réactivation du virus qui a un tropisme pour les cellules nerveuses ganglionnaires (intercostales ou optiques). Dans certains cas la réactivation peut entraîner des atteintes viscérales sévères. (Arvin et coll., Biol Blood Marrow Transplant. 2000) (Miller et Dummer., Am J Transplant, 2007).

Les patients préalablement infectés par **les virus des hépatites B ou C** sont également très à risque de récurrence post-transplantation, en particulier dans le cas d'une greffe hépatique. Ainsi, en l'absence de prophylaxie spécifique, les taux de récurrence pour

les HBV et HCB représentent, respectivement, 80% et 90% des transplantés hépatiques. Bien que les traitements prophylactiques par antiviraux et immunoglobulines anti-VHB ont fait leurs preuves pour diminuer la récurrence à VHB (-70% de récurrence) (Roche et coll., Presse Med. 2007), ceux-ci sont peu efficaces pour prévenir la réactivation du VHC. De nos jours, le risque de primo-infection à VHB par un donneur séropositif est écarté par la vaccination systématique des patients sur liste d'attente. L'utilisation d'organes issus de donneurs séropositifs pour le VHC est principalement réservée aux patients séropositifs écartant le risque de primo-infection. La transplantation allogénique, bien que nécessitant une immunosuppression importante, s'est avérée possible chez **les patients infectés au virus du VIH**, présentant une virémie stabilisée par un traitement antiviral adéquat, sans pour autant favoriser l'évolution vers le SIDA ni vers des complications infectieuses et/ou tumorales (Kuo et coll., Transplantation, 2001) (Halpern et coll., N Eng J Med, 2002). Cependant, les réactivations du HCV chez les patients co-infectés VIH/VHC présentent une sévérité plus importante (Duclos-Vallée et coll., Hepatology. 2008)

Les BK et JC virus sont tous deux des virus à ADN de la famille des polyomaviridae. Leurs prévalences sont de 80% pour le BK et 50% pour le JC (Gardner et coll., J Clin Pathol 1984) à l'âge adulte. Favorisé par l'immunosuppression, le BK virus se réactive chez 30% à 40% des transplantés, en particulier chez les transplantés rénaux (Hirsch et coll., N Engl J Med, 2002). En effet, le BK virus ayant un tropisme pour les cellules épithéliales tubulaires rénales, sa réactivation, si non maîtrisée, peut entraîner une néphropathie tubulo-interstitielle (BKVN : BK Virus Nephritis). Celle-ci touche 5% à 8% des transplantés rénaux suivant la première année post-greffe et constitue de nos jours une des principales causes du rejet chronique d'allo-greffe rénale (Bohl et Brennan., Clin J Am Soc Nephrol, 2007). De très rares cas associent la réactivation du JC virus à la survenue des néphropathies. Cependant, du fait d'un neurotropisme, en particulier pour les oligodendrocytes, le JC virus a été clairement associé au diagnostic de la leucoencéphalopathie multifocale progressive chez des patients immunodéprimés. Diagnostique dont l'issue est bien souvent fatale (White et coll., J Virol., 1992) (pour revue : Bellizzi et coll., J Neurovirol. 2012).

Les primo-infections ont les conséquences les plus graves en allo-transplantation. Ainsi, les enfants sont particulièrement à risque pour ce genre d'infection post-greffe étant donné leur plus faible prévalence au moment de la greffe. L'identification des patients à risque est donc primordiale afin de prévenir d'éventuels risques infectieux post-transplantation. Celle-ci repose sur des techniques de PCR et de sérologie. Les traitements prophylactiques d'un ou d'une combinaison de plusieurs anti-viraux (Ganciclovir, Aciclovir, Valganciclovir) associés ou non avec un traitement par immunoglobulines spécifiques et/ou une diminution de l'immunosuppression ont permis de considérablement diminuer la récurrence pour la plupart des infections virales post-greffe (CMV, EBV, HSV, VZV, HBV...). Cependant ces traitements se sont montrés peu efficaces pour maîtriser la réactivation de certains virus comme l'HCV ainsi que les polyomavirus JC et BK. Les mécanismes virologiques et immunologiques impliqués dans la primo-infection, la latence puis la réactivation de ces virus devront être investigués pour la mise en place de nouveaux traitements efficaces. La question de la grande inter-individualité face à la récurrence devra également être explorée. En d'autres termes, comment expliquer qu'à âge, environnement, immunosuppression et statut virologique identique, un patient va subir une réactivation virale alors qu'un autre non ? En effet, la pression sélective des bactéries et des virus au cours de l'évolution a permis de mettre en évidence des polymorphismes génétiques conférant une plus forte protection de l'hôte (CCR5, TLR4, HLA-B*53, *57...) (Pour revue : Hill., Annu Rev Genet. 2006).

Une meilleure connaissance, à la fois (1) des mécanismes de l'immunité innée impliqués très tôt dans la maîtrise de l'infection (ligands de NKG2D : MICA-B, ULBP-1-2-3-4 ; RLRs ; TLRs ; NLRs...), (2) des outils bactériens et viraux leur permettant d'échapper au système immunitaire de l'hôte (miRNA, enzymes, protéines chélatrices...), mais aussi (3) de la génétique de l'hôte par l'identification de polymorphismes génétiques favorisant ou réfrénant le développement de l'infection, devraient permettre l'identification de nouvelles cibles moléculaires et, en définitive, la mise en place de thérapies efficaces et personnalisées.

1-1.2.2 Les cancers en transplantation

Du fait de l'augmentation de la durée de vie des patients transplantés, due notamment au recul des rejets aigus, les cancers sont devenus au fil des années parmi les premières causes de mortalités des receveurs d'organes. La survenue de ces derniers est intimement liée à un certain nombre de facteurs favorisant ; comme, la pathologie ayant amené le patient sur liste d'attente (cancer, hépatite B ou C...), l'âge au moment de la greffe, l'âge du donneur et la qualité du greffon, d'éventuelles complications chirurgicales et infectieuses, la qualité et l'intensité de l'immunosuppression et bien sûr, l'environnement et la qualité de vie du greffé (Tabagisme, alcoolisme exposition au soleil...). Néanmoins, le dénominateur commun de tous ces patients demeure l'immunosuppression au long terme.

L'incidence du risque de développer un cancer pour un patient transplanté est multipliée par 2 à presque 100 fois, selon le type de cancer, par comparaison à un patient sain, tous types de greffes confondues (Jensen et coll., J am Acad Dermatol. 1999) (Kasiske et coll., Am J Transplant. 2004). Cette incidence étant de plus en plus élevée à mesure que l'on s'éloigne dans le temps de la transplantation. Ainsi, selon l'étude de Kasiske, publiée en 2004, dans l'« American Journal of Transplantation », comparant l'incidence des cancers dans une population de transplantés rénaux (n=35765) et dans la population globale américaine, l'incidence des cancers gastro-intestinaux (Côlon, Œsophage, Pancréas, Intestin grêle et Estomac), tout comme ceux touchant le larynx, les poumons, la vessie, les seins, les ovaires, la prostate et les testicules, est en moyenne 2 à 3 fois plus élevée au delà de la première année post-greffe. Dans un ordre d'incidence croissante, on retrouve ensuite les mélanomes, les cancers du foie et les leucémies qui sont multipliés d'un facteur 5 à 10. Suivent ensuite les cancers rénaux, osseux, endocriniens, du système nerveux central, de la bouche, ainsi que par les lymphomes (PTLD) avec des incidences 10 à 50 fois plus élevées. Les cancers les plus fréquents étant les sarcomes de Kaposi et carcinomes cutanés (spinocellulaires et basocellulaires) avec une incidence jusqu'à 100 fois plus importante à un an post-greffe (Kasiske et coll., Am J Transpl. 2004).

La diminution de l'immunosuppression est donc primordiale chez ces patients tout comme la mise en place d'une chimiothérapie. Par ailleurs, la toxicité relative et l'effet oncogène suspecté de certains immunosuppresseurs, en particulier les anticorps

polyclonaux anti-lymphocytaires qui agissent sur un large spectre cellulaire, font l'objet d'une surveillance accrue (Caillard et coll., Transplantation, 2005). L'utilisation d'immunosuppresseurs, moins toxiques, tel que l'inhibiteur de la voie du mTOR, a très récemment montré un réel bénéfice pour prévenir la rechute des cancers de la peau post-transplantation rénale (Euvrard et coll., N Eng J Med. 2012).

Même si les hommes sont, dans toutes les études, plus à risque que les femmes pour la survenue des cancers, pré comme post-transplantation, ces chiffres d'incidences peuvent varier d'une population à une autre (Vajdic et van Leeuwen, Int J Cancer. 2009). Cette observation montre, d'une part, l'importance des facteurs environnementaux, en particulier concernant les cancers cutanés, mais suggère aussi d'autre part, l'influence de la génétique dans la prédisposition au cancer. En d'autres termes, comment expliquer qu'à âge, statut virologique, immunosuppression et environnement identiques, un patient va développer un cancer alors qu'un autre non ? En effet, si les infections virales sont, là encore, à l'origine de nombreux cancers (EBV, HHV-8, PVH...), certaines mutations ou certains polymorphismes ont clairement été identifiés comme directement associés ou favorisant la survenue du cancer (Lindor et coll., J Nat Cancer Inst. 2008). Parmi celles-ci, on peut citer les gènes BRCA1 et BRCA2, codant pour des protéines impliquées dans les mécanismes de réparation de l'ADN, pour lesquelles des mutations ont clairement été associées à une plus forte incidence du cancer du sein (Narod et Salmena, Discov Med. 2011). De même plusieurs polymorphismes touchant le locus TP53 codant pour la protéine p53, impliquée dans les processus de la mort cellulaire programmée par apoptose en réponse au stress, ont également été associés à une multitude de cancers (Whibley et coll., Nat Rev Cancer. 2009).

Là encore, une meilleure connaissance, à la fois de la génétique du patient par l'identification des gènes de susceptibilités et des mécanismes immunologiques impliqués dans l'initiation puis le développement des cancers à l'insu de l'hôte, devrait permettre l'identification des patients à risque puis la mise en place de thérapies personnalisées efficaces.

1-2 MHC class I related Chain A (MICA).

Ce fut le groupe de Thomas Spies qui le premier identifia et caractérisa, en 1994, ce groupe de Loci qu'il appellera « MHC class I related Chain » (MIC) (Bahram et coll., Proc Natl Acad Sci USA. 1994). Au même moment, une équipe australienne dirigée par Roger Dawkins identifiait les mêmes loci qu'elle nommait alors « PERB11 » (Leelayuwat et coll., Immunogenetics. 1994). Ces deux terminologies désignent donc les mêmes groupes de gènes même si, aujourd'hui, la terminologie MIC est préférentiellement utilisée. Le loci MIC correspond à 7 gènes (*MICA*, *MICB*, *MICC*, *MICD*, *MICE*, *MICF* et *MICG*). Parmi ces gènes, seuls *MICA* et *MICB* donnent lieu à l'expression d'une protéine, les autres étant des pseudogènes. Très vite, le polymorphisme de *MICA* a été documenté (Fodil et coll., Immunogenetics. 1996) et l'expression de la protéine par différents types cellulaires analysée (Zwirner et coll., Immunogenetics. 1998). Plus tard, un rôle pour MICA dans les mécanismes de l'immunité innée a été avancé puisque son expression provoquait l'activation des cellules effectrices à activité cytotoxique, en particulier via l'interaction de MICA avec le récepteur activateur NKG2D (Groh et coll., Science. 1998) (Bauer et coll., Science. 1999).

1-2.1 Organisation et caractéristiques du gène *MICA*

Le gène *MICA* est présent et très conservé chez les mammifères à l'exception des rongeurs. Il est situé sur le chromosome 6, à 46kb centrométrique du gène *HLA-B*, en position anti-parallèle par rapport à ce dernier et à 70kb centrométrique de *MICB* qui lui est orienté dans le même sens que *MICA*. De cette proximité des gènes *HLA-B*, *MICA* et *MICB* en résulte un déséquilibre de liaison (Grimaldi et coll., Hum Immunol. 1996) (Fodil et coll., Immunogenetics. 1999). De façon intéressante, l'allèle *HLA-B*048*, fréquent chez certaines populations asiatiques et sud-Américaines, est associé à une délétion de 100kB incluant le gène *MICA* (Komatsu-Wakui et coll., Immunogenetics. 1999) (Aida et coll., Immunogenetics. 2002). Par ailleurs, le gène *MICB* fréquemment inclus dans cet haplotype porte l'allèle *MICB*009N* (ou **0107N*) qui ne donne pas lieu à l'expression d'une protéine fonctionnelle (Ando et coll., Immunogenetics. 1997). La majorité des porteurs de l'allèle *HLA-B*048* ont donc un haplotype MIC nul.

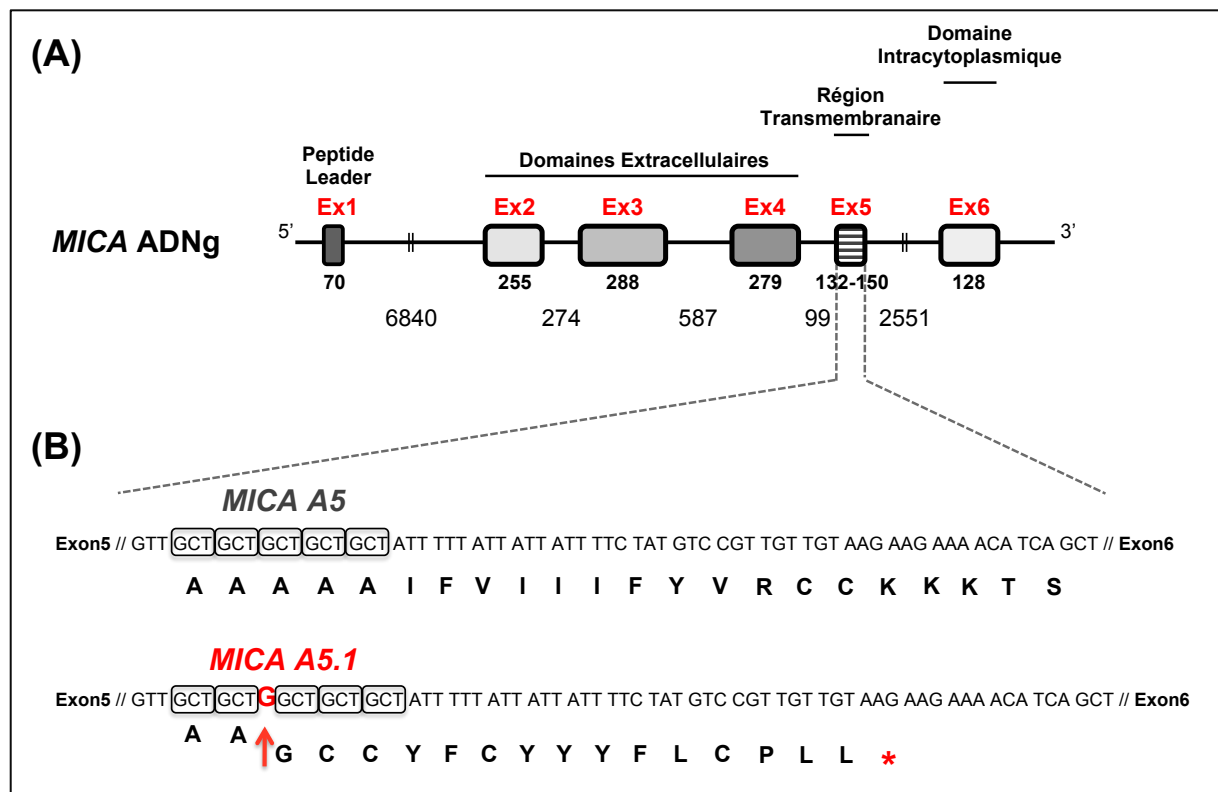


Figure 5 : (A). Organisation exonique et intronique du gène MICA.

□ : Exon — : Intron xxx : Nombre de nucléotides

(B). Comparaison des séquences nucléotidiques des microsatellites A5 et A5 muté (A5.1). Impact de la mutation sur la séquence en acides aminés traduite ou l'introduction précoce d'un codon stop (*).

Le gène *MICA* est constitué de 6 exons répartis sur une longueur totale de 40Kb. Sa séquence nucléotidique présentant entre 18 et 36% d'homologie avec les gènes du HLA de classe I (Bahram et coll., Proc Natl Acad Sci USA. 1994) (**Figure 5A**). Le premier exon code pour le peptide leader. Les exons 2, 3, et 4 codent respectivement pour les domaines alpha 1, 2 et 3 de la région extracellulaire. L'exon 5 code pour la région transmembranaire et l'exon 6 pour la région intra-cytoplasmique. La taille totale des 6 exons varie de 1152 à 1170 nucléotides notamment selon le polymorphisme d'un microsatellite situé dans l'exon 5. Celui-ci correspond à une séquence répétée (STR : Short Tandem Repeats) de 4 (A4) à 10 (A10) codons GCT codant pour une alanine (A) (Mizuki et coll., Proc Natl Acad Sci USA. 1997). Le microsatellite A5 peut également être associé à une mutation. Elle consiste en l'insertion d'une guanine (G) après la deuxième répétition du codon GCT (= A5.1), en position 952 de la séquence codante de *MICA* (Mizuki et coll., Proc Natl Acad Sci USA. 1997). Celle-ci, par modification de l'ORF,

introduit de façon prématurée un codon stop, aboutissant à l'expression d'une protéine tronquée (-43 aa) dépourvue de région intracytoplasmique (Mizuki et coll., Proc Natl Acad Sci USA. 1997) (**Figure 5B**). L'expression de cette protéine tronquée, liée aux allèles *MICA**008, *023, *028, *053, *058 et *070, a par la suite été associée à un défaut d'adressage à la membrane des cellules épithéliales polarisées : La protéine mutée étant exprimée à la surface apicale et la protéine « sauvage » sur le pôle baso-latéral des cellules épithéliales (Suemizu et coll., Proc Natl Acad Sci USA. 2002). L'allèle *MICA**008, porteur de la mutation *MICA* A5.1, est l'allèle le plus représenté dans de nombreuses populations (Katsuyama et coll., Tissue Antigens. 1999) (Petersdorf et coll., Immunogenetics. 1999) (Gao et coll., Hum Immunol. 2006) avec une fréquence allélique pouvant atteindre les 55% pour la population caucasienne. L'expression de MICA se faisant de manière codominante (Molinero et coll., Eur J Immunogenetics. 2002), la protéine mutée MICA A5.1 est donc présente chez la majeure partie de ces individus.

Le gène *MICA*, tout comme les gènes du *HLA*, est très polymorphe avec 94 allèles décrits à ce jour, répartis en 71 groupes (*MICA**001 à *MICA**071) (<http://hla.alleles.org>). De façon intéressante, la majeure partie des polymorphismes de MICA (51/62) se situe dans les exons 2, 3 et 4 codant pour les domaines extra-membranaires de MICA (alpha-1, -2 et -3) (**Figure 6A**), suggérant un impact important du polymorphisme génétique de MICA, non seulement sur l'expression de la protéine MICA, mais également sur sa fonction de ligand de NKG2D et surtout sur sa capacité à induire une immunisation après allo-transplantation.

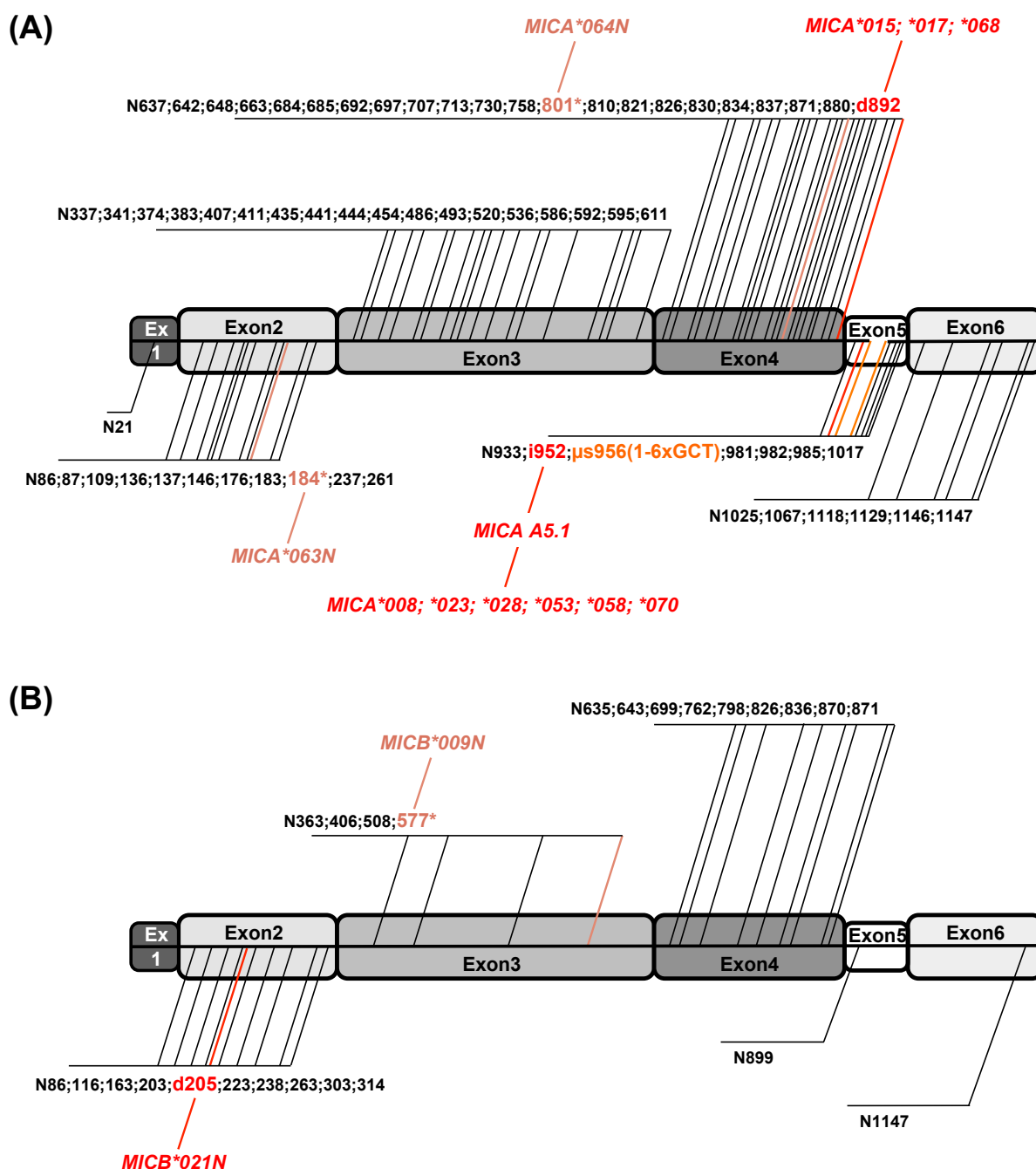


Figure 6 : Représentation schématique du polymorphisme des gènes MICA (A) et MICB (B). N=Nucléotide ; i=Insertion ; d=Délétion ; µs=Microsatellite

Ainsi, 62 SNPs (Single Nucleotide Polymorphism) ont été référencés. Parmi ceux-ci, 44 aboutissent à un changement d'acide aminé, et 2 induisent l'introduction d'un codon stop précocement, en positions 184 (aa39*) et 801 (aa244*) de la séquence codante, ou l'expression de protéines instables et non fonctionnelles. Ces polymorphismes sont associés, respectivement, aux allèles *MICA*063N* (Huang et coll.,

Tissue Antigens. 2011) et *MICA*064N* (Zhang et coll., Tissue Antigens. 2012) (**Figure 6A**).

La délétion d'une guanine en position 892 a également été décrite et associée aux allèles *MICA*015*, **017* et **068*. Cette délétion dans la séquence codante a pour conséquence la modification du cadre ouvert de lecture (ORF : Open Reading Frame) et l'introduction d'un codon stop précocement (Obuchi et coll., Tissue Antigens. 2001) (**Figure 6A**). L'expression de la protéine MICA ainsi modifiée n'a pas fait l'objet d'une description dans la littérature.

En comparaison de MICA, le gène *MICB* présente un moindre polymorphisme, avec tout de même 35 allèles décrits pour 24 SNPs dont 17 aboutissent à une modification de l'acide-aminé et 1 à l'introduction précoce d'un codon stop en position 577 (aa170*). Ce dernier polymorphisme est associé à l'allèle *MICB*009N* (Ando et coll., Immunogenetics. 1997). Une délétion en position 205 (Cytosine) a également été référencée et associée à l'allèle *MICB*021N*. Celle-ci induit un changement d'ORF et la survenue d'un codon stop prématurément (aa66*) (Schroeder et coll., Tissue Antigens. 2004) (**Figure 6B**).

Par ailleurs, un épissage alternatif de MICA a également été décrit dans plusieurs lignées cellulaires puis retrouvé dans les PBMC de donneurs (Zou et Stastny, Immunogenetics. 2002). Celui-ci consiste en la délétion totale de l'exon 3, codant pour le domaine extracellulaire $\alpha 2$. Le transcrit ainsi épissé est alors nommé MICA2 par opposition au transcrit « sauvage », nommé MICA1. Dans cette étude, ce phénomène n'a pas été associé à un allèle de MICA en particulier.

1-2.2 Expression et Régulation de la protéine MICA

La protéine MICA est une glycoprotéine membranaire présentant un haut degré de polymorphisme (Fodil et coll., Immunogenetics. 1996) pour un poids moléculaire estimé entre 42kDa et 33kDa selon le polymorphisme de l'exon 5 et l'expression de la mutation *MICA A5.1*. Son expression initialement restreinte aux **cellules épithéliales** (Groh et coll., Proc Natl Acad Sci USA. 1996 est désormais étendue aux **fibroblastes** et **cellules endothéliales** (CE) ainsi qu'aux **monocytes**, **kératinocytes** (Zwiner et coll., Immunogenetics. 1998) (Zwiner et coll., Hum. Immunol. 1999), **macrophages** (Nedvetzki et coll., Blood. 2007), **cellules dendritiques** (Jinushi et coll., J Immunol. 2003) et **lymphocytes T activés** (Molinero et coll., J Leukoc Biol. 2002) (Cerboni et coll., Blood. 2007). On peut distinguer l'expression membranaire « naturelle » de MICA, à la surface des cultures primaires de CE, de fibroblastes et de cellules épithéliales, de l'expression membranaire « induite », à la surface des monocytes, kératinocytes, cellules dendritiques immatures et lymphocytes T qui n'expriment MICA que de façon intracellulaire, en l'absence de signaux d'activation. Ces observations suggéraient alors une forte régulation de l'adressage de MICA à la membrane par des mécanismes post-traductionnels. A noter également la détection de transcrits MICA dans certaines cellules et tissus sans détection de la protéine, révélant cette fois-ci, la présence de mécanismes post-transcriptionnels régulant l'expression de MICA (Leelayuwat et coll., Immunogenetics 1994).

1-2.2.1 Régulation de MICA par les stress cellulaires

MICA est induite et/ou régulée par les « stress » cellulaires incluant le choc thermique, le stress oxydatif, les altérations de l'ADN, la transformation tumorale, et les infections virale et bactérienne. Le promoteur de MICA comprend des séquences consensus qui permettent la fixation de la protéine du choc thermique HSF-1 (Heat Shock Factor-1), à la suite de laquelle la transcription de MICA est initiée (Venkataraman et coll., J Immunol. 2007). De même, bien que les mécanismes moléculaires mis en jeu restent à confirmer, l'induction ou la surexpression des transcrits et des protéines MICA

à la suite d'une transformation tumorale (Gasser et coll., Nature. 2005) ou d'une infection virale ou bactérienne a très largement été documentée (Zwiner et coll., Immunogenetics. 1998) (Groh et coll., Nat Immunol. 2001) (Sène et coll., PLoS Pathog. 2010) (Ibana et coll., FEMS Immunol Med Microbiol. 2012). La surexpression de MICA peut également être la résultante de tous mécanismes provoquant des dommages de l'ADN. La surexpression de MICA ici observée utilise la phosphorylation des protéines kinases ATM (ataxia telangiectasia mutated) et ATR (ATM and Rad3 related) (Tang et coll., J Cell Biol. 2008). De même, l'augmentation des transcrits *MICA* à la suite d'un stress oxydatif induit par un traitement avec de l'H₂O₂ a également été documentée dans de nombreuses lignées cellulaires (Yamamoto et coll., Biochim Biophys Acta. 2001).

De façon plus anecdotique, la diminution de l'expression de MICA au cours de la prolifération de fibroblastes, par inhibition de contact, a également été rapportée (Zou et coll., Hum Immunol. 2006) puis observée dans notre laboratoire lors de la culture des CE, suggérant un rôle, direct ou indirect, de la prolifération cellulaire sur la régulation de MICA.

1-2.2.2 Régulation de MICA par les cytokines pro-inflammatoires

L'expression de MICA est également régulée par de nombreuses cytokines pro-inflammatoires. Récemment, les travaux du groupe de O'Callaghan ont montré une surexpression de MICA, via le facteur de transcription NFκB, après activation des CE vasculaires humaines par le TNFα (Lin et coll., J. Biol. Chem. 2012). L'IFNα a également été décrit pour induire une forte surexpression de MICA dans diverses lignées tumorales (Zhang et coll., Cancer Sci. 2008). De même, l'IL-2, -4 et -15 induisent l'expression intracellulaire, mais très faiblement membranaire, des protéines MICA par les T CD4+ activés, mettant en évidence, là encore, des mécanismes de régulation post-traductionnels de MICA (Molinero et coll., Hum Immunol. 2006).

A l'inverse, l'interleukine-10 a été associée à une inhibition de l'expression des transcrits MICA dans des lignées de Mélanome (Serrano et coll., Immunol Cell Biol. 2011). De même l'IFNγ a été décrit pour réprimer l'expression de MICA via l'induction du microRNA miR-520b dans diverses lignées cellulaires tumorales (Yadav et coll., J. Immunol. 2009). De façon intéressante, l'expression de MICA semble être fortement

régulée par les miRNA (Stern-Ginossar et coll., Nat. Immunol. 2008), l'inhibition de DICER ou DROSHA, des enzymes essentielles à la machinerie de synthèse et de maturation des miRNAs, induisant la surexpression de MICA (Tang et coll., J Cell Biol. 2008) (Stern-Ginossar et coll., Nat. Immunol. 2008).

1-2.2.3 Mécanismes de régulation post-traductionnels de MICA

L'expression membranaire de MICA est régulée par des mécanismes post-traductionnels. En effet, MICA est une protéine hautement glycosylée avec 8 sites de N-glycosylation en son domaine extracellulaire (Bahram et coll., Proc Natl Acad Sci USA. 1994). Il a récemment été montré que l'inhibition spécifique de la N-glycosylation par le 2-deoxy-D-glucose (2DG) prévenait l'expression membranaire de MICA (Andresen et coll., J Immunol. 2012). De même, l'ubiquitinylation des protéines MICA est un mécanisme nouvellement mis en évidence pour la régulation post-traductionnelle de l'expression membranaire de MICA. Ainsi, de la fixation des molécules d'ubiquitines aux résidus Lysines du domaine intracytoplasmique de MICA, en résulte la dégradation des protéines ainsi ubiquitinylées via la voie de dégradation du protéasome. L'utilisation de ce processus par certains virus a été documentée comme favorisant l'échappement viral par l'inhibition de l'expression de MICA (Thomas et coll., Proc Natl Acad Sci USA. 2008). A l'inverse, Nice et collaborateurs observent, dans un modèle murin, l'inhibition de l'ubiquitinylation de l'analogue murin de MICA, MULT1, à la suite d'un stress cellulaire (thermique et Ultraviolet) avec pour conséquence la surexpression de MULT1 (Nice et coll., J Exp Med. 2009).

De façon intéressante, les travaux de Suemizu et collaborateurs ont associé l'expression de la protéine mutée MICA A5.1, dépourvue de domaine intracellulaire, à un défaut d'adressage de MICA à la surface des cellules épithéliales polarisées. La protéine mutée étant adressée à la face apicale contrairement à la forme non mutée, exprimée au niveau de la surface baso-latérale (Suemizu et coll., Proc Natl Acad Sci USA. 2002). Dans cette étude, aucun des mécanismes mentionnés plus haut n'a été mis en cause, cependant, ces résultats suggèrent une régulation de l'expression et de l'adressage à la membrane de MICA par des mécanismes pouvant être altérés par le polymorphisme de la protéine. C'est en particulier le cas des protéines MICA associées à l'allèle *MICA*010*,

qui, du fait d'une substitution de l'acide aminé en position 6, présentent une instabilité provoquant leur dégradation et l'expression d'un phénotype nul par les cellules concernées (Li et coll., Immunogenetics. 2000).

Ces mécanismes de régulation peuvent donc expliquer, en partie, l'absence d'expression de la protéine MICA malgré la présence de transcrits, observée dans certaines cellules et tissus (Leelayuwat et coll., Immunogenetics 1994).

1-2.2.4 Expression de la forme soluble de MICA

La protéine MICA existe également sous forme soluble (MICAs). Cette forme soluble de MICA fut pour la première fois décrite, simultanément, par les équipes de Thomas Spies et d'Alexander Steinle en 2002 (Groh et coll. Nature. 2002) (Salih et coll., J Immunol. 2002). Il s'agissait là des premières descriptions du relargage de MICA, depuis la membrane cellulaire, après clivage protéolytique. En effet, MICAs correspond en structure, aux domaines alpha-1, -2 et -3 de MICA, pour un poids moléculaire avoisinant les 30kDa. D'un point de vue mécanistique, le relargage de MICA dépend de deux mécanismes distincts et successifs. Le premier, permet le recrutement de MICA au niveau des régions membranaires riches en cholestérol et sphingolipides appelées DRMs (détergent-résistant membrane microdomains) ou « Lipide rafts » (Eleme et coll., J Exp Med. 2004) (Agüera-Gonzalez et coll., Eur J Immunol. 2011). Ce recrutement est médié par la palmitoylation des protéines MICA. Il s'agit d'une réaction enzymatique aboutissant en une liaison thioester entre un acide gras et une cystéine de la protéine cible (S-acylation). La protéine MICA présentant deux cystéines successives dans son domaine intracytoplasmique est donc sujette à la palmitoylation et donc à son recrutement dans les régions DRMs. Le second mécanisme mis en jeu consiste au clivage protéolytique de MICA dans les DRMs, régions riches en métalloprotéinases (Tellier et coll., Exp Cell Res. 2006). Plusieurs métalloprotéinases (MMP9 et MMP14) et désintégrines-métalloprotéinases (ADAM9, 10 et 17) ont été impliquées dans le clivage de MICA (Waldhauer et coll., Cancer Res. 2008) (Kohga et coll., Hepatology. 2010) (Liu et coll., J Immunol. 2010) (Sun et coll., Cell Biol Int. 2011). De même, les travaux du groupe de Thomas Spies ont montré le rôle primordial de la protéine ERP-5 (endoplasmic reticulum protein 5), une enzyme initialement impliquée dans la maturation et le

réarrangement tridimensionnel des protéines nouvellement synthétisées qui, à la membrane cellulaire, se lie à MICA pour former un complexe reconnu par les métalloprotéinases. La présence de MICA soluble est détectable dans le sérum et a été associée à de nombreuses pathologies en particulier l'échappement et la progression tumorale (mécanismes développés dans les paragraphes suivants).

1-2.3 Fonction des protéines MICA

MICA ne pouvant se lier à la β 2-microglobuline (B2M) et son expression n'étant pas associée à la protéine de transport TAP, ceci exclu un quelconque rôle de MICA dans la présentation antigénique (Gros et coll., Proc Natl Acad Sci USA. 1996). Par ailleurs, l'élucidation du Crystal de MICA confirma l'impossibilité de MICA à se lier à la B2M (Bauer et coll., Acta Crystallogr D Biol Crystallogr. 1998) (Li et coll., Nat Immunol. 2001).

MICA est un ligand du récepteur activateur NKG2D (natural-killer groupe 2 member D) exprimé par les lymphocytes T non conventionnels exprimant un TCR $\gamma\delta$ (Groh et coll., Science. 1998), ainsi que les T CD8+ exprimant un TCR $\alpha\beta$, par les cellules NK et NKT, (Bauer et coll., Science 1999) (Wu et coll., Science. 1999) ainsi que certaines sous populations de T CD4+ (Groh et coll., Proc Natl Acad Sci USA. 2003). NKG2D est un récepteur activateur de type II possédant un domaine extracellulaire C-lectin-like dont l'expression ubiquitaire par les cellules précédemment mentionnées est surexprimée en présence d'IL-12, d'IL-15 ainsi que par l'IFN α (Sutherland et coll., J Immunol. 2002). A la surface cellulaire, le récepteur NKG2D se présente sous la forme d'un homodimère et son interaction avec un ligand induit alors un signal d'activation via la phosphorylation de la protéine adaptatrice DAP10. Cette dernière permet le recrutement de p85, une sous-unité de la PI3 Kinase (phosphatidylinositol-3 Kinase), aboutissant, en l'absence de signaux inhibiteurs, en l'activation et l'acquisition de fonctions cytotoxiques (Wu et coll., Science. 1999). L'activation de la cellule effectrice via NKG2D induit la lyse de la cellule cible par la libération de granules cytolytiques (perforine & granzyme B) et le maintien d'un contexte inflammatoire par la libération d'IFN γ , TNF α , GM-CSF ainsi que la chimiokine MIP-1 β (Sutherland et coll., J Immunol. 2002) (pour revue : Vivier et coll., Curr Op Immunol. 2002). Ainsi, dans le cas des cellules NK, de l'interaction de NKG2D avec son ligand résultera un signal d'activation fort qui sera mis en balance avec des signaux inhibiteurs (KIR/HLA ; NKG2A/HLA-E ; NKG2B/HLA-G...) et dont la résultante déterminera si oui ou non la cellule cible doit être lysée (Pour revue : (Vivier et coll., Curr Opin Immunol. 2002) (Vivier et coll., Science. 2011)). Dans le cas d'un lymphocyte T CD8(+), NKG2D constitue un signal de co-activation, en particulier chez les T CD8(+) mémoires présentant peu de CD28 à leur surface (Groh et coll., Nat Immunol. 2001) (Roberts et coll., J Immunol. 2001) (Rajasekaran et coll., PLoS One. 2010)). Les lymphocytes T $\gamma\delta$ arborant un TCR V δ 1 $\gamma\delta$ constituent un cas particulier. Ce TCR a été

décrit pour reconnaître les protéines MICA et MICB (Groh et coll., Science. 1998) (Xu et coll., Proc Natl Acad Sci USA. 2011). La reconnaissance des protéines MIC par ces cellules qui constituent la principale population lymphocytaire parmi les lymphocytes intra épithéliaux (IEL), aboutit alors à un double signal activateur utilisant le TCR et le récepteur NKG2D (Wu et coll., J Immunol. 2002).

MICA et MICB ne sont pas des ligands exclusifs de NKG2D (pour revue : (Raulet, Nat Rev Immunol. 2003) (Radosavljevic et Bahram, Immunogenetics. 2003). Les autres ligands humains de NKG2D (NKG2DL) sont les protéines « UL16 binding protein » ULBP1 ; 2 ; 3 ; 4 ; 5 et 6 (Cosman et coll., Immunity. 2001). Ces dernières peuvent être également appelées, respectivement, « Retinoic acid early transcrits 1 » RAET11 ; H ; N ; E ; G et L en référence à leurs orthologues découverts chez la souris après traitement à l'acide rétinoïque : « Retinoic acid early inducible cDNA clone-1 » Rae-1 α ; -1 β ; Rae-1 γ ; Rae-1 δ et Rae-1 ϵ . (Nomura et coll., Differentiation. 1994). Chez la souris il existe d'autres ligands de NKG2D comprenant le groupe de protéines « Histocompatibility antigen 60 » H60a ; b et c ainsi que la protéine « Murine UL-16-binding protein-like transcript 1 » (MULT1) (Malarkannan et coll., J Immunol. 1998) (Carayannopoulos et coll., J Immunol. 2002). D'un point de vue structural, tous les NKG2DL ont en commun les domaines extracellulaires alpha 1 et 2 indispensables à la liaison NKG2DL/homodimère de NKG2D. Seules les protéines MICA et MICB possèdent un domaine « Ig-like » alpha 3 les différenciant des autres ligands de NKG2D. Une autre différence majeure entre ces différents ligands constitue leur mode d'encrage à la membrane cellulaire. En effet, MICA/B, ULBP4, ULBP5 ainsi que, chez la souris, les protéines H60a et H60b, possèdent un domaine transmembranaire et une région intracytoplasmique alors que les NKG2DLs humain ULBP1, 2, 3, 6 et murin Rae-1 α à -1 ϵ ainsi que H60c, ne possèdent pas de domaine transmembranaire mais sont attachés à la membrane via un ancrage aux glycosylphosphatidylinositols (GPI) de la membrane cellulaire (**Figure 7**).

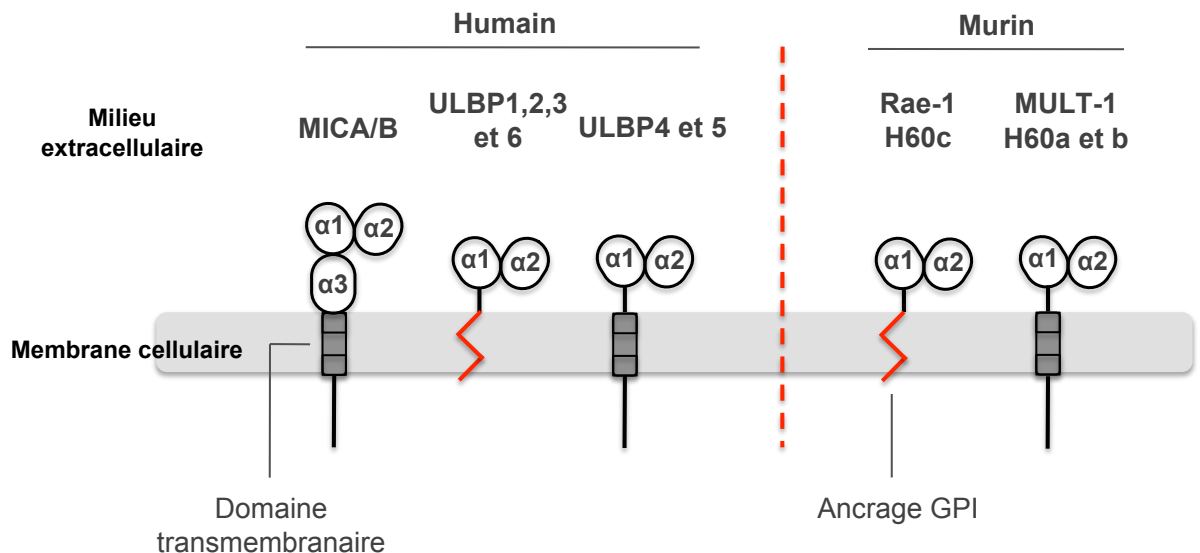


Figure 7 : Comparaison des structures des différents ligands de NKG2D humains et murins.

Comme MICA, l'expression des autres ligands de NKG2D n'est pas ubiquitaire mais restreinte à certaines cellules et tissus (Cosman et coll., Immunity. 2001). Ce sont toutes des protéines induites et/ou régulées par le « stress » et on considère que chaque type cellulaire exprime au moins un ligand de NKG2D.

Des formes solubles de MICB, ULBP1, 2, et 3 ont également été décrites. L'utilisation d'inhibiteurs des métalloprotéinases a été associée à une diminution des formes solubles et une augmentation des formes membranaires de MICA/B et ULBP2 révélant ainsi le mécanisme de relargage des formes solubles, par clivage protéolytique (Salih et coll., J Immunol. 2002) (Waldhauer et coll., Cancer Res. 2006) (Salih et coll., Hum Immunol. 2006). Par ailleurs, 3 isoformes solubles de ULBP4 (ULBP4-I ; -II et -III) et 2 isoformes solubles de ULBP5 (RAET1G2 et 3) synthétisées, non pas à la suite d'un clivage protéolytique mais résultant d'un épissage alternatif des transcrits, ont été observées dans de nombreuses lignées cellulaires tumorales et tissus tumoraux primaires (Cao et coll., J Biol Chem. 2007) (Cao et coll., Int Immunol. 2008). Toutes ces formes solubles, dépourvues de domaines transmembranaires, sont capables d'interagir avec NKG2D puisque possédant toujours leurs domaines $\alpha 1$ et $\alpha 2$ nécessaires à cette interaction. Bien que la fonction de ces ligands solubles de NKG2D soit encore mal connue, leur fixation au récepteur NKG2D induit l'internalisation de ce dernier puis sa dégradation, résultant en une baisse de la surveillance des cellules infectées, transformées ou cancéreuses par les cellules cytotoxiques NKG2D(+) (Groh et coll.,

Nature. 2002). Ainsi, les ligands solubles de NKG2D et les mécanismes moléculaires et cellulaires qui favorisent leur synthèse ont été particulièrement étudiés en cancérologie et associés à l'échappement tumoral (détaillé ci-après).

Un rôle de MICA/NKG2D a également été mis en avant dans la maturation et la sélection des T CD8+ dans le thymus (Hüe et coll., J Immunol. 2003). En effet, dans cette étude, l'expression de MICA a été observée dans la zone médullaire thymique par les cellules épithéliales et les corpuscules de Hassal, et associée à la présence, dans cette même région du thymus, d'une sous-population de thymocytes simples positifs CD8+ exprimant NKG2D. Ce concept est supporté par un certain nombre de nouvelles données récemment publiées dans le journal « Science Translational Medicine » (Shafi et coll., Sci Transl Med. 2011). Cette étude montre d'une part, que le niveau d'expression de MICA à la surface cellulaire est la résultante des polymorphismes du gène MICA. D'autre part, les auteurs montrent que la réponse Tgamma/delta et NK via l'interaction du récepteur NKG2D avec son ligand MICA n'est pas uniquement dépendante du niveau d'expression de MICA par les cellules cibles mais également de la qualité (Allèle) du ligand exprimé. Ceci met en exergue l'inter-individualité de l'efficacité de la surveillance des cellules de l'immunité innée et suggère ainsi une éventuelle « éducation » de ces cellules (Shafi et coll., Sci Transl Med. 2011).

De façon plus anecdotique, une étude du groupe de Bush et collègues, révèle les effets antiprolifératifs de MICA sur des cellules T CD4+ et T CD8+ et cela, indépendamment du récepteur NKG2D, suggérant la présence d'un autre récepteur pour la protéine MICA à la surface de ces cellules (Kriegeskorte et coll., Proc Natl Acad Sci. 2005). Cependant, il s'agit là de l'unique rapport reliant l'expression de MICA à un effet autre que celui dépendant de NKG2D.

En résumé, MICA est une protéine très polymorphe dont l'expression à la surface cellulaire est restreinte à certaines cellules et tissus. En effet, l'expression membranaire nécessite le passage par de multiples « check point » et fait l'objet d'une régulation exacerbée (**Figure 8**). Plusieurs mécanismes de régulation de MICA ont été mis en évidence. Ces derniers peuvent intervenir au niveau transcriptionnel (facteurs de transcription), post-transcriptionnel (microRNA) mais également au niveau post-traductionnel (glycosylation et ubiquitinylation). L'expression de MICA à la surface cellulaire est bien souvent transitoire. A la membrane, la protéine MICA peut être relargée sous une forme soluble à la suite d'un clivage protéolytique par des

métalloprotéinases. Ce clivage est lui même favorisé par la palmitoylation de MICA et la migration de ladite protéine dans les zones de la membrane riches en métalloprotéinases, les DRMs.

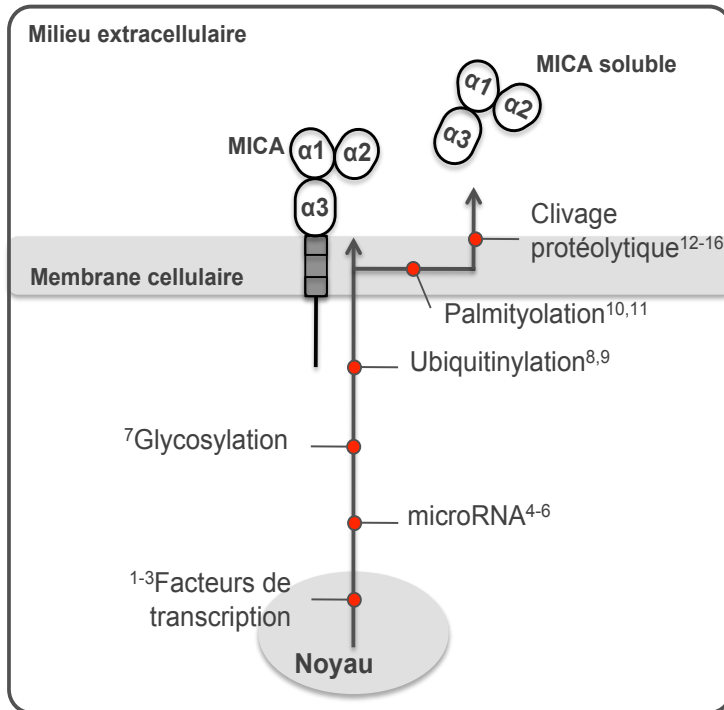


Figure 8 : Les mécanismes cellulaires impliqués dans la régulation de MICA.

(1) Gopalakrishnan et coll., J Immunol. 2007 ; (2) Venkataraman et coll., J Immunol. 2007 ; (3) Lin et coll., J. Biol. Chem. 2012 ; (4) Stern-Ginossar et coll., Nat Immunol. 2008 ; (5) Yadav et coll., J. Immunol. 2009 ; (6) Einsmann et coll., J Immunol. 2010 ; (7) Andresen et coll., J Immunol. 2012 ; (8) Thomas et coll., Proc Natl Acad Sci USA. 2008 ; (9) Nagai et coll., Immunology. 2012 ; (10) Eleme et coll., J Exp Med. 2004 ; (11) Agüera-Gonzalez et coll., Eur J Immunol. 2011 ; (12) Tellier et coll., Exp Cell Res. 2006 ; (13) Waldhauer et coll., Cancer Res. 2008 ; (14) Kohga et coll., Hepatology. 2010 ; (15) Liu et coll., J Immunol. 2010 ; (16) Sun et coll., Cell Biol Int. 2011

Tous ces mécanismes de régulation sont d'une importance capitale pour le contrôle de l'expression membranaire de MICA qui, du fait de sa fonction de ligand du récepteur activateur NKG2D, ont été associés à de nombreuses pathologies, telles que le cancer, l'infection, le rejet de transplantation et l'auto-immunité. Aussi, l'expression de MICA, les mécanismes impliqués dans sa régulation, corrélés à telle ou telle pathologie ou manifestation clinique, ont largement été étudiés ces dernières années sans jamais (ou très rarement) prendre en compte le polymorphisme de MICA, ou l'inter-individualité potentielle des mécanismes observés. Cette notion d'inter-individualité de la réponse immune est pourtant de plus en plus explorée à l'ère où la médecine personnalisée promet de grandes améliorations de la santé humaine.

1-2.4 MICA, NKG2DLs & les Pathologies Associées

MICA et les autres ligands de NKG2D sont des protéines induites par les stress cellulaires, en particulier les infections virales et bactériennes et la transformation tumorale. Les cellules NKG2D(+) tiennent un rôle prépondérant dans l'immuno-surveillance naturelle ou innée des cellules dites « à risque ». Aussi de nombreux travaux de recherche ont été menés visant à caractériser le rôle des ligands de NKG2D dans les processus d'échappement viraux et tumoraux ou comment les virus et les tumeurs parviennent à parer les mécanismes de l'immunité innée utilisant le récepteur NKG2D. De plus en plus d'évidences suggèrent un rôle important de NKG2D et de ses ligands dans les pathologies auto-immunes même si, les polymorphismes du bloc de gènes comprenant les gènes du HLA de classe I, MICA et MICB, avaient depuis longtemps été associés à ce type de pathologie. Le haut niveau de polymorphisme des protéines MICA, qui en fait sa principale particularité, n'a cessé de susciter l'intérêt des transplantateurs ces 10 dernières années et le rôle de MICA dans l'induction d'allo-anticorps post-transplantation semble être désormais acquis pour de nombreux groupes de recherche.

Ainsi, de part son inter-individualité de séquence et de structure, son expression régulée par le stress et sa fonction de ligand de NKG2D, la molécule MICA fait l'objet d'une attention croissante pour son rôle dans les mécanismes immunologiques associés à l'infection, au cancer, aux pathologies auto-immunes et au rejet de transplantation (**Figure 9**).

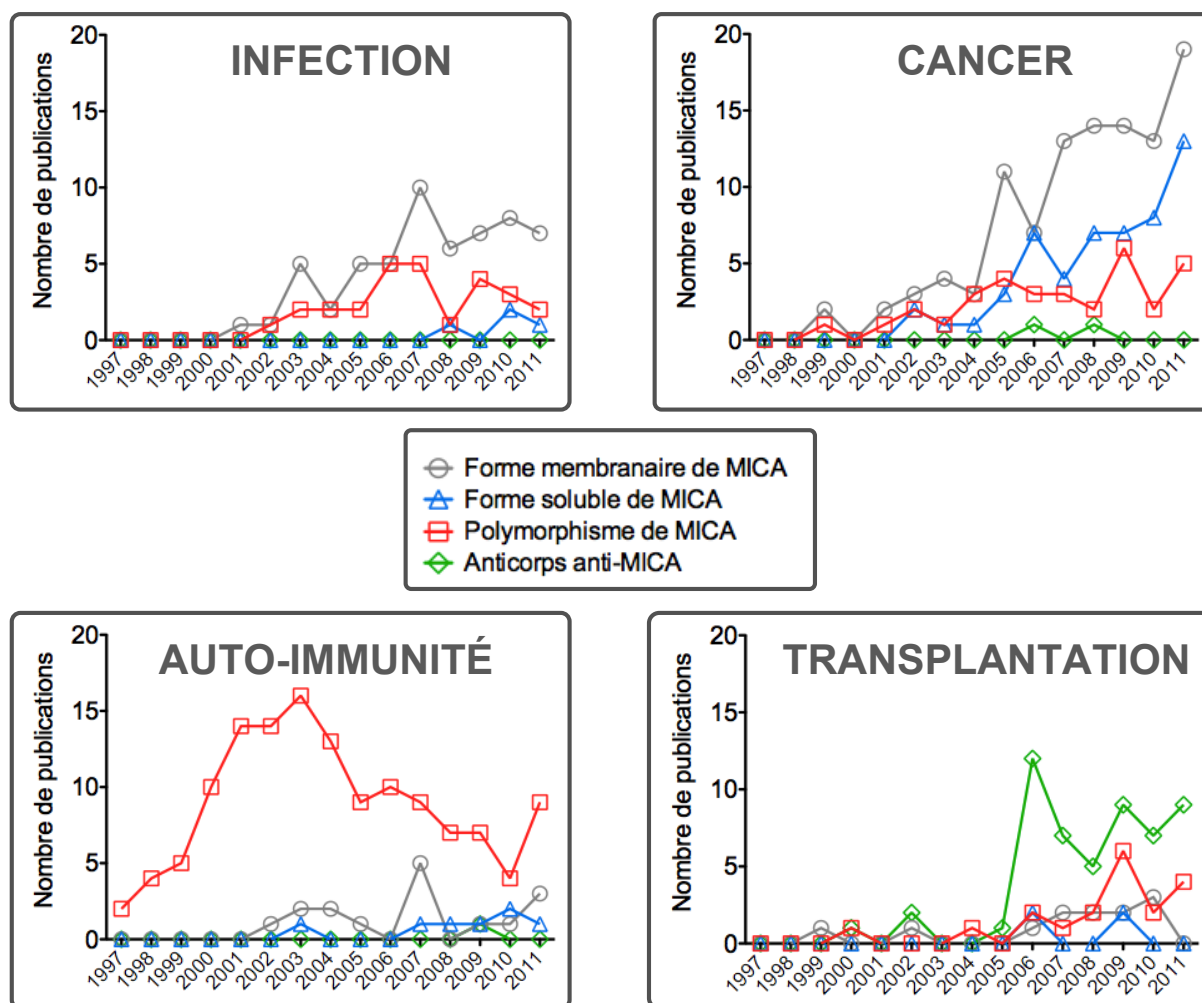


Figure 9 : Cloisonnement de la littérature traitant de la molécule MICA par domaines de recherches et en fonction de l'année de publication. Les publications ont été regroupées en quatre groupes distincts selon la thématique de recherche : Infection, Cancer, Auto-immunité et Transplantation, puis classées en fonction de l'année de publication. Sont considérées comme appartenant au libellé « **Formes membranaire de MICA** » toutes publications décrivant l'expression ou la modulation de MICA à la surface de cellules ou par des tissus. Le libellé « **Forme soluble de MICA** » regroupe toutes les publications décrivant (1) la présence de la forme soluble de MICA dans les surnageants de culture ou les sera des patients et/ou (2) les mécanismes moléculaires amenant à la synthèse de MICAs. Dans le libellé « **Polymorphisme de MICA** » sont regroupées toutes publications décrivant/caractérisant le polymorphisme de MICA au sein de la population d'étude (par exemple : Patients leucémiques, transplantés rénaux...). Toutes publications décrivant la présence d'anticorps anti-MICA sont regroupées dans le libellé « **Anticorps anti-MICA** ». A.N. La thématique de recherche « auto-immunité » regroupe également les publications traitant de pathologies inflammatoires chroniques, parfois suspectées d'avoir un caractère auto-immun.

Liste des publications référencées :

INFECTION

Forme membranaire de MICA

Das et coll., Immunity. 2001
Tieng et coll., Proc Natl Acad Sci USA. 2002
Welte et coll., Eur J Immunol. 2003
Jinushi et coll., J Immunol. 2003
Rölle et coll., J Immunol. 2003
Jinushi et coll., J Immunol. 2003
Dunn et coll., J Exp Med. 2003
Hook et coll., Clin Exp Immunol. 2004
Somersalo et coll., J Clin Invest. 2004
Zou et coll., J Immunol. 2005
Pende et coll., Blood. 2005
Wiemann et coll., J Immunol. 2005
Vankayalapati et coll., J Immunol. 2005
Dann et coll., J Infect Dis. 2005
Molinero et coll., Hum Immunol. 2006
Azimi et coll., Immunogenetics. 2006
Chalupny et coll., Biochem Biophys Res Commun. 2006
Spreu et coll., J Immunol. 2006
Chen et coll., Cell Mol Immunol. 2006
Ceroni et coll., J Gen Virol. 2007
Venkataraman et coll., J Immunol. 2007
Andresen et coll., J Immunol. 2007
Pappworth et coll., J Virol. 2007
Draghi et coll., J Immunol. 2007
Chisholm et coll., J Infect Dis. 2007
Stern-Ginossar et coll., Science. 2007
Ward et coll., Blood. 2007
Benerjee et coll., J Virol. 2007
Ebihara et coll., Int Immunol. 2007
Thomas et coll., Proc Natl Acad Sci U S A. 2008
Wen et coll., Cell Mol Immunol. 2008
Hühn et coll., Cell Microbiol. 2008
McSharry et coll., J Virol. 2008
Zhang et coll., J Infect Dis. 2008
Li et coll., Transplant Proc. 2008
Tang et coll., Med Microbiol Immunol. 2009
Schepis et coll., Scand J Immunol. 2009
Ashiru et coll., J Virol. 2009
Shojima et coll., J Infect Dis. 2009
Jarahian et coll., J Virol. 2009
Ward et coll., PLoS Pathog. 2009
Andresen et coll., J Immunol. 2009
Eissmann et coll., J Immunol. 2010
Richard et coll., Blood. 2010
Mei et coll., Infect Genet Evol. 2010
Guerra et coll., J Virol. 2010
Nolting et coll., Virology. 2010
Bennett et coll., J Immunol. 2010
Sène et coll., PLoS Pathog. 2010
Sester et coll., J Immunol. 2010
Jensen et coll., Plos One. 2011
Kumar et coll., Nat Genet. 2011
schneider et coll., PLoS Pathog. 2011
Magri et coll., Blood. 2011
Bauman et coll., Cell Host Microbe. 2011
Matthews et coll., Eur J Immunol. 2011
Jarahian et coll., PLoS Pathog. 2011

Forme soluble de MICA

Zhang et coll., J Infect Dis. 2008
Sène et coll., PLoS Pathog. 2010
Nolting et coll., Virology. 2010
Kumar et coll., Nat Genet. 2011

Polymorphisme de MICA

Kennedy et coll., J Invest Dermatol. 2002
Gupta et coll., Hum Immunol. 2003
Delgado et coll., Immunogenetics. 2003

Lopez-Vazquez et coll., J Infect Dis. 2004
Karacki et coll., Genes Immun. 2004
Zou et coll., J Immunol. 2005
Shichi et coll., Tissue Antigens. 2005
Tian et coll., Immunogenetics. 2006
Naranjo et coll., Tissue Antigens. 2006
Gao et coll., Hum Immunol. 2006
Tosh et coll., Hum Mol Genet. 2006
Eagle et coll., Hum Immunol. 2006
Averdam et coll., Immunogenetics. 2007
Bravo et coll., Tissue Antigens. 2007
Venkataraman et coll., J Immunol. 2007
Draghi et coll., J Immunol. 2007
Stern-Ginossar et coll., Science. 2007
Thomas et coll., Proc Natl Acad Sci U S A. 2008
Shojima et coll., J Infect Dis. 2009
Moenkemeyer et coll., Hum Immunol. 2009
Mei et coll., Hum Reprod. 2009
Ashiru et coll., J Virol. 2009
Mei et coll., Infect Genet Evol. 2010
Müller et coll., Plos Pathog. 2010
Bennett et coll., J Immunol. 2010
Kumar et coll., Nat Genet. 2011
Garcia et coll., Hum Immunol. 2011

CANCER

Forme membranaire de MICA

Bauer et coll., Science. 1999
Wu et coll., Science. 1999
Yamamoto et coll., Biochim Biophys Acta. 2001
Pende et coll., Eur J Immunol. 2001
Groh et coll., Nature. 2002
Menier et coll., Int J Cancer. 2002
Pende et coll., Cancer Res. 2002
Jinushi et coll., Int J Cancer. 2003
Wagsater et coll., Anticancer Res. 2003
Maccall et coll., Eur J Immunol. 2003
Friese et coll., Cancer res. 2003
Raffaghella et coll., Neoplasia. 2004
Molinero et coll., J Immunol. 2004
Friese et coll., Cancer Res. 2004
Liu et coll., Neuroendocrinology. 2005
Carbone et coll., Blood. 2005
Romansky et coll., Exp Hematol. 2005
Pende et coll., Blood. 2005
Zhang et coll., Int Immunopharmacol. 2005
Wiemann et coll., J Immunol. 2005
Armeanu et coll., Cancer Res. 2005
Girlanda et coll., Cancer Res. 2005
Sconocchia et coll., Blood. 2005
Groh et coll., Proc Natl Acad Sci USA. 2005
Skov et coll., Cancer Res. 2005
Busche et coll., Hum Gene Ther. 2006
Watson et coll., Int J Cancer. 2006
Reinders et coll., Hum Immunol. 2006
Boissel et coll., J Immunol. 2006
Xu et coll., J Clin Endocrinol Metab. 2006
Eisele et coll., Brain. 2006
Marten et coll., Int J Cancer. 2006
Osaki et coll., Clin Cancer Res. 2007
Caristen et coll., Cancer Res. 2007
Raja et coll., Cancer Res. 2007
Epling-Burnette et coll., Blood. 2007
Schrambach et coll., Plos One. 2007
Wrobel et coll., Scand J Immunol. 2007
Poggi et coll., Ann N Y Acad Sci. 2007
Liu et coll., J Oral Pathol Med. 2007
Girart et coll., J Immunol. 2007
Elsner et coll., J Immunol. 2007

- Madjd et coll., Cancer Immun. 2007
 Kato et coll., Leukemia. 2007
 Ostberg et coll., J Leukoc Biol. 2007
 Lu et coll., Neoplasma. 2008
 Jinushi et coll., Proc Natl Acad Sci USA. 2008
 Fuertes et coll., J Immunol. 2008
 Zhang et coll., Cytokine. 2008
 Bouet-Toussaint et coll., Cancer Immunol Immunother. 2008
 Tank et coll., J Cell Biol. 2008
 Chen et coll., Scand J Immunol. 2008
 Armeanu et coll., Clin Cancer Res. 2008
 Jordanova et coll., Clin Cancer Res. 2008
 Zhang et coll., Hum Immunol. 2008
 Zhang et coll., Cancer Sci. 2008
 Qiao et coll., Cancer Immun. 2008
 Stern-Ginossar et coll., Nat Immunol. 2008
 Textor et coll., Int J Cancer. 2008
 Dulphy et coll., J Invest Dermatol. 2009
 Schwinn et coll., Int J Cancer. 2009
 Li et coll., Cancer Immunol Immunother. 2009
 Butler et coll., J Immunol. 2009
 Sconocchia et coll., Neoplasia. 2009
 Andresen et coll., J Immunol. 2009
 Bernal et coll., Hum Immunol. 2009
 Zhang et coll., Cancer Immunol Immunother. 2009
 Higuchi et coll., Cancer Immunol Immunother. 2009
 Wang et coll., Biochem Biophys Res Commun. 2009
 Paschen et coll., Clin Cancer Res. 2009
 Fionda et coll., J Immunol. 2009
 Yadav et coll., J Immunol. 2009
 Kohga et coll., Cancer Res. 2009
 Ashiru et coll., Cancer Res. 2010
 Kohga et coll., J Hepatol. 2010
 Ma et coll., J Clin Neurosci. 2010
 Lu et coll., Cancer Res. 2010
 Nückel et coll., Leukemia. 2010
 Su et coll., J Clin Immunol. 2010
 Cathro et coll., Cancer Immunol Immunother. 2010
 Viny et coll., Haematologica. 2010
 Liu et coll., J Immunol. 2010
 Bressan et coll., Oncol Rep. 2010
 Dhar et coll., Cancer Immun. 2010
 Elsner et coll., J Cell Mol Med. 2010
 Yamanegi et coll., Oncol Rep. 2010
 Lu et coll., Plos One. 2011
 Fuertes et coll., Medicina (B Aires). 2011
 Park et coll., Immunol Invest. 2011
 Serrano et coll., Immunol Cell Biol. 2011
 Bedel et coll., Cancer Res. 2011
 Huang et coll., J Immunother. 2011
 Jiang et coll., Tissue Antigens. 2011
 Neiss-Steider et coll., J Exp Clin Cancer Res. 2011
 Chen et coll., Neoplasma. 2011
 Xu et coll., BMC Cancer. 2011
 Duan et coll., Med Oncol. 2011
 Pfeiffer et coll., Front Biosci (Elite Ed). 2011
 Del Toro-Arreola et coll., Cancer Cell Int. 2011
 Tsuboi et coll., EMBO J. 2011
 Weiss-Steider et coll., J Exp Clin Cancer Res. 2011
 Barsoum et coll., Cancer Res. 2011
 Morisaki et coll., Anticancer Res. 2011
 Sanchez-Correa et coll., Cancer Immunol Immunother. 2011
 Chavez-Blanco et coll., Int J Oncol. 2011
- Forme soluble de MICA**
- Salih et coll., J Immunol. 2002
 Groh et coll., Nature. 2002
 Salih et coll., Blood. 2003
 Raffaghello et coll., Neoplasia. 2004
 Clayton et Tabi, Blood. Blood Cells Mol Dis. 2005
- Armeanu et coll., Cancer Res. 2005
 Jinushi et coll., J Hepatol. 2005
 Holdenrieder et coll., Int J Cancer. 2006
 Reinders et coll., Hum Immunol. 2006
 Boissel et coll., J Immunol. 2006
 Jinushi et coll., Proc Natl Acad Sci USA. 2006
 Eisele et coll., Brain. 2006
 Marten et coll., Int J Cancer. 2006
 Holdenrieder et coll., Cancer Immunol Immunother. 2006
 Osaki et coll., Clin Cancer Res. 2007
 Zwirner et coll., Cytokine Growth Factor Rev. 2007
 Rebmann et coll., Clin Immunol. 2007
 Kaiser et coll., Nature. 2007
 Lu et coll., Neoplasma. 2008
 Arreygue-Garcia et coll., BMC Cancer. 2008
 Jinushi et coll., Proc Natl Acad Sci USA. 2008
 Tamaki et coll., Hum Immunol. 2008
 Clayton et coll., J Immunol. 2008
 Kohga et coll., Cancer Res. 2008
 Waldhauer et coll., Cancer Res. 2008
 Dulphy et coll., J Invest Dermatol. 2009
 Tamaki et coll., Clin Immunol. 2009
 Li et coll., Cancer Immunol Immunother. 2009
 Paschen et coll., Clin Cancer Res. 2009
 Wang et coll., Biochem Biophys Res Commun. 2009
 Lü et coll., Immunology. 2009
 Kohga et coll., Cancer Res. 2009
 Ashiru et coll., Cancer Res. 2010
 Ma et coll., J Clin Neurosci. 2010
 Kohga et coll., Hepatology. 2010
 Liu et coll., J Immunol. 2010
 Nückel et coll., Leukemia. 2010
 Kohga et coll., J Hepatol. 2010
 Kloess et coll., Eur J Immunol. 2010
 Yamanegi et coll., Oncol Rep. 2010
 Hedlund et coll., Plos One. 2011
 Huang et coll., J Immunother. 2011
 Kumar et coll., Nature Genet. 2011
 Morisaki et coll., Anticancer Res. 2011
 Jiang et coll., Tissue Antigens. 2011
 Weiss-Steider et coll., J Exp Clin Cancer Res. 2011
 Xu et coll., BMC Cancer. 2011
 Barsoum et coll., Cancer Res. 2011
 Duan et coll., Med Oncol. 2011
 Sun et coll., Cell Biol Int. 2011
 Del Toro-Arreola. Cancer Cell Int. 2011
 Szczepanski et coll., Haematologica. 2011
 Chavez-Blanco et coll., Int J Oncol. 2011
- Polymorphisme de MICA**
- Ghaderi et coll., Hum Immunol. 1999
 Ghaderi et coll., Hum Immunol. 2001
 Kennedy et coll., J Invest Dermatol. 2002
 Chung-Ji et coll., J Oral Pathol Med. 2002
 de Jong et coll., Hum Mol Genet. 2003
 Lopez-Vazquez et coll., J Infect Dis. 2004
 Lo et coll., Br J Cancer. 2004
 Schroeder et coll., Tissue Antigens. 2004
 Chen et coll., Neoplasma. 2005
 Zoodsma et coll., J Med Genet. 2005
 Tany et coll., Cancer Epidemiol Biomarkers Prev. 2005
 Metzelaar-Blok et coll., Mol Vis. 2005
 Reinders et coll., Hum Immunol. 2006
 Barahmani et coll., J Invest Dermatol. 2006
 Tian et coll., Immunogenetics. 2006
 Reinders et coll., Oral Oncol. 2007
 Jumnainsong et coll., Tissue Antigens. 2007
 Tamaki et coll., J Oral Pathol Med. 2007
 Stern-Ginossar et coll., Nat Immunol. 2008
 Melum et coll., Hepatology. 2008

Douik et coll., Hum Immunol. 2009
 Tamaki et coll., Clin Immunol. 2009
 Lavado-Valenzuela et coll., Tissue Antigens. 2009
 Yadav et coll., J Immunol. 2009
 Kopp et coll., J Clin Immunol. 2009
 Lü et coll., Immunology. 2009
 Ashiru et coll., Cancer Res. 2010
 Viny et coll., Haematologica. 2010
 Kumar et coll., Nat Genet. 2011
 Tse et coll., Hum Mol Genet. 2011
 Luo et coll., Tissu Antigens. 2011
 Jiang et coll., Tissu antigens. 2011
 Huang et coll., Tissue Antigens. 2011

Anticorps anti-MICA

Jinushi et coll., Proc Natl Acad Sci USA. 2006
 Jinushi et coll., Proc Natl Acad Sci USA. 2008

AUTOIMMUNITE

Forme membranaire de MICA

Tieng et coll., Proc Natl Acad Sci USA. 2002
 Martin-Pagola et coll., J Clin Immunol. 2003
 Groh et coll., Proc Natl Acad Sci USA. 2003
 Martin-Pagola et coll., Immunogenetics. 2004
 Hüe et coll., Immunity. 2004
 Holmén et coll., J Am Soc Nephrol. 2005
 Saikali et coll., J Neurosci. 2007
 Perera et coll., Inflamm Bowel Dis. 2007
 Allez et coll., Gastroenterology. 2007
 Schrambach et coll., PLoS One. 2007
 Holmén et coll., J Am Soc Nephrol. 2007
 Eagle et coll., PLoS One. 2009
 Arvonen et coll., Scand J Rheumatol. 2010
 Qin et coll., Diabetes. 2011
 Abediankenari et coll., Iran J Allergy Asthma Immunol. 2011
 Ge et coll., J Dig Dis. 2011

Forme soluble de MICA

Groh et coll., Proc Natl Acad Sci USA. 2003
 Holdenrieder et coll., Anticancer Res. 2007
 Fernandez-Morera et coll., Hum Immunol. 2008
 Dai et coll., J Exp Med. 2009
 Li et coll., Int J Colorectal Dis. 2010
 Clemente et coll., Immunol Lett. 2010
 Zhao et coll., J Gastroenterol Hepatol. 2011

Polymorphisme de MICA

Mizuki et coll., Proc Natl Acad Sci USA. 1997
 Goto et coll., Tissue Antigens. 1997
 Goto et coll., Am J Ophthalmol. 1998
 Goto et coll., Invest Ophthalmol Vis Sci. 1998
 Kimura et coll., Int J Cardiol. 1998
 Tsuchiya et coll., Arthritis Rheum. 1998
 Yabuki et coll., Hum Immunol. 1999
 Ota et coll., Am J Hum Genet. 1999
 Yabuki et coll., Invest Ophthalmol Vis Sci. 1999
 Gonzalez-Escribano et coll., Tissue Antigens. 1999
 Gonzalez et coll., Arthritis Rheum. 1999
 Cheng et coll., Br J Dermatol. 2000
 Mizuki et coll., Invest Ophthalmol Vis Sci. 2000
 Kawabata et coll., Hum Immunol. 2000
 Choi et coll., Tissue Antigens. 2000
 Tay et coll., Clin Exp Immunol. 2000
 Lee et coll., J Pediatr Endocrinol Metab. 2000
 Nejntsev et coll., Diabetes. 2000
 Martinez-Borra et coll., Hum Immunol. 2000
 Ricci-Vitiani et coll., J Rheumatol. 2000
 Huang et coll., Exp Clin Immunogenet. 2000
 Mizuki et coll., Hum Immunol. 2001
 Salvarani et coll., J Rheumatol. 2001
 Martinez et coll., Arthritis Rheum. 2001
 Sugimura et coll., Tissue Antigens. 2001

Glas et coll., Tissue Antigens. 2001
 Park et coll., Diabetes Care. 2001
 Gambelunghie et coll., J Clin Endocrinol Metab. 2001
 Singal et coll., Clin Exp Rheumatol. 2001
 Norris et coll., Gastroenterology. 2001
 Wiencke et coll., Hepatology. 2001
 Gonzalez et coll., J Rheumatol. 2001
 Gonzalez et coll., Hum Immunol. 2001
 Orchard et coll., Clin Exp Immunol. 2001
 Seki et coll., Tissue Antigens. 2001
 Park et coll., J Korean Med Sci. 2002
 Mizuki et coll., Tissue Antigens. 2002
 Picco et coll., Int J Mol Med. 2002
 Nikitina et coll., Hum Immunol. 2002
 Lopez-Vazquez et coll., Gut. 2002
 Bilbao et coll., Tissue Antigens. 2002
 Shtauvere-Brameus et coll., Ann N Y Acad Sci. 2002
 Berzina et coll., Ann N Y Acad Sci. 2002
 Lopez-Vazquez. Immunogenetics. 2002
 Ahmad et coll., Tissue Antigens. 2002
 Park et coll., Tissue Antigens. 2002
 Shtauvere-Brameus et coll., Ann N Y Acad Sci. 2002
 Gonzalez et coll., J Rheumatol. 2002
 Fernandez et coll., Tissue Antigens. 2002
 Grubic et coll., Eur J Immunogenet. 2004
 Liu et coll., J Oral Pathol Med. 2004
 Yasuoka et coll., Arthritis Rheum. 2004
 Martinez et coll., Arthritis Rheum. 2004
 Lopez-Vazquez et coll., Am J Gastroenterol. 2004
 Seko et coll., J Vasc Res. 2004
 Romphruk et coll., Tissue Antigens. 2004
 Woolley et coll., Scand J Immunol. 2005
 Hughes et coll., Tissue antigens. 2005
 Barker et coll., J Clin Endocrinol Metab. 2005
 Van Steenberghe et coll., Eur J Gastroenterol Hepatol. 2005
 Amroun et coll., Hum Immunol. 2005
 Thomas et coll., Hum Immunol. 2005
 Nishiyama et coll., Jpn J Ophthalmol. 2005
 Ding et coll., Clin Exp Immunol. 2005
 Gambelunghie et coll., Rheumatology (Oxford). 2005
 Sanchez et coll., Rheumatology (Oxford). 2006
 Nishiyama et coll., Can J Ophthalmol. 2006
 Munoz-Saa et coll., Scand J Immunol. 2006
 Van Autreve et coll., Hum Immunol. 2006
 Barahmani et coll., J Invest Dermatol. 2006
 Bilbao et coll., Genes Immun. 2006
 Kawabata et coll., Ann N Y Acad Sci. 2006
 Thomas et coll., Hum Immunol. 2006
 Gupta et coll., Ann N Y Acad Sci. 2006
 Fdez et coll., Tissue Antigens. 2006
 Mizuki et coll., Jpn J Ophthalmol. 2007
 Alizadeh et coll., Mol Immunol. 2007
 Turkcapar et coll., Rheumatol Int. 2007
 Karisen et coll., J Hepatol. 2007
 Fang et coll., Scand J Immunol. 2007
 Chang et coll., Br J Dermatol. 2007
 Gombos et coll., Eur J Immunol. 2007
 Lopez-Arbesu et coll., Rheumatology (Oxford). 2007
 Gonzalez-Gay et coll., Rheumatology (Oxford). 2007
 Dittmar et coll., Eur J Endocrinol. 2008
 Tinto et coll., Dig Liver Dis. 2008
 Field et coll., Diabetes. 2008
 Shin et coll., Ann N Y Acad Sci. 2008
 Harjacek et coll., Clin Exp Rheumatol. 2008
 Mameli et coll., Clin Exp Rheumatol. 2008
 Fernandez-Morera et coll., Tissue Antigens. 2008
 Maia et coll., Hum Immunol. 2009
 Santin et coll., Genes Immun. 2009

Triolo et coll., J Clin Endocrinol Metab. 2009
 Kirsten et coll., Arthritis Res Ther. 2009
 Fojtikova et coll., Rheumatol Int. 2009
 Aquino-Galvez et coll., Hum Genet. 2009
 Lü et coll., Immunology. 2009
 Lopez-Hernandez et coll., Hum Immunol. 2010
 Baker et coll., J Clin Endocrinol Metab. 2010
 Bratanic et coll., Tissue Antigens. 2010
 meguro et coll., Ann Rheum Dis. 2010
 Baker et coll., J Clin Endocrinol Metab. 2011
 Skinningsrud et coll., J Clin Endocrinol Metab. 2011
 Pollock et coll., Tissue Antigens. 2011
 Howson et coll., Diabetes. 2011
 Fojtikova et coll., Rheumatol Int. 2011
 Yoshida et coll., Arthritis Rheum. 2011
 Zhao et coll., J Gastroenterol Hepatol. 2011
 Folwaczny et coll., Tissue Antigens. 2011
 Hsieh et coll., Genet Test Mol Biomarkers. 2011

Anticorps anti-MICA

Dai et coll., J Exp Med. 2009

TRANSPLANTATION & GREFFE

Forme membranaire de MICA

Zwirner et coll., Hum Immunol. 1999
 Hankey et coll., Transplantation. 2002
 He et coll., Transplant Proc. 2006
 Seiler et coll., Am J Transplant. 2007
 Suarez-Alvarez et coll., Am J Transplant. 2007
 Gannagé et coll., Transplantation. 2008
 Uzunel et coll., Liver Transpl. 2008
 Li et coll., Proc Natl Acad Sci U S A. 2009
 Racca et coll., Transpl Immunol. 2009
 Li et coll., Transplantation. 2010
 Wei et coll., Life Sci. 2010
 Luo et coll., BMC Cell Biol. 2010

Forme soluble de MICA

Suarez-Alvarez et coll., Transplantation. 2006
 Suarez-Alvarez et coll., Transpl Immunol. 2006
 Zou et coll., Transplant Immunol. 2009
 Boukouaci et coll., Blood. 2009

Polymorphisme de MICA

Zwirner et coll., Hum Immunol. 2000
 Li et coll., Tissue Antigens. 2004
 Zou et coll., Hum Immunol. 2006
 Kitcharoen et coll., Hum Immunol. 2006
 Panigrahi et coll., Hum Immunol. 2007
 Duquesnoy et coll., Hum Immunol. 2008
 Uzunel et coll., Liver Transpl. 2008
 Zou et coll., Immunogenetics. 2009
 Gautier et coll., Transplant Proc. 2009
 Suarez-Alvarez et coll., Transplantation. 2009
 Parmar et coll., Blood. 2009
 Anderson et coll., Blood. 2009
 Boukouaci et coll., Blood. 2009
 Lemy et coll., Transplantation. 2010
 Tonnerre et coll., Transplant Proc. 2010
 Zhang et coll., Transplantation. 2011
 Cox et coll., Hum Immunol. 2011
 Narayan et coll., Pediatr Transplant. 2011
 Fürst et coll., Tissue Antigens. 2011

Anticorps anti-MICA

Zwirner et coll., Hum Immunol. 2000
 Zou et coll., Hum Immunol. 2002
 Sumitran-Holgersson et coll., Transplantation. 2002
 Mizutani et coll., Am J Transplant. 2005
 Morales-Buenrostro et coll., Clin Transpl. 2006
 Mizutani et coll., Clin Transpl. 2006
 Mizutani et coll., Clin Transpl. 2006
 Ozawa et coll., Clin Transpl. 2006

Kinukawa et coll., Clin Transpl. 2006
 Zafar et coll., Clin Transplant. 2006
 Mizutani et coll., Hum Immunol. 2006
 Zou et coll., Hum Immunol. 2006
 Vasilescu et coll., Hum Immunol. 2006
 Mizutani et coll., Hum Immunol. 2006
 Amézaga et coll., Transpl Immunol. 2006
 Suarez-Alvarez et coll., Transpl Immunol. 2006
 Terasaki et coll., Am J Transplant. 2007
 Panigrahi et coll., Transplant Proc. 2007
 Ozawa et coll., Tissue Antigens. 2007
 Panigrahi et coll., Hum Immunol. 2007
 Suarez-Alvarez et coll., Am J Transplant. 2007
 Scornik et coll., Am J Transplant. 2007
 Zou et coll., N Engl J Med. 2007
 Duquesnoy et coll., Hum Immunol. 2008
 Amico et coll., Transplantation. 2008
 Aguilera et coll., Nephrol Dial Transplant. 2008
 Uzunel et coll., Liver Transpl. 2008
 Duquesnoy et coll., Hum Immunol. 2008
 Alvarez-Marquez et coll., Transplantation. 2009
 Zou et coll., Immunogenetics. 2009
 Gautier et coll., Transplant Proc. 2009
 Li et coll., Proc Natl Acad Sci U S A. 2009
 Kauke et coll., J Heart Lung Transplant. 2009
 Zou et coll., Transpl Immunol. 2009
 Smith et coll., Am J Transplant. 2009
 Suarez-Alvarez et coll., Transplantation. 2009
 Boukouaci et coll., Blood. 2009
 Li et coll., Transplantation. 2010
 Paaantjens et coll., J Heart Lung Transplant. 2010
 Angaswamy et coll., Hum Immunol. 2010
 Lemy et coll., Transplantation. 2010
 Pavlova et coll., Tissue Antigens. 2010
 Nath et coll., Hum Immunol. 2010
 Reinsmoen et coll., Transplantation. 2010
 Paantjens et coll., Plum Med. 2011
 Narayan et coll., PediatrTransplant. 2011
 Yao et coll., Chin Med J (Engl). 2011
 Zhang et coll., Transplantation. 2011
 Zhang et coll., Chin Med J (Engl). 2011
 Acevedo et coll., J Heart Lung Transplant. 2011
 Cox et coll., Hum Immunol. 2011
 Broeders et coll., Clin J Am Soc Nephrol. 2011
 Fürst et coll., Tissue Antigens. 2011

1-2.4.1 MICA, NKG2DLs et les infections bactériennes et virales

L'infection par les virus ou bactéries intracellulaires constitue un stress majeur pour les cellules entraînant l'expression, par les cellules infectées, de signaux de danger permettant leur reconnaissance par le système immunitaire de l'hôte. Les premiers de ces signaux vont se traduire par l'expression ou la surexpression des ligands de NKG2D. Bien que les mécanismes moléculaires amenant à leur expression demeurent mal connus, ceux-ci demeurent cellule hôte et pathogène dépendant. En particulier, ce sont les produits de synthèse des différents pathogènes qui vont pouvoir guider l'expression ou la non-expression de tel ou tel ligand de NKG2D pour une cellule donnée.

1-1.2.1a Les infections bactériennes

Peu de cas référencent l'expression d'un ligand de NKG2D à la suite d'une infection bactérienne.

La surexpression du ligand de NKG2D, ULBP1, par les monocytes et macrophages alvéolaires a été observée après infection par *Mycobacterium tuberculosis* et permettrait le contrôle de l'infection par les cellules NK (Vankayalapati et coll., J Immunol. 2005). Par ailleurs, les travaux de Roy et collaborateurs montraient que l'expansion des lymphocytes T régulateurs CD4(+)CD25(+)FoxP3(+) (Treg) au cours de l'infection par *M. tuberculosis* était contrôlée par les cellules NK du fait de l'expression par ces Treg de ULBP1 (Roy et coll., J Immunol., 2008). ULBP1 n'étant probablement pas le seul NKG2D ligand impliqué dans le contrôle de la pathogénèse infectieuse à *M. tuberculosis*. En effet, une surexpression de MICA à la surface de cellules dendritiques et de lignées cellulaires épithéliales infectées par *M. tuberculosis* avait plus tôt été observée (Das et coll. Immunity. 2001). D'autre part, une analyse comparative de la génétique de patients infectés (n=300) ou non (494) par *Mycobacterium avium* suggère une plus forte susceptibilité vis à vis de l'infection pour les patients porteurs du génotype MICA A6/A6 (Shojima et coll., J Infect Dis. 2009).

Le groupe de Michael Borchers a également montré l'importance du système NKG2DL/NKG2D dans le contrôle des infections respiratoires à *Pseudomonas aeruginosa*. Premièrement par l'observation, in vitro, d'une surexpression de ULBP2 par les cellules épithéliales pulmonaires humaines après infection et, in vivo, de la surexpression de Rae-1 dans le même type cellulaire également après l'infection de

souris (Borchers et coll., Infect Immun. 2006). Par la suite, l'utilisation de souris transgéniques surexprimant Rae1 à la surface des cellules épithéliales pulmonaires confirma le rôle important de l'expression de ce ligand de NKG2D dans le contrôle de l'infection à *P. aeruginosa* (Wesselkamper et coll., J Immunol. 2008).

Plus récemment, Li et collaborateurs, utilisant un modèle murin d'infection à *Salmonella enterica* Seroovar Typhimurium, rapportent une surexpression de MULT1 par les cellules intestinales épithéliales infectées favorisant l'activation des T CD8(+) et T $\gamma\delta$ (Li et coll., Infect Immun. 2012). De même, l'activation des T $\gamma\delta$ dans le contrôle de l'infection à *Brucella suis* via NKG2D et la lyse des macrophages infectés a été reliée à l'expression membranaire de ULBP1 par ces derniers à la suite de l'infection (Bessoles et coll., Eur. J. Immunol. 2011).

D'autre part, le LPS (Lipopolysaccharide), une endotoxine synthétisée par les bactéries à Gram négatif, a été décrit par Eissman et collègues pour induire une forte expression de MICA à la surface des macrophages. L'analyse, par les auteurs, du mécanisme cellulaire impliqué dans cette surexpression de MICA a permis l'identification du TLR-4 (Toll Like Recepteur) puis une diminution de l'expression des microRNA, miR-17-5, miR-20a et miR-93 (initialement décrits pour réguler l'expression de MICA) (Stern-Ginossar et coll., Nat Immunol. 2008), comme les médiateurs de l'effet du LPS sur les macrophages (Eissmann et coll., J Immunol. 2010)

1-1.2.1b Les infections virales

L'immuno-surveillance des infections virales est une des fonctions principales des cellules NK. L'interaction des ligands de NKG2D, exprimés à la surface des cellules infectées, avec leur récepteur, constitue donc la première alarme permettant au système immunitaire de l'hôte de détecter et de détruire les cellules infectées. Dans ce système, il est absolument surprenant d'énumérer l'arsenal moléculaire et protéique développé par les virus latents pour passer outre les mécanismes immunologiques de détection de l'hôte, notamment par l'inhibition de l'expression membranaire des ligands de NKG2D. A l'inverse, il est tout aussi incroyable de concevoir comment, au fil de l'évolution, la pression exercée par les virus a permis au système immunitaire de l'hôte d'évoluer pour proposer aujourd'hui un si grand nombre de ligand pour un unique récepteur NKG2D. Parmi ces ligands, et pour les mêmes raisons, certains arborent un nombre élevé de polymorphismes. C'est en particulier le cas des protéines MICA et MICB.

Les protéines virales

Le virus latent qui fut l'objet du plus grand nombre d'études pour sa capacité à échapper au système NKG2L/NKG2D est le cytomégalo virus (CMV). Plusieurs protéines virales permettent au CMV d'inhiber l'expression membranaire des ligands de NKG2D. Dans un modèle murin d'infection au **MCMV**, Krmpotic et collaborateurs observaient l'effet de la protéine virale **gp40** (produit du gène **m152**) sur l'inhibition de l'expression de H60, se traduisant par une diminution de l'activation des cellules NK (Krmpotic et coll., Nat Immunol. 2002). Cette même protéine fut par la suite décrite pour également inhiber l'expression de toutes les protéines Rae-1 (α à γ) (Lodoen et coll., J Exp Med. 2003). Plus tard, le groupe de Krmpotic identifiait le produit du gène **m145** comme étant responsable de l'absence de la protéine MULT1 à la surface de fibroblastes infectés, malgré une forte surexpression des transcrits (Krmpotic et coll., J Exp Med. 2005). Des phénomènes similaires furent par la suite observés avec les produits des gènes **m155**, provoquant la dégradation spécifique des protéines H60 par le protéasome (Lodoen et coll., J Exp Med 2004) (Hasan et coll., J Virol. 2005) ; **m138**, induisant la dégradation de MULT1 ainsi que de H60 via le lysosome (Lenac et coll., J Exp Med. 2006).

L'homologue humain du MCMV (**HCMV**) dispose également d'un panel de molécules et protéines empêchant l'expression des ligands de NKG2D par les cellules infectées, qui signaleraient ainsi la présence du virus au système immunitaire de l'hôte. C'est ainsi que la protéine virale **UL16** donna nom aux ligands de NKG2D nouvellement découverts : ULBPs (UL16 binding protéins) pour la capacité d'UL16 à se lier à ces derniers *in vitro*, par l'utilisation de protéines recombinantes solubles (Cosman et coll., Immunity. 2001). Cette découverte fut confirmée par les travaux de Welte et collaborateurs, qui révélèrent, *in vitro*, dans un modèle d'infection de fibroblastes, l'effet de UL16 sur l'inhibition sélective de l'expression de MICB, ULBP1 et ULBP2 en provoquant leur rétention intracellulaire au niveau du *cis*-Golgi, et sans effet aucun sur l'expression de MICA ni ULBP3 (Welte et coll., Eur J Immunol. 2003). L'action de UL16 a par la suite été étendue à l'ULBP6 (Eagle et coll., Hum Immunol. 2006). De façon intéressante, le groupe de Peter Stastny décrivait en 2005 un mécanisme selon lequel l'infection de diverses lignées cellulaires par HCMV entraînait, soit une surexpression du polymorphe ligand de NKG2D, MICA, soit une absence d'effet voir une diminution

l'expression de ce dernier, selon le polymorphisme de MICA exprimé par la cellule hôte. En effet, ces travaux mettaient en évidence l'incapacité du HCMV à prévenir l'expression de la protéine mutée MICA A5.1 (Zou et coll., J Immunol. 2005). La protéine virale responsable de ce mécanisme fut par la suite identifiée comme étant l'**UL142** et provoquant également la rétention de MICA dans le Réticulum Endoplasmique et le *cis*-Golgi (Chalupny et coll., Biochem Biophys Res Commun. 2006) (Ashiru et coll., J Virol. 2009).

