

UNIVERSITE DE NANTES
FACULTE DE MEDECINE

**Etude de l'expression constitutive et régulée de la
molécule de CMH de classe I non classique MICA par les
cellules endothéliales vasculaires humaines :
conséquences fonctionnelles et mécanismes de contrôle.**

THESE DE DOCTORAT

Ecole Doctorale CHIMIE BIOLOGIE

Discipline : Science de la Vie et de la Santé

Spécialité : Immunologie

présentée

et soutenue publiquement par

CHAUVEAU Annabelle

le 21 janvier 2008, devant le jury ci-dessous

Président :

Pr. BLANCHO Gilles, Professeur des universités, Praticien Hospitalier, INSERM
U643, Nantes

Rapporteurs :

Pr. HENRION Daniel, Directeur de recherche, UMR CNRS 6214, Angers

Pr. HAUET Thierry, Professeur des universités, Praticien Hospitalier, INSERM
ERM 324, Poitiers

Directeur de thèse :

Mme CHARREAU Béatrice, Docteur en Sciences, INSERM, UMR643, Nantes

| | |
|---|-----------|
| LISTE DES FIGURES | 5 |
| LISTE DES TABLEAUX | 6 |
| LISTE DES ABREVIATIONS | 7 |
| AVANT-PROPOS | 9 |
| INTRODUCTION | 10 |
| 1. L'ENDOTHELIUM : STRUCTURE ET FONCTIONS..... | 10 |
| 1.1. Structure de l'endothélium..... | 10 |
| 1.2. Les fonctions de l'endothélium dans des conditions physiologiques..... | 11 |
| 1.3. Les fonctions de l'endothélium activé..... | 12 |
| 1.3.1. Rôle des cellules endothéliales dans l'hémostase et le tonus vasculaire..... | 12 |
| 1.3.2. Rôle des cellules endothéliales dans l'inflammation..... | 12 |
| 1.4. Cellules endothéliales et présentation antigénique..... | 14 |
| 2. ROLES DE L'ENDOTHELIUM EN TRANSPLANTATION..... | 15 |
| 2.1. Implication des cellules endothéliales lors du rejet de greffe..... | 15 |
| 2.2. Importance des molécules du CMH en transplantation d'organes..... | 16 |
| 2.3. Rôle des anticorps anti-HLA et anti-cellules endothéliales..... | 17 |
| 3. LES MOLECULES DE CMH..... | 17 |
| 3.1. Les molécules du CMH de classe I et de classe II classiques..... | 18 |
| 3.2. Les molécules de CMH de classe I non classiques..... | 19 |
| 3.2.1. HLA-E, HLA-F, et HLA-G..... | 19 |
| 3.2.2. EPCR..... | 20 |
| 3.2.3. MICA et MICB..... | 20 |
| 3.2.4. Les autres molécules de CMH de classe I non classiques..... | 21 |
| 4. EXPRESSION ET FONCTIONS DES MOLECULES MICA..... | 21 |
| 4.1. Structure et expression cellulaire de MICA..... | 21 |
| 4.1.1. Le gène MICA..... | 21 |
| 4.1.2. La protéine MICA..... | 22 |
| 4.1.3. La forme soluble de MICA..... | 24 |
| 4.2. Le récepteur NKG2D et son interaction avec MICA..... | 24 |
| 4.3. Les fonctions de MICA..... | 26 |
| 4.3.1. La sélection lymphocytaire T..... | 26 |
| 4.3.2. L'activation cellulaire T..... | 26 |
| 4.3.3. MICA, réponse anti-tumorale et échappement tumoral..... | 27 |
| 4.3.4. MICA et Transplantation..... | 27 |
| 5. OBJECTIF DU PROJET ET STRATEGIE DE RECHERCHE..... | 28 |
| MATERIEL ET METHODES | 30 |
| 1. CULTURE DES CELLULES ENDOTHELIALES HUMAINES..... | 30 |
| 1.1. Isolement des cellules endothéliales humaines..... | 30 |
| 1.2. Caractérisation des cellules endothéliales..... | 31 |
| 1.3. Culture des cellules endothéliales..... | 32 |

| | |
|---|-----------|
| 2. ISOLEMENT ET CULTURE DES AUTRES TYPES CELLULAIRES | 32 |
| 2.1. Les lignées cellulaires | 32 |
| 2.2. Isolement des cellules NK humaines..... | 33 |
| 3. TRAITEMENTS ET ACTIVATION DES CELLULES | 35 |
| 3.1. Activation par les cytokines | 35 |
| 3.2. Modulation de l'expression du récepteur NKG2D | 35 |
| 3.3. Protocole de choc thermique | 36 |
| 4. CYTOMETRIE EN FLUX | 36 |
| 4.1. Principe de la cytométrie en flux..... | 36 |
| 4.2. Protocole d'immunomarquage | 37 |
| 4.3. Analyse des résultats | 39 |
| 5. IMMUNOFLUORESCENCE ET MICROSCOPIE CONFOCALE..... | 39 |
| 5.1. Principe de la microscopie confocale..... | 39 |
| 5.2. Protocole d'immunomarquage pour analyse de la fluorescence par microscopie confocale. | 40 |
| 6. ANALYSE DES PROTEINES PAR LA METHODE DE WESTERN BLOT | 40 |
| 6.1. Principe du Western Blot | 40 |
| 6.2. Préparation des lysats cellulaires..... | 41 |
| 6.3. Protocole de Western Blot..... | 41 |
| 7. TESTS DE CYTOTOXICITE CELLULAIRE | 43 |
| 7.1. Principe du test de cytotoxicité par relargage de chrome radiomarqué..... | 43 |
| 7.2. Protocole du test de cytotoxicité | 44 |
| 8. LA TECHNIQUE ENZYME LINKED IMMUNOSORBENT ASSAY (ELISA) | 45 |
| 9. TESTS DE PROLIFERATION CELLULAIRE..... | 46 |
| 9.1. Etude comparative des facteurs de croissance sur la prolifération des cellules endothéliales..... | 46 |
| 9.2. Analyse du cycle cellulaire par marquage de l'ADN à l'iodure de propidium | 46 |
| 10. ETUDE DES VOIES DE SIGNALISATION..... | 48 |
| 10.1. Etude des voies de signalisation impliquées dans la régulation de MICA | 48 |
| 10.2. Voies de signalisation après interaction des anticorps anti-HLA classe II avec les cellules endothéliales | 48 |
| 11. ANALYSE STATISTIQUE..... | 49 |
| RESULTATS | 50 |
| A - ETUDE DE L'EXPRESSION ET DE LA REGULATION DE MICA PAR LES CELLULES ENDOTHELIALES VASCULAIRES HUMAINES..... | 50 |
| 1. EXPRESSION DE MICA PAR LES CELLULES ENDOTHELIALES HUMAINES | 50 |
| 1.1. Etude comparative par cytométrie en flux..... | 50 |
| 1.2. Etude de la localisation intracellulaire de la protéine MICA dans les cellules endothéliales..... | 56 |
| 1.3. Essai de détection de MICA par la technique de Western Blot..... | 58 |
| 2. MISE EN EVIDENCE DU ROLE FONCTIONNEL DE L'EXPRESSION CONSTITUTIVE MICA PAR LES CELLULES ENDOTHELIALES | 61 |

| | |
|--|------------|
| 2.1. Mise en évidence de l'activité cytotoxique dépendante de NKG2D | 61 |
| 2.2. Effet de MICA sur la modulation de l'expression du récepteur NKG2D | 68 |
| 2.2.1. Influence de la co-culture avec les cellules C1R-MICA | 68 |
| 2.2.2. Influence de la co-culture avec les cellules endothéliales | 69 |
| 3. REGULATION DE L'EXPRESSION DE MICA ET CONSEQUENCES FONCTIONNELLES | 71 |
| 3.1. Régulation de MICA par les cytokines TNF α et l'IFN γ | 71 |
| 3.2. Analyse des conséquences fonctionnelles de la régulation de MICA sur la modulation du récepteur NKG2D et sur l'activation dépendante de NKG2D des cellules NK | 72 |
| 3.3. Mise en évidence de la forme soluble de MICA (sMICA) dans les surnageants de culture de cellules endothéliales | 77 |
| 3.4. Régulation par le choc thermique | 78 |
| 3.5. Régulation de MICA au cours de la prolifération cellulaire | 81 |
| 4. MECANISMES IMPLIQUES DANS LA REGULATION DE MICA PAR LES CELLULES ENDOTHELIALES | 86 |
| 4.1. Importance de la glycosylation des protéines | 86 |
| 4.2. Importance des métalloprotéases matricielles (MMP) | 88 |
| 4.3. Implication des voies de signalisation dans la régulation de MICA | 89 |
| <i>B - CONTRIBUTION A L'ETUDE DE LA SIGNALISATION INTRACELLULAIRE INDUITE PAR LES ANTICORPS ANTI-HLA DE CLASSE II DANS LES CELLULES ENDOTHELIALES VASCULAIRES HUMAINES.</i> | 91 |
| 1. PHOSPHORYLATION DES TYROSINES | 92 |
| 2. ETUDE DES VOIES DE SIGNALISATION | 94 |
| 2.1 Etude de la protéine kinase C | 94 |
| 2.2 Etude de la signalisation par Akt | 97 |
| <i>DISCUSSION.</i> | 99 |
| 1. EXPRESSION ENDOTHELIALE DE MICA | 99 |
| 2. REGULATION DE MICA PAR LES CELLULES ENDOTHELIALES : EFFECTEURS ET MECANISMES | 102 |
| 3. IMPORTANCE DES FORMES SOLUBLES DE MICA ET AUTRES MOLECULES DU HLA NON CLASSIQUE POUR LE SUIVI DES PATIENTS TRANSPLANTES. | 105 |
| 4. SIGNALISATION INTRACELLULAIRE INDUITE PAR LES ANTICORPS ANTI-HLA-DR DANS LES CELLULES ENDOTHELIALES. | 107 |
| <i>CONCLUSION ET PERSPECTIVES.</i> | 110 |
| <i>ANNEXE 1</i> | 111 |
| <i>ANNEXE 2</i> | 147 |
| <i>BIBLIOGRAPHIE</i> | 159 |

Liste des figures

| | |
|--|-----|
| Figure 1 : Coupe schématique d'un vaisseau sanguin. | 10 |
| Figure 2 : Etapes de la cascade d'adhérence des leucocytes à l'endothélium. | 14 |
| Figure 3 : Localisation et organisation du HLA sur le chromosome 6. | 18 |
| Figure 4 : Structure des molécules de CMH de classe classiques. | 19 |
| Figure 5 : Structure des domaines $\alpha 1$ et $\alpha 2$ de MICA. | 23 |
| Figure 6 : Disparité des ligands du récepteur NKG2D chez l'homme et la souris. | 25 |
| Figure 7 : Isolement et culture de cellules endothéliales (HAEC) au moyen de billes anti-CD31. | 31 |
| Figure 8 : Caractérisation des cellules endothéliales après isolement. | 31 |
| Figure 9 : Analyse par cytométrie en flux du pourcentage de cellules NK (CD3-/CD16+/CD56+) dans les populations cellulaires avant et après la sélection. | 35 |
| Figure 10 : Schéma explicatif du cycle cellulaire. | 47 |
| Figure 11 : Analyse de l'expression de MICA à l'aide de plusieurs anticorps. | 54 |
| Figure 12 : Analyse comparative de l'expression constitutive de MICA par différentes cellules. | 54 |
| Figure 13 : Analyse de l'expression constitutive de MICA et de HLA de classe I par les HAEC et HUVEC. | 55 |
| Figure 14 : Analyse comparative de l'expression de MICA par différentes HAEC. | 55 |
| Figure 15 : Analyse comparative de l'expression de MICA et de MICB. | 55 |
| Figure 16 : Expression intracellulaire de MICA dans les cellules endothéliales humaines. | 57 |
| Figure 17 : Détection de la protéine recombinante MICA-Fc par différents anticorps anti-MICA. | 60 |
| Figure 18 : Expression comparée de MICA dans les cellules endothéliales et épithéliales. | 60 |
| Figure 19 : Mise en évidence par microscopie confocale de l'interaction de MICA et de son récepteur NKG2D à la surface des cellules endothéliales. | 60 |
| Figure 20 : Tests de cytotoxicité. | 65 |
| Figure 21 : Effet de l'anticorps anti-NKG2D sur la lyse des C1R-MICA et des HAEC. | 65 |
| Figure 22 : Effet du blocage des récepteurs NKG2. | 66 |
| Figure 23 : Effet de l'anticorps anti-MICA sur la lyse des C1R-MICA et des HAEC. | 67 |
| Figure 24 : Phénotype des cellules NKL | 70 |
| Figure 25 : Expression des récepteurs NKG2D et de CD94 après co-culture. | 70 |
| Figure 26 : Régulation de l'expression de MICA et HLA classe I par les cytokines $TNF\alpha$ et $IFN\gamma$. | 74 |
| Figure 27 : Expression de NKG2D et de CD94 après co-culture avec des HAEC activées ou non par de l' $IFN\gamma$. | 74 |
| Figure 28 : Analyse de l'activité cytolytique des cellules NKL après modulation de l'expression du récepteur NKG2D. | 75 |
| Figure 29 : Mise en évidence de la forme soluble de MICA. | 76 |
| Figure 30 : Expression des récepteurs NKG2D et CD94 après co-culture avec des surnageants de culture de cellules endothéliales activées ou non. | 76 |
| Figure 31 : Analyse de MICA sur des cellules endothéliales ayant subi un choc thermique. | 80 |
| Figure 32 : Effet de la densité cellulaire sur l'expression de MICA et HLA classe I. | 82 |
| Figure 33 : Influence de la densité cellulaire des cellules endothéliales sur la lyse par les NK. | 82 |
| Figure 34 : Effet du FGF-2 sur les cellules endothéliales. | 85 |
| Figure 35 : Effet du VEGF sur les cellules endothéliales. | 85 |
| Figure 36 : Effet de la glycosylation sur l'expression de la protéine MICA. | 87 |
| Figure 37 : Effet des métalloprotéases sur l'expression de la protéine MICA. | 87 |
| Figure 38 : Implication des voies de signalisation sur l'expression de la protéine MICA. | 90 |
| Figure 39 : Etude de la phosphorylation des tyrosines après traitement par l'anticorps anti-HLA-DR. | 93 |
| Figure 40 : Etude de la phosphorylation de PKC par les cellules endothéliales après traitement par l'anticorps anti-HLA-DR. | 96 |
| Figure 41 : Etude de la protéine kinase C (PKC) α/β II après traitement avec l'anticorps anti-HLA-DR. | 96 |
| Figure 42 : Etude de la phosphorylation d'Akt après traitement avec l'anticorps anti-HLA-DR. | 98 |
| Figure 43 : Réponse immunitaire induite par MICA dans un contexte de transplantation allogénique | 102 |
| Figure 44 : Sites de fixation potentiels pour le facteur de transcription $NF\kappa B$ dans les séquences des gènes codant pour les ligands de NKG2D. | 104 |

Liste des tableaux

| | |
|--|-----------|
| Tableau 1 : Caractéristiques des fluorochromes utilisés pour la cytométrie en flux. | 37 |
| Tableau 2 : Liste des anticorps utilisés pour la cytométrie en flux. | 38 |
| Tableau 3 : Anticorps primaires utilisés pour le Western Blot. | 42 |

Liste des abréviations

| | |
|---|---|
| ADN : Acide Désoxyribonucléique | MAP Kinase : Mitogen-Activated Phospho kinase |
| ADNc : Acide Désoxyribonucléique complémentaire | MCP-1 : Monocyte Chemoattractant Protein - 1 |
| APC : Allophycocyanine | MICA, B, C, D ou E : MHC class I chain related A, B, C, D ou E |
| APS : Ammonium PerSulfate | MILL : MHC class I like located near the leukocyte complex |
| ARN : Acide RiboNucléique | MMP : métalloprotéases |
| BSA : Bovine Serum Albumine | MULT1 : mouse UL-Binding Protein like Transcript 1 |
| CMH : Complexe Majeur d'Histocompatibilité | NK : Natural Killer |
| CMV : Cytomégalovirus | NKG2A, C ou D : Natural Killer Group 2 – A, C ou D |
| CPA : cellule présentatrice d'antigène | NKL : lignée de Natural Killer |
| cpm : coups par minute | NO : monoxyde d'azote |
| DMEM : Dulbecco's Modified Eagle's Medium | NOS : NO Synthase |
| DTT : DiThioTreitol | PAF : Platelet Activating Factor |
| ECBM : Endothelial Cell Basal Medium | PBS : Phosphate Buffer Saline |
| EDCF : Endothelial-derived contracting factor | PBMC : Peripheral Blood Mononuclear Cell |
| EDRF : Endothelial-derived relaxing factor | PDTC : pyrrolidine dithiocarbamate |
| EDTA : acide éthylène-diamine-tétraacétique | PE : Phycocerythrine |
| EGF : Epidermal Growth Factor | PECAM-1 : Platelet Endothelial Cell Adhesion Molecule-1 |
| ELISA : Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay | PFA : Paraformaldéhyde |
| EPCR : Endothelial Cell Protein C Receptor | PGI ₂ : Prostaglandine I ₂ ou prostacycline |
| FGF-2 : basic Fibroblast Growth Factor | PHA : phytohemaglutinine |
| FITC: Fluoresceine IsoThioCyanate | PKC : Protéine Kinase C |
| FT : Facteur Tissulaire | PI3Kinase : Phosphatidylinositol 3 Kinase |
| GAPDH : Glycéraldéhyde-3-Phosphate Deshydrogénase | PS : Pénicilline-Streptomycine |
| HAEC : Human Arterial Endothelial Cell | PSGL-1 : P-selectin glycoprotein ligand-1 |
| HFE : Hémochromatose | RAE : Retinoic Acid Early |
| HLA : Human Leukocyte Antigen | RAET1 : Retinoic Acid Early Transcript-1 |
| HRP : Horse-radish-péroxydase | SDS : Sodium Dodécyl Sulfate |
| HSE : Heat Shock Element | sMICA : MICA soluble |
| Hsp : Heat Shock Protein | SVF : Serum de veau foetal |
| HUVEC : Human Umbilical Vein Endothelial Cell | TBS : Tris Buffer Saline |
| ICAM-1 : Intercellular Adhesion Molecule - 1 | TCR : Récepteur des cellules T |
| IFN : Interféron | TNF α : Tumor Necrosis Factor α |
| Ig : Immunoglobuline | tPA : activateur tissulaire du plasminogène |
| IL : Interleukine | ULBP : UL16 Binding Protein |
| ILT : Ig Like Transcrit | VCAM-1 : Vascular Cell Adhesion Molecule - 1 |
| IP : iodure de propidium | VEGF : Vascular Endothelial Growth Factor |
| IP-10 : interferon-inducible protein 10 | VLA-4 : Very Late Antigen-4 |
| LFA-1 : Lymphocyte function-associated antigen-1 | vWF : facteur de Von Willebrand |
| KIR : Killer cell Inhibitory Receptor | ZAG : Zinc α 2-glycoprotein |

Avant-propos

La transplantation d'organes est une thérapie efficace pour pallier la défaillance d'un organe. Aujourd'hui, de nombreux organes défectueux sont ainsi remplacés par des organes fonctionnels : le cœur, le poumon, le foie, le rein, le pancréas et l'intestin. La transplantation est également utilisée pour le remplacement de tissus (peau, cornée), mais aussi de membres plus complexes (greffes de mains en 2000, greffe de visage en 2006). Les progrès réalisés depuis les années 1950, d'un point de vue des connaissances mais aussi des techniques, permettent d'effectuer des transplantations qui sont tolérées de plus en plus longtemps. Cependant, de plus en plus de personnes attendent une transplantation d'organe. En 2006, 7276 personnes étaient inscrites sur la liste d'attente d'un organe. Seules 4428 personnes ont pu bénéficier d'une greffe cette même année dont 62% étaient des greffes rénales. La pénurie de greffons est un facteur limitant de la transplantation. Pour pallier ce manque, plusieurs stratégies sont envisagées, comme la transplantation d'organes animaux, la xénotransplantation. Prolonger la survie des greffons est aussi essentielle pour réduire cette pénurie en limitant les retransplantations. Pour cette raison, il est important de comprendre les mécanismes de la tolérance immune afin d'éviter le rejet du greffon et d'induire la tolérance en modulant la réponse immune du receveur. Actuellement, des traitements immunosuppresseurs sont utilisés pour éviter les rejets aigus cellulaires à court terme. Cependant, ces traitements n'empêchent pas la perte de fonction et le rejet du greffon à long terme et présentent des effets secondaires non négligeables. Par conséquent, une stratégie complémentaire vise à prolonger la survie des greffes en prévenant la dysfonction chronique du greffon (ou rejet chronique), principale cause de perte de greffe au delà de la première année post-greffe dont les causes ne sont encore pas définies. Un meilleur contrôle des réponses immunes humorale et cellulaire et une protection renforcée de l'endothélium du greffon sont actuellement des axes de recherche prioritaires en transplantation. Dans le contexte d'une transplantation d'organes vascularisés, l'endothélium du greffon constitue une interface cellulaire entre l'organe greffé et le système immunitaire du receveur. L'endothélium joue un rôle central dans les mécanismes de rejet du greffon. C'est pourquoi la connaissance des mécanismes impliqués dans l'activation et la dysfonction des cellules endothéliales est essentielle pour prévenir le rejet de greffe et identifier de nouvelles cibles thérapeutiques.

Introduction

1. L'endothélium : structure et fonctions

1.1. Structure de l'endothélium

L'endothélium forme une monocouche de cellules endothéliales. Chez l'adulte, l'endothélium est composé de 1 à $6 \cdot 10^{13}$ cellules, couvrant ainsi une surface de 1 à 7 m² (Cines et al., 1998). Présent au niveau de la paroi interne des vaisseaux, il se situe à l'interface entre le sang et les tissus. Les cellules endothéliales forment des jonctions entre elles mais aussi avec les cellules circulantes dans le sang. Dans un contexte physiologique, l'endothélium forme une barrière, empêchant les cellules du sang de pénétrer dans les tissus. Il maintient la fluidité sanguine. De par sa position, l'endothélium reçoit également de nombreux stimuli qui lui permettent de jouer un rôle au sein de nombreux mécanismes. Ainsi, il intervient dans la régulation du tonus vasculaire, la coagulation, la fibrinolyse, la croissance et la différenciation cellulaire, les réponses immunitaires et inflammatoires (Gerritsen and Bloor, 1993).

La paroi des vaisseaux sanguins est constituée de 3 parties : l'adventia, la media et l'intima. L'intima, paroi la plus interne du vaisseau, se compose d'une monocouche de cellules endothéliales reposant sur une fine couche de matrice extracellulaire et de cellules musculaires lisses. La média est constituée de couches de cellules du muscle lisse ancrées dans une matrice extracellulaire riche en collagène et élastine. La partie la plus externe est l'adventice, composée de myofibroblastes, de quelques leucocytes et d'une matrice extracellulaire (Figure 1).

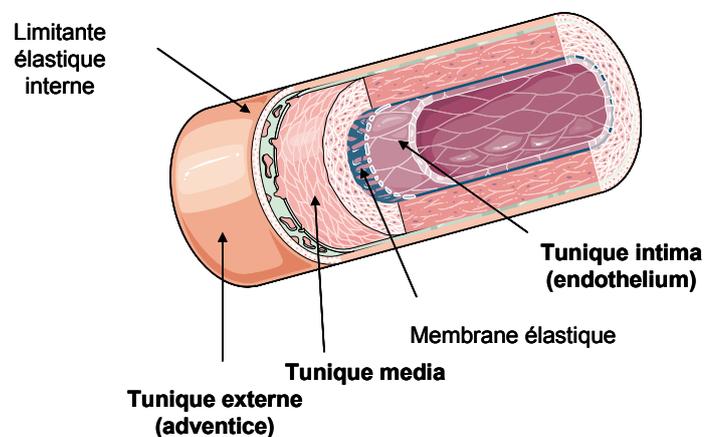


Figure 1 : Coupe schématique d'un vaisseau sanguin.

1.2. Les fonctions de l'endothélium dans des conditions physiologiques

De par sa localisation entre le sang et les tissus environnants, l'endothélium forme une barrière physique. Il empêche les divers éléments du sang de pénétrer dans les tissus. Cette position lui permet également de réguler le flux sanguin, d'inhiber l'adhésion des plaquettes ainsi que la formation de caillot sanguin grâce à ses propriétés anti-thrombotiques. L'endothélium contrôle le trafic des constituants cellulaires et plasmatiques à travers les vaisseaux (Ballermann, 1998; Cines et al., 1998).

Ainsi, l'endothélium joue un rôle dans la régulation de la coagulation et de la fibrinolyse ainsi que dans la régulation de la pression sanguine. La fluidité du sang est maintenue par différents mécanismes qui inhibent la coagulation. Pour cela, les cellules endothéliales sécrètent de nombreux médiateurs comme le monoxyde d'azote (NO) et les prostaglandines (PGI₂) qui permettent l'inhibition de l'agrégation des plaquettes. L'endothélium exprime aussi des héparanes sulfates et de la thrombomoduline. Les héparanes sulfates fixent l'anti-thrombine III afin de former un complexe anti-coagulant. La thrombomoduline forme un complexe en fixant la thrombine. Ce complexe lie la protéine C et l'active. La protéine C s'active également en se liant au récepteur endothélial de la protéine C (EPCR). Une fois activée la protéine C se lie à la protéine S. Ce complexe inactive des facteurs (facteurs Va et VIIIa) impliqués dans la cascade de coagulation (Esmon, 2000). L'activateur tissulaire du plasminogène (tPA), sécrété par l'endothélium, va permettre de transformer le plasminogène en plasmine. La plasmine inhibe alors la formation de fibrine, ce qui évite aussi la formation d'agrégat.

Les cellules endothéliales sécrètent de façon constitutive du NO. Ce médiateur intervient dans la régulation de la coagulation mais est aussi un vasodilatateur. Le NO est élaboré par les cellules endothéliales grâce aux NO synthases. Il existe deux isoformes de NO synthase : eNOS, forme constitutive dont l'expression est augmentée suite à des stress de cisaillement et iNOS, forme inductible. Le NO maintient le tonus vasculaire en relaxant les cellules du muscle lisse vasculaire, inhibe l'adhésion et l'agrégation des plaquettes, inhibe l'adhésion des leucocytes à l'endothélium, la prolifération et la migration des cellules du muscle lisse.

1.3. Les fonctions de l'endothélium activé

L'altération des propriétés de l'endothélium est impliquée dans de nombreux processus pathologiques comme l'athérosclérose (Horrevoets et al., 1999), l'angiogénèse associée à la progression tumorale et au développement de métastases (Zucker et al., 1998), les pathologies inflammatoires dont le choc septique (Bannerman and Goldblum, 2003) et le rejet d'allo et de xénogreffe (Robson et al., 1995).

1.3.1. Rôle des cellules endothéliales dans l'hémostase et le tonus vasculaire

Lors de perturbations au niveau de l'endothélium (inflammation, stress, etc.), les cellules endothéliales se modifient et créent un environnement pro-thrombotique et anti-fibrinolytique suite, entre autres, aux modulations d'expression des molécules vasodilatatrices et vasoconstrictrices. Ainsi, des médiateurs comme les PGI₂, l'endothéline, l'EDRF (endothelial-derived relaxing factor), l'EDCF (endothelial-derived contracting factor) ou les facteurs activant les plaquettes (PAF) vont intervenir précocement dans les phénomènes de vasodilatations et vasoconstrictions de l'endothélium. L'endothéline est produite par l'endothélium suite à une stimulation par stress hypoxique, stress de cisaillement ou ischémie. Ce vasodilatateur permet d'augmenter le tonus des cellules du muscle lisse. Le PAF est exprimé à la surface de l'endothélium et intervient dans le trafic des leucocytes. Le PGI₂ est sécrété et agit en retardant l'agrégation et le dépôt des plaquettes. Lorsque l'endothélium est altéré, les propriétés pro-thrombotiques qu'il acquiert permettent d'arrêter une hémorragie.

1.3.2. Rôle des cellules endothéliales dans l'inflammation

Une réponse inflammatoire comprend plusieurs étapes. Les vaisseaux sanguins vont subir une vasodilatation permettant d'augmenter le débit sanguin et les leucocytes vont migrer vers le site de l'inflammation afin de lutter contre l'agression. Au cours de cette réponse, l'endothélium subit des modifications transcriptionnelles, traductionnelles, phénotypiques et fonctionnelles. D'un état dit "au repos", il se transforme en endothélium dit "activé". Ce phénomène correspond à l'"activation endothéliale". L'activation, telle que définie dans les années 1990 par Jordan Pober, se divise en deux phases : une phase précoce dite de type I et une phase plus tardive dite de type II (Pober and Cotran, 1990a). L'endothélium a un rôle dans le trafic leucocytaire, en permettant l'adhésion des leucocytes à sa surface puis à la migration à travers ces cellules, ce phénomène est appelé diapédèse leucocytaire (Gerritsen and Bloor, 1993).

La première phase dite réponse endothéliale aigüe ou activation de type I est induite dans les 15-30 minutes après la stimulation. Au cours de cette réponse, les cellules endothéliales modifient leur morphologie et perdent leur fonction de barrière. Elles se rétractent et exposent à leur surface des molécules sous-endothéliales comme le facteur tissulaire (FT) et le facteur de Von Willebrand (vWF). Ces molécules entraînent le passage du phénotype anti-coagulant au phénotype pro-coagulant. Le FT permet la fixation du facteur plasmatique VII, ce qui active la cascade de coagulation. Le vWF, stocké dans les corps de Weibel Palade des cellules endothéliales, participe au recrutement des plaquettes sanguines (McEver et al., 1989). L'activation plaquettaire est renforcée par la perte des héparanes sulfates, de la thrombomoduline et par la production de thrombine. Des protéines ou molécules préformées sont exprimées par les cellules endothéliales. Ainsi, la sécrétion de PAF va permettre l'attraction de neutrophiles et leur activation, l'expression de molécules d'adhésion comme la P-sélectine permet l'adhésion des leucocytes à la surface de l'endothélium (McEver et al., 1989).