Le même phénomène a récemment été observé avec la protéine K5 exprimée par le « Kaposi's sarcoma associated herpesvirus » (**KSH**) et sa capacité à réduire l'expression de certains allèles de **MICA**. En effet, les auteurs de cette étude ont caractérisé la protéine **K5** comme ayant une activité « E3 ligase » qui permet l'ubiquitination d'un résidu lysine du domaine transmembranaire des protéines MICA, induisant ainsi leur dégradation par le protéasome. Résidu lysine, dont sa distance par rapport au domaine transmembranaire semble être une condition primordiale à l'efficacité de K5. Une condition non respectée par la topographie des protéines tronquées MICA A5.1, qui ne présentent pas de domaine transmembranaire et qui, par relation de cause à effet, résistent à l'action suppressive de K5 (Thomas et coll., Proc Natl Acad Sci USA. 2008).

Un rôle de la protéine virale **NS3/A4** du VHC fut également avancé dans le contrôle de l'expression de **MICA**, sans que le mécanisme d'action, ni une éventuelle spécificité d'allèle soient établis (Jinushi et coll., J Immunol. 2003) (Wen et coll., Cell Mol Immunol. 2008). Par la suite, plusieurs études ont associé certains polymorphismes de MICA à une susceptibilité de développer un carcinome hépatocellulaire (CHC) chez les patients infectés à HCV (Kumar et coll., Nat Genet. 2011) (Hoshida et coll., J Hepatol. 2012). Récemment, une étude a montré que l'inhibition de l'expression du VHB dans des lignées cellulaires de CHC induisait le rétablissement de l'expression de MICA, suggérant l'utilisation par le HBV d'un mécanisme permettant le contrôle de l'expression de MICA (Tang et coll., Med Microbiol Immunol. 2009).

Comme les autres virus latents précédents, le **VIH** est également capable de contrôler l'expression des ligands de NKG2D. Ainsi, la protéine « **Nef** » a été rapportée comme étant capable d'inhiber l'expression de surface de **MICA**, **ULBP1** et **2**. Le mécanisme moléculaire impliqué et, concernant MICA, l'éventuelle allèle-spécificité de celui-ci n'ont pas été mis en évidence dans cette étude (Cerboni et coll., J Gen Virol.

2007). Plus récemment, les travaux du groupe de Galit Alter, ont révélés le relargage par les TCD4(+) infectés d'une quantité significativement plus importante de la forme soluble de MICA, détectée en quantité importante dans les sérums des patients séropositifs (Nolting et coll., Virology. 2010). Cette étude a permis la mise en lumière d'un effet, jusqu'ici inexploré dans ce domaine de recherche, à savoir l'implication de la forme soluble de MICA dans les mécanismes d'échappement des virus.

Les microARNs viraux

Les microARNs font également partie de la machinerie qu'utilisent les virus pour échapper au système immunitaire de l'hôte. Le virus humain du CMV code également pour un microARN «**hcmv-miR-UL112**» favorisant l'échappement viral. En effet, celui-ci permet l'inhibition de la traduction de MICB, et dans une moindre mesure de MICA, en se liant de façon spécifique à leur région 3'UTR (Ster-Ginossar et coll., Science. 2007) (Nachmani et coll., Nat Immunol. 2010). D'autres microARN viraux ayant pour cibles les transcrits MICB ont également été décrits au cours de l'infection à l'EBV et à KSHV. Il s'agit du **miR-BART2-5p** pour l'EBV et **miR-K12-7** pour KSHV (Nachmani et coll., Cell Host Microbe. 2009). Très récemment, les travaux du même groupe, dirigés par le professeur Ofer Mandelboim, apportaient cette fois-ci la preuve de l'effet fonctionnel du microARN «**miR-J1-3p**», exprimé de façon commune par le BK et le JC virus, sur l'inhibition de ULBP3 au cours de l'infection (Bauman et coll., Cell Host Microbe. 2011).

1-2.4.2 MICA, NKG2DLs et immunité anti-tumorale

L'expression de MICA et MICB, ainsi que des autres ligands de NKG2D est restreinte à un nombre limité de cellules « saines ». L'expression ou la surexpression de ces NKG2DL sera induite lors de la survenue d'un stress cellulaire ou lors de la transformation tumorale (Groh et coll., Proc Natl Acad Sci USA.1999). Bien que les mécanismes moléculaires menant à l'expression des ligands de NKG2D par les cellules tumorales ne soient pas totalement élucidés, il est important de noter que la tumorigénèse est très souvent liée aux processus d'altération de l'ADN ainsi qu'à la perte de l'inhibition de contact, deux phénomènes également liés à la régulation de MICA (Tang et coll., J Cell Biol. 2008) (Zou et coll., Hum Immunol. 2006). Par ailleurs, de nombreuses tumeurs ont pour origine une infection virale (Papillomavirus et Cancer du col de l'utérus; HTLV-1 et Leucémie ou encore HHV- et Sarcome de Kaposi...). Infections qui constituent, là encore, un stress cellulaire favorisant l'expression des ligands de NKG2D. Ainsi, l'expression constitutive de MICA et/ou d'autres NKG2DLs a été largement observée chez nombre de lignées cellulaires et cellules primaires d'origines tumorales de toutes provenances tissulaires (Cosman et coll., Immunity. 2001) (pour revue : Nausch et Cerwenka. Oncogene. 2008). Il est donc très facile de concevoir cette surexpression des ligands de NKG2D par les cellules tumorales comme une « alarme » permettant aux cellules effectrices de l'immunité innée de rapidement cibler puis éliminer les cellules transformées via l'interaction NKG2DL/NKG2D.

En effet, ces dernières années, les démonstrations, *in vitro* de la lyse de cellules tumorales exprimant un ou plusieurs NKG2DL par des cellules NK (Bauer et coll., Science. 1999) (Groh et coll., Proc Natl Acad Sci USA. 1999) et, *in vivo*, du rejet préférentiel des tumeurs NKG2DL(+), préalablement implantées chez la souris par comparaison aux tumeurs NKG2DL(-), (Cerwenka et coll., Proc Natl Acad Sci USA. 2001) (Diefenbach et coll., Nature 2001), ont mis en exergue l'importance des complexes NKG2DL/NKG2D pour l'immunité anti-tumorale. Ces données furent confirmées par la suite avec l'utilisation d'anticorps bloquants le récepteur NKG2D ou de souris transgéniques NKG2D déficientes et l'observation d'une plus grande susceptibilité à la progression tumorale (Smyth et coll. J Exp Med. 2005) (Guerra et coll., Immunity. 2008).

Alors par quel(s) mécanisme(s) le système NKG2DL/NKG2D est-il éludé au cours de la tumorigénèse ? De cette question plusieurs mécanismes d'échappement tumoral ont pu être mis en évidence :

L'exposition prolongée des cellules NKG2D(+) avec ses ligands membranaires pourrait être une cause de la diminution de l'immunité anti-tumorale. En effet, de nombreuses études ont révélé une diminution de l'expression de NKG2D à la surface des NK provenant de souris transgéniques KI pour MICA ou RAE-1, un ligand murin de NKG2D (Oppenheim et coll., Nat Immunol. 2005) (Wiemann et coll., J Immunol. 2005). Une diminution de l'expression de surface de NKG2D à la surface des NK a également été observée après l'exposition prolongée des NK (Plusieurs jours) avec des cellules tumorales transfectées avec le NKG2DL H60 (Coudert et coll., Blood. 2005). Ces études, d'une part, mettent en lumière un mécanisme par lequel NKG2D est internalisé par la cellule NK après interaction avec son ligand, et d'autre part, suggèrent un concept nouveau différenciant l'interaction « ponctuelle » de NKG2D avec son ligand et provoquant la lyse de la cellule présentatrice, de l'interaction « chronique » aboutissant à une baisse de l'immunosurveillance des NK par une expression moindre de NKG2D à leur surface. Ce phénomène pourrait donc constituer un mécanisme naturel, prévenant d'éventuelles réactions immunitaires inadaptées, proches de l'auto-immunité.

Les ligands solubles de NKG2D sont également capables d'interagir avec NKG2D et provoquer son internalisation, donc une diminution de son expression par les cellules effectrices NKG2D(+) (Groh et coll., Nature. 2002) (Wiemann et coll., J Immunol. 2005). Il s'agirait donc là aussi d'un mécanisme en défaveur de l'immunité innée anti-tumorale. Depuis, par le développement et la commercialisation de tests ELISA pour la détection des formes solubles des ligands de NKG2D, leur présence dans les sérums des patients atteints de cancer a fait l'objet d'une vigilance accrue dans nombre de travaux de recherche. Ainsi, les ligands solubles de NKG2D, en particulier MICAs, ont été détectés en quantité plus importante dans les sérums des patients souffrants de tous types de cancers, par comparaison aux patients sains ou atteints de pathologies non cancéreuses (**Tableau 1**). Dans ces études, la présence de ligands solubles a très souvent été liée à une diminution de l'expression membranaire de NKG2D et une diminution de la cytotoxicité des cellules NK et T CD8(+). Par ailleurs, plusieurs études ont pu corrélérer la

quantité de ligands solubles de NKG2D, dans les séra des patients, à l'état de progression du cancer et/ou au pronostique vital (Holdenrieder et coll., Int J Cancer. 2006) (Paschen et coll., Clin Cancer Res. 2009) (Nückel et coll., Leukemia. 2010) (Yamaguchi et coll., Cancer Sci. 2012) (**Tableau 1**).

Tableau 1: Revue de la littérature décrivant la détection des formes solubles de MICA et des autres ligands de NKG2D dans les séra de patients atteints de cancer. PS=Patients sains ; PC=Patients cancéreux ; AML=Leucémie myéloïde aigüe ; ALL=Leucémie lymphoblastique aigüe ; CML= Leucémie myéloïde chronique ; CLL=Leucémie lymphoïde chronique ; T-NHL=Lymphome non-Hodgkinien à cellules T ; MICAs=MICA soluble ; ULBPs=ULBP soluble ; **D'après le résumé uniquement (Publication non accessible)

TYPES DE CANCERS	LIGANDS SOLUBLES DE NKG2D			OBSERVATIONS	REFERENCES
	MICA	MICB	ULBP		
Carcinomes épithéliaux (Sein,n=2 ; poumon, n=3) ; Mélanome (n=2) vs PS (n=1)	X			Plus fort dosage de MICAs dans les séra des PC / Diminution de l'expression de NKG2D à la surface des TCD8(+) infiltrant les tumeurs et présents dans les PBMcs des PC / Diminution de l'activité cytotoxique des TCD8(+)	Groh et coll., Nature. 2002
AML (n=14) ; ALL (n=2) ; T-NHL (n=1) ; CML (n=4) vs PS (n=9)	X	X		MICA et MICB soluble détectées dans les séra	Salih et coll., Blood. 2003
Cancer colorectal (n=3) vs PS (n=3)	X	X		Plus fort dosage de MICAs et MICBs dans les séra des PC / Diminution de l'expression de NKG2D à la surface des NK des PC / Diminution de l'activité cytotoxique des cellules NK	Doubrovina et coll., J Immunol. 2003
Neuroblastome (n=20) vs PS (n=50)	X			Plus fort dosage de MICAs dans les séra des PC / Diminution de l'expression de NKG2D à la surface des NK et TCD8(+) des PC / Diminution de l'activité cytotoxique des cellules NK	Raffaghello et coll., Neoplasia. 2004
Carcinome hépatocellulaire (n=26) vs PS (n=10)	X			Plus fort dosage de MICAs dans les séra des PC / Diminution de l'expression de NKG2D à la surface des NK des PC / Diminution de l'activité cytotoxique des cellules NK	Jinushi et coll., J Hepatol. 2005
Cancers (Sein, n=52 ; poumon, n=19 ; gastro-intestinaux, n=128 ; gynécologique, n=62 ; Prostate, n=16 et rénaux, n=16) vs Pathologies non-cancéreuses (n=154) et PS (n=62)	X			Plus fort dosage de MICAs dans les séra des PC / Corrélation avec le stade du cancer et la présence de métastases	Holdenrieder et coll., Int J Cancer. 2006
Cancers gastro-intestinaux (n=42) vs PS (n=10)		X		Plus fort dosage de MICBs dans les séra des PC	Salih et coll., Hum Immunol. 2006
Leucémie (n=23) et Cancers gastro-intestinaux (n=19) vs PS (n=15)			ULBP2	Plus fort dosage de ULBP2s dans les séra des patients leucémiques	Waldhauer et coll., Cancer Res. 2006
CML (n=49) vs PS (n=13)	X			Plus fort dosage de MICAs dans les séra des PC / Diminution de l'expression de NKG2D à la surface des NK et TCD8(+) des PC	Boissel et coll., J Immunol. 2006
Cancers (Sein, n=52 ; poumon, n=19 ; gastro-intestinaux, n=128 ; gynécologique, n=62 ; Prostate, n=16 et rénaux, n=16) vs Pathologies non-cancéreuses (n=154) et PS (n=62)		X		Plus fort dosage de MICBs dans les séra des PC / Corrélation avec le stade du cancer et la présence de métastases	**Holdenrieder et coll., Cancer Immunol Immunother. 2006
Leucémie myéloïde aigue (n=43) vs PS (n=25)	X		ULBP1	Plus fort dosage de MICAs mais pas de ULBP1s dans les séra des PC	Diermayr et coll., Blood. 2008
Cancer de la prostate (n=7) ; Cancer des Ovaires (n=15) vs PS (n=20)	X	X		Plus fort dosage de MICAs et MICBs dans les séra des PC / Diminution de l'expression de NKG2D à la surface des NKT des PC / Diminution de l'activité cytotoxique des cellules NKT	Wang et coll., Immunol Lett. 2008
Syndrome de Sézary (n=10) vs PS (n=21)	X			Plus fort dosage de MICAs et MICBs dans les séra des PC / Pas de diminution de l'expression de NKG2D à la surface des NK des PC	Dulphy et coll., J Invest Dermatol. 2009
Mélanome (n=208) vs PS (n=50)	X		ULBP2	Plus fort dosage de MICAs et ULBP2s dans les séra des PC / Pas de diminution de l'expression de NKG2D à la surface des NK des PC / Corrélation avec le stade du cancer et la survie des PC	Paschen et coll., Clin Cancer Res. 2009
CLL (n=98) vs PS (n=48)	X	X	ULBP1, 2 et 3	Plus fort dosage de MICAs, MICBs et ULBP2s mais pas de ULBP1 et 3 dans les séra des PC / Pas de diminution de l'expression de NKG2D à la surface des NK des PC / Corrélation avec le stade du cancer et la survie des PC	Nückel et coll., Leukemia. 2010
Prolactinome (n=16) ; Tumeur pituitaire non sécrétrice (n=23) vs PS (n=17)	X			Plus fort dosage de MICAs dans les séra des PC / Diminution de l'expression de NKG2D à la surface des NK et TCD8(+) des PC	Ma et coll., J Clin Neurosci. 2010
Carcinome spinocellulaire buccal (n=60) vs PS (n=50)		X		Plus fort dosage de MICBs dans les séra des PC / Corrélation avec le stade du cancer et la présence de métastases	Tamaki et coll., Anticancer Res. 2010
Neuroblastome (n=4) vs PS (n=6)	X			Plus fort dosage de MICAs dans les séra des PC / Diminution de l'expression de NKG2D à la surface des NK des PC / Diminution de l'activité cytotoxique des cellules NK	Kloess et coll., Eur J Immunol. 2010
Cancer du colon (n=26) vs PS (n=30)	X	X		Plus fort dosage de MICAs et MICBs dans les séra des PC / Diminution de l'expression de NKG2D à la surface des NK des PC / Diminution de l'activité cytotoxique des cellules NK	Zhang et coll., Tohoku J Exp Med. 2012
AML (n=104) ; ALL (n=30) ; CML (n=11) ; CLL (n=60) vs PS (n=30)	X	X	ULBP1, 2 et 3	Plus fort dosage de tout les NKG2DLs dans les séra des PC / Diminution de l'expression de NKG2D à la surface des NK des PC / Diminution de l'activité cytotoxique des cellules NK	Hilpert et coll., J Immunol. 2012
Cancer du poumon (n=80) vs Pathologie pulmonaire non-cancéreuse (n=25) et PS (n=100)			ULBP2	Plus fort dosage de ULBP2s dans les séra des PC / Corrélation avec le stade du cancer et la survie des PC	Yamaguchi et coll., Cancer Sci. 2012

Plusieurs mécanismes moléculaires ont été mis en évidence comme pouvant être la cause de ce relargage massif de ligands solubles de NKG2D chez les patients atteints de cancer. En effet, les travaux de Jinushi et collaborateurs ont corrélé la surexpression de MICA soluble à une surexpression de ERp5, une protéine essentielle au clivage de MICA par les métalloprotéines, au cours du myélome multiple (Jinushi et coll., Proc Natl Acad Sci USA. 2008). Un peu plus tôt, Gumireddy et collaborateurs identifiaient ERp5 comme un facteur de risque favorisant les métastases du cancer du sein (Gumireddy et coll., Proc Natl Acad Sci USA. 2007). De même, l'activité des métalloprotéinases avait également été décrite comme favorisant la tumorigénèse (Borrell-Pagès et coll., EMBO J. 2003) (Wildeboer et coll., J Neuropathol Exp Neurol. 2006). Très récemment, Barsoum et collaborateurs ont montré l'effet direct de l'hypoxie sur l'augmentation de l'expression d'ADAM10 par des cellules cancéreuses. De cette surexpression d'ADAM10 en résultaient une diminution de l'expression membranaire et une augmentation du relargage des formes solubles de MICA, avec pour conséquence une visibilité des cellules tumorales par les cellules NK diminuée (Barsoum et coll., Cancer Res. 2011). En effet, plusieurs conséquences ont été associées au relargage des ligands de NKG2D par les cellules tumorales. La première de ces conséquences est la diminution de l'expression de surface des NKG2DL par les cellules tumorales. La seconde, se caractérise par une diminution de la disponibilité membranaire de NKG2D à la surface des cellules effectrices par internalisation du récepteur ou, tout au moins, par compétition avec les ligands membranaires de NKG2D.

Les travaux de Jinushi et collaborateurs ont montré l'effet des **anticorps anti-MICA**, naturels ou induits par des traitements ciblant le blocage de la costimulation par CTLA-4 ou des thérapies vaccinales utilisant des cellules tumorales autologues apoptotiques, sur la diminution de la quantité des formes solubles de MICA circulantes et sur l'augmentation de l'activité cytotoxique des cellules NK et T CD8(+) (Jinushi et coll., Proc Natl Acad Sci USA. 2006 et 2008). Ces travaux ont mis en lumière un mécanisme nouveau selon lequel ces anticorps permettraient l'opsonisation, non seulement des formes circulantes de MICA, mais également des cellules tumorales exprimant un phénotype MICA(+).

La libération par les cellules tumorales d'**exosomes** présentant des ligands de NKG2D est un nouveau mécanisme encore mal connu, mais de plus en plus associé à l'échappement des cellules cancéreuses. En effet, Clayton et collaborateurs co-signent

plusieurs publications décrivant l'expression, par les exosomes dérivant de cellules tumorales, des protéines MICA et MICB, mais également de TGF- β , toutes trois ici impliquées dans la diminution de l'expression de NKG2D à la surface des NK et T CD8(+) (Clayton et Tabi, Blood Cells Mol Dis. 2005) (Clayton et coll., J Immunol. 2008). De façon surprenante, Ashiru et collaborateurs ont récemment montré l'expression sélective des protéines mutées *MICA*008/A5.1*, et non les protéines MICA sauvages, par les exosomes issus de cellules tumorales (Ashiru et coll., Cancer Res. 2010), suggérant un possible impact du polymorphisme de MICA sur la progression tumorale.

Peu d'études à ce jour ont recherché à relier les **polymorphismes** des ligands de NKG2D, en particulier de MICA, à une prédisposition ou une protection vis à vis du cancer (**Figure 8**). La mutation *MICA A5.1*, précédemment mentionnée, a été alternativement associée à une résistance à l'encontre du carcinome nasopharyngé (Tian et coll., Immunogenetics. 2006) et du cholangiocarcinome (Melum et coll., Hepatology. 2008) et à une susceptibilité à l'égard du carcinome à cellules squameuses (Tamaki et coll., J Oral Pathol Med. 2007) (Tamaki et coll., Clin Immunol. 2009). Le rôle de la protéine mutée MICA A5.1 dans les différents types de cancer reste donc à déterminer.

1-2.4.3 MICA, NKG2DLs et auto-immunité

Le propre du système immunitaire est de définir et différencier ce qui relève du « soi » de ce qui relève du « non soi ». Cette distinction faite, les composantes de l'immunité peuvent alors s'atteler à éliminer ce qu'elles considèrent comme composant du « non soi ». C'est donc là que réside la principale difficulté du système immunitaire ou comment différencier une cellule saine d'une cellule infectée, endommagée ou en cours de transformation tumorale. Il s'agit ici de différences subtiles mettant en jeu des mécanismes moléculaires complexes parmi lesquels l'expression des ligands de NKG2D joue un rôle primordial (pour revue : (Caillat-Zucman, Hum Immunol. 2006) (Van Belle et coll., Mol Immunol. 2009)).

Le diabète de type I (DT1) ou diabète insulino-dépendant (DID), se caractérise par une destruction des cellules bêta des îlots de Langerhans, cellules impliquées dans la synthèse de l'insuline. Le rôle de NKG2D a clairement été associé au développement de cette pathologie auto-immune. En effet, Ogasawara et collaborateurs, par l'utilisation d'un modèle murin NOD (Non-obese diabetic), ont montré (1) l'expression de Rae-1 à la surface des cellules des îlots pancréatiques des souris prédiabétiques alors que les souris saines non, (2) l'expression de NKG2D par les TCD8(+) infiltrant le pancréas des souris diabétiques, alors que chez la souris ces cellules n'expriment pas naturellement NKG2D, et (3), que l'utilisation d'anticorps non-déplétants anti-NKG2D permettait de prévenir la survenue de la pathologie (Ogasawara et coll., Immunity. 2004). L'importance du système Rae-1(cellules bêta)/NKG2D(TCD8+) dans la survenue du diabète auto-immun a très récemment été confirmée (Markiewicz et coll., Immunity. 2012).

D'autre part, plusieurs études, chez la souris NOD et chez l'enfant atteint de DT1, ont associées au DT1 d'importantes dysfonctions de l'activation et de la transduction du signal à partir du récepteur NKG2D. Dans ces études, la dysfonction des NK a, de façon surprenante, été associée à la détection de Rae-1 et MICA à la surface des NK, respectivement, chez la souris NOD et chez les enfants diabétiques (Ogasawara et coll., Immunity. 2003) (Qin et coll., Diabetes. 2011). L'expression de MICA par les cellules NK avait par le passé été observée (McCann et coll., J Immunol. 2007) et, dans cette étude, résultait d'un transfert des protéines MICA, exprimées à la surface des cellules cibles, à la surface des cellules NK, après contact et formation d'une synapse immunologique. Les

conséquences de l'expression de ligands de NKG2D à la surface des NK restent à définir mais semblent corrélés avec les observations de Ogasawara et Qin : Défaut d'activation via NKG2D et diminution du nombre de cellules NK. Le rôle des NK dans le T1D reste également à définir.

Plusieurs évidences en faveur d'une prédisposition génétique au développement du T1D ont également été avancées. En particulier, le génotype *HLA-DR3/DR4* a été très clairement associé au T1D (She et coll., Immunol Today. 1996) (Rewers et coll., Diabetologia. 1996) (Erlich et coll., Diabetes. 2008). A l'inverse le gène *HLA-DR2* a été défini comme protecteur (Valdes et coll., Diabetologica. 2005) (Husain et coll., J Autoimmun. 2007). Par la suite, la susceptibilité des patients *HLA-DR3/DR4* au T1D a été étendue au gène de classe I, *HLA*B3906* (Nejentsev et coll., Nature. 2007) (Baschal et coll., Diabetologica. 2011). Naturellement, et étant donné le déséquilibre de liaison existant entre *HLA-B* et *MICA*, de très nombreuses études ont associé le polymorphisme de *MICA*, en particulier le polymorphisme du microsatellite de l'exon 5, codant pour le domaine transmembranaire de la protéine, comme élément supplémentaire prédisposant au T1D. Dans ces études, la mutation *MICA A5.1* (induit un codon stop précocement, aboutissant à l'expression d'une protéine tronquée) a particulièrement été associée au T1D (pour revue : Gambelunghe et coll., Ann NY Acad Sci. 2007) (Ide et coll., J Clin Immunol. 2005) (Triolo et coll., J clin Endocrinol Metab. 2009). Plus récemment, ce sont les allèles de *MICA* associés à l'expression d'une Valine en position 129 (129(val)) qui ont été mis en évidence comme prédisposants la pathologie (Raache et coll., Clin Vaccine Immunol. 2012). On peut noter, par ailleurs, que la mutation *MICA A5.1* est génétiquement liée à l'expression du polymorphisme 129(Val). Il reste à définir si l'association observée entre le polymorphisme de *MICA* et le T1D résulte d'une conséquence fonctionnelle touchant directement l'expression ou la fonction de *MICA*, ou si cela résulte uniquement du déséquilibre de liaison associant le gène *MICA* aux gènes du *HLA*.

La maladie Céliaque (ou coeliaque) (MC), appelée aussi « intolérance au gluten » est une maladie chronique qui, comme son nom l'indique, est déclenchée par la consommation de gluten et se caractérise, chez les patients intolérants, par une atteinte des villosités de l'intestin grêle et la présence d'un infiltrat lymphocytaire principalement constitué de T CD4(+), dirigés contre des peptides du gluten dans un

contexte HLA-DQ2 et/ou DQ8, au niveau de la Lamina propria, et de T CD8(+) au niveau de l'épithélium intestinal (IELs : Intraepithelial lymphocytes) (pour revue : Sollid., Nat Rev Immunol. 2002). Les mécanismes moléculaires et cellulaires expliquant les lésions observées au cours de la maladie ont été associés à (1) une activité cytotoxique, indépendante du TCR, mais médiée par NKG2D, des IELs du fait de la présence de fortes concentrations d'IL-15 chez les patients atteints de MC (Mention et coll., Gastroenterology. 2003) (Meresse et coll., Immunity. 2004) et (2) de la surexpression des ligands de NKG2D, MICA et ULBP5, à la surface des cellules épithéliales intestinales (Hüe et coll., Immunity. 2004) (Eagle et coll., PLoS One. 2009). Par ailleurs, la surexpression de MICA au niveau des villosités intestinales des patients atteints de MC a directement été associée à la présence de gliadin, un peptide dérivé du gluten (Martin-Pagola et coll., Immunogenetics. 2004). Plus récemment, le rôle éventuel de l'acide arachidonique, relargué par les IELs, après activation via NKG2D, le récepteur à IL-15 et la transduction d'un signal passant par la phosphorylation de la phospholipase cytosolique A₂ (cPLA₂) a été mis en avant comme pouvant contribuer aux lésions de la CM en participant à l'activation des granulocytes (Tang et coll., J Exp Med. 2009).

Etant donné la prédisposition génétique (HLA-DQ2/8) pour le développement de la MC, le haut niveau de polymorphisme du gène *MICA*, le déséquilibre de liaison liant ce gène aux gènes du HLA, et la surexpression de *MICA* par les cellules épithéliales au cours de la MC, le groupe de Tinto et collaborateurs a examiné la fréquence des polymorphismes des gènes du *HLA de classe II* et de *MICA* parmi une population de patients atteints de MC et comparée à une population de patients sains. Leurs résultats ont, d'une part, confirmé la forte prédisposition à la MC des patients porteurs des allèles *HLA-DQ2* et/ou *DQ8*, et d'autre part, identifié la mutation *MICA A5.1*, principalement retrouvé sur l'allèle *MICA*008*, comme étant associée à la MC, en particulier le génotype *MICA A5.1/A5.1* (Tinto et coll., Gig Liv Dis. 2008) (Bratanic et coll., Tissue Antigens. 2010). De façon intéressante, cette mutation avait, au préalable, été associée à un défaut de polarisation, d'adressage à la membrane cellulaire, par les cellules épithéliales intestinales (Suemizu et coll., Proc Natl Acad Sci USA. 2002).

La maladie de Crohn est une maladie inflammatoire chronique de nature auto-immune pouvant entraîner des lésions à tout niveau de l'appareil digestif. Comme dans la MC, celle-ci se caractérise par (1) une surexpression de MICA à la surface des cellules

épithéliales intestinales et (2) la présence d'une sous population lymphocytaire T CD4(+)NKG2D(+) au niveau de la Lamina propria (Tieng et coll., Proc Natl Acad Sci USA. 2002) (Allez et coll., Gastroenterology. 2007). Dans cette dernière étude, les auteurs ont également montré une forte expression de l'IL-15R β par cette population lymphocytaire, mais n'ont pas recherché à quantifier cette cytokine chez ces patients atteints de la maladie de Crohn.

La polyarthrite rhumatoïde (PR) est une maladie auto-immune inflammatoire chronique, qui se définit par une atteinte de la membrane synoviale. Celle-ci a été associée à une infiltration lymphocytaire, en particulier une sous population lymphocytaire CD4(+)CD28(-)NKG2D(+), et la détection locale et dans le sérum de fortes concentrations d'IL-15 et de TNF α (Groh et coll., Proc Natl Acad Sci USA. 2003). De plus, de façon semblable à ce qui a été observé dans la pathogénèse du DT1, il a été rapporté une forte expression des ligands de NKG2D, MICA et MICB, par les synoviocytes des patients souffrant de PR (Groh et coll., Proc Natl Acad Sci USA. 2003) (Schrambach et coll., PLoS One. 2007). De fortes concentrations des isoformes solubles de MICA et MICB ont par ailleurs été détectées dans les séra de ces patients (Groh et coll., Proc Natl Acad Sci USA. 2003). Cependant, dans cette étude, les auteurs n'ont pas observé de diminution de l'expression de NKG2D à la surface des cellules effectrices, probablement du fait de la forte co-expression d'IL-15 et de TNF α , cytokines stimulant l'expression de NKG2D (Zhang et coll., Cytokine. 2008). Plus récemment, les travaux de Andersson et coll. utilisant un modèle murin d'arthrite chronique, ont montré la surexpression des transcrits du ligand de NKG2D, ici Rae-1, au niveau de l'inflammation. Cependant, contrairement aux travaux de Groh et collaborateurs, les auteurs ont montré une diminution de l'expression de NKG2D à la surface des NK au cours de la dernière phase de la maladie (Andersson et coll., Arthritis Rheum. 2011). Dans cette même étude, l'utilisation d'un anticorps monoclonal anti-NKG2D, non déplétant, a montré un effet bénéfique sur la cinétique d'apparition de l'arthrite, confirmant ainsi le rôle de NKG2D et de ses ligands dans cette pathologie. Là encore, la ou les cause(s) et conséquence(s) de cette surexpression de MICA et MICB par les synoviocytes de PR restent à définir.

Une susceptibilité génétique des patients souffrant de PR a également été mise en évidence. Ainsi, de nombreux travaux ont pu associer l'expression des gènes du HLA-DRB1 à une plus forte susceptibilité de survenue de la PR (Reviron et coll., Arthritis

Reum. 2001) (Jawaheer et coll., Am J Hum Genet. 2002) (du Montcel et coll. Arthritis Reum. 2005). Plus récemment, le SNP rs1051794 (Lys196Glu ou 196 K/E) a été associé, et de façon indépendante du polymorphisme du HLA de classe II, à plus ou moins de susceptibilité pour la PR. En particulier, dans cette étude, le variant « MICA 196lys » a été associé à une protection à l'encontre de la PR (Kirsten et coll., Arthritis Res Ther. 2009). L'explication mécanistique résulte, selon les auteurs, d'une probable plus forte affinité de ce variant génétique de MICA pour son récepteur NKG2D. En effet, ce polymorphisme est quasi strictement associé au variant « 129met », préalablement décrit pour avoir une plus forte affinité avec NKG2D (Steinle et coll., Immunogenetics. 2001). A l'inverse, bien que Kirsten et collègues ne le mentionnent pas, leurs travaux suggèrent une plus forte susceptibilité des allèles de *MICA* porteurs des variant 196glu et donc 129met. De façon intéressante, ces deux variants génétiques sont portés par l'allèle *MICA*008*, l'allèle de MICA le plus fréquent dans de nombreuses populations, qui est également porteur de la mutation *MICA A5.1*. Il serait donc intéressant, comme cela a été réalisé pour la maladie cœliaque, de mesurer la fréquence du génotype *A5.1/A5.1* chez des patients atteints de PR.

La sclérose en plaque (SEP) est une maladie inflammatoire autoimmune se caractérisant par une destruction progressive et de façon chronique de la myéline et entraînant des lésions au niveau du système nerveux. Un rôle important de NKG2D et ses ligands a également été mis en évidence dans la SEP puisque l'expression des ligands de NKG2D, MICA/B, a été détecté au niveau des lésions de la substance blanche avec une colocalisation avec un marqueur des oligodendrocytes. Dans ces mêmes lésions, la présence d'un infiltrat de cellules T CD8(+) a également été détectée (Saikali et coll., J Neurosci. 2007). Plus tard, de fortes concentrations de MICB ont été détectées dans les séra des patients, en particulier dans les séra de patients prélevés au moment d'une poussée de la maladie (Fernandez-Morera et coll., Hum Immunol. 2008). Les mêmes auteurs ont montré par la suite un lien entre l'expression de l'allèle *MICB*004* et le développement de la pathologie (Fernandez-Morera et coll., Tissue Antigens. 2008). Dans ces deux dernières études, contrairement à MICB, aucun rôle de MICA, ni dans l'expression de sa forme soluble, ni dans la fréquence des différents allèles, n'a été corrélé avec la pathologie.

D'autres maladies auto-immunes ont été associées à l'expression de NKG2D et de ses ligands. Ainsi, Amroun et collaborateurs associent très clairement le génotype MICA-129met/met à la forme juvénile de la **spondylarthrite ankylosante** (Amroun et coll., Hum Immunol. 2005). La fréquence de la sous-population lymphocytaire T CD4(+)NKG2D(+) a par ailleurs été corrélée avec l'évolution du **Lupus érythémateux**, suggérant également un rôle important de l'interaction NKG2DL/NKG2D dans cette pathologie (Dai et coll., J Exp Med. 2009). La surexpression de MICA, *in vitro*, par les cellules endothéliales (CE) à la suite de leur stimulation par les anticorps anti-CE présents dans les séra des patients atteints de **Granulomatose de Wegener** (GW) et, *in vivo*, au niveau de l'endothélium (péri)tubulaire de ces mêmes patients, tout ceci associé à la présence notoire d'un infiltrat T CD8(+) et T $\gamma\delta$, révèle également l'importance du couple MICA/NKG2D dans la GW (Holmén et coll., J Am Soc Nephrol. 2005 et 2007) (Capraru et coll., Clin Immunol. 2008). En ce sens, les travaux récents de Menthon et collaborateurs, ont montré une plus forte concentration d'IL-15 chez les patients souffrant de GW, tout comme la présence de TCD4(+)NKG2D(+) (Menthon et coll., Arthritis Rheum. 2011).

1-2.4.4 MICA, NKG2DLs et rejet de greffe

Les protéines MIC, en particulier MICA, sont des protéines hautement polymorphes avec 94 allèles décrits pour MICA et 35 pour MICB. Ces protéines sont donc considérées comme faisant partie des antigènes mineurs du complexe majeur d'histocompatibilité. En effet, du fait de ce polymorphisme qui les caractérise, de leur expression par, notamment, les cellules endothéliales et épithéliales, et de leur régulation par le stress et les cytokines pro-inflammatoires, un rôle important pour les protéines MICA et MICB a été proposé en Transplantation, dans l'induction d'une réponse allo-immune (1) dirigée contre le donneur, par la production d'allo-anticorps capables de se fixer sur l'endothélium du greffon, ou (2) dirigée contre les antigènes du receveur après allo-greffe de moelle osseuse ou de cellules souches hématopoïétiques.

Du fait de son important polymorphisme et de son expression par les cellules endothéliales, le rôle de MICA dans l'induction d'allo-anticorps après transplantation d'organes vascularisés fut pour la première fois proposé par le groupe de Peter Stastny, en 1999 (Zwirner et coll., Hum Immunol. 1999). Plus tard, de nombreuses études ont identifié **la présence d'anticorps anti-MICA dans les sérums des patients transplantés rénaux** (Zwirner et coll., Hum Immunol., 2000) (Sumitran-Holgersson et coll., Transplantation. 2002), **cardiaques** (Smith et coll., Am J Transplant. 2009) (Zhang et coll., Transplantation. 2011) **et pulmonaires** (Angaswanmy et coll., Hum Immunol. 2010) (Paantjens et coll., Pulm Med. 2011). Toutes ces études, et bien d'autres, ont associé la présence des anticorps anti-MICA avec le rejet de transplantation. L'importante étude de Terasaki et collaborateurs, incluant deux cohortes de patients transplantés rénaux de plus 1300 individus chacune, dépourvus d'anticorps pré-transplantation et ayant un greffon fonctionnel à 6 mois post-greffe, a clairement établi une diminution de la survie du greffon à 83% à un an, et 69% à 4 ans post-greffe, pour les patients ayant développé des anticorps anti-MICA, par comparaison aux patients sans anticorps avec des survies, respectivement, de 96% et 81% (Terasaki et coll., Am J Transplant. 2007). Par ailleurs, quelques mois plus tard, le groupe de Peter Stastny publiait les conclusions de leur étude sur l'effet des anti-MICA, présents dans les séra des receveurs pré-transplantation, sur la survie de la greffe. Cette étude, qui incluait 1910 transplantés rénaux, a également confirmé l'effet délétère de la présence des

anticorps anti-MICA sur la survie de la greffe (Zou et coll., N Engl J Med. 2007). En ce sens, la présence d'anticorps anti-MICA a été associée à la détection de dépôts de C4d sur des biopsies de transplantés rénaux (Alvarez-Marquez et coll., Transplantation. 2009) (Li et coll., Transplantation. 2010).

Malgré le nombre important de travaux, provenant de groupes distincts et relatant tous des effets délétères des anticorps anti-MICA sur la survie de la greffe, et pour tout type d'organes transplantés, la véracité de l'impact des anti-MICA sur la survie de la greffe reste à ce jour controversée et contredite par quelques études (Smith et coll., Am J Transplant. 2009) (Lemy et coll., Transplantation. 2012). Il est toutefois important de mettre en avant les limites de ce type d'analyse pour pouvoir en juger. Parmi celles-ci on peut citer (1) le nombre d'individus formant la cohorte d'étude. Celui-ci étant dépendant de la fréquence des patients pour lesquels des anticorps anti-MICA ont été détectés donc (2) ; la technique utilisée pour la détection des anticorps anti-MICA. Ainsi, dans l'étude de Terasaki et collaborateurs, la prévalence de l'immunisation anti-MICA, post post-transplantation, était de 5,19 % (Terasaki et coll., Am J Transplant. 2007). Néanmoins, considérant la technologie employée pour la détection des anti-MICA (Luminex), qui utilisait alors le domaine extracellulaire de huit allèles de MICA (*001 ; *002 ; *004 ; *007 ; *008 ; *012 ; *017 et *018), ce chiffre peut assurément être revu à la hausse compte tenu du nombre d'allèles de MICA aujourd'hui identifiés.

La protéine MICA peut également être relarguée sous une forme soluble, après clivage protéolytique de la forme membranaire. Les effets de cette forme soluble au cours de la transplantation cardiaque ont été particulièrement étudiés par le groupe de Lopez-Larrea (Suarez-Alvarez et coll., Transplantation. 2006) (Suarez-Alvarez et coll., Transpl Immunol. 2006). Ces deux études ont révélé un effet bénéfique sur la survie du greffon cardiaque lorsque la forme soluble de MICA a été détectée post-greffe. Par ailleurs, un effet inverse a été prêté aux anticorps anti-MICA lorsqu'ils étaient détectés post-transplantation. De façon intéressante, ces études suggèrent donc une absence d'immunogénicité des formes solubles de MICA, voir même un effet tolérogène ou immunosuppresseur, en accord avec les effets observés lors de l'échappement tumoral. Ce concept met donc en avant un rôle important du récepteur NKG2D dans le rejet de transplantation. En ce sens, des infiltrats de cellules T CD8(+) dans les biopsies de rejets de transplantations rénales (Seiler et coll., Am J Transpl. 2007) et de cellules NK dans les greffons de plusieurs modèles animaux d'allo-greffes (pour revue : Kitchens et coll.,

Transplantation. 2006) ont été observés. Néanmoins le rôle exact de ces cellules dans les mécanismes du rejet reste à définir, bien que de plus en plus étudié.

La maladie du greffon contre l'hôte ou **GVHD** (Graft-Versus-Host Disease) constitue la principale cause de rejet après greffe allogénique de moelle osseuse, de cellules souches hématopoïétiques ou de sang de cordon. Celle-ci provoque de graves lésions tissulaires pouvant toucher aussi bien la peau que le tube digestif et/ou le foie. Le rôle de MICA et de son récepteur dans la pathogénèse de la GVHD a été mis en avant après l'observation de la forte expression des protéines MICA au niveau des lésions caractéristiques de la GVHD, touchant la peau et les intestins des patients ayant subi une greffe de cellules souches hématopoïétiques (Gannagé et coll., Transplantation. 2008). Basé sur ces observations et, étant donné le polymorphisme de MICA, Parmar et collaborateurs ont cherché à vérifier l'effet d'un mismatch de MICA entre donneur et receveur (D/R) sur la prévalence de la GVHD. Leurs résultats ont révélé une plus forte survenue de la GVHD lorsque les couples D/R présentaient un mismatch pour le gène MICA, suggérant ainsi la possibilité que MICA constitue un antigène reconnu par les lymphocytes T allo-réactifs au cours de la GVHD (Parmar et coll., Blood. 2009). Plus tard, Boukouaci et collaborateurs ont, quant à eux, recherché les effets (1) du génotype MICA-129val/met (Valine et Méthionine correspondant, respectivement, à une plus faible et forte affinité avec NKG2D ; (Steinle et coll., Immunogenetics. 2001)), (2) de la présence de l'isoforme soluble de MICA (MICAs) et (3) de celle des anticorps anti-MICA sur le développement de la GVHD après greffe de cellules souches hématopoïétiques. Leurs résultats ont montré un effet délétère, et cumulatif, du génotype MICA-129val/val et de l'apparition post-greffe de MICAs pour le développement d'une GVHD. A l'inverse, la présence d'anticorps anti-MICA pré-greffe, dans cette étude, a été associée à une moindre survenue de la GVHD (Boukouaci et coll., Blood. 2009). Dans cette étude, la compatibilité entre donneur et receveur pour le gène MICA n'a pas été regardée. Le lien entre le polymorphisme de MICA, l'expression de MICAs et l'induction d'anticorps reste à déterminer.

1-3 Objectifs de la thèse

Mon travail de Thèse a été réalisé dans l'Institut de Transplantation, Urologie, Néphrologie (ITUN), au sein de l'équipe 5 du laboratoire INSERM UMR 1064. Ce travail s'inscrit dans la thématique de l'équipe qui est de définir le rôle de la cellule endothéliale dans la réponse immune en allo-transplantation et l'implication des molécules du HLA de classe I non classiques.

Dans ce contexte, l'objectif principal de ma thèse a été d'analyser l'impact du polymorphisme génétique sur l'expression endothéliale de MICA et les propriétés immunorégulatrices associées. Les résultats obtenus tout au long de cette thèse ont été répartis en trois parties (Objectif 1a, 1b et 1c).

Le second objectif de ma thèse a été, par la participation au réseau proVasc (pour protection vasculaire), de mettre au point une série de tests sur les CE pour la détection des propriétés antioxydantes et/ou anti-inflammatoires et/ou anti-AGE par des molécules ou extraits végétaux d'origine végétale, à des fins thérapeutiques. Les résultats obtenus sont présentés en dans la partie « Objectif n° 2 ».

Objectif n°1a

Bien que la fréquence et l'implication de l'immunisation anti-MICA dans le rejet de greffe aient été montrées par plusieurs études cliniques (Terasaki et coll., Am J Transplant. 2007) (Zou et coll., N Engl J Med. 2007), les conditions de cette allo-immunisation demeurent mal connues. Par ailleurs, le génotypage de MICA n'est pas réalisé en routine et peu d'informations sont à l'heure actuelle disponibles pour détecter un éventuel mismatch de MICA entre donneur et receveur avant la greffe, ni prédire une allo-immunisation spécifique de MICA.

Utilisant une cohorte de donneurs d'organes, préalablement typés pour le gène MICA par Nathalie Gérard (AI, INSERM), et pour lesquels nous possédons des cultures de cellules endothéliales, isolées au moment de la greffe dans notre centre (ITUN, Nantes) entre 1999 et 2012, mon objectif a donc été d'explorer l'impact fonctionnel de la mutation *MICA A5.1* (1) sur l'expression des formes membranaire et soluble de MICA par

la cellule endothéliale du donneur, (2) d'en établir une corrélation avec une éventuelle modification de sa fonction de ligand de NKG2D et (3) d'identifier l'impact du phénotype endothélial *MICA A5.1* sur l'induction d'allo-anticorps post-transplantation rénale. L'ensemble des résultats obtenus est présenté et détaillé dans le **Chapitre II**.

Ce travail a permis la rédaction de deux articles :

- 1- Tonnerre, P, N Gérard, M Chatelais, and B Charreau. "**MICA Gene Polymorphism in Kidney Allografts and Possible Impact of Functionally Relevant Variants**" *Transplantation Proceedings* 42, no. 10 (December 2010): 4318–4321.
- 2- Tonnerre, P, N Gérard, M Chatelais, C Poli, S Allard, S Curry, C Bressollette, A Cesbron-Gautier, and B Charreau. "**A5.1 Mutation Influences Endothelial MICA Expression and allosensitization in Kidney Transplantation**" (*J Am Soc Néphrol.*, In press)

Objectif n°16

La prolongation de la durée de vie du greffon à la suite d'une allo-transplantation constitue la principale mission des transplantateurs une fois l'acte chirurgical accompli. Le maintien de la survie d'une allo-greffe nécessite la prise d'un traitement immunosuppresseur lourd. Celui-ci n'est pas sans danger pour le patient transplanté, puisque le rendant vulnérable aux infections et au développement de tumeurs.

La réactivation du BK virus, est une complication infectieuse émergente qui peut gravement mettre en péril le devenir d'une greffe. Les mécanismes immunologiques et virologiques impliqués dans cette réactivation demeurent peu documentés. Néanmoins, l'inter-individualité face à la réactivation du BK virus post-greffe, et ce pour un même traitement immunosuppresseur, pourrait suggérer une prédisposition génétique de l'hôte à l'établissement d'un processus de réactivation.

Dans ce contexte, mon objectif a été (1) de mesurer la fréquence de la mutation *MICA A5.1* au sein d'une cohorte de 88 couples donneurs/receveurs transplantés rénaux, et (2) de caractériser, *in vitro*, l'impact de la forme tronquée de *MICA*, *MICA A5.1*, et de son interaction avec son récepteur NKG2D, sur le contrôle de l'infection au BK virus. La description des résultats obtenus est présentée dans le **Chapitre III** de cette thèse (Article en préparation).

Objectif n°1c

Au-delà du polymorphisme allélique qui caractérise le gène MICA, le troisième objectif de mon travail de thèse a consisté, à travers l'utilisation de la bio-collection de cellules endothéliales qui était mise à ma disposition dans notre laboratoire, à rechercher et caractériser des variants génétiques de MICA susceptibles de modifier son expression par les CE du greffon et/ou altérer sa fonction de ligand de NKG2D. Notre collection de CE est en effet un outil unique permettant d'explorer des modifications phénotypiques et fonctionnelles associées à un variant génétique donné, dans la cellule endothéliale artérielle humaine. Au cours de ce travail, j'ai pu associer une délétion en 5' de l'intron 4 du gène MICA avec un phénomène d'épissage alternatif, conduisant à l'expression de transcrits originaux. L'ensemble des résultats obtenus est présenté dans le **Chapitre IV**. Ce travail réalisé en étroite collaboration avec Nathalie Gérard (AI ; INSERM) et Pierre-Jean Gavlovsky (Master 2 BBRT, Université de Nantes) a permis la rédaction d'un brevet (En cours de dépôt) et fera prochainement l'objet d'une publication.

Objectif n°2

L'inflammation et le stress oxydant jouent un rôle primordial dans la dysfonction endothéliale et dans la survenue de maladies cardiovasculaires. Au cours de ces trois années de thèse, j'ai pu activement prendre part aux travaux du réseau « proVasc » qui avait pour mission l'identification de nouvelles molécules et de nouveaux extraits d'origine végétale pour leur propriétés anti-oxydantes, anti-inflammatoires et/ou anti-AGE (Advanced glycation end). Mon objectif dans ce réseau a donc été l'élaboration de tests, utilisant des cultures primaires de cellules endothéliales humaines, puis le screening de 74 molécules purifiées et de 86 extraits végétaux pour leur capacité à inhiber l'expression membranaire de VCAM-1 ou à protéger les CE de l'apoptose induite par les AGE. Les résultats obtenus sont présentés dans le **Chapitre V** et font l'objet d'un article soumis pour publication (**Annexe I**).

G Rakotomalala, C Agard, P Tonnerre, S Derbré, S Michalet, J Hamzaoui, M Rio, B Charreau, G Loirand, and P Pacaud. « **Extract from Mimosa Pigra attenuates chronic experimental pulmonary hypertension** » (Article soumis)

Par ailleurs, au cours de ces trois années de thèse, j'ai pu apporter ma contribution aux travaux développés par l'équipe et ses collaborations. Les articles scientifiques décrivant ces travaux sont présentés en **annexe II et III**.

Gitton C., Cottureau A., Gérard N., Quillard T., Chauveau A., Devallière J., Tonnerre P. and Charreau B. « **Protective crosstalk between Activated Protein C and TNF signaling in vascular endothelial cells: Implication of EPCR, non canonical NFkB and ERK1/2 MAPKinases** », Am. J. Physiol.: Cell Physiology, 2011

Mathilde A., Tonnerre P., Nedellec S., Oger., Morice A., Guilloux Y, Chalmeau E, Charreau B and Gervois N. « **Cross-recognition of allogeneic endothelial cells by HCMV-committed HLA-E-restricted CD8+ T cells** », (Article en révision, PLoS One)

CHAPITRE II :

Impact de la mutation *MICA A5.1* sur
l'expression endothéliale de *MICA* :
Conséquences sur l'induction d'allo-anticorps
post-transplantation rénale

2-1 Présentation de l'Etude

La molécule MICA est une glycoprotéine membranaire qui, comme les protéines du HLA, présente un haut niveau de polymorphisme. En plus de ce polymorphisme, son expression par les cellules endothéliales (CE) et sa régulation par les stress cellulaires et les cytokines pro-inflammatoires font de MICA une cible potentielle pour le développement d'une réponse allo-immune, post-transplantation (Zwirner et coll., Hum Immunol. 1999). Ainsi, ces 10 dernières années, l'intérêt des transplantateurs pour MICA n'a eu de cesse d'augmenter, de même que les preuves scientifiques associant la présence d'anticorps anti-MICA dans les séra des transplantés à une diminution de la survie des greffons (Terasaki et coll., Am J Transpl. 2007) (Zou et coll., N Engl J Med. 2007).

Cependant, les bases moléculaires conduisant, post-transplantation, à une immunisation à l'encontre des protéines MICA demeurent mal connues. En outre, le génotypage de MICA n'est pas réalisé en routine, laissant peu d'informations aux cliniciens pour déceler les éventuels effets d'une discordance des allèles de MICA sur le devenir de la greffe. Ainsi, la question de la nécessité du typage MICA, pré-transplantation, des couples de donneurs et de receveurs reste en suspens.

La détection des anticorps anti-MICA dans les séra des patients transplantés est réalisée par cytométrie en flux, selon la technique du LUMINEX. Celle-ci utilise des billes sur lesquelles ont été fixées différentes protéines recombinantes correspondant à différents allèles de MICA. Aussi, la conformation tridimensionnelle des protéines utilisées dans cette technique est-elle optimale pour la détection des anticorps anti-MICA ? Ces anticorps anti-MICA sont-ils capables de se fixer à la CE présentant à sa surface une qualité et une quantité plus « physiologique » d'antigène MICA ? Du fait de son polymorphisme, certains allèles de MICA sont-ils plus immunogènes que d'autres ? En d'autres termes, les polymorphismes de MICA peuvent-ils influencer sur le niveau d'expression des antigènes MICA à la surface des CE ?

Contrairement aux anticorps anti-MICA, la détection de la forme soluble de MICA, post-transplantation a été associée à une protection vis à vis du rejet (Suarez-Alvarez et coll., Transplantation. 2006) (Suarez-Alvarez et coll., Transpl Immunol. 2006). Ainsi, les

polymorphismes de MICA peuvent-ils influencer sur l'expression qualitative et quantitative de la forme soluble de MICA ?

Pour répondre à ces questions, nous avons utilisé une bio-collection de cultures primaires de CE, isolées à partir d'un fragment de l'artère rénale des donneurs prélevé au moment de la greffe. Cette collection, initiée en 1999, en partenariat avec le service clinique de transplantation du CHU de Nantes, comprend aujourd'hui plus de 100 cultures primaires de CE. Pour chacune de ces cultures, la réalisation du typage génétique complet de MICA nous a permis de sélectionner les CE des donneurs qui exprimaient la mutation *MICA A5.1*, associée à l'allèle *MICA*008*, pour une étude visant à caractériser l'impact fonctionnel de cette mutation, exprimée de façons hétérozygote ou homozygote, sur l'expression des formes membranaires et solubles de MICA par les CE des donneurs. Utilisant ces CE comme cibles, nous avons comparé les résultats obtenus par la technique du LUMINEX avec ceux obtenus par une technique de cross-match endothélial, développée précédemment (Canet et coll., Transplantation. 2012). Dans cette démarche, les différences de reconnaissance par les anticorps anti-MICA présents dans les séra de transplantés rénaux entre les CE exprimant un allèle de MICA muté ou non, ont fait l'objet d'une attention particulière. Enfin nous avons recherché les effets d'un mismatch pour la mutation *MICA A5.1* entre donneurs et receveurs sur l'induction d'anticorps anti-MICA post-transplantation.

Les résultats que nous avons obtenus sont présentés et détaillés dans les **Articles 1 et 2**.

2-2 Résultats

2-2.1 Résumés

Dans l'**article 1**, nous avons caractérisé la fréquence des différents allèles de MICA au sein d'une cohorte de donneurs d'organes pour lesquels nous disposons de cultures primaires de CE, isolées à partir d'un fragment de l'artère rénale, prélevé au moment de la greffe. Parmi les 28 allèles de MICA identifiés, les allèles *MICA*002*, **004*, **008*, **009**, **010*, **011* sont les allèles les plus fréquents et représentent à eux seuls 70% des donneurs. Outre le fait d'être l'allèle le plus fréquent *MICA*008* (31,1%), ce dernier est associé à la mutation *MICA A5.1* correspondant à l'insertion d'une guanine au niveau de l'exon 5, codant pour le domaine transmembranaire, et aboutissant à une forme tronquée de la protéine MICA, sans domaine intracellulaire. La caractérisation de la fréquence de la mutation *MICA A5.1* a été étendue aux différents microsatellites de l'exon 5 et au polymorphisme A/G en position 131 (codant pour les variants fonctionnels 129Val/Met).

Dans l'**article 2**, utilisant les CE issues des donneurs d'organes de notre centre et préalablement typées pour le gène MICA (**article 1**), nos résultats montrent que la mutation *MICA A5.1* est présente chez 13,3% des donneurs de façon homozygote et 46,4% de façon hétérozygote. Par Western-Blot, nous avons confirmé que les protéines MICA A5.1 ont un poids moléculaire plus faible d'environ 10 kDa par comparaison aux protéines MICA « sauvages ». Par cytométrie en flux, nous avons observé que les CE homozygotes pour la mutation *MICA A5.1* expriment 7-10 fois plus de protéines MICA à leur surface par comparaison aux CE contrôles. Nous montrons que la surexpression de la protéine MICA A5.1 n'est pas due à une plus grande stabilité de la protéine mutée mais résulte d'une augmentation similaire du taux de transcrits. Nous associons l'expression de la mutation *MICA A5.1* par les CE à une absence de forme soluble (MICAs) mais au relargage d'une forme circulante via des exosomes. Nous avons mis au point un test de cross-match endothélial par cytométrie de flux pour la détection et l'étude des anticorps anti-MICA dans les séra des patients transplantés. Nos résultats montrent une fixation allèle spécifique des anti-MICA sur les CE et une fréquence et une intensité de fixation plus importantes des anticorps sur les cibles endothéliales

homozygotes *MICA**008/*A5.1*. Le génotypage MICA, de façon rétrospective, d'une cohorte de 81 couples de donneurs et receveurs apporte la première évidence d'un impact significatif du mismatch *MICA A5.1* dans l'induction d'anticorps anti-MICA post-transplantation suggérant un rôle immunodominant de cette mutation dans la réponse humorale et faisant de *MICA A5.1* un facteur de risque pour le développement d'une réponse allo-immune.

2-2.2 Article 1



MICA Gene Polymorphism in Kidney Allografts and Possible Impact of Functionally Relevant Variants

P. Tonnerre, N. Gérard, M. Chatelais, and B. Charreau

ABSTRACT

It is likely that the polymorphic MICA (MHC class I related chain A) molecules on graft endothelial cells (ECs) may be a target for specific antibodies and T cells directed against solid organ grafts. Although there is evidence for a role of MICA in vascular and transplant biology, genotyping is not performed routinely, and thus there are few correlations between polymorphism and endothelial phenotype. The present study examined the frequency of the various alleles for the nonclassical MHC I *MICA* gene among a cohort of kidney transplant donors, particularly *MICA* genetic variants (*MICA* A5.1 and *MICA*-129) that may affect *MICA* expression and function on graft EC. Genotyping was performed on genomic DNA derived from primary cultures of EC established from transplant donors at the time of transplantation. Herein we have reported that among 106 alleles analyzed, 28/69 *MICA* alleles were distributed among 7 major variants (*00804, *00801, *004, *00201, *00901*, *011, *010), representing 70% of the donors. *MICA**008 the most abundant allele (31.1%) was associated with the *MICA* A5.1 mutation. The majority of donors (52.8%) had at least one *MICA* A5.1 allele, with 13.2% homozygous for this mutation. The *MICA*-129 val/val genotype, which encodes a low-affinity ligand, was predominant (49%), while the *MICA*-129 met/met, corresponding to a high-affinity ligand, was observed in 11.3% of the transplants. Our findings highlighted the *MICA* gene polymorphism that produces functional diversity in transplant recipients with variable interactions between *MICA* and its receptor NKG2D.

ALTHOUGH genetic matching for the classical HLA antigens is clearly a major determinant of successful transplant outcomes, clinical data and previous studies have demonstrate the roles of other polymorphic genetic factors. The MHC class I chain-related gene *MICA* is a prime candidate for such a genetic factor. The human MHC class I chain-related genes (*MICA* and *MICB*) are located within the HLA class I region of chromosome 6. Likewise, classical HLA class I genes, (unlike other nonclassical HLA class I genes; *HLA-E*, *-F* and *-G*), the *MICA* gene is highly polymorphic,^{1,2} with at least 69 alleles (<http://www.anthonvnlan.org.uk/HIG>). Functionally, *MICA* neither builds β 2-microglobulin (β 2-m) nor has a role in peptide binding for antigen presentation. *MICA* is a ligand that activating the immunoreceptor NKG2D, a C-type lectin-like membrane glycoprotein which is expressed on essentially all natural killer (NK) cells, as well as on $\gamma\delta$ and $\alpha\beta$ CD8(+) T cells. *MICA* proteins are physiologically expressed on the surface of a

limited set of cells including intestinal epithelial cells, endothelial cells (ECs), monocytes, and fibroblasts.³ Consistent with the high polymorphism of *MICA* molecules, specific antibodies against *MICA* have been reported in the sera of patients who have rejected kidney allografts, suggesting their potential role in transplant immunopathology.^{4,5} However, *MICA* genotyping is not

From INSERM, U643, CHU NantesS, Institut de Transplantation et de Recherche en Transplantation (ITER), Université de Nantes, Faculté de Médecine, Nantes, France.

This work was supported, in part, by grants from L'Agence de Biomédecine, 1a Fondation de l'avenir and by "Xenome," a European Commission-funded Integrated Project LSHB-CT-2006-037377. P.Tonnerre received a fellowship from La Société Francophone de Transplantation and from Provasc.

Address reprint requests to Béatrice Charreau, PhD, INSERM UMR643, 30 boulevard Jean Monnet, 44093 Nantes Cedex 01, France. E-mail: Beatrice.Charreau@univ-nantes.fr

0041-1345/10/\$—see front matter
doi:10.1016/j.transproceed.2010.09.118

© 2010 by Elsevier Inc. All rights reserved.
360 Park Avenue South, New York, NY 10010-1710

performed routinely; the correlation between MICA polymorphism and its expression and function on graft ECs is still unknown. The present study examined the frequency of *MICA* gene alleles among a cohort of kidney transplant donors with particular focus on variants MICA A5.1 and MICA-129 that may affect MICA expression and function on graft ECs.

MATERIALS AND METHODS

Subjects and Samples

From 1999 to 2009, primary cultures of vascular ECs were established routinely from deceased kidney allograft donors. All kidney or kidney/pancreas transplant recipients were followed at our institution. The study was performed according to the guidelines of the local ethics committee.

Cell Culture and DNA Isolation

For EC isolation, vessels were incubated with collagenase A (Roche, France) for 30 minutes at 37°C. The ECs selected using CD31-Dynabeads (Dyna, France), were characterized before storage, and grown as previously described.⁶ Genomic DNA, extracted from cultured ECs (3×10^6 cells) and using the proteinase K/phenol-chloroform method, was employed for genotyping.

MICA Typing: PCR and Genotyping

MICA exons were amplified with the following primers: MICA1-F5'-ACGCGTTGTCTGTCCTGGAA-3', MICA1-R5'-GAGGTGCAAAAGGGAAGATG-3' for exon 1, MICA2-F5'-ATTCTCTGCCCCAGGAAGGTTGG-3' and MICA2-R 5'-AGACAGGTCCTGCTCTCTG-3' for exon 2, MICA3-F 5'-TTCGGGAATGGAGAAGTCACTGC-3', MICA3-R 5'-AAATGCCTTCATCCATAGCACAG-3' for exon 3, MICA4-F 5'-GACTTGACAGGTCAGGGGTCCC-3', MICA4-R 5'-TGTCCTACCTGGCCTGACC-3' for exon 4, MICA5-F 5'-CCTTTTTCAGGGAAAGTGC-3', MICA5-R 5'-CCTTACCATCTCCAGAACTGC-3' for exon 5, and MICA6-F; 5'-GATGTTGATGGAGTGATGGGA-3', MICA6-R; 5'-CAAAGTGTGGGATTACAGGCGTGAGC-3' for exon 6. PCR for *MICA* exons 1, 5, and 6 were performed using 100 mg of DNA, 12.5 mmol/L dNTPs, 1x *Taq* buffer, 2 mmol/L $MgCl_2$, 0.1 U *Taq* DNA polymerase (Invitrogen, Carlsbad, Calif), and 10 pmol/L of each oligonucleotide. For *MICA* exons 2, 3, and 4, we first performed a PCR using 100 mg DNA, 15 pmol/L of each

primer,⁷ 12.5 mmol/L dNTPs, 1 U of *Herculase Taq* (Stratagene, La Jolla, Calif). Then nested PCRs, were performed with 1 μ L of PCR product under conditions reported above for exons 1, 5, and 6 using a PTC200 thermocycler (BIO-RAD Laboratories, Hercules, Calif). Conditions for long PCR for exons 2, 3, and 4 were: 95°C for 2 minutes, 30 cycles of 95°C for 20 seconds 63°C for 20 seconds, and 72°C for 1 minutes 10 seconds. For nested PCR and PCR for exons 1, 5, and 6, the conditions were 95°C for 5 minutes, 30 cycles of 95°C for 20 seconds at specific melting temperature for 20 seconds, and 72°C for 1 minutes. A final cycle at 72°C for 5 minutes, was applied for all PCR reactions. Products were electrophoresed on 1% agarose gels. The DNA sequencing (Sequencing Core Facility INSERM/IFR26, Nantes, France) employing a 48-capillary AB 3730 automatic system (Applied Biosystems, Foster City, Calif) was analyzed with ChromasPro 1.5 software (Digital River GmbH, Shannon, Ireland).

RESULTS

MICA Allelic Polymorphism

Fifty-three donor EC cultures of corresponded to renal transplantations performed between 1999 and 2009. Among the MICA 106 alleles analyzed, 28 were observed among our cohort (Fig 1). The MICA*008 was the most frequent one (31.1%), including MICA*00804 (17.5%) and MICA*00801 (13.6%), followed by MICA*004 (9.7%). There was a similar frequency for MICA*00201 (7.8%), MICA*00901 (7.8%), MICA*011 (6.8%), and MICA*010 (5.8%), while the other alleles (n = 21) accounted for less than 3%. Among 41 genotypes, MICA *00801/*00804 was the most often present one (14.6%).

MICA Exon 5 Microsatellite Polymorphism

MICA has a triplet repeat microsatellite polymorphism (GCT)_n in the transmembrane region, which consists of five allele—A4, A5, A5.1, A6, and A9.⁸ According to the open reading frame of the MICA cDNA, the microsatellite encodes polyalanine. Therefore the number of alanine residues differs by the number of triplet repeats, eg., A4 is defined to contain 4 GCT repeats. The A5.1 MICA allele contains 5 triplet repeats plus one additional nucleotide insertion (GGCT) that causes a frame-shift mutation leading to a premature intradomain stop

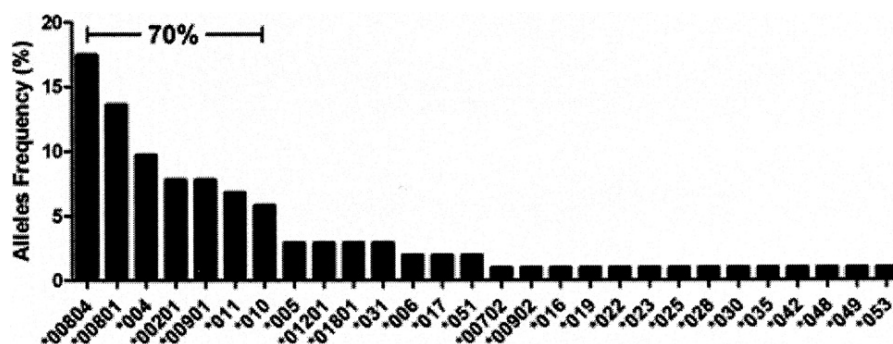


Fig 1. MICA allele polymorphism in transplant donors.

codon. Previous studies have suggested that MICA A5.1 encodes a truncated protein with possible aberrant expression and cellular localization.⁹ We observed a 52.8% (n = 28) frequency of the MICA A5.1 allele in our cohort (Table 1). Importantly, 13.2% (n = 7) of transplant donors were homozygous for MICA A5.1, whereas 39.6% (n = 21) were heterozygous. The MICA A5.1 mutation was associated with four alleles: *23, *028, *053, and *008, the last being the most represented allele among our cohort of transplant donors.

MICA-Amino Acid 129 Polymorphism

A polymorphic methionine (met) to valine (val) variation at amino acid position 129 of the $\alpha 2$ heavy chain domain is in linkage disequilibrium with other allelic changes. It categorizes MICA alleles into high (MICA-129 met) and low (MICA-129 val) affinity ligands for the NKG2D receptor. Consequently, MICA-129 polymorphism may influence effector cell function. Consequently, A $\rightarrow$ G polymorphism in exon 3 at position 454, which decides the amino acid at position 129, was examined among 53 transplant donors (Table 2). The observed genotype frequencies were: MICA-129 met/val heterozygous, 21/53 (39.6%); MICA-129 met/met homozygous, 6/53 (11.3%); and MICA-129 val/val homozygous, 26/53 (49%).

DISCUSSION

This study examined the genetic polymorphism of MICA among a population of transplant donors. The aim of this study was to investigate whether functionally relevant MICA variants affect recognition by allogeneic NKG2D+ effector cells graft endothelium. The domain organization of MICA includes: one leader peptide encoded by exon 1, three extracellular globular domains encoded by exons 2–4, one transmembrane (TM) domain encoded by exon 5, and a cytoplasmic tail encoded by exon 6. Herein, we have reported that, among 106 alleles analyzed, 28/69 showed 7 major alleles: *00804, *00801, *004, *00201, *00901, *011, *010. They represented 70% of the donors. MICA*008, the most abundant allele (31.1%), was associated with the MICA A5.1 mutation. Furthermore, MICA polymorphisms may influence not only the production of donor-specific alloantibodies but also the cell-surface expression of MICA and its binding to NKG2D on recipient effector cells. The majority of donors (52.8%) showed at least one MICA A5.1 with 13.2% homozygous for this mutation. The protein en-

Table 2. Polymorphism of MICA Amino Acid 129 in Transplant Donors

Polymorphism of Amino Acid 129	Homozygous		Heterozygous
	Val/Val129	Met/Met129	Met/Val129
n	26 (49%)	6 (11.3%)	21 (39.6%)

coded by MICA A5.1 is shorter than its normal counterpart and contains fewer hydrophobic amino acids, features which may impair its cell-surface expression. Moreover, individuals homozygous for the MICA A5.1 allele may display an altered immune response to stressed or virally infected cells, as recently reported.¹⁰ When we analyzed transplant donors for MICA exon 3 polymorphism at position 129, the MICA-129 val/val genotype was predominant (49% of transplants), while the MICA-129 met/met variant corresponding to the high-affinity ligand was observed in 11.3% transplants. In the context of vascularized organ transplantation, the weak engagement of NKG2D receptors by the low-affinity ligand MICA-129 val/val genotype may impair NK/cytotoxic T lymphocyte cell activation. In contrast, robust engagement of NKG2D receptors by the high-affinity ligand MICA-129 met/met genotype may promote cytotoxicity and EC lysis. In sum, this study suggested that MICA gene polymorphism determining functional diversity may account for variable MICA/NKG2D interactions in transplant recipients. The clinical impact of this variability remains to be determined. Variations in content and function, ie, NKG2D binding reflecting MICA gene polymorphism, will be further investigated at molecular and cellular level of primary EC cultures isolated from the transplant donors. Finally, this study should provide better knowledge of the MICA implications for transplantation immunology, thus helping to design future detection and monitoring assays.

ACKNOWLEDGEMENT

We acknowledge the French Health Ministry Project No. 02655 and Biocollection INSERM for help in this project.

REFERENCES

- Stephens HA: MICA and MICB genes: can the enigma of their polymorphism be resolved? *Trends Immunol* 22:378, 2001
- Groh V, Bahram S, Bauer S, et al: Cell stress-regulated human major histocompatibility complex class I gene expressed in gastrointestinal epithelium. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93:12445, 1996
- Zwirner NW, Dole K, Stastny P: Differential surface expression of MICA by endothelial cells, fibroblasts, keratinocytes, and monocytes. *H Immunol* 60:323, 1999
- Zwirner NW, Marcos CY, Mirbaha F, et al: Identification of MICA as a new polymorphic alloantigen recognized by antibodies in sera of organ transplant recipients. *Hum Immunol* 61:917, 2000
- Terasaki PI, Ozawa M, Castro R: Four-year follow-up of a prospective trial of HLA and MICA antibodies on kidney graft survival. *Am J Transplant* 7:408, 2007
- Coupe S, Leboeuf F, Boudlay G, et al: RhoA activation mediates phosphatidylinositol 3-kinase-dependent proliferation

Table 1. MICA Exon 5 Polymorphism in Transplant Donors

Microsatellite in Exon 5	n	Homozygous n	Heterozygous n
A4	12 (22.6%)	no	12 (22.6%)
A5	9 (17%)	no	9 (17%)
A5.1	28 (52.8%)	7 (13.2%)	21 (39.6%)
A6	26 (49%)	5 (9.4%)	21 (39.6%)
A9	17 (32.1%)	1 (1.9%)	16 (30.2%)

of human vascular endothelial cells: an alloimmune mechanism of chronic allograft nephropathy. *J Am Soc Nephrol* 15:2429, 2004

7. Katsuyama Y, Ota M, Ando H, et al: Sequencing based typing for genetic polymorphisms in exons, 2, 3 and 4 of the MICA gene. *Tissue Antigens* 54:178, 1999

8. Mizuki N, Ota M, Kimura M, et al: Triplet repeat polymorphism in the transmembrane region of the MICA gene: a strong

association of six GCT repetitions with Behcet disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94:1298, 1997

9. Suemizu H, Radosavljevic M, Kimura M, et al: A basolateral sorting motif in the MICA cytoplasmic tail. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:2971, 2002

10. Moenkemeyer M, Heiken H, Schmidt RE, et al: Higher risk of cytomegalovirus reactivation in human immunodeficiency virus-1-infected patients homozygous for MICA5.1. *Hum Immunol* 70:175, 2009

2-2.3 Article 2

In press dans le journal « **Journal of the American Society of Nephrology** »

***A5.1* Mutation Influences Endothelial MICA Expression and Allosensitization in Kidney Transplantation**

Pierre Tonnerre,^{*†‡} Nathalie Gérard,^{*†‡} Mathias Chatelais,^{*†‡} Caroline Poli,[§] Stéphanie Allard,[§] Sylvie Cury,[§] Céline Bressollette,[¶] Anne Cesbron-Gautier,[§] and Béatrice Charreau^{*†‡}

^{*}INSERM, UMR1064, 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. [§]Laboratoire HLA, Etablissement Français du Sang, Nantes, F44000 France. [¶]EA4271, Université de Nantes, UFR Pharmacie, Nantes, F44000 France

Running title: *A5.1* mutant in renal allograft

Word count for abstract: 187

Word count for text: 2974

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

This study investigated the immunological impact of the *A5.1* mutation, related to the common *MICA**008 allele, in renal transplantation from cellular to clinical levels. Using *MICA* wild type (*WT*) or *MICA A5.1* homozygous endothelial cells (ECs) we show that *A5.1* mutation (59.5% of our transplant donors) elicits an endothelial phenotype characterized by elevated *MICA* mRNA steady state and proteins at cell surface (7-10-fold increase *versus* *WT*), and the exclusive release in exosomes instead of enzymatic cleavage. Mechanistically, we found no quantitative change in regulatory miRNAs but we identified several novel SNPs in *MICA A5.1* 3'UTR and 5'UTR regions. Functionally, *A5.1* ECs enhance NKG2D interaction and NK cell activation, promoting NKG2D-dependent lysis of ECs. In kidney transplant recipients, polyreactive anti-*MICA* sera bind preferentially to *MICA A5.1* donor's ECs supporting *MICA**008(A5.1) molecules as major antigenic determinants on graft's ECs. By determining the incidence of *MICA A5.1* mismatch we provide the first evidence for a statistically significant association between *MICA A5.1* on transplant donor and anti-*MICA* sensitization of kidney recipients. Together, our findings identify the *A5.1* mutation as an immunodominant factor and a potential risk factor for transplant survival.

INTRODUCTION

MHC class I-related chain A (MICA) antigens are surface glycoproteins strongly implicated in innate immunity^{1,2}. MICA is a ligand for the activating immunoreceptor NKG2D, a highly conserved C-type lectin-like membrane glycoprotein expressed on essentially all natural killer (NK) cells, as well as on $\gamma\delta$ and $\alpha\beta$ CD8(+) T cells^{3,2}(Risau and Flamme, 1995).

MICA proteins are physiologically expressed at the cell surface of a restricted number of cell types including endothelial cells (ECs), epithelial cells, fibroblasts, dendritic cells and activated TCD4+ and B lymphocytes⁵. MICA are stress-induced proteins regulated at cell surface by infection (i.e. viruses and some intracellular bacteria), heat shock, DNA damage response⁶ and oncogenic transformation³. Dysregulation of MICA is associated with tumor escape⁷ but also causes autoreactive T cell stimulation, thus promoting autoimmune diseases⁸.

MICA gene is highly polymorphic and more than 70 alleles have been reported so far (<http://hla.alleles.org>)^{9,10}. MICA also has a triplet repeat microsatellite polymorphism (GCT) within Exon 5 encoding for the transmembrane region. Seven GCT (Alanine) repeats have been described, corresponding either in a 4(A4), 5(A5), 6(A6), 7(A7), 8(A8), 9(A9) or 10(A10) Alanine repetitions within the transmembrane region. Additionally, a mutation has been associated with certain A5 repeat alleles. This mutation consists in a guanine insertion after the second, among five, trinucleotide repeat (A5.1) that causes a frameshift mutation leading to a premature intradomain stop codon^{11,12}. Previous studies suggest that *MICA A5.1* encodes a truncated protein with possible aberrant protein expression and cellular localization¹³.

Although genetic matching of the classical HLA antigens is clearly a major determinant of successful organ transplant outcome, clinical studies demonstrate that MICA is

another polymorphic genetic factor involved. Initial studies reported on specific antibodies against MICA in the serum of patients who had rejected kidney allografts, suggesting a role for these molecules in transplant immunopathology^{14,15}. Expression of MICA in transplanted organs has been then demonstrated and anti-MICA antibodies have been associated with both acute and chronic rejection in renal^{16,17}, pancreatic¹⁸ and heart transplants¹⁹. In renal transplantation, anti-MICA antibodies post-transplantation have been reported in 5-9% of recipients and cause a 10%-decrease in graft survival at 1 year²⁰. Together these findings suggest a role for donor MICA antigens expressed on transplant ECs in the alloimmune response. However, MICA genotyping is not routinely achieved and a possible correlation between MICA polymorphism, MICA expression and function on graft's ECs is still unknown. Moreover, the molecular bases for MICA allospecific immunization are not well understood.

The aim of this study was to evaluate the functional impact of *MICA A5.1* mutation on MICA expression by ECs and its clinical relevance in organ transplantation. Here, we examined the frequency of *MICA A5.1* mutation among a cohort of kidney transplant donors. We demonstrate that *MICA A5.1* mutation leads to abnormal expression of both surface MICA expression and release soluble and exosomal MICA antigens by ECs. We show here that endothelial MICA A5.1 expression enhances NKG2D engagement on NK cells and is a major antigenic determinant of the allele-specific anti-MICA humoral response in kidney transplant recipients.

RESULTS

Predominant *MICA A5.1* mutation in kidney transplants associates with MICA protein alteration in donor's endothelial cells. Cultures of donor ECs corresponding to renal transplantations performed in our institute (ITUN, Nantes, France) between 1999 and June 2012 and prospectively isolated and stored have been used to determine the impact of *MICA A5.1* mutation on endothelial phenotype and immune functions. Consistent with our previous study²¹, MICA genotyping of transplant donors (n=84) indicated that *A5.1* mutation was found associated with four alleles: *023, *028, *053 and *008, the latest being the most represented allele in our cohort (34.5 %, including *MICA*0801* (18.4%) and *MICA*0804*, (16.1%); **Figure 1A**). Overall, the frequency of the *MICA A5.1* mutation was 59.5% in our cohort including 13.1% (n=11) of *A5.1* homozygous and 46.4% (n=39) of heterozygous carriers (**Figure 1B**). *MICA A5.1* variant contains 5 GCT repeats plus a nucleotide insertion (GGCT) (**Figure 1C**) that causes a frameshift mutation leading to a premature intradomain stop codon within the transmembrane region, which delete the MICA cytoplasmic tail. As a consequence of this mutation, expression of shortened MICA proteins in EC cultures from *A5.1* homozygous donors as compared to wild type (WT) donors (33 kDa *versus* 42 kDa, respectively; **Figure 1D**) was observed by Western blotting after protein deglycosylation.

Elevated MICA expression on graft's ECs features *MICA A5.1* donors and enhances NKG2D activation. To determine whether *MICA A5.1* mutation may cause change in EC phenotype, MICA expression was compared on primary EC cultures issued from *MICA A5.1* homozygous (*A5.1/A5.1*, n=4), heterozygous (*WT/A5.1*, n=4) and controls (*WT/WT*, n=4) transplant donors. First, FACS analysis (**Figure 2A**) shows that MICA surface expression was

significantly higher on ECs from *A5.1/A5.1* donors compared to controls (MFI: 1085.7 ± 190.5 for *A5.1/A5.1* vs 155.7 ± 40.3 for *WT/WT*, $**p=0.0073$). In contrast, all group express equal levels of HLA-A,-B,-C and other NKG2D ligands (NKG2DL): MICB, ULBP-2 and -3 (**Figures 2B, 2C, 2D, 2E**). ECs where MICA expression was intermediate were heterozygous for the *A5.1* mutation.

The NKG2D receptor stimulates activating signals for cytotoxicity by binding NKG2DL (MICA/B or ULBP1/2/3) on target cells²². Here, two models were used to study the functional impact of *MICA A5.1* EC phenotype. First, coculture of NKL cells with EC monolayers were performed and showed (**Figure 2F**) that elevated MICA cell surface expression on *A5.1/A5.1* ECs significantly decreases NKG2D expression on NK cells compared to *WT/WT* ECs ($32.40 \pm 6.67\%$ versus $50.80 \pm 4.93\%$, $*p=0.0286$) confirming increased ligand/receptor interaction. Second, NK activation and cytotoxic activity toward allogeneic ECs was measured. Enhanced MICA expression at EC target provokes a significant increase in lysis (**Figure 2G**, $51.20 \pm 11.11\%$ versus $32.96 \pm 2.85\%$ of lysis at 100:1 E:T ratio, for *A5.1/A5.1* and *WT/WT*, respectively, $*p=0.0357$). Together, these findings provide evidence that transplant donors carrying the *A5.1* mutation have an elevated expression of MICA protein on graft's EC that triggers an enhanced NKG2D-dependent ECs lysis by effector cells.

***MICA A5.1* mutation causes change in the release of soluble and exosomal MICA by ECs.** A feature of MICA proteins is their ability to be released as soluble form by proteolytic cleavage⁷. To define whether a higher expression of cell bound MICA may also results in increased level of soluble MICA (sMICA), EC culture supernatants were collected and sMICA was quantified by ELISA. Unexpectedly, release of sMICA was found strongly

reduced for *MICA A5.1* heterozygous cells (1.82-fold decrease (* $p < 0.05$) compared to the WT group) while almost no soluble form was produced by *A5.1* homozygous ECs (**Figure 3A**). Consistent with an impaired shedding of MICA from *A5.1* cells, inhibition of metalloproteinases was significantly less efficient to maintain MICA surface expression on *A5.1* carriers than on WT ECs ($32.5 \pm 3.2\%$ versus $119.5 \pm 33.8\%$ of basal MICA increase; * $p = 0.0286$; **Figure 3B**). Previous study reported the shedding of MICA A5.1 proteins into exosomes²³, as a mechanism of immune escape used by some tumor cell lines. Here, the release of exosomes was found similar in quantity from both *WT* and *A5.1* homozygous ECs ($3\text{--}4\mu\text{g}/10^6$ ECs/48h, **Figure 3C**). However and consistent with high cell surface expression, immunoblotting indicated that exosomes released from *A5.1* ECs expressed higher levels of MICA mutated proteins with a dose-response observed for heterozygous and homozygous cells whereas exosomes from *WT* ECs didn't associated with MICA molecules (**Figure 3D**). Thus, the genetic variant *MICA A5.1* strongly impacts on MICA expression by altering cell surface MICA and the release of soluble and exosomal forms of MICA from ECs.

Transcriptional and posttranscriptional control of *MICA A5.1* expression. Next, we investigated the regulatory mechanisms that may trigger elevated MICA expression on *MICA A5.1* ECs. Firstly, similar time courses of membrane-bound MICA decay was observed for *WT* and *A5.1* ECs in the presence of cycloheximide indicating that protein stability was not involved (**Figure 4A**). In contrast, qPCR analyses indicated that *A5.1* phenotype correlates with significantly higher mRNA steady state (1.96 ± 0.83 and 4.00 ± 0.96 -fold-increase for *A5.1* heterozygous, and homozygous, respectively, versus *WT MICA*, ** $p = 0.0085$) (**Figure 4B**).

Among transcriptional mechanisms, regulatory miRNAs have been recently shown to control basal MICA expression in cells²⁴. We found no quantitative change in the miRNAs previously reported to control MICA expression (miR-20a; -106b; -373; -520b) nor in miRNAs that we found predicted to target *MICA* 3'UTR (<http://www.targetscan.org>) (miR-105; -520f; -636) (data not shown). We further speculated that change in *MICA A5.1* transcription rate could alternatively results from either an associated polymorphism in the promoter region or/and in the 3'UTR region that is a target for miRNA regulatory activity²⁵. To test this hypothesis, sequencing of genomic DNA, in proximal 5' and 3'UTRs, from a set of *MICA WT* (n=24) and *A5.1* (n=10) transplant donors was achieved. As a result, 3 novel SNPs were identified in the proximal 5'UTR (at -364; -338; -308 from start codon) but none were specifically associated with *MICA A5.1* (**Figure 4C**). Similarly, 7 novel SNPs were founded in the *MICA* 3'UTR region (at positions: +19; +24; +28; +50; +80; +122; +157 from the stop codon). Although none were specifically associated with *MICA*008(A5.1)*, we cannot exclude their contribution to regulatory mechanisms.

Graft's ECs from *MICA A5.1* donors are predominant targets of anti-MICA responses in kidney allograft recipients. The prevalence of anti-MICA antibodies post-transplantation is around 5-9% and decreases graft survival by 10% at 1 year post-transplantation²⁰. To investigate the clinical impact of having a high MICA expression on graft ECs (i.e. transplant from a *MICA A5.1* donor) we analyzed the specificity of anti-MICA responses in a cohort of kidney allograft recipients. Sera from 28 recipients with anti-MICA antibodies in the absence of anti-HLA antibodies were selected for the study. First, antibody specificity for the various *MICA* alleles of the sera was determined by Luminex® assays. Then, we developed an endothelial cell cross-match assay (ECXM) to test the MICA-based reactivity of the sera on a cellular relevant target. To this end, sera were incubated with four

EC cultures issued from donors homozygous for the 4 major MICA alleles represented in our donor's cohort: MICA*002(WT), MICA*004(WT), MICA*009(WT), MICA*008(A5.1). A representative example of ECXM+ is shown in the **supplemental figure S1**. Anti-MICA antibody binding to the various ECs was detected by FACS as we previously described²⁶. Luminex analysis showed that when present in the sera, intensities of anti-MICA*008/*027 Abs in the sera were not higher than other specificity as determined by fluorescence intensity (MFI). When tested on EC cultures expressing physiological level of membrane-bound MICA, sera only bind to ECs from *MICA*008(A5.1)* donors (**Figure 5A**). Surprisingly, similar or even higher antibody levels defined on beads coated with MICA*002; *004 or *009 proteins did not react with EC cultures from MICA*002(WT); *004(WT) or *009(WT) donors. These findings are illustrated in the **Figure 5B and supplemental figure S2** comparing the reactivity of a set of recipient's sera on beads and ECs. Together, these data show for the first time to our knowledge that anti-MICA antibodies bind to target graft's ECs in an allele-specific manner and also suggest that the level of MICA protein on *A5.1* mutated EC is a key and a limiting parameter. To test this hypothesis, ECXM were repeated on MICA*008(A5.1) ECs previously MICA-silenced using specific siRNA (**Figure 5B**) (Efficacy of MICA silencing is shown in **supplemental figure S3**). Here, we demonstrate that reducing MICA level on *MICA*008(A5.1)* ECs abrogates recipient's sera binding to donor ECs.

***MICA A5.1* mutation mismatch is a major determinant of transplant recipient immunization.** As a consequence of our above findings attributing to *MICA A5.1* changes in graft's EC phenotype and function, in circulating forms of MICA released by ECs and the immunodominance of anti-MICA Abs, we hypothesized that a mismatch in *MICA A5.1* between donor (D) and recipient (R), in particular the combination D(*A5.1*)/R(*WT*) could

promote MICA sensitization. To test this hypothesis, the clinical impact of a *MICA A5.1* mismatch was investigated in a cohort of D/R pairs (n=81) with or without post-transplant MICA sensitization, as we previously determined by Luminex single antigen assays. Demographic data for both groups are presented in the **Table 1**. Genotyping for *A5.1* mutation was performed for both donors and recipients. D/R pairs were classified according to their *MICA* genotypes and four MICA D/R combinations were defined. The distribution of the D/R combinations was then statistically analyzed in the two groups of patients according to MICA sensitization (**Figure 6**). Our results show that, the combination “Donor *A5.1*/Recipient *WT*” was overrepresented in the group of MICA-sensitized patients (n=12; 41.3%) in comparison to group of non-immunized recipients. Interestingly, the D/R full matching for A5.1 was found predominant (49.01%) in the non-immunized patients and low within the MICA sensitized group (13.3%) Statistical analysis of *MICA A5.1* and *WT* distribution among donors and recipients in both groups demonstrates a significant association between D/R *MICA A5.1* mismatch and anti-MICA alloimmunization particularly when donors carry the *A5.1* mutation (*p=0.0104).

DISCUSSION

*MICA**008 is the predominant allele in several populations^{27,28} and is consequently highly represented in transplant donor and recipient populations as demonstrated here. *MICA**008 is characterized by a mutation (*A5.1*) leading to a premature stop codon resulting in a truncated transmembrane and absent cytoplasmic tail¹¹. Previous study from Bahram and colleagues reported on cellular changes associated with *MICA A5.1* mutation in epithelial cells¹³. However, except from recent studies^{29,30}, the functional impact of *MICA* genetic variant as well as the endothelial expression and regulation of MICA have yet not been explored.

By comparing *MICA* transcripts and proteins on cultured ECs from either wild type or *MICA A5.1* heterozygous and homozygous donors we showed that *A5.1* mutation causes elevated MICA protein at the cell membrane (7-10 fold increase versus *WT MICA*). *MICA A5.1* expression was not due to an increase in protein stability but rather reflects specific regulatory control at transcription or post-transcription level. Multiple checkpoints operate to control MICA expression including posttranscriptional mechanisms that allows a faster regulation than could be achieved via transcriptional regulation. Several miRNAs have been shown to play key regulatory role on MICA posttranscriptional control²⁴. In our study, no significant quantitative change was found for miR-20a, -105, -106b, -373, -520b, -520f and -636. Nevertheless, we cannot exclude the possibility that cell-specific (i.e. endothelial-specific) miRNAs contribute to *MICA* regulation in ECs. However, these miRNAs still remain to be identified. We thought to investigate whether a specific polymorphism in the 5' and 3'UTR regions of the *MICA A5.1*-associated-alleles could, independently of miRNA level, impair miRNA binding and regulatory action. Genotyping the 5' and 3'UTRs from various *MICA* alleles reveals several SNPs in these regions. However, among the SNPs that

we found none was specifically associated with the *A5.1* mutation. Ubiquitination and proteasome degradation processes have been reported as important events regulating NKG2DL expression in mouse and in humans³¹. A viral E3 ligase, K5, ubiquitylates lysine residues in the cytoplasmic tail of MICA and decreases cell surface expression of all *MICA* alleles with a wild-type cytoplasmic tail but had no effect on cell lines homozygous for *MICA*008* allele³². Future studies will be required to determine whether accumulated MICA in *A5.1* ECs results, at least partially, from impaired ubiquitination process.

Functionally, and consistent with high level of MICA expression, *A5.1* ECs increase NKG2D interaction and activity in NK cells as compared to ECs expressing full length MICA. As a consequence, activation of NK cells leads to an elevated NKG2D-dependent lysis of allogeneic *A5.1* EC targets. In the transplantation setting, our data suggest that donor bearing the *A5.1* allele could have a higher susceptibility to cell lysis mediated by NKG2D^{positive} effector cells (NK and T CD8+).

Shedding of MICA is one of the mechanisms by which human tumors evade NKG2D-mediated immune destruction^{7,33}. Soluble MICA induces host immune suppression by down regulation of surface NKG2D expression on NK cells and CTLs influencing immune response and patient outcome in cancer⁷ and in cardiac transplantation³⁴. Exosomes derived from cancer cells also express ligands for NKG2D³⁵. Consistent with previous data in a tumor cell line²³, *MICA*008(A5.1)* accumulates in the EC supernatant as exosomes and mutated *A5.1* ECs fail to release soluble cleaved MICA. We also show, for the first time, that primary ECs secrete large quantities of exosomes (even more than immature dendritic cells³⁶). Palmitoylation of two cystein residues in the intracellular domain of MICA is necessary for proteolytic shedding of MICA³⁷. The absence of these two cysteins in *A5.1* mutated proteins could explain the lack of MICA *A5.1* protein shedding from ECs. Together these data suggest that the common *MICA*008(A5.1)* allele provides specific immunoregulatory properties to

ECs with exacerbated NKG2D interactions mediated via cellular contact but also via exosomes released by ECs. The respective functional impact of soluble versus exosomal MICA remains to be defined³⁸.