La deuxième phase de la réponse inflammatoire dite réponse complexe à long terme ou activation de type II nécessite la synthèse de nouvelles molécules. Au cours de cette phase, de nouvelles molécules d'adhérence vont être synthétisées et exprimées à la surface de l'endothélium telles que E-sélectine (Bevilacqua et al., 1989), VCAM-1 (vascular cell adhesion molecule) ou ICAM-1 (intercellular adhesion molecule). L'expression de ces molécules va permettre aux leucocytes, circulants dans le sang, d'interagir avec l'endothélium et favoriser le phénomène d'extravasation et de migration des leucocytes vers le site inflammé. Les leucocytes activés expriment à leur surface les ligands de ces molécules, ils seront capturés par l'endothélium grâce aux interactions mises en place par ces molécules. Ces interactions ralentissent le mouvement des lymphocytes à proximité des cellules endothéliales et favorisent leur roulement à la surface de l'endothélium. Ainsi, les cellules endothéliales expriment les molécules P-sélectine et E-sélectine qui interagissent avec PSGL-1 présent à la surface des lymphocytes ; CD34 interagit avec la L-sélectine ; ICAM-1 avec LFA-1 ; VCAM-1 avec les intégrines $\alpha 4$ (VLA-4) (McEver, 2002; Vestweber, 2003). Ces mouvements des lymphocytes peuvent également être amplifiés par des interactions entre eux. Une fois au contact des cellules endothéliales, les leucocytes peuvent recevoir les informations fournies par l'endothélium sous forme de facteurs solubles ou de molécules transmembranaires. S'ils possèdent les récepteurs adéquats, l'adhésion sera renforcée jusqu'à l'arrêt total des leucocytes. Pour que les lymphocytes puissent traverser l'endothélium, un

réarrangement de l'actine du cytosquelette des lymphocytes est nécessaire. La migration des lymphocytes entre les cellules endothéliales est le phénomène de diapédèse (Gopalan et al., 2000; Mamdouh et al., 2003).

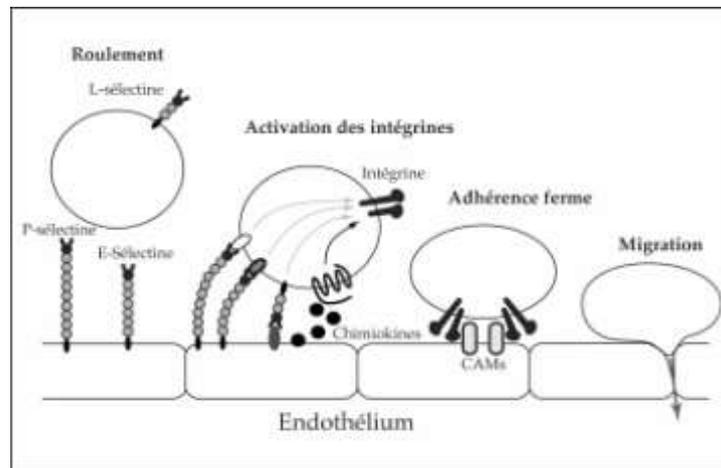


Figure 2 : Etapes de la cascade d'adhérence des leucocytes à l'endothélium.

Les cellules endothéliales activées sécrètent aussi des chimiokines dont l'Interleukine-8 (IL-8), MCP-1 (monocyte chemoattractant protein-1), IP-10 (interferon-inducible protein-10), Rantes.

1.4. Cellules endothéliales et présentation antigénique

Dans des conditions physiologiques, l'endothélium exprime à sa surface des molécules du Complexe Majeur d'Histocompatibilité (CMH) de classe I et de classe II. L'expression de ces molécules est augmentée lors de l'activation de l'endothélium par les cytokines et en particulier par l'IFN γ . Elle varie également en fonction de la localisation tissulaire des cellules endothéliales et du type de vaisseau considéré (Choi et al., 2004). L'expression des molécules du CMH procure aux cellules endothéliales un rôle de cellules présentatrices d'antigènes (CPA) aux lymphocytes T. Cependant, les cellules endothéliales n'expriment pas les molécules majeures de costimulation B7-1 et B7-2 nécessaires pour fournir le signal 2 aux lymphocytes T, elles sont donc considérées comme des CPA semi professionnelles. Lors d'une infection, les molécules de CMH présentent des peptides dérivés des pathogènes. Les lymphocytes T mémoires circulants les reconnaissent et peuvent initier une réponse immunitaire secondaire (Choi et al., 2004). Les cellules T CD8⁺ mémoires sont activées par les cellules endothéliales grâce aux molécules de CMH de classe I exprimées de façon

constitutive à leur surface, et peuvent ainsi proliférer et produire des cytokines (IL2 et IFN γ). Cependant cette activation demeure limitée et confère aux cellules TCD8⁺ un pouvoir cytotoxique restreint comparé à l'activation induite par des cellules B issues du même donneur. Les cellules endothéliales n'activent pas les CD8⁺ naïves. L'IFN γ permet *in vitro* d'induire l'expression des molécules de CMH de classe II, ce qui permet d'induire l'activation des cellules T CD4⁺ (Epperson and Pober, 1994).

2. Rôles de l'endothélium en Transplantation

2.1. Implication des cellules endothéliales lors du rejet de greffe.

Au cours d'une transplantation d'organe vascularisé, les cellules endothéliales sont les premières cellules que rencontrent les cellules effectrices du receveur. Elles agissent de plusieurs manières. Elles stimulent le système immunitaire du receveur en présentant des alloantigènes aux lymphocytes, donc participent à l'initiation du rejet de greffe. Elles répondent aux stimuli de l'hôte (réponse aux cytokines inflammatoires par exemple), ce qui contribue à la perte du greffon par thrombose et mécanismes inflammatoires. Les cellules endothéliales sont les premières cibles cellulaires de la réponse immune du receveur vis à vis de l'organe transplanté (Cines et al., 1998).

Au cours du rejet hyperaigu, des anticorps pré-existants (anti-ABO ou anti-HLA) chez le receveur se fixent sur l'endothélium, déclenchant ainsi l'activation du complément. La cascade du complément peut aboutir à la lyse des cellules par la formation du complexe d'attaque membranaire (C5b9) mais conduit aussi à l'activation des plaquettes, l'accumulation des polynucléaires neutrophiles et à l'altération de l'endothélium. Les lésions de l'endothélium favorisent le développement de thrombose et la perte de la fonction du greffon. Ce rejet est rare car il peut être évité par la sélection du receveur en fonction des antigènes de groupe sanguin ABO, les techniques de *crossmatch* lymphocytaires (B et T) permettant la détection d'anticorps préformés dirigés contre le HLA du donneur.

Le rejet cellulaire aigu se caractérise par un infiltrat cellulaire dans le greffon, notamment des lymphocytes T. Les cellules endothéliales activées par l'inflammation permettent le recrutement et la migration des lymphocytes dans le greffon. Elles permettent également de présenter les antigènes aux lymphocytes via les molécules de CMH de classe I et de classe II. Ceci permet d'activer les lymphocytes T mémoires circulants (Choi et al., 2004).

Le rejet chronique, ou plus précisément la dysfonction chronique du greffon, constitue actuellement l'obstacle majeur à la survie à long terme du greffon en allotransplantation. Le rejet chronique résulte de l'occlusion progressive des artères et artérioles qui aboutit à l'ischémie et à la perte de fonction du greffon. La perte à long terme du greffon survient dans un contexte où la survie globale du greffon n'a cessé d'augmenter pour atteindre, pour une greffe rénale, 90,4% de survie du greffon à 1 an, 79,8% à cinq ans et 64% à 10 ans (Bilan 2005 de l'Agence de la Biomédecine). Cependant le taux de survie d'une allogreffe (coeur ou rein) décroît invariablement, à partir de la première année, de 5% chaque année. La dysfonction chronique du greffon est caractérisée par une atteinte vasculaire, une fibrose interstitielle aboutissant à la perte progressive de la greffe. Les lésions anatomo-pathologiques observées qui la définissent sont la sclérose des artérioles du greffon et la fibrose interstitielle qui peuvent être la résultante de plusieurs mécanismes. De plus, pour chaque organe, il existe des atteintes spécifiques telles que l'atteinte glomérulaire au niveau rénal. Les mécanismes du rejet chronique sont complexes et encore mal connus. Les facteurs de risque associés au rejet chronique comprennent à la fois des facteurs immunologiques et non-immunologiques (pour revues, voir (Libby and Pober, 2001; Waaga et al., 2000). Les lésions vasculaires associées à la dysfonction chronique du greffon s'apparentent à l'artériosclérose. L'artériosclérose est caractérisée à un stade précoce par une altération de la fonction des cellules endothéliales du greffon. Ces altérations conduisent à une modification de la réactivité et de la perméabilité de l'endothélium par l'expression de molécules d'adhésion pour les plaquettes, les macrophages et les lymphocytes qui viennent infiltrer la paroi vasculaire. L'acquisition d'un statut procoagulant et la production de cytokines, de molécules vasoactives et de facteurs de croissance préparent, si cette réponse n'est pas freinée, à la migration de cellules musculaires lisses de la média vers l'intima et à leur prolifération, ainsi qu'à un remodelage de la paroi artérielle dont l'évolution se fait vers l'obstruction vasculaire.

2.2. Importance des molécules du CMH en transplantation d'organes

Par leur fonction dans la présentation antigénique via les molécules de CMH de classe I et de classe II du donneur, les cellules endothéliales peuvent être reconnues par les lymphocytes T alloréactifs du receveur. Les cellules endothéliales du greffon peuvent donc à la fois participer à l'initiation du rejet et être la cible de l'activation T allospécifique (Choi et al., 2004). De plus, des études ont montré que les molécules de CMH de classe I sont impliquées dans la transduction du signal des lymphocytes T mais aussi dans la prolifération des cellules du muscle lisse (Bian et al., 1998), phénomène impliqué dans l'artériosclérose du

greffon. La signalisation intracellulaire via les antigènes du CMH de classe II (HLA-DR, DP et DQ chez l'homme), bien définie dans les lymphocytes B, n'est à ce jour pas connue dans les cellules endothéliales.

2.3. Rôle des anticorps anti-HLA et anti-cellules endothéliales

De nombreuses études ont montré la corrélation entre la présence d'anticorps anti-HLA post-greffe et le rejet chronique (Costa et al., 1997; Reed et al., 1996) ainsi qu'une corrélation entre la présence d'anticorps anti-cellules endothéliales et le rejet chronique en transplantation rénale (Ball et al., 2000). Les anticorps anti-HLA peuvent agir en créant des lésions de l'endothélium du greffon par l'activation du complément et de la coagulation. Ils sont aussi capables d'induire l'activation des CE et la transduction du signal dans les cellules endothéliales en augmentant la prolifération des cellules endothéliales (Bian and Reed, 1999; Smith et al., 2000).

3. Les molécules de CMH

Le Complexe Majeur d'Histocompatibilité (CMH) est un ensemble de molécules qui a un rôle dans la réponse immune, dans la reconnaissance du soi et du non-soi. Chez l'homme, le CMH ou Human Leukocyte Antigen (HLA) est localisé sur le bras court du chromosome 6 (bande 6p21.3). Il comprend trois grandes régions de gènes : les gènes codant pour le CMH de classe I classiques (HLA-A, -B, -C) et de classe I non classiques (HLA-E, -F, -G, MIC, etc.), les gènes codant pour le CMH de classe II classiques (HLA-DR, -DP, -DQ) et les gènes codant pour le CMH de classe III (codant pour des facteurs du complément, molécules du choc thermique, etc.).

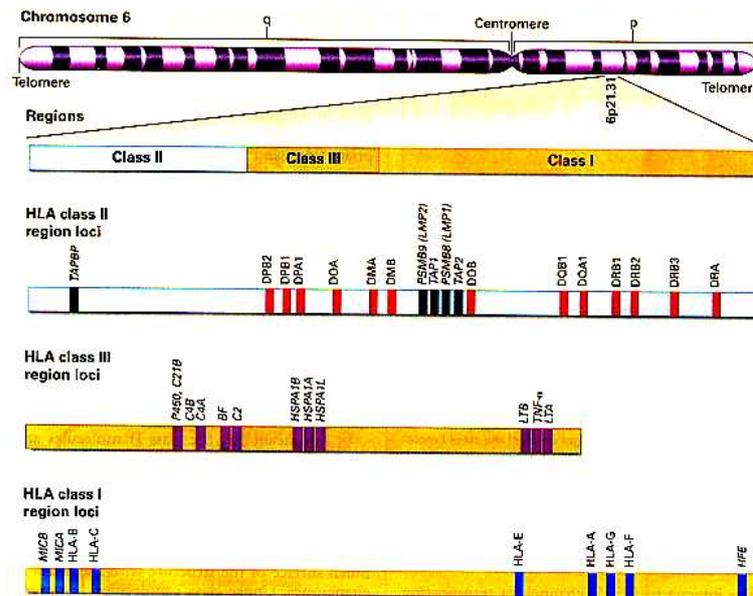


Figure 3 : Localisation et organisation du HLA sur le chromosome 6.

3.1. Les molécules du CMH de classe I et de classe II classiques

La famille des gènes du CMH de classe I classiques ou Ia comprend les molécules HLA-A, HLA-B et HLA-C. Les molécules de CMH de classe I classiques sont très polymorphiques. Ce sont des glycoprotéines de 44 kDa exprimées par toutes les cellules nucléées.

Le gène des molécules HLA de classe I est constitué de 3 régions codant pour 3 domaines extracellulaires $\alpha 1$, $\alpha 2$ et $\alpha 3$. Après leur synthèse, ces molécules s'associent à la $\beta 2$ microglobuline dans le réticulum endoplasmique puis sont apprêtées à la membrane afin de présenter des peptides antigéniques de 8 à 10 acides aminés aux lymphocytes T CD8+.

Les molécules de CMH de classe II sont des glycoprotéines très polymorphiques qui forment des hétérodimères et ne s'associent pas à la $\beta 2$ microglobuline. Leur gène possède 2 chaînes constituées chacune de 2 domaines extracellulaires, $\alpha 1$, $\alpha 2$, $\beta 1$ et $\beta 2$. Cette famille de molécules comprend les protéines HLA-DP, HLA-DQ et HLA-DR. Ces protéines sont exprimées à la surface des cellules présentatrices de l'antigène aux lymphocytes T (lymphocytes B, monocytes, macrophages et cellules dendritiques) mais aussi par les précurseurs hématopoïétiques des globules rouges et des granulocytes. Les molécules HLA-DR sont les molécules de CMH de classe II les plus représentées par rapport aux molécules HLA-DP et HLA-DQ (Zhao et al., 1993). Comme les molécules de CMH de classe I, une fois

synthétisées, elles sont amenées à la membrane de la cellule et permettent de présenter des peptides antigéniques de 13 à 26 acides aminés aux lymphocytes T CD4+.