Since initial report showing that MICA molecule, expressed at the cell surface of ECs, is recognized by specific antibodies in sera of transplanted patients¹⁴, numerous clinical studies have sustained the detrimental impact of anti-MICA humoral response in kidney, heart and lung transplantation^{15,17,39,40}. Nevertheless, the molecular basis for MICA alloimmunization remains to be established⁴¹. In the present study, we show that expression of MICA A5.1 is a primary target of post-transplant antibodies in kidney allograft recipients due to high MICA expression. Our results indicate that anti-MICA are alloreactive antibodies that bind to graft ECs in an allele-specific manner. These findings further support a key for *MICA*008(A5.1)* molecules all as both major antigenic determinant and target on recipient sensitization sustained this hypothesis. Clinically, our retrospective cohort study aimed to determine the incidence of a *A5.1* mismatch provides the first evidence of a statistically significant association between *MICA A5.1* mutation on transplant donors and anti-MICA sensitization of kidney recipients.

To conclude, the *A5.1* mutation related to the common *MICA*008* allele elicits an endothelial phenotype characterized by an exacerbated expression of MICA at cell surface, the exclusive production of exosomes, expressing high level of MICA, as circulating MICA molecules. We propose that *MICA* mismatch with *MICA A5.1* phenotype on graft's ECs in *MICA WT* recipient is a major determinant for effector cellular and alloimmune humoral responses suggesting that particular MICA mismatching between donor and recipient may be a risk factor to consider in transplant long-term outcome.

CONCISE METHODS

Subjects and Samples

Primary EC cultures are prospectively isolated since 1999 from transplant donors at the time of kidney transplantation at ITUN (Nantes, France) and stored for research purposes²⁶ in the DIVAT Sample Biocollection (French Health Minister Project number 02G55).

To investigate the impact of *MICA A5.1* mutation on recipient alloimmunization, a total of 81 patients who underwent kidney transplantation between 1999 and 2010 at ITUN (CHU de Nantes, France) were included in the study. This cohort includes 30 donor/recipient pairs with post-transplant anti-MICA antibodies. A control group (n=51) includes transplant donor/recipient couples with no antibodies against HLA class I, class II and MICA antigens post-transplantation. To allow matching analyses, only donor/recipient pairs with genomic DNA available for MICA typing were selected. Serology for anti-HLA class I, -class II and anti-MICA 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. 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 and DNA, (BioCollection INSERM, French Health Minister Project N°02G55).

Endothelial cell isolation and cell culture

Isolation and establishment of primary cultures of vascular ECs (HAEC) are isolated and characterized as we previously described⁴². 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. 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 of rIL-2 (R&D Systems). NKL cell line was kindly provided by Dr. Eric Vivier (Marseille, France). For NKG2D analysis, NKL were incubated with confluent EC monolayers and NKG2D expression by NKL was then measured by FACS.

Reagents and antibodies

The following mAbs were used: anti-pan HLA class I (anti-HLA-A,-B,-C; clone W6/32) (American Type Cell Culture), anti-MICA (AMO1) and MICA/B (BAM01, BAMO3) were for BamOmab (Tubingen, Germany), anti-ULBP1, -2, -3 (R&D Systems, Lille, France), anti- α 5 integrin and anti-GAPDH (both from Chemicon, Val de Fontenay, France). Anti-NKG2D mAbs as well as FITC and PE-conjugated anti-mouse F(ab')₂ and anti-human IgG were from Jackson ImmunoResearch Laboratories (West Grove, PE). For protein stability analysis, confluent EC monolayers were incubated with cycloheximide (CHX, 50µM, Sigma-Aldrich, St Louis, MO) for the indicated period of time. For inhibition of soluble MICA release, ECs were treated with galardin (GM6001, 50µg/ml, Sigma-Aldrich) for the indicated period of time.

MICA genotyping, 5' and 3'UTR analysis

MICA typing of transplant donors and recipients was performed as we previously described²¹. MICA proximal promoter, exons and 3'UTR region were amplified with the

following primers: MICApromo-F5'-ACGCGTTGTCTGTCCTGGAA-3', MICApromo-R5'-GAGGTGCAAAAGGGAAGATG-3' for the proximal promoter, MICA2-F 5'-ATTCCTGCCCCAGGAAGGTTGG-3' and MICA2-R 5'-AGACAGGTCCCTGCTCTCTG-3' for exon2, MICA3-F 5'-TTCGGGAATGGAGAAGTCACTGC-3', MICA3-R 5'-AAATGCCTTCATCCATAGCACAG-3' for exon3; MICA4-F 5'-GACTTGCAGGTCAGGGGTCCC-3', MICA4-R 5'-TGTCCTACCCTGGCCTGACC-3' for exon 4, MICA5-F 5'-CCTTTTTTTCAGGGAAAGTGC-3', MICA5-R 5'-CCTTACCATCTCCAGAAACTGC-3' for exon5, and MICA6-F; 5'-GATGTTGATGGAGTGATGGGA-3', MICA6-R; 5'-ATGTTGATCAGGATGGTCTCGATC-3' for exon 6 and 5'UTR region.

PCR for *MICA* promoter, exons 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 primer⁴³, 12.5mM dNTPs, 1 U of Herculase® *Taq* (Stratagene, La Jolla, CA). Then, nested PCR were performed using 1µL of PCR product and conditions reported above for exons 1, 5 and 6. 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/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 and quantitative real-time PCR

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. Real-time quantitative PCR was performed in an ABI PRISM 7900 sequence detection application program using labeled TaqMan[®] probes (Applied Biosystems). The following commercial ready-to-use primers/probe mixes were used (Applied Biosystems): MICA (Hs00792_m1), hypoxanthine guanine phosphoribosyl transferase (HPRT, Hs99999909_m1) was used as an endogenous control to normalize RNA amount. Relative expression between a given sample and a reference sample was calculated according to the $2^{-\Delta\Delta C_t}$ method, where the reference represents one-fold expression, as previously described⁴⁴.

siRNAs and silencing

Short interfering RNA (siRNAs) were designed, synthesized and purchased from Ambion (Applied Biosystems). Cells were transiently transfected with 25 nM of non targeting (siCONTROL) or MICA-specific siRNAs (siRNA#s8771, Ambion, Applied Biosystems) using LipofectAMINE[™] RNAiMAX reagent according to the manufacturer's instructions (Invitrogen). The efficiency of silencing, determined by flow cytometry analyses in each experiment, ranged from 70% to 90%.

Immunoblotting

Cells or exosomes 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). Deglycosylation with Endoglycosidase H and Peptide:N-glycosidase F (Sigma–Aldrich) was performed as we described previously⁴⁵. Lysates (20 µg) were resolved by SDS-PAGE (12%) and subjected to Western immunoblot analysis using specific antibodies for MICA/MICB (BAMO1), $\alpha 5$ integrin or GAPDH, 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, Luminex and endothelial cell cross-match (ECXM)

For phenotype analysis, cells ($1\text{--}2 \times 10^5$ 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 primary antibodies. After three washes, cells were incubated with PE-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.

For experimental endothelial cell cross-match, target ECs ($1\text{--}2 \times 10^5$ cells/sample) isolated from MICA*002(WT), *004(WT), *008(A5.1), *009(WT) or *010(null) homozygous donors were suspended with Trypsin-EDTA (Gibco BRL), washed twice with PBS containing 1% BSA and 0.1% NaN₃, and then incubated on ice for 30 min with 25 µL of patient's sera (dilution 1/4 in PBS/BSA/NaN₃). After three washes, cells were incubated with a FITC-labeled goat anti-human F(ab')₂ IgG (Jackson Lab.) at 4 °C for 30 min. Cells were fixed

in 1% paraformaldehyde. A positive ECXM was obtained when MFI was at least twice the MFI obtained with EC control expressing MICA*010 (null), a MICA allele associated with no membrane-bound MICA due to instable proteins⁴⁶. Negative controls were performed using a pool of normal human AB sera (NHS) from 250 healthy male donors (EFS, Nantes, France) or isotype-matched IgG control (Jackson Lab.). Experiments were repeated at least three times. Sera from kidney recipient (n=28) tested in ECXM were provided by Laboratoire HLA, (EFS Pays de la Loire, Nantes, France). These sera contain defined anti-MICA as determined by Luminex Single Antigen (LABScreen, One Lambda) but no anti-HLA class I or II antibodies. MICA single antigen kit allows detection of antibodies against MICA*001, *002, *004, *007, 009, *012, *017, *018, *019, and *027. MICA*027 and MICA*008 share the same extracellular region and have been considered equivalent in this study. Fluorescence was measured on 10,000 cells/sample using a fluorescence activated cell sorter (FACScantoII®: Becton Dickinson, Mountain View, CA) and analyzed using FlowJo® software (Tree Star, Inc. Ashland, OR) and Cytobank⁴⁷. Data are depicted in histograms plotting median ou geomean fluorescence intensity (MFI) on a four-decade logarithmic scale (x-axis) *versus* cell number (y-axis).

Cell-mediated cytotoxicity assays

ECs labeled with ⁵¹Cr were incubated with NKL cells for 4 h at various E:T ratios. The supernatants were obtained after the incubation and subjected to gamma counting. The maximum or spontaneous release was defined as counts from samples incubated with 5% Triton X-100 or medium alone, respectively. Cytolytic activity was calculated with the following formula: % lysis = (experimental release - spontaneous release) x 100/(maximum release - spontaneous release). The spontaneous release in all assays was less than 20% of the maximum release.

Soluble MICA and exosome analysis

Detection of sMICA was done using a sandwich-ELISA from BamoMab (Tubingen, Germany). For exosome purification, confluent EC monolayers were cultured in ECBM without serum or growth factor supplementation for 48h. Cell culture media were centrifuged twice for 10min at 300g and then centrifuged for 30min at 10,000g. Supernatants were centrifuged for 70min at 100,000g. Pellets containing exosomes were washed in PBS and centrifuged for 70min at 100,000g. Exosomes were stored at -80°C before analysis.

Data analysis

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

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors would like to thank Marie-Luce Chesneau (EFS, Nantes) for excellent technical assistance and Dr. Katia Gagne (EFS, Nantes) for helpful discussions. This work was supported by grants from L'Agence de Biomédecine (Recherche et Greffes 2009) and La Société de Néphrologie. This work was also in part supported by an EU-funded Integrated Project in Life Sciences, Genomics and Biotechnology for Health LSHB-CT-2006-037377. P.T. was supported by grants from La région Pays de la Loire (PROVASC project) and the « Société Francophone de Transplantation » (SFT).

DISCLOSURES

None.

REFERENCES

1. Bahram S, Mizuki N, Inoko H, Spies T: Nucleotide sequence of the human MHC class I MICA gene. *Immunogenetics* 44: 80–81, 1996
2. Groh V, Rhinehart R, Secrist H, Bauer S, Grabstein KH, Spies T: Broad tumor-associated expression and recognition by tumor-derived gamma delta T cells of MICA and MICB. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 96: 6879–6884, 1999
3. Bauer S, Groh V, Wu J, Steinle A, Phillips JH, Lanier LL, Spies T: Activation of NK cells and T cells by NKG2D, a receptor for stress-inducible MICA. *Science* 285: 727–729, 1999
4. Ehrlich LIR, Ogasawara K, Hamerman JA, Takaki R, Zingoni A, Allison JP, Lanier LL: 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, 2005
5. Zwirner NW, Fernández-Viña MA, Stastny P: MICA, a new polymorphic HLA-related antigen, is expressed mainly by keratinocytes, endothelial cells, and monocytes. *Immunogenetics* 47: 139–148, 1998
6. Gasser S, Orsulic S, Brown EJ, Raulet DH: The DNA damage pathway regulates innate immune system ligands of the NKG2D receptor. *Nature* 436: 1186–1190, 2005
7. Groh V, Wu J, Yee C, Spies T: Tumour-derived soluble MIC ligands impair expression of NKG2D and T-cell activation. *Nature* 419: 734–738, 2002
8. Groh V, Bruhl A, El-Gabalawy H, Nelson JL, Spies T: Stimulation of T cell autoreactivity by anomalous expression of NKG2D and its MIC ligands in rheumatoid arthritis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 100: 9452–9457, 2003
9. Fodil N, Laloux L, Wanner V, Pellet P, Hauptmann G, Mizuki N, Inoko H, Spies T, Theodorou I, Bahram S: Allelic repertoire of the human MHC class I MICA gene. *Immunogenetics* 44: 351–357, 1996
10. Stephens HA: MICA and MICB genes: can the enigma of their polymorphism be resolved? *Trends Immunol.* 22: 378–385, 2001
11. Mizuki N, Ota M, Kimura M, Ohno S, Ando H, Katsuyama Y, Yamazaki M, Watanabe K, Goto K, Nakamura S, Bahram S, Inoko H: Triplet repeat polymorphism in the transmembrane region of the MICA gene: a strong association of six GCT repetitions with Behçet disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 94: 1298–1303, 1997
12. Goto K, Ota M, Ohno S, Mizuki N, Ando H, Katsuyama Y, Maksymowych WP, Kimura M, Bahram S, Inoko H: MICA gene and ankylosing spondylitis: linkage analysis via a transmembrane-encoded triplet repeat polymorphism. *Tissue Antigens* 49: 503–507, 1997
13. Suemizu H, Radosavljevic M, Kimura M, Sadahiro S, Yoshimura S, Bahram S, Inoko H: A basolateral sorting motif in the MICA cytoplasmic tail. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 99: 2971–2976, 2002

14. Zwirner NW, Marcos CY, Mirbaha F, Zou Y, Stastny P: Identification of MICA as a new polymorphic alloantigen recognized by antibodies in sera of organ transplant recipients. *Hum. Immunol.* 61: 917–924, 2000
15. Sumitran-Holgersson S, Wilczek HE, Holgersson J, Söderström K: Identification of the nonclassical HLA molecules, mica, as targets for humoral immunity associated with irreversible rejection of kidney allografts. *Transplantation* 74: 268–277, 2002
16. Mizutani K, Terasaki P, Bignon JD, Hourmant M, Cesbron-Gautier A, Shih RNJ, Pei R, Lee J, Ozawa M: Association of kidney transplant failure and antibodies against MICA. *Hum. Immunol.* 67: 683–691, 2006
17. Zou Y, Stastny P, Süsal C, Döhler B, Opelz G: Antibodies against MICA antigens and kidney-transplant rejection. *N. Engl. J. Med.* 357: 1293–1300, 2007
18. Hankey KG, Drachenberg CB, Papadimitriou JC, Klassen DK, Philosophe B, Bartlett ST, Groh V, Spies T, Mann DL: MIC expression in renal and pancreatic allografts. *Transplantation* 73: 304–306, 2002
19. Suárez-Alvarez B, López-Vázquez A, Gonzalez MZ, Fdez-Morera JL, Díaz-Molina B, Blanco-Gelaz MA, Pascual D, Martínez-Borra J, Muro M, Alvarez-López MR, López-Larrea C: The relationship of anti-MICA antibodies and MICA expression with heart allograft rejection. *Am. J. Transplant.* 7: 1842–1848, 2007
20. Terasaki PI, Ozawa M, Castro R: Four-year follow-up of a prospective trial of HLA and MICA antibodies on kidney graft survival. *Am. J. Transplant.* 7: 408–415, 2007
21. Tonnerre P, Gérard N, Chatelais M, Charreau B: MICA gene polymorphism in kidney allografts and possible impact of functionally relevant variants. *Transplant. Proc.* 42: 4318–4321, 2010
22. Bahram S, Inoko H, Shiina T, Radosavljevic M: MIC and other NKG2D ligands: from none to too many. *Curr. Opin. Immunol.* 17: 505–509, 2005
23. Ashiru O, Boutet P, Fernández-Messina L, Agüera-González S, Skepper JN, Valés-Gómez M, Reyburn HT: 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: 481–489, 2010
24. Stern-Ginossar N, Mandelboim O: An integrated view of the regulation of NKG2D ligands. *Immunology* 128: 1–6, 2009
25. Chatterjee S, Pal JK: Role of 5'- and 3'-untranslated regions of mRNAs in human diseases. *Biol. Cell* 101: 251–262, 2009
26. Canet E, Devallière J, Gérard N, Karam G, Giral M, Charreau B, Coupel S: Profiling posttransplant circulating antibodies in kidney transplantation using donor endothelial cells. *Transplantation* 93: 257–264, 2012
27. Petersdorf EW, Shuler KB, Longton GM, Spies T, Hansen JA: Population study of allelic diversity in the human MHC class I-related MIC-A gene. *Immunogenetics* 49: 605–612, 1999

28. Zhang Y, Lazaro AM, Lavingia B, Stastny P: Typing for all known MICA alleles by group-specific PCR and SSOP. *Hum. Immunol.* 62: 620–631, 2001
29. Shafi S, Vantourout P, Wallace G, Antoun A, Vaughan R, Stanford M, Hayday A: An NKG2D-mediated human lymphoid stress surveillance response with high interindividual variation. *Sci Transl Med* 3: 113ra124, 2011
30. Lin D, Lavender H, Soilleux EJ, O'Callaghan CA: NF- κ B regulates MICA gene transcription in endothelial cell through a genetically inhibitable control site. *J. Biol. Chem.* 287: 4299–4310, 2012
31. Coscoy L, Sanchez DJ, Ganem D: A novel class of herpesvirus-encoded membrane-bound E3 ubiquitin ligases regulates endocytosis of proteins involved in immune recognition. *J. Cell Biol.* 155: 1265–1273, 2001
32. Thomas M, Boname JM, Field S, Nejntsev S, Salio M, Cerundolo V, Wills M, Lehner PJ: 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: 1656–1661, 2008
33. Salih HR, Rammensee H-G, Steinle A: Cutting edge: down-regulation of MICA on human tumors by proteolytic shedding. *J. Immunol.* 169: 4098–4102, 2002
34. Suárez-Alvarez B, López-Vázquez A, Díaz-Molina B, Bernardo-Rodríguez MJ, Álvarez-López R, Pascual D, Astudillo A, Martínez-Borra J, Lambert JL, González S, López-Larrea C: The predictive value of soluble major histocompatibility complex class I chain-related molecule A (MICA) levels on heart allograft rejection. *Transplantation* 82: 354–361, 2006
35. Clayton A, Tabi Z: Exosomes and the MICA-NKG2D system in cancer. *Blood Cells Mol. Dis.* 34: 206–213, 2005
36. Alvarez-Erviti L, Seow Y, Yin H, Betts C, Lakhal S, Wood MJA: Delivery of siRNA to the mouse brain by systemic injection of targeted exosomes. *Nat. Biotechnol.* 29: 341–345, 2011
37. Agüera-González S, Gross CC, Fernández-Messina L, Ashiru O, Estes G, Hang HC, Reyburn HT, Long EO, Valés-Gómez M: Palmitoylation of MICA, a ligand for NKG2D, mediates its recruitment to membrane microdomains and promotes its shedding. *Eur. J. Immunol.* 41: 3667–3676, 2011
38. Théry C, Ostrowski M, Segura E: Membrane vesicles as conveyors of immune responses. *Nat. Rev. Immunol.* 9: 581–593, 2009
39. Mizutani K, Terasaki P, Rosen A, Esquenazi V, Miller J, Shih RNJ, Pei R, Ozawa M, Lee J: Serial ten-year follow-up of HLA and MICA antibody production prior to kidney graft failure. *Am. J. Transplant.* 5: 2265–2272, 2005
40. Zhang Q, Cecka JM, Gjertson DW, Ge P, Rose ML, Patel JK, Ardehali A, Kobashigawa JA, Fishbein MC, Reed EF: HLA and MICA: targets of antibody-mediated rejection in heart transplantation. *Transplantation* 91: 1153–1158, 2011

41. Zou Y, Qin Z, Silveus A, Fan Y, Stastny P: Polymorphisms of MICA recognized by human alloantibodies. *Immunogenetics* 61: 91–100, 2009
42. Coupel S, Leboeuf F, Bouliday G, Soulillou J-P, Charreau B: 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, 2004
43. Katsuyama Y, Ota M, Ando H, Saito S, Mizuki N, Kera J, Bahram S, Nose Y, Inoko H: Sequencing based typing for genetic polymorphisms in exons, 2, 3 and 4 of the MICA gene. *Tissue Antigens* 54: 178–184, 1999
44. Livak KJ, Schmittgen TD: Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* 25: 402–408, 2001
45. Coupel S, Moreau A, Hamidou M, Horejsi V, Soulillou J-P, Charreau B: Expression and release of soluble HLA-E is an immunoregulatory feature of endothelial cell activation. *Blood* 109: 2806–2814, 2007
46. Li Z, Groh V, Strong RK, Spies T: A single amino acid substitution causes loss of expression of a MICA allele. *Immunogenetics* 51: 246–248, 2000
47. Kotecha N, Krutzik PO, Irish JM: Web-based analysis and publication of flow cytometry experiments. *Curr Protoc Cytom* Chapter 10: Unit10.17, 2010

FIGURE LEGENDS

Figure 1. Allelic distribution and protein characterization of *MICA A5.1* mutation. (A) *MICA* allele distribution in a cohort (n=84) of kidney donors. *MICA* genotyping was performed as reported in the Material and methods section. *MICA* alleles associated with *MICA A5.1* mutation are shown in red. (B) Distribution of exon5 microsatellite polymorphism in our cohort of transplant donors (left panel) and distribution of *MICA WT* and *A5.1* genotype (right panel). Data are expressed as percentages of the total population. (C) Representative electrophoregrams of *MICA* exon5 microsatellite sequences, homozygous *WT/WT* and *A5.1/A5.1* donors. (D) A representative western blot showing *MICA* proteins expressed in vascular ECs isolated from transplant donors. EC lysates were obtained from cultures issued from *WT (MICA A9)* or *MICA A5.1* homozygous individuals. Cell lysates (20 µg) were pretreated overnight with or without endoglycanase F (PNGase F) or endoglycosidase H (Endo H) for deglycosation before electrophoresis. Immunoblotting was performed after protein transfer using an anti-*MICA* monoclonal antibody (AM01). Experiment is representative of 3 separate experiments.

Figure 2. Elevated *MICA* expression on ECs from *MICA A5.1* donors increases NKG2D modulation and activity in NK cells. (A-E) Endothelial expression of *MICA* (A), *MICB* (B), *ULBP2* (C), *ULPB3* (D) and *MHC class I* (E) at cell surface was established by facs analysis performed on ECs from homozygous *WT/WT* (n=4), *MICA A5.1/A5.1* (n=4) and heterozygous *WT/A5.1* (n=4) donors. Upper panel shows representative histograms of fluorescence intensity and a quantitative analysis from 4 individual EC cultures is shown in the lower panel, **p=0.0073. (F) Exacerbated expression of *MICA A5.1* proteins on ECs

increases NKG2D internalization on NK cells. NKG2D expression on NKL was analyzed by FACS 24h after co-culture with EC monolayers from either *MICA* *WT/WT* (n=4) or *A5.1/A5.1* (n=4) individuals. Representative histograms of fluorescence intensity (left) and a quantitative analysis (right) from 4 *MICA* *WT/WT* and 4 *A5.1/A5.1* individual EC cultures are shown, *p=0.0286. (G) Exacerbated expression of MICA A5.1 proteins on ECs increases NKG2D-dependent NK cytotoxic activity. NKL were used as effector cells and ECs with *MICA* *WT/WT* (n=3) or *MICA* *A5.1/A5.1* (n=5) genotype were used as targets at various effector-to-target (E:T) ratios. Cytotoxicity was measured using a 4h- ⁵¹Cr release assay. Results are expressed as mean ± SEM of specific lysis, *p=0.0357. Experiments are representative of three independent experiments.

Figure 3. MICA A5.1 mutation impairs MICA shedding from ECs but promotes release in endothelial exosomes. (A) Quantification of soluble MICA in EC supernatants. Conditioned media from *WT/WT* (n=9), *WT/A5.1* (n=9), and *A5.1/A5.1* (n=7) *MICA* EC cultures were collected at 120h and analyzed by Elisa, *p<0.05, ***p<0.0001. (B) Time course analysis of membrane-bound MICA after treatment of ECs with or without (NT) an inhibitor of metalloproteinases (GM6001) measured by flow cytometry. Representative histograms (left) and a relative quantification obtained from 4 EC *WT/WT* or *A5.1/A5.1* are shown (right). Data are expressed as relative percentages of MICA expression, *p=0.0286). (C) Quantification of exosomes from 48h-conditioned media from *MICA* *WT/WT* (n=3) and *A5.1/A5.1* (n=3) EC cultures. (D) Exosomes were purified by successive ultracentrifugations. Total EC lysates and lysates from purified EC-derived exosomes (20µg) were pretreated overnight with PNGase F before western blot analysis. Immunoblotting were performed using

anti-MICA/B antibodies (BAMO1). Blots were rehybridized using anti-integrin $\alpha 5$ antibodies. Results shown are representative of 3 independent experiments.

Figure 4. *MICA A5.1* mutation causes no change in protein stability but correlates with increased MICA mRNA steady state. (A) ECs with *WT/WT* (n=3) or *A5.1/A5.1* (n=6) MICA genotypes were treated by cycloheximide (CHX) and MICA expression was analyzed by flow cytometry at different time points. Representative histograms from individual donors (left) and a quantitative analysis (right) are shown. Parallel kinetics of membrane bound MICA decreased was observed by FACS. (B) *MICA* transcripts in ECs were quantified by QPCR and results from *WT/WT* (n=6), *WT/A5.1* (n=4) and *MICA A5.1/A5.1* (n=4) are expressed as relative expression calculated by the $2^{-\Delta\Delta C_t}$ method, **p=0.0085. (C) Location and allele-specificity of the SNPs identified by sequencing the 5'UTR and 3'UTR regions from 34 EC cultures including alleles *MICA**008(*A5.1*), *004, *002, *009, *010, *011, *017 and *030.

Figure 5. Allele specificity of anti-MICA alloantibodies in kidney transplant recipients.

(A) Quantitative analysis of anti-MICA antibodies in 28 sera from transplant recipients by Luminex MICA single antigens and endothelial cell crossmatch (ECXM). The four major specificities are shown (*MICA**002, *004, *009, *027/*008). Data from Luminex analysis (upper panel) are expressed as MFI. (A). ECXM (lower panel) were performed by incubating ECs homozygous for *MICA**002(*WT*), *004(*WT*), *009(*WT*) and *008(*A5.1*) with the sera previously characterized by Luminex assay (upper panel). ECs issued from a *MICA**010(null) donor and expressing no MICA at cell surface was used as a control. Results are expressed as

a ratio between MFI obtained on indicated EC and MFI obtained on EC *MICA*010*(null) target. **(B)** For demonstration, data obtained with one serum (CHA) are presented (in red in Figure 5A). Serum reactivity determined by Luminex (left panel) and found by ECXM performed on four homozygous *MICA* ECs (medium panel) are shown. Positive ECXM was abolished after *MICA* silencing using *MICA*-specific siRNAs (right panel). Isotype-matched IgG controls are presented (dark-grey shading). ECXM on *MICA*010*(null) (light-grey shading) and *MICA*008/A5.1* EC targets (black lines) are shown. Positive (red) and negative (black) ECXM scores are indicated.

Figure 6. Clinical impact of for MICA A5.1 mutation mismatching on transplant recipient anti-MICA immunization. A total of 81 first kidney transplant Recipients were separated into two groups according to Luminex analysis data. The first group contains recipients with noimmunization against *MICA*, HLA class-I or -II antigens after transplantation (n=51). The second group contains recipients who have developed antibodies against *MICA* antigens (n=30). Genomic DNAs from both donors and recipients were sequenced for *MICA* A5.1 mutation and donor/recipient pairs were classified in four groups as follows: Donor *WT*/Recipient *A5.1* (white panel); Donor *WT*/Recipient *WT* (light grey panel); Donor *A5.1*/Recipient *A5.1* (dark grey panel); Donor *A5.1*/Recipient *WT* (black panel). The respective percentages of donor/recipient pairs are depicted. Statistical analysis of association between D/R pairs *MICA* A5.1 mutation mismatch and anti-MICA alloimmunization was assessed using Person X² test (*p=0.0104).

Table 1. Demographic data

Patients	Non-immunized n=51	MICA-immunized n=30
DONORS		
Age (years; mean±SD)	53±13	52±16
Gender Male/Female (% of male)	29/22 (56.8%)	10/20 (33.3%)
RECIPIENTS		
Age (years; mean±SD)	52±11	48±16
Gender Male/Female (% of male)	34/17 (66.6%)	17/13 (56.6%)
Graft Kidney/pancreas-Kidney (% of kidney)	47/4 (92.1%)	20/10 (66.6%)
Number of total HLA-A-B-DR mismatches	3.6±1.2	4.0±1.0
Immunization anti-MICA (%)	0 (00.0%)	30 (100%)
Immunization anti-class I (%)	0 (00.0%)	5 (16.6%)
Immunization anti-class II (%)	0 (00.0%)	4 (13.3%)
Original disease (n)		
Polycystic kidney disease	16	4
Diabetes mellitus	7	12
Hypertensive nephritis	6	0
Chronic renal insufficiency	6	2
Chronic interstitial nephritis	4	2
IgA nephritis	2	2
Glomerular disease	2	2
Other	8	6

Figure 1

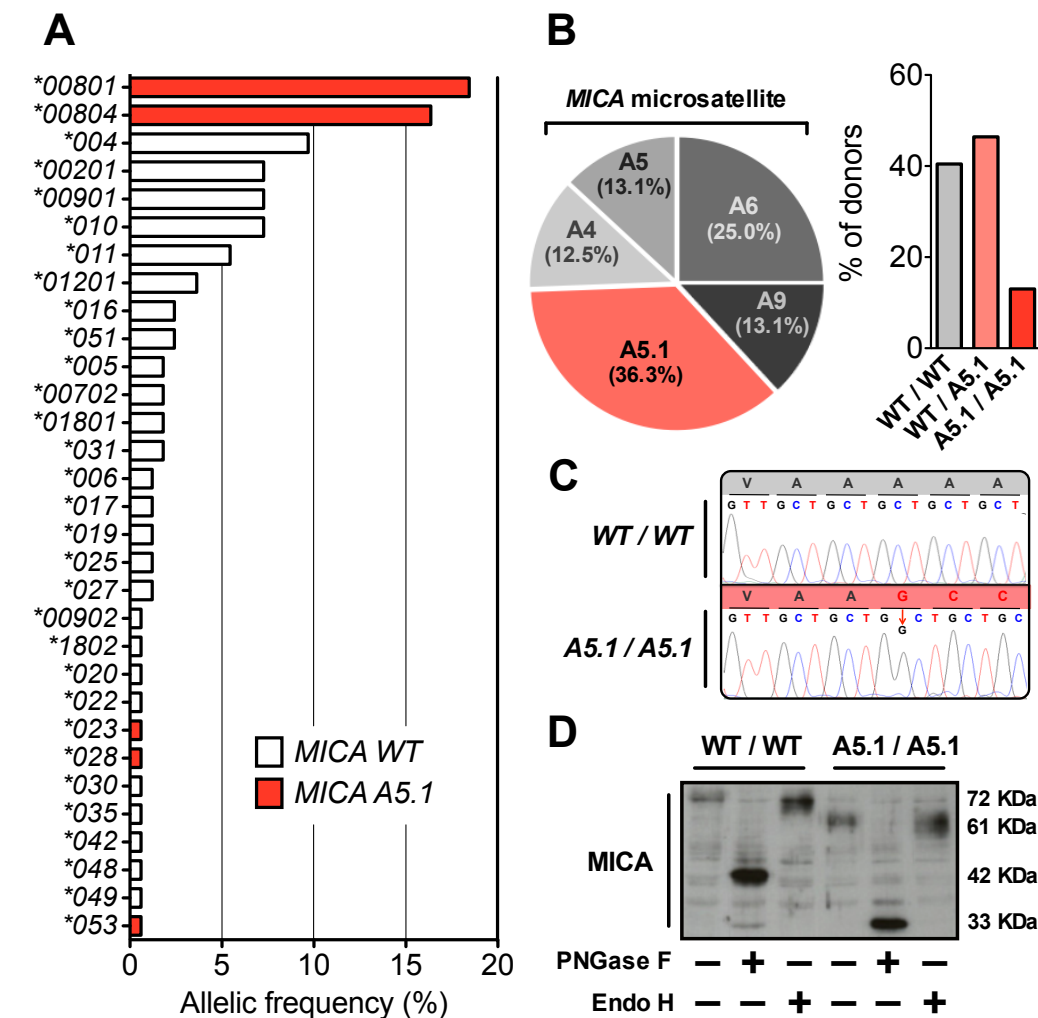


Figure 2

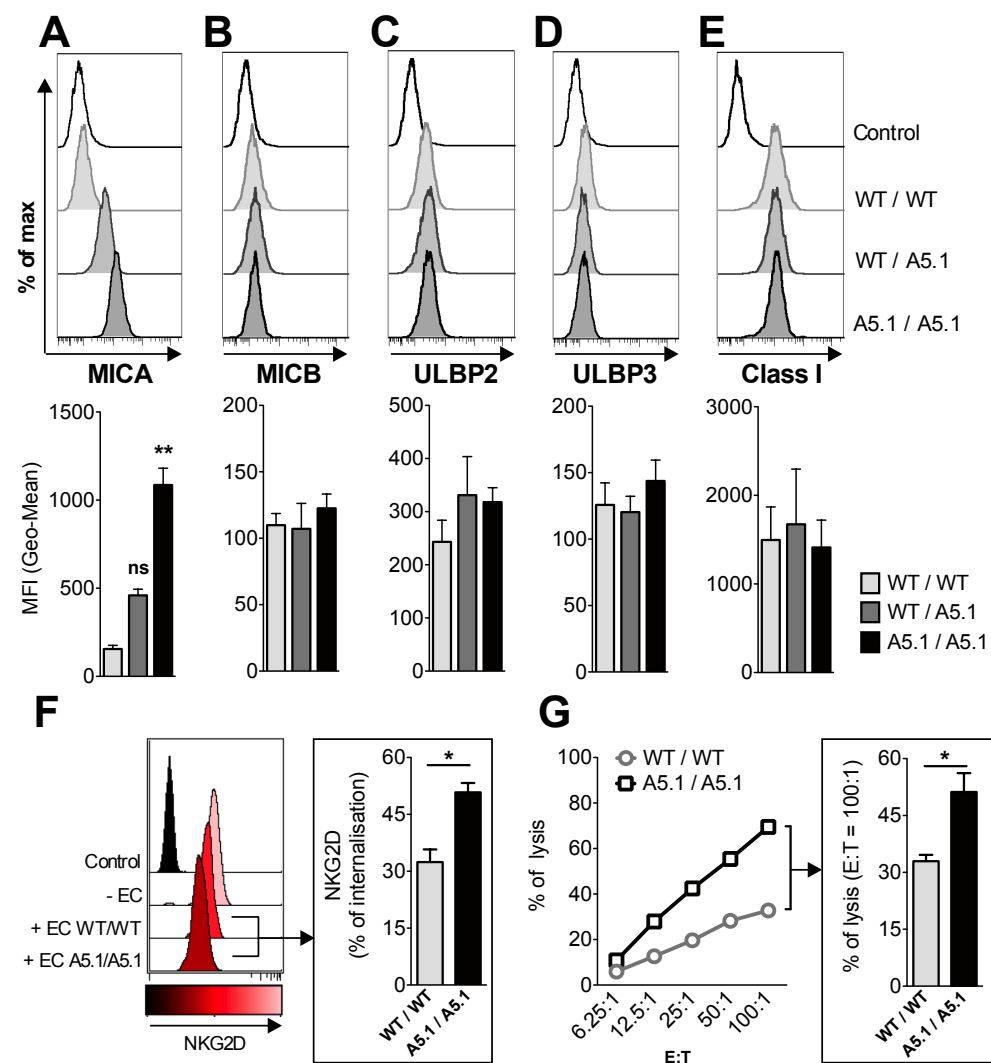


Figure 3

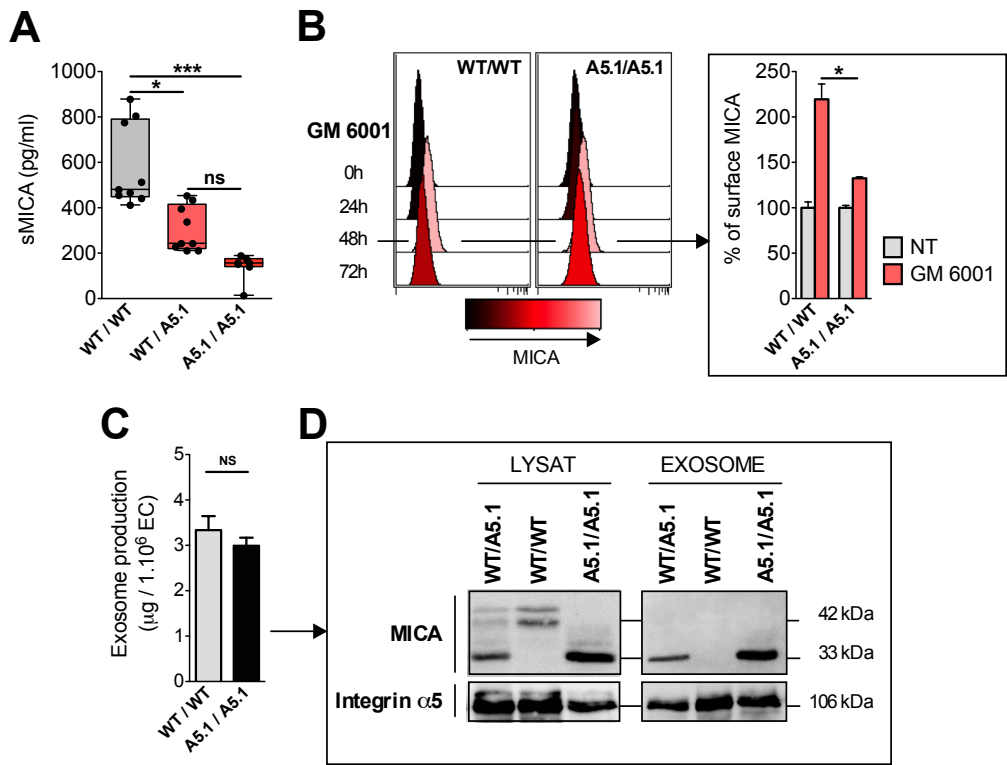


Figure 4

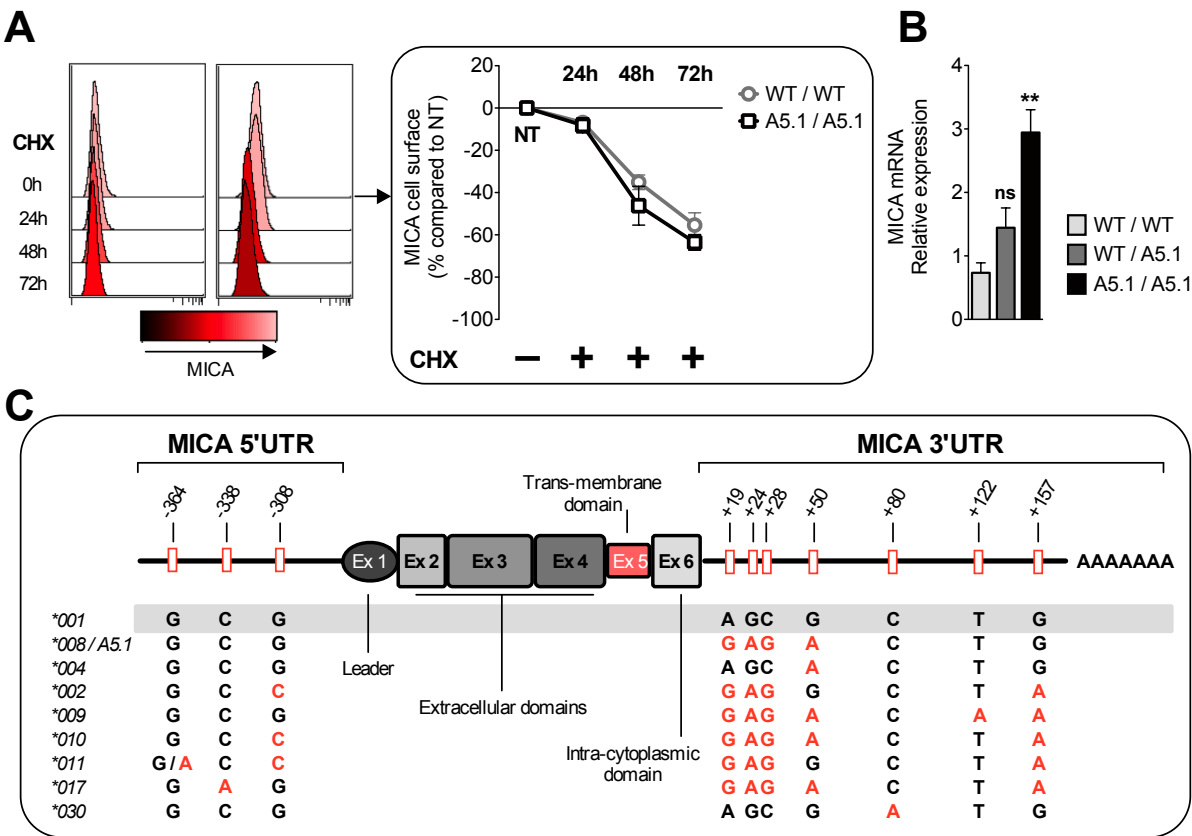


Figure 5

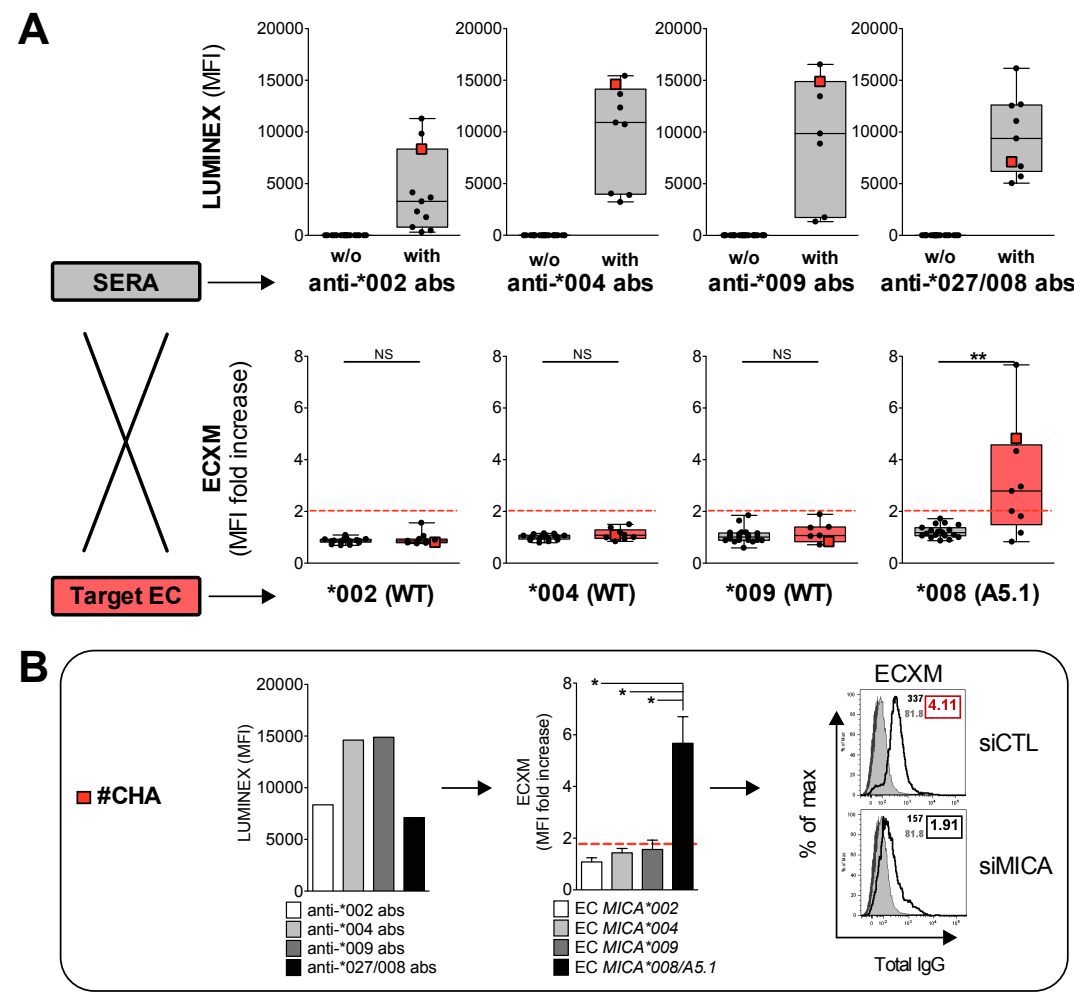
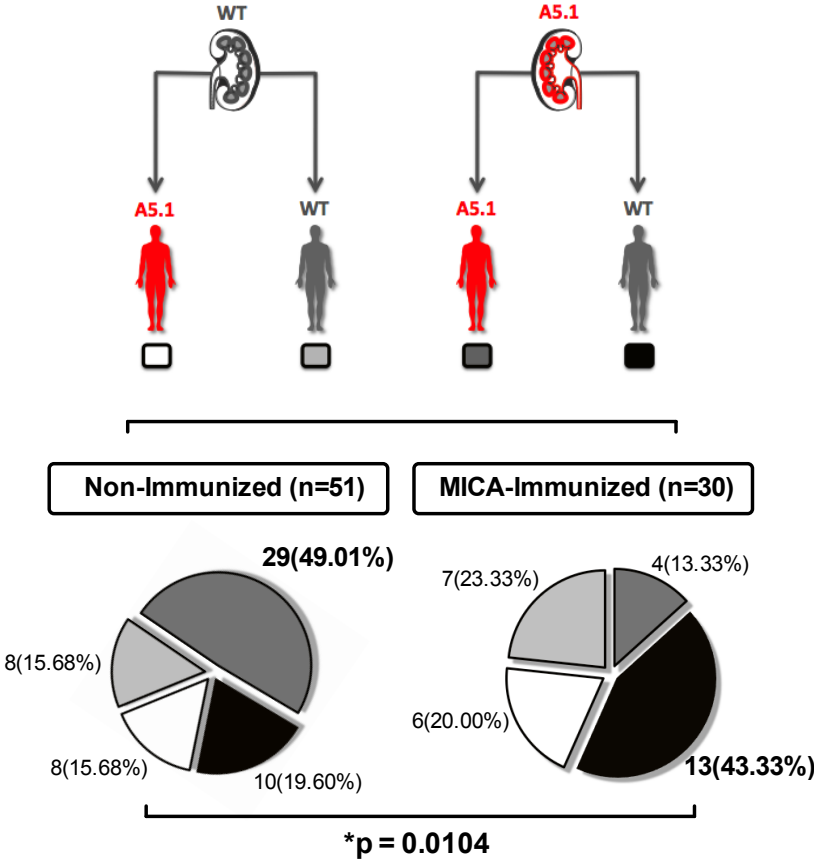
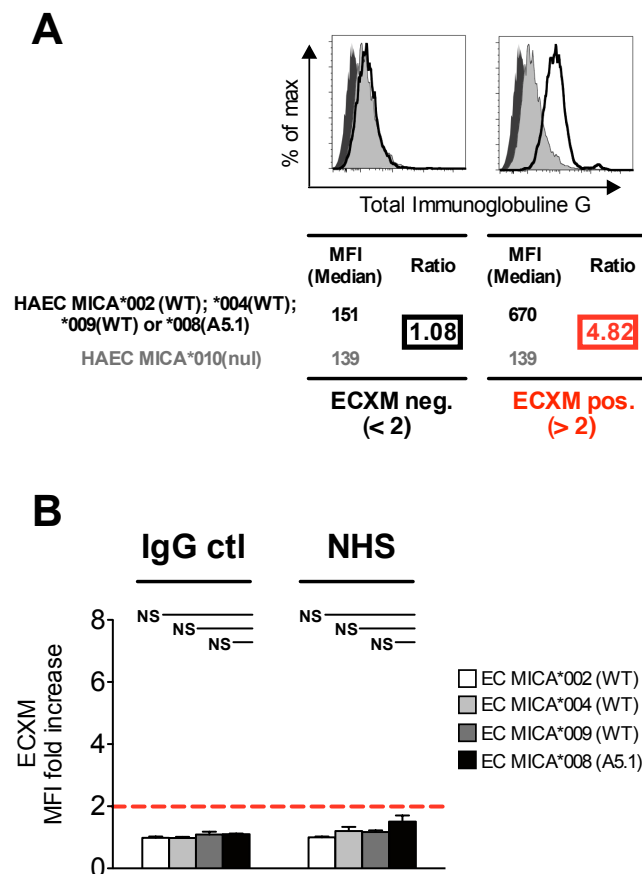


Figure 6

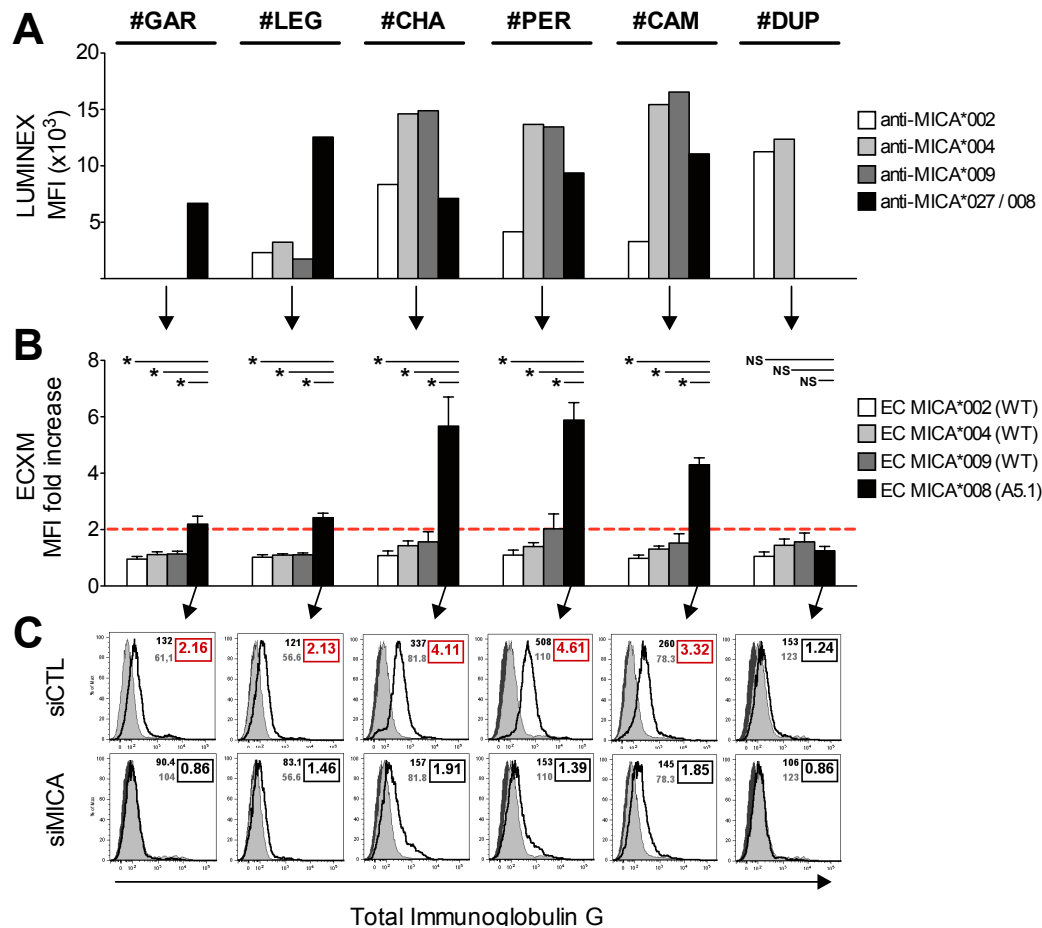


Supplementary Figure 1



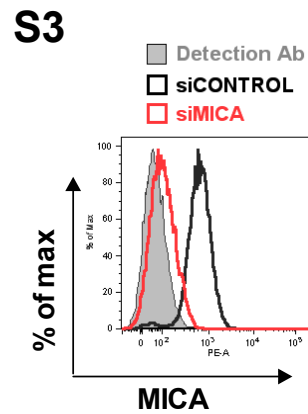
Supplementary Figure 1. Endothelial Cell Cross-Match (ECXM) assay. (A) ECXM was performed on EC homozygous for *MICA**002 (WT), *004 (WT), *009 (WT) or *008 (A5.1) using sera from kidney recipients containing defined anti-MICA but no anti-HLA class I or II antibodies, as determined by Luminex (black line). For all experiments, a parallel ECXM was performed on ECs expressing *MICA**010(null), an allele associated with no MICA expression (light grey shading) to assess MICA specificity. Incubation with isotype-matched IgG (dark-grey shading) are used as a negative control. Results are expressed as a ratio between MFI obtained on indicated EC and MFI obtained on EC *MICA**010(null) target. A positive ECXM was considered when MFI was at least twice the MFI obtained with EC *MICA**010(null) (MFI ratio > 2). (B) ECXM negative controls were performed using a pool of normal human AB sera (NHS) from 250 healthy males donors or isotype-matched IgG control (Jackson Lab.). Experiments were repeated at least three times.

Supplementary Figure 2



Supplementary Figure 2. Comparative analysis of MICA reactivity in six transplant recipient (Gar, LEG, CHA, PER, CAM, DUP) sera by Luminex and ECXM. (A) Quantitative analysis of anti-MICA antibodies in 28 sera from transplant recipients by Luminex MICA single antigens (A) and endothelial cell crossmatch (ECXM) (B). The four major specificities are shown (MICA*002, *004, *009, *027/008). Data are expressed as MFI (A). ECXM were performed by incubating ECs homozygous for *MICA**002 (WT), *004 (WT), *009 (WT) and *008 (A5.1) with the sera previously characterized by Luminex assay. ECs issued from a *MICA**010 (null) donor and expressing no MICA at cell surface was used as a control. Results are expressed as a ratio between MFI obtained on indicated EC and MFI obtained on EC *MICA**010(null) target. (C) Positive ECXM was abolished after MICA silencing using *MICA*-specific siRNAs. Isotype-matched IgG controls are presented (dark-grey shading). ECXM on *MICA**010(null) (light-grey shading) and *MICA**008(A5.1) EC targets (black lines) are shown. Positive (red) and negative (black) ECXM scores are indicated.

Supplementary Figure 3



Supplementary Figure 3. Efficacy of MICA silencing in ECs using specific siRNAs. Representative analysis by flow cytometry of MICA expression on *MICA*008(A5.1)* homozygous EC before (black line) and after (red line) MICA silencing using specific siRNA. Light-grey shading represents isotype control staining.

2-3 Discussion & Perspectives

Jusqu'à ce jour, peu d'études ont recherché à évaluer l'impact du polymorphisme génétique sur l'expression de la protéine MICA.

Comme cela est le cas dans de nombreuses populations (Katsuyama et coll., Tissue Antigens. 1999) (Petersdorf et coll., Immunogenetics. 1999) (Gao et coll., Hum Immunol. 2006), nous identifions l'allèle *MICA*008* comme l'allèle le plus fréquent au sein de notre cohorte de donneurs d'organes. Cet allèle a la particularité d'être associé à la mutation *MICA A5.1*. Celle-ci consiste en l'insertion d'une guanine au niveau du microsatellite A5 de l'exon 5 et introduit, par modification de l'ORF, la survenue précoce d'un codon stop (Mizuki et coll., Proc Natl Acad Sci USA. 1997). Nous confirmons l'expression, par les CE des donneurs qui portent la mutation *MICA A5.1*, d'une protéine MICA plus courte d'environ 10 kDa par comparaison aux protéines « sauvages ». Par ailleurs, nous montrons que l'expression de cette mutation induit la surexpression de la protéine à la membrane cellulaire des CE hétérozygotes et homozygotes *MICA A5.1*.

Nous montrons que la surexpression des protéines MICA par les CE *MICA A5.1* n'est pas due à une plus forte stabilité des protéines tronquées mais résulte d'une surexpression similaire du taux de transcrits, suggérant l'implication d'un mécanisme de régulation transcriptionnel. Nous n'avons pu apporter que des réfutations quant aux mécanismes ici testés pour expliquer la surexpression des transcrits par les CE *A5.1*. En effet, aucun polymorphisme spécifiquement associé à la mutation *MICA A5.1* n'a été observé, ni au niveau du promoteur proximal de MICA, comprenant les séquences de fixation des principaux facteurs de transcription régulant l'expression de MICA (Venkataraman et coll., J Immunol. 2007), ni au niveau de la région 3'UTR, siège de la régulation par les micro-ARN (Stern-Ginossar et coll., Nat Immunol. 2008) (Yadav et coll., J Immunol. 2009).

D'autres mécanismes moléculaires pourraient être envisagés pour expliquer la surexpression des transcrits MICA par les CE *MICA A5.1* :

La stabilité des ARN messagers issus des CE exprimant ou non la mutation *MICA A5.1* pourra être comparée. En effet, bien que la stabilité des ARNm ait été très clairement associée aux polymorphismes des régions 5' et 3' UTR des ARNm (Wu et

Brewer, Gene. 2012) (Weill et coll., Nat Struct Mol Biol. 2012) et qu'ici nous n'en avons observé aucun de spécifique à la mutation *A5.1* dans ces zones, nous ne pouvons tout de fois exclure l'impact d'un ensemble de polymorphismes sur la stabilité des transcrits.

L'implication de mécanismes épigénétiques pourrait également être mis en jeu dans la surexpression des transcrits MICA observée dans les CE *MICA A5.1*. En effet, **l'acétylation des histones** et la **méthylation de l'ADN** ont été identifiées comme étant tout deux des mécanismes de régulation de la transcription de MICA (Kato et coll., Leukemia. 2007) (Andresen et coll., J Immunol. 2007) (Yamanegi et coll., Int J Oncol. 2012). Il n'est donc pas impossible qu'un ou plusieurs polymorphismes, situé(s) en amont du promoteur proximal, puisse modifier l'affinité de l'ADN avec les histones acétylés ou inhiber/favoriser la méthylation d'un site de fixation d'un facteur de transcription.

Enfin, si aucun polymorphisme de l'ADN, ni la modification de la stabilité des ARNm, ne sont à l'origine de la surexpression des transcrits MICA par les CE *MICA A5.1*, la seule différence majeure entre une cellule exprimant la mutation *A5.1* et une cellule ne l'exprimant pas, reste la protéine MICA elle-même. En effet, **la protéine MICA A5.1 est dépourvue de domaine intracellulaire** et il existe de nombreuses évidences quant à un rôle important de celui-ci dans la régulation de MICA. Ainsi, le domaine intracellulaire de MICA a été impliqué dans les mécanismes d'adressage à la membrane dans des cellules épithéliales polarisées (Suemizu et coll., Proc Natl Acad Sci. 2002), ainsi que dans les mécanismes de régulation/dégradation par le protéasome utilisant l'ubiquitinylation du domaine intracytoplasmique de MICA (Nagai et coll., Immunology. 2012). Celui-ci est par ailleurs utilisé comme cible par certaines protéines virales dans le but d'empêcher l'expression de la protéine MICA à la surface cellulaire (Zou et coll., J Immunol. 2005) (Thomas et coll., Proc Natl Acad Sci USA. 2008). Tous ces éléments font des protéines *MICA A5.1* mutées, dépourvues de domaine intracytoplasmique, des protéines avec une régulation et un adressage à la membrane modifiés par comparaison au protéines sauvages, mais semblent conférer une certaine protection vis à vis des mécanismes d'échappement viraux. Cependant, aucune information dans la littérature n'est disponible quant à une éventuelle signalisation prenant forme dans le domaine intracellulaire de MICA, malgré la présence dans cette région de 5 sites de phosphorylation potentiels (**Figure 10**). Ainsi, la protéine MICA est-elle capable de générer un signal via son domaine intracellulaire, qui est donc absent chez les protéines

MICA A5.1 ? Ce signal, pourrait-il être impliqué dans la régulation de la transcription de MICA ? De plus amples investigations devront être envisagées pour répondre à ces questions.

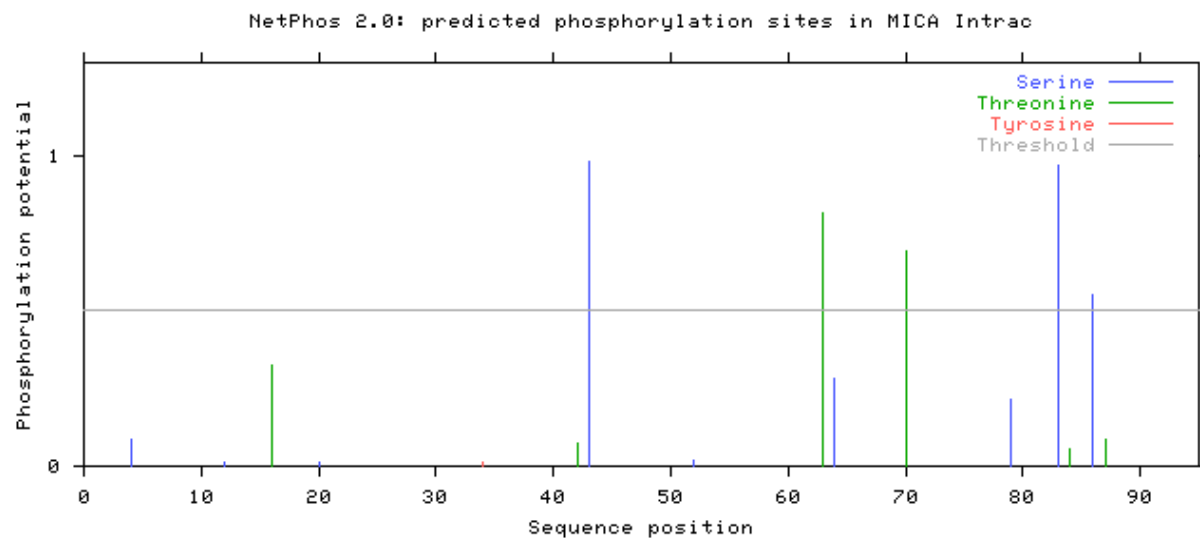


Figure 10 : Sites de phosphorylation potentiels dans le domaine intracellulaire de MICA. D'après les prédictions du serveur en ligne « NetPhos 2.0 » (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetPhos/>).

Il serait par ailleurs intéressant de comparer la polarisation des protéines mutées et sauvages à la surface des cellules endothéliales, comme l'ont fait Suemizu et collaborateurs pour la cellule épithéliale (Suemizu et coll., Proc Natl Acad Sci. 2002). Une modification de l'adressage à la surface des CE selon l'allèle de MICA pourrait avoir d'importantes conséquences, notamment sur la visibilité des antigènes MICA par les anticorps dans un contexte de transplantation ou d'infection. Nos premiers essais se sont heurtés à la difficulté de mettre en œuvre la polarisation des CE, *in vitro*, nécessaire à cette étude.

Dans cette étude, nous associons l'expression de la mutation *MICA A5.1* à une diminution du clivage protéolytique de MICA, se traduisant par une quantité significativement moindre de sa forme soluble dans les surnageants de cultures des CE *A5.1*. Les séquences nucléotidiques impliquées dans le clivage protéolytique étant présentes sur ces deux isoformes de MICA (*A5.1* et WT), la reconnaissance des protéines MICA *A5.1* par les métalloprotéinases et par les protéines adaptatrice ERp5 ne semble pas mise en cause (Kaiser et coll., Nature. 2007) (Waldhauer et coll., Cancer Res. 2008).

Plusieurs études ont cependant montré le rôle de la palmitoylation des deux résidus cystéines du domaine intracytoplasmique de MICA comme favorisant la migration des protéines MICA dans les DRMs puis le clivage protéolytique de MICA. L'absence de domaine intracellulaire pourrait donc être la cause de ce « défaut » de clivage des protéines A5.1, observé dans notre étude.

Par ailleurs, nous montrons pour la première fois dans cette étude le relargage d'une grande quantité d'exosomes par les cultures primaires de CE. En particulier, et en accord avec les travaux de Ashiru et collègues, nous montrons une expression sélective des protéines MICA A5.1 par les exosomes dérivant des CE. Là encore, la palmitoylation de MICA, ou plutôt l'absence de palmitoylation des protéines MICA A5.1, pourrait être un mécanisme envisageable pour expliquer cette dichotomie dans le relargage des formes solubles et exosomales, associée aux protéines MICA mutées et non mutées.

D'un point de vue fonctionnel, nous associons la surexpression des protéines MICA A5.1 à la surface des CE à une plus forte **activation des cellules NK** en co-culture, se traduisant par une plus forte lyse des CE à court terme et une plus importante internalisation du récepteur NKG2D à long terme. Outre l'aspect quantitatif de l'expression de MICA A5.1 à la surface des CE, nos résultats montrent que le mutant MICA A5.1 est, en qualité, tout à fait capable d'interagir avec NKG2D et d'induire l'activation des cellules effectrices NKG2D(+), en désaccord avec les observations de Eleme et collaborateurs (Eleme et coll., J Exp Med. 2004).

De nombreuses études cliniques ont rapporté la présence d'anticorps anti-MICA dans le sérum des patients transplantés et ont associé leur présence à une diminution de la survie du greffon ((Zou et coll., N Engl J Med. 2007) (Terasaki et coll., Am J Transplant. 2007). La surexpression des protéines MICA à la surface des CE A5.1 que nous avons observé dans cette étude suggérerait alors une plus grande visibilité des antigènes MICA par les anticorps anti-MICA présents dans les séra des transplantés. Ainsi, nous avons mis au point un test de cross-match endothélial utilisant notre bio-collection de cultures primaires de CE typée MICA pour la détection des anticorps anti-MICA circulants dans les séra des transplantés rénaux. Par la confrontation de nos résultats avec les informations concernant ces sérums (Spécificité et MFI) collectées par Luminex, nous montrons que la fixation des anticorps anti-MICA sur la CE se fait de manière allèle

spécifique et qu'elle est intimement liée à la quantité d'antigènes MICA présentés à la surface des CE. En effet, dans ce test qui utilise les CE exprimant à leur surface un niveau physiologique d'antigènes MICA comme cibles antigéniques, nous montrons que les CE *MICA A5.1* sont des cibles préférentielles des anticorps anti-MICA.

Tenant compte de ces résultats et partant du postulat qu'un patient ne peut s'immuniser contre son propre allèle de MICA, nous avons émis l'hypothèse d'un effet important du mismatch *MICA A5.1* entre donneurs et receveurs sur l'allo-immunisation anti-MICA post-transplantation. Par l'analyse rétrospective des ADNs (pour le génotypage de MICA) et des sérums (pour la détection des anticorps anti-MICA) de 81 couples donneur/receveur, nous avons mis en évidence, par une analyse statistique de la distribution des receveurs immunisés en fonction du mismatch *MICA A5.1*, un effet délétère de la combinaison Donneur *MICA A5.1* / Receveur *MICA WT* pour l'induction d'anticorps anti-MICA post-transplantation rénale. A l'inverse, un effet protecteur de la combinaison où donneurs et receveurs sont « matchés » pour la mutation *MICA A5.1* a ici été observé.

Ainsi, dans cette étude, nous mettons en évidence les effets de la mutation *MICA A5.1* sur la modification de l'expression des formes membranaires et circulantes de MICA par la CE. Nous associons ce phénotype endothélial à une plus forte incidence de l'allo-immunisation anti-MICA post-greffe et proposons d'envisager le mismatch *MICA A5.1* comme un facteur de risque pour l'allo-immunisation et la survie du greffon en transplantation d'organes vascularisés.

CHAPITRE III :

Impact de la Mutation *MICA A5.1* sur la
Réactivation du BK Virus Post-Transplantation
Rénale

3-1 Présentation de l'Etude

Le virus BK est un virus à ADN double brin appartenant à la famille des *Poliomaviridae*. Celui-ci a été découvert pour la première fois en 1971 chez un patient transplanté rénal ayant développé une sténose urétérale. Ce patient dont les initiales étaient « BK » donna son nom au dit virus (Gardner et coll., Lancet. 1971).

Il est aujourd'hui établi que 80 à 90% de la population adulte est infectée par le virus BK (VBK), la primo-infection ayant lieu au cours de la petite enfance et de façon asymptomatique. Après la primo-infection, le VBK trouve latence dans le tractus réno-urinaire avec un tropisme important pour les cellules urothéliales et épithéliales tubulaires rénales (Funk et coll., Am J Transplant. 2008) (Jiang et coll., J Virol. 2009).

La réactivation du VBK post-transplantation rénale est une complication devenue fréquente puisque touchant 20 à 60% des sujets (Hirsch et coll., N Engl J Med. 2002) (Bressollette-Bodin et coll., Am J Transplant. 2005). Elle se traduit initialement par une augmentation de la charge virale dans les urines des patients et la présence de cellules urothéliales infectées (decoy cells), révélatrices d'une réplication virale en amont. La détection du VBK dans les urines n'est pas, à ce stade, nécessairement associée à une altération de la fonction du greffon. L'évolution vers un statut infectieux à risque pour la greffe se caractérise par la propagation et la détection du virus dans le sang, signe d'une réplication intense du VBK. Ce statut a été décrit pour précéder la survenue de la néphropathie à virus BK (NVBK), observée chez 6 à 8 % des patients (Nicleleit et coll., N Engl J Med. 2000) (Limaye et coll., J Infect Dis. 2001) (Hirsch et coll., N Engl J Med. 2002). Des patients souffrant de NVBK, chez qui une néphrectomie a été réalisée, ont vu leur virémie décroître jusqu'à devenir indétectable, identifiant le rein comme le siège de la réactivation (Funk et coll., J Infect Dis. 2006).

Plusieurs facteurs de risques pour la réactivation du VBK et, en particulier pour la survenue de la NVBK, ont été mis en évidence : Le type et l'intensité de l'**immunosuppression** (en particulier l'utilisation des anti-calcineurines aux effets néphrotoxiques suspectés) (Barri et coll., Clin Transplant. 2001) (Prosser et Hariharan, Exp Rev Clin Immunol. 2006), l'**absence d'une immunité humorale anti-VBK pré-existante** (ex : Primo infection du receveur par le donneur) (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 donneur et receveur** (Awadalla et coll., Am J Transplant. 2004) et les **modifications du génome du virus** au cours de sa réplication (Gosert et coll., J Exp med. 2008).

En l'absence de traitements anti-viraux efficaces sur le VBK, la diminution de l'immunosuppression reste la thérapeutique de choix pour le contrôle de l'infection. La baisse de l'immunosuppression s'associe alors à une réduction de la charge virale dans le sang et dans les urines (Funk et coll., J Infect Dis. 2006) et à l'apparition de cellules TCD4(+) et TCD8(+) dirigées contre les antigènes « VP1 » et « Large-T » du VBK (Binggeli et coll., Am J Transplant. 2007).

Cependant, peu d'informations sont disponibles quant au rôle des cellules de l'immunité innée dans le contrôle de l'infection au VBK. Pourtant, la plupart des virus latents ou persistants disposent d'un arsenal moléculaire ou protéique leur permettant d'échapper aux mécanismes d'immuno-surveillances naturels. Une des cibles principales de ces virus est l'interaction entre le récepteur activateur NKG2D, porté par les cellules NK, NKT, $T\gamma\delta$ et TCD8(+), et ses ligands induits par les stress cellulaires : MICA/B et ULBPs (Eagle et Trowsdale, Nat Rev Immunol. 2007) (Champsaur et Lanier. Immunol Rev. 2010). Ainsi, par la synthèse de la protéine virale UL142, le virus du CMV est en mesure d'induire la rétention intracellulaire de MICA (Chalupny et coll., Biochem Biophys Res Commun. 2006) (Ashiru et coll., J Virol. 2009). De même, le virus KSV « Kaposi's sarcoma associated herpesvirus » est capable de contrôler l'expression de MICA via la protéine virale K5 (Thomas et coll., Proc Natl Acad Sci USA. 2008). L'inhibition de l'expression de MICA se traduisant par une diminution de la reconnaissance et de la lyse des cellules infectées par les cellules effectrices NKG2D(+). De façon intéressante, les groupes de Peter Stastny puis de Paul Lehner ont montré, respectivement, l'incapacité des virus CMV et KSV à bloquer l'expression de la protéine mutée MICA A5.1, dépourvue de domaine intracellulaire (Zou et coll., J Immunol. 2005) (Thomas et coll., Proc Natl Acad Sci USA. 2008).

Dans ce contexte, le but de cette étude a été de déterminer l'impact de la mutation *MICA A5.1* sur la réactivation du VBK, post-transplantation rénale. Dans cette étude collaborative*, nous avons réalisé le typage MICA pour la recherche de la mutation

MICA A5.1, sur une cohorte de 88 couples de donneur et receveur (D/R), pour lesquels un suivi virologique (virurie et virémie) et les échantillons d'ADN étaient disponibles.

Nous avons ensuite réalisé une analyse statistique évaluant une possible corrélation entre le statut infectieux (VBK) et l'expression de la mutation *MICA A5.1*.

Les premiers résultats de cette étude suggèrent un effet protecteur fort de la mutation *MICA A5.1* pour le contrôle de la réactivation du VBK, en particulier lorsque la mutation *MICA A5.1* est exprimée par le donneur d'organe.

* Pierre Tonnerre ; Nathalie Gérard ; Déborah Beillevaire et Béatrice Charreau. **ITUN ; INSERM UMR1064**
Céline Bressollette-Bodin, **Laboratoire de virologie EA4271**
Marie-Luce Cheneau et Anne Cesbron-Gautier, **Laboratoire HLA, EFS**

3-2 Matériel et Méthodes

Patients et fluides biologiques

Quatre-vingt huit transplantés rénaux ont été inclus dans cette étude. Ces patients ont été greffés au CHU de Nantes entre le mois de février 2008 et le mois de novembre 2010. Pour chaque receveur un suivi virologique spécifique du VBK a été réalisé sur les urines et le sang périphérique par la technique de PCR en temps réel. Tous les patients ont été suivis pendant au moins un an avec, au cours de la première année post-greffe, six tests pour la détection du VBK à mois +1, +2, +3, +6, +9 et +12. Les données démographiques des patients sont en cours de collecte.

Les patients pour lesquels aucune réactivation du VBK n'a été détectée dans les urines ni dans le sang, tout au long du suivi, ont été désigné par le symbole « - » et/ou par les termes « **virurie neg.** » (n=31).

Les patients positifs, au moins une fois au cours du suivi, pour la détection de l'ADN viral du VBK dans les urines, sans détection aucune du VBK dans le sang, ont été désignés par le symbole « + » et/ou les termes « **virurie pos.** » (n=25).

Les patients chez lesquels l'ADN du VBK a été détecté, au moins une fois au cours du suivi, dans les urines et dans le sang ont été désignés par le symbole « ++ » et/ou les termes « **virurie / virémie pos.** » (n=32).

PCR en temps réel

La détection spécifique de l'ADN viral du VBK dans les urines et dans le sang a été réalisée dans l'unité EA4271 par le Dr. Céline Bressollette-Bodin comme décrite précédemment (Bressollette-Bodin et coll., Am J Transplant. 2005)

Génotypage

Le génotypage des donneurs et des receveurs pour la mutation *MICA A5.1* a été réalisé sur les ADN génomiques provenant du laboratoire HLA de l'EFS Pays de la Loire, en accord avec les textes en vigueur (Ministère de la santé et de la recherche, numéro 02G55).

Les PCR et les séquençages ont été réalisés comme précédemment décrits (Tonnerre et coll., Transplant Proc. 2010).

Analyse statistique

Les analyses statistiques ont été réalisées selon le test de Pearson χ^2 , via l'utilisation du logiciel informatique GraphPad Prism (GraphPad, San Diego, CA, USA). Une valeur est considérée comme significative pour $p < 0,005$.

3-3 Résultats

Les patients transplantés rénaux ont été suivis sur une période d'au moins un an post-greffe par PCR quantitative pour la détection de l'ADN du VBK dans les urines et dans le sang. La détection de l'ADN du VBK dans les urines signe la réactivation du virus. La détection de l'ADN du VBK à la fois dans les urines et dans le sang est le signe d'une forte réplication du virus et précède généralement la survenue de la NVBK.

Les patients ont été divisés en trois groupes distincts en fonction de leur statut virologique pour le VBK : (1) Les patients pour lesquels aucune réactivation du VBK n'a été détectée, ni dans les urines ni dans le sang, tout au long du suivi, sont désignés par le symbole « - » et/ou par les termes « **virurie neg.** » (n=31). (2) Les patients positifs, au moins une fois au cours du suivi, pour la détection de l'ADN viral du VBK dans les urines, sans détection aucune du VBK dans le sang, sont désignés par le symbole « + » et/ou les termes « **virurie pos.** » (n=25). (3) Les patients chez lesquels l'ADN du VBK a été détecté, au moins une fois au cours du suivi, dans les urines et dans le sang sont désignés par le symbole « ++ » et/ou les termes « **virurie / virémie pos.** » (n=32).

L'expression de la mutation *MICA A5.1* par les donneurs est associée au statut virologique des receveurs, post-greffe.

Les résultats des typages MICA pour l'expression de la mutation *MICA A5.1* par les receveurs ont été confrontés aux suivis virologiques de ces derniers (**Figure 11A**). Ici, nous n'avons observé aucune incidence statistiquement avérée de la mutation *MICA A5.1* sur la réactivation du virus post-greffe. Des tendances opposées, pour la diminution de la fréquence des patients homozygotes MICA non mutée (*WT/WT*) et pour l'augmentation de la fréquence des patients hétérozygotes pour la mutation *MICA A5.1* (*WT/A5.1*) en fonction du statut virologique du receveur (virurie neg. > virurie pos. > virurie/virémie pos.) ont cependant été observées bien que non significatives.

La fréquence des patients homozygotes pour la mutation *MICA A5.1* est observée stable. Nous pouvons noter également que les fréquences des différents génotypes de *MICA* (*WT/WT*; *WT/A5.1*; *A5.1/15.1*) observées ici sont similaires à celles que nous avons précédemment décrites dans une cohorte de donneurs d'organes établie de façon aléatoire (Tonnerre et coll., Transplant Proc. 2010).

Le VBK ayant un tropisme pour les cellules urothéliales et épithéliales tubulaires rénales, le siège de la réactivation du VBK demeure le rein (Funk et coll., J Infect Dis. 2006) (Funk et coll., Am J Transplant. 2008). Nous avons donc émis l'hypothèse d'un impact possible de la mutation *MICA A5.1* exprimée par le donneur sur la réactivation du VBK, chez le receveur. Nous avons donc réitéré l'analyse en confrontant cette fois-ci les statuts virologiques des receveurs aux génotypes *MICA* de leur donneur respectif (**Figure 11B**). De façon surprenante nous avons observé, au sein du groupe VBK « **neg.** », une répartition des fréquences des génotypes *MICA* très différente de celle observée chez les receveurs précédemment analysés ainsi que celle de notre précédente étude sur des donneurs (Tonnerre et coll., Transplant Proc. 2010). En effet, la fréquence des receveurs ayant reçu le rein d'un donneur homozygote *A5.1/A5.1* est particulièrement élevée (38,70%) et proche de celle des hétérozygotes (45,16%) dans le groupe sans réactivation virale. A l'inverse, les donneurs *WT/WT* ne représentent que 16,12% des donneurs de ce groupe. De façon intéressante, les fréquences des patients ayant reçu un organe provenant d'un donneur homozygote ou hétérozygote *MICA A5.1* sont très nettement réduites au sein du groupe VBK « **++** », jusqu'à atteindre, respectivement, **15,62** et **25,00%**. La fréquence de ces génotypes parmi le groupe VBK « **+** » atteignant des valeurs intermédiaires. Réciproquement, la fréquence des patients ayant reçu un greffon *MICA WT/WT* est très nettement augmentée (x3,7) dans le groupe des receveurs VBK « **++** » (**59,37%**), avec une augmentation intermédiaire (x2,2) pour le groupe VBK « **+** » (36,00%).

Ces résultats suggèrent donc un impact fort du génotype *MICA* du donneur sur la réactivation du VBK post-transplantation. En particulier, la mutation *MICA A5.1*, exprimée de façon homozygote ou hétérozygote par le greffon semble avoir un effet protecteur pour le contrôle de la réactivation. A l'inverse le génotype *MICA* non muté *WT/WT* semble avoir un effet délétère.

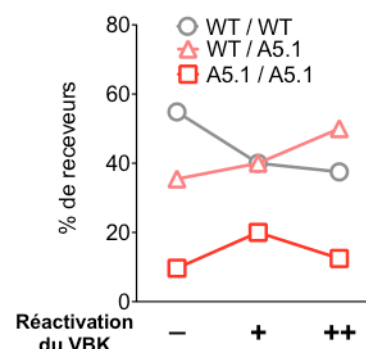
L'analyse statistique des résultats corrèle de façon significative l'expression de la mutation *MICA A5.1* par les donneurs d'organes au statut virologique pour le VBK des receveurs, post-transplantation rénale (groupe « - » vs groupe « **++** », **p=0,0012).

(A)

Receveurs n (%)	Réactivation du VBK		
	-	+	++
WT/WT	17 (54,83)	10 (40,00)	12 (37,5)
A5.1/A5.1	3 (9,67)	5 (20,00)	4 (12,5)
WT/A5.1	11 (35,48)	10 (40,00)	16 (50,00)

$\text{NS } p=0,3111$ $\text{NS } p=0,9029$
 $\text{NS } p=0,5116$

- virurie nég.
+ virurie pos.
++ virurie / virémie pos.



(B)

Donneurs n (%)	Réactivation du VBK		
	-	+	++
WT/WT	5 (16,12)	9 (36,00)	19 (59,37)
A5.1/A5.1	12 (38,70)	7 (28,00)	5 (15,62)
WT/A5.1	14 (45,16)	9 (36,00)	8 (25,00)

$\text{NS } p=0,2914$ $\text{NS } p=0,0700$
 $** p=0,0012$

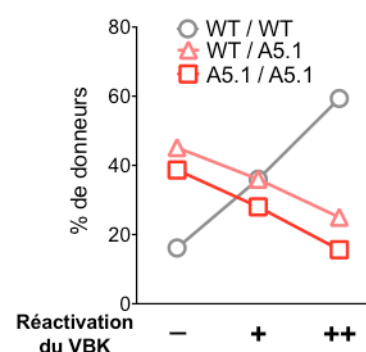


Figure 11 : Comparaison des fréquences des génotypes pour le gène MICA des receveurs (A) et des donneurs (B) avec les statuts virologiques des receveurs pour le VBK. WT/WT=Patients homozygotes pour le gène MICA non muté ; A5.1/15.1=Patients homozygotes pour la mutation *MICA* A5.1 ; WT/A5.1=Patients hétérozygotes pour la mutation *MICA* A5.1. Les analyses statistiques ont été réalisées selon le test de Pearson χ^2 .

Identification des combinaisons de génotypes MICA entre D/R associées à la résistance ou à la sensibilité envers la réactivation du VBK post-transplantation rénale.

Afin d'étudier l'impact éventuel du « mismatch » pour la mutation *MICA A5.1* entre D/R sur la réactivation du VBK, nous avons reconstitué les couples D/R en fonction de leur génotype MICA (**Figure 12**). Ainsi, les couples D/R ont été répartis en 4 combinaisons possibles : DWT/RA5.1 (blanc) ; DWT/RWT (gris clair) ; DA5.1/RA5.1 (gris foncé) et DA5.1/RWT (noir). Dans cette classification, « A5.1 » regroupe les génotypes homozygotes et hétérozygotes pour la mutation. Les fréquences de ces différentes combinaisons au sein des 3 groupes « VBK nég » ; « VBK + » et « VBK ++ » ont ensuite été comparées.

L'analyse des fréquences révèle que les couples pour lesquels il n'y a pas eu de réactivation post-greffe du VBK portent en très grande majorité (**83,86%**) les combinaisons DA5.1/RA5.1 et DA5.1/RWT avec des fréquences respectives de 38,70 et 45,16%. Ces deux combinaisons ont en commun d'associer des donneurs exprimant la mutation *MICA A5.1*, ce qui confirme le rôle protecteur de la mutation précédemment observé. A l'opposé, les combinaisons les plus représentées au sein du groupe de patients à forte réactivation post-greffe « ++ » sont : DWT/RA5.1 (34,37%) et DWT/RWT (25,00%), représentant à elles deux **59,37%** des patients de ce groupe. Ces combinaisons ont en commun d'associer des donneurs homozygotes *MICA WT*. Le groupe de patients positifs pour la détection du virus uniquement dans les urines présente des fréquences intermédiaires pour les différentes combinaisons étudiées. L'analyse statistique révèle une différence significative entre les génotypes *MICA* des couples D/R composant le groupe maîtrisant l'infection et ceux du groupe subissant une forte réactivation du VBK (**p=0,0023).

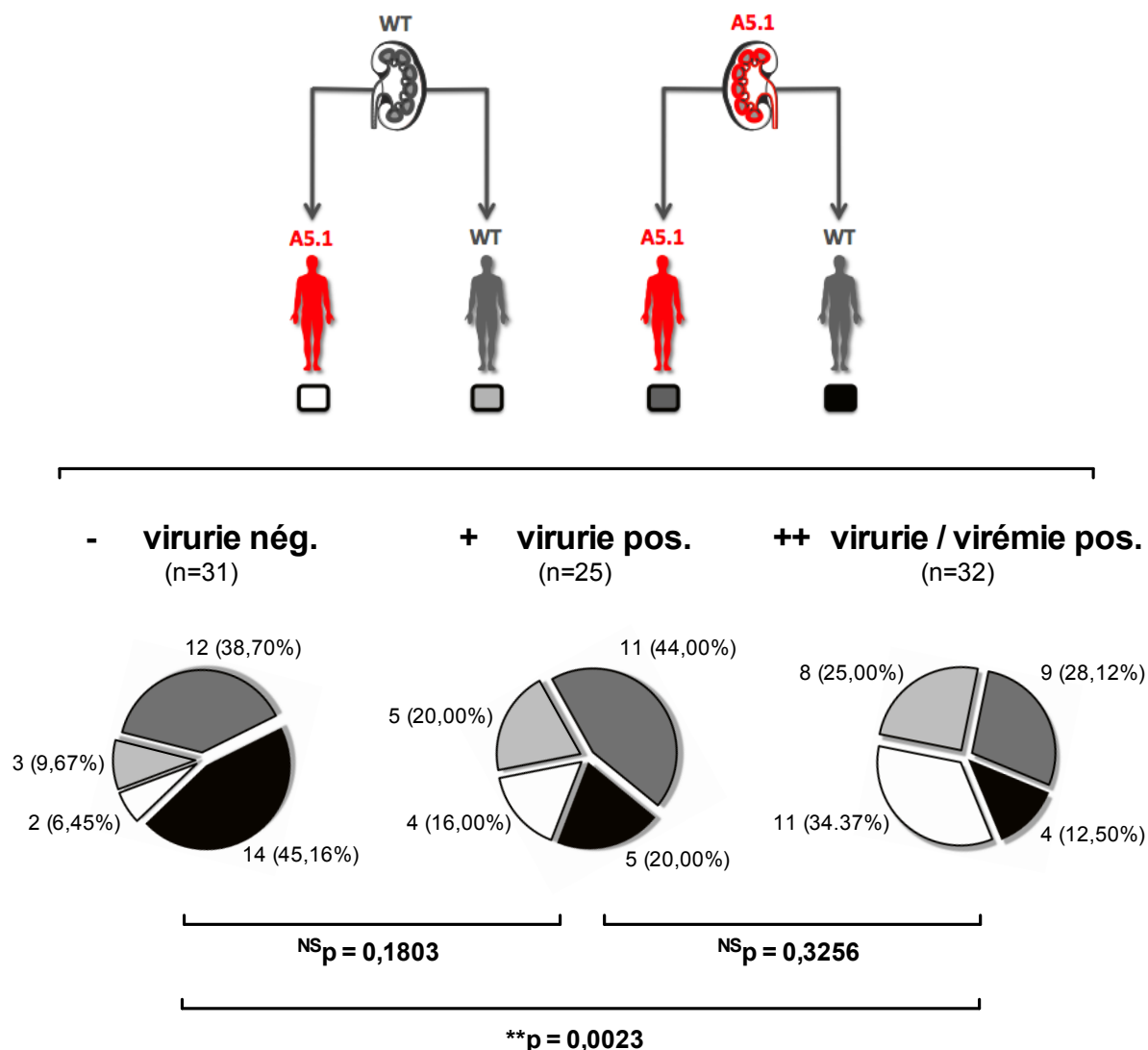


Figure 12 : Comparaison des fréquences des combinaisons D/R pour la mutation *MICA A5.1* en fonction des statuts virologiques des receveurs pour le VBK. WT=Patients homozygotes pour le gène *MICA* non muté ; A5.1=Patients homozygotes ou hétérozygotes pour la mutation *MICA A5.1*. Les analyses statistiques ont été réalisées selon le test de Pearson X^2 .

Nous observons donc un effet antagoniste, selon l'expression ou non de la mutation *MICA A5.1* par le donneur, sur le contrôle de l'infection à VBK chez le receveur. Ainsi, les effets protecteurs, par l'expression de la mutation *MICA A5.1*, et délétères, par l'expression du gène *MICA* non muté, semblent être uniquement restreints au donneur et donc indépendant de l'allèle *MICA* exprimé par le receveur. Alors comment expliquer le peu de variation entre les fréquences de la combinaison DA5.1/RA5.1 (Gris foncé) dans les différents groupes VBK « - », « + » et « ++ » (**Figure 12**) ?

Pour répondre à cette question, nous montrons ci-dessous les différentes combinaisons de génotypes possibles entre les donneurs et les receveurs (**Figure 13**).

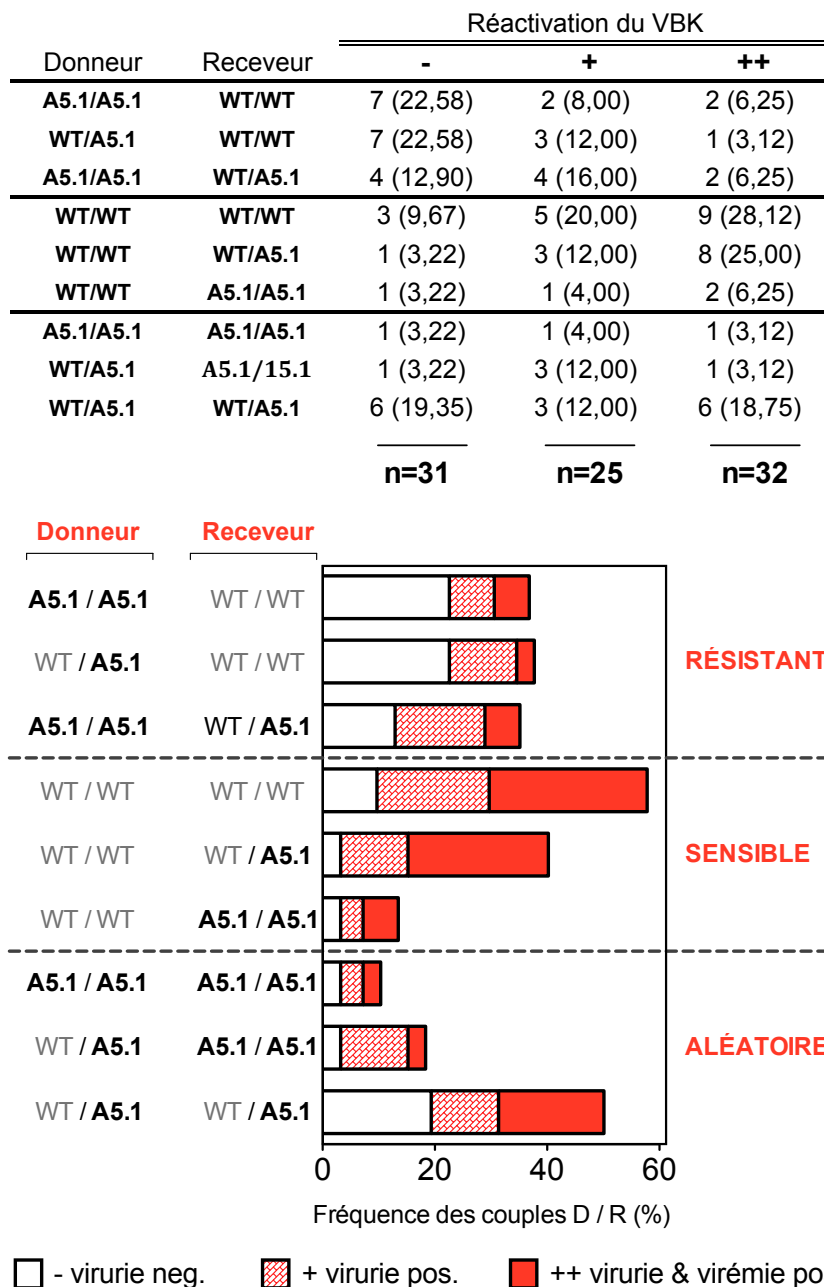


Figure 13 : Les différentes combinaisons D/R pour le gène MICA et leurs impacts sur la réactivation du VBK post-transplantation. WT/WT=Patients homozygotes pour le gène MICA non muté ; A5.1/15.1=Patients homozygotes pour la mutation *MICA* A5.1 ; WT/A5.1=Patients hétérozygotes pour la mutation *MICA* A5.1.