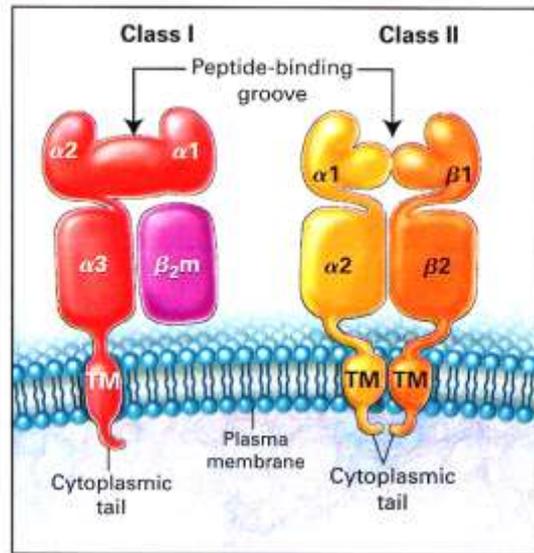


Figure 4 : Structure des molécules de CMH de classe classiques.

3.2. Les molécules de CMH de classe I non classiques

Contrairement aux molécules de CMH de classe I classiques, les molécules de CMH de classe I non classiques ou Ib se distinguent par un polymorphisme plus limité et une expression tissulaire plus restreinte (Braud et al., 1998).

3.2.1. HLA-E, HLA-F, et HLA-G

Le gène *HLA-E* est situé sur le chromosome 6 entre les gènes *HLA-A* et *HLA-C*. La molécule HLA-E est une glycoprotéine associée à la membrane mais, contrairement aux molécules de CMH de classe I classiques, HLA-E est faiblement polymorphique. Son profil d'expression est restreint, ce qui limite, à priori, sa fonction dans le contrôle de la réponse immune. Les molécules HLA-E initialement décrites par Koller et al. en 1988 (Koller et al., 1988) sont les ligands des récepteurs CD94/NKG2A et CD94/NKG2C présents à la surface des cellules Natural Killer (NK) et d'une sous-population de cellules TCD8+ (Lee et al., 1998).

HLA-E forme un hétérodimère associé à la $\beta 2$ microglobuline et peut présenter des peptides comme les molécules de CMH de classe I classiques. Bien que le transcrit d'HLA-E soit exprimé dans de nombreux types cellulaires, son expression protéique, *in vivo*, semble restreinte aux cellules endothéliales, cellules immunitaires (lymphocytes B, T, cellules NK, monocytes et macrophages) et au trophoblaste (Coupel et al., 2007).

HLA-F est une protéine de 40-41 kDa qui semble associée à la $\beta 2$ microglobuline comme les molécules CMH de classe I classiques. Son expression est restreinte aux cellules B, à la lignée de cellules T HUT78 et aux organes lymphoïdes comme le thymus, la rate, les amygdales (Lepin et al., 2000; Wainwright et al., 2000). HLA-F est également exprimée dans le cytoplasme et à la surface des cellules du cytotrophoblaste lors de la fin de la grossesse.

Le gène *HLA-G* code pour 7 isoformes : 4 protéines membranaires (HLA-G1 à –G4) et 3 formes solubles (HLA-G5 à –G7) (Carosella et al., 2000). La molécule HLA-G est exprimée essentiellement dans les sites “ privilégiés immuns ” comme le trophoblaste, le thymus, la cornée, le pancréas et les précurseurs érythroïdes et endothéliaux mais aussi par les cellules dendritiques et les cellules T alloréactives (Le Fricc et al., 2004; Le Rond et al., 2004). Cette protéine est également exprimée par les cellules tumorales (mélanomes et carcinomes) (Rouas-Freiss et al., 2007). Initialement décrit pour avoir un rôle dans la protection du fœtus contre la lyse par les cellules NK maternelles (Le Bouteiller and Lenfant, 1996), HLA-G intervient aussi dans les mécanismes d’échappement tumoral. HLA-G se lie à différents récepteurs inhibiteurs présentés par les cellules immunitaires : les récepteurs ILT-2, ILT-4, KIR2DL4 (Rouas-Freiss et al., 2007).

3.2.2. *EPCR*

Le gène codant pour le récepteur endothélial de la protéine C (EPCR) est situé sur le chromosome 20. L’EPCR est une glycoprotéine transmembranaire de 46 kDa associée à la $\beta 2$ microglobuline (Villoutreix et al., 1999). Exprimée de façon constitutive par les cellules endothéliales mais aussi par les neutrophiles, sa structure est similaire à celle des molécules de CMH de classe I (Fukudome and Esmon, 1995). Cette protéine a la capacité de lier la protéine C (activée ou non). L’EPCR augmente l’activation de la protéine C induite par le complexe thrombine-thrombomoduline. Une forme soluble d’EPCR est détectée dans les sérums. Cette forme soluble conserve les capacités de fixation à la protéine mais diminue ses capacités d’activation et les propriétés anti-coagulantes de la protéine C (Liaw et al., 2000; Xu et al., 2000).

3.2.3. *MICA et MICB*

La famille MIC (MHC class I chain related) comprend 2 gènes codant pour MICA et MICB et des pseudogènes pour MICC, MICD et MICE. Les gènes *MICA* et *MICB* ont été identifiés en 1994 au cours d’une recherche sur la région HLA-B (Bahram et al., 1994).

Comme pour les autres gènes HLA de classe I, les gènes de la famille MIC sont localisés sur le chromosome 6 du génome humain. Les gènes de MICA et MICB sont situés respectivement à 40 et 110 kb du gène HLA-B. Ce sont des protéines très polymorphiques.

3.2.4. Les autres molécules de CMH de classe I non classiques

Il existe également d'autres molécules de CMH de classe I non classique comme les molécules HFE (hémochromatose ou HLA-H), MILL (MHC class I-like located near the leukocyte complex), ULBP, RAE, H60, FcRn, (neonatal Fc receptor), ZAG (Zinc α_2 -glycoprotein), MR1 et CD1d (qui est non polymorphique) mais elles sont peu décrites.

HFE est une protéine associée à la β_2 microglobuline et joue un rôle prépondérant dans la régulation de l'absorption du fer. La molécule MILL est identifiée chez la souris et le rat. Elle serait l'homologue murin de MICA (Kajikawa et al., 2006). Contrairement à MICA, MILL est associée à la β_2 microglobuline.

4. Expression et fonctions des molécules MICA

4.1. Structure et expression cellulaire de MICA

4.1.1. Le gène MICA

MICA est fortement polymorphique (environ 60 allèles différents décrits à ce jour) (Stastny, 2006) mais 4 allèles sont très représentés (Sumitran-Holgersson et al., 2002). L'allèle MICA*008 apparaît être le plus fréquent des allèles MICA (présent chez 55% des Caucasiens) (Zwirner et al., 2000).

Le gène *MICA* code pour un polypeptide de 383 acides aminés. L'ARNm de MICA n'est pas détecté dans les lymphocytes B et T. Par contre, il est présent dans les cellules HeLa mais n'est pas régulé par l'IFN γ . Cet ARNm est également détecté avec un niveau d'expression équivalent dans les lignées de fibroblastes et les cellules épithéliales (Bahram et al., 1994).

Il existe des homologies de séquences entre MICA et HLA de classe I, mais ces homologies sont moins importantes que pour les autres gènes HLA classe I : 18% pour le domaine α_1 , 25% pour le domaine α_2 et 30% pour le domaine α_3 (Bahram et al., 1996). Cet ARN a donc subi des modifications précoces afin de s'adapter dans l'évolution pour acquérir de nouvelles fonctions (Bahram et al., 1994). De plus, contrairement aux séquences HLA de

classe I, la séquence de MICA n'a pas de résidus impliqués dans la fixation du co-récepteur CD8 aux HLA classe I.

Les séquences MICA et MICB comportent dans leurs régions 5' flanquantes des éléments de régulation de choc thermique similaires aux éléments régulateurs en amont du gène hsp70 (Bahram et al., 1996). Un choc thermique sur les cellules HeLa augmente le niveau de base des ARN messagers de MICA et MICB. Le choc thermique traduit une réponse au stress, suggérant dans les études initiales que MICA serait un élément de réponse au stress cellulaire (Bahram et al., 1996; Groh et al., 1996). Des associations entre les allèles de MICA et des maladies ont été décrites.

4.1.2. La protéine MICA

La protéine MICA possède 3 domaines extracellulaires $\alpha 1$, $\alpha 2$, $\alpha 3$, un domaine transmembranaire et un domaine cytoplasmique (Bahram et al., 1994). Les domaines $\alpha 1$ et $\alpha 2$ forment un plateau arrangé en 4 hélices α et un feuillet β anti-parallèle, le domaine $\alpha 3$ est un domaine de type immunoglobuline (Li et al., 2001). Cette protéine est fortement glycosylée et n'est pas associée à la $\beta 2$ microglobuline (Groh et al., 1996). A la différence des molécules HLA de classe I, la séquence de MICA comprend une asparagine en position 8 de la chaîne $\alpha 1$ et en position 283 de la chaîne $\alpha 3$ à la place d'une phénylalanine et d'un acide aspartique respectivement. Il y a donc une modification de l'encombrement stérique de la protéine. Cette modification accumulée aux nombreuses glycosylations contribue à la perte de l'association à la $\beta 2$ microglobuline (Steinle et al., 1998). L'ADNc de MICA code pour une protéine membranaire de 43 kDa. Les molécules MICA nouvellement synthétisées sont transportées à travers l'appareil de Golgi afin d'y être maturées (Bauer et al., 1999; Groh et al., 1999).

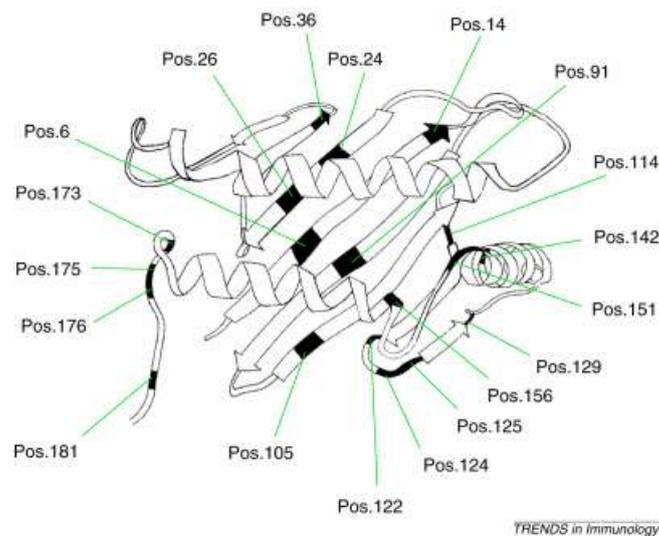


Figure 5 : Structure des domaines $\alpha 1$ et $\alpha 2$ de MICA.

Les régions polymorphiques sont indiquées en noir. D'après la revue de Stephens (Stephens, 2001)).

Selon les premières études réalisées pour caractériser cette protéine, MICA est exprimée par quelques types cellulaires. Cette protéine n'a pas été détectée à la surface de lignées de lymphocytes B, T et monocytes, des cellules mononucléaires du sang périphérique et des thymocytes. Par contre, elle est détectée à la surface des cellules tumorales (lignées HT29 et U373). La protéine MICA est exprimée à la surface des cellules épithéliales (Groh et al., 1996; Zwirner et al., 1998), des kératinocytes, des lymphomes B et T (lignées uniquement, pas par les cellules fraîches), des cellules endothéliales (HUVEC) et des fibroblastes (Zwirner et al., 1999; Zwirner et al., 1998). Elle est également exprimée, au niveau intracytoplasmique, par des monocytes, kératinocytes et cellules endothéliales de cordon ombilical frais mais pas par des lymphocytes T CD4+, CD8+ ou CD19+ du sang périphérique. Bien que non-exprimée par les cellules dendritique immatures, l'expression de MICA est induite par les cellules dendritiques stimulées par l'IFN α , ces cellules dendritiques peuvent alors activer les cellules NK (Jinushi et al., 2003).

In vivo, MICA n'est pas présente dans le cerveau, le cœur, le foie, le poumon, la thyroïde, les reins, la glande adrénaie, le placenta, la langue et la rate. Par contre, cette protéine est exprimée dans les petites et larges muqueuses intestinales. MICA est exprimée dans l'épithélium intestinal ainsi que dans plusieurs épithéliums tumoraux (Groh et al., 1999). MICA semble également exprimée par les tissus transplantés (Hankey et al., 2002), les cellules tumorales thyroïdiennes (Xu et al., 2006).

Contrairement aux molécules HLA de classe I classiques, l'IFN γ ne permet pas d'augmenter l'expression de MICA à la surface des cellules exprimant constitutivement cette protéine. L'expression de MICA n'est également pas induite par l'IFN γ à la surface de cellules qui ne l'expriment pas (Hankey et al., 2002; Zwirner et al., 1998). L'expression intracytoplasmique de MICA est induite par les cellules T CD4⁺ ou CD8⁺ après stimulation par la PHA (phytohemagglutinine) (Zwirner et al., 1998).

L'expression de MICA par des fibroblastes est augmentée lors d'une infection par le CMV (cytomégalovirus), contrairement aux molécules HLA de classe I dont l'expression est diminuée (Zou et al., 2005). Enfin, l'expression de MICA par les fibroblastes est diminuée quand les cellules sont en contact par rapport à la phase de croissance. Cette diminution d'expression est due à une baisse de la synthèse d'ARN quand les cellules sont à confluence. (Zou et al., 2006).

4.1.3. *La forme soluble de MICA*

Une forme soluble de MICA a été détectée dans les surnageants de culture de C1R MICA (cellules transfectées par MICA) et de carcinomes du colon. MICA est spontanément libérée sous sa forme soluble fortement glycosylée par des lignées de cellules tumorales qui expriment de façon endogène MICA ou bien transfectées par l'ADNc de MICA (Salih et al., 2002). L'ajout d'inhibiteur de métalloprotéases de la matrice diminue la sécrétion de sMICA dans les surnageants et augmente l'expression de MICA à la surface des cellules. La sécrétion de MICA par les cellules tumorales est due aux métalloprotéases.

La forme soluble de MICA interagit avec le récepteur NKG2D de 2 façons : en agissant comme un acteur mimétique compétitif de la forme membranaire et donc bloque la liaison entre le récepteur et MICA membranaire et en permettant l'internalisation du récepteur (Yokoyama, 2002).

4.2. Le récepteur NKG2D et son interaction avec MICA

Les cellules Natural Killer (NK) constituent une sous-population de lymphocytes qui représentent 5 à 10% des cellules mononuclées. Ces cellules ont la capacité de détruire les cellules tumorales, les cellules infectées par des virus ou toutes autres cellules dont l'expression des molécules de CMH de classe I est modifiée ou faible. Ils présentent à leur surface des récepteurs activateurs et inhibiteurs. Le récepteur NKG2D est un des récepteurs activateurs. Il appartient à la famille des protéines intégrales de type II contenant un domaine lectine de type C. Identifié depuis 1991 (Houchins et al., 1991), le gène codant pour NKG2D

est situé sur le chromosome 12p13 chez l'homme, à proximités des gènes codant pour NKG2A, C et E (Glienke et al., 1998). Il est exprimé à la surface des cellules NK mais aussi T CD8+ $\alpha\beta$ et $\gamma\delta$ (Bauer et al., 1999; Diefenbach et al., 2000; Wu et al., 1999).

Contrairement aux autres récepteurs de la famille NKG2 qui forment des hétérodimères avec CD94, le récepteur NKG2D est un homodimère qui se lie à une protéine adaptatrice DAP10. DAP10 permet le recrutement de la sous-unité p85 de la phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3 Kinase) par phosphorylation d'un domaine cytoplasmique de type YxxM, site de fixation à un domaine src homology 2 (SH2) (Wu et al., 1999). Le récepteur NKG2D se lie avec DAP10 pour former un complexe hexamérique. Chaque domaine transmembranaire du dimère NKG2D se lie à un dimère DAP10 (Garrity et al., 2005). NKG2D interagit avec plusieurs ligands : chez l'homme, ce récepteur interagit avec MICA et MICB (Bauer et al., 1999), ULBP1, 2, 3 (UL16-binding protein) ou RAET1 (retinoic acid early transcript-1) (Cosman et al., 2001) ; chez la souris, NKG2D interagit avec la famille RAE1 (retinoic acid early inducible 1), H60, MULT1 (mouse UL-binding protein-like transcript 1) (Bahram et al., 2005; Diefenbach et al., 2000; Vivier et al., 2002).

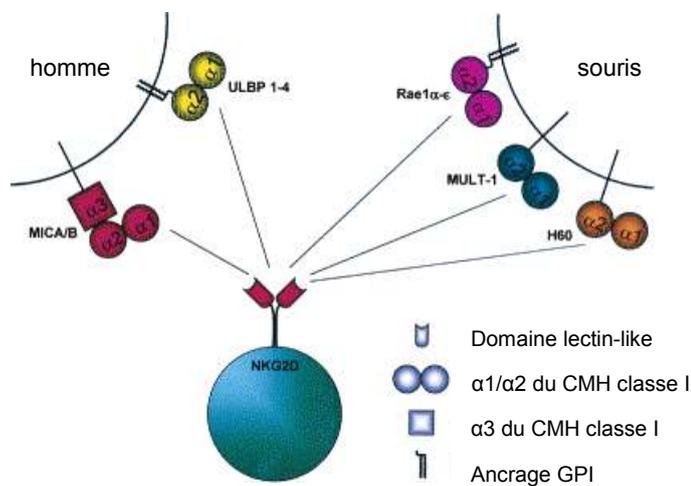


Figure 6 : Disparité des ligands du récepteur NKG2D chez l'homme et la souris.

L'expression du récepteur NKG2D est régulée par les cytokines. Elle est augmentée par l'IL-15, IL-12 et l'IFN α à la surface des cellules NK et par l'IL-15 à la surface des cellules T CD8⁺ (Bauer et al., 1999; Roberts et al., 2001; Sutherland et al., 2002).

Le complexe NKG2D/DAP10 peut jouer un rôle au cours de la costimulation dans l'activation des cellules NK et des cellules T en l'absence de CD28 (Wu et al., 2000).

L'expression du récepteur NKG2D est augmentée en réponse à une infection par le cytomégalo virus (CMV) permettant ainsi une réponse anti-virale (Groh et al., 2001).

Dans un premier temps, la protéine MICA a été décrite pour être reconnue par une sous-population de cellules T dans l'épithélium gastro-intestinal (interaction différente des MHC classe I), dans les cellules épithéliales corticales thymiques (Groh et al., 1996), puis par les cellules T $\gamma\delta$ intestino-intraépithélial (Groh et al., 1998). MICA interagit avec le récepteur NKG2D exprimé par ces sous populations de lymphocytes. L'interaction NKG2D-MICA peut promouvoir une réponse anti-tumorale (Bauer et al., 1999).

NKG2D forme un homodimère qui interagit avec un monomère de MICA. L'expression de MICA par les tumeurs diminue l'expression de NKG2D par les cellules T CD8⁺. Le récepteur est alors internalisé et dégradé mais n'est pas recyclé (Groh et al., 2001).

4.3. Les fonctions de MICA

4.3.1. La sélection lymphocytaire T

Contrairement aux molécules de CMH de classe I classiques, MICA ne présente pas de peptides antigéniques à la surface des cellules (Groh et al., 1998). MICA est exprimée par les cellules épithéliales corticales thymiques et participe à la sélection des cellules T (Groh et al., 1996; Groh et al., 2002). Les cellules épithéliales de l'intestin présentent cette molécule à leur surface, protéine qui interagit avec les sous-populations T permettant ainsi une surveillance immunitaire spécifique.

4.3.2. L'activation cellulaire T

Pendant l'activation des cellules T, MICA agit au niveau du signal 1 (dépendant du TCR) comme du signal 2 (dépendant de NKG2D) (Groh et al., 2001). L'engagement de MICA avec son récepteur NKG2D délivre un signal de costimulation qui permet la reconnaissance des cellules cibles via le TCR et permet la production d'IL2. Cette interaction peut ainsi stimuler le système immunitaire à combattre les virus, peut stimuler les réponses

aux cellules T CD8 $\alpha\beta$ spécifiques des antigènes tumoraux et permettre une fonction de défense d'urgence contre les agents infectieux et les conditions hasardeuses qui causent un stress cellulaire (Groh et al., 2001). MICA est un signal de danger pour le système immunitaire.

4.3.3. MICA, réponse anti-tumorale et échappement tumoral

MICA est fortement exprimée par les cellules tumorales qui présentent une expression très réduite du CMH de classe I. Par conséquent, MICA intervient dans les mécanismes anti-tumoraux. En effet, l'engagement de NKG2D à la surface des lymphocytes T CD8⁺ par les molécules MICA et MICB, surexprimées par certaines tumeurs, stimule leur activité lytique. Certaines tumeurs semblent capables, en sécrétant des molécules solubles pour MICA et MICB, de provoquer une diminution de l'expression de NKG2D sur les lymphocytes T CD8⁺ limitant leur activité anti-tumorale associée à l'engagement de ce récepteur. Les métalloprotéases sont en grande partie responsables de la diminution de l'expression de MICA à la surface des cellules tumorales et de la production de MICA soluble (Salih et al., 2002).

Les patients atteints de cancers expriment la forme membranaire de MICA mais libèrent également la forme soluble dans le sang. Cette forme soluble n'est pas détectée dans le sérum de patients sains. MICA est donc libérée par les cellules tumorales *in vivo* (Salih et al., 2002). MICA membranaire interagit avec son récepteur NKG2D, ce qui diminue son expression à la surface des lymphocytes T CD8⁺, sMICA a le même effet sur ce récepteur (Groh et al., 2002). Une corrélation entre le niveau de sMICA et le degré de la maladie a été mise en évidence dans le cancer de la prostate (Wu et al., 2004). Cela suggère que MICA pourrait être une cible antigénique pour une immunothérapie dans les cancers. Cependant, MICA n'est pas présente dans tous les cancers. MICA est faiblement exprimée, voire non exprimée, dans les cancers du poumon (Busche et al., 2006) mais est exprimée dans les cancers de la thyroïde (Xu et al., 2006).

4.3.4. MICA et Transplantation

Comme les molécules du CMH de classe I, les molécules MICA sont fortement polymorphiques et sont une cible potentielle des alloanticorps lors d'une greffe (Sumitran-Holgersson et al., 2002; Zwirner et al., 1999). Les anticorps anti-MICA peuvent reconnaître les antigènes MICA du donneur exprimés par l'endothélium du greffon et induire la perte de la greffe (Zou et al., 2006; Zwirner et al., 2000). Ces anticorps semblent impliqués dans les

rejets aigus humoraux même si les mécanismes ne sont pas encore bien définis. Il semble que les anticorps anti-MICA soient capables d'activer la voie du complément (au moins dans des expériences *in vitro*) (Amezaga et al., 2006). Les travaux initiaux du groupe de Sumitran-Holgersson, portant sur 139 patients ayant reçu une greffe rénale, ont montré une corrélation entre la présence d'anticorps anti-MICA et l'incidence de rejet vasculaire aigu en l'absence d'anticorps dirigés contre d'autres antigènes du HLA (Sumitran-Holgersson et al., 2002). Ces observations sont confortées par la mise en évidence de l'expression de MICA dans les organes transplantés (rein et pancréas) au moment du rejet.

Des anticorps dirigés contre MICA ont été détectés chez 25% des receveurs d'organes et dans 31% des sérums testés (Zwirner et al., 2000). Les patients qui développent des anticorps anti-HLA et anti-MICA rejettent plus fréquemment leur greffe (Panigrahi et al., 2007; Terasaki et al., 2007; Zou et al., 2007). Par conséquent, la recherche d'anticorps anti-MICA ainsi que le typage de MICA chez le receveur et le donneur pourraient permettre d'établir de nouveaux critères de sélection des couples donneur/receveur et des outils pour la détection et la prévention des rejets aigus mais aussi des rejets chroniques.

La forme soluble de MICA a été détectée dans des sérums de patients transplantés n'ayant pas fait de rejet. La présence de sMICA pourrait inhiber la réponse humorale contre MICA, stabiliser la fonction du greffon et ainsi participer à la tolérance du greffon alors que la présence d'anticorps anti-MICA favoriserait le rejet de greffe (Mizutani et al., 2006a; Suarez-Alvarez et al., 2006a; Suarez-Alvarez et al., 2006b; Terasaki et al., 2007).

5. Objectif du projet et Stratégie de recherche

Depuis plusieurs années, notre équipe (équipe 7, INSERM U643) s'intéresse au rôle de l'endothélium du greffon dans les mécanismes du rejet de greffe en transplantation humaine. Les travaux de notre équipe s'orientent selon deux axes qui sont (1) l'identification des nouvelles molécules et voies de signalisation impliquées dans la survie des cellules endothéliales et (2) l'étude de l'"alloréactivité" des cellules endothéliales conférée par l'expression des molécules du CMH du donneur. Concernant la place de l'endothélium dans la réponse cellulaire ou humorale allogénique, nous avons récemment montré l'effet de l'interaction des anticorps anti-HLA de classe I (Coupel et al., 2004) et de classe II (Le Bas-Bernardet et al., 2004) sur la prolifération et l'apoptose des cellules endothéliales. Nous avons aussi mis en évidence la présence chez des patients hyper-immunisés d'anticorps non-HLA dirigés contre les CE et capable d'induire l'apoptose des CE (Le Bas-Bernardet et al., 2003).

Ces travaux montrent, qu'au delà de la lyse dépendante du complément, les anticorps anti-donneur (anti-HLA ou anti-CE) ont un effet direct sur la viabilité et/ou les fonctions de l'endothélium du greffon impliquant des voies de signalisation propres. Il renforce aussi l'intérêt d'une caractérisation exhaustive de l'expression et de la régulation des molécules du CMH portées par les cellules endothéliales.

Ainsi, pour mieux caractériser l'allogénicité de l'endothélium nous avons plus récemment initié une étude portant sur l'expression des molécules associées au CMH et globalement répertoriées sous le terme de molécules du HLA de classe I non classique (Coupel et al., 2006). Les molécules choisies pour cette étude sont HLA-E, MICA et EPCR. L'expression de ces 3 molécules est restreinte à un petit nombre de types cellulaires incluant l'endothélium. Ces trois molécules ont également la particularité d'être à la fois exprimées à la membrane et produites sous forme soluble.

Dans ce contexte, l'analyse de l'expression et de la régulation de MICA par les cellules endothéliales vasculaires humaines m'a été confiée. En effet, bien que l'expression de MICA ait été rapportée par plusieurs équipes, elle demeure mal caractérisée et sa régulation dans un contexte inflammatoire est peu connue. J'ai donc utilisée la collection de cellules endothéliales développée dans l'équipe pour étudier l'expression basale et la régulation de MICA dans un contexte inflammatoire in vitro. Les conséquences de l'interaction de MICA avec le récepteur activateur NKG2D ont été analysées par l'étude de l'activité cytotoxique NK et de l'expression du récepteur NKG2D dans un modèle de coculture. Les mécanismes post-transcriptionnels ont été abordés par l'utilisation d'inhibiteurs de la glycosylation et des métalloprotéases de la matrice extracellulaire (MMP). Ces expériences nous ont permis de mettre en évidence la forme soluble de MICA (sMICA) dans le surnageant de culture des cellules activées par les cytokines. Enfin, des inhibiteurs pharmacologiques des principales voies de signalisation intracellulaires (NF κ B, PI3 Kinase et MAP Kinases) nous ont aidé pour montrer l'importance des voies NF κ B et MAP Kinases dans la régulation de MICA par les cytokines TNF α et IFN α . L'ensemble de ces résultats fait l'objet d'un article soumis pour publication (cf. Annexe 1). De façon complémentaire, j'ai participé à un projet de recherche visant à comprendre la signalisation induite par la liaison du HLA de classe II par les alloanticorps à la surface des cellules endothéliales. Cette étude montre l'implication de la PKC et suggère un rôle pour la PI3-Kinase dans la protection contre l'apoptose induite par les anticorps dirigés contre le HLA de classe II. Ces résultats ont été publiés dans *Transplantation* (Le Bas-Bernardet et al., *Transplantation* 2004 ; cf. Annexe 2)

Matériel et méthodes

1. Culture des cellules endothéliales humaines

1.1. Isolement des cellules endothéliales humaines

Au cours de ces travaux, nous avons utilisé des cellules endothéliales provenant d'artères humaines (Human Arterial Endothelial Cell : HAEC) et de veines ombilicales humaines (Human Umbilical Vein Endothelial Cell : HUVEC). Les HAEC sont isolées à partir d'artères rénales (rebutts chirurgicaux) prélevées avant la transplantation sur un donneur d'organes. Les HUVEC sont isolées à partir de veines du cordon ombilical. Les isollements d'HAEC sont réalisés dans le cadre du protocole « Divat Biocol » (BioCol INSERM n°02G55).

La méthode utilisée pour isoler les cellules endothéliales du prélèvement a été adaptée dans notre équipe (Le Bas-Bernardet et al., 2003) à partir de la méthode initialement décrite par le Pr. Jaffe (Jaffe et al., 1973).