L'analyse des différentes combinaisons D/R pour le gène *MICA* et de leurs fréquences dans les différents groupes de patients, en fonction de leurs statuts virologiques, a permis le classement des combinaisons D/R en fonction de leur impact sur la réactivation du VBK (**Figure 13**).

Ainsi, les combinaisons « DA5.1/A5.1 // RWT/WT » ; « DWT/A5.1 // RWT/WT » et « DA5.1/A5.1 // RWT/A5.1 » sont clairement associées à une résistance quant à la réactivation du VBK post-greffe, en particulier les deux premières. Les combinaisons « DWT/WT // RWT/WT » ; « DWT/WT // RWT/A5.1 » et « DWT/WT // RA5.1/A5.1 » sont, à l'inverse, clairement associées à une plus forte susceptibilité à la réactivation du VBK post-greffe, particulièrement les deux premières combinaisons. Les combinaisons « DA5.1/A5.1 // RA5.1/A5.1 » ; « DWT/A5.1 // RA5.1/A5.1 » et « DWT/A5.1 // RWT/A5.1 » semblent, quant à elles, associées à un effet aléatoire sur la réactivation du VBK post-greffe.

Outre le fait de mettre à nouveau en évidence l'effet protecteur de l'expression de la mutation *MICA A5.1* par le greffon, cette analyse apporte un éclairage quant à l'impact du génotype *MICA* porté par le receveur sur le contrôle de l'infection au VBK. En effet, cette analyse suggère que l'association d'un donneur exprimant la mutation *A5.1* avec un receveur n'exprimant pas l'allèle muté est protectrice. A l'inverse, l'association d'un donneur exprimant un allèle de *MICA non muté* avec un receveur également exprimant un allèle non muté semble au contraire délétère. La présence de la mutation à la fois chez le donneur et le receveur est ici associée à un effet aléatoire pour la réactivation du VBK. Il y aurait donc une dichotomie dans l'impact de l'expression de *MICA WT* par le receveur, qui serait protectrice lorsque associée à un greffon *MICA A5.1* et délétère lorsque associée à un greffon *MICA WT*.

3-4 Discussion & Perspectives

Dans cette étude, nous associons de façon significative le génotype *MICA* du donneur au statut virologique du receveur pour le VBK. L'expression de la mutation *MICA A5.1* par le donneur étant associée à une absence de réactivation alors que l'expression d'un allèle non muté, à une plus forte réactivation du VBK.

L'analyse des combinaisons de génotypes *MICA* associées au couples D/R confirme le rôle protecteur de la mutation *MICA A5.1* lorsque celle-ci est exprimée par le greffon, en particulier lorsque le receveur exprime un allèle de *MICA* non muté. A l'inverse, l'expression de *MICA WT* par le greffon est associée à une plus forte sensibilité à l'encontre de l'infection au VBK, particulièrement lorsque le receveur exprime lui aussi un allèle non muté. Ici, la co-expression de la mutation *MICA A5.1* semble plutôt impacter de façon aléatoire sur la réactivation du VBK post-transplantation.

Ces résultats devront être vérifiés sur une cohorte de patients plus importante. L'augmentation de cette dernière est en cours.

L'effet protecteur de la mutation *MICA A5.1* est en accord avec les travaux de Zou et collaborateurs sur le virus du CMV (Zou et coll., J Immunol. 2005) et de Thomas et collègues sur le virus du KSV (Thomas et coll., Proc Natl Acad Sci USA. 2008) qui décrivaient l'incapacité de ces virus à contrôler l'expression de la protéine mutée. L'infection de lignées épithéliales exprimant respectivement les trois génotypes *MICA* (*WT/WT*; *WT/A5.1* et *A5.1/A5.1*) par le VBK sera réalisée dans les prochains mois afin de vérifier si un mécanisme similaire est ici mis en jeu.

Les travaux de Hüe et collègues ont mis en avant l'implication possible de l'interaction *MICA/NKG2D* dans la maturation des T CD8(+) (Hüe et coll., J Immunol. 2003). Dans la même ligne, Shafi et collaborateurs mettent en avant une surveillance par les cellules NK et T $\gamma\delta$ selon une intensité « individuelle », dépendante de l'allèle de *MICA* (Shafi et coll., Sci Transl Med. 2011). Dans une précédente étude (Article 2 du Chapitre II) nous avons montré que la mutation *MICA A5.1* était associée à une surexpression de la protéine mutée à la surface des cellules endothéliales et provoquait une plus forte activation des cellules NK dans un système de co-culture.

Aussi, une forte expression « naturelle » de MICA, dans les tissus, pourrait-elle « éduquer » les cellules effectrices NKG2D(+) à ne déclencher une activité cytotoxique qu'en présence d'une cellule cible exprimant un niveau encore plus élevé de MICA ? A l'inverse, une faible surexpression de MICA, pourrait-elle induire une forte lyse par les cellules effectrices NKG2D(+) « éduquées » avec une faible expression naturelle de MICA ? La transplantation chez de tels individus d'un organe exprimant une forte quantité naturelle de la protéine MICA (ex *MICA A5.1*) pourrait-elle induire une réponse allo-immune du receveur à l'encontre des antigènes MICA du greffon ? Mais favoriser l'élimination des cellules infectées du greffon ? Ceci pourrait donc expliquer pourquoi, dans cette étude, les receveurs *MICA WT* sont associés à une protection lorsque greffés avec un organe *A5.1* et à une susceptibilité vis à vis de l'infection au VBK lorsqu'ils reçoivent un greffon *MICA WT*.

Par ailleurs, les travaux de Jinushi et collègues ont montré un effet bénéfique de la présence d'anticorps anti-MICA chez des patients atteints de cancer (Jinushi et coll., Proc Natl Acad Sci USA. 2006 et 2008). Nos précédents travaux indiquent que les combinaisons D/R, dans cette étude les plus favorables au contrôle de la réactivation du VBK (« *DA5.1/A5.1 // RWT/WT* » et « *DWT/A5.1 // RWT/WT* ») constituent les combinaisons idéales pour la mise en place d'une allo-immunisation anti-MICA (Article 2 du chapitre II). Les anticorps anti-MICA pourraient-ils avoir un double impact sur la greffe, en signalant les cellules infectées (ex Réactivation du VBK) et provoquer leur élimination à court terme et, induisant des lésions amenant au rejet chronique, à plus long terme ? La recherche des anticorps anti-MICA dans cette cohorte de patients sera également effectuée dans les prochains mois.

CHAPITRE IV :

Identification et Caractérisation d'un Epissage Alternatif du Gène MICA

4-1 Présentation de l'étude

En plus du système HLA, d'autres systèmes antigéniques présentent un polymorphisme susceptible de jouer un rôle dans un contexte allogénique. C'est en particulier le cas des protéines MICA avec 94 allèles décrits à ce jour, répartis en 71 groupes (<http://hla.alleles.org>). La majorité de ces polymorphismes étant située dans les exons 2, 3 et 4 du gène MICA, codant pour les domaines extracellulaires ($\alpha 1$, $\alpha 2$ et $\alpha 3$). L'exon 1 codant pour le peptide « Leader », l'exon 4 pour la région transmembranaire et l'exon 6 pour la région intra-cytoplasmique. Initialement restreinte aux fibroblastes et aux cellules épithéliales, l'expression membranaire de MICA a par la suite été étendue à d'autres types cellulaires, incluant en particulier les cellules endothéliales (CE) (Zwirner et coll., Immunogenetics. 1998).

MICA est une protéine régulée par les stress cellulaires et dont la fonction est de lier le récepteur activateur NKG2D, principalement exprimé par les lymphocytes TCD8(+), $T\gamma\delta$, les cellules NK et NKT (Groh et coll., Science. 1998) (Bauer et coll., Science 1999) (Wu et coll., Science. 1999). Le signal résultant de l'interaction de MICA avec son récepteur induit, en l'absence de signaux inhibiteur, l'activation de la cellule effectrice NKG2D(+) et la lyse de la cellule cible (pour revue : Vivier et coll., Cur Op Immunol. 2002).

La protéine MICA existe également sous une forme soluble (MICAs) (Groh et coll. Nature. 2002) (Salih et coll., J Immunol. 2002). Cette forme soluble, qui correspond en structure aux domaines $\alpha 1$, 2 et 3 de MICA, résulte du clivage protéolytique de la protéine membranaire. Ce processus permet donc la régulation de la forme membranaire de MICA par le relargage d'une forme soluble. Bien que la fonction de MICAs soit encore mal connue, celle-ci semble avoir un effet antagoniste de celui de la forme membranaire. En effet, MICAs a été décrite pour induire l'internalisation de NKG2D à la surface des cellules effectrices et, par conséquent, diminuer leur activité cytolytique engagée par le récepteur NKG2D (Groh et coll., Nature. 2002).

L'épissage alternatif est un mécanisme moléculaire pouvant également permettre la régulation de la protéine « sauvage », par la synthèse d'isoformes aux propriétés parfois différentes de celles de la protéine d'origine (Blencowe, Cell. 2006). Un épissage

alternatif du ligand de NKG2D, RAET1G (ou ULBP5), a précédemment été identifié (Bacon et coll, J Immunol. 2004). Dans cette étude, les auteurs décrivent un épissage partiel de l'exon 4 du gène RAET1G, modifiant le cadre de lecture et introduisant de façon précoce un codon stop. Le transcrit alternatif obtenu code alors pour une protéine « RAET1G2 » dépourvue des domaines transmembranaires et intracytoplasmiques. La caractérisation de l'expression et de la fonction de la protéine RAET1G2 décrit une protéine relarguée sous forme soluble, avec une fonction semblable à celle décrite pour MICAs (Bacon et coll, J Immunol. 2004) (Eagle et coll., PLoS ONE. 2009). Un épissage alternatif de MICA a également été décrit par le passé (Zou et Stastny, Immunogenetics. 2002). Celui-ci consistait en une délétion totale de l'exon 3 de MICA, codant pour le domaine $\alpha 2$. Dans cette étude, la fonction de cette nouvelle isoforme de MICA n'a pas fait l'objet d'une description détaillée.

Dans cette étude, nous décrivons les événements nous ayant amené à l'identification d'un nouvel épissage alternatif de MICA. Nous apportons ici une description détaillée des différents transcrits alternatifs, des nouvelles isoformes ainsi encodées et identifions la cause probable du phénomène à l'origine de la présence de ces transcrits.

Cette partie de mon travail de thèse fait actuellement l'objet d'un dépôt de brevet. Aussi, pour respecter la confidentialité, certaines informations ne sont pas montrées.

4-2 Matériel et Méthodes

Culture primaire de Cellules Endothéliales

Une collection de Cellules Endothéliales Artérielles Humaines (HAEC) issues de donneurs d'organes (n=84) a été établie dans notre équipe. Les conditions d'amplification post-isolément et le stockage de ces cellules dans l'azote liquide ont été optimisés afin de générer un stock suffisant et permettre un nombre d'études significatives.

Les CE sont cultivées dans un milieu de croissance composé de 10 mL d'ECBM (Endothelial Cell Basal Medium) supplémenté par 10 % de SVF décomplémenté à 56°C pendant 30 min ; 4µL « Endothelial Cell Growth supplement » (ECGS)/heparin ; 0,1 ng/mL human Epidermal Growth Factor (hEGF), 1ng/mL human basic Growth Factor (hbGF) ; 1µg/mL d'hydrocortisone ; 50 ng/ml d'amphotéricine B et 50 µg/ml de gentamycine B (C-22010 ; PromoCell, Heidelberg, Germany), 2mM L-glutamine, 100U/mL pénicilline, 0,1mg/mL streptomycine (Sigma-Aldrich).

Extraction d'ARN et RT-PCR

Les ARN ont été extraits par l'utilisation de Trizol (Invitrogen) et selon les instructions préconisées par le fournisseur. La qualité des ARN a été évaluée par migration électrophorétique sur gel d'agarose dénaturant puis traités à la DNase (Ambion, Applied Biosystems, Foster city, CA). La rétrotranscription a été réalisée via l'utilisation de l'enzyme M-MLV RTase (Invitrogen) selon les instructions du fournisseur. Les séquences des amorces utilisées pour la réaction de PCR ont été obtenues par l'utilisation du logiciel « Oligo4S » et leur synthèse a été réalisée par la société « MWG » (eurofins) (Tableau 2). Les produits de PCR ont ensuite été contrôlés par migration électrophorétique sur gel d'agarose.

Gène	Amorce sens	Amorce antisens	Taille (pb)
<i>MICA</i>	5' GTCGGGGCCATGGGGCT 3'	5' TCATAGGTCAGGAACTGAGG 3'	1350

Tableau 2 : Séquences des amorces utilisées pour les réactions de PCR et taille attendue des produits amplifiés

PCR en temps réel

Plusieurs paires d'amorces, spécifiques des transcrits alternatifs, ont été synthétisées pour la quantification par SYBRTM Green. La quantification relative de l'expression de MICA est obtenue par normalisation avec le gène de ménage hypoxanthine-guanine phosphoribosyl transferase (HPRT) et un échantillon de référence selon la méthode des « 2- $\Delta\Delta C_t$ » (Livak and Schmittgen 2001) et l'utilisation du thermocycleur ABI PRISM 7700 sequence detection system (PE Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Chaque réaction a été réalisée en triplicat.

Sous-clonage

La séparation des différents produits de RT-PCR, est performée par migration électrophorétique sur gel d'agarose Low-Melting (Invitrogen) 2% à 50 V pendant 15 heures. Les bandes contenant les amplicons d'intérêts sont excisées et l'ADNc extrait selon la méthode du Phénol/Chloroforme. Les acides nucléiques précipités par de l'éthanol absolu sont culotés par centrifugation puis lavés en éthanol 70%. Le sous-clonage est réalisé à l'aide du kit StrataCloneTM PCR Cloning (Stratagene). Cinq à cinquante μ g de produit de RT-PCR purifié sont insérés dans le plasmide pSC-A (StrataCloneTM Vector). Les plasmides sont ensuite incorporés dans une souche bactérienne compétente (StratacloneTM SoloPack Competent Cells, Garden Grove, CA) par choc thermique. La sélection a été réalisée sous le couvert de l'expression des gènes de l'ampicilline et du X-Gal. Par la suite, l'extraction et la purification des plasmides ont été réalisées selon le kit (Nucleospin Plasmid Quick Pure, Macherey-Nagel, Hoerd, France).

Séquençage et analyse de l'ADN

Le séquençage a été réalisé par la plate-forme de séquençage de l'IFR 26 selon la méthode de Sanger. L'ensemble des réactions constitutives du séquençage a été réalisé avec le kit « Big Dye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit » (Applied Biosystems). L'analyse des séquences d'ADN a été réalisée via le logiciel « ChromasPro ». Ces séquences ont été alignées à la totalité des gènes référencés dans la banque de donnée en ligne « GenBank ».

Clonage et Transfection de cellules COS

Les ADNc correspondants ont été insérés dans vecteur d'expression pCMV-3Flag (Agilent Technology, CA, USA), en 5' d'un FLAG M2. Celui-ci consiste en une répétition du motif « DYKDDDDK ». La transfection des cellules COS a été réalisée avec l'utilisation de la Lipofectamine 2000 (Invitrogen, CA, USA) selon les recommandations préconisées par le fournisseur. Un vecteur vide a été utilisé en contrôle.

Cytométrie en flux

Quarante-huit heures post-transfection, les cellules COS ont été décollées par de la trypsine et lavées à trois reprises dans une solution de PBS contenant 1% de BSA et 0,1% d'azide de sodium (NaN₃) puis incubées avec 25 µl d'une solution d'anticorps anti-Flag utilisée à 10 µg/mL. La présence des isoformes est révélée par l'ajout d'un anticorps secondaire couplé à un fluorochrome (FITC). Nous avons utilisé le cytomètre de flux « FACSCanto II » (Becton Dickinson) et le logiciel d'analyse FlowJo® (Tree Star, Inc.) pour l'analyse de l'expression des différentes isoformes par les cellules COS transfectées.

Immunofluorescence

Quarante-huit heures post-transfection les cellules COS cultivées sur lame de verre sont fixées par une solution de PBS / BSA 1% puis marquées avec une solution d'anticorps anti-Flag à 10 µg/mL, pendant 15h, à 4°C. La présence des isoformes est révélée par l'ajout d'un anticorps secondaire couplé à un fluorochrome (FITC). Le microscopie à fluorescence Nikon Diaphot microscope (Nikon, Tokyo, Japan) a été utilisé pour la capture d'image. Les images ont ensuite été analysées avec le logiciel de traitement d'image ImageJ (U.S. National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA).

4-3 Résultats

Identification et caractérisation de transcrits alternatifs de MICA.

Par l'analyse de l'impact du polymorphisme génétique sur la transcription du gène MICA, réalisée sur des cultures de CE isolées à partir de donneurs d'organes par RT-PCR, nous avons mis en évidence la présence de transcrits supplémentaires, 4 bandes de poids moléculaires inférieurs au transcrit sauvage (1300pb), chez 2 individus parmi les 84 testés (**Figure 1A**).

Dans le but de caractériser les différents transcrits de MICA, les produits de RT-PCR obtenus à partir des CE ont été séparés et purifiés à partir de l'excision des bandes alternes sur gel d'agarose. Ces derniers ont été amplifiés par sous-clonage puis séquencés (**Figure 1B**). L'analyse des séquences a permis de caractériser les délétions présentes dans les transcrits additionnels de MICA (A, B, C et D) schématisées dans la **Figure 1C**.

L'analyse des séquences nucléotidiques révèle, pour les quatre transcrits alternatifs, une délétion totale ou partielle d'un ou plusieurs exons. En effet, l'ADNc correspondant au transcrit alternatif de MICA noté « A » se caractérise par la délétion de 280 nucléotides en 5' de l'exon 3 et d'une Guanine en 3' de l'exon 4 ($\Delta 5'Ex3$; $G3'Ex4$). La séquence d'ADNc correspondant au transcrit alternatif noté « B » se caractérise par la délétion de 138 nucléotides en 5' de l'exon 3 et de 164 en 3' de l'Exon 4 ($\Delta 5'Ex3$; $3'Ex4$), soit 302 nucléotides. L'ADNc associé au transcrit alternatif noté « C » est caractérisé par la délétion de 138 nucléotides en 5' de l'exon 3 et par la délétion totale de l'Exon 4 ($\Delta 5'Ex3 - Ex4$), soit une délétion totale de 417 nucléotides. La séquence nucléotidique de l'ADNc correspondant au plus petit transcrit alternatif de MICA noté « D » est caractérisée par une délétion totale des exons 3 et 4 ($\Delta Ex3 - Ex4$), soit de 566 nucléotides. De plus, ces délétions ont pour conséquence le décalage du cadre de lecture (ORF) pour les transcrits « A, B, C » (*), ce qui n'est pas le cas pour le transcrit alternatif noté « D ».

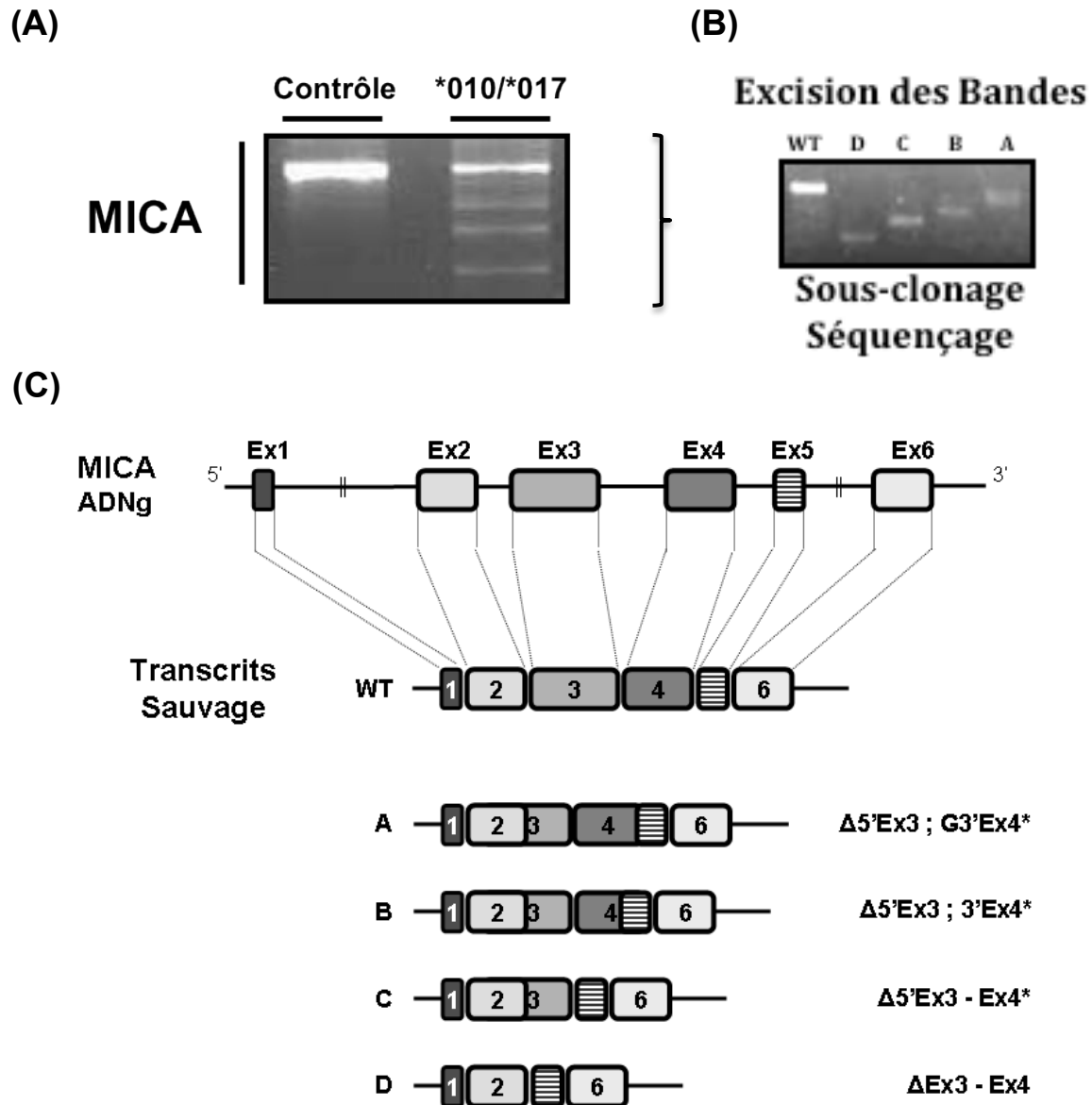


Figure 14 : Mise en évidence et caractérisation des transcrits alternatifs de MICA. (A)Après extraction des ARN au Trizol, traitement à la DNase et Transcription inverse, les ADNc ainsi obtenus sont amplifiés par PCR au moyen d'amorces spécifiques de MICA. Les produits de PCR provenant d'une cellule contrôle et d'une cellule présentant le polymorphisme génétique MICA *010/*017 sont ensuite contrôlés par migration électrophorétique sur gel d'agarose 1%. (B) Excision et sous-clonage de chaque transcrit alternatif de MICA. Les produits de RT-PCR excisés ont été amplifiés par sous-clonage. (C) Séquençage et analyse des séquences de chaque transcrit alternatif. Représentation schématique des transcrits alternatifs de MICA. Cinq transcrits différents ont été identifiés : Un transcrit noté « WT » correspondant au transcrit sauvage de MICA et quatre transcrits additionnels notés A, B, C et D.

Identification d'une mutation au niveau de l'intron 4 pouvant être la cause de l'altération de l'épissage de MICA

Nous avons mis en évidence la présence de ces transcrits alternatifs chez 2 patients sur 84 analysés (2,38%). L'analyse du génotype MICA de ces 2 individus révèle que ces deux individus sont porteurs, de façon hétérozygote, de l'allèle rare MICA*017 (génotype *MICA**010/*017 pour le premier (EC #1) et *MICA**018/*017 pour le second (EC #2)). L'analyse des polymorphismes des transcrits alternatifs et des transcrits WT présents dans ces deux cellules révèle que les transcrits alternes proviennent tous de l'épissage de l'allèle *MICA**017, les transcrits WT provenant de la transcription des autres allèles ; *MICA**010 pour le premier individu et *MICA**002 pour le second (**Figure 15A**).

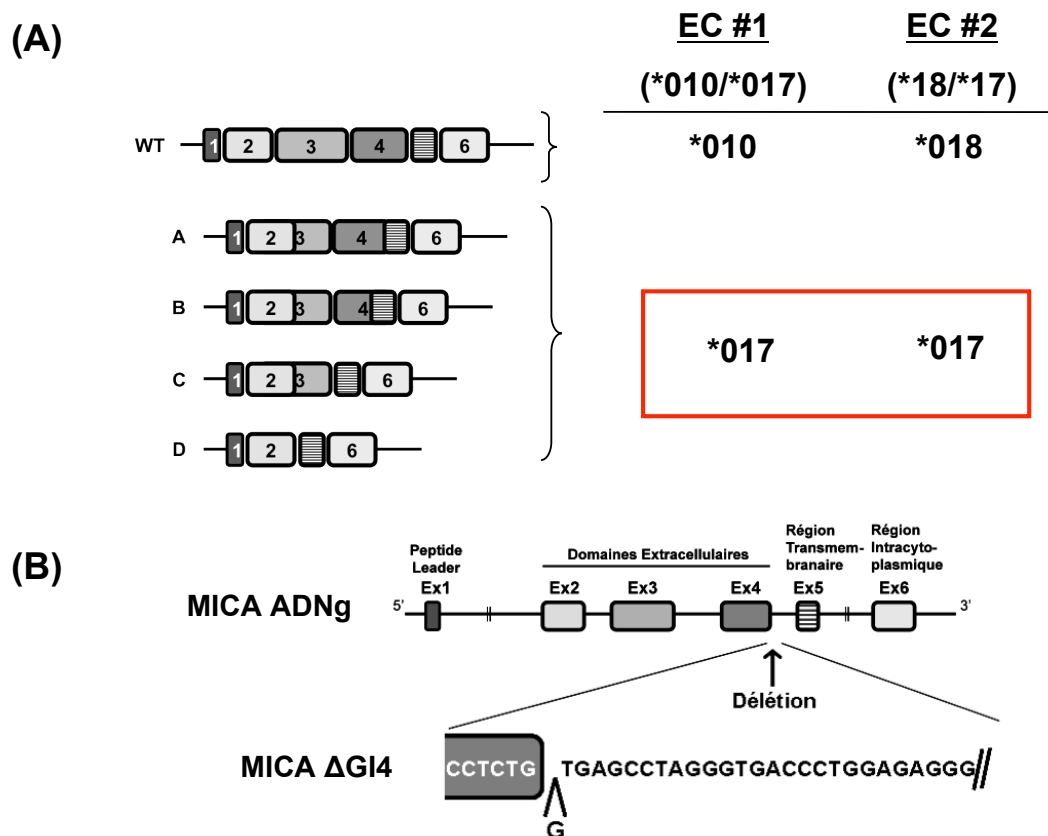


Figure 15 : Association entre la présence des transcrits alternatifs et l'allèle MICA*017 (A), identification de la délétion d'une guanine en 5' de l'intron 4 (B)

La première description de l'allèle *MICA*017* fut réalisée par Obuchi et collaborateurs. Ils décrivaient alors cet allèle comme porteur de la délétion d'une guanine en 3' de l'exon 4, entraînant une modification de l'ORF et l'introduction précoce d'un codon stop. Par analogie, la séquence protéique prédite devait comporter une répétition de 12 leucines dans le domaine transmembranaire (Obuchi et coll., Tissue Antigens. 2001). Cependant, par l'analyse de l'ADN génomique correspondant à l'allèle *MICA*017*, nous observons également la délétion d'une guanine mais ne pouvons définir s'il s'agit du G situé en 5' de l'exon 4 ou celui situé en 3' de l'intron 4 (**Figure 15B**). Cette dernière possibilité pourrait aisément expliquer l'altération de l'épissage associé à l'allèle *MICA*017*, les régions 5' et 3' des introns étant des zones critiques pour le processus d'épissage (Blencowe, Cell. 2006). Nous proposons donc la dénomination de « Δ GI4 » (Délétion d'une guanine en 5' de l'intron 4) pour qualifier les cellules exprimant ces transcrits alternatifs de MICA. En effet, d'après le dernier recensement des différents allèles de *MICA*. Cette mutation pourrait être associée, non seulement à l'allèle *MICA*017*, mais également aux allèles *MICA*015* et **068* (<http://hla.alleles.org>)

Quantification des transcrits alternatifs par RT-PCR quantitative.

Par la synthèse de paires d'amorces spécifiques de chacun des transcrits (mis à part pour le transcrit MICA-A qui ne peut être différencié des transcrits B et C), nous avons quantifié le taux d'expression des différents transcrits par RT-PCR quantitative dans les deux CE associées aux transcrits alternatifs et l'avons comparé à un groupe de CE contrôles (**Figure 16**).

Nos résultats révèlent des taux de transcrits alternatifs A, B, C et D significativement plus importants dans les CE hétérozygotes pour l'allèle *MICA*017*, par comparaison à un groupe de CE contrôles. Pour tous les transcrits alternatifs, leur détection est inexistante dans le groupe contrôle sauf pour le transcrit MICA-D qui semble être détecté dans les CE contrôles, bien qu'en quantité nettement inférieure.

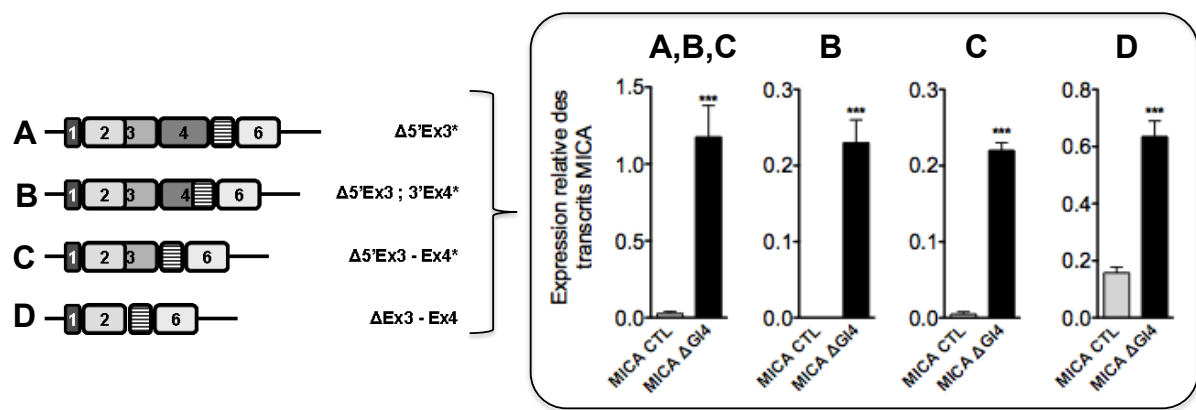


Figure 16 : Quantification des transcrits alternatifs de MICA par RT-qPCR. La quantification des transcrits a été réalisée sur des produits de RT-PCR à l'aide d'amorces spécifiques au moyen de la technologie SYBR™ Green. Le groupe de CE contrôles (CTL) comprend n=6 CE. Le groupe MICAΔG14 comprend les deux CE *MICA*017*. L'analyse statistique a été réalisée selon le T test de Student.

Description des séquences prédites en acides aminés.

Les séquences en acides aminés déduites de ces nouvelles séquences nucléotidiques pour les différents transcrits alternatifs sont schématisées en **Figure 17**. Pour les isoformes MICA-A, -B, et -C, la modification du cadre de lecture intervient après l'exon 2 et conduit à une protéine où seul le domaine alpha 1 de MICA est conservé. Dans le cas de MICA-B les domaines extracellulaires alpha 2 et 3 sont perdus mais cette isoforme conserve son domaine alpha 1, son domaine transmembranaire et intracellulaire. L'isoforme MICA-D correspond, quant à elle, à une forme de MICA tronquée avec un domaine extracellulaire unique (alpha1).

1	MGLGPVFLLLAGIFFFAPPGAAAEPHSLRYNLTVLSWDGVSQSGFLTEVHLDGQPFRLCDRQKCRAPQG
WT	MGLGPVFLLLAGIFFFAPPGAAAEPHSLRYNLTVLSWDGVSQSGFLAEVHLDGQPFRLYDRQKCRAPQG
ΔA	MGLGPVFLLLAGIFFFAPPGAAAEPHSLRYNLTVLSGDGVSQSGFLAEVHLDGQPFRLCDRQKCRAPQG
ΔB	MGLGPVFLLLAGIFFFAPPGAAAEPHSLRYNLTVLSWDGVSQSGFLTEVHLDGQPFRLCDRQKCRAPQG
ΔC	MGLGPVFLLLAGIFFFAPPGAAAEPHSLRYNLTVLSWDGVSQSGFLTEVHLDGQPFRLCDRQKCRAPQG
ΔD	MGLGPVFLLLAGIFFFAPPGAAAEPHSLRYNLTVLSWDGVSQSGFLTEVHLDGQPFRLCDRQKCRAPQG
71	QWAEDVLGNKTWDRETRDLTGNGKDLRMTLAHIKDQKEGLHSLQEIRVCEIHEDNSTRSSQHFFYYDGELF
WT	QWAEDVLGNKTWDRETRDLTGNGKDLRMTLAHIKDQKEGLHSLQEIRVCEIHEDNSTRSSQHFFYYDGELF
ΔA	QWAEDVLGNKTWDRETRDLTGNGKDLRMTLAHIKDQKE-----
ΔB	QWAEDVLGNKTWDRETRDLTGNGKDLRMTLAHIKDQKE-----
ΔC	QWAEDVLGNKTWDRETRDLTGNGKDLRMTLAHIKDQKE-----
ΔD	QWAEDVLGNKTWDRETRDLTGNGKDLRMTLAHIKDQKE-----
141	LSQNLETKENTVPQSSRAQTLAMNVRNFKEDAMKTKTHYHAMHADCLQELRRYLKSGVVLRRTVPPMVN
WT	LSQNLETKENTVPQSSRAQTLAMNVRNFKEDAMKTKTHYHAMHADCLQELRRYLESSVVLRRTVPPMVN
ΔA	-----VLQSSDLGHERQEFLEGRCHEDQDTLSRYACRLPAGTTAISKIRRSPEENSAPHGE
ΔB	-----VLQSSDLGHERQEFLEGRCHEDQDTLSRYACRLPAGTTAISKIRRSPEENSAPHGE
ΔC	-----VLQSSDLGHERQEFLEGRCHEDQDTLSRYACRLPAGTTAISKIRRSPEEN-----
ΔD	-----
211	VTRSEASEGNITVTCRASGFYPWNITLSWRQDGVLSHDTQQWGDVLPDGNQTYQTWVATRICQGEEQRF
WT	VTRSEASEGNITVTCRASGFYPWNITLSWRQDGVLSHDTQQWGDVLPDGNQTYQTWVATRICQGEEQRF
ΔA	CHPQRGLRGQHYRDMQGFWLLSLEYHTELASGWFIFEPHFAVGGCPA*
ΔB	CHPQRGLRGQHYRDMQGFWLLSLEYHTELASGW-----
ΔC	-----
ΔD	-----
281	TCYMEHSGNHSTHPVPSGKVLVLQSHWQTFHVSAAAA-----IFVIIIFYVRCCKKKKTSAAEGPELV
WT	TCYMEHSGNHSTHPVPSGKVLVLQSHWQTFHVSAAAA-----IFVIIIFYVRCCKKKKTSAAEGPELV
ΔA	-----
ΔB	-----GKVLVLQSHWQTFHVSAAAAAAIFVIIIFYVRCCKKKKTSAAEGPELV
ΔC	-----RESAGASESLADIPCFCCCCCCCCCYFCYYFLRLLL*
ΔD	-----GKVLVLQSHWQTFHVSAAAAAAIFVIIIFYVRCCKKKKTSAAEGPELV
361	SLQVLDQHPVGTSDHRDATQLGFQPLMSDLGSTGSTEGA*
WT	SLQVLDQHPVGTSDHRDATQLGFQPLMSALGSTGSTEGA*
ΔA	SLQVLDQHPVGTSDHRDATQLGFQPLMSDLGSTGSTEGA*
ΔB	SLQVLDQHPVGTSDHRDATQLGFQPLMSDLGSTGSTEGA*
ΔC	SLQVLDQHPVGTSDHRDATQLGFQPLMSDLGSTGSTEGA*
ΔD	SLQVLDQHPVGTSDHRDATQLGFQPLMSDLGSTGSTEGA*

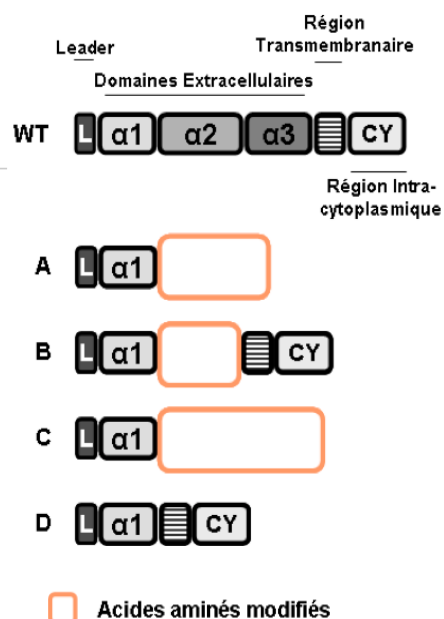


Figure 17 : Alignement & Représentation schématique de la prédiction des séquences en acides aminés codées par les différents transcrits alternatifs de MICA

Clonage et expression de chacune des isoformes de MICA.

Les différentes isoformes de MICA, résultant de l'épissage alternatif de l'allèle *MICA*017*, ont été clonées dans un vecteur d'expression. Des cellules COS ont ensuite été transfectées et les différentes protéines de fusion ont été détectées par FACS et Immunofluorescence, via le marquage intracellulaire des isoformes avec un anticorps anti-FLAG spécifique (**Figure 18**).

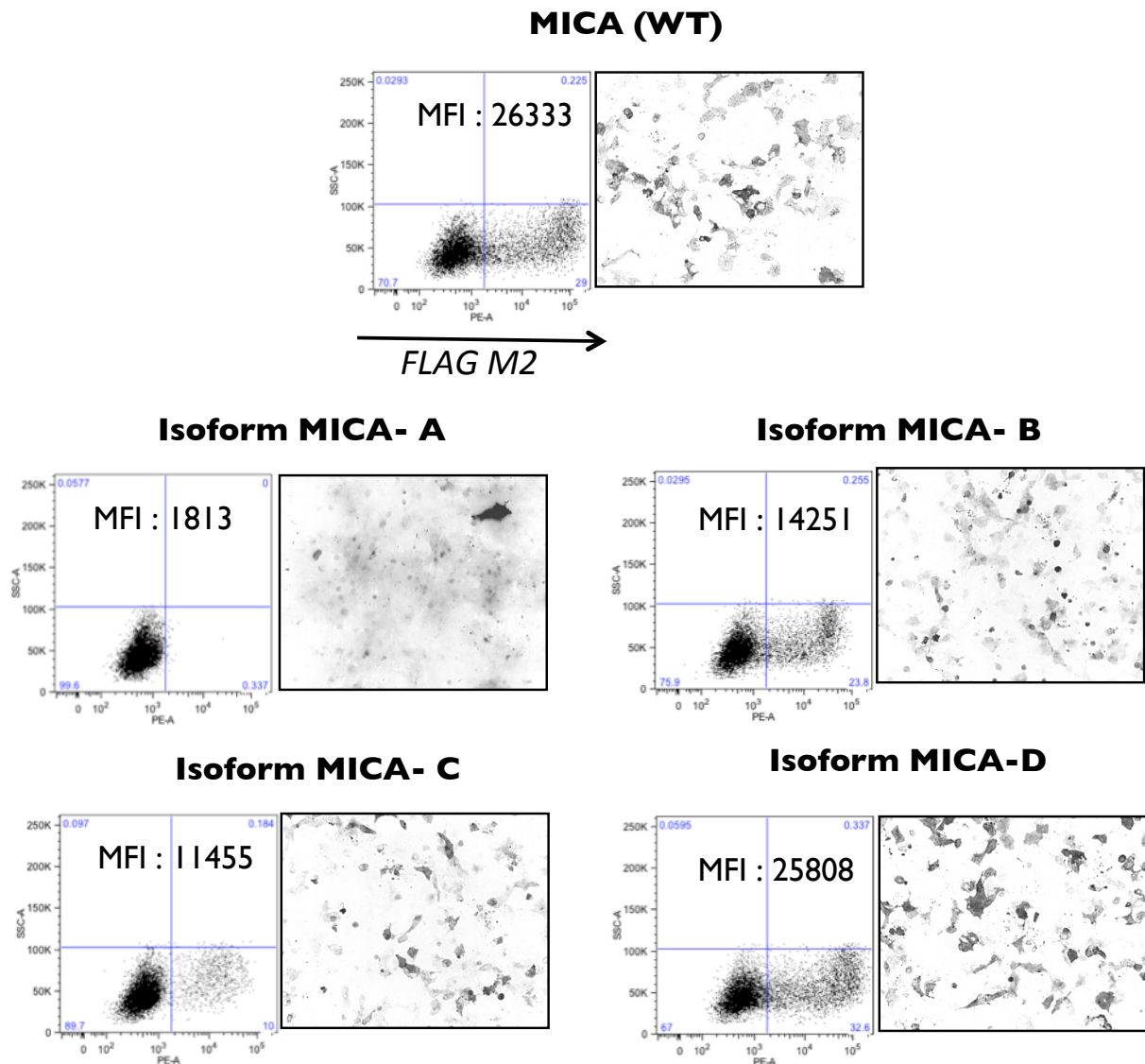


Figure 18 : Détection des différentes isoformes de MICA par FACS (Image de gauche) et par immunofluorescence (Image de droite) après la transfection de cellules COS. Les protéines de fusion correspondant aux différentes isoformes ont été détectées par un anticorps anti-FLAG spécifique. Le marquage par immunofluorescence résulte du marquage secondaire des anticorps anti-FLAG avec un anticorps anti-IgG de souris couplé à un fluorochrome (FITC). Les cellules positives apparaissent en noir. Travail réalisé par Pierre-Jean Gavlovsky, étudiant en première année de thèse.

La détection spécifique des différentes isoformes par immuno-fluorescence révèle un marquage positif pour les protéines WT (MICA*018) et les isoformes MICA-B ; -C et -D, avec une intensité de fluorescence plus importante pour les protéines WT et MICA-D. La détection des protéines par FACS confirme une absence de synthèse de l'isoforme MICA-A par comparaison aux autres isoformes et à la protéine sauvage. Les valeurs de MFI obtenues confirment une plus forte expression des protéines WT et MICA-D et suggèrent une stabilité plus importante de ces dernières (**Figure 18**).

4-4 Discussion et Perspectives

Dans cette étude, nous apportons la première description des ces transcrits alternatifs de MICA. Après analyse des séquences nous observons que ces transcrits alternatifs résultent de l'épissage de l'allèle *MICA*017*, retrouvé chez 2,38% des patients composant notre cohorte de donneurs. Cet allèle avait initialement été décrit pour porter une mutation, la délétion d'une guanine, en 3' de l'exon 4 (Obuchi et coll., Tissue Antigens. 2001). Le séquençage de l'ADN génomique des patients de notre cohorte, portant cet allèle confirme la présence de la mutation, mais suggère un décalage de la position de celle-ci par rapport à la première description réalisée par Obuchi et collègues. Ainsi, nous proposons que la guanine délétée serait située en 5' de l'intron 4 et non en 3' de l'exon 4. Le positionnement de cette mutation, dans une zone intronique critique pour les mécanismes d'épissage, pourrait alors expliquer la présence des transcrits alternatifs et l'absence du transcrit sauvage associé à l'allèle *MICA*017*.

La recherche de cette délétion est en cours dans une cohorte plus importante de patients. L'association de la mutation avec l'allèle *MICA*017* et la présence des transcrits alternatifs devra être confirmée. La délétion initialement décrite par Obuchi et collègues avait été associée également à l'allèle **015* puis étendue à l'allèle **068*. La présence de transcrits alternatifs de MICA devra être recherchée chez les individus porteurs de ces allèles.

Nous décrivons la présence des transcrits alternatifs de MICA dans des cultures primaires de CE. La contribution du type cellulaire sur la synthèse de ces transcrits devra être vérifiée. Nous recherchons actuellement à collecter d'autres échantillons biologiques provenant des donneurs déjà identifiés afin de vérifier la présence des transcrits alternatifs dans d'autres types cellulaires (PBMC, monocytes, macrophages...).

La caractérisation de la fréquence des allèles *MICA*015*, **017* et **068* dans une population de donneurs sains pourra être étendue à certaines population pathologiques. En effet, il existe un déséquilibre de liaison associant les gènes *MICA* et *HLA-B* (Grimaldi et coll., Hum Immunol. 1996) (Fodil et coll., Immunogenetics. 1999). De façon intéressante, les allèles *MICA*015* et **017* ont été décrits pour être associés à l'allèle *HLA-B57*, un allèle particulièrement étudié pour son implication dans les mécanismes

d'immunité anti-virale. En effet, cet allèle rare a été très clairement associé à la population, non moins rare, d'« elite controllers » ou les patients contrôlant de façon innée la réplication du virus du VIH (Zaunders et coll., Curr Opin HIV AIDS. 2011).

Les ADNc codant pour les différents transcrits alternatifs de MICA ont été clonés dans un vecteur d'expression. La caractérisation biochimique des différentes isoformes résultant de la transfection de cellules COS est en cours. La localisation cellulaire des différentes isoformes sera réalisée et la possibilité de leur relargage sous une forme soluble vérifiée.

L'interaction entre les protéines MICA et le récepteur NKG2D agit comme un signal majeur déclenchant l'activation ou la co-activation des cellules effectrices NKG2D(+). MICA et NKG2D sont donc des cibles particulièrement importantes pour des approches d'immunothérapie dans les domaines de la cancérologie et de la virologie en particulier. L'impact de l'expression de ces isoformes sur le récepteur NKG2D devra donc être déterminé. Des co-cultures entre les cellules transfectées, exprimant les différentes isoformes, et des cellules NK sont actuellement en cours afin d'évaluer le rôle de chacune de ces isoformes sur l'activation NK (Travail réalisé par Pierre-Jean Gavlovsky, étudiant en première année de thèse).

Enfin, la synthèse d'anticorps spécifiques de chacune de ces isoformes est envisagée à moyen terme. Ces anticorps seront alors des outils uniques et nécessaires pour la caractérisation plus poussée des isoformes et de leur(s) impact(s) sur les mécanismes de l'immunité.

CHAPITRE V :

Le projet proVasc : Identification de molécules
et extraits d'origine végétale pour leurs
propriétés antioxydantes, anti- inflammatoires
et anti-AGE

5-1 Présentation de l'étude

L'inflammation, le stress oxydant et les AGE (Advanced Glycation End-products) jouent un rôle primordial dans les mécanismes de la dysfonction endothéliale et sont impliqués dans de nombreuses pathologies cardio-vasculaires.

Le but du projet proVasc (acronyme de « protection vasculaire ») est d'identifier de nouvelles molécules et extraits d'origine végétale pour leurs propriétés anti-inflammatoires, anti-oxydantes et/ou anti-AGEs. Le potentiel thérapeutique des meilleures molécules et extraits identifiés sera par la suite testé pour des maladies telles que le diabète, l'hypertension artérielle, le cancer ou le rejet de greffe. Ce réseau coordonné par le professeur Pierre Pacaud de l'INSERM UMR915, de l'Université de Nantes, s'organise autour de différents acteurs académiques et industriels, d'horizons et de compétences différents.

A travers le réseau proVasc notre objectif a été de mettre au point des tests, sur les CE, permettant de cribler un très grand nombre de molécules et extraits d'origines végétales pour leurs propriétés anti-inflammatoires et/ou anti-AGEs.

Pour la détection des propriétés anti-inflammatoires, nous avons utilisé la technique d'ELISA cellulaire pour mesurer et comparer l'expression membranaire induite de la molécule d'adhésion VCAM-1 en présence ou en absence de molécules chimiques ou d'extraits végétaux.

En effet, la molécule VCAM-1 n'est pas exprimée par la cellule endothéliale (CE) à l'état basal mais est induite par un traitement au TNF α pendant 6 heures aboutissant, via la voie de signalisation NF κ B, à l'activation de la CE. La voie d'activation utilisant le facteur de transcription NF κ B étant la voie intervenant majoritairement dans les mécanismes d'inflammation et de stress oxydatif (Poher et Sessa, Nat Rev Immunol. 2007). Nous testons donc la capacité des molécules chimiques/extraits végétaux à inhiber, de façon dose dépendante, la voie de signalisation NF κ B. Notre inhibiteur de référence étant l'Ammonium pyrrolidinedithiocarbamate (PDTC).

Nous réalisons en parallèle un test de viabilité cellulaire par MTT (bromure de 3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-2,5-diphényl tétrazolium), permettant de mesurer, de façon dose dépendante, la toxicité des molécules chimiques/extraits végétaux testés.

Pour la détection des propriétés anti-AGE, nous avons mis au point un test de viabilité cellulaire par MTT afin de mesurer et comparer la mortalité cellulaire induite par la formation d'AGE sur des cultures de CE prétraitées ou non avec une dose réponse de molécules/extraits végétaux. Nous utilisons ici l'alpha-oxoaldéhyde GLYOXAL comme inducteur d'AGE. Son introduction dans le milieu de culture des CE aboutissant à une mortalité cellulaire de 80% après 15h de traitement.

5-2 Mise au point d'un test pour la détection des propriétés anti-inflammatoires et anti-oxydantes

Ce test s'articule autour de la capacité qu'ont les CE à synthétiser des molécules d'adhésion en réponse à certains stimuli, tels que les cytokines proinflammatoires ou les médiateurs du stress oxydatif. Le déterminant commun de tous ces stimuli est l'activation du facteur de transcription NFkB (Nuclear Factor-kappa B) (Poher et Sessa, Nat Rev Immunol. 2007) (Csiszar et coll., J Appl Physiol. 2008). L'activation de la voie NFkB dans la CE déclenche alors la synthèse de protéines impliquées dans diverses fonctions de l'endothélium, notamment les protéines impliquées dans l'adhésion des leucocytes (VCAM1, E-selectines...). Notre objectif était donc de mettre au point un test pour la détection de nouvelles molécules ou extraits d'origine végétale capables de bloquer/inhiber l'activation endothéliale induite par un activateur de la voie NFkB. Ce test se voulait rapide et simple dans la mise en œuvre, puisqu'un grand nombre de molécules et extraits doivent être testés.

Comparaison du TNF α et du LPS pour leur capacité à induire l'expression de VCAM1 à la surface des CE

Nous avons, dans un premier temps, comparé deux types de stimuli différents (TNF α et LPS) pour leur capacité à induire l'expression de VCAM1 par cytométrie en flux (**Figure 19**). Les résultats obtenus mettent en évidence un effet dose réponse du TNF α sur l'induction membranaire de la molécule d'adhésion VCAM1 par les CE. Cependant aucun effet du LPS n'a été observé sur VCAM1, après 6h de traitement. A ce stade, nous avons retenu le TNF α comme notre molécule de référence pour stimuler l'expression de VCAM1 par les CE.

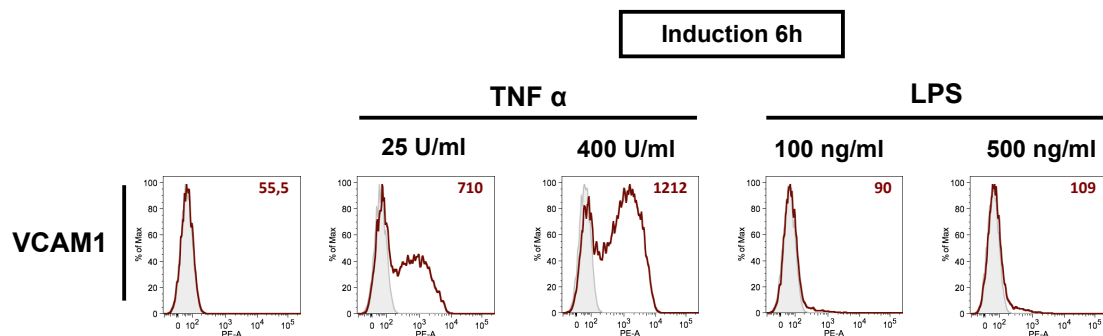


Figure 19 : Détection de l'expression de VCAM-1 à la surface des CE par cytométrie de flux, après traitement par TNF α ou LPS. Les CE ont été traitées durant 6h par des doses croissantes de TNF α (25 et 400U/ml) ou de LPS (100 et 500ng/ml).

Détection de l'expression induite de VCAM1 à la surface des CE par ELISA cellulaire.

Nous avons cherché à reproduire les résultats obtenus avec le TNF α , mais cette fois-ci en utilisant la technique d'ELISA cellulaire moins sensible mais dont la facilité de mise en oeuvre suggère une capacité de criblage plus importante que la cytométrie de flux (Bishop et coll., Biotechniques. 1992) (Charreau et coll., Transplantation. 2000).

Par cette technique, nous avons testé les effets d'une dose réponse de TNF α et deux temps d'activation, 6 et 15 h sur l'induction de VCAM1 membranaire (**Figure 20**).

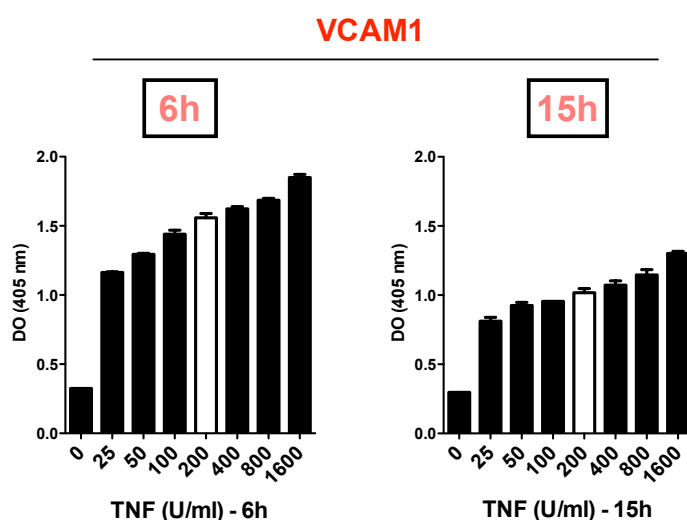


Figure 20 : Comparaison des effets d'une dose réponse et du temps d'incubation sur l'induction de VCAM1 par le TNF α . Les CE ont été traitées durant 6 à 15h par des doses croissantes de TNF α (25 à 1600U/ml). L'expression de VCAM1 est mesurée par densité optique (DO). L'histogramme blanc correspond à la concentration de TNF α retenue pour le criblage.

Ces résultats montrent un effet dose-réponse du TNF α sur l'induction de l'expression de VCAM1 par les CE. La mise en évidence, par la suite, d'un effet, même faible, des molécules ou extraits végétaux sur l'inhibition de VCAM1 induit par le TNF α , nécessite le choix d'une condition expérimentale permettant la meilleure induction de VCAM1 pour une concentration « raisonnable » de TNF α . Dans cette optique, nous avons choisi de retenir un temps d'activation de 6h et une concentration en TNF α de 200 U/ml (Histogramme blanc).

Recherche d'une molécule de référence pour l'inhibition de l'expression de VCAM1 induite par le TNF α .

Trois molécules ont été testées et comparées pour leur capacité à inhiber l'expression de VCAM1 induite par le TNF α . Le TEMPOL (4-Hydroxy-TEMPO) est un nitroxyde ayant des propriétés anti-oxydantes (Wilcox, Pharmacol Ther. 2010). Le dérivé synthétique de la cystéine NAC (N-acétylcystéine) a également été décrit pour ses propriétés anti-oxydantes (Coombes et Fassett, Kidney Int. 2012) tout comme le PDTC (pyrrolidine dithiocarbamate) qui est un inhibiteur de la voie NF κ B reconnu (Schreck etc coll., J Exp Med. 1992). Les CE ont été pré-traitées durant une heure avec diverses concentrations de ces trois molécules puis traitées pendant 6h avec 400U/ml de TNF α . L'expression de VCAM1 a ensuite été mesurée par ELISA cellulaire (**Figure 21A**). Un test de viabilité cellulaire par MTT a été réalisé en parallèle afin d'écarter tout effet apparent sur l'expression du VCAM1 en réalité dû à une toxicité de la molécule testée (**Figure 21B**).

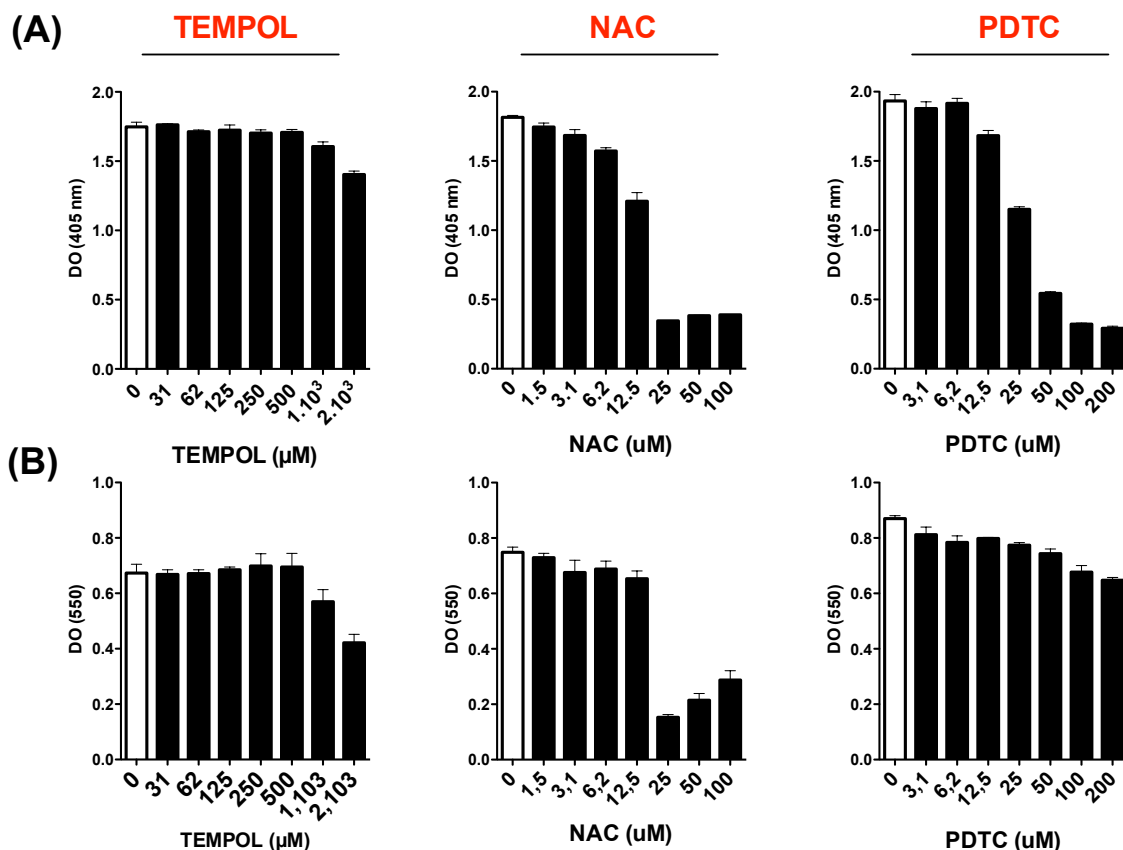


Figure 21 : Effets des anti-oxydants TEMPOL, NAC et PDTC sur l'inhibition de l'expression de VCAM induite par le TNF. (A) Les CE ont été pré-traitées pendant une heure avec les différents anti-oxydants. Du TNF α a ensuite été ajouté au milieu de culture pour une concentration finale de 200U/ml. Après 6h d'incubation, les CE ont été fixées et l'expression de VCAM1 mesurée par ELISA cellulaire. (B) Un test de viabilité cellulaire par MTT a été réalisé en parallèle afin de mesurer la toxicité relative à chacun des inhibiteurs hypothétiques testés.

Les effets sur l'inhibition de l'expression de VCAM observés ici avec le TEMPOL et NAC ne résultent que de la toxicité de ces deux molécules, à partir de 1mM pour le TEMPOL et de 25mg/ml pour NAC. Cependant, nous observons une très forte inhibition de l'expression induite de VCAM1 par le PDTC, pour une toxicité très faible. Le PDTC est donc retenu comme inhibiteur de référence et sera utilisé à une concentration de 100 μ M.

Criblage d'une collection d'extraits végétaux et de molécules purifiées d'origine végétale.

Toutes les molécules et extraits testés ici sont des molécules et extraits originaux d'origine végétale, sélectionnés sur des critères pharmaco-ethnologiques et/ou par une utilisation ancestrale de la plante d'origine à des fin thérapeutiques.

A ce jour, nous avons testé **90 extraits** et **72 molécules purifiées**. Un exemple représentatif des résultats de notre test pour la détection des propriétés anti-inflammatoires/oxydantes est présenté en **Figure 22**.

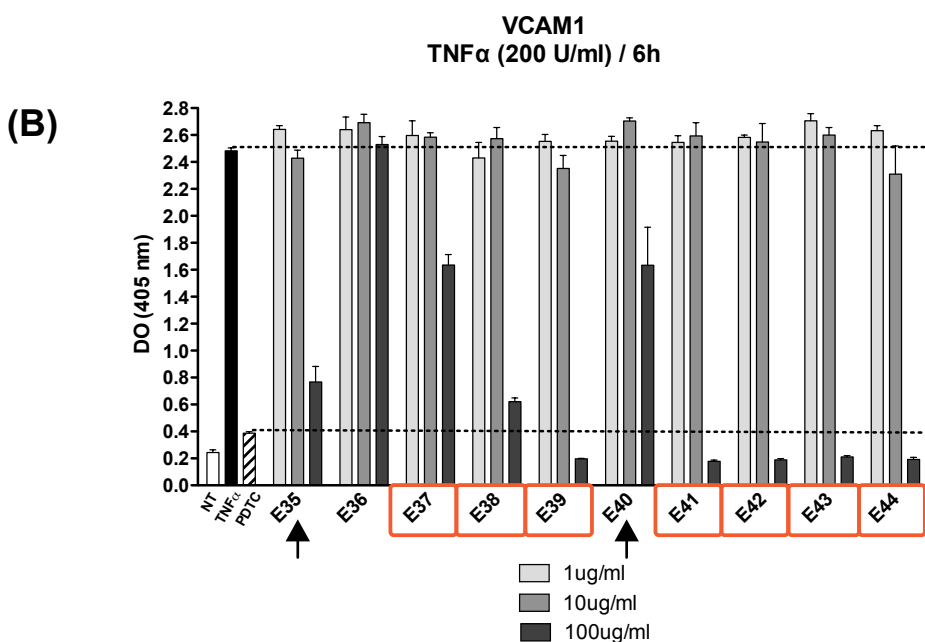
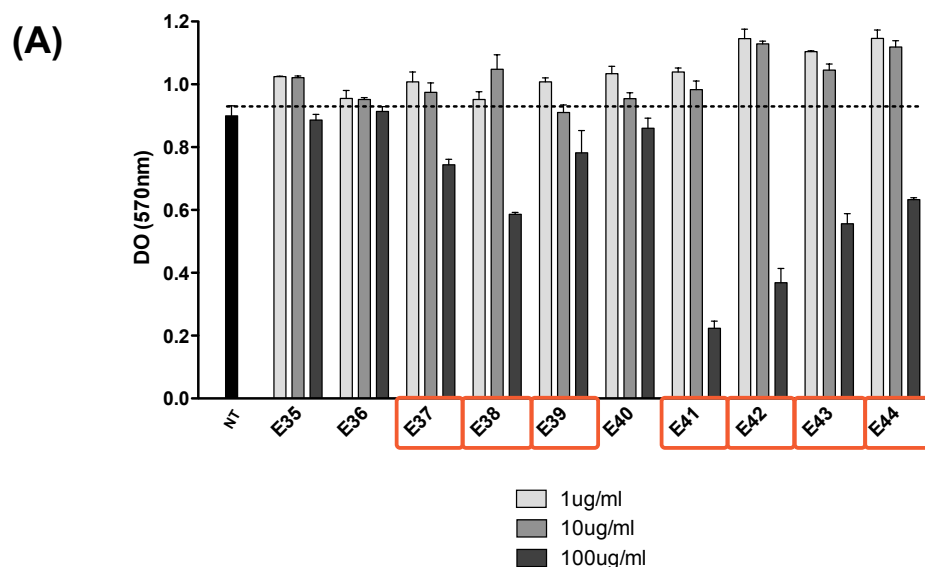


Figure 22 : Exemple représentatif des résultats obtenus par le test pour la détection des propriétés antioxydantes/inflammatoires. (A) Test de viabilité cellulaire au MTT. Les extraits présentant une toxicité sont encadrés en rouge. (B) Test d'inhibition de l'expression induite de VCAM1 à la surface des CE. Les CE ont été pré-traitées pendant une heure avec les différents extraits végétaux. Du TNF α a ensuite été ajouté au milieu de culture pour une concentration finale de 200U/ml. Après 6h d'incubation, les CE ont été fixées et l'expression de VCAM1 mesurée par ELISA cellulaire. Les flèches désignent les extraits, non toxiques, présentant un potentiel d'inhibition de l'expression de VCAM1 induite par le TNF α (E35 et E40).

La **Figure 22** représente une série de résultats, représentatifs, des résultats obtenus avec ces tests. Le test de viabilité cellulaire par MTT révèle une toxicité relative des extraits E37 à E39 et E41 à E44, lorsque utilisés à une concentration de 100ug/ml (Encadrés en rouge) (**Figure 22A**). Les résultats du test d'inhibition de l'expression de VCAM1, corrélés au test de viabilité cellulaire, mettent en évidence les propriétés des extraits E35 et E40 à bloquer l'effet du TNF sur l'induction de VCAM1 par la CE (**Figure 22B**).

5-3 Mise au point d'un test pour la détection des propriétés anti-AGE

Les AGEs (Advanced glycation end-products) sont les produits finaux de la réaction non-enzymatique de glycation des protéines ou lipo-protéines plasmatiques ou intracellulaires. Cette réaction est impliquée dans les mécanismes de vieillissement et associée à de nombreuses pathologies comme le diabète ou l'insuffisance rénale (pour revue : Goldin et coll., Circulation. 2006).

Les CE qui expriment à leur surface des récepteurs aux AGEs (RAGE) sont une cible reconnue des AGEs. De l'interaction des AGEs avec leur récepteur à la surface des CE, en résulte une activation endothéliale via le facteur de transcription NFκB (Schmidt et coll., Proc Natl Acad Sci USA. 1994). Les molécules et extraits d'origine végétale précédemment identifiés pour leurs effets sur l'inhibition de l'expression de VCAM1 à la surface des CE par le TNF ont donc tous un effet anti-AGE potentiel.

Dans ce contexte, notre but était de mettre au point un test, complémentaire du premier, permettant la détection des molécules ou extraits capables de directement bloquer la synthèse des AGEs, au niveau intracellulaire.

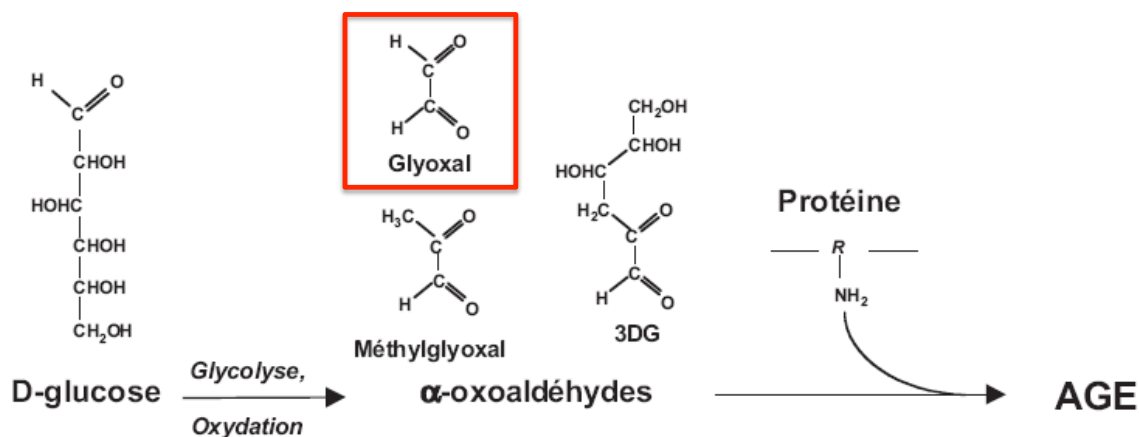


Figure 23 : Structure chimique des molécules de la famille des α-oxoaldéhydes.

A partir des travaux de Sliman et collègues nous avons choisi d'utiliser l'α-oxoaldéhyde « Glyoxal », un composé chimique impliqué dans la réaction de glycation des protéines, comme inducteur d'AGE dans la cellule endothéliale (Sliman et coll., Mol Cell Biochem. 2010) (**Figure 23**).

En accord avec les travaux de Sliman et collaborateurs nous observons un effet dose réponse du glyoxal sur la diminution de la viabilité des CE, révélé par MTT (**Figure 24A**). Chacun des extraits et molécules ont par la suite été testés pour leur capacité à protéger la CE de la mortalité induite par le Glyoxal. Pour ce faire, les CE ont été pré-traitées avec différentes concentrations des molécules et extraits d'intérêts, pendant 6h. Le milieu de culture des CE a ensuite été remplacé par un milieu contenant le glyoxal. Après 15h d'incubation, la mortalité des CE est mesurée par MTT. Un exemple de résultat positif est représenté en **Figure 24B**.

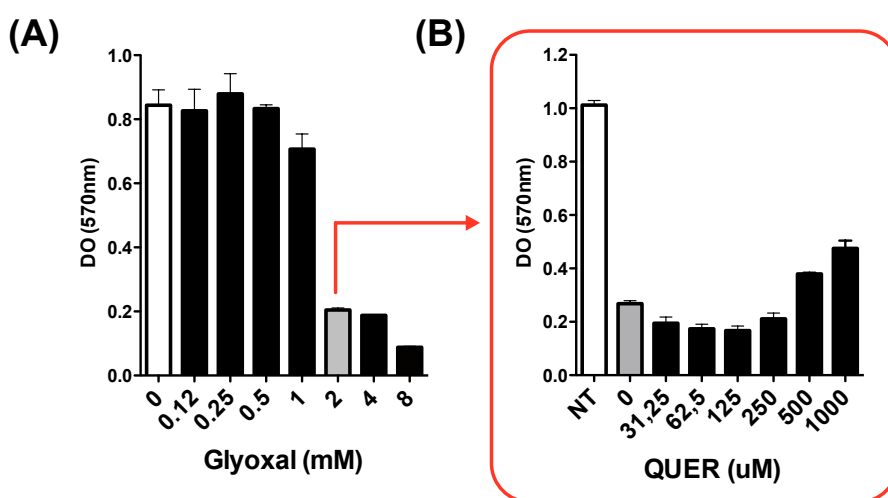


Figure 24 : Mesure de la viabilité cellulaire par MTT après traitement des CE avec l'inducteur d'AGE « Glyoxal » et exemple représentatif des effets d'une molécule capable d'inhiber l'effet du Glyoxal. (A) Les CE ont été traitées avec des concentrations croissantes de Glyoxal, pendant 15h. La viabilité cellulaire a ensuite été mesurée par MTT. (B) Les CE ont été pré-traitées avec différentes concentrations de la molécule d'origine végétale QUER, pendant 6h. Le milieu de culture des CE a ensuite été remplacé par un milieu contenant 2mM de glyoxal (Histogramme grisé). Après 15h d'incubation, la mortalité des CE est mesurée par MTT.

5-4 Résultats du screening

Parmi les 90 extraits testés, 38 (42,2%) se sont avérés toxiques, 24 (26,7%) n'ont affichés aucun effet sur la CE (ni toxique, ni sur l'inhibition de VCAM1) et 28 (31,1%) sont ressortis du crible pour leurs effets sur l'inhibition de VCAM1. Sur les 72 molécules purifiées ici testées, 56 (77,8%) étaient toxiques pour la CE, 7 (9,7%) étaient sans effet et 9 (12,5%) se sont révélées capables d'inhiber l'expression induite de VCAM1.

Le test complémentaire visant à déceler des propriétés anti-AGE a permis l'identification de 3 molécules purifiées pour leur capacité à inhiber la mortalité cellulaire induite par le Glyoxal, en plus de leur effet sur l'inhibition de VCAM1.

Les molécules et extraits ainsi sélectionnés ont fait/font l'objet de tests supplémentaires (Mesure des effets vaso-relaxants, inhibition de la synthèse des ROS (reactive oxygen species)) au sein des différents laboratoires du réseau proVasc afin de compléter leurs effets protecteurs et identifier les modes d'action mis en oeuvre. Une partie des résultats obtenus fait, à ce jour, l'objet d'une publication soumise (**Annexe 1**) :

G Rakotomalala, C Agard, P Tonnerre, S Derbré, S Michalet, J Hamzaoui, M Rio, B Charreau, G Loirand, and P Pacaud. « **Extract from *Mimosa Pigra* attenuates chronic experimental pulmonary hypertension** »

CONCLUSION GENERALE

De part sa fonction de ligand de NKG2D, son expression hyper-réglée, et le haut degré de polymorphisme qui lui est associé, l'intérêt des chercheurs pour la molécule MICA n'a eu de cesse de croître dès la première description des loci MIC, en 1994 (Bahram et coll., Proc Nat Acad Sci USA. 1994) (**Figure 9**).

Dans un premier temps, son polymorphisme et sa proximité génétique avec les gènes du HLA, ont fait de MICA un gène particulièrement étudié pour son rôle dans les pathologies auto-immunes (Mizuki et coll., Proc Natl Acad Sci USA. 1997). Très vite, les transplantateurs s'intéressent également à cette protéine polymorphe exprimée par les cellules endothéliales et les premières descriptions de la présence d'anticorps anti-MICA dans les sérums des patients transplantés de tardent pas (Zwirner et coll., Hum Immunol. 2000). Plus tard de nombreuses études cliniques associeront la présence des anticorps anti-MICA à une diminution de la survie des greffes (Zou et coll., N Engl J Med. 2007) (Terasaki et coll., Am J Transplant. 2007).

La régulation de MICA par les stress cellulaires, les premières descriptions de la fonction de MICA comme ligand activateur du récepteur NKG2D, porté par les cellules NK et les lymphocytes TCD8(+) (Groh et coll., Science. 1998) (Bauer et coll., Science 1999) ont sonné le début d'une décennie de travaux décrivant l'importance de MICA pour la détection et la destruction des cellules infectées ou en cours de transformation tumorale par les cellules de l'immunité innée. En parallèle, la description des mécanismes utilisés par les virus et les tumeurs pour échapper à cette détection a permis d'étendre les champs de recherche de ces deux thématiques, l'immunité anti-infectieuse et l'immunité anti-virale, à l'impact que pouvaient avoir les polymorphismes de MICA sur ces mécanismes (Zou et coll., J Immunol. 2005) (Thomas et coll., Proc Natl Acad Sci. 2008) (Ashiru et coll., Cancer Res. 2010).

La première description d'une forme soluble de MICA, après le clivage protéolytique de la forme membranaire, a également suscité une vague de travaux sur l'impact et la régulation de cette forme soluble sur les mécanismes d'échappement des tumeurs, compte tenu de sa fonction immunosuppressive (Groh et coll., Nature. 2002) (Salih et coll., J Immunol. 2002). Cependant, les études recherchant la présence et l'implication de ces protéines solubles dans des pathologies autres que cancéreuses demeurent anecdotiques parmi l'ensemble. De même, la recherche des anticorps anti-MICA et la caractérisation de leurs effets restent cantonnées au domaine de la transplantation. Pourtant, certaines études émergent et suggèrent un rôle important des

anticorps anti-MICA dans les pathologies cancéreuses (Jinushi et coll., Proc Natl Acad Sci USA. 2006 et 2008) et pourquoi pas dans les pathologies infectieuses et auto-immunes.

Le travail présenté ici s'inscrit dans la thématique de notre équipe (équipe 5, INSERM U1064) qui s'intéresse au rôle de l'endothélium du greffon dans les mécanismes du rejet du greffon. Les travaux de notre équipe s'articulent autour de deux axes ; (1) l'identification des nouvelles molécules et voies de signalisation impliquées dans les mécanismes de la dysfonction endothéliale et (2) l'étude de l'alloréactivité des cellules endothéliales, cibles des allo-anticorps en transplantation par l'expression de molécules HLA et non-HLA du donneur.

La protéine MICA fait partie de ces antigènes, non-HLA, exprimés par les cellules endothéliales et reconnus par les anticorps induits post-transplantation. L'hypothèse de départ de ce travail se construit autour d'une idée, celle que le polymorphisme génétique de MICA pourrait influencer l'expression de la protéine MICA par les CE du donneur et moduler la réponse allo-immune en transplantation.

Pour tester cette hypothèse, nous nous sommes appuyés sur un outil unique, une bio-collection de cultures primaires de CE, isolées à partir de l'artère rénale des donneurs d'organes. Le typage systématique de *MICA*, pour chacune des cultures de CE, nous a permis de réaliser des études phénotypiques sur un grand nombre de CE de génotype *MICA* défini et de corrélérer les résultats obtenus avec le génotype *MICA* des CE. C'est ainsi que nous avons observé une forte modification de l'expression de *MICA* par les CE portant la mutation *MICA A5.1*.

Ainsi, nous démontrons que la mutation *MICA A5.1* induit la surexpression d'une protéine mutée à la surface des CE du donneur. Cette surexpression est associée à une absence de clivage protéolytique de la protéine *MICA A5.1* mais à la présence d'une forme soluble liée aux exosomes issus des CE. L'impact de ces formes solubles sur les fonctions du greffon reste à déterminer. Nous montrons, que les CE des donneurs porteurs de la mutation sont la cible privilégiée des anticorps anti-MICA présents dans les sérums des receveurs et apportons la première analyse statistique proposant une corrélation entre un mismatch *MICA A5.1* entre donneurs et receveurs et l'induction d'anticorps anti-MICA post-transplantation rénale.

La protéine MICA, en tant que ligand du récepteur activateur NKG2D, est impliquée dans les mécanismes de l'immunité innée anti-virale. La réactivation du virus BK constitue aujourd'hui une des principales causes de perte du greffon au-delà de la première année post-greffe.

Nous avons donc recherché l'impact de la mutation *MICA A5.1* sur la réactivation du virus BK post-transplantation rénale. Par la confrontation des génotypes MICA des couples de donneur/receveur avec les statuts virologiques des receveurs, nous avons mis en évidence une corrélation statistique entre l'expression de la mutation *MICA A5.1* par le donneur d'organe et une moindre fréquence de la réactivation du virus BK post-greffe. En outre, nous identifions les combinaisons de génotypes *MICA*, entre donneurs et receveurs, les plus à risque pour la réactivation du virus BK.

L'ensemble de ces travaux suggère un impact fort de la mutation *MICA A5.1* sur la survenue de complications immunologiques et/ou virologiques post-greffe. Nous proposons le génotypage des donneurs et des receveurs pour le gène MICA, pré-greffe, afin d'identifier les receveurs à risque et adapter leur suivi post-greffe.

Ce travail apporte également la description d'un nouvel épissage alternatif de MICA, dans les CE. Celui-ci se caractérise par la présence de 4 transcrits alternes, définis par une délétion totale ou partielle des exons 3 et 4 codant pour les domaines extracellulaires de MICA. La caractérisation des isoformes issues de la traduction de ces transcrits promet des structures originales, parfois très différentes de la protéine sauvage. Les fonctions et l'implication de ces différentes isoformes dans un contexte pathologique devront être définies.

Ces travaux soulignent toute l'importance du polymorphisme génétique dans la mise en œuvre des mécanismes immunologiques et soutiennent la théorie de l'inter-individualité de la réponse immune, pour laquelle la thérapie personnalisée semble être la réponse la plus adaptée dans un contexte pathologique.

Liste des publications & communications scientifiques

Publications

Guillon C., Cottureau A., Gérard N., Quillard T., Chauveau A., Devallière J., Tonnerre P. and Charreau B. **Protective crosstalk between Activated Protein C and TNF signaling in vascular endothelial cells: Implication of EPCR, non canonical NFkB and ERK1/2 MAPKinases**, Am. J. Physiol.: Cell Physiology, 2011

Tonnerre P., Gérard N., Chatelais M. and Charreau B. **MICA Gene Polymorphism in Kidney Allografts and Possible Impact of Functionally Relevant Variants**, Transplant Proc, 2010.

Tonnerre P., Gérard N., Chatelais M., Poli C., Allard S., Curry S., Bressollette C., Cesbron-Gautier A., and Charreau B., **"MICA A5.1 mutation is an immunodominant factor altering endothelial cell phenotype and alloimmune functions in kidney transplantation"** (J Am Soc Néphrol., accepté avec révision)

Mathilde A., Tonnerre P., Nedellec S., Oger., Morice A., Guilloux Y Chalmeau E, Charreau B and Gervois N. « **Cross-recognition of allogeneic endothelial cells by HCMV-committed HLA-E-restricted CD8+ T cells** », (Article en révision, PLoS ONE)

G Rakotomalala, C Agard, P.Tonnerre, S Derbré, S Michalet, J Hamzaoui, M Rio, B Charreau, G Loirand, and P Pacaud. « **Extract from Mimosa Pigra attenuates chronic experimental pulmonary hypertension** » (Article soumis)

Communications Orales

Tonnerre P., Gérard N., Chatelais M. and Charreau B. (**Communication orale**) Compréhension des mécanismes de l'alloimmunisation en Transplantation rénale : Impact du polymorphisme génétique sur l'expression endothéliale des molécules MICA, **9ème Congrès Annuel de la Société Francophone de Transplantation**, Nice, 9-11 Décembre 2009.

Tonnerre P., Gérard N., Chatelais M., Allard S., Cury S., Cesbron-Gautier A and Charreau B. (**Communication orale**) Functional impact of MICA A5.1 polymorphism on graft's endothelial cell phenotype, immunoregulatory functions and alloantibody responses, **European Society for Organ Transplantation**, Glasgow, Septembre 4-7, 2011.

Tonnerre P., Gérard N., Chatelais M. and Charreau B. (**Communication orale**) MICA A5.1 mutated molecules are over-expressed in graft's endothelial cells that promotes NKG2D dependent NK cells activation, **American Transplant Congress**, Boston, USA, 2-6 Juin 2012.

Tonnerre P., Gérard N., Chatelais M., Allard S., Cury S., Cesbron-Gautier A and Charreau B. (**Communication orale**) MICA*008/A5.1 molecules over-expressed on graft's endothelial cells surface are dominant targets that promotes alloantibodies fixation, **American Transplant Congress, Boston**, USA, 2-6 Juin 2012.

Tonnerre P., Gérard N., Chatelais M., Allard S., Cury S., Cesbron-Gautier A and Charreau B. (**communication orale**) Functional impact of MICA A5.1 mutation on graft's endothelial cell phenotype, NKG2D activation and alloantibody responses, **Internationnal Congress of the Transplantation Society**, Berlin, Allemagne, 15-19Juillet 2012.

Communications affichées

Tonnerre P., Gérard N., Chatelais M. and Charreau B. (**Poster**) Rôle des molécules MICA en transplantation rénale: Importance du polymorphisme MICA A5.1 sur l'expression endothéliale et régulation par les miRNA, **10ème Congrès Annuel de la Societe Francophone de Transplantation**, Genève, 15-17 Décembre 2010.

Tonnerre P., Gérard N., Chatelais M. and Charreau B. (**Poster**) MICA Expression and Functions on Graft's Endothelial Cells: Characterisation of the Polymorphism MICA A5.1, **The French Society For Immunology**, Marseille, 24-26 Novembre 2010.

Tonnerre P., Gérard N., Chatelais M., Allard S., Cury S., Cesbron-Gautier A and Charreau B. (**Poster**) Functional impact of MICA A5.1 polymorphism on graft's endothelial cell phenotype, immunoregulatory functions and alloantibody responses, **XII TTS Basic Science Symposium**, Boston (Cap Cod) USA June 11-14, 2011.

Annexe I

Soumis pour publication dans le journal : « **Journal of Ethnopharmacology** »

Extract from *Mimosa Pigra* attenuates chronic experimental pulmonary hypertension

G Rakotomalala^{1,2,3}, C Agard^{1,2,3}, P Tonnerre^{2,4}, S Derbré⁵, S Michalet⁶, J Hamzaoui⁶, M Rio M^{1,2}, B Charreau^{2,4}, G Loirand^{1,2,3} and P Pacaud^{1,2,3}

¹ INSERM, UMR_S107, Nantes, F-44000 France;

² Université de Nantes, Nantes, F-44000 France;

³ CHU de Nantes, l'institut du thorax, Nantes, F-44000 France;

⁴ INSERM, UMR_S643, Nantes, F-44000 France;

⁵ UPRES EA921, IFR149, Université d'Angers, Angers, F-49100 France;

⁶ Centre d'Etude des Substances Naturelles (CESN), UMR 5557 CNRS/Université Lyon1/USC INRA 1193 - Ecologie Microbienne. Villeurbanne, France.

Short running title: *Mimosa Pigra* reduces pulmonary hypertension

Correspondence to Pierre Pacaud, Inserm UMR_S1087, IRT-UN, 8 Quai Moncousu, BP 70721, 44007 NANTES Cedex 1, France - Fax # 33 2 28 08 01 20
E-mail: pierre.pacaud@univ-nantes.fr

Abstract

ETHNOPHARMACOLOGICAL RELEVANCE: Different parts of *Mimosa Pigra* are used in traditional medicine in Madagascar, tropical Africa, South America and Indonesia for various troubles including cardiovascular disorders.

AIM OF THE STUDY: To investigate the mechanisms underlying the vascular effects of MPG by assessing *in vitro* its antioxidant and anti-inflammatory properties, and its vascular relaxing effects, and *in vivo*, its action on hypoxic pulmonary hypertension (PAH) in rats.

MATERIAL AND METHODS: The antioxidant activity of MPG extracts was determined by using both the 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) radical scavenging and the oxygen radical absorbance capacity (ORAC) *in vitro* assays. Anti-inflammatory properties were assayed on TNF α -induced VCAM-1 expression in endothelial cells. The vasorelaxant effect of MPG methanolic extracts was studied on rat aorta and pulmonary artery rings pre-contracted with phenylephrine (PE, 1 μ M) in the presence or absence of the endothelium.

In vivo MPG extract effects were analyzed in chronic hypoxic PAH, obtained by housing male Wistar rats (250 g), orally treated or not with a daily dose of 400 mg/kg of MPG extract, in a hypobaric chamber for 21 days.

RESULTS: MPG extract has antioxidant and anti-inflammatory properties. It induces endothelium-dependent, NO-mediated relaxation of rat aorta and pulmonary artery. *In vivo*, chronic MPG treatment reduces hemodynamic and histologic manifestations of hypoxic PAH in rat. This effect is associated with a restoration of endothelium function and an increase in endothelial NO synthase phosphorylation. MPG leaf extract contains flavonoids, including quercetin and tryptophan. Each compound also efficiently limits hypoxia-induced PAH.

CONCLUSIONS: Our results show endothelial protective action of MPG extracts which is likely to be due to its antioxidant action. MPG successfully attenuated the development of PAH, thus demonstrating the protective effect of MPG on cardiovascular disease.

Introduction

Pulmonary arterial hypertension (PAH) is a complex and multifactorial disease characterized by a progressive increase of pulmonary vascular resistance and pulmonary arterial pressure (PAP), leading to right ventricle hypertrophy and death (Humbert and Hoeper, 2008; Rubin, 2006). Idiopathic, familial and connective tissue disease-associated forms of PAH share similar features (Rabinovitch, 1997). Pathologic changes of pulmonary arteries, which involve endothelial dysfunction, endothelial and smooth muscle cell proliferation, and increased vasoconstriction, decrease the lumen area of the pulmonary microvasculature, causing fixed elevation of pulmonary resistance. Although major advances in the understanding of disease development and treatment have been achieved over the last 15 years, the pathogenesis of PAH remains not clearly understood and the mechanisms responsible for this abnormal pulmonary vascular remodelling are unknown. However, impairment of endothelial dysfunction, essentially characterized by an impairment of nitric oxide (NO) production and/or bioavailability is likely to play a central role in the initiation and progression of PAH (Budhiraja et al., 2004). Multiple studies in experimental models and in human implicate oxidative stress in the development endothelial dysfunction, increased vasoconstriction and PAH (Jernigan et al., 2008; Lai et al., 1998; Tabima et al., 2012). This oxidative stress, corresponding to increased generation of reactive oxygen species (ROS) and reactive nitrogen species promotes decrease of both synthesis and bioactivity of endothelial NO (Fresquet et al., 2006; Tabima et al., 2012). Accordingly, current therapies are based on the use of drugs that improve endothelial function and pharmacological agents targeting the endothelium/smooth muscle cell axis, acting on endothelin-1 receptors, NO or prostacyclin signaling, have shown benefits for patients with PAH (Tabima et al., 2012). However, these treatments failed to improve the long-term survival and their use is hampered by either side effects or inconvenient drug administration routes (Humbert et al., 2004). Alternatively, in

light of the role of ROS in PAH, antioxidant-based strategies aiming at decreasing ROS levels have been proposed as potential interesting therapeutic treatments for PAH.

Nature has been a source of medicinal agents for thousands of years and continues to be an abundant source of novel chemotypes and pharmacophores. About 50% of the currently marketed drugs discovered between the period of 1981 to 2010 owe their origin to natural products or natural product derivatives (Newman and Cragg, 2012). In fact, the most important worldwide used drugs were discovered as a result of chemical studies directed at the isolation of the active substances from plants used in traditional medicine. In particular, during the few past years, medicinal plants have been extensively used as a source of new antioxidants for the development of drugs and other valuable bioactive agents. According to this strategy, from a screening of plant used in traditional medicine in Madagascar, we identified antioxidant properties of *Mimosa Pigra* (MPG) leaf extracts. Different parts of MPG is used in traditional medicine in Madagascar, tropical Africa, south America and Indonesia for various troubles including head colds, toothaches, eye medicine, diarrhoea, weak heart or weak pulse, and also for its antimicrobial activity (Grosvenor et al., 1995; Rosado-Vallado et al., 2000). The aim of this study was to analyze the properties of MPG extract responsible for its cardiovascular effect. We found that antioxidant properties of MPG extract are associated in vitro with anti-inflammatory effects and endothelium-dependent vascular relaxing effects, and in vivo, with a beneficial effect on hypoxic HTAP in rats.

Methods

Plant material

MPG extracts were purchased from Sotramex (Antananarivo, Madagascar). MPG dry leaves were grounded and extracted with methanol (50% aqueous methanol) at room temperature for 24 h. The crude hydroalcoholic extract was filtrated and then evaporated. The dried extracts

were then re-dissolved at a concentration of 100 mg/ml in aqueous solution with 10% dimethyl sulfoxide (DMSO). The maximal DMSO concentration used in our tests was thus 0.1% and has no effect.

UHPLC-DAD-ESI-QTOF analysis

Dried extract was concentrated at 10 mg/ml and then analysed by ultra-high performance liquid chromatography (UHPLC, Agilent 1290) coupled to diode array detector (DAD) and electrospray quadrupole time of flight (QTOF) MS detector (Agilent 6530) using poroshell 120 EC-C18 column (3.0*100 mm, 2.7 μ m, Agilent) with a mixture of 0.4% formic acid in water (A) and acetonitrile (B) following this gradient: 2% of B from 0 to 2 min., 40% of B at 20 min. and 100% of B at 22 min. The flow rate was 0.8 ml/min and the injection volume was 5 μ l. UV spectra were recorded between 190 and 600 nm. The ESI source was optimized as follows: positive ionization mode, scan spectra from m/z 100 to 3000, capillary voltage 3.5 kV, fragmentor 110V, fixed collision energy at 20V. Nitrogen was used as the nebulizing gas with a flow rate of 12 l/min and a temperature of 320°C at 40 psi.

Antioxidant activity of MPG extract

The antioxidant activity of MPG extracts were determined by using both the 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) radical scavenging and the oxygen radical absorbance capacity (ORAC) *in vitro* assays.

DPPH scavenging activity was assayed as described previously (Duge de Bernonville et al., 2010). Assays were performed in microplates (Nunc-Immuno Modules, Nunc, Roskilde, Denmark). Thirty microliter of methanol extract or 10 $\times$ solutions of each compound was added to 240 μ l of methanol in microplate wells. The reaction was started with the addition of 30 μ l of a 3.2 mM methanol solution of DPPH and the OD was monitored at 515 nm every

minute for 120 min with a UV–visible microplate spectrophotometer. A Trolox standard dilution curve was included as an internal control in each run. Antioxidant activity was evaluated by calculating the concentration of the tested molecule or raw extract corresponding to 50% reduction of the DPPH radical at steady state (EC_{50}). Trolox equivalent antiradical capacity was calculated as the ratio between the Trolox EC_{50} and that of the extract tested. The experiment was repeated three times ($n=3$) with internal duplicate-measurements.

ORAC based on 2,2-azobis(2-amidinopropane) dihydrochloride (AAPH)-initiated chain-oxidation of fluorescein as previously described (Duge de Bernonville et al., 2010). Extract dilutions were prepared in potassium phosphate buffer (10 mM, pH 7.4). The reaction was performed in a 96-well black opaque plate (Costar, Cambridge, MA) as follows: 150 μ l of 10 nM of fluorescein were added in each well and 25 μ l of Trolox or extract or pure compound were pipetted in triplicate. Trolox dilutions ranged from 62.5 to 1000 μ M with a 2-fold dilution factor, pure compounds from 12.5 to 100 μ M and extracts were diluted 800 and 400 times. The background signal was determined after a 30 min incubation at 37 °C and the reaction was started with the automatic injection of 100 μ l of 240 mM AAPH. Fluorescence was measured every 90 s for 10 cycles. Fluorescence data were plotted and the area under the curve (AUC) was calculated. A Trolox equivalent (TE) was calculated with a linear Trolox regression curve ($Y = 168.18X - 20.269$, $R^2 = 0.9977$ with $X = \text{AUC sample} - \text{AUC blank}$) and results are expressed in μ mol TE/g extract. Each experiments was performed three times ($n=3$) with internal duplicate-measurements.

Endothelial Cell culture and activation

Human primary vascular endothelial cells (Lonza Verviers SPRL, Verviers, Belgium) 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 μ g/ml

hydrocortisone, 50 µg/ml gentamicin and 50 ng/ml amphotericin B (C-22010, PromoCell, Heidelberg, Germany) and used between passage 2 and 5. For activation, confluent endothelial cell monolayers were starved overnight and incubated with recombinant human TNFα (200 U/ml, R&D Systems, Lille, France) for 6 h in ECBM supplemented with 2% FCS, in the absence or presence of MPG or pyrrolidine dithiocarbamate (PDTC, 200 µM; Sigma), used as reference antioxidant. Experiments were performed in triplicates in 96-well plates pre-coated with 1% gelatine (Nunc, Roskilde, Denmark).

Cellular Elisa assays for membrane-bound vascular cell adhesion molecule 1 (VCAM-1).

After treatment, cells were fixed in glutaraldehyde. VCAM-1 detection was achieved using anti-VCAM-1 mouse IgG (R&D Systems). Assays were processed using anti-mouse IgG2a-horseradish peroxidase (Cell SciencesTM, Inc., Canton, MA, USA) (1:4,000) and developed using the ABTS Peroxidase Substrate Reagent (Roche Diagnostics, Indianapolis, IN, USA). Optical density (OD) was measured at 570 nm.

Cellular Viability/proliferation assay

Cell viability/proliferation was quantified by MTT colorimetric assays in endothelial and rat aortic smooth muscle cell cultures. Primary aortic smooth muscle cells were obtained and cultured as previously described (Agard et al., 2009). After plating and incubation in the presence of various concentration of MPG, without or with 10% FCS, endothelial or smooth muscle cell viability was assessed by incubation with 1 mg/ml MTT (3-[4,5 Dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazodium) for 4h at 37 °C and recording the OD at 550 nm. For each experiment, measurements were performed in triplicates. The relationship between OD and cell number was determined to be linear by the regression curve and the equation of the curve allowed us to determine the cell number for each treatment.

Animals

Male Wistar rats (250 g) were used. The normoxic rats were housed in room air at normal atmospheric pressure. Chronic hypoxic PAH was obtained by housing animals in a hypobaric chamber at 380 mmHg (Vacucell 111L, Medcenter, Munich, Germany) for 21 days. MPG (400 mg/kg/d) extract and quercetin (100 mg/kg/d; Sigma) were added in the drinking water and L-tryptophan was daily administrated by IP injection (50 mg/kg/d; Sigma) for all the 21 days-hypoxia. All experiments were conducted in accordance with international guidelines for the care and use of laboratory animals.

Haemodynamic measures

Haemodynamic measures were made as previously described (Guilluy et al., 2005). Rats were anaesthetized by IP injection of ketamine and xylazine. Haemodynamic parameters were measured using a venous catheter inserted in the right jugular vein. The catheter was introduced in the right atrium, the right ventricle and then in the pulmonary artery. Systolic right ventricle pressure, systolic, diastolic and mean pulmonary arterial pressure (PAP) were then measured (Hewlett-Packard, M1106B).

Measure of right ventricular hypertrophy.

After sacrifice, heart was removed and washed from blood. Right ventricular (RV) hypertrophy was measured using the ratio of RV weight to left ventricle (LV) plus interventricular septum weight $[RV/(LV+S)]$.

Histologic analysis

Histological examination of pulmonary vascular remodelling was performed as previously described (Guilluy et al., 2005). The left lung was removed. Left bronchus was slowly injected with 4% paraformaldehyde in PBS to distend air-cells and the entire piece was put in the same fixation solution to be processed for paraffin-embedded sections (10 µm). Three transversal sections per lung were stained with haematoxylin-eosin-saffron and Weigert's staining. A total of 15-30 arterial vessels (20 to 60 µm in diameter) were examined in each section. The wall thickness was quantified by measuring the area using Metaview software (Universal Imaging Co., West Chester, PA, U.S.A.). The ratio area of the lumen (LA) to the area of the entire vessel (arterial wall plus lumen; VA) x 100 was calculated. The medial area (MA, in %) was calculated using the formula $MA = 100 - LA/VA \times 100$. All these analyses were performed by one observer blinded to the group from which the sections were taken.

Western blot analysis

Pulmonary arteries (extralobar, main and first branches) were harvested and lysed as previously described (Agard et al., 2009). After electrophoresis and transfer to nitrocellulose membrane, samples were analysed by Western blot with antibodies against eNOS and phospho-eNOS (Cell Signaling), p38 and phospho-p38 (Cell Signaling). Immunoreactive bands were visualized using horseradish peroxidase-conjugated secondary antibody and subsequent ECL kit detection (Amersham Pharmacia Biotech, Orsay, France). Quantification was made by densitometric analysis with QuantityOne (Biorad, Hercules, CA, U.S.A.).

Contraction experiments

Rat aortas and pulmonary arteries were collected in physiological saline solution (in mM; 130 NaCl, 5.6 KCl, 1 MgCl₂, 2 CaCl₂, 11 glucose, 10 Tris, pH 7.4 with HCl) and cut in rings.

Arterial rings were then suspended under isometric conditions, connected to a force transducer (Pioden controls Ltd, Canterbury, UK) in Krebs-Henseleit solution at 37°C bubbled with 95% O₂-5% CO₂. After equilibration, the response to KCl 60mM was determined. The presence and the functionality of the endothelium were checked by adding carbachol (CCh, 10 µM) to rings pre-contracted by phenylephrine (PhE, 1 µM). Similarly, the relaxing effect of MPG was tested by adding increasing concentrations of MPG to rings pre-contracted by PhE (1 µM). In some experiments performed in de-endothelialized, the endothelium was removed by gentle mechanical rubbing of the intimal surface.

Statistical analysis

Values are expressed as mean ± SEM of n independent experiments or samples. Statistical analysis was performed by two tailed, unpaired Student's *t* test. A *P* value of *P*<0.05 was considered significant.

Results

Antioxidant and anti-inflammatory properties of MPG extracts

Antioxidant potential of MPG was assessed by both DPPH scavenging and ORAC assays on MPG extracts. These assays revealed antioxidant properties of MPG extract, in the same ranks of concentration: 1268 µmol TE/g with DPPH and 2287 µmol TE/g with ORAC.

Antioxidant activity of plant extract is often associated with anti-inflammatory properties. We thus analyzed the anti-inflammatory action of MPG by measuring its ability to decrease TNFα-induced VCAM-1 expression in endothelial cells (Fig 1A). MPG extracts (0.01-1 mg/ml) inhibited the induction of VCAM-1 in response to TNFα with a maximal inhibitory effect close to 90%, similar to that obtained with PDTC. This anti-inflammatory activity was not due to cytotoxic effect of the extract as endothelial cell viability, assessed by MTT is not

affected by the presence of MPG (Fig 1B). These results provide evidence for antioxidant and anti-inflammatory properties of MPG extract.

Vasorelaxing effect of MPG

MGP (0.0001-0.1 mg/ml) produces a concentration-dependent relaxation of rat aorta and pulmonary artery precontracted with 1 μ M PhE, with a half-maximal effect obtained at 7.89 μ g/ml and 3.24 μ g/ml, respectively (Fig 1C, D). Removal of the endothelium completely abolishes the relaxing effect of MPG (Fig 1C). In endothelialized rat aortic rings, inhibition of NO synthesis by L-NAME (3 μ M), attested by the inhibition of CCh-induced relaxation, also totally prevents MGP-induced relaxation of PhE contraction (Fig 1E). In contrast, indomethacin, an inhibitor of cyclooxygenase (10 μ M) and gibenclamide, an inhibitor of ATP-sensitive potassium channels (10 μ M) have no effect, suggesting that neither prostacyclin nor hyperpolarizing relaxing factors were involved in the relaxing effect of MPG (Fig 1E). These results thus indicate that MGP induces endothelium-dependent vascular relaxation through stimulation of NO production.

MGP has no effect on vascular smooth muscle cell viability and proliferation

To further characterize the action of MGP of vascular cells, we have analyzed MPG effects on smooth muscle proliferation and viability (Fig 2). At concentrations ranging from 0.01 to 1 mg/ml, MPG extract did not significantly affect smooth muscle cell proliferation induced by 10% serum (Fig 2A) and cell viability (Fig 2B).

Beneficial effect of MPG extract on PAH

Results from our *in vitro* experiments suggest that MPG extracts display endothelial protective effect. We therefore next address its *in vivo* effect on the development of hypoxic

PAH, known to involve endothelial dysfunction. Rats maintained in hypobaric chamber for 21 days displayed an increased hematocrit ($67.00 \pm 0.15\%$ vs 39.17 ± 1.01 in normoxic rats, $n=6$, $P<0.0001$) attesting the hypoxic condition. The rats exposed to chronic hypoxia developed PAH characterized by an increase in mean PAP (26.29 ± 1.01 mmHg vs 9.00 ± 0.81 mm Hg in normoxic rats, $n=6$, $P<0.001$)(Figure 3A). Right ventricular remodelling in hypoxic rats was also attested by the strong increase in the ratio of RV weight to LV plus septum [RV/(LV+S)] (0.434 ± 0.038 vs 0.174 ± 0.004 , $n=6$, $P<0.001$) (Figure 3B). MPG treatment ($400 \text{ mg kg}^{-1} \text{ d}^{-1}$) applied daily for the entire duration of hypoxia exposure significantly reduces PAH, as shown by the significant decrease in the mean PAP and the RV/(LV+S) (Figure 3A and B).

Antiremodelling effect of MPG in pulmonary vasculature

Histologic examination of pulmonary vasculature showed that medial wall thickness of small pulmonary arteries (20-60 μm in diameter) was markedly increased in hypoxic rat at day 21 (Figure 3C). Treatment with MPG nearly resulted in a normalization of pulmonary arterial wall thickness (Figure 3C). Recent evidence suggests that p38 MAPK is activated in the pulmonary artery in response to both acute and chronic hypoxia, driving cell proliferation and vascular remodelling (Welsh et al., 2005; Welsh et al., 2001). As expected, hypoxia induced increase in pulmonary p38 activity (Figure 3D). Hypoxia-induced activation of p38 was significantly reduced in MPG-treated rats (Figure 3D).

MPG restores endothelial function of hypoxic rats

To further define the effect of MPG in the progression of PAH in hypoxic rats, we next assessed the effect of MPG on the endothelial function of pulmonary artery ring from untreated and MPG-treated hypoxic rats (Figure 4A). Endothelial NO releasing capacity of the endothelium was assessed by measuring CCh-induced relaxation of pulmonary artery rings contracted by PhE ($1 \mu\text{M}$). As shown in Figure 4A, CCh-induced relaxation was

increased in MPG-treated hypoxic rat, indicating that MPG limited hypoxia-induced endothelial dysfunction. This observation is in agreement with the increase phosphorylation of eNOs observed in pulmonary arteries from MPG-treated hypoxic rats (Figure 4B). Taken together, these results provide evidence that MPG-induced improvement of endothelial function could participate to its beneficial effect on PAH.

Compounds identification

We next wanted to identify compounds contained in MPG extract that could potentially underlie the biological effects of MPG. The phytochemical analysis of MPG leaves extract revealed the presence of phenolic compounds (Figure 5A), of which 6 were identified as flavonols derivatives according to their characteristic UV spectra. All were 3-*O* substituted since band I λ_{max} were observed inferior to 360 nm, which is typical of a 3-*O* substitution for this class of compounds (Mabry et al., 1970). Given this information, HRMS and HRMS/MS spectra were analysed and allowed the identification of 6 flavonols mono-glycosides and also tryptophan in the extract (Figure 5B). The exact nature of the sugar could not be determined with these experiments apart for quercitrin (3-*O*-rhamnosyl quercetin) and myricitrin (3-*O*-rhamnosyl myricetin) which were compared with authentic standards (Extrasynthese).

Effects of tryptophan and quercetin

Among the compounds identified, tryptophan and quercetin have been shown to have hypotensive action in systemic circulation (Hofmann, 2010; Wang et al., 2010) and endothelium-dependent relaxing effect (Perez-Vizcaino and Duarte, 2010), respectively. We thus examined whether these individual compounds can underlie the biological effect of MPG, and mimick its effect on PAH. We first examined the relaxing effect of both compounds on endothelialized pulmonary artery rings. Quercetin produced a concentration-

dependent relaxation of precontracted rings but l-tryptophan had no effects (Figure 6A). The relaxing effect of quercetin was completely abolished in the presence of L-NAME (not shown), indicating that it was mediated by endothelial NO. *In vivo*, in the hypoxic PAH model, L-tryptophan (50 mg kg⁻¹ d⁻¹) or quercetin (100 mg kg⁻¹ d⁻¹) treatment applied daily for the entire duration of hypoxia exposure significantly reduces PAH, as shown by the significant decrease in the mean PAP, RV/(LV+S) ratio and pulmonary artery remodelling (Figure 6B-C).

Discussion

Our results provide evidence for antioxidant and anti-inflammatory properties, and endothelium- and NO-dependent vasodilatory effect of MPG leaf extract. An important finding of this study is that *in vivo*, chronic treatment with MPG extract limits hypoxia-induced PAH in rats. MPG significantly ameliorates haemodynamic parameters and right ventricle hypertrophy. We further show that MPG has efficient antiremodelling effect on pulmonary vasculature and improves endothelial function.

We suggest that the effects of the prolonged MPG extract treatment in attenuating hypoxia-induced PAH occur via its anti-oxidant properties. Increased ROS is crucial for vascular endothelial dysfunction (Fresquet et al., 2006; Tabima et al., 2012). Accumulating evidence indicates a role of reactive oxygen species (ROS), essentially produced by NAD(P)H oxidase activity, in the pathogenesis of PAH in several different animal models of PAH including fetal lambs (Brennan et al., 2003; Grobe et al., 2006), newborn piglets (Dennis et al., 2009), and mice (Nisbet et al., 2009). In human, increased oxidative status has been detected in patients with idiopathic PAH. Lipid, protein and DNA oxidation is higher in patients with PAH than in control subjects (Wong et al., 2012). These results suggest that components of ROS signaling are possible therapeutic targets for the treatment of PAH. Accordingly various compounds with antioxidant properties have been shown to reduce or

suppress the progression of PAH. In rats, compounds with antioxidant activities have been found to inhibit pulmonary hypertension and/or right ventricular dysfunction. Such compounds include probucol, N-acetylcysteine, tempol, erdosteine, allicin, pyrrolidine dithiocarbamate, superoxide dismutase, allopurinol, sulfur dioxide and resveratrol (Wong et al., 2012). In neonatal lambs with persistent pulmonary hypertension, superoxide dismutase was found to improve oxygenation, reduce oxidation, restore endothelial nitric oxide synthase expression and function (Wong et al., 2012). Our observation that MPG treatment restored endothelial function and increased eNOS phosphorylation supports the hypothesis that modulation of PAH by MPG is due to its antioxidant effect. This is also in agreement with the inhibitory action of MPG on VCAM-1 expression in endothelial cells since PDTC mimicks its effect. Furthermore, it has been previously shown that antioxidants such as flavonoids inhibited endothelial VCAM-1 through blunting ROS-triggered signaling pathway (Yi et al., 2012).

Another indirect observation also supporting a major role of the antioxidant properties of MPG in its beneficial action on PAH is that the flavonols quercetin, one of the most prominent dietary antioxidants, has been identified in MPG extracts and found to display protective action against PAH similar to that of MPG. It is not possible to conclude that the effect of MPG extract was due to quercetin, but the presence of several flavonoids including myricitin, quercitrin and kaempferol in MPG leaf extract strongly suggests that the effect of MPG resulted from the simultaneous and combined action of a mixture antioxidants (Perez-Vizcaino and Duarte, 2010). L-tryptophan, which is not an antioxidant, was also found to ameliorate PAH, however independently of an endothelium-dependent relaxing action. It could thus participate in the beneficial action of MPG extract on PAH, of but not on its action on the endothelium function.

The beneficial effect of MPG on PAH is likely to be due to its endothelium-protective effect, attested both by the increase in eNOS phosphorylation and the correction of hypoxia-induced impairment of endothelial-dependent pulmonary artery relaxation in MPG-treated hypoxic rats. This hypothesis is in agreement with the NO-dependent relaxing effect of MPG observed in arterial rings. Normal functioning of the endothelium is crucial to maintaining pulmonary vascular function and structural integrity. In addition to the impairment of the pulmonary arterial tone regulation, endothelial dysfunction is manifested by vascular cell proliferation. Although several mechanisms are involved cell proliferation associated with endothelial dysfunction, p38 MAPK has been recently described as a common link for PAH-associated vasomotor dysfunction and vascular remodelling (Weerackody et al., 2009). P38 MAPK is activated by ROS and in turn, p38 MAPK activation is involved in vascular cell proliferation and participates to pulmonary artery endothelial depression, in particular through the stimulation of NADPH oxidase-dependent ROS production (Son et al., 2011; Weerackody et al., 2009). This thus creates a positive feedback loop, exaggerating pulmonary vascular remodelling and endothelial dysfunction. The observation that MPG treatment decreases p38 MAPK activation in hypoxic rats is in agreement with its action on vascular remodelling and suggests that MPG has disrupted this positive feedback.

In conclusion, the present study demonstrates the endothelial protective action of MPG extracts. This effect is likely to be due to its antioxidant action. MPG successfully attenuated the development of PAH, thus demonstrating the protective effect of MPG on cardiovascular disease.

Acknowledgments

This work is supported by grants from INSERM and Région Pays de Loire (PROVASC project). We thank the IBISA platform Cardiex for functional explorations.

References

- Agard, C., Rolli-Derkinderen, M., Dumas-de-La-Roque, E., Rio, M., Sagan, C., Savineau, J.P., Loirand, G. and Pacaud, P., 2009. Protective role of the antidiabetic drug metformin against chronic experimental pulmonary hypertension. *Br J Pharmacol* 158, 1285-1294.
- Brennan, L.A., Steinhorn, R.H., Wedgwood, S., Mata-Greenwood, E., Roark, E.A., Russell, J.A. and Black, S.M., 2003. Increased superoxide generation is associated with pulmonary hypertension in fetal lambs: a role for NADPH oxidase. *Circ Res* 92, 683-691.
- Budhiraja, R., Tuder, R.M. and Hassoun, P.M., 2004. Endothelial dysfunction in pulmonary hypertension. *Circulation* 109, 159-165.
- Dennis, K.E., Aschner, J.L., Milatovic, D., Schmidt, J.W., Aschner, M., Kaplowitz, M.R., Zhang, Y. and Fike, C.D., 2009. NADPH oxidases and reactive oxygen species at different stages of chronic hypoxia-induced pulmonary hypertension in newborn piglets. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 297, L596-607.
- Duge de Bernonville, T., Guyot, S., Paulin, J.P., Gaucher, M., Loufrani, L., Henrion, D., Derbre, S., Guilet, D., Richomme, P., Dat, J.F. and Brisset, M.N., 2010. Dihydrochalcones: Implication in resistance to oxidative stress and bioactivities against advanced glycation end-products and vasoconstriction. *Phytochemistry* 71, 443-452.
- Fresquet, F., Pourageaud, F., Leblais, V., Brandes, R.P., Savineau, J.P., Marthan, R. and Muller, B., 2006. Role of reactive oxygen species and gp91phox in endothelial dysfunction of pulmonary arteries induced by chronic hypoxia. *Br J Pharmacol* 148, 714-723.
- Grobe, A.C., Wells, S.M., Benavidez, E., Oishi, P., Azakie, A., Fineman, J.R. and Black, S.M., 2006. Increased oxidative stress in lambs with increased pulmonary blood flow and pulmonary hypertension: role of NADPH oxidase and endothelial NO synthase. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 290, L1069-1077.
- Grosvenor, P.W., Supriono, A. and Gray, D.O., 1995. Medicinal plants from Riau province, Sumatra, Indonesia. Part 2: Antibacterial and antifungal activity. *J Ethnopharmacol* 45, 97-111.
- Guilluy, C., Sauzeau, V., Rolli-Derkinderen, M., Guerin, P., Sagan, C., Pacaud, P. and Loirand, G., 2005. Inhibition of RhoA/Rho kinase pathway is involved in the beneficial effect of sildenafil on pulmonary hypertension. *Br J Pharmacol* 146, 1010-1018.
- Hofmann, F., 2010. Ido brings down the pressure in systemic inflammation. *Nat Med* 16, 265-267.
- Humbert, M. and Hoeper, M.M., 2008. Severe pulmonary arterial hypertension: a forme fruste of cancer? *Am J Respir Crit Care Med* 178, 551-552.
- Humbert, M., Sitbon, O. and Simonneau, G., 2004. Treatment of pulmonary arterial hypertension. *N Engl J Med* 351, 1425-1436.
- Jernigan, N.L., Walker, B.R. and Resta, T.C., 2008. Reactive oxygen species mediate RhoA/Rho kinase-induced Ca²⁺ sensitization in pulmonary vascular smooth muscle following chronic hypoxia. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 295, L515-529.
- Lai, Y.L., Wu, H.D. and Chen, C.F., 1998. Antioxidants attenuate chronic hypoxic pulmonary hypertension. *J Cardiovasc Pharmacol* 32, 714-720.
- Mabry, T.J., Markham, K.R. and Thomas, M.B., 1970. *The Systematic Identification of Flavonoids* Springer-Verlag, Berlin New-York.
- Newman, D.J. and Cragg, G.M., 2012. Natural products as sources of new drugs over the 30 years from 1981 to 2010. *J Nat Prod* 75, 311-335.
- Nisbet, R.E., Graves, A.S., Kleinhenz, D.J., Rupnow, H.L., Reed, A.L., Fan, T.H., Mitchell, P.O., Sutliff, R.L. and Hart, C.M., 2009. The role of NADPH oxidase in chronic

- intermittent hypoxia-induced pulmonary hypertension in mice. *Am J Respir Cell Mol Biol* 40, 601-609.
- Perez-Vizcaino, F. and Duarte, J., 2010. Flavonols and cardiovascular disease. *Mol Aspects Med* 31, 478-494.
- Rabinovitch, M., 1997. Pulmonary hypertension: updating a mysterious disease. *Cardiovasc Res* 34, 268-272.
- Rosado-Vallado, M., Brito-Loeza, W., Mena-Rejon, G.J., Quintero-Marmol, E. and Flores-Guido, J.S., 2000. Antimicrobial activity of Fabaceae species used in Yucatan traditional medicine. *Fitoterapia* 71, 570-573.
- Rubin, L.J., 2006. Pulmonary arterial hypertension. *Proc Am Thorac Soc* 3, 111-115.
- Son, Y., Cheong, Y.K., Kim, N.H., Chung, H.T., Kang, D.G. and Pae, H.O., 2011. Mitogen-Activated Protein Kinases and Reactive Oxygen Species: How Can ROS Activate MAPK Pathways? *J Signal Transduct* 2011, 792639.
- Tabima, D.M., Frizzell, S. and Gladwin, M.T., 2012. Reactive oxygen and nitrogen species in pulmonary hypertension. *Free Radic Biol Med* 52, 1970-1986.
- Wang, Y., Liu, H., McKenzie, G., Witting, P.K., Stasch, J.P., Hahn, M., Changsirivathanathamrong, D., Wu, B.J., Ball, H.J., Thomas, S.R., Kapoor, V., Celermajer, D.S., Mellor, A.L., Keaney, J.F., Jr., Hunt, N.H. and Stocker, R., 2010. Kynurenine is an endothelium-derived relaxing factor produced during inflammation. *Nat Med* 16, 279-285.
- Weerackody, R.P., Welsh, D.J., Wadsworth, R.M. and Peacock, A.J., 2009. Inhibition of p38 MAPK reverses hypoxia-induced pulmonary artery endothelial dysfunction. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 296, H1312-1320.
- Welsh, D., Mortimer, H., Kirk, A. and Peacock, A., 2005. The role of p38 mitogen-activated protein kinase in hypoxia-induced vascular cell proliferation: an interspecies comparison. *Chest* 128, 573S-574S.
- Welsh, D.J., Peacock, A.J., MacLean, M. and Harnett, M., 2001. Chronic hypoxia induces constitutive p38 mitogen-activated protein kinase activity that correlates with enhanced cellular proliferation in fibroblasts from rat pulmonary but not systemic arteries. *Am J Respir Crit Care Med* 164, 282-289.
- Wong, C.M., Bansal, G., Pavlickova, L., Marcocci, L. and Suzuki, Y.J., 2012. Reactive Oxygen Species and Antioxidants in Pulmonary Hypertension. *Antioxid Redox Signal*.
- Yi, L., Chen, C.Y., Jin, X., Zhang, T., Zhou, Y., Zhang, Q.Y., Zhu, J.D. and Mi, M.T., 2012. Differential suppression of intracellular reactive oxygen species-mediated signaling pathway in vascular endothelial cells by several subclasses of flavonoids. *Biochimie* 94, 2035-2044.

Figure legends

Figure 1 MPG effects on endothelial cells. A Effect of MPG (0.01-1 mg/ml) on TNF α -induced VCAM-1 expression in endothelial cells. PDTC was used as positive control (* P <0.05, *** P <0.0001 vs TNF α alone; n=3). B. Effect of MPG (0.01-1 mg/ml) on endothelial cell viability. C Cumulative concentration-response curves for MPG-induced relaxation of PhE (1 μ M)-contracted aorta rings with (+E) and without (–E) endothelium. D Cumulative concentration-response curves for MPG-induced relaxation of PhE (1 μ M)-contracted pulmonary artery rings. E Relaxing effect of MPG on PhE (1 μ M)-contracted pulmonary artery rings in the absence and presence of L-NAME (3 μ M), indomethacin (10 μ M) or gibenclamide (10 μ M). Relaxation induced by CCh in the presence and absence of L-NAME was used as control (*** P <0.0001 vs untreated, n=5).

Figure 2 MPG effects on vascular smooth muscle cells. MPG (0.01-1 mg/ml) has no significant effect on vascular smooth muscle cell proliferation (A) and viability (B) (n=4).

Figure 3 MPG reduces chronic hypoxia-induced PAH. (A) Mean PAP and [RV/(LV+S)] ratio determined in control rats (normoxia), rats exposed to hypoxia for 21 days, and MPG-treated rats (400 mg kg⁻¹ day⁻¹) exposed to hypoxia.. (^{##} P <0.001 vs normoxia, * P <0.05 vs untreated hypoxic rats, n = 5-8). C. Representative sections of lung tissue (top) and quantification of the relative thickness of small pulmonary artery (20-60 μ m) wall (bottom) in samples from control, hypoxic (21 days) and MPG-treated hypoxic rats (^{##} P <0.001 vs control, * P <0.05 vs untreated hypoxic rats). D Phosphorylation and expression of p38 MAPK have been analyzed by western blot in lungs from control rats and rats exposed to hypoxia for 21 days, untreated and treated with MPG (3 different samples representative of each condition). Graph shows

densitometric analysis of P-p38 in blots, relative to p38 expression and normalized to controls. ([#]*P*<0.01 vs control, **P*<0.05 vs untreated hypoxic rats, n=6).

Figure 4 MPG improves endothelial function in hypoxic rats. A Cumulative concentration-response curves for CCh-induced relaxation of PhE (1 μ M)-contracted pulmonary artery rings from hypoxic (21 days, ●) and MPG-treated hypoxic rats (○). Tension is expressed as percentage of the amplitude of the PhE-induced contraction (n=5). B Phosphorylation and expression of eNOS have been analyzed by western blot in lungs from control rats and rats exposed to hypoxia for 21 days, untreated and treated with MPG (3 different samples representative of each condition). Graph shows densitometric analysis of P-eNOS in blots, relative to eNOS expression and normalized to controls. (**P*<0.05 vs untreated hypoxic rats, n=6).

Figure 5 Identification of MPG extract compounds. A UV chromatogram of MPG extract recorded at 280 nm. Numbered peaks were identified according to their UV and HRMS spectra. B List of compounds identified in MPG extracts corresponding to peak numbers indicated in A.

Figure 6 Effect of L-tryptophan and quercetin. A Cumulative concentration-response curves for L-tryptophan- and quercetin-induced relaxation of PhE (1 μ M)-contracted pulmonary artery rings with endothelium. (B) Mean PAP, (C) [RV/(LV+S)] ratio and (D) relative thickness of small pulmonary artery (20-60 μ m) wall (bottom) determined in control rats (normoxia), rats exposed to hypoxia for 21 days, L-tryptophan-treated (50 mg kg⁻¹ day⁻¹, IP) and quercetin-treated (100 mg kg⁻¹ day⁻¹ in drinking water) rats exposed to hypoxia.. ([#]*P*<0.01 and ^{##}*P*<0.001 vs normoxia, **P*<0.05 and ****P*<0.0001 vs untreated hypoxic rats, n = 5-8)

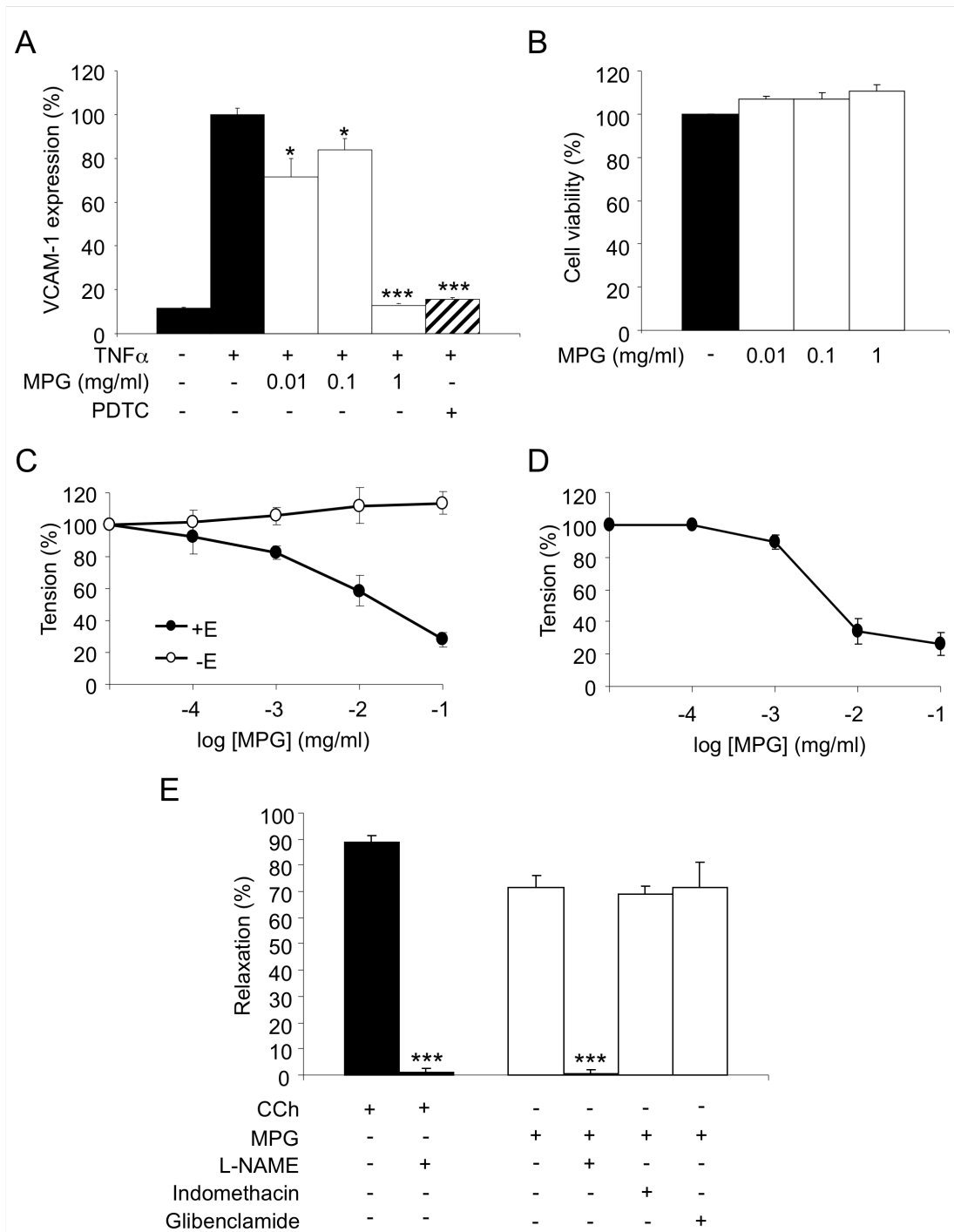


Figure 1

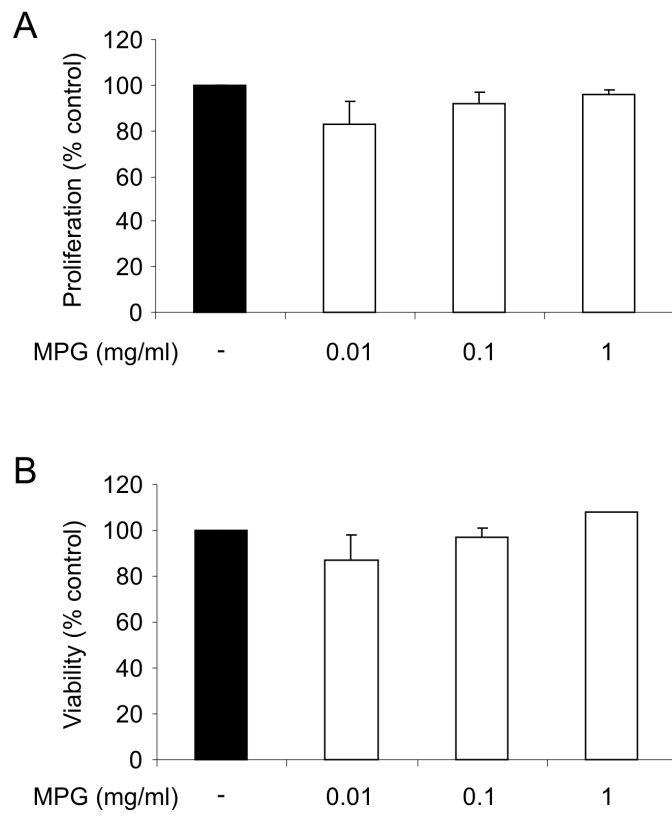


Figure 2

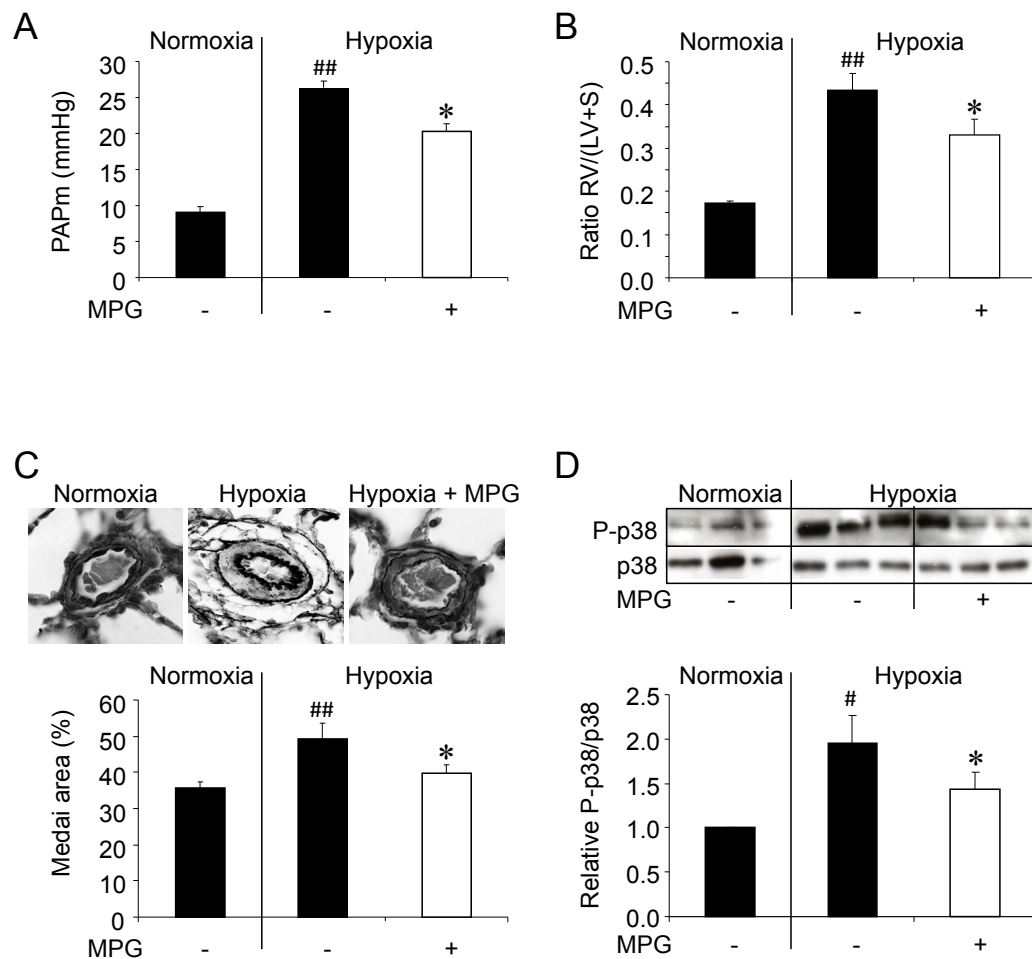


Figure 3

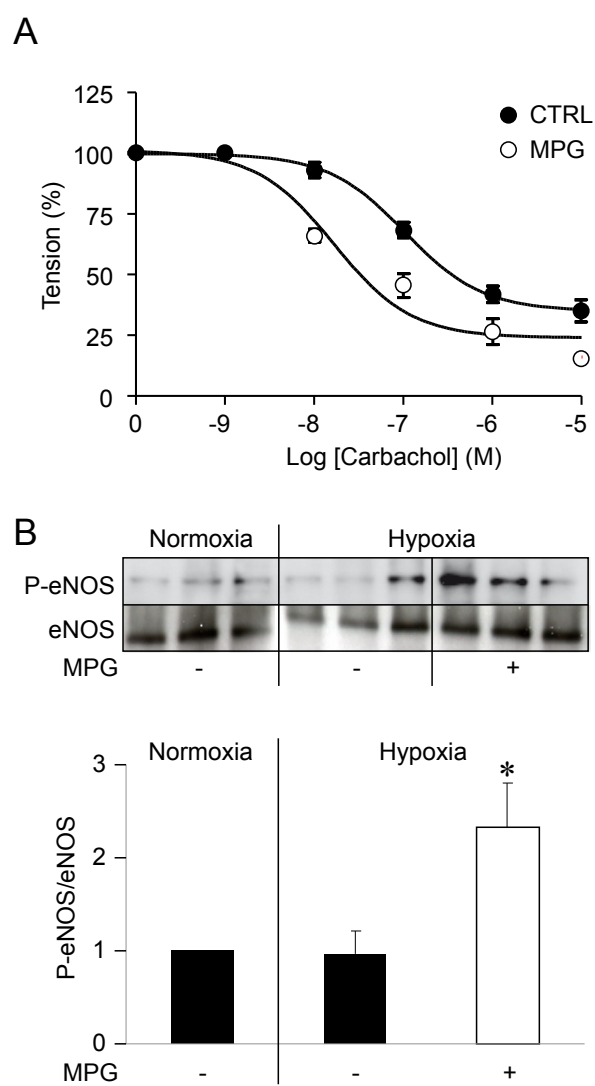
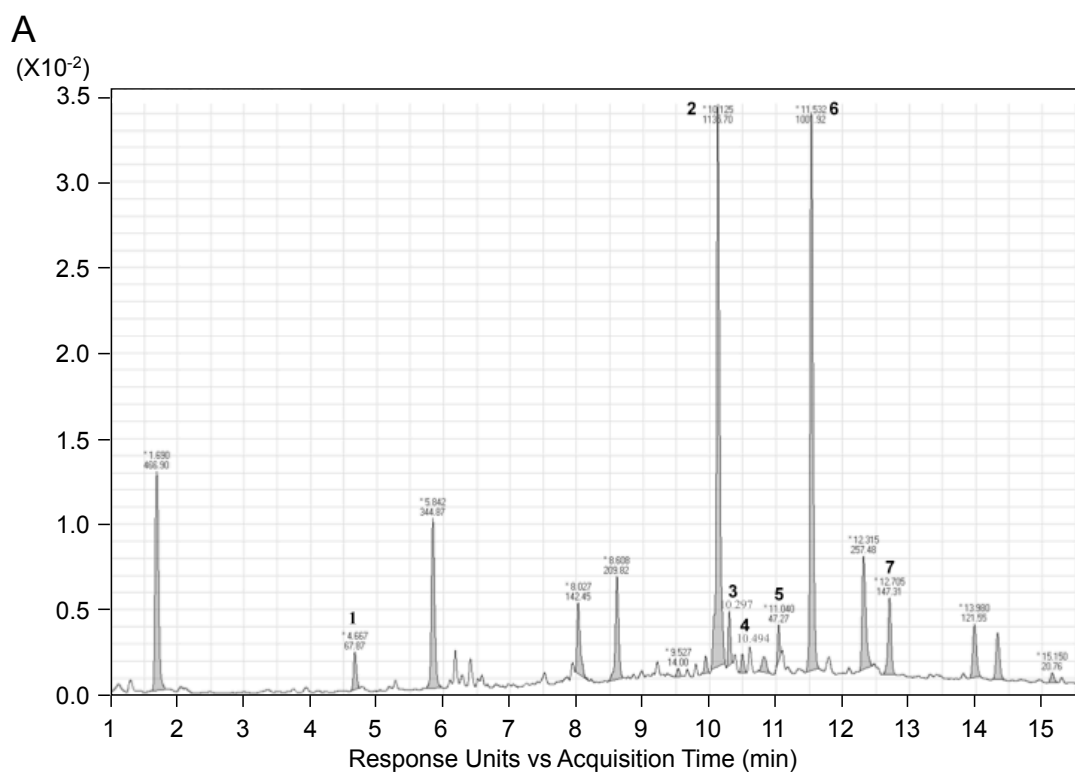


Figure 4



B

Compound	Tr (min)	Formula	[M+H] ⁺ (m/z)	[M+Na] ⁺ (m/z)	[M+K] ⁺ (m/z)	Name
1	4.667	C ₁₁ H ₁₂ N ₂ O ₂	205.0968			Tryptophan
2	10.125	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₂	465.1042	487.0862	503.0596	Myricitrin
3	10.297	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₂	465.1048	487.0872	503.0582	Quercetin 3-O-hexose
4	10.494	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₂	465.1041	487.0849	503.0581	Quercetin 3-O-hexose
5	11.040	C ₂₀ H ₁₈ O ₁₁	435.0939	457.0761	473.0503	Quercetin 3-O-pentose
6	11.532	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₁	449.1096	471.0914	487.0000	Quercitrin
7	12.705	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₀	433.1142	455.0957	471.0914	Kampferol 3-O-desoxyhexose

Figure 5

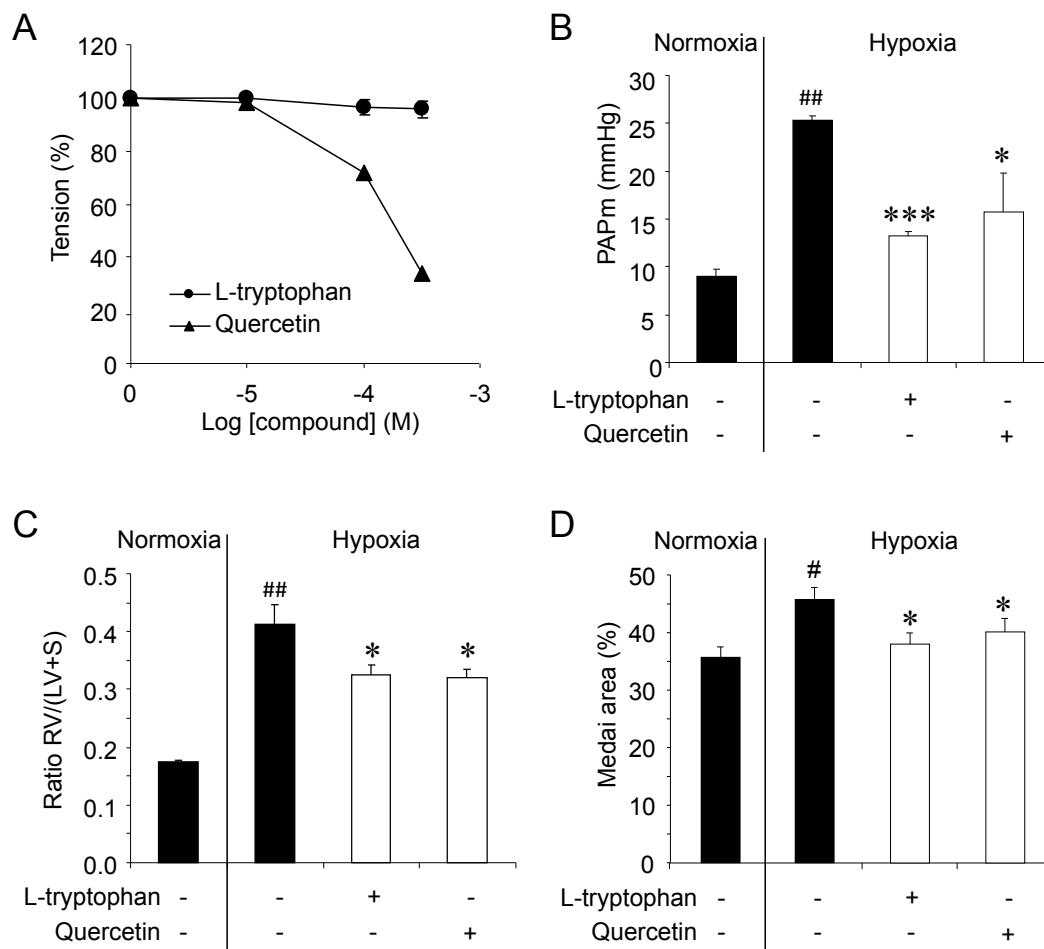


Figure 6

Protective cross talk between activated protein C and TNF signaling in vascular endothelial cells: implication of EPCR, noncanonical NF- κ B, and ERK1/2 MAP kinases

Christophe Guitton,^{1,2} Alice Cottureau,¹ Nathalie Gérard,¹ Thibaut Quillard,¹ Annabelle Chauveau,¹ Julie Devallière,¹ Pierre Tonnerre,¹ and Béatrice Charreau¹

¹Institut national de la santé et de la recherche médicale (INSERM), U643, Institut de Transplantation et de Recherche en Transplantation (ITERT), Nantes, France; and ²Service de réanimation médicale, Center hospitalier universitaire (CHU) Nantes, and Faculté de Médecine, Université de Nantes, Nantes, France

Submitted 6 January 2010; accepted in final form 21 December 2010

Guitton C, Cottureau A, Gérard N, Quillard T, Chauveau A, Devallière J, Tonnerre P, Charreau B. Protective cross talk between activated protein C and TNF signaling in vascular endothelial cells: implication of EPCR, noncanonical NF- κ B, and ERK1/2 MAP kinases. *Am J Physiol Cell Physiol* 300: C833–C842, 2011. First published January 12, 2011; doi:10.1152/ajpcell.00003.2010.—Activated protein C (APC) is a natural anticoagulant protease that displays cytoprotective and antiinflammatory activities and has been demonstrated to reduce mortality of patients with severe sepsis. However, APC signaling is not fully understood. This study further investigated the antiinflammatory effects of APC in vascular endothelial cells (EC) and examined the cross talk between APC and TNF signaling. Analysis of the regulatory mechanisms mediated by APC on vascular human EC shows that APC impairs TNF signaling by triggering a preemptive activation of intracellular pathways. We found that APC signaling causes a moderate but significant induction of cell adhesion molecules (CAMs) including VCAM-1 at mRNA and protein levels. Activation of the noncanonical NF- κ B and ERK1/2 are both pivotal to APC signaling leading to VCAM-1 expression. APC upregulates TNF receptor-associated factor 2 (TRAF2) and phosphorylates NF- κ B p65 at Ser276 and Ser536 independently of I κ B degradation. The ultimate protective antiinflammatory effect of APC in response to TNF is associated with a sustained activation of ERK1/2 and Akt while phosphorylation of NF- κ B p65 is precluded. Inhibitors of ERK (PD98059 and U0126) abolish the antiinflammatory signal mediated by APC. Blocking antibodies and silencing assays also suggest that, in EC, protease-activated receptor 1 and endothelial protein C receptor (EPCR) both conduct ERK activation and VCAM-1 induction in response to APC. To conclude, APC protects EC by attenuating CAM expression during inflammation. APC engages a regulatory cross talk involving EPCR, ERK, and NF- κ B that impairs TNF signaling.

coagulation; endothelium; tumor necrosis factor signaling; protective signaling pathways; inflammation; endothelial protein C receptor

THE ENDOTHELIUM IS A FUNCTIONAL barrier between the vessel wall and bloodstream, which exhibits a variety of important functions, including control of coagulation, fibrinolysis, vascular tone, growth, and immune response (14). It is now clear that dysfunction of the endothelium disturbs a physiological protective regulatory balance, which is a critical factor in the progression of inflammatory and autoimmune diseases, in atherosclerosis, and in transplant rejection (9, 10, 20, 26, 27). The endothelium can be considered as a first link between

inflammation and coagulation since activated endothelium during inflammation represents a surface where proteins involved in both coagulation and the development of inflammation are expressed (1, 12).

Activated protein C (APC) is an anticoagulant protease that elicits cytoprotective and antiinflammatory activities and has been shown clinically to reduce mortality of patients with severe sepsis (3). APC binds to specific receptors mainly expressed on endothelial cells (EC) known as endothelial protein C receptors (EPCR) (19). In vivo, the antiinflammatory effects of APC that are independent of its anticoagulant effects include inhibition of neutrophil adhesion, decreased TNF- α synthesis, and decreased drops in blood pressure (see Ref. 15 for review). APC has multiple effects in tissue culture systems, including regulation of gene expression, limitation in proinflammatory activity, attenuation of inflammatory cytokine and chemokine generation, and upregulation of antiapoptotic genes of the Bcl-2 family of homologs (7, 13, 16, 30).

Mechanistically, APC has multiple signaling effects that may involve multiple receptors and cell signaling pathways. Earlier studies using gene expression analysis suggested that recombinant APC inhibited TNF induction of cell surface adhesion molecules (e.g., VCAM, ICAM, E-selectin) through a regulatory effect on the NF- κ B pathway (16). Some evidence also suggests that recombinant APC also upregulated genes associated with cell survival and protection against apoptosis including Bcl-2 homolog (A1), endothelial nitric oxide synthase (eNOS), and the inhibitor of apoptosis (IAP), and suppression of the apoptosis-associated genes calreticulin and TRMP-2 (16). APC has also been demonstrated to activate the mitogen-activated protein kinase (MAPK) pathway in EC in vitro. Riewald et al. (28) reported that APC, by interacting with EPCR on EC, induces phosphorylation of MAPK via protease-activated receptor 1 (PAR1) activation. Activation of ERK1 and 2 is a prerequisite for endothelial cell proliferation induced by APC (31). Furthermore, because MAPK are also implicated in the TNF signaling pathway, APC could also modulate inflammation and apoptosis via activation of the MAPK (24, 29). However, the mechanism by which APC exerts antiinflammatory and cytoprotective signaling in endothelial cells is not fully understood.

In the present study, we examined signaling pathways triggering the cross talk between inflammation and coagulation mediated by APC using primary cultures of human arterial endothelial cells (HAEC). How the signaling specificity of APC may change TNF-mediated signaling and the respective

Address for reprint requests and other correspondence: B. Charreau, INSERM U643, ITERT, CHU Hôtel-Dieu, 30 Bd Jean Monnet, F-44093 Nantes, France (e-mail: Beatrice.Charreau@univ-nantes.fr).

involvement of EPCR and PAR receptors have been investigated further in EC.

MATERIALS AND METHODS

Cell culture and reagents. Primary cultures of HAEC and human umbilical vein EC (HUVEC) were generated and cultured as we previously reported (9). EC were grown in endothelial basal growth medium (ECBM, Promocell, Heidelberg, Germany) supplemented with 10% fetal calf serum (FCS), 0.4% EC growth supplement-heparin, 0.1 ng/ml human epidermal growth factor, 1 ng/ml human basic fibroblast growth factor, 1 µg/ml hydrocortisone, 50 µg/ml gentamicin, and 50 ng/ml amphotericin B. For activation, confluent EC monolayers were cultured with human TNF-α (provided by Professor P. Neuman, BASF, Ludwigshafen, Germany). Human recombinant IL-1β (R&D Systems, Abingdon, UK) was used at 5 ng/ml. Activation experiments were performed in six-well plates using confluent EC monolayers. Cells were deprived for 18 h in ECBM supplemented with only 2% FCS before incubation with 100 U/ml recombinant human TNF or APC (from 5 min to 8 h). When applicable, cells were preincubated with inhibitors for 1 h or APC for 8–24 h before incubation with TNF. Synthetic PAR agonist and control peptides (purchased from Peptides International, Louisville, KY) were as follows: PAR1 agonist peptide (ap) 1: SFLLRN-NH₂ (20 and 100 µM); PAR1 ap2: TFLLR-NH₂ (5 and 10 µM); PAR2 agonist: 3-mercaptopropionyl-F-Cha-Cha-RKPNNDK-amide (10 and 50 µM); and PAR4 agonist peptide: AYGKF-NH₂ (10 µM and 50 µM).

Recombinant human APC [Drotrecogin alfa (activated); Xigris] was kindly provided by Lilly-France. When applicable, experiments involving APC contained 100 nM hirudin (Refudan) to exclude thrombin signaling. Pyrrolidine dithiocarbamate (PDTC, 10 µM), U0126 (5 µM), PD98059 (10 µM), and MG132 (1 µM) inhibitors were purchased from Calbiochem (St Quentin Fallavier, France).

Cell lysis and Western blot analysis. Cell lysis was performed on ice in 100 mM NaCl, 5 mM MgCl₂, and 1% Nonidet-40 in the presence of the following protease inhibitors: [4-(2-aminoethyl)benzenesulfonyl fluoride] (AEBSF), E-64, bestatin, leupeptin, aprotinin, and sodium EDTA (Protease Inhibitor Cocktail; Sigma, St. Quentin Fallavier, France). Protein concentration was determined using bicinchoninic acid protein assay reagent (Pierce, Rockford, IL). Cell lysates (20 µg) were resolved by SDS-PAGE (12%), and proteins were transferred to nitrocellulose membranes (ECL Hybond; Amersham, UK) using a Trans-Blot SD Semi-Dry Electrophoretic Transfer Cell (Bio-Rad). Then, membranes were subjected to Western immunoblot analysis using primary antibodies described above and appropriate peroxidase-conjugated secondary antibodies. After incubations and washes, antibody-bound proteins were detected using an enhanced chemiluminescence ECL Western blotting analysis system (Amersham), and the membranes were exposed to Kodak X-Omat LS X-ray film. Blot quantification was performed with a Kodak Digital Science Image Station 440 CF, and densitometry was performed using Multi Gauge software (version 3.0).

Mouse monoclonal antibody directed against human VCAM-1 was purchased from Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA) (clone E-10) (1:1,000 dilution). Rabbit and mouse monoclonal antibodies directed against total and/or phosphorylated form of Akt (Ser473), IκBα (Ser32), NF-κB p65 (Ser536, Ser276, Ser468, Lys310), eNOS (Ser1177), p38 (Thr180/Tyr182), ERK1/2 (Thr202/Tyr204), JNK/SAPK (Thr183/Tyr185), phosphoinositide-dependent kinase 1 (PDK1), TNF receptor (TNFR)-associated factor 2 (TRAF2), NF-κB-inducing kinase (NIK), IKK, and RelB were purchased from Cell Signaling Technology (Ozyme, St Quentin Yveline, France) (1:1,000 dilution). Mouse anti-GAPDH antibody was from Chemicon (Val de Fontenay, France) and used (1:5,000 dilution) to quantify total protein. Anti-mouse (1:2,000 dilution) and anti-rabbit (1:1,000 dilution) (both from CST) and anti-goat (1:2,000 dilution: from Serotec) IgG,

horseradish peroxidase were used as secondary antibodies. When applicable, EC were incubated with blocking anti-EPCR (RCR-252, 25 µg/ml), anti-PAR1 (ARAP2, 25 µg/ml), or irrelevant control antibodies (Abs; Zymed, Invitrogen, France) for 20 min at room temperature before incubation with recombinant APC.

ERK activation was measured using a cell-based ERK1/2 ELISA kit that allows the concomitant quantification of phosphorylated (Thr202/Tyr204) and total ERK1/2 [RayBio Cell-based ERK1/2 (activated) ELISA sample kit]. Experiments were performed in triplicate according to the manufacturer's recommendations (Ray-Biotech, Norcross, GA).

Fluorescence-activated cell sorting analysis and immunofluorescence. After treatment, EC were harvested using trypsin-EDTA and washed in PBS, 1% FCS, and 0.1% NaN₃ at 4°C. The cells were incubated with primary polyclonal or monoclonal antibodies (10 µg/ml in PBS, 1% FCS, 0.1% NaN₃) for 30 min at 4°C. Mouse monoclonal antibodies directed against human VCAM-1, E-selectin (CD62E), ICAM-1 were purchased from R&D Systems (Lille, France), polyclonal goat Abs against EPCR were from R&D Systems, and monoclonal anti-PAR1 (ATAP12) was from Zymed (Invitrogen, France). After washing in PBS-1% FCS-0.1% NaN₃, cells were stained (30 min, 4°C) with a FITC- or phycoerythrin (PE)-labeled secondary donkey anti-goat or goat anti-mouse IgG F(ab')₂ antibody (Jackson Laboratories, West Grove PA). Control staining was with irrelevant isotype-matched antibodies. Fluorescent labeling was measured on 10,000 cells/sample using a FACScalibur and analyzed with CellQuest software (Becton Dickinson, Mountain View, CA). For immunofluorescence, EC were grown to confluence on glass coverslips. After treatment, cultures were washed with PBS, fixed for 20 min in PBS containing 4% paraformaldehyde, and permeabilized with 0.1% Triton X-100 for 15 min. Cells were washed again with PBS, incubated overnight at 4°C with blocking buffer (5% BSA in PBS), and then incubated with tetramethylrhodamine isothiocyanate-phalloidin (Sigma) or monoclonal anti-p65, anti-phospho-Akt, anti-JNK/SAPK antibodies (from CST, 10 µg/ml) for 4 h. Slides were rewashed and incubated with PE- or FITC-conjugated goat anti-mouse antibodies (5 µg/ml, Jackson) and DAPI for 1 h. Slides were washed in PBS, dried, and mounted with ProLong antifade reagent (Molecular Probes). Specimens were examined by immunofluorescence microscopy using a Nikon Diaphot microscope (Nikon, Japan).

Transfections and reporter gene assays. Transfections were performed using lipofectAmine+ reagent (Invitrogen, Cergy Pontoise, France), and VCAM-1 and NF-κB promoter-luciferase reporter constructs were kindly provided by Dr. M. Soares (Instituto Gulbenkian de Ciência, Oeiras, Portugal). Transfected cells (HUVEC) were incubated with and without APC, hirudin, and TNF (100 U/ml) for the various periods of time. Untreated and TNF-treated EC were used as negative and positive controls, respectively. Cell extracts were obtained using the Promega (Madison, WI) cell culture lysis reagent extraction kit, and luciferase activity was assayed (luciferase assay system, Promega) according to the manufacturer's instructions. Results shown are means ± SD from four separate experiments performed in duplicate wells, normalized, and are expressed in arbitrary luciferase units.

RNA isolation and RT-PCR. RNA from treated EC was collected by TRIzol extraction (Invitrogen). Genomic DNA was removed by DNase treatment (Roche, Indianapolis, IN), and mRNAs were reverse transcribed into first-strand cDNAs using polydT oligonucleotide and Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase (Invitrogen). The following oligonucleotides were used in this study as primers in PCR and to design probes: human VCAM-1 forward: 5'-CTCACCTTAATTGCTATG-3' and reverse: 5'-GTTTTTACCTTCTAAGAC-3'; human β-actin forward: 5'-AATCTGGCACCACACCTTCTACA-3' and reverse: 5'-CGACGTAGCAGCTTCTCTCTTA-3' (Genosys, Sigma, St Quentin Fallavier, France). Target transcripts were amplified in 25 µl of PCR mix containing 10× buffer, 50 mM MgCl₂, 2.5 mM dATP, dCTP, dGTP, and dTTP, 100 pmol/µl of each primer and Taq DNA polymerase

(Invitrogen). The cycling conditions were as follows: 5 min at 95°C to activate the Taq DNA polymerase, cycles of 1 min at 95°C and 45 s at both 60°C and 72°C—between 18 and 23 cycles were used depending on the primers—and the reaction was finished with 3 min at 72°C and storage at 4°C. PCR products were separated on 1% agarose-gel in the presence of ethidium bromide.

Quantitative real-time PCR. Real-time quantitative PCR (qPCR) was performed in an Applied Biosystems GenAmp 7700 Sequence Detection System using labeled TaqMan probes (Applied Biosystems, Foster City, CA). The following commercial ready-to-use primers/probe mixes were used (Applied Biosystems): VCAM-1 (Hs00365486_m1), hypoxanthine guanine phosphoribosyl transferase (HPRT) was used as an endogenous control to normalize RNA amount. Relative expression between a given sample and a reference sample was calculated according to the $2^{-\Delta\Delta C_t}$ method (where C_t is cycle threshold), where the reference represents onefold expression, as previously described (21).

Short interfering RNAs and silencing. Short interfering RNAs (siRNAs) were designed, synthesized, and purchased from Ambion

(Applied Biosystems). Cells were transiently transfected with 10 nM of nontargeting (ns) or target-specific siRNAs using LipofectAMINE RNAiMAX reagent according to the manufacturer's instructions (Invitrogen). The following target-specific siRNAs were used for transfection: EPCR-siRNA-1 targeting the mRNA sequence 5'-GTGGAT-GCCTTCGGGTCA-3' and the ns-siRNA 5'-CTACGTCCAG-GAGCGCACC-3', the PAR1 siRNA targeting the mRNA sequence 5'-GCAATGAGCTGTTGAAGA-3. The efficiency of silencing determined by Western blots and flow cytometry analyses in each experiment ranged from 70% to >90%.

Statistical analysis. Results are expressed as means $\pm$ SD. Data were analyzed using Prism software (version 4.0; GraphPad), and statistical significance was determined using InStat software (version 3.0; GraphPad). Group comparisons were made using two-tailed Student's *t*-tests, and analysis of variance was used when more than two treatment regimens were compared. When applicable, quantitative variables were compared using nonparametric Kruskal-Wallis test. This analysis was completed with a post hoc Dunns test. A value of $P < 0.05$ was considered statistically significant.

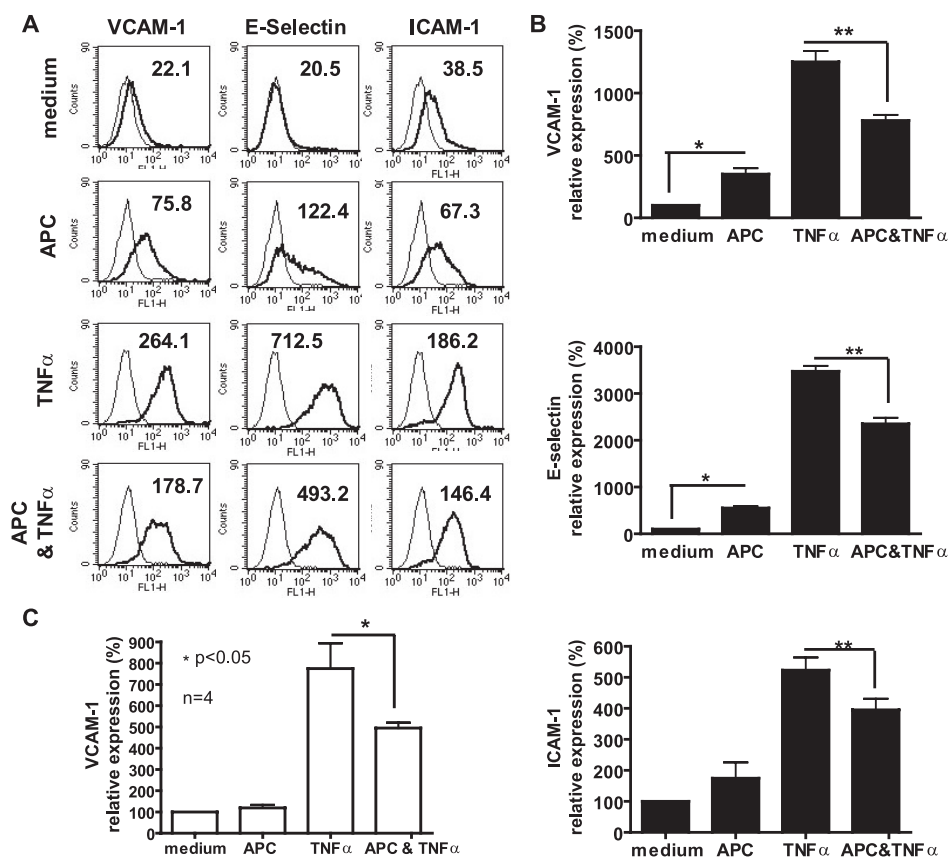


Fig. 1. Regulatory effect of recombinant activated protein C (APC) on cell adhesion molecule (CAM) expression in unstimulated and TNF-activated endothelial cells (EC). A: representative FACS analysis showing the expression of VCAM-1, E-selectin, and ICAM-1 on cultured EC 8 h after incubation with medium alone, TNF-α, APC, or TNF-α following a pretreatment with APC (180 nM) for 16 h. B: quantitative analysis from 4 independent FACS experiments. Results shown are mean values $\pm$ SD; * $P < 0.05$ vs. basal; ** $P < 0.05$ vs. TNF-α. C: quantitative analysis of VCAM-1 expression on EC treated with APC alone (24 h) or APC (16 h) and/or TNF-α (8 h) performed by FACS. Results shown are mean values $\pm$ SD from 4 independent experiments; * $P < 0.05$.

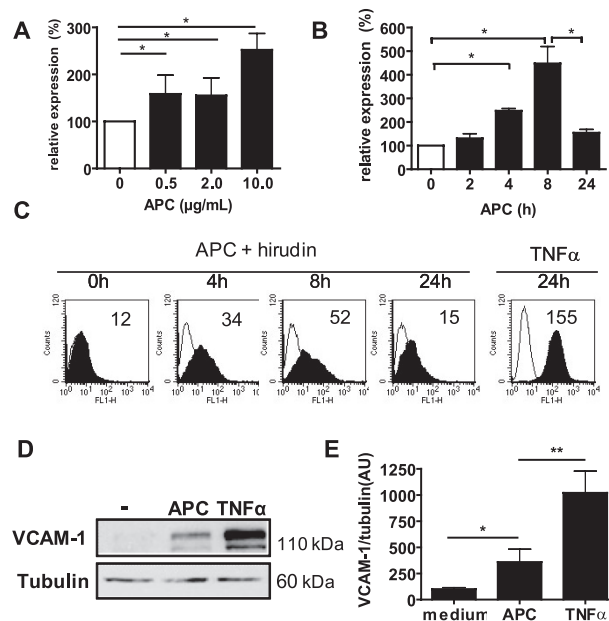
RESULTS

Activated protein C modulates cell adhesion molecule expression in vascular endothelial cells. Earlier studies reported that APC upregulates a broad set of genes encoding protective and anti-inflammatory molecules (7, 13, 16). However, the protective signaling driven by APC is still not fully elucidated. In the present study, a possible crosstalk between TNF and APC signaling was investigated in primary cultures of human vascular EC. Firstly, to test whether APC signaling may interfere with TNF signaling, EC were preincubated with APC and subsequently challenged with TNF- α . Expression of cell adhesion molecules (CAM) was analyzed by flow cytometry. As shown Fig. 1, pretreatment with APC significantly reduces the TNF- α -mediated expression of the CAMs, VCAM-1, E-selectin (CD62E), and ICAM-1 (Fig. 1A). APC reduces by 25–40% the ability of TNF- α to upregulate CAM expression in EC with $37.6 \pm 6.2\%$ of inhibition for VCAM-1, $32.4 \pm 7.9\%$ for E-selectin, and $24.5 \pm 6.8\%$ for ICAM-1 (Fig. 1B, $P < 0.05$ vs. TNF-treated EC). However, we found that EC treated for 8 h with APC alone exhibit a significant increase in VCAM-1 (3.5-fold increase as compared with basal level) and E-selectin (5.5-fold increase as compared with basal level) expression as compared with untreated controls (Fig. 1B, $P < 0.05$ vs. untreated EC). No significant increase was found for ICAM-1. In addition, no increase in VCAM-1 was observed when EC were treated with APC alone for 24 h (Fig. 1C), indicating that APC triggers a transient and selective upregulation of CAMs.

The regulatory effect of APC on VCAM-1 expression was further investigated using TNF- α as a positive control for EC

activation and signaling. As shown in the Fig. 2, the regulatory effect of APC on VCAM-1 expression was concentration dependent (Fig. 2A), significant at 0.5 $\mu\text{g/ml}$ of APC and maximal 8 h after treatment (Fig. 2B). VCAM-1 expression was still observed in the presence of hirudin, indicating that thrombin contamination could not account for the induction of VCAM-1 expression (Fig. 2C). Induction of VCAM-1 protein expression in response to APC was confirmed by Western blot analysis (Fig. 2D). Western blot quantification (Fig. 2E) from three independent experiments confirmed an increased VCAM-1 level in response to APC up to 3.6 ± 0.8 -fold increase of basal level as compared with a 10.2 ± 1.9 -fold increase in response to TNF ($P < 0.05$ vs. untreated EC and TNF-activated EC). Next, RT-PCR assays were performed on EC treated with APC (180 nM) or TNF- α (100 U/ml) for various periods of time (from 2 h to 24 h). TNF- α induced a transient accumulation of high levels of VCAM-1 mRNA in EC (maximum 420-fold increase as compared with basal level) while the transient upregulation in VCAM-1 mRNA mediated by APC was significant but moderate (maximum 50-fold increase as compared to basal level). Thus, RT-PCR assays indicate that an increase in mRNA level correlates with cell surface protein level for VCAM-1 in cells treated with APC (Fig. 3). Using a VCAM-1 gene promoter driven luciferase reporter assay allowed us to establish that APC induces VCAM-1 promoter activity in EC (Fig. 3C). Again, although moderate as compared with activity induced by TNF- α , VCAM-1 promoter activity induced by APC was significant compared with controls ($P < 0.05$). Together, these results strongly suggest that recombinant APC mediates VCAM-1 expression in EC through activation of

Fig. 2. VCAM-1 protein regulation by recombinant APC. A: concentration-response analysis of VCAM-1 surface expression on EC after 8-h treatment with recombinant APC. B: time course analysis of VCAM-1 surface expression on EC after treatment with recombinant APC (180 nM). Results shown in A and B are mean fluorescent intensity (MFI) values $\pm$ SD from 6 (A) and 3 (B) independent experiments; $*P < 0.05$ vs. controls. C: representative FACS analysis showing VCAM-1 expression (filled histograms) after treatment with APC (10 $\mu\text{g/ml}$) in the presence of hirudin (2 $\mu\text{g/ml}$). VCAM-1 expression in response to a 24-h stimulation with TNF (100 U/ml) is shown as a positive control. Negative controls were performed using an isotype-matched control IgG (empty histograms). Specific MFI values are indicated. Results are representative of 3 experiments. D: representative immunoblot out of three showing VCAM-1 protein expression in cell lysates from EC treated with APC (180 nM) or TNF- α (100 U/ml) for 8 h. Blot was reprobed with anti-tubulin antibodies to ensure equal protein loading in samples. E: quantitative analysis from 3 independent Western blot experiments. Results shown are mean [expressed as arbitrary units (AU)] values $\pm$ SD; $*P < 0.05$ vs. basal; $**P < 0.05$ vs. TNF- α .



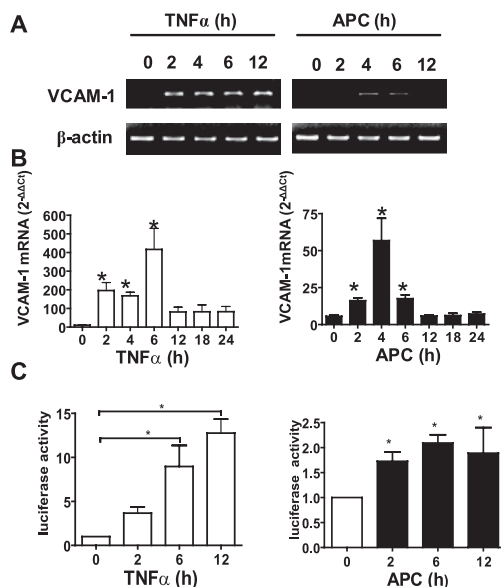


Fig. 3. Effect of APC on *VCAM-1* gene transcription. *A* and *B*: time course analysis of steady-state *VCAM-1* mRNA in cultured EC treated with APC (180 nM) or TNF-α (100 U/ml) performed by semiquantitative RT-PCR (*A*) and quantified by real-time quantitative PCR (*B*). Ct, cycle threshold. *C*: *VCAM-1* gene reporter assays. Human umbilical vein EC (HUVEC) were transfected with a *VCAM-1* promoter-luciferase reporter construct or an empty vector as a control. Transfected cells were incubated with and without APC (180 nM) and TNF-α (100 U/ml) for the various periods of time. Untreated and TNF-α-treated control EC were used as negative and positive controls, respectively. All treatments were performed in the presence of hirudin (100 nM). After cell lysis, luciferase activity was assayed and normalized according to the manufacturer's instructions. Results shown are means $\pm$ SD from 4 separate experiments performed in duplicate wells, normalized, and are expressed in arbitrary luciferase units; * P < 0.05 vs. control.

VCAM-1 gene transcription. Gene expression profiling, using TaqMan Low Density Arrays targeting immune pathway, indicates that APC also drives a moderate but significant increase in transcript levels for some mediators of inflammation including ICAM-1, E-selectin, and IL-8. These regulations were subsequently confirmed by qPCR (data not shown).

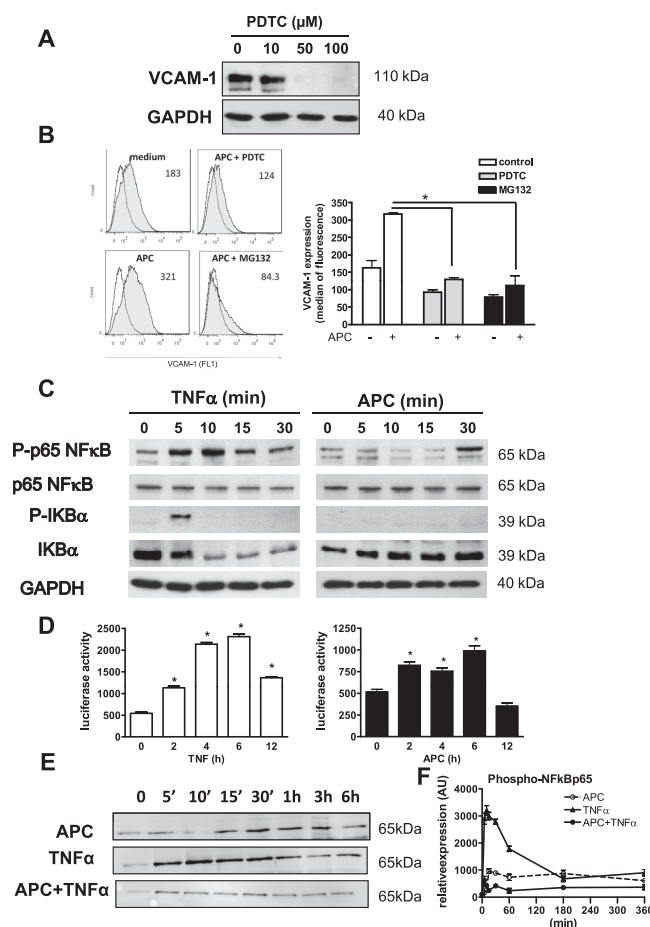
The noncanonical NF-κB pathway is pivotal in the regulation of *VCAM-1* by APC in endothelial cells. Induction of *VCAM-1* transcription by TNF-α is, as for the other CAMs E-selectin and ICAM-1, dependent on activation of the transcription factor NF-κB in EC (8, 32). Therefore, we speculated that NF-κB may also be involved in CAM regulation by APC. To test this possibility, EC were preincubated with synthetic inhibitors before treatment with APC (Fig. 4). We found that inhibition of NF-κB using PDTC or MG132 efficiently prevents *VCAM-1* expression as measured by Western blot (Fig. 4A) and by flow cytometry (Fig. 4B). Both effects were concentration dependent. Blocking the p38 MAPK with SB203580 has no significant effect (data not shown). To explore further the implication of NF-κB in the APC signaling, phosphorylation and degradation of RelA/p65 and IκBα were

analyzed by Western blotting (Fig. 4C). We found that TNF-α, a potent inducer of NF-κB, promotes a rapid phosphorylation of p65 at Ser536 that correlates with the phosphorylation and degradation of total IκBα. In comparison, neither phosphorylation at Ser32 nor degradation of IκBα was observed in response to APC. Nevertheless, a transient decrease in phospho-p65 basal level was found at 10 and 15 min preceding a late induction of the p65 phosphorylation at 30 min. EC were transiently transfected with a synthetic NF-κB-luciferase reporter derived from *E-selectin* promoter (5) and then challenged with either TNF or APC (Fig. 4D). Gene reporter assays showed that APC has only a modest effect on NF-κB promoter activity (maximum twofold increase, P < 0.05), whereas TNF drives up to fivefold increase (P < 0.05) in promoter activity. Time course of NF-κB p65 phosphorylation was examined in EC treated with both APC and TNF (Fig. 4E). We found that APC significantly inhibits p65 phosphorylation mediated by TNF at all time points.

Next, we sought to determine the mechanisms and signaling pathways activated by APC alone to examine how APC signaling may interfere with TNF signaling to downregulate inflammatory gene expression. In Fig. 5, immunoblots further show that APC drives a rapid and transient induction of TRAF2, NIK, and IKKα/β (at 15 min) followed by a late (at 1 h and 3 h) phosphorylation of p65 at Ser276, 463, and 536 and Lys310. Therefore, APC signaling is associated with an activation of the transcription factor NF-κB via a mechanism that is not associated with the canonical IκBα phosphorylation/degradation or NF-κB (i.e., RelA) nuclear translocation, although it affects NF-κB binding to DNA κB consensus sequences in the *VCAM-1* and *E-selectin* promoters.

ERK1/2 MAPK is activated by APC and serves as an antiinflammatory signal in endothelial cells. To explore further APC signaling in vascular endothelium, we next examined the effect of APC on phosphorylation of MEK1/2 and ERK1/2 (p42/44) in both resting and TNF-activated EC. As shown Fig. 6A, and consistent with earlier studies (31), intracellular levels of phosphorylated ERK1/2 began to increase 5 min after treatment with APC, peaking at 15 min after treatment, and thereafter gradually decreased to pretreatment levels. We found a parallel increase in phosphorylation of JNK2/3 MAPK with a similar time course, whereas phosphorylation of JNK1 was only significant at 30 min. In contrast, no phosphorylated p38 MAPK was detected in EC treated with APC alone, while in our conditions, p38 was efficiently phosphorylated in response to TNF-α. Moreover, when considering the phosphatidylinositol 3-kinase pathway, we found that phosphorylation of Akt occurred in response to APC but was delayed as compared with those observed in response to TNF and only found at 30 min. Downstream of Akt, phosphorylated eNOS was found preserved in response to APC, while upstream of PDK1, phosphorylation was not affected. APC-mediated cell signaling was confirmed by immunofluorescence (supplemental Fig. S1; Supplemental Material for this article is available online at the Journal website). Figure 6B also indicates that pretreatment with APC deeply inhibited major signaling events triggered by TNF. These changes include an enhanced phosphorylation of ERK1/2 and a sustained phosphorylation of Akt. A quantitative analysis is shown in Fig. 6C. The ability of APC to activate ERK1/2 in resting cells and to enhance ERK activation in TNF-treated cells was also confirmed by measuring activated

Fig. 4. Implication of NF- κ B in the regulatory action of APC. **A:** Western blot analysis of APC-mediated VCAM-1 expression after inhibition of the NF- κ B pathway using pyrrolidine dithiocarbamate (PDTC). A concentration-response analysis of inhibitor is shown. Blots were reprobed with anti-GAPDH antibodies to ensure equal protein loading. **B:** representative (left) and quantitative (right, from 3 experiments) FACS analysis showing the inhibitory effect of PDTC and MG132 on APC-induced expression of VCAM-1 on vascular EC (gray histograms). For FACS analysis, experimental negative controls were performed using an isotype-matched control IgG (empty histograms). Specific MFI values are indicated. Results are representative of 3 experiments. Quantification was obtained from 3 separate experiments. Controls for statistical analyses are cells treated without the inhibitors (* $P < 0.05$ vs. APC alone). **C:** comparative analysis by Western blots of NF- κ B signaling pathway in EC treated with TNF- α (100 U/ml) or recombinant APC (180 nM). Time course analyses are shown; blots were reprobed with anti-GAPDH antibodies to ensure equal protein loading. **D:** NF- κ B gene reporter assays. HUVEC were transfected with a NF- κ B-luciferase reporter construct or an empty vector as a control. Transfected cells were incubated with and without APC (180 nM), hirudin (100 nM), and TNF- α (100 U/ml) for the various periods of time. Untreated and TNF-treated control EC were used as negative and positive controls, respectively. After cell lysis, luciferase activity was assayed and normalized according to the manufacturer's instructions. Results shown are means $\pm$ SD from 4 separate experiments performed in duplicate wells, normalized, and are expressed in arbitrary luciferase units. **E** and **F:** representative (E) and quantitative (F) analysis of time course phosphorylation of NF- κ B p65 in EC treated with APC (180 nM) and/or TNF (100 U/ml). Data were normalized to GAPDH (not shown).



ERK using a cell-based assay (Fig. 6D, $P < 0.05$ vs. medium; $P < 0.05$ vs. TNF- α). In contrast, phosphorylation of NF- κ B p65 was prevented, confirming that inhibition of NF- κ B activity occurred.

The contribution of ERK to the regulatory functions of APC on VCAM-1 was investigated by employing MEK inhibitors, PD98059 (10 μ M) and U0126 (5 μ M). Treatment of EC with APC enhanced VCAM-1 expression. In the presence of PD98059, the effect of APC was markedly increased at 8 h (Fig. 7). Pretreatment with the other MEK inhibitor, U0126, also augmented VCAM-1 in response to APC ($P < 0.05$ vs. diluents). U0126 and PD98059 alone had no significant effect on VCAM-1 induced by TNF. The inhibitory action of both PD98059 and U0126 on ERK activation was confirmed by Western blots (data not shown). To further confirm the role of ERK in the modulation of VCAM-1 in inflammatory conditions, EC were pretreated with APC in the presence or absence

of inhibitors before stimulation with TNF. As shown in Fig. 7, the APC-mediated downregulation of VCAM-1 in response to TNF was significantly abrogated by PD98059 and U0126 ($P < 0.05$ vs. diluent). The data collectively suggest that ERK is activated by APC and serves as an antiinflammatory signal that suppresses expression of NF- κ B-dependent inflammatory genes probably by inhibiting IKK activity in EC.

PAR1 and EPCR equally mediate APC signaling that triggers VCAM-1 expression. PAR1 has been shown to be a major receptor mediating the protective effect of APC (28). The contribution of EPCR to APC signaling is still poorly defined. Thus, in this study we sought to define the upstream signaling events that account for ERK activation and VCAM-1 regulation in response to APC. First, contribution of the PAR receptors was assessed by analyzing VCAM-1 induction in response to agonists of PAR1, -2, and -4. PAR3 is not significantly expressed by EC (17). Agonist peptides

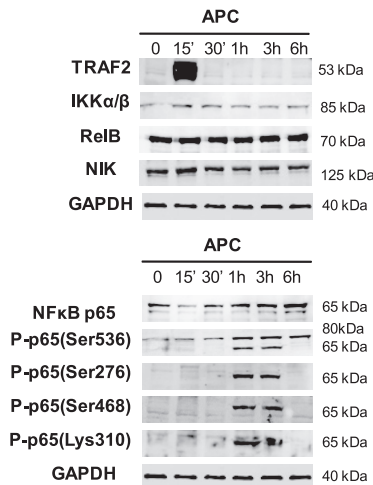


Fig. 5. APC signaling causes phosphorylation of NF- κ B p65. Representative Western blots showing the effect of APC on the NF- κ B pathway. A time course analysis of APC (180 nM) is shown. Immunoblotting was performed using antibodies against total and/or phosphorylated forms of NF- κ B p65 (Ser536, Ser276, Ser468, Lys310), TNF receptor-associated factor 2 (TRAF2), NF- κ B-inducing kinase (NIK), IKK α β , and RelB. Blots were reprobed with anti-GAPDH antibodies to ensure equal protein loading.

for PAR1 (PAR1-ap1 and -ap2) efficiently reproduced the induction of VCAM-1 obtained by recombinant APC in EC. In contrast and consistent with previous reports (29), no effect was found by using agonists of PAR2 and PAR4 (Fig. 8A). In experiments using blocking antibodies, VCAM-1 induction was totally suppressed using either anti-PAR1 or anti-EPCR antibodies, suggesting that both receptors equally contribute to APC signaling (Fig. 8B). To confirm this hypothesis, silencing of PAR1 and EPCR was achieved in vascular EC by the use of siRNA. Efficiency of siRNAs to silence EPCR and PAR1 is presented in Supplemental Fig. S2. Figure 8, C and D, further confirms by flow cytometry and by Western blotting, respectively, that silencing PAR1 or EPCR similarly abrogates VCAM-1 expression in response to APC. No additive effect was found by silencing both targets. A quantitative analysis comparing the blocking effect of antibodies and siRNAs is shown in Fig. 8E. Statistical analyses confirmed that antibodies and siRNAs targeting EPCR or PAR1 similarly inhibit the induction of VCAM-1 in response to APC ($P < 0.05$ vs. APC alone). Next, the respective impact of PAR1 and EPCR receptors was investigated in cells that express selectively EPCR or PAR1. As shown in Supplemental Fig. S3, in contrast to EC that express both PAR1 and EPCR, epithelial cells from the HeLa cell line only express EPCR but no PAR1, whereas the Jurkat T cells express PAR1 but not EPCR as determined by flow cytometry (Supplemental Fig. S3A). These cells were used as an experimental model to assess the respective role of PAR1 and EPCR in ERK1/2 activation. Western blots show that APC induces phosphorylated ERK only in cells expressing EPCR (EC and to a lesser extent HeLa) but not in T cells expressing PAR1 but no EPCR (Supplemental Fig. S3B).

Selective silencing of EPCR or PAR1 in EC similarly prevents ERK activation in EC (Supplemental Fig. S3C). Together, these findings sustain the fact that both receptors are required in EC to trigger APC signaling. These data also suggest that APC signaling and regulatory function may also differ according to cell type.

DISCUSSION

The recombinant form of human activated protein C, a natural anticoagulant serine protease, improves the outcome of patients with severe sepsis (3). The protective effect of APC supplementation in patients likely reflects the ability of APC to modulate multiple events implicated in the pathophysiology of sepsis. Indeed, in addition to the control of coagulation, APC also elicits cytoprotective and antiinflammatory activities established in several *in vitro* studies and animal models (18, 29, 30). Here we show that recombinant APC plays a regulatory role in EC by attenuating CAM expression during inflammation. We demonstrate that APC regulates both the noncanonical NF- κ B and ERK1/2 signaling pathways to modulate VCAM-1 expression in resting and activated EC.

Our results indicate that antiinflammatory function of recombinant APC in the presence of TNF- α requires an active phase of cellular signaling and activation of gene transcription in primary vascular EC. Analysis of VCAM-1 gene transcription and protein expression was used to assess the regulatory function of recombinant APC in inflamed endothelium. Although moderate as compared with TNF signaling, we found that APC signaling consistently induces VCAM-1 mRNA and protein. Gene reporter assays indicate that the increase in VCAM-1 mRNA after treatment with APC is due to an increase in the rate of gene transcription.

The transcription factor NF- κ B plays a central role in the regulation of inflammatory and immune responses, control of cell division, and apoptosis. The NF- κ B family of transcription factors is composed of five members sharing a consensus Rel homology domain, i.e., p50, p52, cRel, RelB, and RelA (p65), which is probably the predominant active form in EC (23). NF- κ B proteins form homodimers and heterodimers that can bind κ B DNA motifs in the promoter regions of "NF- κ B-dependent genes."