Pour obtenir les HAEC, après l'avoir nettoyée des tissus conjonctifs, l'artère est digérée avec de la collagénase A à 2 mg/ml (Boehringer, Mannheim, Allemagne) pendant 30 minutes dans un incubateur à 37°C et 5% de CO₂. La suspension cellulaire est lavée par centrifugation (1500 rpm, 10 minutes, 4°C). Les cellules sont remises en suspension dans 500 µl d'une solution de BSA (Bovine Serum Albumine) 0,1% diluée dans du PBS (Phosphate Buffer Saline). Les cellules endothéliales sont isolées de la suspension cellulaire par sélection positive à l'aide de billes magnétiques couplées à un anticorps anti-CD31 (Dynabeads[®] CD31 Endothelial Cell, Dynal Biotech, Compiègne, France), le CD31 (PECAM-1 ou *Platelet Endothelial Cell Adhesion Molecule-1*) permettant de caractériser des cellules endothéliales. Pour la sélection, 25 µl de billes Dynabeads[®] CD31 sont lavées 3 fois avec 1 ml de la solution de BSA 0,1%. Les billes sont récupérées à l'aide d'un aimant. Les cellules sont incubées pendant 20 minutes à 4°C sous agitation rotative avec les Dynabeads[®] CD31. Les cellules sont ensuite lavées puis récupérées à l'aide de l'aimant : 3 lavages de 2 minutes avec 1 ml de solution BSA 0,1%, suivi de 2 lavages de 2 minutes avec du milieu de culture spécifique pour les cellules endothéliales (cf. paragraphe 1.3 du matériel et méthode). Les cellules endothéliales sont mises en culture dans une boîte de Pétri pour culture cellulaire de 100 mm de diamètre (Nunc, Dutscher, Brumath, France) préalablement traitée avec de la gélatine à 1% (Sigma-Aldrich, St Quentin Fallavier, France) dans un incubateur à 37°C et 5%

de CO₂ dans 10 ml de milieu de culture spécifique pour les cellules endothéliales. Les cultures d'HUVEC sont aussi obtenues par digestion à la collagénase à partir de veines ombilicales selon un protocole similaire (Le Bas-Bernardet et al., 2003).

La figure ci-dessous (Figure 7) illustre les différentes étapes de l'isolement et de la culture des cellules endothéliales primaires.

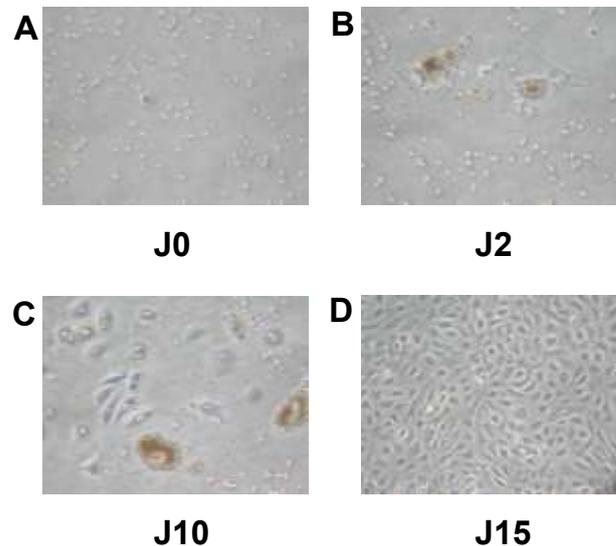


Figure 7 : Isolement et culture de cellules endothéliales (HAEC) au moyen de billes anti-CD31.
 A - Mise en culture (J0) des cellules endothéliales après l'isolement à l'aide des billes Dynabeads® CD31.
 B - Après 2 jours de culture, adhésion et division des cellules endothéliales.
 C - Après 10 jours de culture, des îlots de cellules endothéliales se forment.
 D - Après 15 jours de culture, les cellules endothéliales forment un tapis cellulaire confluent.

1.2. Caractérisation des cellules endothéliales

Une fois que les cultures de cellules endothéliales sont à confluence, leur phénotype est étudié par cytométrie en flux afin de les caractériser et de vérifier la pureté de l'isolement. Pour cela, les marqueurs PECAM-1 (CD31) et CD146 sont analysés à l'aide d'anticorps spécifiques. Un exemple du profil d'expression de CD31 par les cultures primaires d'HAEC est représenté dans la Figure 8.

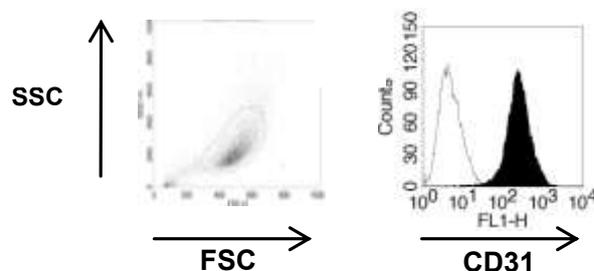


Figure 8 : Caractérisation des cellules endothéliales après isolement.
 Dot blot montrant les paramètres de taille et de granulosité des cellules endothéliales (A) et histogramme montrant l'expression du CD31 (B)

1.3. Culture des cellules endothéliales

Les cellules endothéliales (HAEC et HUVEC) sont cultivées dans du milieu Endothelial Cell Basal Medium (ECBM, PromoCell, Heidelberg, Allemagne) supplémenté avec 10% de sérum de veau fœtal (SVF) (BioWest, Nuaillé, France), 0,4% de suppléments de facteur de croissance pour cellules endothéliales et de l'héparine, 0,1 µg/ml de EGF (Epidermal Growth Factor), 1 µg/ml de FGF-2 (basic Fibroblast Growth Factor), 5 mg/ml d'hydrocortisone (kit de supplément PromoCell) ainsi qu'en présence de 10 mg/ml de pénicilline-streptomycine (PS) (Sigma-Aldrich) et de 2 mM de glutamine (Sigma-Aldrich). Les cellules endothéliales sont cultivées dans des boîtes de Pétri pour culture cellulaire de 100 mm de diamètre (Nunc) préalablement traitées avec de la gélatine à 1% (Sigma-Aldrich) dans un incubateur à 37°C et 5% de CO₂. Le milieu ECBM contenant 10% de SVF et des suppléments de facteurs de croissance est utilisé afin d'amplifier les cultures de cellules endothéliales. Au cours de nos expériences, les cellules endothéliales sont cultivées dans du milieu ECBM contenant uniquement 2% de SVF. Ce milieu sans facteurs de croissance est utilisé dans le but d'étudier différents traitements aux cellules endothéliales.

Une fois confluentes, les cellules endothéliales sont décollées à l'aide de 500 µl/boîte d'une solution de trypsine/EDTA 1X (à partir d'une solution 10X : 5 g de trypsine de porc ; 2 g EDTA ; 4 Na par litre dans 0,9% de NaCl) (Sigma-Aldrich). Elles sont remises en suspension dans du milieu de culture et redistribuées dans de nouvelles boîtes de culture (dilution au quart) pour permettre d'amplifier les cultures : cette étape de dilution des cultures constitue un passage. Les cellules endothéliales ont été utilisées pour les expériences entre le deuxième et le sixième passage.

2. Isolement et culture des autres types cellulaires

2.1. Les lignées cellulaires

Différentes lignées cellulaires ont également été utilisées au cours de ces travaux. Ces lignées proviennent de l'American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA, USA).

Les cellules HeLa sont des cellules épithéliales provenant d'un adénocarcinome. Ces cellules adhérentes sont décollées à l'aide d'une solution de trypsine/EDTA.

Les cellules Raji ainsi que les cellules Daudi sont des lignées de lymphocytes B provenant d'un lymphome de Burkitt. Les cellules K562 sont des lymphoblastes, ces cellules

proviennent d'une leucémie myéloïde chronique. Les cellules Jurkat sont une lignée de lymphocytes T. Les cellules U937 sont des cellules monocytaires.

Les cellules C1R sont des lymphoblastes B. Les cellules C1R-MICA correspondent à la lignée C1R transfectée par le gène MICA*008 (lignées fournies par le Pr. Antoine Toubert, Hôpital Saint-Louis, Paris, France). La lignée transfectée C1R-MICA est maintenue en pression de sélection par l'ajout de généticine G418 (500 µg/ml, Sigma-Aldrich) dans le milieu de culture (Tieng et al., 2002).

La lignée de cellules NKL nous a été fournie par le Pr. Eric Vivier (CHU, Marseille, France). Cette lignée de cellules NK humaines est dépendante de l'IL-2 (Robertson et al., 1996), elle est cultivée en présence d'IL2 recombinante à 150 U/ml (R&D Systems, Lille, France)

Excepté les cellules HeLa qui sont cultivées dans un milieu de culture Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM ; 4,5 g/l de glucose), toutes les autres lignées sont cultivées dans du milieu de culture RPMI-1640 provenant de chez Sigma Aldrich. Ces milieux sont supplémentés avec 10% de SVF, 10 mg/ml de PS, 2 mM de glutamine, 1% d'acides aminés non essentiels et 1% de pyruvate de sodium (Sigma-Aldrich).

2.2. Isolement des cellules NK humaines

Les cellules NK (Natural Killer) sont isolées à partir d'un anneau de cytophèrese provenant de l'Etablissement Français du Sang (EFS) de Nantes. Le sang récupéré est dilué au 1/3 dans du PBS. Afin de séparer les leucocytes des autres éléments du sang, un gradient de Ficoll (1/3 de Lymphosep lymphocyte separation media (BioWest) pour 2/3 de sang) est réalisé. Après centrifugation (2500 rpm, 30 minutes, température ambiante, sans frein), les leucocytes sont regroupés en un anneau. Cet anneau contient toutes les cellules mononucléaires du sang périphérique (PBMC). Après avoir récupéré ces cellules et les avoir diluées, plusieurs centrifugations (successivement 2000 rpm, 10 minutes, 4°C ; 1800 rpm, 10 minutes, 4° C puis 1000 rpm, 10 minutes, 4°C) permettent d'éliminer les plaquettes. Les globules rouges restants sont supprimés par lyse hypotonique dans une solution spécifique (8,29 g/l NH₄Cl ; 1 g/l KHCO₃ ; 37,2 mg/l EDTA ; pH=7,2-7,4) pendant 2 minutes. Les PMBC sont récupérées après centrifugation (1500 rpm, 10 minutes, 4°C) puis mises en suspension dans du RPMI-1640.

Les cellules NK sont alors purifiées à partir des PBMC selon le principe de sélection négative à l'aide de billes magnétiques (NK Cell Isolation kit II, Miltenyi Biotech, Paris, France). Après centrifugation (1500 rpm, 10 minutes, 4°C), les PBMC sont mises en suspension dans 400 µl de tampon A froid (0,5% BSA ; 2 mM EDTA dilué dans du PBS ; 4°C) puis incubées 10 minutes à 4°C avec 100 µl d'anticorps biotinylés dirigés contre les marqueurs CD3, CD4, CD14, CD15, CD19, CD36, CD123 et la glycophorine A. Ces anticorps vont se fixer aux lymphocytes T, lymphocytes B, aux cellules dendritiques, monocytes, granulocytes et cellules érythroïdes. Puis 300 µl de tampon A et 200 µl de billes magnétiques anti-biotine sont ajoutés aux cellules pendant 15 minutes à 4°C. Ces billes magnétiques vont permettre de capturer les cellules qui ont fixé les anticorps. Enfin, après avoir ajouté 25 ml de tampon A à cette préparation, les cellules sont centrifugées (1500 rpm, 10 minutes, 4°C) afin d'éliminer l'excédent d'anticorps. Les cellules sont de nouveau mises dans 500 µl de tampon A. Cette solution est déposée sur une colonne magnétique (Miltenyi) qui va retenir toutes les cellules qui ont fixé les anticorps, permettant ainsi de ne sélectionner que les cellules NK. Ces cellules NK sont éluées et mises en culture dans du milieu RPMI-1640 supplémenté de 10% de SVF, 1% d'acides aminés non essentiels, 1% de pyruvate de sodium, 1% de PS et 1% de glutamine, et en présence d'IL2 recombinante à 150 U/ml.

La pureté des cellules NK est contrôlée par cytométrie en flux, au moyen d'anticorps anti-CD3-APC et anti-CD16/CD56-FITC. Le marqueur CD3 est présent sur les lymphocytes T, CD16 et CD56 sont des marqueurs des cellules NK. Les cellules avant purification correspondent aux PBMC, les cellules après tri aux cellules NK purifiées (phénotype : CD3 négatif et CD16/CD56 positif).

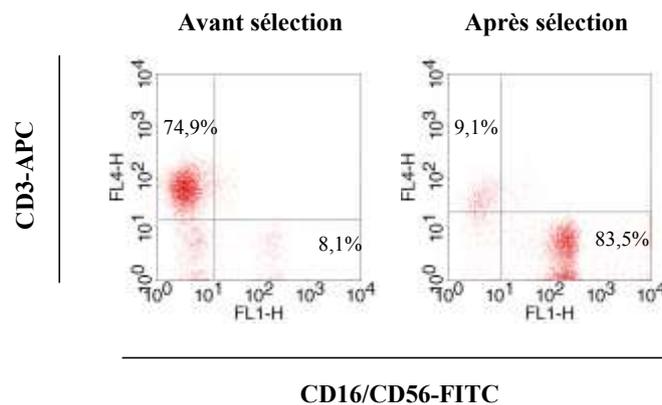


Figure 9 : Analyse par cytométrie en flux du pourcentage de cellules NK (CD3-/CD16+/CD56+) dans les populations cellulaires avant et après la sélection.

Les cellules NK sont obtenues après sélection négative à partir des PBMC. Les cellules sont analysées à l'aide d'un anticorps anti-CD3 directement couplé à l'APC et d'un anticorps anti-CD16/CD56 directement couplé au FITC. CD3 est un marqueur des lymphocytes T, CD16/CD56 est un marqueur des cellules NK. Les cellules NK correspondent à la population qui a un phénotype négatif pour CD3 et positif pour CD16/CD56.

3. Traitements et activation des cellules

3.1. Activation par les cytokines

Afin d'induire l'activation endothéliale *in vitro*, des cytokines sont ajoutées dans les milieux de culture des cellules endothéliales. Lorsque les cellules endothéliales sont à confluence, elles sont mises en culture dans du milieu ECBM avec seulement 2% de SVF et sans facteurs de croissance. Dans ces conditions de culture, les cytokines pro-inflammatoires telles que le Tumor Necrosis Factor α (TNF α) à 100 U/ml (donné par le Pr. P. Neuman, (BASF, Ludwigshafen, Germany)), l'Interleukine 1 β (IL1 β) à 5 ng/ml (R&D Systems) ou l'Interferon γ (IFN γ) à 100 U/ml (Imukin, Boehringer Ingelheim, Allemagne) sont ajoutées aux cellules. Les temps de traitement des cellules endothéliales par ces cytokines varient de 12 à 48h. Une fois activées, les cellules sont récupérées pour être analysées selon les différentes techniques décrites ci-dessous (cf. paragraphes 5, 6, 7 et 8 du matériel et méthodes)

3.2. Modulation de l'expression du récepteur NKG2D

MICA est l'un des ligands du récepteur NKG2D (Steinle et al., 2001). L'expression du récepteur NKG2D est étudiée sur une lignée de cellules NK, la lignée NKL ainsi que sur des cellules NK purifiées à partir de sang de donneurs sains. Afin d'analyser l'effet de MICA sur son récepteur, des co-cultures sont réalisées. Les cellules C1R-MICA ou C1R (3×10^5 cellules)

ont été mises en culture avec des cellules NKL (3×10^5 cellules) dans une plaque 24 puits (BD Biosciences, Le Pont-De-Claix, France) pendant une nuit à 37°C. Les cellules sont récupérées, centrifugées (1500 rpm, 10 minutes, 4°C) puis analysées par cytométrie en flux (cf. paragraphe 4 du matériel et méthodes). Des co-cultures de cellules NKL et de cellules endothéliales sont également réalisées dans des plaques 6 puits (BD Biosciences). Une fois à confluence, les cellules endothéliales sont activées à l'aide des cytokines TNF α (100 U/ml) ou IFN γ (100 U/ml) pendant 48h. Les cellules endothéliales sont ensuite mises en culture avec 3×10^5 cellules NKL. Les cellules sont laissées en culture à 37°C pendant 36h. Les surnageants de culture contenant les cellules NKL sont récupérés, centrifugés (1500 rpm, 10 minutes, 4°C) puis analysés par cytométrie en flux pour étudier la modulation du récepteur NKG2D. Dans le but d'étudier l'impact fonctionnel de cette modulation, des " tests de cytotoxicité redirigée" sont également effectués à l'aide de ces cellules NKL (cf. paragraphe 7 du matériel et méthodes).