Activation of the NF- κ B pathway was further demonstrated by the induction of NF- κ B binding site-dependent transcriptional activation in APC-treated cells. These observations suggested that the induction of VCAM-1 genes by APC was at least in part related to activation of the NF- κ B pathway. This was supported by observations showing that the NF- κ B inhibitor PDTC greatly reduced the induction of the VCAM-1 expression by APC. The canonical pathway of NF- κ B activation, through the activation of various receptors, including those for TNF- α or IL-1 β , involves phosphorylation and ubiquitination of I κ B α and its subsequent degradation by the proteasome machinery (6). The activation of NF- κ B by several stress-inducing agents has been reported to involve a reduction in the level of I κ B protein; however, it does not involve phosphorylation and degradation of I κ B α but appears to be related to a reduction in the translation of I κ B mRNA. Not only degradation of I κ B and nuclear translocation of NF- κ B but also posttranslational modifications of NF- κ B, including site-spe-

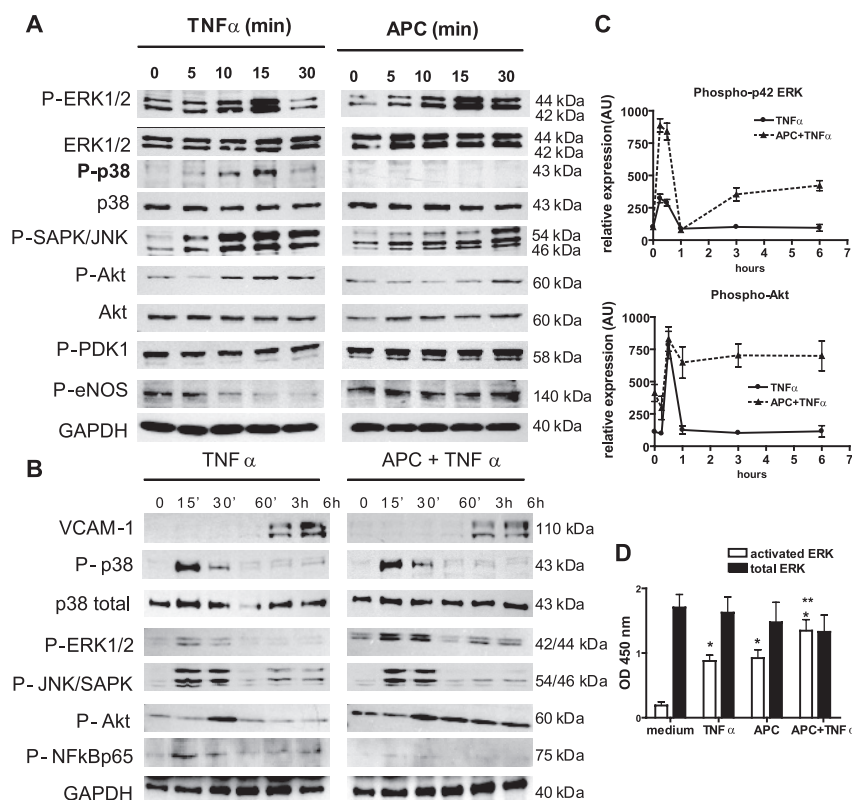


Fig. 6. APC signaling in EC and potential interference between APC and TNF signaling pathways. **A**: Western blots comparing the activity of the MAPKs (ERK1/2, p38, and JNK/SAPK) and the phosphatidylinositol 3-kinase [Akt, phosphoinositide-dependent kinase 1 (PDK1), and endothelial nitric oxide synthase (eNOS)] in EC treated with APC (180 nM) or TNF (100 U/ml). **B**: antagonistic effect of APC on TNF signaling in cultured vascular EC. Cells were treated with TNF (100 nM) with or without a preincubation with APC (180 nM) for 8 h. Cell lysates were subjected to Western blotting. Time course analyses are shown; blots were reprobbed with anti-GAPDH antibodies to ensure equal protein loading. **C**: quantitative time course analysis of ERK1/2 and Akt phosphorylation in response to APC and/or TNF from 3 independent Western blot experiments. Results were normalized by GAPDH values and are expressed as arbitrary units. **D**: activation of ERK1/2 in response to APC and/or TNF measured by a cell-based ELISA assay; * $P < 0.05$ vs. medium, ** $P < 0.05$ vs. TNF-treated cells. OD, optical density.

cific phosphorylation, particularly p65 phosphorylation, are important for optimal *trans* activation activity of NF- κ B. We found that APC causes neither I κ B phosphorylation nor degradation. Nevertheless, we demonstrated that recombinant APC regulates phosphorylation of p65/RelA at Ser276 in the Rel homology domain and Ser536, which is located on the *trans* activation domain. Thus, phosphorylation of NF- κ B p65 may be implicated in the regulation of VCAM-1, E-selectin, ICAM-1, and IL-8 reported here. Moreover, the phosphorylation status of p65 controls not only its transcriptional activity but also specificity for different subsets of target genes (2) and may at least in part be responsible for the selective induction of gene expression observed in APC-treated cells. Interestingly, induction of the adaptor TRAF2 was found as an early response to APC. TRAF2 recruits antiapoptotic cIAP1 and cIAP2 to the TNFR1 signaling complex through its COOH-

terminal TRAF-N domain and thereby inhibits the activation of effector caspases by TNF- α (25). The stable expression of wild-type TRAF2 completely inhibited TNF-induced cell death, suggesting that TRAF2 phosphorylation is not required for its protective action (4). Whether TRAF2 may account for the antiapoptotic action of APC in EC remains to be examined.

Mechanisms whereby APC may block the activation of NF- κ B by proinflammatory stimuli (i.e., TNF) were then analyzed. We found a major and early effect of APC on ERK1/2 and JNK MAP kinases, whereas no effect was found on p38, suggesting that activation of MAPK is upstream of NF- κ B activation that take place later. As suggested by our results, activation of ERK is required for the induction of VCAM-1 transcription. Indeed, together ERK and JNK trigger AP1 that in coordination with NF- κ B activity is required for VCAM-1 transcription. Thus we speculate that the early acti-

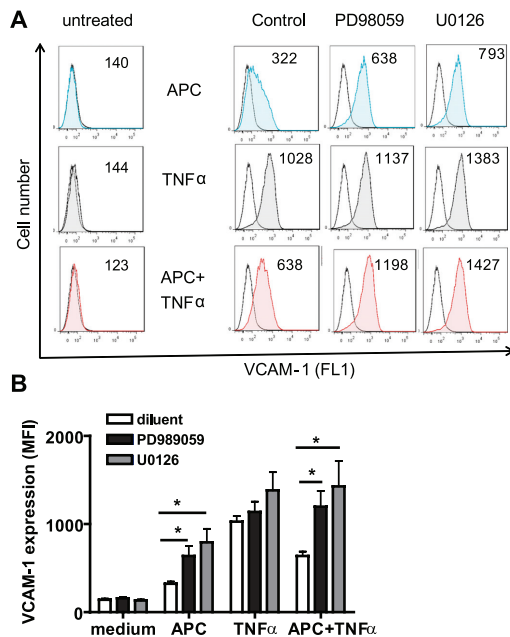


Fig. 7. ERK regulates the modulation of VCAM-1 expression triggered by APC in EC. EC were treated with APC (180 nM) or TNF (100 U/ml) for 8 h or pretreated with APC for 16 h before incubation with TNF for 8 h. Cells were preincubated with inhibitors 1 h before treatment. **A**: representative FACS analysis of VCAM-1 expression. Mean values of fluorescence intensity are indicated. **B**: quantitative analysis from 3 separate FACS analysis. Data are expressed as means $\pm$ SD; * P < 0.05 vs. control conditions (treatment with diluents but without inhibitors).

vation of ERK/JNK accounts for the protective effect of APC in EC. However, mechanisms that control temporal and spatial aspects of NF- κ B and ERK signaling and the interplay between kinases and phosphatases that modulate pathway signaling are still unclear (22).

Mechanistically, coagulation and inflammation are intimately linked and cellular signaling by coagulation proteases through protease-activated receptors (PAR) may affect pro- and antiinflammatory responses (11). Some evidence suggests that APC-EPCR complex can translocate from the plasma membrane to the nucleus, where it could modulate gene expression (16). APC bound to EPCR has also been shown to cleave PAR1 and PAR2 (28). Signaling through PAR promotes EC proliferation and mediates at least some of the antiinflammatory effects observed with APC. Silencing EPCR and PAR1 receptors indicates an equal contribution of both receptors in VCAM-1 induction. Depending on cell type, APC induces signaling via the MAPK pathway with phosphorylation of ERK-1/2 that is reported to be PAR1 dependent and EPCR dependent or PAR1 dependent but EPCR independent (24, 28, 31). However, our findings support the concept that EPCR is necessary for ERK1/2 activation for APC signaling in vascular EC.

In summary, our data provide evidence for the existence of a regulatory pathway mediated by APC that impair for the TNF signaling. In the future, it will be important to further determine the mechanisms by which APC desensitizes EC to TNF signaling.

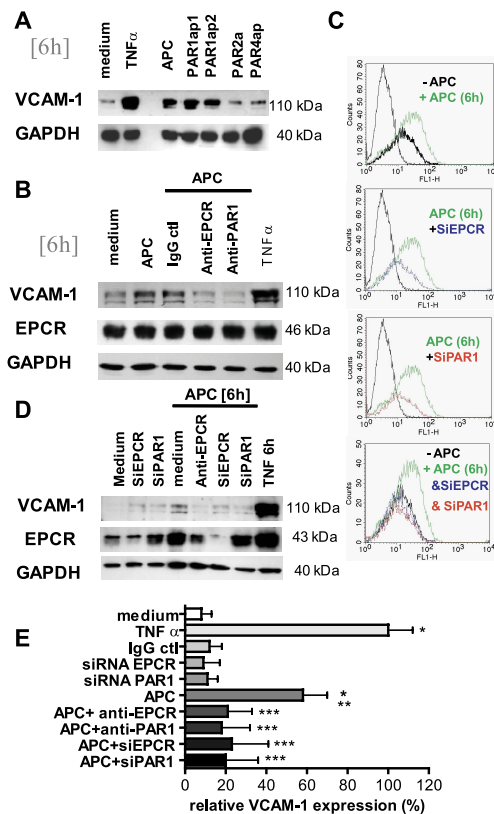


Fig. 8. Involvement of endothelial protein C receptor (EPCR) and protease-activated receptor (PAR) receptors in APC-mediated regulation of endothelial VCAM-1. **A**: immunoblots showing VCAM-1 and GAPDH expression in cells treated with recombinant APC (180 nM) or PAR agonist peptides (PAR1ap1, PAR1ap2, PAR4ap) or molecule (PAR2a). EC treated with culture medium or TNF- α (100 U/ml) were used as negative and positive controls, respectively. **B**: immunoblots showing VCAM-1, EPCR, and GAPDH expression in cells treated with recombinant APC (180 nM) in the presence of blocking anti-PAR1 or anti-EPCR antibodies. Cells treated with irrelevant control (ctl) IgG were used as a negative control. **C** and **D**: FACS for VCAM-1 (**C**) and Western blot analysis for EPCR and PAR1 (**D**) in EC before and after silencing with specific short interfering RNA (siRNA). EC were transfected without siRNA (medium) and with either nontargeting siRNA or siRNA specific for EPCR or PAR1. EPCR and PAR1 protein expression was analyzed 48 h after transfection by Western blot and FACS. EC were incubated for 6 h with recombinant APC (180 nM). **E**: quantification from 4 independent Western blot analyses. Results are expressed as relative percentages compared with TNF-treated cells; * P < 0.05 vs. medium, ** P < 0.05 vs. TNF- α , *** P < 0.05 vs. APC.

GRANTS

This work was supported by grants from l'Agence de Biomédecine (AO2007), La Société de Néphrologie, Lilly-France. This work was also in part supported by XENOME, an EU-funded Integrated Project in Life Sciences, Genomics and Biotechnology for Health (LSHB-CT-2006-037377), and by a grant from la Fondation de l'Avenir (contract ET8-498).

DISCLOSURES

No conflicts of interest, financial or otherwise, are declared by the author(s).

REFERENCES

- Aird WC. Sepsis and coagulation. *Crit Care Clin* 21: 417–431, 2005.
- Anrather J, Racchumi G, Iadecola C. *cis*-Acting, element-specific transcriptional activity of differentially phosphorylated nuclear factor- κ B. *J Biol Chem* 280: 244–252, 2005.
- Bernard GR, Vincent JL, Laterre PF, LaRosa SP, Dhainaut JF, Lopez-Rodriguez A, Steingrub JS, Garber GE, Helterbrand JD, Ely EW, Fisher CJ Jr. Efficacy and safety of recombinant human activated protein C for severe sepsis. *N Engl J Med* 344: 699–709, 2001.
- Blackwell K, Zhang L, Thomas GS, Sun S, Nakano H, Habelhah H. TRAF2 phosphorylation modulates tumor necrosis factor α -induced gene expression and cell resistance to apoptosis. *Mol Cell Biol* 29: 303–314, 2009.
- Brostjan C, Anrather J, Csizmadia V, Natarajan G, Winkler H. Glucocorticoids inhibit E-selectin expression by targeting NF- κ B and not ATF/c-Jun. *J Immunol* 158: 3836–3844, 1997.
- Chen LF, Greene WC. Shaping the nuclear action of NF- κ B. *Nat Rev Mol Cell Biol* 5: 392–401, 2004.
- Cheng T, Liu D, Griffin JH, Fernandez JA, Castellino F, Rosen ED, Fukudome K, Zlokovic BV. Activated protein C blocks p53-mediated apoptosis in ischemic human brain endothelium and is neuroprotective. *Nat Med* 9: 338–342, 2003.
- Collins T, Read MA, Neish AS, Whitley MZ, Thanos D, Maniatis T. Transcriptional regulation of endothelial cell adhesion molecules: NF- κ B and cytokine-inducible enhancers. *FASEB J* 9: 899–909, 1995.
- Coupe S, Leboeuf F, Bouday G, Souillou JP, Charreau B. 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, 2004.
- Dimmeler S, Haendeler J, Zeiher AM. Regulation of endothelial cell apoptosis in atherothrombosis. *Curr Opin Lipidol* 13: 531–536, 2002.
- Esmont CT. Coagulation and inflammation. *J Endotoxin Res* 9: 192–198, 2003.
- Esmont CT. Inflammation and the activated protein C anticoagulant pathway. *Semin Thromb Hemost* 32, Suppl 1: 49–60, 2006.
- Franscini N, Bachli EB, Blau N, Leikauf MS, Schaffner A, Schoedon G. Gene expression profiling of inflamed human endothelial cells and influence of activated protein C. *Circulation* 110: 2903–2909, 2004.
- Gerritsen ME, Bloor CM. Endothelial cell gene expression in response to injury. *FASEB J* 7: 523–532, 1993.
- Griffin JH, Fernandez JA, Gale AJ, Mosnier LO. Activated protein C. *J Thromb Haemost* 5, Suppl 1: 73–80, 2007.
- Joyce DE, Gelbert L, Ciaccia A, DeHoff B, Grinnell BW. Gene expression profile of antithrombotic protein C defines new mechanisms modulating inflammation and apoptosis. *J Biol Chem* 276: 11199–11203, 2001.
- Kataoka H, Hamilton JR, McKemy DD, Camerer E, Zheng YW, Cheng A, Griffin C, Coughlin SR. Protease-activated receptors 1 and 4 mediate thrombin signaling in endothelial cells. *Blood* 102: 3224–3231, 2003.
- Kerschen EJ, Fernandez JA, Cooley BC, Yang XV, Sood R, Mosnier LO, Castellino FJ, Mackman N, Griffin JH, Weiler H. Endotoxemia and sepsis mortality reduction by non-anticoagulant activated protein C. *J Exp Med* 204: 2439–2448, 2007.
- Laszik Z, Mitro A, Taylor FB Jr, Ferrell G, Esmont CT. Human protein C receptor is present primarily on endothelium of large blood vessels: implications for the control of the protein C pathway. *Circulation* 96: 3633–3640, 1997.
- Libby P, Ridker PM, Maseri A. Inflammation and atherosclerosis. *Circulation* 105: 1135–1143, 2002.
- Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) method. *Methods* 25: 402–408, 2001.
- Murphy LO, Blenis J. MAPK signal specificity: the right place at the right time. *Trends Biochem Sci* 31: 268–275, 2006.
- Nabel GJ, Verma IM. Proposed NF- κ B/I κ B family nomenclature (Abstract). *Genes Dev* 7: 2063, 1993.
- O'Brien LA, Richardson MA, Mehrbod SF, Berg DT, Gerlitz B, Gupta A, Grinnell BW. Activated protein C decreases tumor necrosis factor related apoptosis-inducing ligand by an EPCR- independent mechanism involving Egr-1/Erk-1/2 activation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 27: 2634–2641, 2007.
- Park YC, Ye H, Hsia C, Segal D, Rich RL, Liou HC, Myszk DG, Wu H. A novel mechanism of TRAF signaling revealed by structural and functional analyses of the TRADD-TRAF2 interaction. *Cell* 101: 777–787, 2000.
- Quillard T, Coupe S, Coulon F, Fitau J, Chatelais M, Cuturi MC, Chiffolleau E, Charreau B. Impaired Notch4 activity elicits endothelial cell activation and apoptosis: implication for transplant arteriosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 28: 2258–2265, 2008.
- Quillard T, Devalliere J, Chatelais M, Coulon F, Seveno C, Romagnoli M, Barille Nion S, Charreau B. Notch2 signaling sensitizes endothelial cells to apoptosis by negatively regulating the key protective molecule survivin. *PLoS One* 4: e8244, 2009.
- Riewald M, Petrovan RJ, Donner A, Mueller BM, Ruf W. Activation of endothelial cell protease activated receptor 1 by the protein C pathway. *Science* 296: 1880–1882, 2002.
- Riewald M, Ruf W. Protease-activated receptor-1 signaling by activated protein C in cytokine-perturbed endothelial cells is distinct from thrombin signaling. *J Biol Chem* 280: 19808–19814, 2005.
- Stephenson DA, Tolt LJ, Beaudin S, Liaw PC. Modulation of monocyte function by activated protein C, a natural anticoagulant. *J Immunol* 177: 2115–2122, 2006.
- Uchiba M, Okajima K, Oike Y, Ito Y, Fukudome K, Isobe H, Suda T. Activated protein C induces endothelial cell proliferation by mitogen-activated protein kinase activation in vitro and angiogenesis in vivo. *Circ Res* 95: 34–41, 2004.
- Wrighton CJ, Hofer-Warbinek R, Moll T, Eytner R, Bach FH, de Martin R. Inhibition of endothelial cell activation by adenovirus-mediated expression of I κ B α , an inhibitor of the transcription factor NF- κ B. *J Exp Med* 183: 1013–1022, 1996.

HLA-E-Restricted Cross-Recognition of Allogeneic Endothelial Cells by CMV-Associated CD8 T Cells: A Potential Risk Factor following Transplantation

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

¹ Inserm, U892, Nantes, France, ² Univ Nantes, Nantes, France, ³ CNRS, UMR 6299, Nantes, France, ⁴ Inserm, U1064, Nantes, France, ⁵ CHU Nantes, Nantes, France

Abstract

Although association between CMV infection and allograft rejection is well admitted, the precise mechanisms involved remain uncertain. Here, we report the characterization of an alloreactive HLA-E-restricted CD8 T cell population that was detected in the PBL of a kidney transplant patient after its CMV conversion. This monoclonal CD8 T cell population represents a sizable fraction in the blood (3% of PBL) and is characterized by an effector-memory phenotype and the expression of multiple NK receptors. Interestingly, these unconventional T cells display HLA-E-dependent reactivity against peptides derived from the leader sequences of both various HCMV-UL40 and allogeneic classical HLA-I molecules. Consequently, while HLA-E-restricted CD8 T cells have potential to contribute to the control of CMV infection *in vivo*, they may also directly mediate graft rejection through recognition of peptides derived from allogeneic HLA-I molecules on graft cells. Therefore, as HLA-E expression in nonlymphoid organs is mainly restricted to endothelial cells, we investigated the reactivity of this HLA-E-restricted T cell population towards allogeneic endothelial cells. We clearly demonstrated that CMV-associated HLA-E-restricted T cells efficiently recognized and killed allogeneic endothelial cells *in vitro*. Moreover, our data indicate that this alloreactivity is tightly regulated by NK receptors, especially by inhibitory KIR2DL2 that strongly prevents TCR-induced activation through recognition of HLA-C molecules. Hence, a better evaluation of the role of CMV-associated HLA-E-restricted T cells in transplantation and of the impact of HLA-genotype, especially HLA-C, on their alloreactivity may determine whether they indeed represent a risk factor following organ transplantation.

Citation: Allard M, Tonnerre P, Nedellec S, Oger R, Morice A, et al. (2012) HLA-E-Restricted Cross-Recognition of Allogeneic Endothelial Cells by CMV-Associated CD8 T Cells: A Potential Risk Factor following Transplantation. PLoS ONE 7(11): e50951. doi:10.1371/journal.pone.0050951

Editor: Vassiliki A. Boussiotis, Beth Israel Deaconess Medical Center, Harvard Medical School, United States of America

Received: June 7, 2012; **Accepted:** October 29, 2012; **Published:** November 30, 2012

Copyright: © 2012 Allard et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Funding: This work was supported by grants awarded by the “Cancéropôle Grand Ouest” (RPH10017NNA), “Xenome,” a European Commission-funded Integrated Project, Life Sciences, Genomics and Biotechnology for Health LSHB-CT-2006-037377, and by a grant from L’Agence de Biomédecine “Appel Recherche et Greffe 2009”. PT was supported by “PROVASC » a grant from “la Région Pays de la Loire” and Alexis Morice by the “Association de Recherche contre le Cancer.” The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

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

* E-mail: nadine.gervois@inserm.fr

Introduction

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

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

CMV could account for graft rejection by triggering the activation of endothelial cells, which are preferential targets of CMV infection [5,6,7]. This might directly increase the expression of MHC, costimulatory and adhesion molecules on the allograft endothelium through the induction of mediators release such as

type I IFN. Then, activated graft’s EC may attract and activate recipient’s cytotoxic T cells, which can trigger rejection [8]. CMV infection could also be implicated in the development of allograft rejection because of cross-reactivity of CMV-specific T cells toward allogeneic HLA molecules as we and others have previously documented [9,10,11,12]. An alternate mechanism has been suggested by studies reporting the existence in CMV seropositive individuals of CD8 T cells that recognize, in a HLA-E restricted-fashion, peptides derived from the leader sequences of both HCMV-UL40 and allogeneic classical HLA-I molecules [13,14,15,16]. Consequently, while this HLA-E-restricted T cells potentially mediate protection against CMV infection, they may also promote graft rejection through recognition of peptides derived from allogeneic HLA-I molecules presented by HLA-E on graft cells.

One of the most striking features of the non-classical HLA-I molecule HLA-E is its highly conserved nature. Only two allelic forms exist in the Caucasian population, HLA-E*0101 (HLA-E^{107B}) and HLA-E*0103 (HLA-E^{107C}) that differ at one amino acid position [17]. As a consequence, HLA-E-bound peptides are highly restricted, comprising mostly signal peptides derived from

others HLA-I proteins [18]. Class Ib molecules are often considered to have a prominent role in innate immunity. Among this line, surface expression of HLA-E bound to autologous HLA class I derived peptides, indicating the integrity of the MHC I antigen processing machinery and acting as a ligand for CD94-NKG2 receptors, modulate the activation of NK and T cells [19,20]. However, in times of cellular stress or infections, HLA-E is associated with a much more diverse repertoire of peptides, which can be sensed directly by $\alpha\beta$ TCR [21,22]. Indeed, several studies in human and mice have highlighted a dual role for unclassical HLA-Ib molecules, in that, like classical HLA-Ia molecules (ie HLA-A/-B/-C), they can mediate adaptative immune responses to bacteria [23,24], viruses [13,25,26], tumors [27] and self-antigens [28,29].

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

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

Materials and Methods

HLA-E-restricted CD8 T Cells Isolation and Culture

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

HAEC Isolation, Culture and IFN- γ Activation

Human arterial endothelial cells (HAEC) were isolated from unused artery pieces collected at the time of kidney transplantation, harvested according to good medical practice and stored in the DIVAT Biocollection (French Health Minister Project number 02G55) [35]. All patients who participated in this study signed an informed consent and the study was performed according to the guidelines of the local ethics committee (CCPRB, CHU Nantes, France). Briefly, fragment of arteries

were incubated with collagenase A (Roche, Basel, Switzerland) for 30 min at 37°C and EC were selected using CD31-Dynabeads (Dyna, Villebon sur Yvette, France). HAEC were grown in Endothelial Cell Basal Medium (ECBM) supplemented with 10% fetal calf serum (FCS, PAA, France), 0.004 m-L/mL ECGS/Heparin, 0.1 ng/mL hEGF, 1 ng/mL hbFGF, 1 μ g/mL hydrocortisone, 50 μ g/mL gentamicin and 50 ng/mL amphotericin B (C-22010, PromoCell, Heidelberg, Germany). For activation, confluent HAEC monolayers were starved overnight in ECBM supplemented with 2%FCS without growth factors and incubated with recombinant human IFN- γ (50 U/mL, Imukin, Boehringer Ingelheim, Germany) for 48 h. HLA class I genotyping was performed by the Etablissement Français du Sang (Nantes, France).

B-EBV 721.221 and COS-7 Cells Culture

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

Antibodies

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

Peptides and Recombinant Peptide/HLA-E Monomers

Peptides VMAPRTLIL, VMAPRTLVL, VMAPRTVLL and VMAPRTLIL (HLA-A*01-, HLA-A*02-, HLA-B*07- and HLA-Cw*01-derived signal peptides respectively) with purity >85% were purchased from Eurogentec (Angers, France). HLA-E*0101/peptide monomers were generated by the recombinant protein facility of SFR26 (Nantes, France).

Phenotypic Characterization by Flow Cytometry

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

Transient Transfection of COS-7 Cells and TNF Assay

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

Intracellular Staining

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

CD107a Degranulation

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

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

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

Single-cell Ca^{2+} Video Imaging

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

^{51}Cr Release Assay

Target cells were labeled with 100 μ Ci $Na^{51}CrO_4$ (Oris Industrie, Gif-sur-Yvette, France) for 1 h at 37°C, and incubated 4 h at 37°C, with effectors T cells at various E/T ratios. Then, 25 μ l of supernatants were mixed with 100 μ l of scintillation liquid (Optiphase Supermix, Wallac, United Kingdom) for measurement of radioactive content on a beta plate counter (EG&G Wallac, Evry, France). Percentage of target cell lysis was calculated according to the following formula: $[(\text{experimental release} - \text{spontaneous release}) / (\text{maximum release} - \text{spontaneous release})] \times 100$. Maximum and spontaneous releases were determined by, respectively, adding 0.1% Triton X-100 or medium to ^{51}Cr -labeled target cells in the absence of T cells.

Redirected Cytolytic Activity

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

Results

Frequency and Phenotypic Characteristics of HLA-E-reactive CD8 T Cells Isolated from Peripheral Blood of a Cytomegalovirus-seropositive Kidney-transplant Patient

Investigations of a cohort of renal transplant recipients [12] allowed us to identify an HLA-E-reactive CD8⁺ T cell population in PBL of a kidney transplant recipient with an active CMV infection. This HLA-E-restricted response was not observed on blood samples harvested before CMV infection (at one month post-transplantation) but appeared correlated with CMV infection 2 years post-transplantation, in association with a T cell response to pp65₄₉₅₋₅₀₃/A*0201 HCMV epitope. As shown in Figure 1A, recipient fresh PBL activity, assessed by TNF- α production, was observed against COS-7 cells transfected with either HLA-E*0101 or HLA-E*0103 alleles whereas no response was observed with other HLA-I alleles tested. The HLA-E-reactive population was enriched and cloned. All the CD8 T cell clones derived ($n=9$) were HLA-E-reactive and characterized by the homogeneous expression of the TCRV β 22 (data not shown). Notably, TCRV β 22⁺ cells represent a sizable fraction (3.4%) of freshly isolated recipient PBL, comprising 7% of CD3⁺ T cells and 14% of CD8⁺CD3⁺ T cells (Figure 1B). This monoclonal population, thereafter named MART.22, is characterized by CD8 $\alpha\beta$ ⁺CD62L⁺CCR7⁺CD27⁺CD28⁺CD45RA^{lo}CD45RO^{hi}CD57[−] surface phenotype (Figure S1), suggesting that MART.22 belongs to the effector-memory cell compartment [38]. Moreover, MART.22 expresses CD56 consistent with the phenotype of HLA-E-restricted NK-CTL previously reported by the group of L. Moretta [13].

Requirement of Co-engagement of TCR and CD8 for HLA-E-reactive CD8 T Cells

To further characterize MART.22, we used the 721.221 B-EBV cell line (.221), lacking classical HLA class I molecules and HLA-G expression, and the 721.221-E cell line (.221-E), which has been stably transfected with the cDNA encoding HLA-E*0101 together with the leader sequence peptide from HLA-B*08, that is required for HLA-E cell surface expression and stabilization [18]. The transfected.221-E cell line, that consistently expresses high levels of HLA-E (Figure S2), induced strong activation of MART.22, as assessed by TNF production (59% of TNF- α producing T cells) (Figure 1C, white bar), whereas.221 cells were not recognized.

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

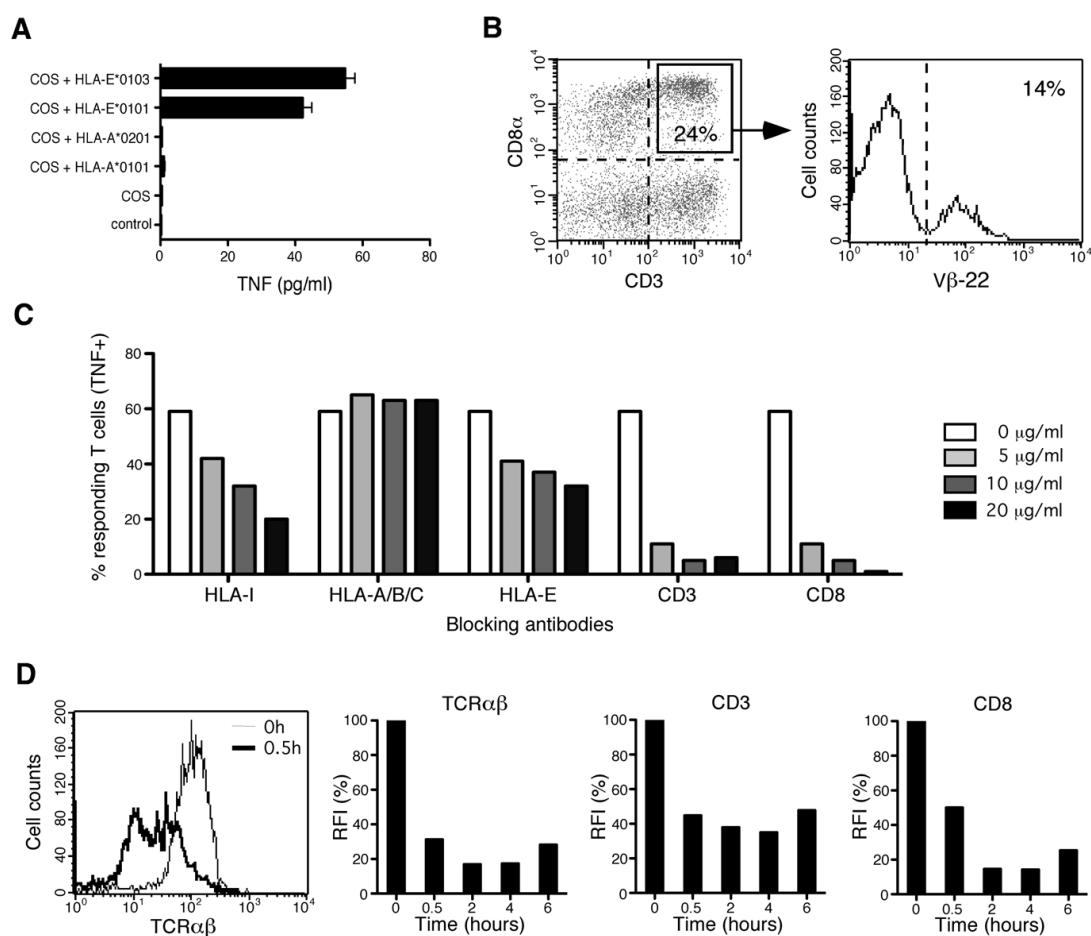


Figure 1. Characterization of HLA-E-restricted T cells in PBL of a kidney transplant patient undergoing CMV infection. A/Reactivity of freshly isolated PBL against COS-7 cells transfected, or not, with HLA-I encoding cDNA was assessed by a TNF release assay. Means and standard deviations of six replicates are shown. B/Frequency of TCRVβ22⁺ HLA-E-restricted T cells in PBL. Fresh PBL were analyzed by three-color flow cytometry using antibodies specific for CD3, CD8α and Vβ22 TCR. Percentage of Vβ22 TCR expressing cells was examined on gated CD3⁺CD8⁺ T cells. C/TNF production in response to HLA-E transfected.221-E cells in the presence of blocking antibodies. MART.22 was stimulated with target cells in the presence or not of blocking antibodies directed against total HLA-I, HLA-A/B/C, HLA-E, CD3 and CD8 molecules at the indicated concentrations. After 6 h, T cells were fixed, permeabilized and stained for intracellular TNF-α. Results are expressed as percentage of TNF-producing T cells. D/Time course of TCRαβ, CD3 and CD8 surface expression on HLA-E-restricted CD8 T cells stimulated with.221-E cells. A representative FACS analysis of TCRαβ at early time course is shown (left panel). Results are expressed as percentages of RFI (as defined in Material and Methods). doi:10.1371/journal.pone.0050951.g001

(Figure 1D). Furthermore, using the same approaches, we showed the high degree of CD8 dependency of MART.22 (Figures 1C–D). Together, these data confirm HLA-E restriction of MART.22 and unveil its strong CD8 dependency.

Peptide Specificity of HLA-E-restricted CD8 T Cells

Next, to investigate MART.22 peptide specificity, we test its ability to recognize.221 cells exogenously loaded with six HLA-E-restricted synthetic peptides (Table 1). This peptide set included the three previously described peptides derived from the UL40 protein of different human CMV strains [39,40] and the peptides derived from the majority of HLA-I leader sequences, including autologous HLA-I from the transplant recipient. We found that

MART.22 recognized.221 cells pulsed with 3 out of 6 peptides tested (Figure 2A). The VMAPRTLIL peptide was recognized with the highest avidity (EC50 at 1×10^{-2} μM). This peptide is derived from both the UL40 of the clinically isolate CMV 3C strain [39] and the leader sequence of various allogeneic HLA-A and HLA-C molecules. MART.22 also recognized with high avidity the VMAPRTVLL peptide (EC50 at 2×10^{-2} μM), which is derived from the leader sequence of various allogeneic HLA-B, including the HLA-B*08, molecules, thus providing explanation for the recognition of.221-E cells expressing HLA-B*08 leader sequence. MART.22 also recognized, albeit to a lesser extent (EC50 at 4×10^{-2} μM), the VMAPRTLIL peptide that derived from the UL40 of the laboratory CMV AD169 strain [39,40]. This

latter result was unexpected as this peptide also derives from the leader sequence of various HLA-C molecules, including the two autologous HLA-C alleles of the patient (ie HLA-Cw*1402 and -Cw*0501). The three other tested peptides (VTAPRTLIL, VTAPRTLVL and VMAPRTLVL) were not recognized at all, pinpointing to the importance of a methionine and of a leucine or an isoleucine at position 2 and 8 respectively to allow peptide recognition. To further substantiate our data on MART.22 peptide specificity, we used HLA-E*0101 tetramers refolded either with VMAPRTLIL, VMAPRTLVL, VMAPRTLIL or VMAPRTLVL peptides. As expected, Figure 2B shows the ability of MART.22 to bind HLA-E/VMAPRTLIL tetramers and to a lesser extent HLA-E/VMAPRTLVL and HLA-E/VMAPRTLIL tetramers whereas no significant binding was observed with tetramers refolded with the unrecognized VMAPRTLVL peptide.

These results show the ability of MART.22 to recognize peptides derived from both HCMV-UL40 and various allogeneic HLA-Ia molecules, suggesting that these cells may participate in the immune response against CMV-infected or allogeneic cells. HLA class I alleles of the kidney donor (HLA-A2, -B18, -B44 and -Cw3) are identical with the ones of the recipient (with the exception of HLA-B18 which give rise to an unrecognized peptide) therefore excluding that this population has been activated by the transplantation in favor to an induction as a consequence of CMV infection.

Functional Characteristics of HLA-E-restricted CD8 T Cells

Functional characterization of MART.22 was assessed using 221-E stimulating cells. As shown in Figure 3A, incubation with 221-E cells triggered a strong and rapid elevation in intracellular free calcium (Ca^{2+}) concentration within MART.22 while no significant Ca^{2+} signal was detected when untransfected 221 cells were used. With regard to its potential ability to develop lytic response, incubation with 221-E cells induced MART.22 degranulation as demonstrated by the high CD107a surface mobilization (77% of CD107a positive T cells) and perforin/granzyme production (Figure 3B and data not shown). This leads to the lysis of 221-E cells as assessed with a standard ^{51}Cr release assay (Figure 3C). As shown in Figure 3D, MART.22 was also found to produce high levels of TNF- α (78% of producing cells), IFN- γ (64%) and to a lower extent GM-CSF (31%), IL-2 (18%), IL-13 (17%) and IL-4 (13%). Conversely, no production of IL-5, IL-17F, IL-21, IL-22 or TGF- β was detected (data not shown). These data emphasize the strong granzyme-dependent cytolytic and TNF- α /IFN- γ secretion capacities of MART.22.

Regulation of HLA-E-restricted CD8 T Cells Activity by NKR

As previous studies on HLA-E-restricted NK-CTL reported surface expression of HLA class I-specific inhibitory NK receptors (NKR), we investigated NKR expression on MART.22 (Figure 4A). MART.22 was strongly stained by the GL183 antibody, which recognizes KIR2DS2, KIR2DL2 and KIR2DL3. The combined use of KIR-specific mAbs [41] allowed us to identify the inhibitory KIR2DL2 as the KIR expressed by MART.22 (data not shown). Surface expression of ILT-2, NKG2-D and CD94 were also observed. Surprisingly, CD94 expression was not associated with NKG2-A or NKG2-C surface expression. In order to address the functionality of these receptors, we analyzed, in a redirected lysis assay, the ability of anti-NKR mAbs to modulate MART.22 TCR dependent lysis. As shown in Figure 4B, anti-CD3 mAb induced cytolytic activity was strongly inhibited by the addition of anti-KIR2DL2 mAb. Lysis was also inhibited, although to a lesser extent, by the addition of anti-ILT-2

mAb while it was slightly increased in presence of anti-NKG2-D mAb. However, addition of anti-CD94 mAb did not affect the lysis efficiency, clearly indicating the non-functionality of the CD94 receptor expressed by MART.22. Taken together, our data clearly indicate that the activity of HLA-E-restricted T cells can be modulated by competing positive or negative signals transduced by NKR, with especially efficient inhibition through KIR2DL2 ligation. Interestingly, autologous MART.22 HLA-C molecules (HLA-Cw*0501 and *1402) are ligands for the KIR2DL2 receptor [42]. Since these HLA-C molecules also provide a recognized HLA-E-bound peptide (Figure 2A and Table 1), this allowed us to hypothesize that inhibitory KIR2DL2 expression by MART.22 dampens its detrimental auto-reactivity against healthy (not CMV infected) autologous cells through ligation of autologous protective HLA-C molecules. Accordingly, when incubated in the presence of anti-KIR2DL2/DS2/DL3 or HLA-A/B/C blocking Abs, MART.22 developed fratricide response (Figure S3).

HLA-E-restricted CD8 T Cells Reactivity Against Allogeneic Endothelial Cells

Since we demonstrated that peptides derived from both CMV-UL40 and allogeneic HLA-I molecules can be recognized by MART.22 in an HLA-E-restricted fashion, we asked whether MART.22 could also recognize and damage allogeneic endothelial cells and therefore represent a risk factor for allograft outcome. To this end, primary human arterial endothelial cell (HAEC) cultures, isolated from kidney transplant donors were tested *in vitro* for their capacity to activate MART.22. HLA-I typing of the seven endothelial cell cultures tested as well as their capacity to provide recognized peptides or to interact with KIR2DL2 are documented in Table 2. All EC cultures expressed HLA-I molecules carrying peptides potentially recognized in the HLA-E context. The CMV serologic status of EC donors is also indicated. While surface HLA-E staining levels were similar on all EC cultures tested (Figure 5A and data not shown), six out of seven EC cultures induced efficient cytokine responses of MART.22, as illustrated by TNF- α production (from 24% to 75% of T cells) (Figure 5B and Table 2). Moreover, MART.22 develops cytolytic responses against recognized endothelial cells, as assessed by CD107a surface expression (from 8% to 68% of T cells) (Figure 5C and Table 2). In accordance with recognition of both allelic forms of HLA-E by MART.22 (Figure 1A), endothelial cells are recognized independently of their HLA-E haplotype and with no correlation to CMV infection (mean value, 42% of TNF producing T cells for CMV negative versus 41% for CMV positive patients), suggesting the direct recognition of allogeneic HLA-I derived peptides in an HLA-E-restricted fashion. Thus, HLA-E-restricted T cells could represent a risk factor for allograft outcome through recognition of allogeneic graft endothelial cells.

Tight Regulation of HLA-E-restricted CD8 T Cells Alloreactivity by KIR2DL2

As mentioned above, in an unexpected way, one EC culture (HAEC#402), with no apparent defect in surface HLA-E expression levels, was not recognized by MART.22 (Figure 5A). To ascertain this was not the consequence of the specific lack of expression of HLA-I molecules encoding recognized peptides, we investigated whether incubation with the two best-recognized synthetic peptides could render these endothelial cells more susceptible to recognition by MART.22. As shown on Figure 6A, pulsing of the otherwise resistant HAEC#402 with VMAPRTLIL and VMAPRTLVL induced TNF- α production by MART.22 but only with saturating amounts of peptides

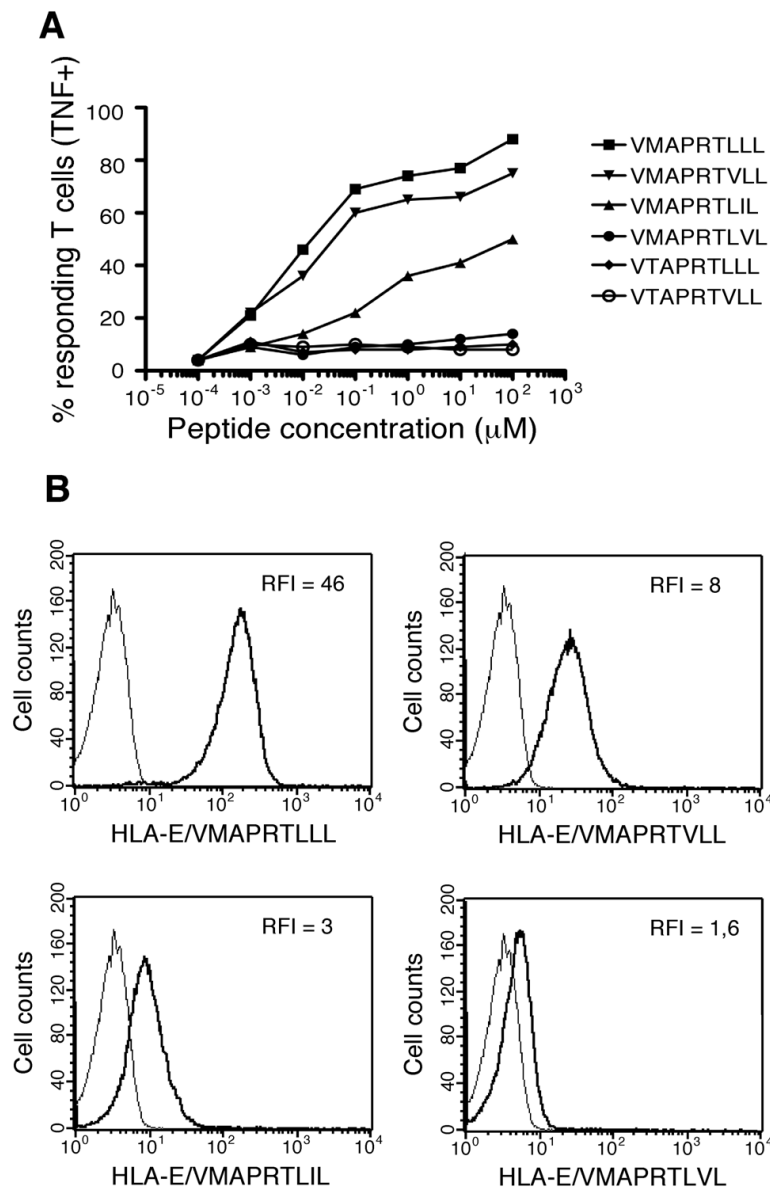


Figure 2. Characterization of CMV/HLA-I-derived peptides recognized by HLA-E-restricted CD8 T cells. A/TNF production in response to stimulation with.221 cells pulsed with synthetic peptides.221 cells were incubated for 1 h with range concentrations of the indicated peptides before addition of MART.22 T cells. After 6 h, T cells were fixed, permeabilized and stained for intracellular TNF- α . Results are expressed as percentage of TNF-producing T cells. B/Peptide-MHC tetramer staining of HLA-E-restricted CD8 T cells. MART.22 T cells were incubated for 1 h with biotinylated HLA-E monomers refolded with the indicated peptides and tetramerized with PE-coupled streptavidin. Peptide-HLA-E tetramers staining was assessed by flow cytometry and RFI are indicated. doi:10.1371/journal.pone.0050951.g002

(respectively 40% and 18% of TNF secreting T cells when HAEC#402 were loaded with $10^2 \mu\text{M}$ of peptides). Similar results were obtained with another poorly recognized EC culture (HAEC#116), suggesting another mechanism conferring resis-

tance to recognition. As we showed that MART.22 reactivity is strongly regulated by the inhibitory KIR2DL2, we investigated whether HAEC suboptimal recognition was indeed the consequence of the expression of protective HLA-C molecules (ie

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

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

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

^aMART.22 HLA-E-restricted T cell clone activity in response to 221 cells pulsed with different peptides (see Figure 2).

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

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

doi:10.1371/journal.pone.0050951.t001

KIR2DL2 ligands) [42,43,44]. Interestingly, HLA-C haplotype crucially influence the MART.22 alloreactivity: endothelial cells possessing two appropriate HLA-C alleles (HAEC#116, #337 and #402) are less recognized (mean value, 18% of TNF producing T cells) than those bearing only one (HAEC#112, #331 and #495, 54% of TNF producing T cells) or no (HAEC#323, 75%) (Figure 6B). This was confirmed by assessing the effect of blocking antibodies on endothelial cells recognition by MART.22. As shown on Figure 6C, addition of KIR2DL2-blocking Abs and, to a lesser extent, of anti-HLA-A/B/C Abs efficiently restore the HAEC#402 recognition by MART.22 in a dose dependent manner (up to 40% and 25% respectively), whereas addition of blocking Ab to ILT-2 had no significant effect. These results underline the tight regulation of HLA-E-restricted allo-reactivity by KIR2DL2 receptors through their recognition of HLA-C molecules expressed on target cells.

Effect of IFN- γ Treatment on Endothelial Cells Recognition by HLA-E-restricted CD8 T Cells

Chronic CMV infections result in recruitment of inflammatory cells and mediators such as chemokines and cytokines including IFN- γ [4]. So, we analyzed the impact of IFN- γ treatment of EC cultures on their recognition by MART.22. As we previously reported [30], IFN- γ treatment enhances both HLA-E and total HLA-I surface expression on endothelial cells (Figure 7A and Figure S4A). However, IFN- γ treatment of endothelial cells resulted in decreased MART.22 mediated lysis and cytokine production (Figures 7B–C and Figures S4B–C). The percentage of TNF- α producing T cells upon stimulation with the HAEC#495 fell from 61% to 33% after IFN- γ treatment. Experiments performed with a less recognized EC culture show that MART.22 reactivity against IFN- γ treated HAEC#116 was completely abolished. To investigate whether the inhibitory effect of IFN- γ treatment was the consequence of an increased expression of inhibitory NKR ligands by endothelial cells, we performed antibody blocking experiments. First, anti-KIR2DL2 and anti-ILT-2 antibodies had little or no effect on recognition of the untreated HAEC#495 culture. In contrast, these antibodies, especially the anti-KIR2DL2 mAb, improved in a dose dependent manner the recognition of IFN- γ treated endothelial cells (71% vs 36% of TNF- α producing T cells for the maximal dose of anti-KIR2DL2 Ab) (Figure 7D). In the same way, mAb directed against classical HLA-I molecules, which are ligands of both KIR2DL2 and ILT-2, greatly enhanced recognition of IFN- γ

treated endothelial cells recognition (69% vs 36% of TNF- α producing T cells for the maximal dose of Ab). Taken together, these data underline the crucial role of inhibitory NKR ligands which expression on EC is a determining factor for HLA-E-restricted T cells reactivity.

Discussion

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

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

In accordance with previous studies showing that CMV-associated HLA-E-restricted T cells represent a pauciclonal population comprising a sizable fraction of CD8 $\alpha\beta$ T cells in CMV-seropositive patients [15,49], the population described in this study expresses homogeneously a given TCR owing to its monoclonal origin and constitutes a significant component of peripheral blood mononuclear cells (14% of CD8⁺CD3⁺ T cells). Moreover, we showed that this population has phenotypic characteristics of effector-memory lymphocytes and displays strong granzyme-dependent cytolytic and TNF- α /IFN- γ secretion capacities, suggesting that they could play a relevant role in the control of CMV infection.

As three different HLA-E-binding HCMV-UL40-derived peptides have been previously described, we investigated the

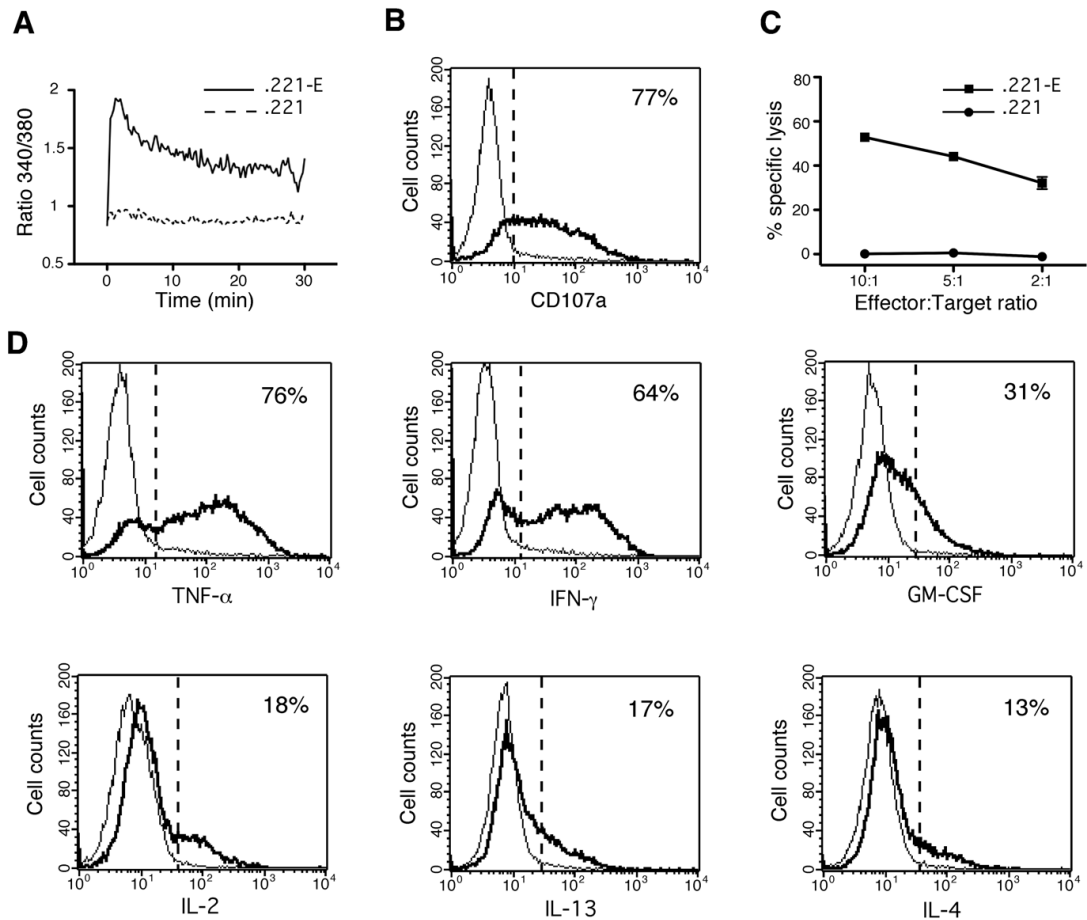


Figure 3. Functional characterization of HLA-E-restricted CD8 T cells. A/Induction of strong and rapid Ca^{2+} responses within activated HLA-E-restricted CD8 T cells. B-EBV 721.221 cells transfected (.221-E) or not (.221) with HLA-E and the leader sequence of HLA-B*08, were incubated with MART.22 T cells loaded with Fura-2 (1:1 ratio). T cell intracellular Ca^{2+} levels were monitored by videomicroscopy for the indicated acquisition time. Graphs represent the kinetics of intracellular Ca^{2+} levels (340/380 nm ratio). Values correspond to the mean of emission measured among all T cells present in the field (approximately 20 cells per experiment). Results are representative of two independent experiments. B/Degranulation of HLA-E-restricted CD8 T cells upon stimulation.221-E cells (thick line) or.221 cells (thin line) were incubated for 4 h with MART.22 T cells in the presence of anti-CD107a antibody. Results are expressed as percentages of surface CD107a positives T cells upon stimulation with.221-E cells. C/Cytotoxic activity of HLA-E restricted CD8 T cells. 10^3 ^{51}Cr -labeled.221-E cells (squares) or.221 cells (circles) were co-cultured for 4 h with MART.22 T cells at various E/T ratios. Cytotoxic activity was assessed through measure of Chromium release in the supernatants. Percentages of specific lysis are indicated. Means and standard deviations of triplicate wells are shown for one out of three comparable experiments. D/Cytokine production analysis of HLA-E restricted CD8 T cells. MART.22 T cells were fixed, permeabilized and stained for intracellular cytokines following 6 h of incubation with.221-E cells (thick line) or.221 cells (thin line). Data are expressed as mean % of intracellular cytokine secreting cells upon stimulation with.221-E cells. doi:10.1371/journal.pone.0050951.g003

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

Because recognized peptides also derived from the leader sequences of numerous allogeneic HLA-I alleles, CMV-associated HLA-E-restricted T cells have potential to mediate allograft

rejection through direct recognition of allogeneic HLA-I derived-peptides presented by HLA-E on graft cells. In a previous study, we showed that HLA-E protein expression in normal human organs is mainly restricted to endothelial cells and leucocytes [30]. Hence, owing to the crucial role of endothelial cells in allo-antigen presentation to T cells [8] and to the HCMV tropism for endothelial cells [5,7], we investigated whether HLA-E-restricted T cells could recognize primary endothelial cells cultures, isolated from kidney allografts. We clearly demonstrate that CMV-associated HLA-E-restricted CD8 T cells can efficiently recognize and killed allogeneic endothelial cells *in vitro*, independently

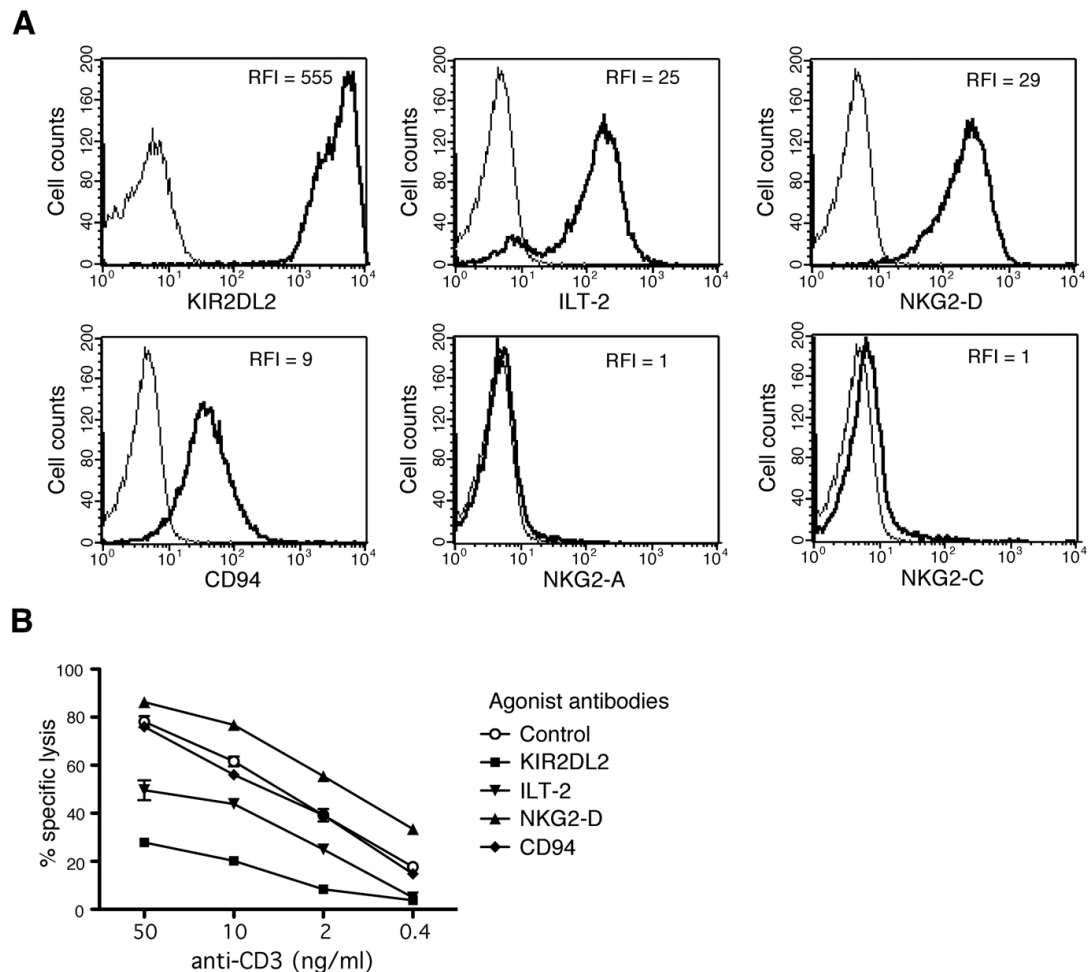


Figure 4. Expression of NK receptors by HLA-E-restricted CD8 T cells and functional characterization. A/Surface expression of NK receptors by HLA-E-restricted CD8 T cells. RFI of stained T cells (thick line) are indicated. B/Modulation of HLA-E restricted CD8 T cells reactivity through NKR engagement. ^{51}Cr -labeled P815 cells were preincubated with the indicated concentration of anti-CD3 antibody in the presence or not of the indicated anti-NKR antibody for 1 h. Then, MART.22 T cells were added for 4 h. Redirected cytotoxic activity was assessed through measure of Chromium release in the supernatants. Percentages of specific lysis are indicated. Means and standard deviations of triplicate wells are shown for one representative experiments out of three performed. doi:10.1371/journal.pone.0050951.g004

of their HLA-E allotype. Therefore, because immunosuppressed transplant patients are particularly prone to CMV infection, we can speculate that in the context of both CMV reactivation or primary infections, while these T cells have potential to contribute to infection control, they may also directly recognize allogeneic graft endothelial cells and thereby contribute to allograft rejection.

As suggested by previous studies, we clearly demonstrated that CMV-associated HLA-E-restricted T cell allo-reactivity is tightly regulated by NK receptors [50]. We first showed surface expression of KIR2DL2, ILT-2, NKG2D and CD94 receptors by MART.22. Surprisingly, CD94 surface expression was not associated with that of NKG2-A or NKG2-C molecules and did not allow interaction with HLA-E tetramer refolded with HLA-A2

peptide, suggesting the expression of CD94 homodimers as previously described [51]. Finally, we demonstrated the non-functionality of this receptor. All the other expressed NK receptors were found to be functional, with a predominant role in preventing target cell recognition for the highly expressed inhibitory KIR2DL2 through ligation of appropriated (protective) HLA-C molecules [42]. The expression of KIR2DL2 appears to constitute a safety mechanism avoiding harmful autoreactivity through the ligation of protective autologous HLA-C molecules. As a consequence, the ability of HLA-E-restricted T cells to mediate alloreactivity against endothelial cells was crucially impacted by the expression of protective HLA-C alleles. Thus, allogeneic endothelial cells that express protective HLA-C

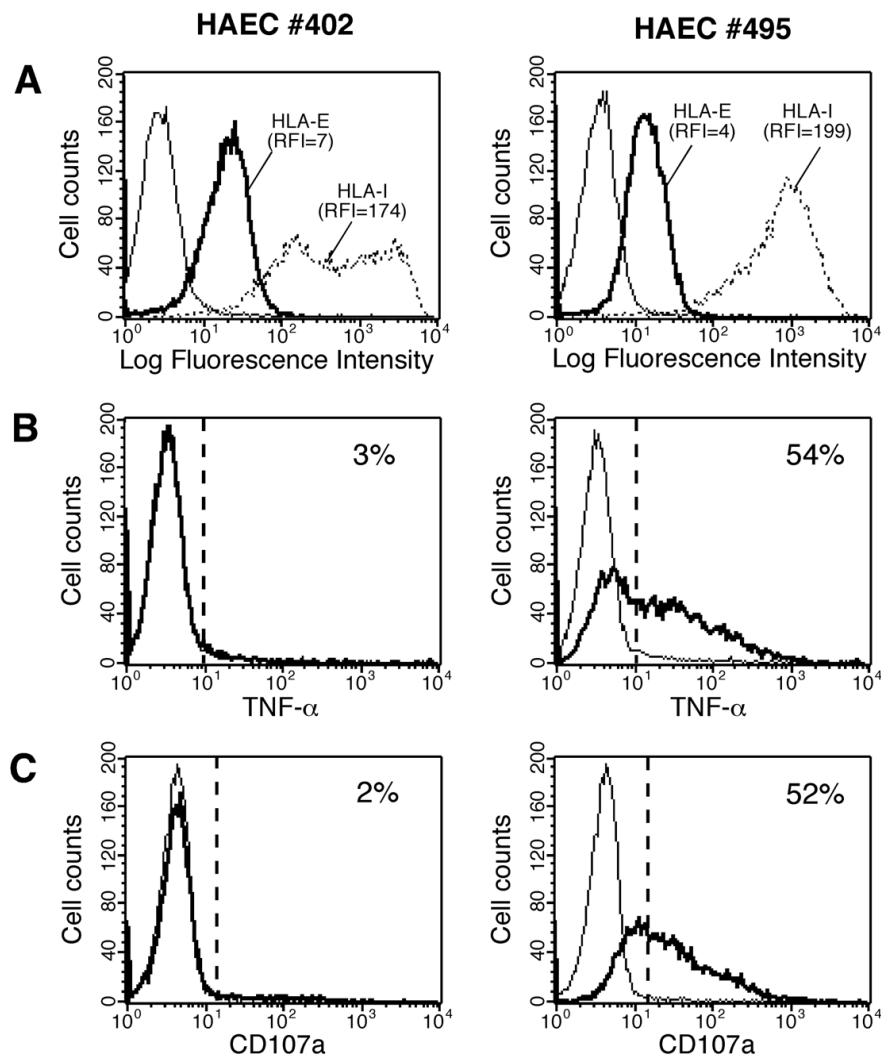


Figure 5. Reactivity of HLA-E-restricted CD8 T cells against allogeneic endothelial cells. A/Surface expression of HLA-E (thick lines) and total HLA-I (dotted lines) molecules by two representative endothelial cultures (HAEC). RFI are indicated. B/Cytokine production by HLA-E-restricted CD8 T cells upon stimulation with endothelial cultures. MART.22 T cells were fixed, permeabilized and stained for intracellular TNF- α following 6 h of incubation with HAECs (thick line) or not (thin line). Data are expressed as percentage of intracellular cytokine secreting T cells upon stimulation with HAECs. C/Degranulation of HLA-E-restricted CD8 T cells upon stimulation with endothelial cultures. MART.22 T cells were incubated for 4 h with HAECs (thick line) or not (thin line) in the presence of anti-CD107a antibody. Results are expressed as percentages of surface CD107a positive T cells upon stimulation with endothelial cells.
doi:10.1371/journal.pone.0050951.g005

molecules, or that were pre-treated with INF- γ , were less recognized by HLA-E-restricted T cells, unless specific blocking antibodies (i.e. anti-KIR2DL2 or anti-HLA-A/B/C) were added to the cultures. This underlines the crucial impact of HLA-C haplotype of target cells on their ability to trigger, or not, an allogeneic HLA-E-restricted T cell response. Therefore, HLA-C haplotypes that are still underestimated in transplantation setting should be reconsidered and taken into account [52,53].

In conclusion, we demonstrated, for the first time, that CMV infection in transplant patient correlated with an allo-reactive HLA-E-restricted T cell response that have potential to mediate detrimental vascularized allograft rejection via endothelial cells lysis. Therefore, CMV-associated HLA-E restricted T cells could account for the well-established association between CMV-infection and accelerated allograft rejection. As HLA-E is also expressed in leucocytes, the involvement of HLA-E-restricted T cells in the immunological response following allogeneic hemato-

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

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

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

^aHLA-E-restricted T cell clone activity in response to endothelial cells (see Figure 5).

^bHLA-C allotypes carrying the C1 epitope that are susceptible to bind to KIR2DL2 receptor.

^cHLA-Cw0401 allotype that has been shown to interact with KIR2DL2 receptor.

doi:10.1371/journal.pone.0050951.t002

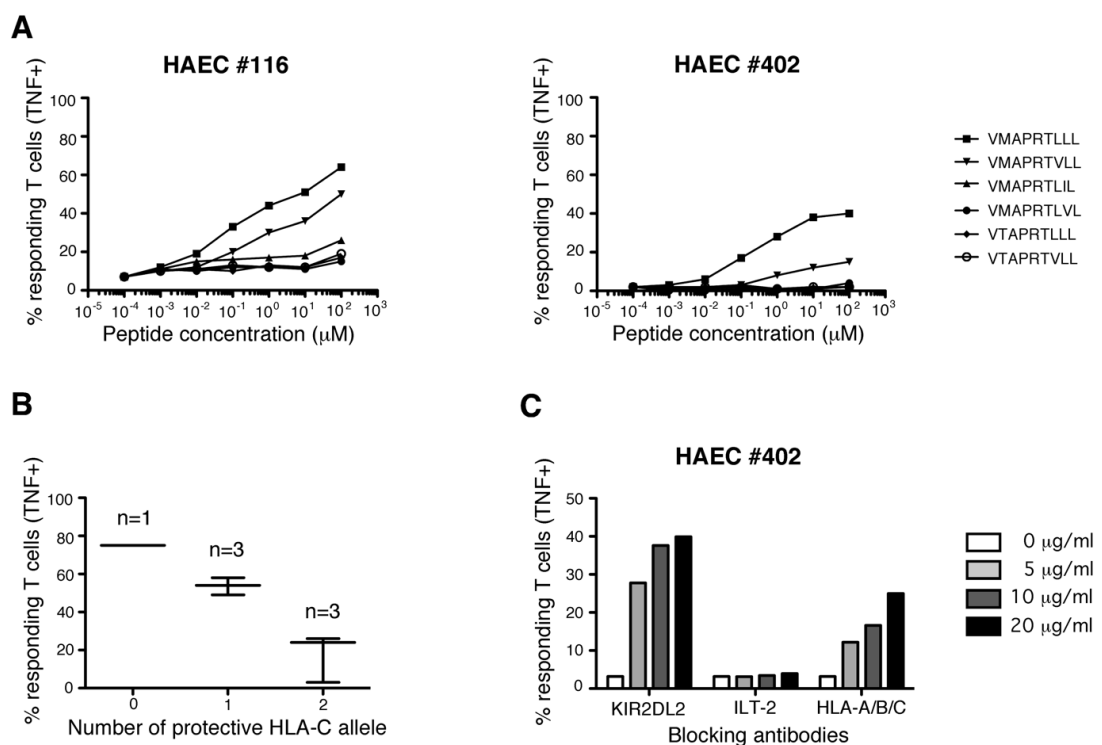


Figure 6. Regulation of HLA-E-restricted CD8 T cells reactivity against allogeneic endothelial cells by NK receptor. A/Reactivity of HLA-E-restricted T cells against poorly recognized (HAEC#116) or unrecognized (HAEC#402) endothelial cultures pulsed with synthetic peptides. HAECs were incubated for 1 h with range concentrations of the indicated peptides before MART.22 T cells were added. After 6 h, T cells were fixed, permeabilized and stained for intracellular TNF- α . Results are expressed as percentage of TNF-producing T cells. B/Impact of KIR2DL2-ligands expression by HAECs on HLA-E-restricted T cells alloreactivity. Percentages of TNF-producing MART.22 T cells are shown for HAECs with none, one or two protective HLA-C alleles. C/Reactivity of HLA-E-restricted T cells against unrecognized endothelial cultures (HAEC#402) in the presence of blocking antibodies. HAECs were incubated with MART.22 T cells in the presence or not of indicated concentrations of blocking antibodies. After 6 h, T cells were fixed, permeabilized and stained for intracellular TNF- α . Results are expressed as percentage of TNF-producing T cells.

doi:10.1371/journal.pone.0050951.g006

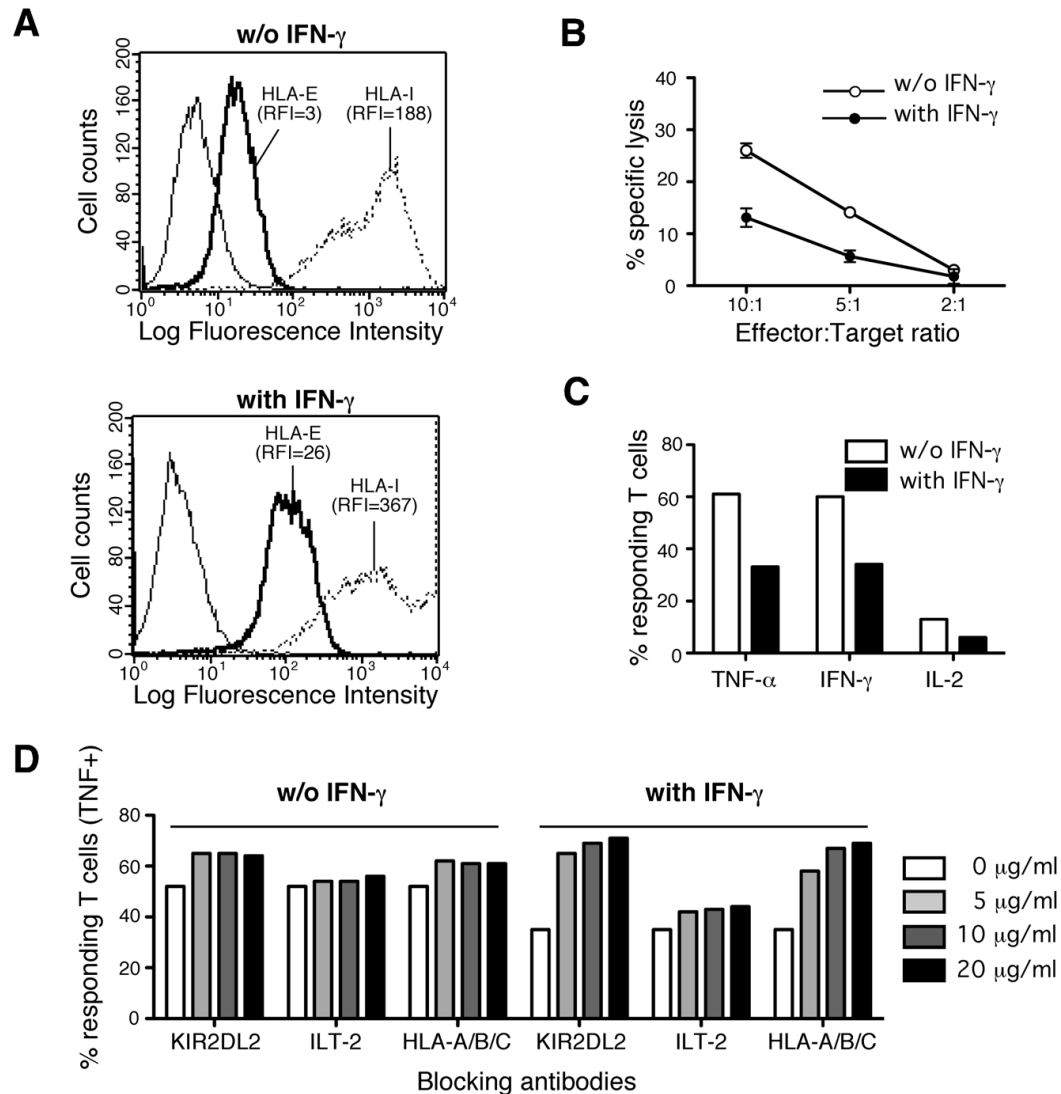


Figure 7. Impact of IFN- γ treatment on allogeneic endothelial cells (HAEC#495) recognition by HLA-E-restricted CD8 T cells. A/ Impact of IFN- γ treatment on surface expression of HLA-E (thick lines) and total HLA-I (dotted lines) molecules by endothelial cultures. RFI are indicated. B/HLA-E-restricted CD8 T cells cytotoxicity toward endothelial cultures treated or not with IFN- γ . 10^3 51 Cr-labeled HAECs pretreated (closed circles) or not (open circle) with IFN- γ were co-cultured for 4 h with T cells at various E:T ratio. Cytotoxic activity was assessed through measure of Chromium release in the supernatants. Percentages of specific lysis are indicated. Means and standard deviations of triplicate wells are shown for one representative experiments out of three performed. C/HLA-E-restricted CD8 T cells cytokine production upon stimulation with endothelial cultures treated or not with IFN- γ . MART.22 T cells were fixed, permeabilized and stained for intracellular cytokines following 6 h of incubation with HAECs pretreated (black bars) or not (white bars) with IFN- γ . Data are expressed as percentages of intracellular cytokine secreting T cells upon stimulation. D/HLA-E-restricted CD8 T cells cytokine production upon stimulation with endothelial cultures treated or not by IFN- γ , in the presence of blocking antibodies. MART.22 T cells were fixed, permeabilized and stained for intracellular cytokines following incubation for 6 h with HAECs pretreated or not with IFN- γ in the presence or not of various amount of blocking antibodies directed against KIR2DL2, ILT-2 and HLA-Ia molecules. Data are expressed as percentages of intracellular TNF secreting T cells upon stimulation. doi:10.1371/journal.pone.0050951.g007

poietic stem cell transplantation should also be addressed, as it has been suggested by studies using transgenic mice [32]. Moreover, we provided strong evidence that HLA-C/NKR mismatch is a key

player in HLA-E-restricted T cells alloreactivity. Thus, graft organ HLA-C haplotypes may impact on CMV-associated HLA-E-restricted T cells capacity to mediate allograft rejection. Hence, a

deeper evaluation of the frequency and the role of CMV-associated HLA-E-restricted T cells in transplantation and of the impact of HLA-C haplotype on their alloreactivity, may determine whether this indeed represents an additional risk factor following solid organ transplantation.

Supporting Information

Figure S1 Phenotypic characterization of HLA-E-restricted T cells. The surface expression of various markers was assessed by flow cytometry and the RFI plotted graphically. (TIF)

Figure S2 Surface expression of HLA-I molecules by B-EBV cell lines transfected (.221-E) or not (.221) with HLA-E. Surface expression of total HLA-I (A), HLA-Ia (B) and HLA-E (C) molecules. RFI are indicated. (TIF)

Figure S3 Autoreactivity of HLA-E-restricted T cells in the presence of blocking antibodies. MART.22 T cells were incubated in the presence (thick lines) or in the absence (thin lines) of blocking antibodies (10 µg/ml) directed against KIR2DL2 (A), ILT-2 (B) and HLA-Ia (C). After 6 h, T cells were fixed, permeabilized and stained for intracellular TNF-α. Results are expressed as percentage of TNF-producing T cells when incubated with blocking antibodies. (TIF)

Figure S4 Impact of IFN-γ treatment on allogeneic endothelial cells (HAEC#116) recognition by HLA-E-restricted CD8 T cells. A/Impact of IFN-γ treatment on surface expression of HLA-E (thick lines) and total HLA-I (dotted lines) molecules by endothelial cultures. RFI are indicated. B/

HLA-E-restricted CD8 T cells cytotoxicity toward endothelial cultures treated or not with IFN-γ. 10^3 ^{51}Cr -labeled HAECs pretreated (closed circles) or not (open circle) with IFN-γ were co-cultured for 4 h with T cells at various E:T ratio. Cytotoxic activity was assessed through measure of Chromium release in the supernatants. Percentages of specific lysis are indicated. Means and standard deviations of triplicate wells are shown for one representative experiments out of three performed. C/HLA-E-restricted CD8 T cells cytokine production upon stimulation with endothelial cultures treated or not with IFN-γ. MART.22 T cells were fixed, permeabilized and stained for intracellular cytokines following 6 h of incubation with HAECs pretreated (black bars) or not (white bars) with IFN-γ. Data are expressed as percentages of intracellular cytokine secreting T cells upon stimulation. (TIF)

Acknowledgments

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

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: MA BC NG. Performed the experiments: MA PT SN RO. Analyzed the data: MA PT BC NG. Contributed reagents/materials/analysis tools: SN AM YG EH. Wrote the paper: MA EH BC NG.

References

- Husain S, Pietrangeli CE, Zeevi A (2009) Delayed onset CMV disease in solid organ transplant recipients. *Transpl Immunol* 21: 1–9.
- Rowshani AT, Bemelman FJ, van Leeuwen EM, van Lier RA, ten Berge IJ (2005) Clinical and immunologic aspects of cytomegalovirus infection in solid organ transplant recipients. *Transplantation* 79: 381–386.
- Fisher RA (2009) Cytomegalovirus infection and disease in the new era of immunosuppression following solid organ transplantation. *Transpl Infect Dis* 11: 195–202.
- Streblov DN, Orloff SL, Nelson JA (2007) Acceleration of allograft failure by cytomegalovirus. *Curr Opin Immunol* 19: 577–582.
- Adler B, Sinzger C (2009) Endothelial cells in human cytomegalovirus infection: one host cell out of many or a crucial target for virus spread? *Thromb Haemostasis* 102: 1057–1063.
- Guetta E, Scarpati EM, DiCorleto PE (2001) Effect of cytomegalovirus immediate early gene products on endothelial cell gene activity. *Cardiovasc Res* 50: 538–546.
- Sacher T, Mohr CA, Weyn A, Schlichting C, Koszinowski UH, et al. (2012) The role of cell types in cytomegalovirus infection in vivo. *Eur J Cell Biol* 91: 70–77.
- Al-Lamki RS, Bradley JR, Pober JS (2006) Endothelial cells in allograft rejection. *Transplantation* 86: 1340–1348.
- Amir AL, D'Orsogna LJ, Roelen DL, van Loenen MM, Hagedoorn RS, et al. (2010) Allo-HLA reactivity of virus-specific memory T cells is common. *Blood* 115: 3146–3157.
- D'Orsogna LJ, Roelen DL, Doxiadis II, Claas FH (2010) Alloreactivity from human viral specific memory T-cells. *Transpl Immunol* 23: 149–155.
- Gamadia LE, Remmerswaal EB, Surachno S, Lardy NM, Wertheim-van Dillen PM, et al. (2004) Cross-reactivity of cytomegalovirus-specific CD8+ T cells to allo-major histocompatibility complex class I molecules. *Transplantation* 77: 1879–1885.
- Morice A, Charreau B, Neveu B, Brouard S, Souillou JP, et al. (2010) Cross-reactivity of herpesvirus-specific CD8 T cell lines toward allogeneic class I MHC molecules. *PLoS One* 5: e12120.
- Pietra G, Romagnani C, Falco M, Vitale M, Castriconi R, et al. (2001) The analysis of the natural killer-like activity of human cytolytic T lymphocytes revealed HLA-E as a novel target for TCR alpha/beta-mediated recognition. *Eur J Immunol* 31: 3687–3693.
- Pietra G, Romagnani C, Manzini C, Moretta L, Mingari MC (2010) The emerging role of HLA-E-restricted CD8+ T lymphocytes in the adaptive immune response to pathogens and tumors. *J Biomed Biotechnol* 2010: 907092.
- Pietra G, Romagnani C, Mazzarino P, Falco M, Millo E, et al. (2003) HLA-E-restricted recognition of cytomegalovirus-derived peptides by human CD8+ cytolytic T lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100: 10896–10901.
- Romagnani C, Pietra G, Falco M, Millo E, Mazzarino P, et al. (2002) Identification of HLA-E-specific alloreactive T lymphocytes: a cell subset that undergoes preferential expansion in mixed lymphocyte culture and displays a broad cytolytic activity against allogeneic cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99: 11328–11333.
- Strong RK, Holmes MA, Li P, Braun L, Lee N, et al. (2003) HLA-E allelic variants. Correlating differential expression, peptide affinities, crystal structures, and thermal stabilities. *J Biol Chem* 278: 5082–5090.
- Lee N, Goodlett DR, Ishitani A, Marquardt H, Geraghty DE (1998) HLA-E surface expression depends on binding of TAP-dependent peptides derived from certain HLA class I signal sequences. *J Immunol* 160: 4951–4960.
- Braud VM, Allan DS, O'Callaghan CA, Soderstrom K, D'Andrea A, et al. (1998) HLA-E binds to natural killer cell receptors CD94/NKG2A, B and C. *Nature* 391: 795–799.
- Lee N, Llano M, Carretero M, Ishitani A, Navarro F, et al. (1998) HLA-E is a major ligand for the natural killer inhibitory receptor CD94/NKG2A. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95: 5199–5204.
- Hoare HL, Sullivan LC, Pietra G, Clements CS, Lee EJ, et al. (2006) Structural basis for a major histocompatibility complex class Ib-restricted T cell response. *Nat Immunol* 7: 256–264.
- van Hall T, Oliveira CC, Joosten SA, Ottenhoff TH (2010) The other Janus face of Qa-1 and HLA-E: diverse peptide repertoires in times of stress. *Microbes Infect* 12: 910–918.
- Joosten SA, van Meijgaarden KE, van Weeren PC, Kazi F, Geluk A, et al. (2010) Mycobacterium tuberculosis peptides presented by HLA-E molecules are targets for human CD8 T-cells with cytotoxic as well as regulatory activity. *PLoS Pathog* 6: e1000782.
- Salerno-Goncalves R, Fernandez-Vina M, Lewinsohn DM, Szein MB (2004) Identification of a human HLA-E-restricted CD8+ T cell subset in volunteers immunized with Salmonella enterica serovar Typhi strain Ty21a typhoid vaccine. *J Immunol* 173: 5852–5862.
- Garcia P, Llano M, de Heredia AB, Willberg CB, Caparros E, et al. (2002) Human T cell receptor-mediated recognition of HLA-E. *Eur J Immunol* 32: 936–944.
- Schulte D, Vogel M, Langhans B, Kramer B, Korner C, et al. (2009) The HLA-E(R)/HLA-E(R) genotype affects the natural course of hepatitis C virus (HCV)

- infection and is associated with HLA-E-restricted recognition of an HCV-derived peptide by interferon-gamma-secreting human CD8(+) T cells. *J Infect Dis* 200; 1397–1401.
27. Sensi M, Pietra G, Molla A, Nicolini G, Vegetti C, et al. (2009) Peptides with dual binding specificity for HLA-A2 and HLA-E are encoded by alternatively spliced isoforms of the antioxidant enzyme peroxiredoxin 5. *Int Immunol* 21: 257–268.
 28. Jiang H, Canfield SM, Gallagher MP, Jiang HH, Jiang Y, et al. (2010) HLA-E-restricted regulatory CD8(+) T cells are involved in development and control of human autoimmune type 1 diabetes. *J Clin Invest* 120: 3641–3650.
 29. Oliveira CC, van Veelen PA, Querido B, de Ru A, Sluiter M, et al. (2010) The nonpolymorphic MHC Qa-1b mediates CD8+ T cell surveillance of antigen-processing defects. *J Exp Med* 207: 207–221.
 30. Coupel S, Moreau A, Hamidou M, Horejsi V, Souillou JP, et al. (2007) Expression and release of soluble HLA-E is an immunoregulatory feature of endothelial cell activation. *Blood* 109: 2806–2814.
 31. Choi J, Enis DR, Koh KP, Shiao SL, Pober JS (2004) T lymphocyte-endothelial cell interactions. *Annu Rev Immunol* 22: 683–709.
 32. Pacasova R, Martinozzi S, Boulouis HJ, Ulbrecht M, Vieville JC, et al. (1999) Cell-surface expression and alloantigenic function of a human nonclassical class I molecule (HLA-E) in transgenic mice. *J Immunol* 162: 5190–5196.
 33. Saulquin X, Ibisch C, Peyrat MA, Scotet E, Hourmant M, et al. (2000) A global appraisal of immunodominant CD8 T cell responses to Epstein-Barr virus and cytomegalovirus by bulk screening. *Eur J Immunol* 30: 2531–2539.
 34. Gervois N, Labarrière N, Le Guiner S, Pandolfino MC, Fonteneau JF, et al. (2000) High avidity melanoma-reactive cytotoxic T lymphocytes are efficiently induced from peripheral blood lymphocytes on stimulation by peptide-pulsed melanoma cells. *Clin Cancer Res* 6: 1459–1467.
 35. Coupel S, Leboeuf F, Boudlay G, Souillou JP, Charreau B (2004) RhoA activation mediates phosphatidylinositol 3-kinase-dependent proliferation of human vascular endothelial cells: an alloimmune mechanism of chronic allograft nephropathy. *J Am Soc Nephrol* 15: 2429–2439.
 36. Braud VM, Allan DS, Wilson D, McMichael AJ (1998) TAP- and tapasin-dependent HLA-E surface expression correlates with the binding of an MHC class I leader peptide. *Curr Biol* 8: 1–10.
 37. De Paen E, Lurquin C, Lethe B, van der Bruggen P, Brichard V, et al. (1997) Identification of genes coding for tumor antigens recognized by cytolytic T lymphocytes. *Methods* 12: 125–142.
 38. Klebanoff CA, Gattinoni L, Restifo NP (2006) CD8+ T-cell memory in tumor immunology and immunotherapy. *Immunol Rev* 211: 214–224.
 39. Cerboni C, Mousavi-Jazi M, Wakiguchi H, Carbone E, Karre K, et al. (2001) Synergistic effect of IFN-gamma and human cytomegalovirus protein UL40 in the HLA-E-dependent protection from NK cell-mediated cytotoxicity. *Eur J Immunol* 31: 2926–2935.
 40. Tomasec P, Braud VM, Rickards C, Powell MB, McSharry BP, et al. (2000) Surface expression of HLA-E, an inhibitor of natural killer cells, enhanced by human cytomegalovirus gpUL40. *Science* 287: 1031.
 41. David G, Morvan M, Gagne K, Kerdudou N, Willem C, et al. (2009) Discrimination between the main activating and inhibitory killer cell immunoglobulin-like receptor positive natural killer cell subsets using newly characterized monoclonal antibodies. *Immunology* 128: 172–184.
 42. Moesta AK, Norman PJ, Yawata M, Yawata N, Gleimer M, et al. (2008) Synergistic polymorphism at two positions distal to the ligand-binding site makes KIR2DL2 a stronger receptor for HLA-C than KIR2DL3. *J Immunol* 180: 3969–3979.
 43. Pende D, Marcenaro S, Falco M, Martini S, Bernardo ME, et al. (2009) Anti-leukemia activity of alloreactive NK cells in KIR ligand-mismatched haploidentical HSCT for pediatric patients: evaluation of the functional role of activating KIR and redefinition of inhibitory KIR specificity. *Blood* 113: 3119–3129.
 44. Schonberg K, Sribar M, Enczmann J, Fischer JC, Uhrberg M (2011) Analyses of HLA-C-specific KIR repertoires in donors with group A and B haplotypes suggest a ligand-instructed model of NK cell receptor acquisition. *Blood* 117: 98–107.
 45. Rodgers JR, Cook RG (2005) MHC class Ib molecules bridge innate and acquired immunity. *Nat Rev Immunol* 5: 459–471.
 46. Sullivan LC, Clements CS, Rossjohn J, Brooks AG (2008) The major histocompatibility complex class Ib molecule HLA-E at the interface between innate and adaptive immunity. *Tissue Antigens* 72: 415–424.
 47. Reddehase MJ (2002) Antigens and immunoevasins: opponents in cytomegalovirus immune surveillance. *Nat Rev Immunol* 2: 831–844.
 48. Wilkinson GW, Tomasec P, Stanton RJ, Armstrong M, Prod'homme V, et al. (2008) Modulation of natural killer cells by human cytomegalovirus. *J Clin Virol* 41: 206–212.
 49. Mazzarino P, Pietra G, Vacca P, Falco M, Colau D, et al. (2005) Identification of effector-memory CMV-specific T lymphocytes that kill CMV-infected target cells in an HLA-E-restricted fashion. *Eur J Immunol* 35: 3240–3247.
 50. Moretta L, Romagnani C, Pietra G, Moretta A, Mingari MC (2003) NK-CTLs, a novel HLA-E-restricted T-cell subset. *Trends Immunol* 24: 136–143.
 51. Jabri B, Selby JM, Negulescu H, Lee L, Roberts AI, et al. (2002) TCR specificity dictates CD94/NKG2A expression by human CTL. *Immunity* 17: 487–499.
 52. Takemoto S, Port FK, Claas FH, Duquesnoy RJ (2004) HLA matching for kidney transplantation. *Hum Immunol* 65: 1489–1505.
 53. van Bergen J, Thompson A, Haasnoot GW, Roodnat JJ, de Fijter JW, et al. (2011) KIR-ligand mismatches are associated with reduced long-term graft survival in HLA-compatible kidney transplantation. *Am J Transplant* 11: 1959–1964.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Abediankenari, S., Yousefzadeh, Y., Majidi, M., Ghasemi, M., Nasehi, M.M., Ghaffari, J., Habibi Saravi, R., Abedini, M., and Elyasi, M. (2011). MICB gene expression on peripheral blood mononuclear cells and susceptibility to multiple sclerosis in north of Iran. *Iran J Allergy Asthma Immunol* 10, 261–265.
- Acevedo, M.J., Caro-Oleas, J.L., Álvarez-Márquez, A.J., Sobrino, J.M., Lage-Gallé, E., Aguilera, I., and Núñez-Roldán, A. (2011). Antibodies against heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K in patients with cardiac allograft vasculopathy. *J. Heart Lung Transplant.* 30, 1051–1059.
- Agüera-González, S., Gross, C.C., Fernández-Messina, L., Ashiru, O., Estes, G., Hang, H.C., Reyburn, H.T., Long, E.O., and Valés-Gómez, M. (2011). Palmitoylation of MICA, a ligand for NKG2D, mediates its recruitment to membrane microdomains and promotes its shedding. *Eur. J. Immunol.* 41, 3667–3676.
- Ahmad, T., Marshall, S.E., Mulcahy-Hawes, K., Orchard, T., Crawshaw, J., Armuzzi, A., Neville, M., van Heel, D., Barnardo, M., Welsh, K.I., et al. (2002). High resolution MIC genotyping: design and application to the investigation of inflammatory bowel disease susceptibility. *Tissue Antigens* 60, 164–179.
- Aida, K., Russomando, G., Kikuchi, M., Candia, N., Franco, L., Almiron, M., Ubalee, R., and Hirayama, K. (2002). High frequency of MIC null haplotype (HLA-B48-MICA-del-MICB*0107 N) in the Angaité Amerindian community in Paraguay. *Immunogenetics* 54, 439–441.
- Aird, W.C. (2006). Endothelium and allotransplantation. *Transplantation* 82, S6–8.
- Aird, W.C. (2007). Phenotypic heterogeneity of the endothelium: I. Structure, function, and mechanisms. *Circ. Res.* 100, 158–173.
- Albrecht, E.A., Chinnaiyan, A.M., Varambally, S., Kumar-Sinha, C., Barrette, T.R., Sarma, J.V., and Ward, P.A. (2004). C5a-induced gene expression in human umbilical vein endothelial cells. *Am. J. Pathol.* 164, 849–859.
- Alizadeh, B.Z., Eerligh, P., van der Slik, A.R., Shastry, A., Zhernakova, A., Valdigem, G., Bruining, J.G., Sanjeevi, C.B., Wijmenga, C., Roep, B.O., et al. (2007). MICA marks additional risk factors for Type 1 diabetes on extended HLA haplotypes: an association and meta-analysis. *Mol. Immunol.* 44, 2806–2812.
- Allez, M., Tieng, V., Nakazawa, A., Treton, X., Pacault, V., Dulphy, N., Caillat-Zucman, S., Paul, P., Gornet, J.-M., Douay, C., et al. (2007). CD4+NKG2D+ T cells in Crohn's disease mediate inflammatory and cytotoxic responses through MICA interactions. *Gastroenterology* 132, 2346–2358.
- Alvarez-Márquez, A., Aguilera, I., Gentil, M.A., Caro, J.L., Bernal, G., Fernández Alonso, J., Acevedo, M.J., Cabello, V., Wichmann, I., Gonzalez-Escribano, M.F., et al. (2009). Donor-specific antibodies against HLA, MICA, and GSTT1 in patients with allograft rejection and C4d deposition in renal biopsies. *Transplantation* 87, 94–99.
- Amézaga, N., Crespo, M., Lopez-Cobos, M., Millán, M.A., Viñas, O., Solé, M., Oppenheimer, F., Martorell, J., and Ercilla, M.G. (2006). Relevance of MICA antibodies in acute humoral rejection in renal transplant patients. *Transpl. Immunol.* 17, 39–42.
- Amico, P., Hönger, G., Biemann, D., Lutz, D., Garzoni, D., Steiger, J., Mihatsch, M.J., Dragun, D., and Schaub, S. (2008). Incidence and prediction of early antibody-mediated rejection due to non-human leukocyte antigen-antibodies. *Transplantation* 85, 1557–1563.
- Amroun, H., Djoudi, H., Busson, M., Allat, R., El Sherbini, S.M., Sloma, I., Ramasawmy, R., Brun, M., Dulphy, N., Krishnamoorthy, R., et al. (2005). Early-Onset Ankylosing Spondylitis Is Associated With a Functional MICA Polymorphism. *Human Immunology* 66, 1057–1061.
- Anderson, E., Grzywacz, B., Wang, H., Wang, T., Haagensohn, M., Spellman, S., Blazar, B.R., Miller, J.S., and Verneris, M.R. (2009). Limited role of MHC class I chain-related gene A (MICA) typing in assessing graft-versus-host disease risk after fully human leukocyte antigen-matched unrelated donor transplantation. *Blood* 114, 4753–4754; author reply 4754–4755.
- Andersson, A.K., Sumariwalla, P.F., McCann, F.E., Amjadi, P., Chang, C., McNamee, K., Tornehave, D., Haase, C., Agersø, H., Stennicke, V.W., et al. (2011). Blockade of NKG2D ameliorates disease in mice with collagen-induced arthritis: A potential pathogenic role in chronic inflammatory arthritis. *Arthritis & Rheumatism*

Ando, H., Mizuki, N., Ota, M., Yamazaki, M., Ohno, S., Goto, K., Miyata, Y., Wakisaka, K., Bahram, S., and Inoko, H. (1997). Allelic variants of the human MHC class I chain-related B gene (MICB). *Immunogenetics* 46, 499–508.

Andresen, L., Jensen, H., Pedersen, M.T., Hansen, K.A., and Skov, S. (2007). Molecular regulation of MHC class I chain-related protein A expression after HDAC-inhibitor treatment of Jurkat T cells. *J. Immunol.* 179, 8235–8242.

Andresen, L., Hansen, K.A., Jensen, H., Pedersen, S.F., Stougaard, P., Hansen, H.R., Jurlander, J., and Skov, S. (2009). Propionic acid secreted from propionibacteria induces NKG2D ligand expression on human-activated T lymphocytes and cancer cells. *J. Immunol.* 183, 897–906.

Andresen, L., Skovbakke, S.L., Persson, G., Hagemann-Jensen, M., Hansen, K.A., Jensen, H., and Skov, S. (2012). 2-deoxy D-glucose prevents cell surface expression of NKG2D ligands through inhibition of N-linked glycosylation. *J. Immunol.* 188, 1847–1855.

Angaswamy, N., Saini, D., Ramachandran, S., Nath, D.S., Phelan, D., Hachem, R., Trulock, E., Patterson, G.A., and Mohanakumar, T. (2010). Development of antibodies to human leukocyte antigen precedes development of antibodies to major histocompatibility class I-related chain A and are significantly associated with development of chronic rejection after human lung transplantation. *Hum. Immunol.* 71, 560–565.

Annane, D., Bellissant, E., and Cavaillon, J.-M. (2005). Septic shock. *Lancet* 365, 63–78.

Aquino-Galvez, A., Pérez-Rodríguez, M., Camarena, A., Falfan-Valencia, R., Ruiz, V., Montaña, M., Barrera, L., Sada-Ovalle, I., Ramírez, R., Granados, J., et al. (2009). MICA polymorphisms and decreased expression of the MICA receptor NKG2D contribute to idiopathic pulmonary fibrosis susceptibility. *Hum. Genet.* 125, 639–648.

Ariza-Heredia, E.J., and Razonable, R.R. (2011). Human herpes virus 8 in solid organ transplantation. *Transplantation* 92, 837–844.

Armeanu, S., Bitzer, M., Lauer, U.M., Venturelli, S., Pathil, A., Krusch, M., Kaiser, S., Jobst, J., Smirnow, I., Wagner, A., et al. (2005). Natural killer cell-mediated lysis of hepatoma cells via specific induction of NKG2D ligands by the histone deacetylase inhibitor sodium valproate. *Cancer Res.* 65, 6321–6329.

Arnaud, L., Haroche, J., Mathian, A., Gorochoy, G., and Amoura, Z. (2011). Pathogenesis of Takayasu's arteritis: a 2011 update. *Autoimmun Rev* 11, 61–67.

Arreygue-Garcia, N.A., Daneri-Navarro, A., del Toro-Arreola, A., Cid-Arregui, A., Gonzalez-Ramella, O., Jave-Suarez, L.F., Aguilar-Lemarroy, A., Troyo-Sanroman, R., Bravo-Cuellar, A., Delgado-Rizo, V., et al. (2008). Augmented serum level of major histocompatibility complex class I-related chain A (MICA) protein and reduced NKG2D expression on NK and T cells in patients with cervical cancer and precursor lesions. *BMC Cancer* 8, 16.

Arthurs, S.K., Eid, A.J., Pedersen, R.A., Kremers, W.K., Cosio, F.G., Patel, R., and Razonable, R.R. (2008). Delayed-onset primary cytomegalovirus disease and the risk of allograft failure and mortality after kidney transplantation. *Clin. Infect. Dis.* 46, 840–846.

Arvin, A.M. (2000). Varicella-Zoster virus: pathogenesis, immunity, and clinical management in hematopoietic cell transplant recipients. *Biol. Blood Marrow Transplant.* 6, 219–230.

Arvonen, M., Tikanmäki, M., Vähäsalo, P., and Karttunen, T.J. (2010). Heat shock protein expression is low in intestinal mucosa in juvenile idiopathic arthritis: a defect in immunoregulation? *Scand. J. Rheumatol.* 39, 212–218.

Ashiru, O., Bennett, N.J., Boyle, L.H., Thomas, M., Trowsdale, J., and Wills, M.R. (2009). NKG2D ligand MICA is retained in the cis-Golgi apparatus by human cytomegalovirus protein UL142. *J. Virol.* 83, 12345–12354.

Ashiru, O., Boutet, P., Fernández-Messina, L., Agüera-González, S., Skepper, J.N., Valés-Gómez, M., and

- Reyburn, H.T. (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, 481–489.
- Averdam, A., Seelke, S., Grützner, I., Rosner, C., Roos, C., Westphal, N., Stahl-Hennig, C., Muppala, V., Schrod, A., Sauermann, U., et al. (2007). Genotyping and segregation analyses indicate the presence of only two functional MIC genes in rhesus macaques. *Immunogenetics* 59, 247–251.
- Awadalla, Y., Randhawa, P., Ruppert, K., Zeevi, A., and Duquesnoy, R.J. (2004). HLA mismatching increases the risk of BK virus nephropathy in renal transplant recipients. *Am. J. Transplant.* 4, 1691–1696.
- Azimi, N., Jacobson, S., Tanaka, Y., Corey, L., Groh, V., and Spies, T. (2006). Immunostimulation by induced expression of NKG2D and its MIC ligands in HTLV-1-associated neurologic disease. *Immunogenetics* 58, 252–258.
- Bachelet, T., Couzi, L., Guidicelli, G., Moreau, K., Morel, D., Merville, P., and Taupin, J.-L. (2011). Anti-Cw Donor-specific Alloantibodies Can Lead to Positive Flow Cytometry Crossmatch and Irreversible Acute Antibody-Mediated Rejection. *American Journal of Transplantation* 11, 1543–1544.
- Bacon, L., Eagle, R.A., Meyer, M., Easom, N., Young, N.T., and Trowsdale, J. (2004). Two human ULBP/RAET1 molecules with transmembrane regions are ligands for NKG2D. *J. Immunol.* 173, 1078–1084.
- Baharav, E., and Weinberger, A. (2012). The HLA-B*5101 molecule-binding capacity to antigens used in animal models of Behçet's disease: a bioinformatics study. *Isr. Med. Assoc. J.* 14, 424–428.
- Bahram, S., Bresnahan, M., Geraghty, D.E., and Spies, T. (1994). A second lineage of mammalian major histocompatibility complex class I genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 91, 6259–6263.
- Bahram, S., Mizuki, N., Inoko, H., and Spies, T. (1996). Nucleotide sequence of the human MHC class I MICA gene. *Immunogenetics* 44, 80–81.
- Barahmani, N., de Andrade, M., Slusser, J.P., Zhang, Q., and Duvic, M. (2006). Major histocompatibility complex class I chain-related gene A polymorphisms and extended haplotypes are associated with familial alopecia areata. *J. Invest. Dermatol.* 126, 74–78.
- Barker, J.M., Ide, A., Hostetler, C., Yu, L., Miao, D., Fain, P.R., Eisenbarth, G.S., and Gottlieb, P.A. (2005). Endocrine and immunogenetic testing in individuals with type 1 diabetes and 21-hydroxylase autoantibodies: Addison's disease in a high-risk population. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 90, 128–134.
- Barri, Y.M., Ahmad, I., Ketel, B.L., Barone, G.W., Walker, P.D., Bonsib, S.M., and Abul-Ezz, S.R. (2001). Polyoma viral infection in renal transplantation: the role of immunosuppressive therapy. *Clin Transplant* 15, 240–246.
- Barsoum, I.B., Hamilton, T.K., Li, X., Cotechini, T., Miles, E.A., Siemens, D.R., and Graham, C.H. (2011). Hypoxia induces escape from innate immunity in cancer cells via increased expression of ADAM10: role of nitric oxide. *Cancer Res.* 71, 7433–7441.
- Le Bas-Bernardet, S., Hourmant, M., Coupel, S., Bignon, J.-D., Souillou, J.-P., and Charreau, B. (2003). Non-HLA-type endothelial cell reactive alloantibodies in pre-transplant sera of kidney recipients trigger apoptosis. *Am. J. Transplant.* 3, 167–177.
- Le Bas-Bernardet, S., Coupel, S., Chauveau, A., Souillou, J.-P., and Charreau, B. (2004). Vascular endothelial cells evade apoptosis triggered by human leukocyte antigen-DR ligation mediated by allospecific antibodies. *Transplantation* 78, 1729–1739.
- Baschal, E.E., and Eisenbarth, G.S. (2008). Extreme genetic risk for type 1A diabetes in the post-genome era. *Journal of Autoimmunity* 31, 1–6.
- Baschal, E.E., Baker, P.R., Eyring, K.R., Siebert, J.C., Jasinski, J.M., and Eisenbarth, G.S. (2011). The HLA-B*3906 allele imparts a high risk of diabetes only on specific HLA-DR/DQ haplotypes. *Diabetologia* 54, 1702–1709.
- Basu, S., Eriksson, M., Pioli, P.A., Conejo-Garcia, J., Mselle, T.F., Yamamoto, S., Wira, C.R., and Sentman, C.L. (2009). Human uterine NK cells interact with uterine macrophages via NKG2D upon stimulation with

PAMPs. *Am. J. Reprod. Immunol.* *61*, 52–61.

Bauer, S., Willie, S.T., Spies, T., and Strong, R.K. (1998). Expression, purification, crystallization and crystallographic characterization of the human MHC class I related protein MICA. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* *54*, 451–453.

Bauer, S., Groh, V., Wu, J., Steinle, A., Phillips, J.H., Lanier, L.L., and Spies, T. (1999). Activation of NK cells and T cells by NKG2D, a receptor for stress-inducible MICA. *Science* *285*, 727–729.

Bauman, Y., Nachmani, D., Vitsenshtein, A., Tsukerman, P., Drayman, N., Stern-Ginossar, N., Lankry, D., Gruda, R., and Mandelboim, O. (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*, 93–102.

Bedel, R., Thiery-Vuillemin, A., Grandclement, C., Balland, J., Remy-Martin, J.-P., Kantelip, B., Pallandre, J.-R., Pivot, X., Ferrand, C., Tiberghien, P., et al. (2011). Novel role for STAT3 in transcriptional regulation of NK immune cell targeting receptor MICA on cancer cells. *Cancer Res.* *71*, 1615–1626.

Belicha-Villanueva, A., Riddell, J., Bangia, N., and Gollnick, S.O. (2012). The effect of photodynamic therapy on tumor cell expression of major histocompatibility complex (MHC) class I and MHC class I-related molecules. *Lasers Surg Med* *44*, 60–68.

Van Belle, T.L., and von Herrath, M.G. (2009). The role of the activating receptor NKG2D in autoimmunity. *Mol. Immunol.* *47*, 8–11.

Bellizzi, A., Nardis, C., Anzivino, E., Rodio, D.M., Fioriti, D., Mischitelli, M., Chiarini, F., and Pietropaolo, V. (2012). Human polyomavirus JC reactivation and pathogenetic mechanisms of progressive multifocal leukoencephalopathy and cancer in the era of monoclonal antibody therapies. *J. Neurovirol.* *18*, 1–11.

Ben Ahmed, M., Houman, H., Abdelhak, S., Ben Ghorbel, I., Miled, M., Dellagi, K., and Louzir, H. (2003). MICA transmembrane region polymorphism and HLA B51 in Tunisian Behçet's disease patients. *Adv. Exp. Med. Biol.* *528*, 225–228.

Bennett, N.J., Ashiru, O., Morgan, F.J.E., Pang, Y., Okecha, G., Eagle, R.A., Trowsdale, J., Sissons, J.G.P., and Wills, M.R. (2010). Intracellular Sequestration of the NKG2D Ligand ULBP3 by Human Cytomegalovirus. *J Immunol* *185*, 1093–1102.

Bent, C.J., Isaacs, N.W., Mitchell, T.J., and Riboldi-Tunncliffe, A. (2003). Cloning, overexpression, purification, crystallization and preliminary diffraction analysis of the receiver domain of MicA. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* *59*, 758–760.

Benzaquen, L.R., Nicholson-Weller, A., and Halperin, J.A. (1994). Terminal complement proteins C5b-9 release basic fibroblast growth factor and platelet-derived growth factor from endothelial cells. *J. Exp. Med.* *179*, 985–992.

Bernal, M., Garrido, P., Jiménez, P., Carretero, R., Almagro, M., López, P., Navarro, P., Garrido, F., and Ruiz-Cabello, F. (2009). Changes in activatory and inhibitory natural killer (NK) receptors may induce progression to multiple myeloma: implications for tumor evasion of T and NK cells. *Hum. Immunol.* *70*, 854–857.

Bertzina, L., Shtauvere-Brameus, A., Rumba, I., and Sanjeevi, C.B. (2002). Microsatellite allele A5.1 of MHC class I chain-related gene A is associated with latent autoimmune diabetes in adults in Latvia. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* *958*, 353–356.

Bessoles, S., Ni, M., Garcia-Jimenez, S., Sanchez, F., and Lafont, V. (2011). Role of NKG2D and its ligands in the anti-infectious activity of Vγ9Vδ2 T cells against intracellular bacteria. *Eur. J. Immunol.* *41*, 1619–1628.

Bilbao, J.R., Martín-Pagola, A., Vitoria, J.C., Zubillaga, P., Ortiz, L., and Castaño, L. (2002). HLA-DRB1 and MHC class I chain-related A haplotypes in Basque families with celiac disease. *Tissue Antigens* *60*, 71–76.

Bilbao, J.R., Martín-Pagola, A., Pérez De Nanclares, G., Calvo, B., Vitoria, J.C., Vázquez, F., and Castaño, L. (2003). HLA-DRB1 and MICA in autoimmunity: common associated alleles in autoimmune disorders. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* *1005*, 314–318.

Bilbao, J.R., Villoslada, P., Martín-Pagola, A., and Castaño, L. (2004). No evidence of pancreatic autoimmunity

among patients with multiple sclerosis. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1037, 133–137.

Binggeli, S., Egli, A., Schaub, S., Binet, I., Mayr, M., Steiger, J., and Hirsch, H.H. (2007). Polyomavirus BK-specific cellular immune response to VP1 and large T-antigen in kidney transplant recipients. *Am. J. Transplant.* 7, 1131–1139.

Bishop, G.A., and Hwang, J. (1992). Use of a cellular ELISA for the detection of cell surface antigens. *BioTechniques* 12, 326–330.

Blencowe, B.J. (2006). Alternative splicing: new insights from global analyses. *Cell* 126, 37–47.

Blume, O.R., Yost, S.E., and Kaplan, B. (2012). Antibody-mediated rejection: pathogenesis, prevention, treatment, and outcomes. *J Transplant* 2012, 201754.

Bohl, D.L., and Brennan, D.C. (2007). BK virus nephropathy and kidney transplantation. *Clin J Am Soc Nephrol* 2 Suppl 1, S36–46.

Böhmig, G.A., Exner, M., Habicht, A., Schillinger, M., Lang, U., Kletzmayer, J., Säemann, M.D., Hörl, W.H., Watschinger, B., and Regele, H. (2002). Capillary C4d deposition in kidney allografts: a specific marker of alloantibody-dependent graft injury. *J. Am. Soc. Nephrol.* 13, 1091–1099.

Boissel, N., Rea, D., Tieng, V., Dulphy, N., Brun, M., Cayuela, J.-M., Rousselot, P., Tamouza, R., Le Bouteiller, P., Mahon, F.-X., et al. (2006). BCR/ABL oncogene directly controls MHC class I chain-related molecule A expression in chronic myelogenous leukemia. *J. Immunol.* 176, 5108–5116.

Bolognesi, E., Dalfonso, S., Rolando, V., Fasano, M.E., Praticò, L., and Momigliano-Richiardi, P. (2001). MICA and MICB microsatellite alleles in HLA extended haplotypes. *Eur. J. Immunogenet.* 28, 523–530.

Bontadini, A. (2012). HLA techniques: typing and antibody detection in the laboratory of immunogenetics. *Methods* 56, 471–476.

Borchers, M.T., Harris, N.L., Wesselkamper, S.C., Vitucci, M., and Cosman, D. (2006a). NKG2D ligands are expressed on stressed human airway epithelial cells. *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* 291, L222–231.

Borchers, M.T., Harris, N.L., Wesselkamper, S.C., Zhang, S., Chen, Y., Young, L., and Lau, G.W. (2006b). The NKG2D-activating receptor mediates pulmonary clearance of *Pseudomonas aeruginosa*. *Infect. Immun.* 74, 2578–2586.

Borrell-Pagès, M., Rojo, F., Albanell, J., Baselga, J., and Arribas, J. (2003). TACE is required for the activation of the EGFR by TGF- α in tumors. *EMBO J.* 22, 1114–1124.

Boukouaci, W., Busson, M., Peffault de Latour, R., Rocha, V., Suberbielle, C., Bengoufa, D., Dulphy, N., Haas, P., Scieux, C., Amroun, H., et al. (2009). MICA-129 genotype, soluble MICA, and anti-MICA antibodies as biomarkers of chronic graft-versus-host disease. *Blood* 114, 5216–5224.

Bratanic, N., Smigoc Schweiger, D., Mendez, A., Bratina, N., Battelino, T., and Vidan-Jeras, B. (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, 208–215.

Bravo, M.J., Colmenero, J.D., Martín, J., Alonso, A., and Caballero, A. (2007). Polymorphism of the transmembrane region of the MICA gene and human brucellosis. *Tissue Antigens* 69, 358–360.

Bressollette-Bodin, C., Coste-Burel, M., Hourmant, M., Sebillé, V., Andre-Garnier, E., and Imbert-Marcille, B.M. (2005). A prospective longitudinal study of BK virus infection in 104 renal transplant recipients. *Am. J. Transplant.* 5, 1926–1933.

Briscoe, D.M., Alexander, S.I., and Lichtman, A.H. (1998). Interactions between T lymphocytes and endothelial cells in allograft rejection. *Curr. Opin. Immunol.* 10, 525–531.

Broeders, N.E., Hombrouck, A., Lemy, A., Wissing, K.M., Racapé, J., Gastaldello, K., Massart, A., Van Gucht, S., Weichselbaum, L., De Mul, A., et al. (2011). Influenza A/H1N1 vaccine in patients treated by kidney transplant or dialysis: a cohort study. *Clin J Am Soc Nephrol* 6, 2573–2578.

- Bruck, R., Aeed, H., Schey, R., Matas, Z., Reifen, R., Zaiger, G., Hochman, A., and Avni, Y. (2002). Pyrrolidine dithiocarbamate protects against thioacetamide-induced fulminant hepatic failure in rats. *J. Hepatol.* *36*, 370–377.
- Burlingham, W.J., Love, R.B., Jankowska-Gan, E., Haynes, L.D., Xu, Q., Bobadilla, J.L., Meyer, K.C., Hayney, M.S., Braun, R.K., Greenspan, D.S., et al. (2007). IL-17-dependent cellular immunity to collagen type V predisposes to obliterative bronchiolitis in human lung transplants. *J. Clin. Invest.* *117*, 3498–3506.
- Busche, A., Goldmann, T., Naumann, U., Steinle, A., and Brandau, S. (2006). Natural killer cell-mediated rejection of experimental human lung cancer by genetic overexpression of major histocompatibility complex class I chain-related gene A. *Hum. Gene Ther.* *17*, 135–146.
- Butler, J.E., Moore, M.B., Presnell, S.R., Chan, H.-W., Chalupny, N.J., and Lutz, C.T. (2009). Proteasome regulation of ULBP1 transcription. *J. Immunol.* *182*, 6600–6609.
- Cai, J., and Terasaki, P.I. (2005). Humoral theory of transplantation: mechanism, prevention, and treatment. *Hum. Immunol.* *66*, 334–342.
- Caillard, S., Dharnidharka, V., Agodoa, L., Bohen, E., and Abbott, K. (2005). Posttransplant lymphoproliferative disorders after renal transplantation in the United States in era of modern immunosuppression. *Transplantation* *80*, 1233–1243.
- Caillat-Zucman, S. (2006). How NKG2D ligands trigger autoimmunity? *Hum. Immunol.* *67*, 204–207.
- Cambra, A., Muñoz-Saá, I., Crespi, C., Serra, A., Etxagibel, A., Matamoros, N., Milà, J., and Julià, M.R. (2009). MICA-HLA-B haplotype diversity and linkage disequilibrium in a population of Jewish descent from Majorca (the Balearic Islands). *Hum. Immunol.* *70*, 513–517.
- Canet, E., Devallière, J., Gérard, N., Karam, G., Giral, M., Charreau, B., and Coupel, S. (2012). Profiling posttransplant circulating antibodies in kidney transplantation using donor endothelial cells. *Transplantation* *93*, 257–264.
- Cao, W., and He, W. (2004). UL16 binding proteins. *Immunobiology* *209*, 283–290.
- Cao, W., Xi, X., Hao, Z., Li, W., Kong, Y., Cui, L., Ma, C., Ba, D., and He, W. (2007). RAET1E2, a Soluble Isoform of the UL16-binding Protein RAET1E Produced by Tumor Cells, Inhibits NKG2D-mediated NK Cytotoxicity. *J. Biol. Chem.* *282*, 18922–18928.
- Cao, W., Xi, X., Wang, Z., Dong, L., Hao, Z., Cui, L., Ma, C., and He, W. (2008). Four novel ULBP splice variants are ligands for human NKG2D. *Int. Immunol.* *20*, 981–991.
- Capraru, D., Müller, A., Csernok, E., Gross, W.L., Holl-Ulrich, K., Northfield, J., Klenerman, P., Herlyn, K., Holle, J., Gottschlich, S., et al. (2008). Expansion of circulating NKG2D⁺ effector memory T-cells and expression of NKG2D-ligand MIC in granulomaous lesions in Wegener's granulomatosis. *Clin. Immunol.* *127*, 144–150.
- Carayannopoulos, L.N., Naidenko, O.V., Fremont, D.H., and Yokoyama, W.M. (2002). Cutting edge: murine UL16-binding protein-like transcript 1: a newly described transcript encoding a high-affinity ligand for murine NKG2D. *J. Immunol.* *169*, 4079–4083.
- Carbone, E., Neri, P., Mesuraca, M., Fulciniti, M.T., Otsuki, T., Pende, D., Groh, V., Spies, T., Pollio, G., Cosman, D., et al. (2005). HLA class I, NKG2D, and natural cytotoxicity receptors regulate multiple myeloma cell recognition by natural killer cells. *Blood* *105*, 251–258.
- Carmeliet, P., and Jain, R.K. (2000). Angiogenesis in cancer and other diseases. *Nature* *407*, 249–257.
- Carreno, B.M., Garbow, J.R., Kolar, G.R., Jackson, E.N., Engelbach, J.A., Becker-Hapak, M., Carayannopoulos, L.N., Piwnica-Worms, D., and Linette, G.P. (2009). Immunodeficient mouse strains display marked variability in growth of human melanoma lung metastases. *Clin. Cancer Res.* *15*, 3277–3286.
- Cathro, H.P., Smolkin, M.E., Theodorescu, D., Jo, V.Y., Ferrone, S., and Frierson, H.F., Jr (2010). Relationship between HLA class I antigen processing machinery component expression and the clinicopathologic characteristics of bladder carcinomas. *Cancer Immunol. Immunother.* *59*, 465–472.

- Cattley, S.K., Longman, N., Dawkins, R.L., Gaudieri, S., Kulski, J.K., and Leelayuwat, C. (1999). Phylogenetic analysis of primate MIC (PERB11) sequences suggests that the representation of the gene family differs in different primates: comparison of MIC (PERB11) and C4. *Eur. J. Immunogenet.* 26, 233–238.
- Cerboni, C., Zingoni, A., Cippitelli, M., Piccoli, M., Frati, L., and Santoni, A. (2007a). 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, 606–615.
- Cerboni, C., Neri, F., Casartelli, N., Zingoni, A., Cosman, D., Rossi, P., Santoni, A., and Doria, M. (2007b). 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, 242–250.
- Cerwenka, A., Baron, J.L., and Lanier, L.L. (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. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 98, 11521–11526.
- Cha, C.-H., Sohn, Y.-H., Oh, H.-B., Ko, S.-Y., Cho, M.-C., and Kwon, O.-J. (2011). MICB polymorphisms and haplotypes with MICA and HLA alleles in Koreans. *Tissue Antigens* 78, 38–44.
- Chalupny, N.J., Rein-Weston, A., Dosch, S., and Cosman, D. (2006). Down-regulation of the NKG2D ligand MICA by the human cytomegalovirus glycoprotein UL142. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 346, 175–181.
- Champsaur, M., and Lanier, L.L. (2010). Effect of NKG2D ligand expression on host immune responses. *Immunol. Rev.* 235, 267–285.
- Chang, Y., Cesarman, E., Pessin, M.S., Lee, F., Culpepper, J., Knowles, D.M., and Moore, P.S. (1994). Identification of herpesvirus-like DNA sequences in AIDS-associated Kaposi's sarcoma. *Science* 266, 1865–1869.
- Chang, Y.T., Tsai, S.F., Lee, D.D., Shiao, Y.M., Huang, C.Y., Liu, H.N., Wang, W.J., and Wong, C.K. (2003). A study of candidate genes for psoriasis near HLA-C in Chinese patients with psoriasis. *Br. J. Dermatol.* 148, 418–423.
- Charreau, B., Coupel, S., Goret, F., Pourcel, C., and Souillou, J.P. (2000). Association of glucocorticoids and cyclosporin A or rapamycin prevents E-selectin and IL-8 expression during LPS- and TNF α -mediated endothelial cell activation. *Transplantation* 69, 945–953.
- Chauveau, A., Aucher, A., Eissmann, P., Vivier, E., and Davis, D.M. (2010). Membrane nanotubes facilitate long-distance interactions between natural killer cells and target cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 107, 5545–5550.
- Chávez-Blanco, A., De la Cruz-Hernández, E., Domínguez, G.I., Rodríguez-Cortez, O., Alatorre, B., Pérez-Cárdenas, E., Chacón-Salinas, R., Trejo-Becerril, C., Taja-Chayeb, L., Trujillo, J.E., et al. (2011). Upregulation of NKG2D ligands and enhanced natural killer cell cytotoxicity by hydralazine and valproate. *Int. J. Oncol.* 39, 1491–1499.
- Chen, G., and Goeddel, D.V. (2002). TNF-R1 signaling: a beautiful pathway. *Science* 296, 1634–1635.
- Chen, A., Shen, Y., Xia, M., Xu, L., Pan, N., Yin, Y., Miao, F., Shen, C., Xie, W., and Zhang, J. (2011). Expression of the nonclassical HLA class I and MICA/B molecules in human hepatocellular carcinoma. *Neoplasma* 58, 371–376.
- Chen, J.R., Lee, Y.J., Chen, T., Wang, K.L., Dang, C.W., Chang, S.C., Liu, H.F., and Yang, Y.C. (2005). MHC class I chain-related gene A (MICA) polymorphism and the different histological types of cervical cancer. *Neoplasma* 52, 369–373.
- Chen, M., Peng, M., Shi, Q., and Ren, H. (2007). [Establishing a L02 cell model with whole HBV gene transfection and analyzing its expressions of HLA-A, B, C and MICA/B]. *Zhonghua Gan Zang Bing Za Zhi* 15, 417–421.
- Chen, X.M., Xu, X.Q., Sun, K., Hallett, W.H.D., Zhao, J.D., and Zhang, D.L. (2008). NKG2D ligands expression and NKG2D-mediated cytotoxicity in human laryngeal squamous carcinoma cells. *Scand. J.*

Immunol. 67, 441–447.

Chen, Y., Cheng, M., and Tian, Z. (2006). Hepatitis B virus down-regulates expressions of MHC class I molecules on hepatoplastoma cell line. *Cell. Mol. Immunol.* 3, 373–378.

Cheng, L., Zhang, S.Z., Xiao, C.Y., Hou, Y.P., Li, L., Luo, H.C., Jiang, H.Y., and Zuo, W.Q. (2000). The A5.1 allele of the major histocompatibility complex class I chain-related gene A is associated with psoriasis vulgaris in Chinese. *Br. J. Dermatol.* 143, 324–329.

Choi, H.B., Han, H., Youn, J.I., Kim, T.Y., and Kim, T.G. (2000). MICA 5.1 allele is a susceptibility marker for psoriasis in the Korean population. *Tissue Antigens* 56, 548–550.

Choy, M.-K., and Phipps, M.E. (2003). Possible polyphyletic origin of major histocompatibility complex class I chain-related gene A (MICA) alleles. *J. Mol. Evol.* 57, 38–43.

Choy, M.-K., and Phipps, M.E. (2010). MICA polymorphism: biology and importance in immunity and disease. *Trends Mol Med* 16, 97–106.

Chung, Y.L., Bang, D.S., Lee, E.-S., Lee, S.N., Mok, J.W., and Park, K.S. (2003). Behçet's disease: the first Mongolian case in literature showing HLA B51, MICA gene type *5/*6. *Yonsei Med. J.* 44, 935–938.

Chung-Ji, L., Yann-Jinn, L., Hsin-Fu, L., Ching-Wen, D., Che-Shoa, C., Yi-Shing, L., and Kuo-Wei, C. (2002). The increase in the frequency of MICA gene A6 allele in oral squamous cell carcinoma. *J. Oral Pathol. Med.* 31, 323–328.

Clatworthy, M.R., Espeli, M., Torpey, N., and Smith, K.G.C. (2010). The generation and maintenance of serum alloantibody. *Curr. Opin. Immunol.* 22, 669–681.

Clayton, A., and Tabi, Z. (2005). Exosomes and the MICA-NKG2D system in cancer. *Blood Cells Mol. Dis.* 34, 206–213.

Clayton, A., Mitchell, J.P., Court, J., Linnane, S., Mason, M.D., and Tabi, Z. (2008). Human tumor-derived exosomes down-modulate NKG2D expression. *J. Immunol.* 180, 7249–7258.

Clemente, A., Cambra, A., Munoz-Saá, I., Crespi, C., Pallarés, L., Juan, A., Matamoros, N., and Julià, M.R. (2010). Phenotype markers and cytokine intracellular production by CD8⁺ gammadelta T lymphocytes do not support a regulatory T profile in Behçet's disease patients and healthy controls. *Immunol. Lett.* 129, 57–63.

Collins, A.B., Schneeberger, E.E., Pascual, M.A., Saidman, S.L., Williams, W.W., Tolkoff-Rubin, N., Cosimi, A.B., and Colvin, R.B. (1999). Complement activation in acute humoral renal allograft rejection: diagnostic significance of C4d deposits in peritubular capillaries. *J. Am. Soc. Nephrol.* 10, 2208–2214.

Collins, R.W.M., Stephens, H.A.F., Clare, M.A., and Vaughan, R.W. (2002). High resolution molecular phototyping of MICA and MICB alleles using sequence specific primers. *Hum. Immunol.* 63, 783–794.

Colvin, R.B., and Smith, R.N. (2005). Antibody-mediated organ-allograft rejection. *Nat. Rev. Immunol.* 5, 807–817.

Coombes, J.S., and Fassett, R.G. (2012). Antioxidant therapy in hemodialysis patients: a systematic review. *Kidney International* 81, 233–246.

Cosman, D., Müllberg, J., Sutherland, C.L., Chin, W., Armitage, R., Fanslow, W., Kubin, M., and Chalupny, N.J. (2001a). ULBPs, novel MHC class I-related molecules, bind to CMV glycoprotein UL16 and stimulate NK cytotoxicity through the NKG2D receptor. *Immunity* 14, 123–133.

Cosman, D., Müllberg, J., Sutherland, C.L., Chin, W., Armitage, R., Fanslow, W., Kubin, M., and Chalupny, N.J. (2001b). ULBPs, novel MHC class I-related molecules, bind to CMV glycoprotein UL16 and stimulate NK cytotoxicity through the NKG2D receptor. *Immunity* 14, 123–133.

Coudert, J.D., Zimmer, J., Tomasello, E., Cebecauer, M., Colonna, M., Vivier, E., and Held, W. (2005). Altered NKG2D function in NK cells induced by chronic exposure to NKG2D ligand-expressing tumor cells. *Blood* 106, 1711–1717.

- Coupel, S., Leboeuf, F., Boulday, G., Soulillou, J.-P., and Charreau, B. (2004a). 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.
- Coupel, S., Leboeuf, F., Boulday, G., Soulillou, J.-P., and Charreau, B. (2004b). 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.
- Cox, S.T., Stephens, H.A.F., Fernando, R., Grant, J., Madrigal, J.A., and Little, A.-M. (2009). Two novel MICA alleles, MICA*054 and MICA*056. *Tissue Antigens* *73*, 85–87.
- Cox, S.T., Stephens, H.A.F., Fernando, R., Karasu, A., Harber, M., Howie, A.J., Powis, S., Zou, Y., Stastny, P., Madrigal, J.A., et al. (2011). Major histocompatibility complex class I-related chain A allele mismatching, antibodies, and rejection in renal transplantation. *Hum. Immunol.* *72*, 827–834.
- Crespi, C., Rosa Julià, M., Muñoz-Saa, I., Pérez-Castellano, M.T., Milà, J., and Matamoros, N. (2003). Skewed inhibitory receptors expression in a TAP2-deficient patient. *Immunol. Lett.* *86*, 149–153.
- Csiszar, A., Wang, M., Lakatta, E.G., and Ungvari, Z. (2008a). Inflammation and endothelial dysfunction during aging: role of NF-kappaB. *J. Appl. Physiol.* *105*, 1333–1341.
- Csiszar, A., Wang, M., Lakatta, E.G., and Ungvari, Z. (2008b). Inflammation and endothelial dysfunction during aging: role of NF-kappaB. *J. Appl. Physiol.* *105*, 1333–1341.
- Culpepper, D.J., Maddox, M.K., Caldwell, A.B., and McFarland, B.J. (2011). Systematic mutation and thermodynamic analysis of central tyrosine pairs in polyspecific NKG2D receptor interactions. *Mol. Immunol.* *48*, 516–523.
- Dai, Z., Turtle, C.J., Booth, G.C., Riddell, S.R., Gooley, T.A., Stevens, A.M., Spies, T., and Groh, V. (2009). Normally occurring NKG2D+CD4+ T cells are immunosuppressive and inversely correlated with disease activity in juvenile-onset lupus. *J. Exp. Med.* *206*, 793–805.
- Danilova, A.B., Danilov, A.O., Fakhmudinova, O.L., Badueva, I.A., and Moiseenko, V.M. (2010). [Immunochemical assay of MIC A production by tumor cells in vitro and in vivo as a component of antitumor vaccine development]. *Vopr Onkol* *56*, 576–582.
- Das, G., and Janeway, C.A., Jr (2003). MHC specificity of iIELs. *Trends Immunol.* *24*, 88–93.
- Das, H., Groh, V., Kuijl, C., Sugita, M., Morita, C.T., Spies, T., and Bukowski, J.F. (2001). MICA engagement by human Vgamma2Vdelta2 T cells enhances their antigen-dependent effector function. *Immunity* *15*, 83–93.
- Das, H., Sugita, M., and Brenner, M.B. (2004). Mechanisms of Vdelta1 gammadelta T cell activation by microbial components. *J. Immunol.* *172*, 6578–6586.
- Delgado, J.C., Leung, J.Y., Baena, A., Clavijo, O.P., Vittinghoff, E., Buchbinder, S., Wolinsky, S., Addo, M., Walker, B.D., Yunis, E.J., et al. (2003). The -1030/-862-linked TNF promoter single-nucleotide polymorphisms are associated with the inability to control HIV-1 viremia. *Immunogenetics* *55*, 497–501.
- Delpy, E., Coste, H., and Gouville, A.C. (1996). Effects of cyclic GMP elevation on isoprenaline-induced increase in cyclic AMP and relaxation in rat aortic smooth muscle: role of phosphodiesterase 3. *Br. J. Pharmacol.* *119*, 471–478.
- Diefenbach, A., and Raulet, D.H. (1999). Natural killer cells: stress out, turn on, tune in. *Curr. Biol.* *9*, R851–853.
- Diefenbach, A., Jensen, E.R., Jamieson, A.M., and Raulet, D.H. (2001). Rae1 and H60 ligands of the NKG2D receptor stimulate tumour immunity. *Nature* *413*, 165–171.
- Diermayr, S., Himmelreich, H., Durovic, B., Mathys-Schneeberger, A., Siegler, U., Langenkamp, U., Hofsteenge, J., Gratwohl, A., Tichelli, A., Paluszewska, M., et al. (2008). NKG2D ligand expression in AML increases in response to HDAC inhibitor valproic acid and contributes to allorecognition by NK-cell lines with single KIR-HLA class I specificities. *Blood* *111*, 1428–1436.

- Dimasi, N., Sawicki, M.W., Reineck, L.A., Li, Y., Natarajan, K., Margulies, D.H., and Mariuzza, R.A. (2002). Crystal structure of the Ly49I natural killer cell receptor reveals variability in dimerization mode within the Ly49 family. *J. Mol. Biol.* *320*, 573–585.
- Ding, Y., Xia, B., Lü, M., Zhang, Y., Li, J., Ye, M., Luo, H., Yu, J., Zhang, X., and Tan, J. (2005). MHC class I chain-related gene A-A5.1 allele is associated with ulcerative colitis in Chinese population. *Clin. Exp. Immunol.* *142*, 193–198.
- Dittmar, M., Ide, M., Wurm, M., and Kahaly, G.J. (2008). Early onset of polyglandular failure is associated with HLA-DRB1*03. *Eur. J. Endocrinol.* *159*, 55–60.
- Dorak, M.T., Shao, W., Machulla, H.K.G., Lobashevsky, E.S., Tang, J., Park, M.H., and Kaslow, R.A. (2006). Conserved extended haplotypes of the major histocompatibility complex: further characterization. *Genes Immun.* *7*, 450–467.
- Doubrovina, E.S., Doubrovin, M.M., Vider, E., Sisson, R.B., O'Reilly, R.J., Dupont, B., and Vyas, Y.M. (2003). Evasion from NK cell immunity by MHC class I chain-related molecules expressing colon adenocarcinoma. *J. Immunol.* *171*, 6891–6899.
- Douik, H., Ben Chaaben, A., Attia Romdhane, N., Romdhane, H.B., Mamoghli, T., Fortier, C., Boukouaci, W., Harzallah, L., Ghanem, A., Gritli, S., et al. (2009). Association of MICA-129 polymorphism with nasopharyngeal cancer risk in a Tunisian population. *Hum. Immunol.* *70*, 45–48.
- Doxiadis, G.G.M., Heijmans, C.M., Otting, N., and Bontrop, R.E. (2007). MIC gene polymorphism and haplotype diversity in rhesus macaques. *Tissue Antigens* *69*, 212–219.
- Dragun, D., and Hegner, B. (2009). Non-HLA antibodies post-transplantation: clinical relevance and treatment in solid organ transplantation. *Contrib Nephrol* *162*, 129–139.
- Dragun, D., Müller, D.N., Bräsen, J.H., Fritsche, L., Nieminen-Kelhä, M., Dechend, R., Kintscher, U., Rudolph, B., Hoebeke, J., Eckert, D., et al. (2005). Angiotensin II type 1-receptor activating antibodies in renal-allograft rejection. *N. Engl. J. Med.* *352*, 558–569.
- Dragun, D., Scornik, J., and Meier-Kriesche, H.-U. (2008). Kidney-transplant rejection and anti-MICA antibodies. *N. Engl. J. Med.* *358*, 196; author reply 196.
- Du, L., Kijlstra, A., and Yang, P. (2009). Immune response genes in uveitis. *Ocul. Immunol. Inflamm.* *17*, 249–256.
- Duan, X., Deng, L., Chen, X., Lu, Y., Zhang, Q., Zhang, K., Hu, Y., Zeng, J., and Sun, W. (2011). Clinical significance of the immunostimulatory MHC class I chain-related molecule A and NKG2D receptor on NK cells in pancreatic cancer. *Med. Oncol.* *28*, 466–474.
- Duclos-Vallée, J.-C., Féray, C., Sebah, M., Teicher, E., Roque-Afonso, A.-M., Roche, B., Azoulay, D., Adam, R., Bismuth, H., Castaing, D., et al. (2008). Survival and recurrence of hepatitis C after liver transplantation in patients coinfecting with human immunodeficiency virus and hepatitis C virus. *Hepatology* *47*, 407–417.
- Dulphy, N., Berrou, J., Campillo, J.A., Bagot, M., Bensussan, A., and Toubert, A. (2009). NKG2D ligands expression and NKG2D-mediated NK activity in Sezary patients. *J. Invest. Dermatol.* *129*, 359–364.
- Dummer, J.S., Hardy, A., Poorsattar, A., and Ho, M. (1983). Early infections in kidney, heart, and liver transplant recipients on cyclosporine. *Transplantation* *36*, 259–267.
- Dunn, D.S., Ota, M., Inoko, H., and Kulski, J.K. (2003). Association of MHC dimorphic Alu insertions with HLA class I and MIC genes in Japanese HLA-B48 haplotypes. *Tissue Antigens* *62*, 259–262.
- Duquesnoy, R.J., Mosteck, J., Hariharan, J., and Balazs, I. (2008). Structurally based epitope analysis of major histocompatibility complex class I-related chain A (MICA) antibody specificity patterns. *Hum. Immunol.* *69*, 826–832.
- Eagle, R.A., and Trowsdale, J. (2007). Promiscuity and the single receptor: NKG2D. *Nat. Rev. Immunol.* *7*, 737–744.

- Eagle, R.A., Traherne, J.A., Ashiru, O., Wills, M.R., and Trowsdale, J. (2006). Regulation of NKG2D ligand gene expression. *Hum. Immunol.* 67, 159–169.
- Eagle, R.A., Flack, G., Warford, A., Martínez-Borra, J., Jafferji, I., Traherne, J.A., Ohashi, M., Boyle, L.H., Barrow, A.D., Caillat-Zucman, S., et al. (2009). Cellular expression, trafficking, and function of two isoforms of human ULBP5/RAET1G. *PLoS ONE* 4, e4503.
- Eisele, G., Wischhusen, J., Mittelbronn, M., Meyermann, R., Waldhauer, I., Steinle, A., Weller, M., and Friese, M.A. (2006). TGF-beta and metalloproteinases differentially suppress NKG2D ligand surface expression on malignant glioma cells. *Brain* 129, 2416–2425.
- Eissmann, P., Evans, J.H., Mehrabi, M., Rose, E.L., Nedvetzki, S., and Davis, D.M. (2010). Multiple mechanisms downstream of TLR-4 stimulation allow expression of NKG2D ligands to facilitate macrophage/NK cell crosstalk. *J. Immunol.* 184, 6901–6909.
- El-Awar, N., Terasaki, P.I., Cai, J., Deng, C.-T., Ozawa, M., Nguyen, A., Lias, M., and Conger, N. (2009). Epitopes of HLA-A, B, C, DR, DQ, DP and MICA antigens. *Clin Transpl* 295–321.
- el-Shazly, M., Bakry, R., Tohamy, A., Ali, W.M., Elbakry, S., Brown, S.-E., and Weatherley-White, R.C.A. (2010). Attitudes toward children with clefts in rural Muslim and Hindu societies. *Ann Plast Surg* 64, 780–783.
- Eleme, K., Taner, S.B., Onfelt, B., Collinson, L.M., McCann, F.E., Chalupny, N.J., Cosman, D., Hopkins, C., Magee, A.I., and Davis, D.M. (2004). Cell surface organization of stress-inducible proteins ULBP and MICA that stimulate human NK cells and T cells via NKG2D. *J. Exp. Med.* 199, 1005–1010.
- Elsner, H.A., Schroeder, M., and Blasczyk, R. (2001). The nucleotide diversity of MICA and MICB suggests the effect of overdominant selection. *Tissue Antigens* 58, 419–421.
- Elsner, L., Muppala, V., Gehrmann, M., Lozano, J., Malzahn, D., Bickeböller, H., Brunner, E., Zientkowska, M., Herrmann, T., Walter, L., et al. (2007). The heat shock protein HSP70 promotes mouse NK cell activity against tumors that express inducible NKG2D ligands. *J. Immunol.* 179, 5523–5533.
- Elsner, L., Flügge, P.F., Lozano, J., Muppala, V., Eiz-Vesper, B., Demiroglu, S.Y., Malzahn, D., Herrmann, T., Brunner, E., Bickeböller, H., et al. (2010). The endogenous danger signals HSP70 and MICA cooperate in the activation of cytotoxic effector functions of NK cells. *J. Cell. Mol. Med.* 14, 992–1002.
- Erlich, H., Valdes, A.M., Noble, J., Carlson, J.A., Varney, M., Concannon, P., Mychaleckyj, J.C., Todd, J.A., Bonella, P., Fear, A.L., et al. (2008). HLA DR-DQ haplotypes and genotypes and type 1 diabetes risk: analysis of the type 1 diabetes genetics consortium families. *Diabetes* 57, 1084–1092.
- Euvrard, S., Morelon, E., Rostaing, L., Goffin, E., Brocard, A., Tromme, I., Broeders, N., del Marmol, V., Chatelet, V., DompMartin, A., et al. (2012). Sirolimus and secondary skin-cancer prevention in kidney transplantation. *N. Engl. J. Med.* 367, 329–339.
- Falorni, A. (2003). [Immunologic and genetic aspects of latent autoimmune diabetes in the adult]. *Minerva Endocrinol.* 28, 297–312.
- Fang, X.-C., Liu, H.-L., Sun, Z.-M., Gui, L., Geng, L.-Q., Wang, X.-B., Zhou, M., and Wang, Z.-Y. (2010). [Expression and abscission of activated receptors and their ligands on/from NK cells in peripheral blood of patients with acute leukemia]. *Zhongguo Shi Yan Xue Ye Xue Za Zhi* 18, 436–440.
- Farjadian, S., Kiyanimesh, N., Abbaszadegan, A., and Lotfazar, M. (2007). HLA class I gene polymorphism in Iranian patients with Papillon-Lefevre Syndrome. *Iran J Immunol* 4, 241–245.
- Fdez-Morera, J.L., Rodrigo, L., López-Vázquez, A., Rodero, S.R., Martínez-Borra, J., Niño, P., González, S., and López-Larrea, C. (2003). MHC class I chain-related gene A transmembrane polymorphism modulates the extension of ulcerative colitis. *Hum. Immunol.* 64, 816–822.
- Fdez-Morera, J.L., Tunon, A., Rodriguez-Rodero, S., Rodrigo, L., Martinez-Borra, J., Gonzalez, S., Lopez-Vazquez, A., Lahoz, C.H., and Lopez-Larrea, C. (2006). Clinical behavior of multiple sclerosis is modulated by the MHC class I-chain-related gene A. *Tissue Antigens* 67, 409–414.
- Feng, M., Zhang, J., Xie, J., Ji, Y., Lu, Q., Chen, L., Yang, J., and Guo, X. (2004a). [The polymorphism

distributions of MICA and MICB microsatellite in Guangdong Han population]. *Zhonghua Yi Xue Yi Chuan Xue Za Zhi* 21, 294–296.

Feng, M.-L., Guo, X.-J., Zhang, J.-Y., Xie, J.-H., Chen, L., Lu, Q., Yang, J.-H., Ji, Y., and Qian, K.-C. (2004b). Study on the haplotypes of MICA and MICB microsatellite and HLA-B locus in the Guangzhou Han population. *Tissue Antigens* 64, 281–285.

Ferguson, L.R., Shelling, A.N., Browning, B.L., Huebner, C., and Petermann, I. (2007). Genes, diet and inflammatory bowel disease. *Mutat. Res.* 622, 70–83.

Fernandez, L., Fernandez-Arquero, M., Gual, L., Lazaro, F., Maluenda, C., Polanco, I., Figueredo, M.A., and Gomez de la Concha, E. (2002). Triplet repeat polymorphism in the transmembrane region of the MICA gene in celiac disease. *Tissue Antigens* 59, 219–222.

Fernandez-Morera, J.L., Rodriguez-Rodero, S., Tunon, A., Martinez-Borra, J., Vidal-Castineira, J.R., Lopez-Vazquez, A., Rodrigo, L., Rodrigo, P., González, S., Lahoz, C.H., et al. (2008). Genetic influence of the nonclassical major histocompatibility complex class I molecule MICB in multiple sclerosis susceptibility. *Tissue Antigens* 72, 54–59.

Fernández-Morera, J.L., Rodríguez-Rodero, S., Lahoz, C., Tuñón, A., Astudillo, A., Garcia-Suarez, O., Martínez-Borra, J., López-Vázquez, A., Rodrigo, L., Gonzalez, S., et al. (2008). Soluble MHC class I chain-related protein B serum levels correlate with disease activity in relapsing-remitting multiple sclerosis. *Hum. Immunol.* 69, 235–240.

Fernandez-Vina, M., Parmar, S., Champlin, R., and Lima, M. de (2009). Response: MHC class I chain-related gene A (MICA) in unrelated donor transplantation. *Blood* 114, 4754–4755.

Field, S.F., Nejentsev, S., Walker, N.M., Howson, J.M.M., Godfrey, L.M., Jolley, J.D., Hardy, M.P.A., and Todd, J.A. (2008). Sequencing-based genotyping and association analysis of the MICA and MICB genes in type 1 diabetes. *Diabetes* 57, 1753–1756.

Fionda, C., Soriani, A., Malgarini, G., Iannitto, M.L., Santoni, A., and Cippitelli, M. (2009). Heat shock protein-90 inhibitors increase MHC class I-related chain A and B ligand expression on multiple myeloma cells and their ability to trigger NK cell degranulation. *J. Immunol.* 183, 4385–4394.

Fischer, G., Argüello, J.R., Pérez-Rodríguez, M., McWhinnie, A., Marsh, S.G., Travers, P.J., and Madrigal, J.A. (2000a). Sequence-specific oligonucleotide probing for MICB alleles reveals associations with MICA and HLA-B. *Immunogenetics* 51, 591–599.

Fischer, G., Pérez-Rodríguez, M., Argüello, J.R., Cox, S.T., McWhinnie, A., Travers, P.J., and Madrigal, J.A. (2000b). Three novel MICB alleles. *Tissue Antigens* 55, 166–170.

Fishman, J.A. (2007). Infection in solid-organ transplant recipients. *N. Engl. J. Med.* 357, 2601–2614.

Flegel, W.A. (2007). Will MICA glitter for recipients of kidney transplants? *N. Engl. J. Med.* 357, 1337–1339.

Fodil, N., Laloux, L., Wanner, V., Pellet, P., Hauptmann, G., Mizuki, N., Inoko, H., Spies, T., Theodorou, I., and Bahram, S. (1996). Allelic repertoire of the human MHC class I MICA gene. *Immunogenetics* 44, 351–357.

Fodil, N., Pellet, P., Laloux, L., Hauptmann, G., Theodorou, I., and Bahram, S. (1999). MICA haplotypic diversity. *Immunogenetics* 49, 557–560.

Fojtíková, M., Stofa, J., Novota, P., Cejková, P., Dostál, C., and Cerná, M. (2009). HLA-Cw*06 class I region rather than MICA is associated with psoriatic arthritis in Czech population. *Rheumatol. Int.* 29, 1293–1299.

Fojtíková, M., Novota, P., Cejková, P., Pešíčková, S., Tegzová, D., and Cerná, M. (2011). HLA class II, MICA and PRL gene polymorphisms: the common contribution to the systemic lupus erythematosus development in Czech population. *Rheumatol. Int.* 31, 1195–1201.

Folwaczny, M., Henninger, M., and Glas, J. (2011). Impact of MICA-TM, MICB-C1_2_A and C1_4_1 microsatellite polymorphisms on the susceptibility to chronic periodontitis in Germany. *Tissue Antigens* 77, 298–304.

- Fonseca, C., Soiffer, R., Ho, V., Vanneman, M., Jinushi, M., Ritz, J., Neuberg, D., Stone, R., DeAngelo, D., and Dranoff, G. (2009). Protein disulfide isomerases are antibody targets during immune-mediated tumor destruction. *Blood* 113, 1681–1688.
- Fowler, E.V. (2011). Is there a role for MICA in ulcerative colitis? *J. Gastroenterol. Hepatol.* 26, 422–423.
- Friese, M.A., Platten, M., Lutz, S.Z., Naumann, U., Aulwurm, S., Bischof, F., Bühring, H.-J., Dichgans, J., Rammensee, H.-G., Steinle, A., et al. (2003). MICA/NKG2D-mediated immunogene therapy of experimental gliomas. *Cancer Res.* 63, 8996–9006.
- Fuertes, M.B., Girart, M.V., Molinero, L.L., Domaica, C.I., Rossi, L.E., Barrio, M.M., Mordoh, J., Rabinovich, G.A., and Zwirner, N.W. (2008). Intracellular retention of the NKG2D ligand MHC class I chain-related gene A in human melanomas confers immune privilege and prevents NK cell-mediated cytotoxicity. *J. Immunol.* 180, 4606–4614.
- Fuertes, M.B., Rossi, L.E., Peralta, C.M., Cabrera, H.N., Allevato, M.A., and Zwirner, N.W. (2011). Premalignant quiescent melanocytic nevi do not express the MHC class I chain-related protein A. *Medicina (B Aires)* 71, 357–360.
- Fukami-Kobayashi, K., Shiina, T., Anzai, T., Sano, K., Yamazaki, M., Inoko, H., and Tateno, Y. (2005). Genomic evolution of MHC class I region in primates. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 102, 9230–9234.
- Funk, G.A., Steiger, J., and Hirsch, H.H. (2006). Rapid dynamics of polyomavirus type BK in renal transplant recipients. *J. Infect. Dis.* 193, 80–87.
- Funk, G.A., Gosert, R., Comoli, P., Ginevri, F., and Hirsch, H.H. (2008). Polyomavirus BK replication dynamics in vivo and in silico to predict cytopathology and viral clearance in kidney transplants. *Am. J. Transplant.* 8, 2368–2377.
- Fürst, D., Solgi, G., Recker, K., Mytilineos, D., Schrezenmeier, H., and Mytilineos, J. (2011). Sequence-based typing of major histocompatibility complex class I chain-related gene A alleles by use of exons 2-5 information. *Tissue Antigens* 77, 201–205.
- Gambelunghe, G., Ghaderi, M., Tortoioli, C., Falorni, A., Santeusano, F., Brunetti, P., Sanjeevi, C.B., and Falorni, A. (2001). Two distinct MICA gene markers discriminate major autoimmune diabetes types. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 86, 3754–3760.
- Gambelunghe, G., Gerli, R., Bocci, E.B., Del Sindaco, P., Ghaderi, M., Sanjeevi, C.B., Bistoni, O., Bini, V., and Falorni, A. (2005). Contribution of MHC class I chain-related A (MICA) gene polymorphism to genetic susceptibility for systemic lupus erythematosus. *Rheumatology (Oxford)* 44, 287–292.
- Gambelunghe, G., Brozzetti, A.L., Ghaderi, M., Tortoioli, C., and Falorni, A. (2006). MICA A8: a new allele within MHC class I chain-related A transmembrane region with eight GCT repeats. *Hum. Immunol.* 67, 1005–1007.
- Gambelunghe, G., Brozzetti, A., Ghaderi, M., Candeloro, P., Tortoioli, C., and Falorni, A. (2007a). MICA gene polymorphism in the pathogenesis of type 1 diabetes. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1110, 92–98.
- Gambelunghe, G., Brozzetti, A., Ghaderi, M., Candeloro, P., Tortoioli, C., and Falorni, A. (2007b). MICA Gene Polymorphism in the Pathogenesis of Type 1 Diabetes. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1110, 92–98.
- Gannagé, M., Buzyn, A., Bogiatzi, S.I., Lambert, M., Soumelis, V., Dal Cortivo, L., Cavazzana-Calvo, M., Brousse, N., and Caillat-Zucman, S. (2008). Induction of NKG2D ligands by gamma radiation and tumor necrosis factor- α may participate in the tissue damage during acute graft-versus-host disease. *Transplantation* 85, 911–915.
- Gao, C., Huan, J., Tang, J., and Li, W. (2008). Stromal-derived factor-1 up-regulated the expression of MIC on mouse keratinocyte stem cells. *Transplant. Proc.* 40, 3653–3655.
- Gao, C., Huan, J., Li, W., and Tang, J. (2009). Protective effects of ulinastatin on pancreatic and renal damage in rats following early scald injury. *Burns* 35, 547–552.

- Gao, C., Liu, Y., Ma, L., and Wang, S. (2012a). Protective effects of ulinastatin on pulmonary damage in rats following scald injury. *Burns* 38, 1027–1034.
- Gao, C., Liu, Y., Ma, L., Zhang, X., and Wang, S. (2012b). Effects of Ligustrazine on pulmonary damage in rats following scald injury. *Burns* 38, 743–750.
- Gao, X., Single, R.M., Karacki, P., Marti, D., O'Brien, S.J., and Carrington, M. (2006). Diversity of MICA and linkage disequilibrium with HLA-B in two North American populations. *Hum. Immunol.* 67, 152–158.
- García, G., del Puerto, F., Pérez, A.B., Sierra, B., Aguirre, E., Kikuchi, M., Sánchez, L., Hirayama, K., and Guzmán, M.G. (2011). Association of MICA and MICB alleles with symptomatic dengue infection. *Hum. Immunol.* 72, 904–907.
- Gardner, S.D., Field, A.M., Coleman, D.V., and Hulme, B. (1971). New human papovavirus (B.K.) isolated from urine after renal transplantation. *Lancet* 1, 1253–1257.
- Gardner, S.D., MacKenzie, E.F., Smith, C., and Porter, A.A. (1984). Prospective study of the human polyomaviruses BK and JC and cytomegalovirus in renal transplant recipients. *J. Clin. Pathol.* 37, 578–586.
- Gasser, S., Orsulic, S., Brown, E.J., and Raulet, D.H. (2005). The DNA damage pathway regulates innate immune system ligands of the NKG2D receptor. *Nature* 436, 1186–1190.
- Gautier, A.C., Devys, A., Cheneau, M.L., Simon, P.H., Martin, C., Allard, S., Hourmant, M., and Bignon, J.D. (2009). MICA compatibility and immunization in third kidney transplantations. *Transplant. Proc.* 41, 663–665.
- Gazquez, I., Moreno, A., Aran, I., Soto-Varela, A., Santos, S., Perez-Garrigues, H., Lopez-Nevot, A., Requena, T., Lopez-Nevot, M.A., and Lopez-Escamez, J.A. (2012). MICA-STR A.4 is associated with slower hearing loss progression in patients with Ménière's disease. *Otol. Neurotol.* 33, 223–229.
- Ge, L.Q., Jiang, T., Zhao, J., Chen, Z.T., Zhou, F., and Xia, B. (2011). Upregulated mRNA expression of major histocompatibility complex class I chain-related gene A in colon and activated natural killer cells of Chinese patients with ulcerative colitis. *J. Dig. Dis.* 12, 82–89.
- Germain, C., Larbouret, C., Cesson, V., Donda, A., Held, W., Mach, J.-P., Pèlegri, A., and Robert, B. (2005). MHC class I-related chain A conjugated to antitumor antibodies can sensitize tumor cells to specific lysis by natural killer cells. *Clin. Cancer Res.* 11, 7516–7522.
- Gerritsen, M.E., and Bloor, C.M. (1993). Endothelial cell gene expression in response to injury. *FASEB J.* 7, 523–532.
- Gewaltig, M.T., and Kojda, G. (2002). Vasoprotection by nitric oxide: mechanisms and therapeutic potential. *Cardiovasc. Res.* 55, 250–260.
- Ghaderi, M., Hjelmström, P., Hallmans, G., Wiklund, F., Lenner, P., Dillner, J., and Sanjeevi, C.B. (1999). MICA gene polymorphism and the risk to develop cervical intraepithelial neoplasia. *Hum. Immunol.* 60, 970–973.
- Ghaderi, M., Nikitina Zake, L., Wallin, K., Wiklund, F., Hallmans, G., Lenner, P., Dillner, J., and Sanjeevi, C.B. (2001). Tumor necrosis factor A and MHC class I chain related gene A (MIC-A) polymorphisms in Swedish patients with cervical cancer. *Hum. Immunol.* 62, 1153–1158.
- Girardi, M., Oppenheim, D.E., Steele, C.R., Lewis, J.M., Glusac, E., Filler, R., Hobby, P., Sutton, B., Tigelaar, R.E., and Hayday, A.C. (2001). Regulation of cutaneous malignancy by gammadelta T cells. *Science* 294, 605–609.
- Girart, M.V., Fuertes, M.B., Domaica, C.I., Rossi, L.E., and Zwirner, N.W. (2007). Engagement of TLR3, TLR7, and NKG2D regulate IFN-gamma secretion but not NKG2D-mediated cytotoxicity by human NK cells stimulated with suboptimal doses of IL-12. *J. Immunol.* 179, 3472–3479.
- Girlanda, S., Fortis, C., Belloni, D., Ferrero, E., Ticozzi, P., Sciorati, C., Tresoldi, M., Vicari, A., Spies, T., Groh, V., et al. (2005). MICA expressed by multiple myeloma and monoclonal gammopathy of undetermined significance plasma cells Costimulates pamidronate-activated gammadelta lymphocytes. *Cancer Res.* 65, 7502–7508.

- Glas, J., Werner, A.I., Brännler, G., Witter, K., Scholz, S., Weiss, E.H., and Albert, E.D. (2001). Linkage disequilibria between HLA-B, C1_4_1, MICA and MICB. *Tissue Antigens* 58, 411–418.
- Glas, J., Maier, K., Wetzke, M., Henninger, M., Weiss, E.H., and Folwaczny, M. (2008). MICA*055: a new allele with eight GCT repeats in the exon 5 microsatellite. *Tissue Antigens* 72, 410–411.
- Goldin, A., Beckman, J.A., Schmidt, A.M., and Creager, M.A. (2006a). Advanced glycation end products: sparking the development of diabetic vascular injury. *Circulation* 114, 597–605.
- Goldin, A., Beckman, J.A., Schmidt, A.M., and Creager, M.A. (2006b). Advanced glycation end products: sparking the development of diabetic vascular injury. *Circulation* 114, 597–605.
- Gong, W., Xiao, W., Gong, C., Tian, F., and Ji, M. (2010a). [Association of MICA gene polymorphism and serum soluble MICA level with colorectal cancer]. *Zhonghua Yi Xue Yi Chuan Xue Za Zhi* 27, 335–339.
- Gong, W., Xiao, W., Hu, M., Weng, X., Qian, L., Pan, X., and Ji, M. (2010b). Ex vivo expansion of natural killer cells with high cytotoxicity by K562 cells modified to co-express major histocompatibility complex class I chain-related protein A, 4-1BB ligand, and interleukin-15. *Tissue Antigens* 76, 467–475.
- Gong, W., Xiao, W., Qian, L., Gong, C., Hu, M., Pan, X., and Ji, M. (2010c). Immobilized MHC class I chain-related protein A synergizes with IL-15 and soluble 4-1BB ligand to expand NK cells with high cytotoxicity ex vivo. *Cell. Mol. Immunol.* 7, 477–484.
- Gong, W., Gong, C., Wang, C., Xiao, W., Qian, L., and Ji, M. (2011). [The effect of up-regulation of MHC class I chain-related antigen A expression by dendritic cells on activity of NK cells]. *Xi Bao Yu Fen Zi Mian Yi Xue Za Zhi* 27, 11–14.
- Gong, Z., Luo, Q.-Z., Lin, L., Su, Y.-P., Peng, H.-B., Du, K., Yu, P., and Wang, S.-P. (2012). Association of MICA gene polymorphisms with liver fibrosis in schistosomiasis patients in the Dongting Lake region. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 45, 222–229.
- Gonzalez, S., Martinez-Borra, J., Torre-Alonso, J.C., Gonzalez-Roces, S., Sanchez del Río, J., Rodriguez Pérez, A., Brautbar, C., and López-Larrea, C. (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.
- González, S., Brautbar, C., Martínez-Borra, J., López-Vázquez, A., Segal, R., Blanco-Gelaz, M.A., Enk, C.D., Safriman, C., and López-Larrea, C. (2001a). Polymorphism in MICA rather than HLA-B/C genes is associated with psoriatic arthritis in the Jewish population. *Hum. Immunol.* 62, 632–638.
- González, S., Torre-Alonso, J.C., Martínez-Borra, J., Fernández Sánchez, J.A., López-Vázquez, A., Rodríguez Pérez, A., and López-Larrea, C. (2001b). TNF-238A promoter polymorphism contributes to susceptibility to ankylosing spondylitis in HLA-B27 negative patients. *J. Rheumatol.* 28, 1288–1293.
- González, S., Martínez-Borra, J., López-Vázquez, A., García-Fernández, S., Torre-Alonso, J.C., and López-Larrea, C. (2002). MICA rather than MICB, TNFA, or HLA-DRB1 is associated with susceptibility to psoriatic arthritis. *J. Rheumatol.* 29, 973–978.
- González, S., Rodríguez-Rodero, S., Martínez-Borra, J., López-Vázquez, A., Rodrigo, L., and López-Larrea, C. (2003). MICB typing by PCR amplification with sequence specific primers. *Immunogenetics* 54, 850–855.
- González, S., Rodrigo, L., López-Vázquez, A., Fuentes, D., Agudo-Ibáñez, L., Rodríguez-Rodero, S., Fdez-Morera, J.L., Martínez-Borra, J., and López-Larrea, C. (2004). Association of MHC class I related gene B (MICB) to celiac disease. *Am. J. Gastroenterol.* 99, 676–680.
- González-Escribano, M.F., Rodríguez, M.R., Aguilar, F., Alvarez, A., Sanchez-Roman, J., and Núñez-Roldán, A. (1999). Lack of association of MICA transmembrane region polymorphism and Behçet's disease in Spain. *Tissue Antigens* 54, 278–281.
- Gonzalez-Gay, M.A., Rueda, B., Vilchez, J.R., Lopez-Nevot, M.A., Robledo, G., Ruiz, M.P., Fernández, O., Garcia-Porrúa, C., Gonzalez-Escribano, M.F., and Martín, J. (2007). Contribution of MHC class I region to genetic susceptibility for giant cell arteritis. *Rheumatology (Oxford)* 46, 431–434.

- Gosert, R., Rinaldo, C.H., Funk, G.A., Egli, A., Ramos, E., Drachenberg, C.B., and Hirsch, H.H. (2008). Polyomavirus BK with rearranged noncoding control region emerge in vivo in renal transplant patients and increase viral replication and cytopathology. *J. Exp. Med.* 205, 841–852.
- Goto, K., Ota, M., Ohno, S., Mizuki, N., Ando, H., Katsuyama, Y., Maksymowych, W.P., Kimura, M., Bahram, S., and Inoko, H. (1997). MICA gene and ankylosing spondylitis: linkage analysis via a transmembrane-encoded triplet repeat polymorphism. *Tissue Antigens* 49, 503–507.
- Goto, K., Ota, M., Ando, H., Mizuki, N., Nakamura, S., Inoue, K., Yabuki, K., Kotake, S., Katsuyama, Y., Kimura, M., et al. (1998a). MICA gene polymorphisms and HLA-B27 subtypes in Japanese patients with HLA-B27-associated acute anterior uveitis. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 39, 634–637.
- Goto, K., Ota, M., Maksymowych, W.P., Mizuki, N., Yabuki, K., Katsuyama, Y., Kimura, M., Inoko, H., and Ohno, S. (1998b). Association between MICA gene A4 allele and acute anterior uveitis in white patients with and without HLA-B27. *Am. J. Ophthalmol.* 126, 436–441.
- Grimaldi, M.C., Clayton, J., Pontarotti, P., Cambon-Thomsen, A., and Crouau-Roy, B. (1996). New highly polymorphic microsatellite marker in linkage disequilibrium with HLA-B. *Hum. Immunol.* 51, 89–94.
- Groh, V., Bahram, S., Bauer, S., Herman, A., Beauchamp, M., and Spies, T. (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.
- Groh, V., Steinle, A., Bauer, S., and Spies, T. (1998). Recognition of stress-induced MHC molecules by intestinal epithelial gammadelta T cells. *Science* 279, 1737–1740.
- Groh, V., Rhinehart, R., Secrist, H., Bauer, S., Grabstein, K.H., and Spies, T. (1999). Broad tumor-associated expression and recognition by tumor-derived gamma delta T cells of MICA and MICB. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 96, 6879–6884.
- Groh, V., Rhinehart, R., Randolph-Habecker, J., Topp, M.S., Riddell, S.R., and Spies, T. (2001). Costimulation of CD8 $\alpha\beta$ T cells by NKG2D via engagement by MIC induced on virus-infected cells. *Nature Immunology* 2, 255–260.
- Groh, V., Wu, J., Yee, C., and Spies, T. (2002). Tumour-derived soluble MIC ligands impair expression of NKG2D and T-cell activation. *Nature* 419, 734–738.
- Groh, V., Bruhl, A., El-Gabalawy, H., Nelson, J.L., and Spies, T. (2003). Stimulation of T cell autoreactivity by anomalous expression of NKG2D and its MIC ligands in rheumatoid arthritis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 100, 9452–9457.
- Groh, V., Li, Y.Q., Cioca, D., Hunder, N.N., Wang, W., Riddell, S.R., Yee, C., and Spies, T. (2005). Efficient cross-priming of tumor antigen-specific T cells by dendritic cells sensitized with diverse anti-MICA opsonized tumor cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 102, 6461–6466.
- de Groot, N.G., Garcia, C.A., Verschoor, E.J., Doxiadis, G.G.M., Marsh, S.G.E., Otting, N., and Bontrop, R.E. (2005). Reduced MIC gene repertoire variation in West African chimpanzees as compared to humans. *Mol. Biol. Evol.* 22, 1375–1385.
- Grubić, Z., Perić, P., Eeëuk-Jelčić, E., Zunec, R., Stingl, K., Curković, B., and Kerhin-Brkljacić, V. (2004). The MICA-A4 triplet repeats polymorphism in the transmembrane region confers additional risk for development of psoriatic arthritis in the Croatian population. *Eur. J. Immunogenet.* 31, 93–98.
- Grubić, Z., Stingl, K., Kerhin-Brkljacić, V., and Zunec, R. (2008). The study of the extended haplotypes of rare HLA-B*2730 allele using microsatellite loci. *Tissue Antigens* 71, 514–519.
- Guerra, N., Tan, Y.X., Joncker, N.T., Choy, A., Gallardo, F., Xiong, N., Knoblaugh, S., Cado, D., Greenberg, N.M., Greenberg, N.R., et al. (2008). NKG2D-deficient mice are defective in tumor surveillance in models of spontaneous malignancy. *Immunity* 28, 571–580.
- Guerra, S., González, J.M., Climent, N., Reyburn, H., López-Fernández, L.A., Nájera, J.L., Gómez, C.E., García, F., Gatell, J.M., Gallart, T., et al. (2010). Selective induction of host genes by MVA-B, a candidate vaccine

against HIV/AIDS. *J. Virol.* 84, 8141–8152.

Guillot, C., Guillonnet, C., Mathieu, P., Gerdes, C.A., Ménoret, S., Braudeau, C., Tesson, L., Renaudin, K., Castro, M.G., Löwenstein, P.R., et al. (2002). Prolonged blockade of CD40-CD40 ligand interactions by gene transfer of CD40Ig results in long-term heart allograft survival and donor-specific hyporesponsiveness, but does not prevent chronic rejection. *J. Immunol.* 168, 1600–1609.

Gumireddy, K., Sun, F., Klein-Szanto, A.J., Gibbins, J.M., Gimotty, P.A., Saunders, A.J., Schultz, P.G., and Huang, Q. (2007). In vivo selection for metastasis promoting genes in the mouse. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 104, 6696–6701.

Guo, Z., Xu, L., Fan, L., Ge, Y., Yao, F., and Yang, J. (2000). Study on polymorphism of MICA exon 5 microsatellite in Shanghai Han population. *Zhonghua Yi Xue Yi Chuan Xue Za Zhi* 17, 332–335.

Gupta, M., Nikitina-Zake, L., Landin-Olsson, M., Kockum, I., and Sanjeevi, C.B. (2003). Cocksackie virus B antibodies are increased in HLA DR3-MICA5.1 positive type 1 diabetes patients in the Linköping region of Sweden. *Hum. Immunol.* 64, 874–879.

Gupta, M., Ludvigsson, J., and Sanjeevi, C.B. (2004). Frequency of MICA in all babies in southeast Sweden (ABIS) positive for high-risk HLA-DQ associated with type 1 diabetes. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1037, 138–144.

Gupta, M., Graham, J., McNeeny, B., Zarghami, M., Landin-Olsson, M., Hagopian, W.A., Palmer, J., Lernmark, A., and Sanjeevi, C.B. (2006). MHC class I chain-related gene-A is associated with IA2 and IAA but not GAD in Swedish type 1 diabetes mellitus. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1079, 229–239.

Halpern, S.D., Ubel, P.A., and Caplan, A.L. (2002). Solid-organ transplantation in HIV-infected patients. *N. Engl. J. Med.* 347, 284–287.

Hamilton, T.K., Hu, N., Kolomitro, K., Bell, E.N., Maurice, D.H., Graham, C.H., and Siemens, D.R. (2012). Potential therapeutic applications of phosphodiesterase inhibition in prostate cancer. *World Journal of Urology*.

Hanaoka, N., Jabri, B., Dai, Z., Ciszewski, C., Stevens, A.M., Yee, C., Nakakuma, H., Spies, T., and Groh, V. (2010). NKG2D Initiates Caspase-Mediated CD3 ζ Degradation and Lymphocyte Receptor Impairments Associated with Human Cancer and Autoimmune Disease. *J Immunol* 185, 5732–5742.

Hankey, K.G., Drachenberg, C.B., Papadimitriou, J.C., Klassen, D.K., Philosophe, B., Bartlett, S.T., Groh, V., Spies, T., and Mann, D.L. (2002). MIC expression in renal and pancreatic allografts. *Transplantation* 73, 304–306.

Harjacek, M., Margetić, T., Kerhin-Brkljacić, V., Martinez, N., and Grubić, Z. (2008). HLA-B*27/HLA-B*07 in combination with D6S273-134 allele is associated with increased susceptibility to juvenile spondyloarthropathies. *Clin. Exp. Rheumatol.* 26, 498–504.

Harris, P.E., Bian, H., and Reed, E.F. (1997). Induction of high affinity fibroblast growth factor receptor expression and proliferation in human endothelial cells by anti-HLA antibodies: a possible mechanism for transplant atherosclerosis. *J. Immunol.* 159, 5697–5704.

Hasan, M., Krmpotic, A., Ruzsics, Z., Bubic, I., Lenac, T., Halenius, A., Loewendorf, A., Messerle, M., Hengel, H., Jonjic, S., et al. (2005). Selective Down-Regulation of the NKG2D Ligand H60 by Mouse Cytomegalovirus m155 Glycoprotein. *J. Virol.* 79, 2920–2930.

Hassan, A.B., Nikitina-Zake, L., Padyukov, L., Karlsson, G., Gupta, M., Lundberg, I.E., and Sanjeevi, C.B. (2003). MICA4/HLA-DRB1*04/TNF1 haplotype is associated with mixed connective tissue disease in Swedish patients. *Hum. Immunol.* 64, 290–296.

Haurani, M.J., Cifuentes, M.E., Shepard, A.D., and Pagano, P.J. (2008). Nox4 oxidase overexpression specifically decreases endogenous Nox4 mRNA and inhibits angiotensin II-induced adventitial myofibroblast migration. *Hypertension* 52, 143–149.

Hedlund, M., Nagaeva, O., Kargl, D., Baranov, V., and Mincheva-Nilsson, L. (2011). Thermal- and oxidative stress causes enhanced release of NKG2D ligand-bearing immunosuppressive exosomes in leukemia/lymphoma T and B cells. *PLoS ONE* 6, e16899.

- Higuchi, T., Shimizu, M., Owaki, A., Takahashi, M., Shinya, E., Nishimura, T., and Takahashi, H. (2009). A possible mechanism of intravesical BCG therapy for human bladder carcinoma: involvement of innate effector cells for the inhibition of tumor growth. *Cancer Immunol. Immunother.* 58, 1245–1255.
- Hill, A.V.S. (2006). Aspects of genetic susceptibility to human infectious diseases. *Annu. Rev. Genet.* 40, 469–486.
- Hill, G.S., Nochy, D., Bruneval, P., Duong van Huyen, J.P., Glotz, D., Suberbielle, C., Zuber, J., Anglicheau, D., Empana, J.-P., Legendre, C., et al. (2011). Donor-specific antibodies accelerate arteriosclerosis after kidney transplantation. *J. Am. Soc. Nephrol.* 22, 975–983.
- Hilpert, J., Grosse-Hovest, L., Grünebach, F., Buechele, C., Nuebling, T., Raum, T., Steinle, A., and Salih, H.R. (2012). Comprehensive analysis of NKG2D ligand expression and release in leukemia: implications for NKG2D-mediated NK cell responses. *J. Immunol.* 189, 1360–1371.
- Hirohashi, T., Chase, C.M., Della Pelle, P., Sebastian, D., Alessandrini, A., Madsen, J.C., Russell, P.S., and Colvin, R.B. (2012). A novel pathway of chronic allograft rejection mediated by NK cells and alloantibody. *Am. J. Transplant.* 12, 313–321.
- Hirsch, H.H., Knowles, W., Dickenmann, M., Passweg, J., Klimkait, T., Mihatsch, M.J., and Steiger, J. (2002). Prospective study of polyomavirus type BK replication and nephropathy in renal-transplant recipients. *N. Engl. J. Med.* 347, 488–496.
- Holdenrieder, S., Stieber, P., Peterfi, A., Nagel, D., Steinle, A., and Salih, H.R. (2006a). Soluble MICA in malignant diseases. *Int. J. Cancer* 118, 684–687.
- Holdenrieder, S., Stieber, P., Peterfi, A., Nagel, D., Steinle, A., and Salih, H.R. (2006b). Soluble MICB in malignant diseases: analysis of diagnostic significance and correlation with soluble MICA. *Cancer Immunol. Immunother.* 55, 1584–1589.
- Holmén, C., Els Sheikh, E., Stenvinkel, P., Qureshi, A.R., Pettersson, E., Jalkanen, S., and Sumitran-Holgersson, S. (2005). Circulating inflammatory endothelial cells contribute to endothelial progenitor cell dysfunction in patients with vasculitis and kidney involvement. *J. Am. Soc. Nephrol.* 16, 3110–3120.
- Holmén, C., Els Sheikh, E., Christensson, M., Liu, J., Johansson, A.-S., Qureshi, A.R., Jalkanen, S., and Sumitran-Holgersson, S. (2007). Anti endothelial cell autoantibodies selectively activate SAPK/JNK signalling in Wegener's granulomatosis. *J. Am. Soc. Nephrol.* 18, 2497–2508.
- Holtmeier, W., and Kabelitz, D. (2005). gammadelta T cells link innate and adaptive immune responses. *Chem Immunol Allergy* 86, 151–183.
- Hong, J., Shao, T., Sun, X., Li, G., and Xu, J. (2012). Interferon- γ up-regulates major-histocompatibility-complex class I-related chain A expression and enhances major-histocompatibility-complex class I-related chain A-mediated cytotoxicity of human corneal epithelium by natural killer cells in vitro. *J. Interferon Cytokine Res.* 32, 115–120.
- Hoshida, Y., Fuchs, B.C., and Tanabe, K.K. (2012). Genomic risk of hepatitis C-related hepatocellular carcinoma. *J. Hepatol.* 56, 729–730.
- Hsieh, Y.-Y., Chang, C.-C., Hsu, C.-M., Chen, S.-Y., Lin, W.-H., and Tsai, F.-J. (2011). Major histocompatibility complex class I chain-related gene polymorphisms: associated with susceptibility to Kawasaki disease and coronary artery aneurysms. *Genet Test Mol Biomarkers* 15, 755–763.
- Huang, B., Luo, Q., Li, L., Mei, B., Zou, Y., Wu, L., and Yu, P. (2006). [MICA*008/A5.1 allele and HCMV infection in kidney transplanted donees of Hunan Han nationality]. *Zhong Nan Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban* 31, 479–482.
- Huang, B., Luo, Q., Mei, B., and Yu, P. (2007). [Correlation between MHC class I-related chain A gene *008 allele and human cytomegalovirus infection]. *Nan Fang Yi Ke Da Xue Xue Bao* 27, 509–511.
- Huang, B., Sikorski, R., Sampath, P., and Thorne, S.H. (2011a). Modulation of NKG2D-ligand cell surface expression enhances immune cell therapy of cancer. *J. Immunother.* 34, 289–296.

- Huang, S.-Y., Chiang, C.-H., Chen, F.-P., and Yu, C.-L. (2011b). The alteration of placental-derived soluble MHC class I chain-related protein A and B during pregnancy. *Acta Obstet Gynecol Scand* *90*, 802–807.
- Huang, Y., Lee, Y.J., Chen, M.R., Hsu, C.H., Lin, S.P., Sung, T.C., Chang, S.C., and Chang, J.G. (2000). Polymorphism of transmembrane region of MICA gene and Kawasaki disease. *Exp. Clin. Immunogenet.* *17*, 130–137.
- Huang, Y., Tan, Y., Xu, X., Wei, Y., Xia, W., and Ye, X. (2011c). Identification of a novel allele, MICA*063N, in a Chinese lung cancer patient. *Tissue Antigens* *78*, 297–298.
- Huang, Y., Tan, Y., Yang, S., Luo, H., and Zou, T. (2012). [Full sequence analysis for a null allele of MICA gene (MICA*063N)]. *Zhonghua Yi Xue Yi Chuan Xue Za Zhi* *29*, 334–337.
- Hüe, S., Monteiro, R.C., Berrih-Aknin, S., and Caillat-Zucman, S. (2003). Potential role of NKG2D/MHC class I-related chain A interaction in intrathymic maturation of single-positive CD8 T cells. *J. Immunol.* *171*, 1909–1917.
- Hüe, S., Mention, J.-J., Monteiro, R.C., Zhang, S., Cellier, C., Schmitz, J., Verkarre, V., Fodil, N., Bahram, S., Cerf-Bensussan, N., et al. (2004). A direct role for NKG2D/MICA interaction in villous atrophy during celiac disease. *Immunity* *21*, 367–377.
- Huergo-Zapico, L., Gonzalez-Rodriguez, A.P., Contesti, J., Gonzalez, E., López-Soto, A., Fernandez-Guizan, A., Acebes-Huerta, A., de Los Toyos, J.R., Lopez-Larrea, C., Groh, V., et al. (2012). Expression of ERp5 and GRP78 on the membrane of chronic lymphocytic leukemia cells: association with soluble MICA shedding. *Cancer Immunol. Immunother.* *61*, 1201–1210.
- Hughes, E.H., Collins, R.W.M., Kondeatis, E., Wallace, G.R., Graham, E.M., Vaughan, R.W., and Stanford, M.R. (2005). Associations of major histocompatibility complex class I chain-related molecule polymorphisms with Behcet's disease in Caucasian patients. *Tissue Antigens* *66*, 195–199.
- Hui, J., Palmer, L.J., James, A.L., Musk, A.W., and Beilby, J.P. (2006). AluYMICB dimorphism within the class I region of the major histocompatibility complex is associated with asthma and airflow obstruction in the Busselton population. *Clin. Exp. Allergy* *36*, 728–734.
- Husain, Z., Kelly, M.A., Eisenbarth, G.S., Pugliese, A., Awdeh, Z.L., Larsen, C.E., and Alper, C.A. (2008). The MHC type 1 diabetes susceptibility gene is centromeric to HLA-DQB1. *J. Autoimmun.* *30*, 266–272.
- Ibana, J.A., Aiyar, A., Quayle, A.J., and Schust, D.J. (2012). Modulation of MICA on the surface of Chlamydia trachomatis-infected endocervical epithelial cells promotes NK cell-mediated killing. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* *65*, 32–42.
- Ide, A., Babu, S.R., Robles, D.T., Wang, T., Erlich, H.A., Bugawan, T.L., Rewers, M., Fain, P.R., and Eisenbarth, G.S. (2005). Homozygosity for premature stop codon of the MHC class I chain-related gene A (MIC-A) is associated with early activation of islet autoimmunity of DR3/4-DQ2/8 high risk DAISY relatives. *J. Clin. Immunol.* *25*, 303–308.
- Ismail, A.M., Badawi, R.M., El-Agroudy, A.E., and Mansour, M.A. (2009). Pretransplant detection of anti-endothelial cell antibodies could predict renal allograft outcome. *Exp Clin Transplant* *7*, 104–109.
- Jawaheer, D., Li, W., Graham, R.R., Chen, W., Damle, A., Xiao, X., Monteiro, J., Khalili, H., Lee, A., Lundsten, R., et al. (2002). Dissecting the genetic complexity of the association between human leukocyte antigens and rheumatoid arthritis. *Am. J. Hum. Genet.* *71*, 585–594.
- Jensen, H., Andresen, L., Nielsen, J., Christensen, J.P., and Skov, S. (2011). Vesicular stomatitis virus infection promotes immune evasion by preventing NKG2D-ligand surface expression. *PLoS ONE* *6*, e23023.
- Jensen, P., Hansen, S., Møller, B., Leivestad, T., Pfeffer, P., Geiran, O., Fauchald, P., and Simonsen, S. (1999). Skin cancer in kidney and heart transplant recipients and different long-term immunosuppressive therapy regimens. *J. Am. Acad. Dermatol.* *40*, 177–186.
- Jiang, M., Abend, J.R., Tsai, B., and Imperiale, M.J. (2009). Early events during BK virus entry and disassembly. *J. Virol.* *83*, 1350–1358.

- Jiang, X., Zou, Y., Huo, Z., and Yu, P. (2011). Association of major histocompatibility complex class I chain-related gene A microsatellite polymorphism and hepatocellular carcinoma in South China Han population. *Tissue Antigens* 78, 143–147.
- Jimenez-Perez, M.I., Jave-Suarez, L.F., Ortiz-Lazareno, P.C., Bravo-Cuellar, A., Gonzalez-Ramella, O., Aguilar-Lemarroy, A., Hernandez-Flores, G., Pereira-Suarez, A.L., Daneri-Navarro, A., and del Toro-Arreola, S. (2012). Cervical cancer cell lines expressing NKG2D-ligands are able to down-modulate the NKG2D receptor on NK cells with functional implications. *BMC Immunol.* 13, 7.
- Jin, X., Satoh-Otonashi, Y., Zamami, Y., Takatori, S., Hashikawa-Hobara, N., Kitamura, Y., and Kawasaki, H. (2011). New molecular mechanisms for cardiovascular disease: contribution of endothelium-derived hyperpolarizing factor in the regulation of vasoconstriction in peripheral resistance arteries. *J. Pharmacol. Sci.* 116, 332–336.
- Jin, Y., Fuller, L., Ciancio, G., Burke, G.W., 3rd, Tzakis, A.G., Ricordi, C., Miller, J., and Esquenzai, V. (2004a). Antigen presentation and immune regulatory capacity of immature and mature-enriched antigen presenting (dendritic) cells derived from human bone marrow. *Hum. Immunol.* 65, 93–103.
- Jin, Y.-P., Fishbein, M.C., Said, J.W., Jindra, P.T., Rajalingam, R., Rozengurt, E., and Reed, E.F. (2004b). Anti-HLA class I antibody-mediated activation of the PI3K/Akt signaling pathway and induction of Bcl-2 and Bcl-xL expression in endothelial cells. *Hum. Immunol.* 65, 291–302.
- Jindra, P.T., Zhang, X., Mulder, A., Claas, F., Veale, J., Jin, Y.-P., and Reed, E.F. (2006). Anti-HLA antibodies can induce endothelial cell survival or proliferation depending on their concentration. *Transplantation* 82, S33–35.
- Jinushi, M., Takehara, T., Tatsumi, T., Kanto, T., Groh, V., Spies, T., Suzuki, T., Miyagi, T., and Hayashi, N. (2003b). Autocrine/paracrine IL-15 that is required for type I IFN-mediated dendritic cell expression of MHC class I-related chain A and B is impaired in hepatitis C virus infection. *J. Immunol.* 171, 5423–5429.
- Jinushi, M., Takehara, T., Kanto, T., Tatsumi, T., Groh, V., Spies, T., Miyagi, T., Suzuki, T., Sasaki, Y., and Hayashi, N. (2003c). 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. *J. Immunol.* 170, 1249–1256.
- Jinushi, M., Takehara, T., Tatsumi, T., Kanto, T., Groh, V., Spies, T., Kimura, R., Miyagi, T., Mochizuki, K., Sasaki, Y., et al. (2003a). Expression and role of MICA and MICB in human hepatocellular carcinomas and their regulation by retinoic acid. *Int. J. Cancer* 104, 354–361.
- Jinushi, M., Takehara, T., Tatsumi, T., Hiramatsu, N., Sakamori, R., Yamaguchi, S., and Hayashi, N. (2005). Impairment of natural killer cell and dendritic cell functions by the soluble form of MHC class I-related chain A in advanced human hepatocellular carcinomas. *J. Hepatol.* 43, 1013–1020.
- Jinushi, M., Hodi, F.S., and Dranoff, G. (2006). Therapy-induced antibodies to MHC class I chain-related protein A antagonize immune suppression and stimulate antitumor cytotoxicity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 103, 9190–9195.
- Jinushi, M., Vanneman, M., Munshi, N.C., Tai, Y.-T., Prabhala, R.H., Ritz, J., Neubergh, D., Anderson, K.C., Carrasco, D.R., and Dranoff, G. (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, 1285–1290.
- Joosten, S.A., van Dixhoorn, M.G.A., Borrias, M.C., Benediktsson, H., van Veelen, P.A., van Kooten, C., and Paul, L.C. (2002). Antibody response against perlecan and collagen types IV and VI in chronic renal allograft rejection in the rat. *Am. J. Pathol.* 160, 1301–1310.
- Joosten, S.A., Sijpkens, Y.W.J., van Ham, V., Trouw, L.A., van der Vlag, J., van den Heuvel, B., van Kooten, C., and Paul, L.C. (2005). Antibody response against the glomerular basement membrane protein agrin in patients with transplant glomerulopathy. *Am. J. Transplant.* 5, 383–393.
- Jordanova, E.S., Gorter, A., Ayachi, O., Prins, F., Durrant, L.G., Kenter, G.G., van der Burg, S.H., and Fleuren, G.J. (2008). Human leukocyte antigen class I, MHC class I chain-related molecule A, and CD8+/regulatory T-cell ratio: which variable determines survival of cervical cancer patients? *Clin. Cancer Res.* 14, 2028–2035.