3.3. Protocole de choc thermique

Afin d'étudier l'effet du choc thermique sur l'expression de MICA, les cellules endothéliales, une fois à confluence, sont déprivées puis soumises à un choc de température chaud. Ce choc thermique chaud est défini par une culture des cellules à 42,5°C dans une étuve à 5% de CO₂ pendant 1h suivi par un temps de culture à 37°C dans une étuve à 5% de CO₂ pendant des périodes de 2 à 24h (Groh et al., 1996).

A la fin du traitement, les cellules sont analysées par cytométrie en flux ou par Western Blot (cf. paragraphes 4 et 6 du matériel et méthodes).

4. Cytométrie en flux

4.1. Principe de la cytométrie en flux

La technique de cytométrie en flux permet de caractériser le phénotype des cellules en étudiant l'expression des antigènes à leur surface. Les cellules en suspension sont analysées à l'aide d'un cytomètre. Ces cellules passent devant un faisceau laser qui permet de mesurer plusieurs paramètres cellulaires. La lumière diffractée permet d'évaluer la taille des cellules (FSC : forward scatter) mais aussi donne une mesure de la granulosité de la cellule (SSC : side scatter). Afin d'étudier l'expression des antigènes, les cellules sont marquées avec des anticorps primaires directement couplés à des fluorochromes ou au moyen d'anticorps

secondaires couplés à des fluorochromes. Les signaux détectés par le système optique sont amplifiés grâce à un photomultiplicateur, convertis en signaux électroniques puis en valeurs numériques. L'analyse de ces valeurs numériques est réalisée grâce au logiciel associé CellQuestTM Pro.

Au cours de ces travaux, les fluorochromes utilisés sont le Fluoresceine IsoThioCyanate (FITC), Phycoérythrine (PE) et Allophycocyanine (APC) (Tableau 1).

| Fluorochrome | Longueur d'onde d'excitation (nm) | Longueur d'onde d'émission (nm) |
|---------------------|--|--|
| FITC | 488 | 522 |
| PE | 488 | 575 |
| APC | 630 | 650 |

Tableau 1 : Caractéristiques des fluorochromes utilisés pour la cytométrie en flux.

4.2. Protocole d'immunomarquage

Les cellules sont mises en culture dans des plaques 6 puits puis traitées selon les protocoles d'activation cellulaire (cf. paragraphe 3 du matériel et méthodes). A l'issue du traitement, les cellules endothéliales sont décollées avec 200 µl/puits de trypsine/EDTA 1X, récupérées, lavées avec une solution froide de BSA 1%/Azide 0,05% dans du PBS et distribuées dans une plaque 96 puits à fond conique (Nunc). Les cellules sont centrifugées (2500 rpm, 2 minutes, 4°C) puis à nouveau lavées avec la solution de BSA 1%/Azide 0,05% (3 fois). Les cellules sont incubées pendant 20 minutes à 4°C avec un anticorps primaire dirigé contre la molécule d'intérêt puis pendant 20 minutes à 4°C avec un anticorps secondaire, couplé à un fluorochrome (FITC, PE ou APC selon le cas). Ces anticorps sont préparés dans une solution de BSA 1%/Azide 0,05% dans du PBS. Le contrôle négatif est réalisé à l'aide d'un marquage avec l'anticorps secondaire uniquement ou bien un isotype contrôle selon les expériences. Après chaque incubation d'anticorps, les cellules sont lavées avec la solution de BSA 1%/Azide 0,05% et centrifugées (2500 rpm, 2 minutes, 4°C) afin d'éliminer l'excédent d'anticorps. Une fois l'immunomarquage réalisé, les cellules sont fixées dans 200 µl de paraformaldéhyde (PFA) 1% dans du PBS et conservées à 4°C jusqu'à la lecture.

Les anticorps utilisés pour notre étude sont listés dans le Tableau 2 ci-dessous :

| Cible | Espèce | Clone/ Référence | Isotype | Fournisseur |
|---------------------------------|---------------|-----------------------------|----------------|------------------------------------|
| HLA classe I (HLA-A, -B, -C) | Souris | W6/32 | IgG2a | ATCC |
| VCAM-1 | Souris | BBIG-V1 | IgG1 | R&D Systems |
| PECAM-1 (CD31) | Souris | WM59 | IgG1 κ | BD Pharmingen |
| MICA | Souris | AM01 | IgG1 κ | Immatics |
| MICA/MICB | Souris | 6D4 | IgG2a κ | BD Pharmingen |
| MICA | Souris | MAB1300 | IgG2B | R&D Systems |
| MICA/MICB | Souris | BAM01 | IgG1 | Immatics |
| MICB | Souris | BMO1 | | Surnageant offert par A.Steinle |
| NKG2A | Souris | MAB1059 | IgG2a | R&D Systems |
| NKG2C | Souris | MAB1381 | IgG2b | R&D Systems |
| NKG2D | Souris | MAB139 | IgG1 | R&D Systems |
| CD94 | Souris | MAB1058 | IgG1 | R&D Systems |
| CD16/CD56-FITC | Souris | LNK16/ MEM-288 | IgG1/ IgG2a | Serotec |
| CD3-APC | Souris | UCHT1 | IgG1 | Serotec |

(R&D Systems, Lille, France ; BD Pharmingen, Le Pont-De-Claix, France ; Immatics, Tübingen, Allemagne ; Serotec, Oxford, Royaume Uni)

Tableau 2 : Liste des anticorps utilisés pour la cytométrie en flux.

Les anticorps secondaires utilisés pour notre étude sont : un anticorps de chèvre anti-IgG+IgM de souris couplé au fluorochrome FITC (Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA, USA) ou un anticorps d'âne anti-IgG de souris couplé au fluorochrome PE (Jackson ImmunoResearch).

4.3. Analyse des résultats

Les différentes analyses sont réalisées sur un cytomètre en flux (FacsCalibur®, Becton Dickinson, Mountain View, CA, USA). L'analyse des résultats est réalisée grâce au logiciel CellQuest™ Pro. Pour toutes les expériences, 10000 évènements sont enregistrés.

Tout d'abord, les paramètres FSC et SSC sont analysés sous la forme d'un dot blot permettant de visualiser chaque cellule sur l'écran sous forme de point. Cette méthode de représentation permet d'isoler une population cellulaire homogène et vivante (cette zone définit une région) et d'exclure les débris cellulaires et les agrégats cellulaires. L'analyse de la fluorescence est ensuite réalisée sur les cellules comprises dans cette région. Les signaux numériques sont représentés par des histogrammes de distribution de fréquence, montrant ainsi la distribution des cellules marquées : l'axe des abscisses représentant l'intensité de fluorescence et l'axe des ordonnées le nombre de cellules. Le témoin négatif correspond au bruit de fond de fluorescence (marquage non spécifique de l'anticorps secondaire ou isotype contrôle selon les expériences). Les résultats sont exprimés en moyenne de fluorescence (MFI).

5. Immunofluorescence et microscopie confocale

5.1. Principe de la microscopie confocale

Les cellules sont analysées par microscopie confocale à balayage laser après qu'un immunomarquage ait été réalisé. Comparée à la microscopie optique classique, la microscopie confocale à balayage laser est une technique qui permet d'obtenir une image nette sur un plan focal en éliminant tous les signaux n'appartenant pas à ce plan focal. Grâce à cette technique, des coupes dans l'épaisseur de l'échantillon sont réalisées permettant ainsi d'obtenir une image nette en trois dimensions. Le faisceau laser balaie ainsi point par point le champ d'observation. Le signal lumineux émis par le fluorochrome présent sur l'échantillon est capté par l'objectif puis redirigé par un système de miroirs et de filtres vers un tube photomultiplicateur qui transforme ce signal en signal analogique. Avant d'arriver au photomultiplicateur, le signal lumineux passe à travers un diaphragme qui ne fait passer à travers son ouverture (pinhole) que la lumière provenant du point éclairé, arrêtant ainsi les autres signaux. Ce signal est alors numérisé grâce à un convertisseur analogique/numérique permettant d'afficher une image en pixels.

5.2. Protocole d'immunomarquage pour analyse de la fluorescence par microscopie confocale.

Les cellules endothéliales sont mises en culture sur des lamelles de verre (Hecht-Assistent, Sondheim, Allemagne) préalablement traitées par de la gélatine. Une fois à confluence, les cellules subissent différents traitements ou activation (cf. paragraphe 3.1 du matériel et méthodes). A la fin de l'activation, les cellules sont lavées au PBS puis fixées à l'aide d'une solution de PFA 4% dilué dans du PBS pendant 20 minutes à 4°C. Après 3 lavages en PBS froid, les cellules sont incubées dans une solution de saturation de BSA 1%/Azide 0,05% dans du PBS pendant une nuit à 4°C dans l'obscurité. Les anticorps primaires et secondaires sont préparés dans du BSA 1%/Azide 0,05%. Chaque anticorps est incubé avec les cellules pendant 1 heure sous agitation, dans l'obscurité et à température ambiante. Pour un marquage intracellulaire, une étape de perméabilisation est réalisée par incubation avec une solution de Triton X 0,1% préparé dans du PBS pendant 15 minutes.

Les noyaux des cellules sont visualisés grâce au Topro 3, un intercalant fluorescent de l'ADN (Molecular Probes, Invitrogen, Cergy Pontoise, France) dilué au 1/1000e incubé pendant 15 minutes. La rhodamine-B-hexyl ester (2,5 µg/ml) et l'anticorps anti-golgin-97 (clone CDF4, 2 µg/ml) (Molecular Probes) sont incubés avec les cellules pendant 20 minutes sous agitation afin de marquer respectivement le réticulum endoplasmique et l'appareil de Golgi. L'anticorps anti-golgin-97 est révélé à l'aide d'un anticorps secondaire anti-souris couplé au TRITC (5 µg/ml, Jackson ImmunoResearch). Les cellules sont montées entre lame et lamelles grâce au milieu ProLong® Antifade kit (Molecular Probes). La lecture des lames est réalisée à l'aide d'un microscope confocale à balayage laser LEICA TCS-SP1 (Leica AG, Rueil-Malmaison, France).

6. Analyse des protéines par la méthode de Western blot

6.1. Principe du Western Blot

Le Western Blot est une technique qui permet de détecter des protéines selon leur poids moléculaire. La séparation des protéines est réalisée grâce à une électrophorèse de gel polyacrylamide en SDS (SDS-PAGE). Le SDS (Sodium Dodécyl Sulfate), molécule très fortement chargée négativement se lie aux protéines par des liaisons covalentes et donne une charge électrique négative à la protéine, ce qui masque complètement les charges propres de la protéine. Au cours de l'électrophorèse, les protéines migrent à travers deux gels : le gel de concentration à faible pourcentage d'acrylamide permettant d'obtenir une zone protéique fine

qui va migrer dans le second gel ; le gel de migration à plus fort pourcentage d'acrylamide permettant de séparer les protéines en fonction de leur poids moléculaire. Une fois séparées, les protéines sont transférées sur une membrane de nitrocellulose. La détection de la protéine d'intérêt est réalisée par immunomarquage.

6.2. Préparation des lysats cellulaires

A la fin des traitements, les cellules sont lavées au PBS froid puis lysées dans 300 µl de tampon de lyse constitué de 1% NP-40, 100 mM NaCl, 5 mM MgCl₂ et d'inhibiteurs de protéases (Protease Inhibitor Cocktail, Sigma-Aldrich) pendant 20 minutes à 4°C. Après centrifugation (1500 rpm, 10 minutes, 4°C), la quantité de protéines contenues dans chaque lysat est dosée grâce à un test colorimétrique dérivé de la réaction de Biuret (BC Assay, Interchim, Montluçon, France). La même quantité de protéines (de 10 à 20 µg selon les expériences) est déposée sur le gel.

6.3. Protocole de Western Blot

Avant leur dépôt sur le gel d'acrylamide, 15 µl de chaque échantillon sont dilués dans un tampon de charge dénaturant (4,5 µl) contenant 0,004% de bleu de bromophénol ; 12% de SDS (Quantum Biotechnologies, Montréal, Québec) ; 0,2 M de Tris HCl pH=7 ; 200 mM de DiThioThreitol (DTT) ; 40% de glycérol pour visualiser et alourdir l'échantillon. Les échantillons sont dénaturés à 100°C pendant 5 minutes.

Les protéines migrent ensuite à travers des gels de séparation à 10 ou 12% d'acrylamide. Un gel à 12% d'acrylamide de 5 ml est constitué de 1,25 ml de Tris-HCl 1,5 M pH=8,8 ; 2 ml d'Acrylamide 30%/bis-Acrylamide (Biorad ; Marnes-la-Coquette, France) (la quantité d'acrylamide dépend du pourcentage du gel) ; de 50 µl de SDS 10% ; de 25 µl d'Ammonium PerSulfate (APS) 10% (Qbiogen, MP Biomedicals Parc d'Innovation, Illkirch, France) et de 5 µl de Temed (Sigma-Aldrich) pour la polymérisation. Cette solution est préparée dans de l'eau.

Le gel de concentration à 4% d'acrylamide est constitué de 625 µl de Tris-HCl 0,5 M à pH=6,8 ; de 325 µl d'Acrylamide 30%/bis-Acrylamide (Biorad) ; de 25 µl de SDS 10% ; de 12,5 µl d'APS 10% et de 3,75 µl de Temed. La migration des protéines est réalisée dans une cuve (Mini-PROTEAN[®], Biorad) contenant un tampon de migration 1X (à partir d'une solution 5X : 15 g/l Tris ; 72 g/l Glycine ; 5 g/l SDS) à 200V pendant 1h30 environ.

Le gel est ensuite incubé dans un tampon de transfert (5,82 g/l Tris ; 3 g/l Glycine ; 0,375 % SDS, 20% méthanol) ainsi que la membrane de nitrocellulose Hybond™-ECL™ (Amersham-Pharmacia, Orsay, France) pendant 15 minutes à température ambiante. Pour le transfert des protéines du gel sur la membrane, la technique de transfert en condition semi-liquide est utilisée (Trans-Blot®SD Semi-Dry Electrophoretic Transfer Cell, Biorad). Le transfert est réalisé par un courant à 25V pendant 25 minutes. La membrane est alors lavée dans une solution de Tris Buffered Saline (TBS) 1X (à partir d'une solution de TBS 10X : 24,2 g/l Tris ; 80 g/l NaCl pH=7,6)/Tween 20 0,1% puis saturée par incubation avec une solution de TBS1X/Tween 20 0,1%/BSA 5% pendant 2h à température ambiante. Chaque membrane est ensuite incubée toute la nuit à 4°C sous agitation avec l'anticorps primaire puis 2h à température ambiante avec l'anticorps secondaire couplé à la peroxydase (HRP). Après chaque incubation d'anticorps, 4 lavages de 20 minutes avec du TBS1X/Tween 20 0,1% sont réalisés à température ambiante et sous agitation.