- Jumnainsong, A., Romphruk, A.V., Jearanaikoon, P., Klumkrathok, K., Romphruk, A., Luanrattanakorn, S., and Leelayuwat, C. (2007). Association of polymorphic extracellular domains of MICA with cervical cancer in northeastern Thai population. *Tissue Antigens* 69, 326–333.
- Jurcevic, S., Ainsworth, M.E., Pomerance, A., Smith, J.D., Robinson, D.R., Dunn, M.J., Yacoub, M.H., and Rose, M.L. (2001). Antivimentin antibodies are an independent predictor of transplant-associated coronary artery disease after cardiac transplantation. *Transplantation* 71, 886–892.
- Kaiser, B.K., Yim, D., Chow, I.-T., Gonzalez, S., Dai, Z., Mann, H.H., Strong, R.K., Groh, V., and Spies, T. (2007). Disulphide-isomerase-enabled shedding of tumour-associated NKG2D ligands. *Nature* 447, 482–486.
- Kamoun, M., and Grossman, R.A. (2008). Kidney-transplant rejection and anti-MICA antibodies. *N. Engl. J. Med.* 358, 195; author reply 196.
- Kanto, T., and Hayashi, N. (2007). Innate immunity in hepatitis C virus infection: Interplay among dendritic cells, natural killer cells and natural killer T cells. *Hepatology* 37 Suppl 3, S319–326.
- Kanungo, A., Samal, K.C., and Sanjeevi, C.B. (2002). Molecular mechanisms involved in the etiopathogenesis of malnutrition-modulated diabetes mellitus. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 958, 138–143.
- Karacki, P.S., Gao, X., Thio, C.L., Thomas, D.L., Goedert, J.J., Vlahov, D., Kaslow, R.A., Strathdee, S., Hilgartner, M.W., O'Brien, S.J., et al. (2004). MICA and recovery from hepatitis C virus and hepatitis B virus infections. *Genes Immun.* 5, 261–266.
- Kasahara, M., Watanabe, Y., Sumasu, M., and Nagata, T. (2002). A family of MHC class I-like genes located in the vicinity of the mouse leukocyte receptor complex. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 99, 13687–13692.
- Kasiske, B.L., Snyder, J.J., Gilbertson, D.T., and Wang, C. (2004). Cancer after kidney transplantation in the United States. *Am. J. Transplant.* 4, 905–913.
- Kato, M., Kinukawa, T., Hattori, R., Tsuji, Y., Hirano, A., Horie, K., Tsuyuki, M., and Mizutani, K. (2006). Does MICA influence acute rejection in kidney transplantation? *Clin Transpl* 389–393.
- Kato, N., Tanaka, J., Sugita, J., Toubai, T., Miura, Y., Ibata, M., Syono, Y., Ota, S., Kondo, T., Asaka, M., et al. (2007). Regulation of the expression of MHC class I-related chain A, B (MICA, MICB) via chromatin remodeling and its impact on the susceptibility of leukemic cells to the cytotoxicity of NKG2D-expressing cells. *Leukemia* 21, 2103–2108.
- Katsuyama, Y., Ota, M., Ando, H., Saito, S., Mizuki, N., Kera, J., Bahram, S., Nose, Y., and Inoko, H. (1999). Sequencing based typing for genetic polymorphisms in exons, 2, 3 and 4 of the MICA gene. *Tissue Antigens* 54, 178–184.
- Kauke, T., Kaczmarek, I., Dick, A., Schmoedel, M., Deutsch, M.-A., Beiras-Fernandez, A., Reichart, B., and Spannagl, M. (2009). Anti-MICA antibodies are related to adverse outcome in heart transplant recipients. *J. Heart Lung Transplant.* 28, 305–311.
- Kawabata, Y., Ikegami, H., Kawaguchi, Y., Fujisawa, T., Hotta, M., Ueda, H., Shintani, M., Nojima, K., Ono, M., Nishino, M., et al. (2000). Age-related association of MHC class I chain-related gene A (MICA) with type 1 (insulin-dependent) diabetes mellitus. *Hum. Immunol.* 61, 624–629.
- Kawasaki, E., Matsuura, N., and Eguchi, K. (2006). Type 1 diabetes in Japan. *Diabetologia* 49, 828–836.
- Kennedy, C., Naipal, A., Gruis, N.A., Struijk, L., ter Schegget, J., Willemze, R., Claas, F.H.J., Bouwes Bavinck, J.N., and Doxiadis, I.I.N. (2002). MICA gene polymorphism is not associated with an increased risk for skin cancer. *J. Invest. Dermatol.* 118, 686–691.
- Kim, T.W., Kim, H.J., Lee, C., Kim, H.Y., Baek, S.-H., Kim, J.H., Kwon, K.-S., and Kim, J.-R. (2008). Identification of replicative senescence-associated genes in human umbilical vein endothelial cells by an annealing control primer system. *Exp. Gerontol.* 43, 286–295.
- Kimura, A., Kobayashi, Y., Takahashi, M., Ohbuchi, N., Kitamura, H., Nakamura, T., Satoh, M., Sasaoka, T., Hiroi, S., Arimura, T., et al. (1998a). MICA gene polymorphism in Takayasu's arteritis and Buerger's disease. *Int. J. Cardiol.* 66 Suppl 1, S107–113; discussion S115.

- Kimura, T., Goto, K., Yabuki, K., Mizuki, N., Tamiya, G., Sato, M., Kimura, M., Inoko, H., and Ohno, S. (1998b). Microsatellite polymorphism within the MICB gene among Japanese patients with Behçet's disease. *Hum. Immunol.* *59*, 500–502.
- Kirsten, H., Petit-Teixeira, E., Scholz, M., Hasenclever, D., Hantmann, H., Heider, D., Wagner, U., Sack, U., Hugo Teixeira, V., Prum, B., et al. (2009a). Association of MICA with rheumatoid arthritis independent of known HLA-DRB1 risk alleles in a family-based and a case control study. *Arthritis Res. Ther.* *11*, R60.
- Kirsten, H., Petit-Teixeira, E., Scholz, M., Hasenclever, D., Hantmann, H., Heider, D., Wagner, U., Sack, U., Hugo Teixeira, V., Prum, B., et al. (2009b). Association of MICA with rheumatoid arthritis independent of known HLA-DRB1 risk alleles in a family-based and a case control study. *Arthritis Res. Ther.* *11*, R60.
- Kitcharoen, K., Witt, C.S., Romphruk, A.V., Christiansen, F.T., and Leelayuwat, C. (2006a). MICA, MICB, and MHC beta block matching in bone marrow transplantation: relevance to transplantation outcome. *Hum. Immunol.* *67*, 238–246.
- Kitcharoen, K., Witt, C.S., Romphruk, A.V., Christiansen, F.T., and Leelayuwat, C. (2006b). MICA, MICB, and MHC Beta Block Matching in Bone Marrow Transplantation: Relevance to Transplantation Outcome. *Human Immunology* *67*, 238–246.
- Kitchens, W.H., Uehara, S., Chase, C.M., Colvin, R.B., Russell, P.S., and Madsen, J.C. (2006). The changing role of natural killer cells in solid organ rejection and tolerance. *Transplantation* *81*, 811–817.
- Kloess, S., Huenecke, S., Piechulek, D., Esser, R., Koch, J., Brehm, C., Soerensen, J., Gardlowski, T., Brinkmann, A., Bader, P., et al. (2010). IL-2-activated haploidentical NK cells restore NKG2D-mediated NK-cell cytotoxicity in neuroblastoma patients by scavenging of plasma MICA. *Eur. J. Immunol.* *40*, 3255–3267.
- Kloss, M., Decker, P., Baltz, K.M., Baessler, T., Jung, G., Rammensee, H.-G., Steinle, A., Krusch, M., and Salih, H.R. (2008). Interaction of monocytes with NK cells upon Toll-like receptor-induced expression of the NKG2D ligand MICA. *J. Immunol.* *181*, 6711–6719.
- Knight, J., Spain, S.L., Capon, F., Hayday, A., Nestle, F.O., Clop, A., Barker, J.N., Weale, M.E., and Trembath, R.C. (2012). Conditional analysis identifies three novel major histocompatibility complex loci associated with psoriasis. *Hum. Mol. Genet.*
- Kohga, K., Takehara, T., Tatsumi, T., Ohkawa, K., Miyagi, T., Hiramatsu, N., Kanto, T., Kasugai, T., Katayama, K., Kato, M., et al. (2008). Serum levels of soluble major histocompatibility complex (MHC) class I-related chain A in patients with chronic liver diseases and changes during transcatheter arterial embolization for hepatocellular carcinoma. *Cancer Sci.* *99*, 1643–1649.
- Kohga, K., Takehara, T., Tatsumi, T., Miyagi, T., Ishida, H., Ohkawa, K., Kanto, T., Hiramatsu, N., and Hayashi, N. (2009). Anticancer chemotherapy inhibits MHC class I-related chain a ectodomain shedding by downregulating ADAM10 expression in hepatocellular carcinoma. *Cancer Res.* *69*, 8050–8057.
- Kohga, K., Takehara, T., Tatsumi, T., Ishida, H., Miyagi, T., Hosui, A., and Hayashi, N. (2010a). Sorafenib inhibits the shedding of major histocompatibility complex class I-related chain A on hepatocellular carcinoma cells by down-regulating a disintegrin and metalloproteinase 9. *Hepatology* *51*, 1264–1273.
- Kohga, K., Tatsumi, T., Takehara, T., Tsunematsu, H., Shimizu, S., Yamamoto, M., Sasakawa, A., Miyagi, T., and Hayashi, N. (2010b). Expression of CD133 confers malignant potential by regulating metalloproteinases in human hepatocellular carcinoma. *J. Hepatol.* *52*, 872–879.
- Köhler, K., Xiong, S., Brzostek, J., Mehrabi, M., Eissmann, P., Harrison, A., Cordoba, S.-P., Oddos, S., Miloserdov, V., Gould, K., et al. (2010). Matched sizes of activating and inhibitory receptor/ligand pairs are required for optimal signal integration by human natural killer cells. *PLoS ONE* *5*, e15374.
- Komarova, Y., and Malik, A.B. (2010a). Regulation of endothelial permeability via paracellular and transcellular transport pathways. *Annu. Rev. Physiol.* *72*, 463–493.
- Komarova, Y., and Malik, A.B. (2010b). Regulation of Endothelial Permeability via Paracellular and Transcellular Transport Pathways. *Annual Review of Physiology* *72*, 463–493.

- Komatsu-Wakui, M., Tokunaga, K., Ishikawa, Y., Kashiwase, K., Moriyama, S., Tsuchiya, N., Ando, H., Shiina, T., Geraghty, D.E., Inoko, H., et al. (1999). MIC-A polymorphism in Japanese and a MIC-A-MIC-B null haplotype. *Immunogenetics* 49, 620–628.
- Komatsu-Wakui, M., Tokunaga, K., Ishikawa, Y., Leelayuwat, C., Kashiwase, K., Tanaka, H., Moriyama, S., Nakajima, F., Park, M.H., Jia, G.J., et al. (2001). Wide distribution of the MICA-MICB null haplotype in East Asians. *Tissue Antigens* 57, 1–8.
- Kopp, R., Glas, J., Lau-Werner, U., Albert, E.D., and Weiss, E.H. (2009). Association of MICA-TM and MICB C1_2_A microsatellite polymorphisms with tumor progression in patients with colorectal cancer. *J. Clin. Immunol.* 29, 545–554.
- Kriegeskorte, A.K., Gebhardt, F.E., Porcellini, S., Schiemann, M., Stemberger, C., Franz, T.J., Huster, K.M., Carayannopoulos, L.N., Yokoyama, W.M., Colonna, M., et al. (2005). NKG2D-independent suppression of T cell proliferation by H60 and MICA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 102, 11805–11810.
- Krmpotic, A., Hasan, M., Loewendorf, A., Saulig, T., Halenius, A., Lenac, T., Polic, B., Bubic, I., Kriegeskorte, A., Pernjak-Pugel, E., et al. (2005). NK cell activation through the NKG2D ligand MULT-1 is selectively prevented by the glycoprotein encoded by mouse cytomegalovirus gene m145. *J Exp Med* 201, 211–220.
- Krmpotić, A., Busch, D.H., Bubić, I., Gebhardt, F., Hengel, H., Hasan, M., Scalzo, A.A., Koszinowski, U.H., and Jonjić, S. (2002). MCMV glycoprotein gp40 confers virus resistance to CD8+ T cells and NK cells in vivo. *Nature Immunology* 3, 529–535.
- Kulski, J.K., Gaudieri, S., Inoko, H., and Dawkins, R.L. (1999). Comparison between two human endogenous retrovirus (HERV)-rich regions within the major histocompatibility complex. *J. Mol. Evol.* 48, 675–683.
- Kulski, J.K., Dunn, D.S., Hui, J., Martinez, P., Romphruk, A.V., Leelayuwat, C., Tay, G.K., Oka, A., and Inoko, H. (2002). Alu polymorphism within the MICB gene and association with HLA-B alleles. *Immunogenetics* 53, 975–979.
- Kumar, V., Kato, N., Urabe, Y., Takahashi, A., Muroyama, R., Hosono, N., Otsuka, M., Tateishi, R., Omata, M., Nakagawa, H., et al. (2011). Genome-wide association study identifies a susceptibility locus for HCV-induced hepatocellular carcinoma. *Nat. Genet.* 43, 455–458.
- Kumar, V., Yi Lo, P.H., Sawai, H., Kato, N., Takahashi, A., Deng, Z., Urabe, Y., Mbarek, H., Tokunaga, K., Tanaka, Y., et al. (2012). Soluble MICA and a MICA Variation as Possible Prognostic Biomarkers for HBV-Induced Hepatocellular Carcinoma. *PLoS ONE* 7, e44743.
- Kuo, P.C., Lu, A.D., and Johnson, L.B. (2001). Expanded criteria donors/high risk recipients is not always cheaper than hemodialysis. *Transplantation* 72, 554–555.
- Kusne, S., Schwartz, M., Breinig, M.K., Dummer, J.S., Lee, R.E., Selby, R., Starzl, T.E., Simmons, R.L., and Ho, M. (1991). Herpes simplex virus hepatitis after solid organ transplantation in adults. *J. Infect. Dis.* 163, 1001–1007.
- Lavado-Valenzuela, R., Benavides, M., Carabantes, F., Alonso, A., and Caballero, A. (2009). MHC class I chain-related gene A transmembrane polymorphism in Spanish women with breast cancer. *Tissue Antigens* 74, 46–49.
- Lee, P.-C., Terasaki, P.I., Takemoto, S.K., Lee, P.-H., Hung, C.-J., Chen, Y.-L., Tsai, A., and Lei, H.-Y. (2002). All chronic rejection failures of kidney transplants were preceded by the development of HLA antibodies. *Transplantation* 74, 1192–1194.
- Lee, Y.J., Huang, F.Y., Wang, C.H., Lo, F.S., Tsan, K.W., Hsu, C.H., Huang, C.Y., Chang, S.C., and Chang, J.G. (2000). Polymorphism in the transmembrane region of the MICA gene and type 1 diabetes. *J. Pediatr. Endocrinol. Metab.* 13, 489–496.
- Leelayuwat, C., Townsend, D.C., Degli-Esposti, M.A., Abraham, L.J., and Dawkins, R.L. (1994). A new polymorphic and multicopy MHC gene family related to nonmammalian class I. *Immunogenetics* 40, 339–351.
- Lemy, A., Andrien, M., Lionet, A., Labalette, M., Noel, C., Hiesse, C., Delahousse, M., Suberbielle-Boissel, C.,

- De Meyer, M., Latinne, D., et al. (2012). Posttransplant 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*.
- Lenac, T., Budt, M., Arapovic, J., Hasan, M., Zimmermann, A., Simic, H., Krmpotic, A., Messerle, M., Ruzsics, Z., Koszinowski, U.H., et al. (2006). The herpesviral Fc receptor fcr-1 down-regulates the NKG2D ligands MULT-1 and H60. *J. Exp. Med.* 203, 1843–1850.
- Lengyel, C.S.E., Willis, L.J., Mann, P., Baker, D., Kortemme, T., Strong, R.K., and McFarland, B.J. (2007). Mutations designed to destabilize the receptor-bound conformation increase MICA-NKG2D association rate and affinity. *J. Biol. Chem.* 282, 30658–30666.
- Ley, K., Laudanna, C., Cybulsky, M.I., and Nourshargh, S. (2007). Getting to the site of inflammation: the leukocyte adhesion cascade updated. *Nat. Rev. Immunol.* 7, 678–689.
- Li, C., Shi, F., Wang, J., Yang, D., Jian, X., and Jiang, C. (2012a). [Antitumor immune response of MHC class I chain-related gene A modified oral squamous cell carcinoma vaccine: an experimental study in mice]. *Shanghai Kou Qiang Yi Xue* 21, 1–5.
- Li, C., Shi, F., Yang, D., Wang, J., Jian, X., and Jiang, C. (2012b). [Natural killer and cytotoxic T lymphocyte-mediated cytotoxicity enhanced by genetic overexpression of MHC class I chain-related protein A in oral squamous cell carcinoma: an experimental study in vivo]. *Hua Xi Kou Qiang Yi Xue Za Zhi* 30, 32–35.
- Li, J., Cui, L., and He, W. (2005). Distinct pattern of human Vdelta1 gammadelta T cells recognizing MICA. *Cell. Mol. Immunol.* 2, 253–258.
- Li, J.-J., Pan, K., Gu, M.-F., Chen, M.-S., Zhao, J.-J., Wang, H., Liang, X.-T., Sun, J.-C., and Xia, J.-C. (2012c). Prognostic value of soluble MICA levels in the serum of patients with advanced hepatocellular carcinoma. *Chinese Journal of Cancer*.
- Li, K., Mandai, M., Hamanishi, J., Matsumura, N., Suzuki, A., Yagi, H., Yamaguchi, K., Baba, T., Fujii, S., and Konishi, I. (2009). Clinical significance of the NKG2D ligands, MICA/B and ULBP2 in ovarian cancer: high expression of ULBP2 is an indicator of poor prognosis. *Cancer Immunol. Immunother.* 58, 641–652.
- Li, L., Chen, A., Chaudhuri, A., Kambham, N., Sigdel, T., Chen, R., and Sarwal, M.M. (2010a). Compartmental localization and clinical relevance of MICA antibodies after renal transplantation. *Transplantation* 89, 312–319.
- Li, P., Morris, D.L., Willcox, B.E., Steinle, A., Spies, T., and Strong, R.K. (2001). Complex structure of the activating immunoreceptor NKG2D and its MHC class I-like ligand MICA. *Nat. Immunol.* 2, 443–451.
- Li, S., Kawata, H., Katsuyama, Y., Ota, M., Morishima, Y., Mano, S., Kulski, J. k., Naruse, T., and Inoko, H. (2004). Association of polymorphic MHC microsatellites with GVHD, survival, and leukemia relapse in unrelated hematopoietic stem cell transplant donor/recipient pairs matched at five HLA loci. *Tissue Antigens* 63, 362–368.
- Li, Y., Xia, B., Lü, M., Ge, L., and Zhang, X. (2010b). MICB0106 gene polymorphism is associated with ulcerative colitis in central China. *Int J Colorectal Dis* 25, 153–159.
- Li, Z., Groh, V., Strong, R.K., and Spies, T. (2000). A single amino acid substitution causes loss of expression of a MICA allele. *Immunogenetics* 51, 246–248.
- Li, Z., Zhang, C., Zhou, Z., Zhang, J., Zhang, J., and Tian, Z. (2012d). Small intestinal intraepithelial lymphocytes expressing CD8 and T cell receptor $\gamma\delta$ are involved in bacterial clearance during *Salmonella enterica* serovar Typhimurium infection. *Infect. Immun.* 80, 565–574.
- Lilienfeld, B.G., Garcia-Borges, C., Crew, M.D., and Seebach, J.D. (2006). Porcine UL16-binding protein 1 expressed on the surface of endothelial cells triggers human NK cytotoxicity through NKG2D. *J. Immunol.* 177, 2146–2152.
- Limaye, A.P., Jerome, K.R., Kuhr, C.S., Ferrenberg, J., Huang, M.L., Davis, C.L., Corey, L., and Marsh, C.L. (2001). Quantitation of BK virus load in serum for the diagnosis of BK virus-associated nephropathy in renal transplant recipients. *J. Infect. Dis.* 183, 1669–1672.

- Lin, D., Lavender, H., Soilleux, E.J., and O'Callaghan, C.A. (2012). NF- κ B regulates MICA gene transcription in endothelial cell through a genetically inhibitable control site. *J. Biol. Chem.* 287, 4299–4310.
- Lindor, N.M., McMaster, M.L., Lindor, C.J., and Greene, M.H. (2008). Concise handbook of familial cancer susceptibility syndromes - second edition. *J. Natl. Cancer Inst. Monographs* 1–93.
- Liu, C.-J., Lee, Y.-J., Chang, K.-W., Shih, Y.-N., Liu, H.-F., and Dang, C.-W. (2004). Polymorphism of the MICA gene and risk for oral submucous fibrosis. *J. Oral Pathol. Med.* 33, 1–6.
- Liu, C.-J., Lui, M.-T., Chen, H.-L., Lin, S.-C., and Chang, K.-W. (2007). MICA and MICB overexpression in oral squamous cell carcinoma. *J. Oral Pathol. Med.* 36, 43–47.
- Liu, G., Atteridge, C.L., Wang, X., Lundgren, A.D., and Wu, J.D. (2010a). The membrane type matrix metalloproteinase MMP14 mediates constitutive shedding of MHC class I chain-related molecule A independent of A disintegrin and metalloproteinases. *J. Immunol.* 184, 3346–3350.
- Liu, J., Liu, F., Qi, Y., Yang, B., Lu, M., Pan, D., and Shen, H. (2010b). [Studies on IFN-gamma-mediated reversion of CIK killing sensitivity to edited human lung cancer A549 cells]. *Xi Bao Yu Fen Zi Mian Yi Xue Za Zhi* 26, 354–355, 358.
- Liu, X., Li, L., Pan, F., and Tian, W. (2012). MICB polymorphism in a southern Chinese Han population: the identification of two new MICB alleles, MICB*005:06 and MICB*026. *Hum. Immunol.* 73, 818–823.
- Lo, F.-S., Lee, Y.-J., Huang, C.-Y., Lin, C.-H., Chang, S.-C., Dang, C.-W., and Liu, H.-F. (2003). Polymorphism in the transmembrane region of the major histocompatibility complex class I chain-related gene A: association of five GCT repetitions with Graves' disease in children. *Thyroid* 13, 839–843.
- Lodoen, M.B., Abenes, G., Umamoto, S., Houchins, J.P., Liu, F., and Lanier, L.L. (2004). The Cytomegalovirus m155 Gene Product Subverts Natural Killer Cell Antiviral Protection by Disruption of H60–NKG2D Interactions. *J Exp Med* 200, 1075–1081.
- Loirand, G., Guilluy, C., and Pacaud, P. (2006). Regulation of Rho proteins by phosphorylation in the cardiovascular system. *Trends Cardiovasc. Med.* 16, 199–204.
- López-Arbesu, R., Ballina-García, F.J., Alperi-López, M., López-Soto, A., Rodríguez-Rodero, S., Martínez-Borra, J., López-Vázquez, A., Fernández-Morera, J.L., Riestra-Noriega, J.L., Queiro-Silva, R., et al. (2007). MHC class I chain-related gene B (MICB) is associated with rheumatoid arthritis susceptibility. *Rheumatology (Oxford)* 46, 426–430.
- López-Botet, M., Bellón, T., Llano, M., Navarro, F., García, P., and de Miguel, M. (2000). Paired inhibitory and triggering NK cell receptors for HLA class I molecules. *Hum. Immunol.* 61, 7–17.
- López-Hernández, R., Valdés, M., Lucas, D., Campillo, J.A., Martínez-García, P., Salama, H., López, M., Salgado, G., Botella, C., Minguela, A., et al. (2010). Association analysis of MICA gene polymorphism and MICA-129 dimorphism with inflammatory bowel disease susceptibility in a Spanish population. *Hum. Immunol.* 71, 512–514.
- Lopez-Vazquez, A., Rodrigo, L., Fuentes, D., Riestra, S., Bousoño, C., Garcia-Fernandez, S., Martinez-Borra, J., Gonzalez, S., and Lopez-Larrea, C. (2002a). MHC class I chain related gene A (MICA) modulates the development of coeliac disease in patients with the high risk heterodimer DQA1*0501/DQB1*0201. *Gut* 50, 336–340.
- Lopez-Vazquez, A., Rodrigo, L., Fuentes, D., Riestra, S., Bousoño, C., Garcia-Fernandez, S., Martinez-Borra, J., Gonzalez, S., and Lopez-Larrea, C. (2002b). MICA-A5.1 allele is associated with atypical forms of celiac disease in HLA-DQ2-negative patients. *Immunogenetics* 53, 989–991.
- López-Vázquez, A., Fuentes, D., Rodrigo, L., González, S., Moreno, M., Fernández, E., Martínez-Borra, J., and López-Larrea, C. (2004a). MHC class I region plays a role in the development of diverse clinical forms of celiac disease in a Saharawi population. *Am. J. Gastroenterol.* 99, 662–667.
- López-Vázquez, A., Rodrigo, L., Miña-Blanco, A., Martínez-Borra, J., Fuentes, D., Rodríguez, M., Pérez, R., González, S., and López-Larrea, C. (2004b). Extended human leukocyte antigen haplotype EH18.1 influences

- progression to hepatocellular carcinoma in patients with hepatitis C virus infection. *J. Infect. Dis.* *189*, 957–963.
- Loupy, A., Suberbielle-Boissel, C., Hill, G.S., Lefaucheur, C., Anglicheau, D., Zuber, J., Martinez, F., Thervet, E., Méjean, A., Charron, D., et al. (2009). Outcome of subclinical antibody-mediated rejection in kidney transplant recipients with preformed donor-specific antibodies. *Am. J. Transplant.* *9*, 2561–2570.
- Loupy, A., Cazes, A., Guillemain, R., Amrein, C., Hedjoudje, A., Tible, M., Pezzella, V., Fabiani, J.N., Suberbielle, C., Nochy, D., et al. (2011a). Very late heart transplant rejection is associated with microvascular injury, complement deposition and progression to cardiac allograft vasculopathy. *Am. J. Transplant.* *11*, 1478–1487.
- Loupy, A., Hill, G.S., Suberbielle, C., Charron, D., Anglicheau, D., Zuber, J., Timsit, M.O., Duong, J.P., Bruneval, P., Vernerey, D., et al. (2011b). Significance of C4d Banff scores in early protocol biopsies of kidney transplant recipients with preformed donor-specific antibodies (DSA). *Am. J. Transplant.* *11*, 56–65.
- Loupy, A., Vernerey, D., Hill, G.S., Legendre, C., and Anglicheau, D. (2011c). Delineating the picture of renal graft injury in 2011. *Am. J. Transplant.* *11*, 1757; author reply 1758.
- Lowance, D., Neumayer, H.H., Legendre, C.M., Squifflet, J.P., Kovarik, J., Brennan, P.J., Norman, D., Mendez, R., Keating, M.R., Coggon, G.L., et al. (1999). Valacyclovir for the prevention of cytomegalovirus disease after renal transplantation. International Valacyclovir Cytomegalovirus Prophylaxis Transplantation Study Group. *N. Engl. J. Med.* *340*, 1462–1470.
- Lu, J., Aggarwal, R., Kanji, S., Das, M., Joseph, M., Pompili, V., and Das, H. (2011). Human ovarian tumor cells escape $\gamma\delta$ T cell recognition partly by down regulating surface expression of MICA and limiting cell cycle related molecules. *PLoS ONE* *6*, e23348.
- Lu, S., Xiao, P., Xue, L., Che, L., Yang, P., Li, Y., and Qiao, H. (2008). Prevalent expression of MHC class I chain-related molecule A in human osteosarcoma. *Neoplasma* *55*, 266–272.
- Lü, M., Xia, B., Li, J., Ye, M., Zhang, X., and Tan, Q. (2006). MICB microsatellite polymorphism is associated with ulcerative colitis in Chinese population. *Clin. Immunol.* *120*, 199–204.
- Lü, M., Xia, B., Ge, L., Li, Y., Zhao, J., Chen, F., Zhou, F., Zhang, X., and Tan, J. (2009). Role of major histocompatibility complex class I-related molecules A*A5.1 allele in ulcerative colitis in Chinese patients. *Immunology* *128*, e230–236.
- Lucas, D., Campillo, J.A., López-Hernández, R., Martínez-García, P., López-Sánchez, M., Botella, C., Salgado, G., Minguela, A., Alvarez-López, M.R., and Muro, M. (2008). Allelic diversity of MICA gene and MICA/HLA-B haplotypic variation in a population of the Murcia region in southeastern Spain. *Hum. Immunol.* *69*, 655–660.
- Luo, L., Lu, J., Wei, L., Long, D., Guo, J.Y., Shan, J., Li, F.S., Lu, P.Y., Li, P.Y., and Feng, L. (2010). The role of HIF-1 in up-regulating MICA expression on human renal proximal tubular epithelial cells during hypoxia/reoxygenation. *BMC Cell Biol.* *11*, 91.
- Luo, Q.Z., Lin, L., Gong, Z., Mei, B., Xu, Y.J., Huo, Z., and Yu, P. (2011). Positive association of major histocompatibility complex class I chain-related gene A polymorphism with leukemia susceptibility in the people of Han nationality of Southern China. *Tissue Antigens* *78*, 178–184.
- Lusis, A.J. (2000). Atherosclerosis. *Nature* *407*, 233–241.
- Ma, L., Li, G., Su, Y., He, Q., Zhang, C., and Zhang, J. (2010). The soluble major histocompatibility complex class I-related chain A protein reduced NKG2D expression on natural killer and T cells from patients with prolactinoma and non-secreting pituitary adenoma. *J Clin Neurosci* *17*, 241–247.
- Maccalli, C., Pende, D., Castelli, C., Mingari, M.C., Robbins, P.F., and Parmiani, G. (2003). NKG2D engagement of colorectal cancer-specific T cells strengthens TCR-mediated antigen stimulation and elicits TCR independent anti-tumor activity. *Eur. J. Immunol.* *33*, 2033–2043.
- Madjd, Z., Spendlove, I., Moss, R., Bevin, S., Pinder, S.E., Watson, N.F.S., Ellis, I., and Durrant, L.G. (2007). Upregulation of MICA on high-grade invasive operable breast carcinoma. *Cancer Immun.* *7*, 17.
- Maia, M.H.T., Peixoto, R. de L., de Lima, C.P.S., Magalhães, M., Sena, L., Costa, P. do S.S., Barbosa, F.B., de

- Oliveira, L.F., Romero, M., Silva, C.N. de A., et al. (2009). Predisposition to idiopathic thrombocytopenic purpura maps close to the major histocompatibility complex class I chain-related gene A. *Hum. Immunol.* *70*, 179–183.
- Malarkannan, S., Shih, P.P., Eden, P.A., Horng, T., Zuberi, A.R., Christianson, G., Roopenian, D., and Shastri, N. (1998). The molecular and functional characterization of a dominant minor H antigen, H60. *J. Immunol.* *161*, 3501–3509.
- Mameli, A., Cauli, A., Taccari, E., Scarpa, R., Punzi, L., Lapadula, G., Peluso, R., Ramonda, R., Spadaro, A., Iannone, F., et al. (2008). Association of MICA alleles with psoriatic arthritis and its clinical forms. A multicenter Italian study. *Clin. Exp. Rheumatol.* *26*, 649–652.
- Marin, M.L.C., Savioli, C.R., Yamamoto, J.H., Kalil, J., and Goldberg, A.C. (2004). MICA polymorphism in a sample of the São Paulo population, Brazil. *Eur. J. Immunogenet.* *31*, 63–71.
- Markiewicz, M.A., Wise, E.L., Buchwald, Z.S., Pinto, A.K., Zafirova, B., Polic, B., and Shaw, A.S. (2012). RAE1 ϵ ligand expressed on pancreatic islets recruits NKG2D receptor-expressing cytotoxic T cells independent of T cell receptor recognition. *Immunity* *36*, 132–141.
- Märten, A., von Lilienfeld-Toal, M., Büchler, M.W., and Schmidt, J. (2006). Soluble MIC is elevated in the serum of patients with pancreatic carcinoma diminishing gammadelta T cell cytotoxicity. *Int. J. Cancer* *119*, 2359–2365.
- Martin, M.U., and Wesche, H. (2002a). Summary and comparison of the signaling mechanisms of the Toll/interleukin-1 receptor family. *Biochim. Biophys. Acta* *1592*, 265–280.
- Martin, M.U., and Wesche, H. (2002b). Summary and comparison of the signaling mechanisms of the Toll/interleukin-1 receptor family. *Biochim. Biophys. Acta* *1592*, 265–280.
- Martín-Pagola, A., Ortiz, L., Pérez de Nanclares, G., Vitoria, J.C., Castaño, L., and Bilbao, J.R. (2003). Analysis of the expression of MICA in small intestinal mucosa of patients with celiac disease. *J. Clin. Immunol.* *23*, 498–503.
- Martín-Pagola, A., Pérez-Nanclares, G., Ortiz, L., Vitoria, J.C., Hualde, I., Zaballa, R., Preciado, E., Castaño, L., and Bilbao, J.R. (2004). MICA response to gliadin in intestinal mucosa from celiac patients. *Immunogenetics* *56*, 549–554.
- Martinez, A., Fernandez-Arquero, M., Balsa, A., Rubio, A., Alves, H., Pascual-Salcedo, D., Martin-Mola, E., and de la Concha, E.G. (2001). Primary association of a MICA allele with protection against rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* *44*, 1261–1265.
- Martinez, A., Salido, M., Bonilla, G., Pascual-Salcedo, D., Fernandez-Arquero, M., de Miguel, S., Balsa, A., de la Concha, E.G., and Fernandez-Gutierrez, B. (2004). Association of the major histocompatibility complex with response to infliximab therapy in rheumatoid arthritis patients. *Arthritis Rheum.* *50*, 1077–1082.
- Martinez-Borra, J., Gonzalez, S., López-Vazquez, A., Gelaz, M.A., Armas, J.B., Kanga, U., Mehra, N.K., and López-Larrea, C. (2000). HLA-B27 alone rather than B27-related class I haplotypes contributes to ankylosing spondylitis susceptibility. *Hum. Immunol.* *61*, 131–139.
- Mathieu, A., Cauli, A., Vacca, A., Mameli, A., Passiu, G., Porru, G., Piga, M., Ibba, V., Mura, V., and Sanna, S. (2007). Genetics of psoriasis and psoriatic arthritis. *Reumatismo* *59 Suppl 1*, 25–27.
- McCann, F.E., Eissmann, P., Onfelt, B., Leung, R., and Davis, D.M. (2007a). The activating NKG2D ligand MHC class I-related chain A transfers from target cells to NK cells in a manner that allows functional consequences. *J. Immunol.* *178*, 3418–3426.
- McCann, F.E., Eissmann, P., Önfelt, B., Leung, R., and Davis, D.M. (2007b). The Activating NKG2D Ligand MHC Class I-Related Chain A Transfers from Target Cells to NK Cells in a Manner That Allows Functional Consequences. *J Immunol* *178*, 3418–3426.
- McSharry, B.P., Burgert, H.-G., Owen, D.P., Stanton, R.J., Prod'homme, V., Sester, M., Koebernick, K., Groh, V., Spies, T., Cox, S., et al. (2008). Adenovirus E3/19K promotes evasion of NK cell recognition by intracellular

sequestration of the NKG2D ligands major histocompatibility complex class I chain-related proteins A and B. *J. Virol.* 82, 4585–4594.

Medlej-Hashim, M., Delague, V., Chouery, E., Salem, N., Rawashdeh, M., Lefranc, G., Loiselet, J., and Mégarbané, A. (2004). Amyloidosis in familial Mediterranean fever patients: correlation with MEFV genotype and SAA1 and MICA polymorphisms effects. *BMC Med. Genet.* 5, 4.

Mehta, D., and Malik, A.B. (2006). Signaling mechanisms regulating endothelial permeability. *Physiol. Rev.* 86, 279–367.

Mei, B., Luo, Q., Du, K., Huo, Z., Wang, F., and Yu, P. (2009). Association of MICA gene polymorphisms with *Chlamydia trachomatis* infection and related tubal pathology in infertile women. *Hum. Reprod.* 24, 3090–3095.

Mei, B., Du, K., Huo, Z., Zou, Y., and Yu, P. (2010). Discrepant effects of *Chlamydia trachomatis* infection on MICA expression of HeLa and U373 cells. *Infect. Genet. Evol.* 10, 740–745.

Melum, E., Karlsen, T.H., Schrumpf, E., Bergquist, A., Thorsby, E., Boberg, K.M., and Lie, B.A. (2008). Cholangiocarcinoma in primary sclerosing cholangitis is associated with NKG2D polymorphisms. *Hepatology* 47, 90–96.

Mendoza-Rincon, J., Argüello, J.R., Pérez-Rodríguez, M., McWhinnie, A., Marsh, S.G., Fischer, G., and Madrigal, J.A. (1999). Characterization of the MICA polymorphism by sequence-specific oligonucleotide probing. *Immunogenetics* 49, 471–478.

Menier, C., Riteau, B., Carosella, E.D., and Rouas-Freiss, N. (2002). MICA triggering signal for NK cell tumor lysis is counteracted by HLA-G1-mediated inhibitory signal. *Int. J. Cancer* 100, 63–70.

de Menthon, M., Lambert, M., Guiard, E., Tognarelli, S., Bienvenu, B., Karras, A., Guillevin, L., and Caillat-Zucman, S. (2011). Excessive interleukin-15 transpresentation endows NKG2D+CD4+ T cells with innate-like capacity to lyse vascular endothelium in granulomatosis with polyangiitis (Wegener's). *Arthritis & Rheumatism* 63, 2116–2126.

Mention, J.-J., Ben Ahmed, M., Bègue, B., Barbe, U., Verkarre, V., Asnafi, V., Colombel, J.-F., Cugnenc, P.-H., Ruemmele, F.M., McIntyre, E., et al. (2003). Interleukin 15: a key to disrupted intraepithelial lymphocyte homeostasis and lymphomagenesis in celiac disease. *Gastroenterology* 125, 730–745.

Meresse, B., Chen, Z., Ciszewski, C., Tretiakova, M., Bhagat, G., Krausz, T.N., Raulet, D.H., Lanier, L.L., Groh, V., Spies, T., et al. (2004). Coordinated Induction by IL15 of a TCR-Independent NKG2D Signaling Pathway Converts CTL into Lymphokine-Activated Killer Cells in Celiac Disease. *Immunity* 21, 357–366.

Metzelaar-Blok, J.A.W., Hurks, H.M.H., Naipal, A., De Lange, P., Keunen, J.E.E., Claas, F.H.J., Doxiadis, I.I.N., and Jager, M.J. (2005). Normal HLA class I, II, and MICA gene distribution in uveal melanoma. *Mol. Vis.* 11, 1166–1172.

Miller, G.G., and Dummer, J.S. (2007). Herpes simplex and varicella zoster viruses: forgotten but not gone. *Am. J. Transplant.* 7, 741–747.

Minshall, R.D., Tirupathi, C., Vogel, S.M., and Malik, A.B. (2002). Vesicle formation and trafficking in endothelial cells and regulation of endothelial barrier function. *Histochem. Cell Biol.* 117, 105–112.

Mizuki, N., Inoko, H., and Ohno, S. (1997a). Molecular genetics (HLA) of Behçet's disease. *Yonsei Med. J.* 38, 333–349.

Mizuki, N., Ota, M., Kimura, M., Ohno, S., Ando, H., Katsuyama, Y., Yamazaki, M., Watanabe, K., Goto, K., Nakamura, S., et al. (1997b). Triplet repeat polymorphism in the transmembrane region of the MICA gene: a strong association of six GCT repetitions with Behçet disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 94, 1298–1303.

Mizuki, N., Meguro, A., Tohnai, I., Gül, A., Ohno, S., and Mizuki, N. (2007). Association of Major Histocompatibility Complex Class I Chain-Related Gene A and HLA-B Alleles with Behçet's Disease in Turkey. *Jpn. J. Ophthalmol.* 51, 431–436.

Mizutani, K., Terasaki, P., Rosen, A., Esquenazi, V., Miller, J., Shih, R.N.J., Pei, R., Ozawa, M., and Lee, J. (2005). Serial ten-year follow-up of HLA and MICA antibody production prior to kidney graft failure. *Am. J.*

Transplant. 5, 2265–2272.

Mizutani, K., Shibata, L., Ozawa, M., Esquenazi, V., Rosen, A., Miller, J., and Terasaki, P.I. (2006a). Detection of HLA and MICA antibodies before kidney graft failure. *Clin Transpl* 255–264.

Mizutani, K., Terasaki, P., Bignon, J.D., Hourmant, M., Cesbron-Gautier, A., Shih, R.N.J., Pei, R., Lee, J., and Ozawa, M. (2006b). Association of kidney transplant failure and antibodies against MICA. *Hum. Immunol.* 67, 683–691.

Mizutani, K., Terasaki, P.I., Shih, R.N.J., Pei, R., Ozawa, M., and Lee, J. (2006c). Frequency of MIC antibody in rejected renal transplant patients without HLA antibody. *Hum. Immunol.* 67, 223–229.

Moenkemeyer, M., Heiken, H., Schmidt, R.E., and Witte, T. (2009). Higher risk of cytomegalovirus reactivation in human immunodeficiency virus-1-infected patients homozygous for MICA5.1. *Hum. Immunol.* 70, 175–178.

Mohebbi, N., and Wagner, C.A. (2009). The “antibodyome”: or, how to find antibodies? *J. Nephrol.* 22, 439–441.

Mok, J.W., Lee, Y.J., Kim, J.Y., Lee, E.B., Song, Y.W., Park, M.H., and Park, K.S. (2003). Association of MICA polymorphism with rheumatoid arthritis patients in Koreans. *Hum. Immunol.* 64, 1190–1194.

Molinero, L.L., Fuertes, M.B., Rabinovich, G.A., Fainboim, L., and Zwirner, N.W. (2002a). Activation-induced expression of MICA on T lymphocytes involves engagement of CD3 and CD28. *J. Leukoc. Biol.* 71, 791–797.

Molinero, L.L., Marcos, C.Y., Mirbaha, F., Fainboim, L., Stastny, P., and Zwirner, N.W. (2002b). Codominant expression of the polymorphic MICA alloantigens encoded by genes in the HLA region. *Eur. J. Immunogenet.* 29, 315–319.

Molinero, L.L., Fuertes, M.B., Fainboim, L., Rabinovich, G.A., and Zwirner, N.W. (2003a). Up-regulated expression of MICA on activated T lymphocytes involves Lck and Fyn kinases and signaling through MEK1/ERK, p38 MAP kinase, and calcineurin. *J. Leukoc. Biol.* 73, 815–822.

Molinero, L.L., Gruber, M., Leoni, J., Woscoff, A., and Zwirner, N.W. (2003b). Up-regulated expression of MICA and proinflammatory cytokines in skin biopsies from patients with seborrheic dermatitis. *Clin. Immunol.* 106, 50–54.

Molinero, L.L., Fuertes, M.B., Girart, M.V., Fainboim, L., Rabinovich, G.A., Costas, M.A., and Zwirner, N.W. (2004). NF-kappa B regulates expression of the MHC class I-related chain A gene in activated T lymphocytes. *J. Immunol.* 173, 5583–5590.

Molinero, L.L., Domaica, C.I., Fuertes, M.B., Girart, M.V., Rossi, L.E., and Zwirner, N.W. (2006). Intracellular expression of MICA in activated CD4 T lymphocytes and protection from NK cell-mediated MICA-dependent cytotoxicity. *Hum. Immunol.* 67, 170–182.

Monsinjon, T., Gasque, P., Chan, P., Ischenko, A., Brady, J.J., and Fontaine, M.C. (2003). Regulation by complement C3a and C5a anaphylatoxins of cytokine production in human umbilical vein endothelial cells. *FASEB J.* 17, 1003–1014.

du Montcel, S.T., Michou, L., Petit-Teixeira, E., Osorio, J., Lemaire, I., Lasbleiz, S., Pierlot, C., Quillet, P., Bardin, T., Prum, B., et al. (2005). New classification of HLA-DRB1 alleles supports the shared epitope hypothesis of rheumatoid arthritis susceptibility. *Arthritis Rheum.* 52, 1063–1068.

Montgomery, R.A., Cozzi, E., West, L.J., and Warren, D.S. (2011). Humoral immunity and antibody-mediated rejection in solid organ transplantation. *Semin. Immunol.* 23, 224–234.

Mylonakis, E., Goes, N., Rubin, R.H., Cosimi, A.B., Colvin, R.B., and Fishman, J.A. (2001). BK virus in solid organ transplant recipients: an emerging syndrome. *Transplantation* 72, 1587–1592.

Nachmani, D., Stern-Ginossar, N., Sarid, R., and Mandelboim, O. (2009). Diverse herpesvirus microRNAs target the stress-induced immune ligand MICB to escape recognition by natural killer cells. *Cell Host Microbe* 5, 376–385.

Nachmani, D., Lankry, D., Wolf, D.G., and Mandelboim, O. (2010). The human cytomegalovirus microRNA

- miR-UL112 acts synergistically with a cellular microRNA to escape immune elimination. *Nat. Immunol.* *11*, 806–813.
- Nagai, Y., Tanaka, Y., Kuroishi, T., Sato, R., Endo, Y., and Sugawara, S. (2012). Histamine reduces susceptibility to natural killer cells via down-regulation of NKG2D ligands on human monocytic leukaemia THP-1 cells. *Immunology* *136*, 103–114.
- Najafian, B., and Kasiske, B.L. (2008). Chronic allograft nephropathy. *Curr. Opin. Nephrol. Hypertens.* *17*, 149–155.
- Narod, S.A., and Salmena, L. (2011). BRCA1 and BRCA2 mutations and breast cancer. *Discov Med* *12*, 445–453.
- Nausch, N., and Cerwenka, A. (2008). NKG2D ligands in tumor immunity. *Oncogene* *27*, 5944–5958.
- Nedvetzki, S., Sowinski, S., Eagle, R.A., Harris, J., Vély, F., Pende, D., Trowsdale, J., Vivier, E., Gordon, S., and Davis, D.M. (2007). Reciprocal regulation of human natural killer cells and macrophages associated with distinct immune synapses. *Blood* *109*, 3776–3785.
- Nejentsev, S., Howson, J.M.M., Walker, N.M., Szeszko, J., Field, S.F., Stevens, H.E., Reynolds, P., Hardy, M., King, E., Masters, J., et al. (2007). Localization of type 1 diabetes susceptibility to the MHC class I genes HLA-B and HLA-A. *Nature* *450*, 887–892.
- Newell, K.A., Alonso, E.M., Whittington, P.F., Bruce, D.S., Millis, J.M., Piper, J.B., Woodle, E.S., Kelly, S.M., Koeppen, H., Hart, J., et al. (1996). Posttransplant lymphoproliferative disease in pediatric liver transplantation. Interplay between primary Epstein-Barr virus infection and immunosuppression. *Transplantation* *62*, 370–375.
- Nice, T.J., Coscoy, L., and Raulet, D.H. (2009). Posttranslational regulation of the NKG2D ligand Mult1 in response to cell stress. *J. Exp. Med.* *206*, 287–298.
- Nickeleit, V., Klimkait, T., Binet, I.F., Dalquen, P., Del Zenero, V., Thiel, G., Mihatsch, M.J., and Hirsch, H.H. (2000). Testing for polyomavirus type BK DNA in plasma to identify renal-allograft recipients with viral nephropathy. *N. Engl. J. Med.* *342*, 1309–1315.
- Nolting, A., Dugast, A.-S., Rihn, S., Luteijn, R., Carrington, M.F., Kane, K., Jost, S., Toth, I., Nagami, E., Faetkenheuer, G., 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*, 12–20.
- Nomura, M., Takihara, Y., and Shimada, K. (1994). Isolation and characterization of retinoic acid-inducible cDNA clones in F9 cells: one of the early inducible clones encodes a novel protein sharing several highly homologous regions with a *Drosophila* polyhomeotic protein. *Differentiation* *57*, 39–50.
- Nückel, H., Switala, M., Sellmann, L., Horn, P.A., Dürig, J., Dührsen, U., Küppers, R., Grosse-Wilde, H., and Rebmann, V. (2010). The prognostic significance of soluble NKG2D ligands in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia* *24*, 1152–1159.
- Obuchi, N., Takahashi, M., Nouchi, T., Satoh, M., Arimura, T., Ueda, K., Akai, J., Ota, M., Naruse, T., Inoko, H., et al. (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.
- Ogasawara, K., Hamerman, J.A., Hsin, H., Chikuma, S., Bour-Jordan, H., Chen, T., Pertel, T., Carnaud, C., Bluestone, J.A., and Lanier, L.L. (2003). Impairment of NK cell function by NKG2D modulation in NOD mice. *Immunity* *18*, 41–51.
- Ogasawara, K., Hamerman, J.A., Ehrlich, L.R., Bour-Jordan, H., Santamaria, P., Bluestone, J.A., and Lanier, L.L. (2004). NKG2D blockade prevents autoimmune diabetes in NOD mice. *Immunity* *20*, 757–767.
- Opelz, G. (2005). Non-HLA transplantation immunity revealed by lymphocytotoxic antibodies. *Lancet* *365*, 1570–1576.
- Oppenheim, D.E., Roberts, S.J., Clarke, S.L., Filler, R., Lewis, J.M., Tigelaar, R.E., Girardi, M., and Hayday, A.C. (2005). Sustained localized expression of ligand for the activating NKG2D receptor impairs natural cytotoxicity in vivo and reduces tumor immunosurveillance. *Nature Immunology* *6*, 928–937.

- Paantjens, A.W.M., van de Graaf, E.A., van Ginkel, W.G.J., van den Bosch, J.M.M., and Otten, H.G. (2010). Lung transplantation under a tacrolimus/mycophenolate mofetil-based immunosuppressive regimen results in low titers of HLA and MICA IgG antibodies which are not related to development of BOS. *J. Heart Lung Transplant.* *29*, 596–598.
- Parmar, S., Lima, M. del, Zou, Y., Patah, P.A., Liu, P., Cano, P., Rondon, G., Pesoa, S., Silva, L. de P., Qazilbash, M.H., et al. (2009). Donor-recipient mismatches in MHC class I chain-related gene A in unrelated donor transplantation lead to increased incidence of acute graft-versus-host disease. *Blood* *114*, 2884–2887.
- Paschen, A., Sucker, A., Hill, B., Moll, I., Zapatka, M., Nguyen, X.D., Sim, G.C., Gutmann, I., Hassel, J., Becker, J.C., et al. (2009). Differential clinical significance of individual NKG2D ligands in melanoma: soluble ULBP2 as an indicator of poor prognosis superior to S100B. *Clin. Cancer Res.* *15*, 5208–5215.
- Pescovitz, M.D. (2006). Rituximab, an anti-cd20 monoclonal antibody: history and mechanism of action. *Am. J. Transplant.* *6*, 859–866.
- Petersdorf, E.W., Shuler, K.B., Longton, G.M., Spies, T., and Hansen, J.A. (1999). Population study of allelic diversity in the human MHC class I-related MIC-A gene. *Immunogenetics* *49*, 605–612.
- Pober, J.S., and Cotran, R.S. (1990a). Cytokines and endothelial cell biology. *Physiol. Rev.* *70*, 427–451.
- Pober, J.S., and Cotran, R.S. (1990b). The role of endothelial cells in inflammation. *Transplantation* *50*, 537–544.
- Pober, J.S., and Sessa, W.C. (2007). Evolving functions of endothelial cells in inflammation. *Nat. Rev. Immunol.* *7*, 803–815.
- Poirier, N., Blanco, G., and Vanhove, B. (2012). CD28-specific immunomodulating antibodies: what can be learned from experimental models? *Am. J. Transplant.* *12*, 1682–1690.
- Prosser, S., and Hariharan, S. (2006). Pathogenesis of BK virus infection after renal transplantation. *Expert Rev Clin Immunol* *2*, 833–837.
- Qin, H., Lee, I.-F., Panagiotopoulos, C., Wang, X., Chu, A.D., Utz, P.J., Priatel, J.J., and Tan, R. (2011). Natural Killer Cells From Children With Type 1 Diabetes Have Defects in NKG2D-Dependent Function and Signaling. *Diabetes* *60*, 857–866.
- Raache, R., Belanteur, K., Amroun, H., Benyahia, A., Heniche, A., Azzouz, M., Mimouni, S., Gervais, T., Latinne, D., Boudiba, A., et al. (2012). Association of Major Histocompatibility Complex Class I Chain-Related Gene A Dimorphism with Type 1 Diabetes and Latent Autoimmune Diabetes in Adults in the Algerian Population. *Clin. Vaccine Immunol.* *19*, 557–561.
- Racusen, L.C., and Haas, M. (2006). Antibody-mediated rejection in renal allografts: lessons from pathology. *Clin J Am Soc Nephrol* *1*, 415–420.
- Radosavljevic, M., and Bahram, S. (2003). In vivo immunogenetics: from MIC to RAET1 loci. *Immunogenetics* *55*, 1–9.
- Raffaghello, L., Prigione, I., Airoidi, I., Camoriano, M., Levreri, I., Gambini, C., Pende, D., Steinle, A., Ferrone, S., and Pistoia, V. (2004). Downregulation and/or release of NKG2D ligands as immune evasion strategy of human neuroblastoma. *Neoplasia* *6*, 558–568.
- Rajasekaran, K., Xiong, V., Fong, L., Gorski, J., and Malarkannan, S. (2010). Functional dichotomy between NKG2D and CD28-mediated co-stimulation in human CD8⁺ T cells. *PLoS ONE* *5*.
- Raulet, D.H. (2003). Roles of the NKG2D immunoreceptor and its ligands. *Nat. Rev. Immunol.* *3*, 781–790.
- Ravindranath, M.H., Pham, T., Ozawa, M., and Terasaki, P.I. (2012). Antibodies to HLA-E may account for the non-donor-specific anti-HLA class-Ia antibodies in renal and liver transplant recipients. *Int. Immunol.* *24*, 43–57.
- Regele, H. (2008). [The role of endothelial cells in allograft rejection]. *Pathologie* *29 Suppl 2*, 141–144.
- Regele, H., and Böhmig, G.A. (2003). Tissue injury and repair in allografts: novel perspectives. *Curr. Opin.*

Nephrol. Hypertens. *12*, 259–266.

Revirion, D., Perdriger, A., Toussiro, E., Wendling, D., Balandraud, N., Guis, S., Semana, G., Tiberghien, P., Mercier, P., and Roudier, J. (2001). Influence of shared epitope-negative HLA-DRB1 alleles on genetic susceptibility to rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* *44*, 535–540.

Rewers, M., Bugawan, T.L., Norris, J.M., Blair, A., Beaty, B., Hoffman, M., McDuffie, R.S., Jr, Hamman, R.F., Klingensmith, G., Eisenbarth, G.S., et al. (1996). Newborn screening for HLA markers associated with IDDM: diabetes autoimmunity study in the young (DAISY). *Diabetologia* *39*, 807–812.

Risau, W., and Flamme, I. (1995). Vasculogenesis. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* *11*, 73–91.

Roberts, A.I., Lee, L., Schwarz, E., Groh, V., Spies, T., Ebert, E.C., and Jabri, B. (2001). NKG2D receptors induced by IL-15 costimulate CD28-negative effector CTL in the tissue microenvironment. *J. Immunol.* *167*, 5527–5530.

Roche, B., and Samuel, D. (2006). [Liver transplantation for complications of hepatitis B]. *Presse Med* *35*, 335–345.

Rose, G. (2005). The risk of tuberculosis transmission in solid organ transplantation: Is it more than a theoretical concern? *Can J Infect Dis Med Microbiol* *16*, 304–308.

Rossini, M., Cheunsuchon, B., Donnert, E., Ma, L.-J., Thomas, J.W., Neilson, E.G., and Fogo, A.B. (2005). Immunolocalization of fibroblast growth factor-1 (FGF-1), its receptor (FGFR-1), and fibroblast-specific protein-1 (FSP-1) in inflammatory renal disease. *Kidney Int.* *68*, 2621–2628.

Roy, S., Barnes, P.F., Garg, A., Wu, S., Cosman, D., and Vankayalapati, R. (2008). NK cells lyse T regulatory cells that expand in response to an intracellular pathogen. *J. Immunol.* *180*, 1729–1736.

Rundhaug, J.E. (2005). Matrix metalloproteinases and angiogenesis. *J. Cell. Mol. Med.* *9*, 267–285.

do Sacramento, W.S., Mazini, P.S., Franceschi, D.A.S., de Melo, F.C., Braga, M.A., Sell, A.M., Tsuneto, L.T., and Visentainer, J.E.L. (2012). Frequencies of MICA alleles in patients from southern Brazil with multibacillary and paucibacillary leprosy. *Int. J. Immunogenet.* *39*, 210–215.

Sagedal, S., Nordal, K.P., Hartmann, A., Sund, S., Scott, H., Degré, M., Foss, A., Leivestad, T., Osnes, K., Fauchald, P., et al. (2002). The impact of cytomegalovirus infection and disease on rejection episodes in renal allograft recipients. *Am. J. Transplant.* *2*, 850–856.

Saikali, P., Antel, J.P., Newcombe, J., Chen, Z., Freedman, M., Blain, M., Cayrol, R., Prat, A., Hall, J.A., and Arbour, N. (2007). NKG2D-Mediated Cytotoxicity toward Oligodendrocytes Suggests a Mechanism for Tissue Injury in Multiple Sclerosis. *J. Neurosci.* *27*, 1220–1228.

Saito, M., Tanabe, Y., Kudo, I., and Nakayama, K. (2003). Endothelium-derived prostaglandin H2 evokes the stretch-induced contraction of rabbit pulmonary artery. *Eur. J. Pharmacol.* *467*, 151–161.

Salih, H.R., Rammensee, H.-G., and Steinle, A. (2002). Cutting edge: down-regulation of MICA on human tumors by proteolytic shedding. *J. Immunol.* *169*, 4098–4102.

Salih, H.R., Antropius, H., Gieseke, F., Lutz, S.Z., Kanz, L., Rammensee, H.-G., and Steinle, A. (2003). Functional expression and release of ligands for the activating immunoreceptor NKG2D in leukemia. *Blood* *102*, 1389–1396.

Salih, H.R., Goehlsdorf, D., and Steinle, A. (2006). Release of MICB molecules by tumor cells: mechanism and soluble MICB in sera of cancer patients. *Hum. Immunol.* *67*, 188–195.

Schmidt, A.M., Hasu, M., Popov, D., Zhang, J.H., Chen, J., Yan, S.D., Brett, J., Cao, R., Kuwabara, K., and Costache, G. (1994). Receptor for advanced glycation end products (AGEs) has a central role in vessel wall interactions and gene activation in response to circulating AGE proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *91*, 8807–8811.

Schreck, R., Meier, B., Männel, D.N., Dröge, W., and Baeuerle, P.A. (1992). Dithiocarbamates as potent inhibitors of nuclear factor kappa B activation in intact cells. *J. Exp. Med.* *175*, 1181–1194.

- Schroeder, M., Elsner, H.-A., Kim, T.D., and Blasczyk, R. (2004). Eight novel MICB alleles, including a null allele, identified in gastric MALT lymphoma patients. *Tissue Antigens* 64, 276–280.
- Seiler, M., Brabcova, I., Viklicky, O., Hribova, P., Rosenberger, C., Pratschke, J., Lodererova, A., Matz, M., Schönemann, C., Reinke, P., et al. (2007). Heightened expression of the cytotoxicity receptor NKG2D correlates with acute and chronic nephropathy after kidney transplantation. *Am. J. Transplant.* 7, 423–433.
- Selvan, R.S., Kapadia, H.B., and Platt, J.L. (1998). Complement-induced expression of chemokine genes in endothelium: regulation by IL-1-dependent and -independent mechanisms. *J. Immunol.* 161, 4388–4395.
- Sène, D., Levasseur, F., Abel, M., Lambert, M., Camous, X., Hernandez, C., Pène, V., Rosenberg, A.R., Jouvin-Marche, E., Marche, P.N., et al. (2010). Hepatitis C virus (HCV) evades NKG2D-dependent NK cell responses through NS5A-mediated imbalance of inflammatory cytokines. *PLoS Pathog.* 6, e1001184.
- Shafi, S., Vantourout, P., Wallace, G., Antoun, A., Vaughan, R., Stanford, M., and Hayday, A. (2011). An NKG2D-mediated human lymphoid stress surveillance response with high interindividual variation. *Sci Transl Med* 3, 113ra124.
- She, J.X. (1996). Susceptibility to type I diabetes: HLA-DQ and DR revisited. *Immunol. Today* 17, 323–329.
- Shimizu, S., Nomoto, M., Yamamoto, T., and Momose, K. (1994). Reduction by NG-nitro-L-arginine of H₂O₂-induced endothelial cell injury. *Br. J. Pharmacol.* 113, 564–568.
- Shojima, J., Tanaka, G., Keicho, N., Tamiya, G., Ando, S., Oka, A., Inoue, Y., Suzuki, K., Sakatani, M., Okada, M., et al. (2009). Identification of MICA as a susceptibility gene for pulmonary Mycobacterium avium complex infection. *J. Infect. Dis.* 199, 1707–1715.
- Singh, N. (1997). Infections in solid-organ transplant recipients. *Am J Infect Control* 25, 409–417.
- Sliman, S.M., Eubank, T.D., Kotha, S.R., Kuppusamy, M.L., Sherwani, S.I., Butler, E.S.O., Kuppusamy, P., Roy, S., Marsh, C.B., Stern, D.M., et al. (2010). Hyperglycemic oxoaldehyde, glyoxal, causes barrier dysfunction, cytoskeletal alterations, and inhibition of angiogenesis in vascular endothelial cells: aminoguanidine protection. *Mol. Cell. Biochem.* 333, 9–26.
- Smith, J.D., Brunner, V.M., Jigjidsuren, S., Hamour, I.M., McCormack, A.M., Banner, N.R., and Rose, M.L. (2009). Lack of effect of MICA antibodies on graft survival following heart transplantation. *Am. J. Transplant.* 9, 1912–1919.
- Smyth, M.J., Swann, J., Cretney, E., Zerafa, N., Yokoyama, W.M., and Hayakawa, Y. (2005). NKG2D function protects the host from tumor initiation. *J. Exp. Med.* 202, 583–588.
- Solez, K., Colvin, R.B., Racusen, L.C., Sis, B., Halloran, P.F., Birk, P.E., Campbell, P.M., Cascalho, M., Collins, A.B., Demetris, A.J., et al. (2007). Banff ‘05 Meeting Report: differential diagnosis of chronic allograft injury and elimination of chronic allograft nephropathy (‘CAN’). *Am. J. Transplant.* 7, 518–526.
- Sollid, L.M. (2002). Coeliac disease: dissecting a complex inflammatory disorder. *Nat. Rev. Immunol.* 2, 647–655.
- Steinle, A., Li, P., Morris, D.L., Groh, V., Lanier, L.L., Strong, R.K., and Spies, T. (2001). Interactions of human NKG2D with its ligands MICA, MICB, and homologs of the mouse RAE-1 protein family. *Immunogenetics* 53, 279–287.
- Stern-Ginossar, N., Elefant, N., Zimmermann, A., Wolf, D.G., Saleh, N., Biton, M., Horwitz, E., Prokocimer, Z., Prichard, M., Hahn, G., et al. (2007). Host Immune System Gene Targeting by a Viral miRNA. *Science* 317, 376–381.
- Stern-Ginossar, N., Gur, C., Biton, M., Horwitz, E., Elboim, M., Stanitsky, N., Mandelboim, M., and Mandelboim, O. (2008). Human microRNAs regulate stress-induced immune responses mediated by the receptor NKG2D. *Nat. Immunol.* 9, 1065–1073.
- Suárez-Alvarez, B., López-Vázquez, A., Díaz-Molina, B., Bernardo-Rodríguez, M.J., Álvarez-López, R., Pascual, D., Astudillo, A., Martínez-Borra, J., Lambert, J.L., González, S., et al. (2006a). The predictive value of soluble major histocompatibility complex class I chain-related molecule A (MICA) levels on heart allograft

rejection. *Transplantation* 82, 354–361.

Suárez-Alvarez, B., López-Vázquez, A., Díaz-Peña, R., Díaz-Molina, B., Blanco-García, R.M., Alvarez-López, M.R., and López-Larrea, C. (2006b). Post-transplant soluble MICA and MICA antibodies predict subsequent heart graft outcome. *Transpl. Immunol.* 17, 43–46.

Suárez-Alvarez, B., López-Vázquez, A., Gonzalez, M.Z., Fdez-Morera, J.L., Díaz-Molina, B., Blanco-Gelaz, M.A., Pascual, D., Martínez-Borra, J., Muro, M., Alvarez-López, M.R., et al. (2007). The relationship of anti-MICA antibodies and MICA expression with heart allograft rejection. *Am. J. Transplant.* 7, 1842–1848.

Suárez-Alvarez, B., Alonso-Arias, R., Bravo-Mendoza, C., López-Vázquez, A., Ortega, T., Baltar, J.M., Coto, E., Ortega, F., and López-Larrea, C. (2009). Identification of epitopes and immunodominant regions on the MICA protein defined by alloantibodies from kidney transplant patients. *Transplantation* 88, S68–77.

Suemizu, H., Radosavljevic, M., Kimura, M., Sadahiro, S., Yoshimura, S., Bahram, S., and Inoko, H. (2002). A basolateral sorting motif in the MICA cytoplasmic tail. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 99, 2971–2976.

Sumitran-Holgersson, S., Wilczek, H.E., Holgersson, J., and Söderström, K. (2002). Identification of the nonclassical HLA molecules, mica, as targets for humoral immunity associated with irreversible rejection of kidney allografts. *Transplantation* 74, 268–277.

Sun, D., Wang, X., Zhang, H., Deng, L., and Zhang, Y. (2011). MMP9 mediates MICA shedding in human osteosarcomas. *Cell Biol. Int.* 35, 569–574.

Süsal, C., and Opelz, G. (2012). Impact of HLA matching and HLA antibodies in organ transplantation: a collaborative transplant study view. *Methods Mol. Biol.* 882, 267–277.

Tamaki, S., Sanefuzi, N., Ohgi, K., Imai, Y., Kawakami, M., Yamamoto, K., Ishitani, A., Hatake, K., and Kirita, T. (2007). An association between the MICA-A5.1 allele and an increased susceptibility to oral squamous cell carcinoma in Japanese patients. *J. Oral Pathol. Med.* 36, 351–356.

Tamaki, S., Kawakami, M., Yamanaka, Y., Shimomura, H., Imai, Y., Ishida, J., Yamamoto, K., Ishitani, A., Hatake, K., and Kirita, T. (2009). Relationship between soluble MICA and the MICA A5.1 homozygous genotype in patients with oral squamous cell carcinoma. *Clin. Immunol.* 130, 331–337.

Tamaki, S., Kawakami, M., Ishitani, A., Kawashima, W., Kasuda, S., Yamanaka, Y., Shimomura, H., Imai, Y., Nakagawa, Y., Hatake, K., et al. (2010). Soluble MICB serum levels correlate with disease stage and survival rate in patients with oral squamous cell carcinoma. *Anticancer Res.* 30, 4097–4101.

Tang, F., Chen, Z., Ciszewski, C., Setty, M., Solus, J., Tretiakova, M., Ebert, E., Han, J., Lin, A., Guandalini, S., et al. (2009). Cytosolic PLA2 is required for CTL-mediated immunopathology of celiac disease via NKG2D and IL-15. *J. Exp. Med.* 206, 707–719.

Tang, K.-F., Ren, H., Cao, J., Zeng, G.-L., Xie, J., Chen, M., Wang, L., and He, C.-X. (2008). Decreased Dicer expression elicits DNA damage and up-regulation of MICA and MICB. *J. Cell Biol.* 182, 233–239.

Terasaki, P.I., Ozawa, M., and Castro, R. (2007). Four-year follow-up of a prospective trial of HLA and MICA antibodies on kidney graft survival. *Am. J. Transplant.* 7, 408–415.

Thaunat, O. (2012). Humoral immunity in chronic allograft rejection: puzzle pieces come together. *Transpl. Immunol.* 26, 101–106.

Thaunat, O., Field, A.-C., Dai, J., Louedec, L., Patey, N., Bloch, M.-F., Mandet, C., Belair, M.-F., Bruneval, P., Meilhac, O., et al. (2005). Lymphoid neogenesis in chronic rejection: evidence for a local humoral alloimmune response. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 102, 14723–14728.

Thaunat, O., Patey, N., Gautreau, C., Lechaton, S., Fremeaux-Bacchi, V., Dieu-Nosjean, M.-C., Cassuto-Viguier, E., Legendre, C., Delahousse, M., Lang, P., et al. (2008). B cell survival in intragraft tertiary lymphoid organs after rituximab therapy. *Transplantation* 85, 1648–1653.

Thomas, M., Boname, J.M., Field, S., Nejntsev, S., Salio, M., Cerundolo, V., Wills, M., and Lehner, P.J. (2008). Down-regulation of NKG2D and NKp80 ligands by Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus K5 protects against NK cell cytotoxicity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 105, 1656–1661.

- Tian, W., Li, L.-X., Wang, F., Luo, Q.-Z., Yan, M.-Y., Yu, P., Guo, S.-S., and Cao, Y. (2006). MICA-STR, HLA-B haplotypic diversity and linkage disequilibrium in the Hunan Han population of southern China. *Int. J. Immunogenet.* *33*, 241–245.
- Tieng, V., Le Bouguénec, C., du Merle, L., Bertheau, P., Desreumaux, P., Janin, A., Charron, D., and Toubert, A. (2002). Binding of *Escherichia coli* adhesin AfaE to CD55 triggers cell-surface expression of the MHC class I-related molecule MICA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *99*, 2977–2982.
- Tinto, N., Ciacci, C., Calcagno, G., Gennarelli, D., Spampanato, A., Farinaro, E., Tortora, R., and Sacchetti, L. (2008). Increased prevalence of celiac disease without gastrointestinal symptoms in adults MICA 5.1 homozygous subjects from the Campania area. *Dig Liver Dis* *40*, 248–252.
- Del Toro-Arreola, S., Arreygue-Garcia, N., Aguilar-Lemarroy, A., Cid-Arregui, A., Jimenez-Perez, M., Haramati, J., Barros-Núñez, P., Gonzalez-Ramella, O., Del Toro-Arreola, A., Ortiz-Lazareno, P., et al. (2011). MHC class I-related chain A and B ligands are differentially expressed in human cervical cancer cell lines. *Cancer Cell Int.* *11*, 15.
- Triolo, T.M., Baschal, E.E., Armstrong, T.K., Toews, C.S., Fain, P.R., Rewers, M.J., Yu, L., Miao, D., Eisenbarth, G.S., Gottlieb, P.A., et al. (2009). Homozygosity of the polymorphism MICA5.1 identifies extreme risk of progression to overt adrenal insufficiency among 21-hydroxylase antibody-positive patients with type 1 diabetes. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* *94*, 4517–4523.
- Vajdic, C.M., and van Leeuwen, M.T. (2009). Cancer incidence and risk factors after solid organ transplantation. *Int. J. Cancer* *125*, 1747–1754.
- Valdes, A.M., Thomson, G., Graham, J., Zarghami, M., McNeney, B., Kockum, I., Smith, A., Lathrop, M., Steenkiste, A.R., Dorman, J.S., et al. (2005). D6S265*15 marks a DRB1*15, DQB1*0602 haplotype associated with attenuated protection from type 1 diabetes mellitus. *Diabetologia* *48*, 2540–2543.
- Vankayalapati, R., Garg, A., Porgador, A., Griffith, D.E., Klucar, P., Safi, H., Girard, W.M., Cosman, D., Spies, T., and Barnes, P.F. (2005). Role of NK cell-activating receptors and their ligands in the lysis of mononuclear phagocytes infected with an intracellular bacterium. *J. Immunol.* *175*, 4611–4617.
- Venkataraman, G.M., Suci, D., Groh, V., Boss, J.M., and Spies, T. (2007). Promoter region architecture and transcriptional regulation of the genes for the MHC class I-related chain A and B ligands of NKG2D. *J. Immunol.* *178*, 961–969.
- Vivier, E., Tomasello, E., and Paul, P. (2002). Lymphocyte activation via NKG2D: towards a new paradigm in immune recognition? *Curr. Opin. Immunol.* *14*, 306–311.
- Vivier, E., Raulet, D.H., Moretta, A., Caligiuri, M.A., Zitvogel, L., Lanier, L.L., Yokoyama, W.M., and Ugolini, S. (2011). Innate or adaptive immunity? The example of natural killer cells. *Science* *331*, 44–49.
- Waldhauer, I., and Steinle, A. (2006). Proteolytic release of soluble UL16-binding protein 2 from tumor cells. *Cancer Res.* *66*, 2520–2526.
- Waldhauer, I., Goehlsdorf, D., Gieseke, F., Weinschenk, T., Wittenbrink, M., Ludwig, A., Stevanovic, S., Rammensee, H.-G., and Steinle, A. (2008). Tumor-associated MICA is shed by ADAM proteases. *Cancer Res.* *68*, 6368–6376.
- Wang, H., Yang, D., Xu, W., Wang, Y., Ruan, Z., Zhao, T., Han, J., and Wu, Y. (2008). Tumor-derived soluble MICs impair CD3(+)CD56(+) NKT-like cell cytotoxicity in cancer patients. *Immunol. Lett.* *120*, 65–71.
- Weill, L., Belloc, E., Bava, F.-A., and Méndez, R. (2012). Translational control by changes in poly(A) tail length: recycling mRNAs. *Nat. Struct. Mol. Biol.* *19*, 577–585.
- Welte, S.A., Sinzger, C., Lutz, S.Z., Singh-Jasuja, H., Sampaio, K.L., Eknigk, U., Rammensee, H.-G., and Steinle, A. (2003). Selective intracellular retention of virally induced NKG2D ligands by the human cytomegalovirus UL16 glycoprotein. *Eur. J. Immunol.* *33*, 194–203.
- Wen, C., He, X., Ma, H., Hou, N., Wei, C., Song, T., Zhang, Y., Sun, L., Ma, Q., and Zhong, H. (2008). Hepatitis C Virus Infection Downregulates the Ligands of the Activating Receptor NKG2D. *Cellular &*

Molecular Immunology 5, 475–478.

Wesselkamper, S.C., Eppert, B.L., Motz, G.T., Lau, G.W., Hassett, D.J., and Borchers, M.T. (2008). NKG2D is critical for NK cell activation in host defense against *Pseudomonas aeruginosa* respiratory infection. *J. Immunol.* 181, 5481–5489.

Whibley, C., Pharoah, P.D.P., and Hollstein, M. (2009). p53 polymorphisms: cancer implications. *Nat. Rev. Cancer* 9, 95–107.

White, F.A., 3rd, Ishaq, M., Stoner, G.L., and Frisque, R.J. (1992). JC virus DNA is present in many human brain samples from patients without progressive multifocal leukoencephalopathy. *J. Virol.* 66, 5726–5734.

Wiemann, K., Mittrücker, H.-W., Feger, U., Welte, S.A., Yokoyama, W.M., Spies, T., Rammensee, H.-G., and Steinle, A. (2005). Systemic NKG2D down-regulation impairs NK and CD8 T cell responses in vivo. *J. Immunol.* 175, 720–729.

Wilcox, C.S. (2010). Effects of tempol and redox-cycling nitroxides in models of oxidative stress. *Pharmacol. Ther.* 126, 119–145.

Wildeboer, D., Naus, S., Amy Sang, Q.-X., Bartsch, J.W., and Pagenstecher, A. (2006). Metalloproteinase disintegrins ADAM8 and ADAM19 are highly regulated in human primary brain tumors and their expression levels and activities are associated with invasiveness. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 65, 516–527.

Woof, J.M., and Burton, D.R. (2004). Human antibody-Fc receptor interactions illuminated by crystal structures. *Nat. Rev. Immunol.* 4, 89–99.

Worthington, J.E., McEwen, A., McWilliam, L.J., Picton, M.L., and Martin, S. (2007). Association between C4d staining in renal transplant biopsies, production of donor-specific HLA antibodies, and graft outcome. *Transplantation* 83, 398–403.

Wu, X., and Brewer, G. (2012). The regulation of mRNA stability in mammalian cells: 2.0. *Gene* 500, 10–21.

Wu, J., Song, Y., Bakker, A.B., Bauer, S., Spies, T., Lanier, L.L., and Phillips, J.H. (1999). An activating immunoreceptor complex formed by NKG2D and DAP10. *Science* 285, 730–732.

Wu, J., Groh, V., and Spies, T. (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. *J. Immunol.* 169, 1236–1240.

Wynn, T.A. (2008). Cellular and molecular mechanisms of fibrosis. *J. Pathol.* 214, 199–210.

Xu, B., Pizarro, J.C., Holmes, M.A., McBeth, C., Groh, V., Spies, T., and Strong, R.K. (2011). Crystal structure of a gammadelta T-cell receptor specific for the human MHC class I homolog MICA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 108, 2414–2419.

Xu, F., Schillinger, J.A., Sternberg, M.R., Johnson, R.E., Lee, F.K., Nahmias, A.J., and Markowitz, L.E. (2002). Seroprevalence and coinfection with herpes simplex virus type 1 and type 2 in the United States, 1988–1994. *J. Infect. Dis.* 185, 1019–1024.

Yadav, D., Ngolab, J., Lim, R.S.-H., Krishnamurthy, S., and Bui, J.D. (2009). Cutting edge: down-regulation of MHC class I-related chain A on tumor cells by IFN-gamma-induced microRNA. *J. Immunol.* 182, 39–43.

Yamaguchi, K., Chikumi, H., Shimizu, A., Takata, M., Kinoshita, N., Hashimoto, K., Nakamoto, M., Matsunaga, S., Kurai, J., Miyake, N., et al. (2012). Diagnostic and prognostic impact of serum-soluble UL16-binding protein 2 in lung cancer patients. *Cancer Sci.* 103, 1405–1413.

Yamamoto, K., Fujiyama, Y., Andoh, A., Bamba, T., and Okabe, H. (2001). Oxidative stress increases MICA and MICB gene expression in the human colon carcinoma cell line (CaCo-2). *Biochim. Biophys. Acta* 1526, 10–12.

Yamanegi, K., Yamane, J., Kobayashi, K., Kato-Kogoe, N., Ohyama, H., Nakasho, K., Yamada, N., Hata, M., Fukunaga, S., Futani, H., et al. (2012). Valproic acid cooperates with hydralazine to augment the susceptibility of human osteosarcoma cells to Fas- and NK cell-mediated cell death. *Int. J. Oncol.* 41, 83–91.

- Zaunders, J., Dyer, W.B., and Churchill, M. (2011). The Sydney Blood Bank Cohort: implications for viral fitness as a cause of elite control. *Curr Opin HIV AIDS* 6, 151–156.
- Zhang, Q., and Reed, E.F. (2010). Non-MHC antigenic targets of the humoral immune response in transplantation. *Curr. Opin. Immunol.* 22, 682–688.
- Zhang, Y., and Stastny, P. (2006). MICA antigens stimulate T cell proliferation and cell-mediated cytotoxicity. *Hum. Immunol.* 67, 215–222.
- Zhang, A., Sun, Y., Viny, A., Thomas, D., and Askar, M. (2012a). Description of two new MICA alleles: MICA*058 and MICA*002:03. *Tissue Antigens* 79, 144–145.
- Zhang, A., Sun, Y., Thomas, D., Kawczak, P., Zhang, S., and Askar, M. (2012b). Identification of three MICA alleles in the genotype of a patient with chronic lymphocytic leukemia. *Tissue Antigens* 79, 64–67.
- Zhang, C., Zhang, J., Niu, J., Zhang, J., and Tian, Z. (2008a). Interleukin-15 improves cytotoxicity of natural killer cells via up-regulating NKG2D and cytotoxic effector molecule expression as well as STAT1 and ERK1/2 phosphorylation. *Cytokine* 42, 128–136.
- Zhang, C., Zhang, J., Niu, J., Zhou, Z., Zhang, J., and Tian, Z. (2008b). Interleukin-12 improves cytotoxicity of natural killer cells via upregulated expression of NKG2D. *Hum. Immunol.* 69, 490–500.
- Zhang, C., Niu, J., Zhang, J., Wang, Y., Zhou, Z., Zhang, J., and Tian, Z. (2008c). Opposing effects of interferon-alpha and interferon-gamma on the expression of major histocompatibility complex class I chain-related A in tumors. *Cancer Sci.* 99, 1279–1286.
- Zhang, D., Ma, J., Brismar, K., Efendic, S., and Gu, H.F. (2009). A single nucleotide polymorphism alters the sequence of SP1 binding site in the adiponectin promoter region and is associated with diabetic nephropathy among type 1 diabetic patients in the Genetics of Kidneys in Diabetes Study. *Journal of Diabetes and Its Complications* 23, 265–272.
- Zhang, M., Lu, F., Qu, L., He, J., Yuan, X., and Gu, Y. (2011a). Serum major-histocompatibility-complex class I-related chain A antibody detection for the evaluation of graft dysfunction in renal allograft recipients. *Chin. Med. J.* 124, 2127–2131.
- Zhang, Q., Liang, L.W., Gjertson, D.W., Lassman, C., Wilkinson, A.H., Kendrick, E., Pham, P.-T.T., Danovitch, G.M., Gritsch, H.A., and Reed, E.F. (2005). Development of posttransplant antidonor HLA antibodies is associated with acute humoral rejection and early graft dysfunction. *Transplantation* 79, 591–598.
- Zhang, Q., Cecka, J.M., Gjertson, D.W., Ge, P., Rose, M.L., Patel, J.K., Ardehali, A., Kobashigawa, J.A., Fishbein, M.C., and Reed, E.F. (2011b). HLA and MICA: targets of antibody-mediated rejection in heart transplantation. *Transplantation* 91, 1153–1158.
- Zhang, Q., Cecka, J.M., Gjertson, D.W., Ge, P., Rose, M.L., Patel, J.K., Ardehali, A., Kobashigawa, J.A., Fishbein, M.C., and Reed, E.F. (2011c). HLA and MICA: targets of antibody-mediated rejection in heart transplantation. *Transplantation* 91, 1153–1158.
- Zhang, S., Hüe, S., Sène, D., Penforis, A., Bresson-Hadni, S., Kantelip, B., Caillat-Zucman, S., and Vuitton, D.A. (2008d). Expression of major histocompatibility complex class I chain-related molecule A, NKG2D, and transforming growth factor-beta in the liver of humans with alveolar echinococcosis: new actors in the tolerance to parasites? *J. Infect. Dis.* 197, 1341–1349.
- Zhang, Z., Su, T., He, L., Wang, H., Ji, G., Liu, X., Zhang, Y., and Dong, G. (2012c). Identification and functional analysis of ligands for natural killer cell activating receptors in colon carcinoma. *Tohoku J. Exp. Med.* 226, 59–68.
- Zhao, J., Huang, J., Chen, H., Cui, L., and He, W. (2006). Vdelta1 T cell receptor binds specifically to MHC I chain related A: molecular and biochemical evidences. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 339, 232–240.
- Zhao, J., Jiang, Y., Lei, Y., Chen, L.-P., Yi, F.-M., Wang, C.-G., Zou, K.-F., and Xia, B. (2011a). [The relationship between major histocompatibility complex class I chain-related antigens A (MICA)-129 gene polymorphism, soluble MICA level and ulcerative colitis]. *Zhonghua Nei Ke Za Zhi* 50, 311–315.

- Zhao, J., Jiang, Y., Lei, Y., Zou, K., Wang, C., Huang, S., Yi, F., and Xia, B. (2011b). Functional MICA-129 polymorphism and serum levels of soluble MICA are correlated with ulcerative colitis in Chinese patients. *J. Gastroenterol. Hepatol.* *26*, 593–598.
- Zhu, F., Zhao, H., He, Y., Zhang, W., He, J., Xu, X., and Yan, L. (2009). Distribution of MICA diversity in the Chinese Han population by polymerase chain reaction sequence-based typing for exons 2-6. *Tissue Antigens* *73*, 358–363.
- Zou, Y., and Stastny, P. (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.
- Zou, Y., and Stastny, P. (2009). The role of major histocompatibility complex class I chain-related gene A antibodies in organ transplantation. *Curr Opin Organ Transplant* *14*, 414–418.
- Zou, Y., and Stastny, P. (2010). Role of MICA in the immune response to transplants. *Tissue Antigens* *76*, 171–176.
- Zou, Y., and Stastny, P. (2011). Antibodies against major histocompatibility complex class I-related chain A in transplant recipients. *Chin. Med. J.* *124*, 764–770.
- Zou, Y., Mirbaha, F., Lazaro, A., Zhang, Y., Lavingia, B., and Stastny, P. (2002). MICA is a target for complement-dependent cytotoxicity with mouse monoclonal antibodies and human alloantibodies. *Hum. Immunol.* *63*, 30–39.
- Zou, Y., Bresnahan, W., Taylor, R.T., and Stastny, P. (2005). Effect of human cytomegalovirus on expression of MHC class I-related chains A. *J. Immunol.* *174*, 3098–3104.
- Zou, Y., Han, M., Wang, Z., and Stastny, P. (2006a). 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*, 145–151.
- Zou, Y., Heinemann, F.M., Grosse-Wilde, H., Sireci, G., Wang, Z., Lavingia, B., and Stastny, P. (2006b). Detection of anti-MICA antibodies in patients awaiting kidney transplantation, during the post-transplant course, and in eluates from rejected kidney allografts by Luminex flow cytometry. *Hum. Immunol.* *67*, 230–237.
- Zou, Y., Mirbaha, F., and Stastny, P. (2006c). Contact inhibition causes strong downregulation of expression of MICA in human fibroblasts and decreased NK cell killing. *Hum. Immunol.* *67*, 183–187.
- Zou, Y., Stastny, P., Süsal, C., Döhler, B., and Opelz, G. (2007a). Antibodies against MICA antigens and kidney-transplant rejection. *N. Engl. J. Med.* *357*, 1293–1300.
- Zou, Y., Stastny, P., Süsal, C., Döhler, B., and Opelz, G. (2007b). Antibodies against MICA antigens and kidney-transplant rejection. *N. Engl. J. Med.* *357*, 1293–1300.
- Zou, Y., Qin, Z., Silveus, A., Fan, Y., and Stastny, P. (2009a). Polymorphisms of MICA recognized by human alloantibodies. *Immunogenetics* *61*, 91–100.
- Zou, Y., Yang, X., Jiang, X., Wang, H., Hao, Q., Liu, Y., and Yu, P. (2009b). High levels of soluble Major Histocompatibility Complex class I related chain A (MICA) are associated with biliary cast syndrome after liver transplantation. *Transpl. Immunol.* *21*, 210–214.
- Zwirner, N.W., Fernández-Viña, M.A., and Stastny, P. (1998). MICA, a new polymorphic HLA-related antigen, is expressed mainly by keratinocytes, endothelial cells, and monocytes. *Immunogenetics* *47*, 139–148.
- Zwirner, N.W., Dole, K., and Stastny, P. (1999). Differential surface expression of MICA by endothelial cells, fibroblasts, keratinocytes, and monocytes. *Hum. Immunol.* *60*, 323–330.
- Zwirner, N.W., Marcos, C.Y., Mirbaha, F., Zou, Y., and Stastny, P. (2000). Identification of MICA as a new polymorphic alloantigen recognized by antibodies in sera of organ transplant recipients. *Hum. Immunol.* *61*, 917–924.
- Zwirner, N.W., Fuertes, M.B., Girart, M.V., Domaica, C.I., and Rossi, L.E. (2007). Cytokine-driven regulation

of NK cell functions in tumor immunity: role of the MICA-NKG2D system. *Cytokine Growth Factor Rev.* 18, 159–170.

Remerciements

Je remercie le Pr. Gilles Blancho, le Dr. Ignacio Anegon et le Pr. Jean-Paul Souillou pour m'avoir permis d'effectuer ma thèse au sein du laboratoire INSERM UMR 1064.

J'adresse mes remerciements sincères au Dr. Béatrice Charreau pour m'avoir accueillie dans son équipe. Merci de la confiance que vous m'avez accordée et la disponibilité dont vous avez fait preuve tout au long de cette thèse. J'ai énormément appris à vos côtés et vous serai éternellement reconnaissant pour tout ce que vous m'avez apporté.

Je remercie chaleureusement le Pr. Seiamak Bahram et le Pr. Jean-Luc Taupin d'avoir accepté d'évaluer ce travail de thèse en tant que rapporteurs. J'espère sincèrement que vous ne serez pas déçus et que vous retrouverez, au travers de ce manuscrit, tout le plaisir que j'ai eu à réaliser ce travail de recherche.

Je tiens également à remercier le Pr. Sophie Caillat-Zucman et le Pr. Nadine Gervois d'avoir accepté de faire partie de mon jury de thèse en tant qu'examineurs. J'espère me montrer à la hauteur de vos attentes.

Je remercie le Dr. Gervaise Loirand d'avoir bien voulu accepter d'être mon co-directeur de thèse. Ce fut un plaisir de collaborer avec vous au travers du réseau proVasc.

Je remercie également le Pr. Pierre Pacaud et le Dr. Laure-Emmanuelle Benhamou de leur confiance. Cette thèse n'aurait pas pu avoir lieu sans le soutien financier du réseau proVasc et de la Région Pays de la Loire. Merci pour votre soutien.

Je remercie le Dr Katia Gagne qui, avec le Dr. Gervaise Loirand et le Dr. Nadine Gervois ont composé mon comité de thèse. Merci pour vos conseils et votre soutien.

J'adresse mes remerciements sincères au Pr. Anne Cesbron-Gautier pour m'avoir ouvert les portes de son laboratoire. Vous m'avez tout de suite fait confiance et avez cru en ce projet. J'associe à ces remerciements tous les membres du laboratoire HLA de l'EFS ; Caroline, Sylvie, Stéphanie, Marie-Luce... Un grand merci pour votre aide.

Je tiens à remercier le Dr. Céline Bressollette-Bodin pour m'avoir fait connaître le virus BK. Je suis sûr que nous allons écrire une belle histoire ensemble.

J'adresse mes remerciements sincères à Nathalie Gérard. Ton efficacité dans le travail et ton calme à toute épreuve font de toi la collaboratrice idéale. Rien n'aurait pu être fait sans toi. Merci pour tout. Je remercie également tous les membres de l'équipe 7 (devenue 5) ; Christophe, Thibault, Angélique, Pierre-Jean...

Je remercie tous les membres du « dîner de bureau » : Nico P & Valérie, Nico D & Fabie, Laure-Mich et Nahzel Tarket Amouk. Merci pour ces grands moments de gastronomie.

Un grand merci à tous mes complices et amis ; Ségo, Julie Ping, Julie A, Cécile, Caro, Thomas et bien sûr Mathias. Vous faites tous désormais partie de la famille. Je balance un spécial Big-up pour toi, Mathias. Merci pour ton enthousiasme et ton soutien tout au long de ces années. Sache que j'accepte avec plaisir d'être le parrain de votre enfant (encore faudrait-il que vous me le proposiez... Faites vite, je suis très demandé).

Merci à tous mes amis Groisillons. Vous arrivez toujours à me faire décompresser (Mais quel est votre secret ?). Merci à Bapt, Ludo, Rico, Kefranc et tous les affreux de l'Ile de Groix.

Résumé :

Impact du polymorphisme génétique sur l'expression endothéliale de MICA : Rôle de la mutation *MICA A5.1* dans le rejet de greffe & Caractérisation d'un nouvel épissage alternatif de *MICA*

La molécule MICA est une protéine très polymorphe exprimée, dans des conditions physiologiques, par un nombre restreint de types cellulaires, incluant les cellules endothéliales (CE). Bien que la fréquence de l'immunisation anti-MICA et son implication dans le rejet de greffe aient été montrées par plusieurs études cliniques, les conditions de cette allo-immunisation demeurent mal connues. Par ailleurs, le génotypage de MICA n'est pas réalisé en routine et peu d'informations sont disponibles pour détecter un éventuel mismatch entre donneur et receveur avant la greffe ni prédire une allo-immunisation spécifique de MICA.

Par une approche intégrative associant des techniques de biologie moléculaire et cellulaire et utilisant une collection de CE issues de donneurs d'organes, nous apportons la preuve que la mutation *MICA A5.1* modifie fortement l'expression endothéliale de MICA et constitue un facteur de risque pour le développement d'anticorps anti-MICA, post-greffe. MICA est un ligand du récepteur activateur NKG2D porté par les cellules NK et les lymphocytes T CD8⁺ et T $\gamma\delta$, cellules impliquées dans les mécanismes de l'immunité innée. Nous associons l'expression de la mutation *MICA A5.1* par le donneur d'organe à une protection du receveur vis à vis de la réactivation du virus BK post-transplantation. L'analyse de l'expression du gène *MICA* au sein de notre collection de CE nous a permis de mettre en évidence un nouvel épissage alternatif de *MICA*. Nous associons la présence de ces transcrits à une mutation en 5' de l'intron 4 de *MICA*.

En conclusion, ce travail a permis la mise en évidence de l'impact du polymorphisme génétique sur l'expression endothéliale de MICA et l'identification de nouveaux facteurs de risque pour le contrôle de l'allo-immunisation et des complications virales.

Abstract :

Impact of *MICA* gene polymorphisms on endothelial cell expression: Implication of *MICA A5.1* mutation in graft rejection & Identification of new alternative spliced forms of *MICA*

MICA is a highly polymorphic surface protein that is basally expressed by a restricted set of cells including graft's endothelial cells (EC) and constitutes a ligand for the activating NKG2D receptor expressed on NK and CD8⁺T cells. Although specific antibodies (Abs) against MICA associated with kidney allograft rejection, *MICA* genotyping is not routinely undertaken and the molecular basis for anti-MICA allosensitization is unknown. Using an integrated approach including immunogenetic and cellular biology, we show that *MICA A5.1* genetic variant has a strong impact on MICA expression by graft's EC and may be a risk factor to consider in transplant allo-immune humoral responses. In contrast, we provide the first evidence for association between the expression of *MICA A5.1* mutation, carried by transplant donors, and a protection against BK virus replication after kidney transplantation. By investigating *MICA* transcripts in graft ECs, we identified new alternative spliced forms of *MICA* mRNA. We associate these new transcripts to a mutation located in intron 4 of *MICA*. All together, these findings contribute to bring new insights on the role of *MICA* gene polymorphism in transplant immunology and to identify new risk factors.