Le Tableau 3 recense les différents anticorps primaires utilisés pour cette étude.

| Cible | Espèce | Clone/Référence | Isotype | Fournisseur |
|--|--------|-----------------|---------|---------------------------|
| MICA | Chèvre | AF1300 | IgG | R&D Systems |
| MICA | Souris | MAB1300 | IgG2B | R&D Systems |
| MICA | Souris | BAMO1 | IgG1 | Immatics |
| Akt | Lapin | | | Cell Signaling Technology |
| P-Akt (Ser473) | Lapin | | IgG | Cell Signaling Technology |
| Bad | Lapin | | | Cell Signaling Technology |
| P-Bad | Souris | | IgG1 | Cell Signaling Technology |
| Hsp70 | Lapin | AF1663 | IgG | R&D Systems |
| Glycéradéhyde-3-Phosphate Deshydrogénase (GAPDH) | Souris | MAB374 | IgG | Chemicon |
| P-PKC pan | Lapin | | IgG | Cell Signaling Technology |

Cell Signaling Technology (CST), Danvers, MA

Tableau 3 : Anticorps primaires utilisés pour le Western Blot.

Pour révéler ces différentes protéines, des anticorps secondaires anti-souris et anti-lapin couplés à HRP ont été utilisés au 1/1000^e dilués dans du TBS1X/Tween 20 0,1%/BSA 5% (Cell Signaling Technology). La révélation des protéines est réalisée par chimioluminescence à l'aide d'un kit de révélation ECL (Enhanced ChemiLuminescence, Amersham-Pharmacia), un substrat réagit avec la HRP afin d'émettre un signal lumineux visible par radiographie. Les membranes sont révélées à l'aide d'une développeuse (Curix 60, AGFA, Rueil-Malmaison, France) puis les films sont scannés (Digital Science Image Station 440CF (KODAK)). L'intensité des bandes, correspondant à la quantité de protéines est évaluée par densitométrie (logiciel IS440 sur Windows).

Les membranes peuvent être deshybridées puis réhybridées avec un second anticorps primaire (autre protéine ou GAPDH qui sert de protéine contrôle pour notre étude). Pour éliminer les anticorps fixés au cours de la première hybridation, les membranes sont incubées dans une solution de deshybridation (RestoreTM Western Blot Stripping Buffer, Pierce, Brebières, France) pendant 15 minutes à 37°C sous agitation puis sont à nouveau saturées avec du TBS 1X/Tween 20 0,1%/BSA 5% pendant 1h à température ambiante sous agitation.

7. Tests de cytotoxicité cellulaire

7.1. Principe du test de cytotoxicité par relargage de chrome radiomarqué

Le test de cytotoxicité est basé sur la fonction lytique des cellules effectrices (NK et NKL dans notre étude). Afin de mesurer cette activité, du chrome 51 (⁵¹Cr) est incorporé dans les cellules cibles. Lorsque les cellules effectrices sont activées, elles lysent les cellules cibles qui libèrent l'isotope radioactif dans les surnageants de culture. La quantité de radioactivité libérée est proportionnelle à l'activité lytique des cellules effectrices. Dans notre étude, les cellules cibles sont des cellules endothéliales ou des lignées exprimant ou non MICA et les cellules effectrices sont des cellules NK purifiées à partir de PBMC ou la lignée NKL. Ce test de cytotoxicité permet d'analyser la fonction de l'interaction de MICA avec son récepteur NKG2D.

7.2. Protocole du test de cytotoxicité

Pour ce test, les cellules cibles sont les cellules endothéliales avec ou sans traitement par des cytokines ou bien des lignées cellulaires : C1R-MICA, C1R. Les cellules effectrices sont les cellules NK (lignées ou purifiées).

Les cellules cibles sont mises en présence de chrome (20 μ l de ^{51}Cr (Na_2CrO_4 , Amersham-Pharmacia) pour 1×10^6 cellules) pendant 1h à 37°C. Après plusieurs lavages avec du milieu de culture, les cellules radiomarquées sont remises en suspension dans du milieu de culture afin d'obtenir une concentration de 2×10^3 cellules/puits. Les cellules effectrices sont comptées, diluées dans leur milieu de culture et mises en plaque au contact des cellules cibles à différents ratios effecteur : cible (E:T) pendant 4h à 37°C. Le contrôle positif, correspondant aux 100% de lyse des cellules, est réalisé en ajoutant du SDS 10% sur les cellules cibles. Le contrôle négatif est réalisé en ne mettant pas les cellules effectrices au contact des cellules cibles, ce qui permet de mesurer le relargage spontané de chrome radiomarqué.

Après l'incubation des cellules cibles avec les cellules effectrices, le surnageant de chaque puits est prélevé puis déposé dans une plaque Luma Plate[®] (Packard, Meriden, CT, USA). La radioactivité est ensuite mesurée en coups par minute (cpm) à l'aide d'un compteur bêta (Packard Instrument, Rungis, France).

Le pourcentage de lyse spécifique est calculé de la manière suivante :

$$\% \text{ de lyse spécifique} = \frac{\text{cpm réel} - \text{cpm lyse spontanée}}{(\text{cpm lyse totale} - \text{cpm lyse spontanée})} \times 100$$

Pour mieux comprendre les fonctions liées à MICA, un anticorps bloquant MICA, l'anticorps MAB1300 (R&D Systems) à 1 et 2 $\mu\text{g/ml}$ a été mis en présence des cellules cibles pendant 20 minutes à température ambiante avant l'ajout des cellules effectrices. Des anticorps bloquants les récepteurs des cellules effectrices ont également été utilisés dans certaines expériences. Ces anticorps anti-NKG2A, anti-NKG2C et anti-NKG2D (R&D Systems) ont été mis en présence des cellules effectrices pendant 20 minutes à température ambiante avant d'être mis au contact des cellules cibles.

Des tests de “ cytotoxicité redirigée” ont aussi été effectués pour analyser le rôle de la modulation du récepteur NKG2D par MICA. Pour réaliser ces tests, les cellules NKL ont été mises en présence des cellules endothéliales activées ou non par du $\text{TNF}\alpha$ (100 U/ml) ou de l’ $\text{IFN}\gamma$ (100 U/ml) pendant 48h ou des surnageants de cultures. Les cellules NKL sont récupérées puis mises en présence des cellules cibles, les C1R-MICA préalablement marquées avec du ^{51}Cr (Na_2CrO_4), pour mesurer la lyse de ces cellules. Parallèlement à ce test de cytotoxicité, le phénotype des cellules effectrices a été réalisé par cytométrie en flux pour observer la modulation du récepteur NKG2D.

8. La technique Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay (ELISA)

Le dosage de sMICA (MICA soluble) dans les surnageants de nos cultures a été réalisé grâce au kit human MICA ELISA kit (Immatics Biotechnologies). Cet ELISA “ sandwich” est réalisé sur des surnageants des cultures de cellules endothéliales activées ou non conservés à -80°C .

Dans une plaque 96 puits à fond plat (MaxiSorp™ Immuno-Plate, Nunc), l’anticorps de capture est incubé toute la nuit à 4°C . Cet anticorps est un anticorps IgG1 anti-MICA de souris (AMO1) utilisé à 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ dans du PBS. Il reconnaît les chaînes $\alpha 1$ et $\alpha 2$ de MICA. Après 4 lavages dans une solution de Tween 20 0,05% dans du PBS pour éliminer l’excédent d’anticorps, une solution de BSA 15% dans du PBS est ajoutée dans chaque puits pour saturer les sites non spécifiques pendant 1h à 37°C . Puis, les surnageants de culture de cellules endothéliales activées ou non sont incubés pendant 2h à 37°C . Parallèlement, une gamme étalon de 20 ng/ml à 10 pg/ml dans une solution de BSA 7,5% dans du PBS a été établie à l’aide d’un standard sMICA*04 (Immatics Biotechnologies).

La présence de MICA dans les surnageants est détectée au moyen d’un anticorps IgG2a anti-MICA de souris (BAMO3, Immatics Biotechnologies) utilisé à 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ pendant 2h à 37°C . Cet anticorps anti-MICA reconnaît la chaîne $\alpha 3$ de MICA. Le complexe immunitaire ainsi formé est révélé au moyen d’une incubation d’1h à 37°C avec l’anticorps anti-IgG2a de souris couplé à la peroxydase (SouthernBiotech, Birmingham, AL, USA).

Enfin, le TMB Peroxydase Substrat Reagent (R&D Systems) est utilisé comme substrat de la peroxydase pendant 20 minutes à 37°C . La densité optique est lue à 450 nm. La mesure de cette densité optique est réalisée par un lecteur de plaque ELISA (MRX, Dynatech Laboratories, Chantilly, USA) à l’aide du logiciel Révélation®.

9. Tests de prolifération cellulaire

9.1. Etude comparative des facteurs de croissance sur la prolifération des cellules endothéliales

L'effet des facteurs de croissance FGF-2 (Fibroblast Growth Factor, PromoCell) et VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor, PeproTechn Inc par Tebu Bio) a été analysé sur la prolifération des cellules endothéliales.

Les cellules endothéliales ont été mises en culture dans des plaques 6 puits, à raison de $2,5 \times 10^5$ cellules/puits. Lorsque les cellules ont adhéré et sont à 50% de confluence, le milieu de culture des cellules endothéliales est remplacé par du milieu ECBM + 2% SVF. Deux facteurs de croissance, FGF-2 (PromoCell) de 1 à 20 ng/ml ou VEGF (R&D Systems) de 10 à 25 ng/ml, sont ajoutés dans les milieux de culture. Les cellules sont ainsi mises en culture pendant 24h dans un incubateur à 37°C et 5% de CO₂. Les cellules sont récoltées avec 200 µl de trypsine/EDTA 1X. Pour chaque condition de culture, deux puits sont traités de la même manière afin d'analyser en parallèle la prolifération des cellules par incorporation d'iodure de propidium (IP) et le phénotype des cellules endothéliales. L'analyse du phénotype des cellules endothéliales est réalisée par cytométrie en flux à l'aide des anticorps anti-HLA classe I (W6/32, 10 µg/ml) et anti-MICA (AMO1, 5 µg/ml) (cf paragraphe 4.2 du matériel et méthodes).

9.2. Analyse du cycle cellulaire par marquage de l'ADN à l'iodure de propidium

Parallèlement à l'étude du phénotype des cellules endothéliales en fonction des facteurs de croissance, pour chaque condition de culture, la prolifération des cellules endothéliales est analysée par la technique dite de "DNA content". Pour cela, un agent intercalant de l'ADN, l'IP est incorporé aux cellules pour analyser les différentes phases du cycle cellulaire. L'IP est un fluorochrome qui émet à 630 nm. Ce fluorochrome permet d'étudier les différentes phases du cycle cellulaire (phases G1, S et G2M).

Au cours de la phase G1, les cellules ont 2n chromosomes. Au cours de la phase S, les cellules synthétisent de l'ADN. Lorsque les cellules sont en phase G2, les cellules ont 4n chromosomes (Figure 10 A). L'incorporation d'IP au niveau de l'ADN permet d'analyser ces différentes phases du cycle cellulaire. Plus il y a d'ADN dans les cellules, plus la fluorescence émise par l'IP sera intense (Figure 10 B). La fluorescence est directement proportionnelle à la quantité d'ADN.

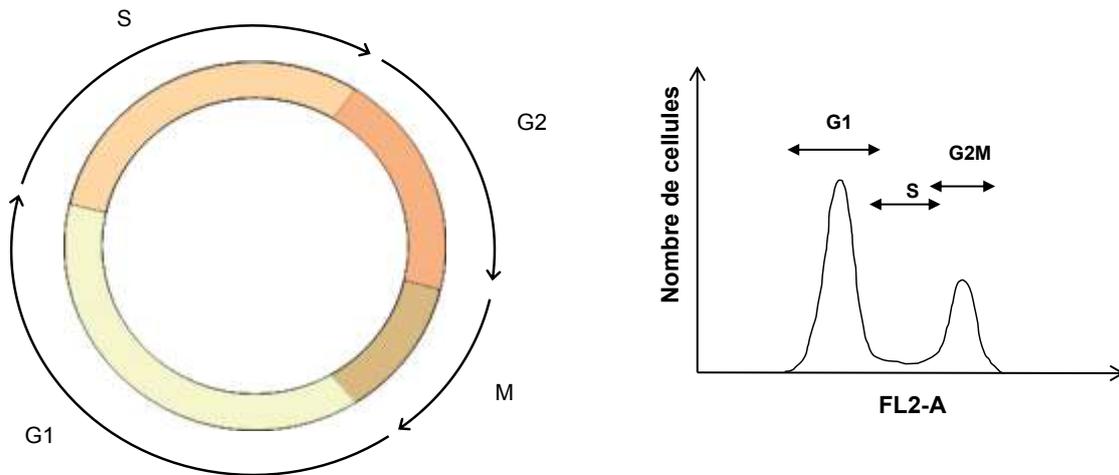


Figure 10 : Schéma explicatif du cycle cellulaire.

A – Diagramme représentatif des différentes phases du cycle cellulaire : G1, S, G2 et M.

B – Exemple type d'analyse des phases du cycle cellulaire après incorporation du iodure de propidium. La lecture est réalisée à l'aide d'un cytomètre en flux en FL2-A.

Une fois récoltées avec la trypsine/EDTA 1X, les cellules endothéliales sont lavées 3 fois avec du PBS par centrifugation (1500 rpm, 10 minutes, 4°C) puis sont fixées délicatement avec 1 ml d'éthanol 70% (-20°C) dilué dans du PBS. Les cellules sont ensuite incubées une nuit à 4°C puis centrifugées à 2500 rpm pendant 10 min à 4°C et lavées avec du PBS. Pour le marquage, 37,5 µl d'une solution contenant 1 mg/ml de Glucose et 10 mg/ml de RNase A dans du PBS sont ajoutés dans chaque condition de culture puis 300 µl de Glucose/RNase A/IP (50 µg/ml) par condition. Les cellules sont immédiatement analysées à l'aide d'un cytomètre en flux de type FacsCalibur®.

Afin d'étudier les différentes phases du cycle cellulaire, la fluorescence émise par l'iodure de propidium est lue en FL2-A, ce qui permet de séparer les phases G1, S et G2M (Figure 10 B).

10. Etude des voies de signalisation

10.1. Etude des voies de signalisation impliquées dans la régulation de MICA

Pour étudier les mécanismes moléculaires impliqués dans la régulation de l'expression et des fonctions de MICA, plusieurs inhibiteurs chimiques ont été utilisés. Le mécanisme de glycosylation des protéines est inhibé par la tunicamycine (Calbiochem) pendant le traitement par les cytokines. La galardine, inhibiteur des métalloprotéases (GM6001, 10, 50 et 100 μ M, Calbiochem) est ajoutée dans le milieu de culture pendant la durée du traitement par les cytokines. La voie de signalisation de NF κ B est inhibée par du PDTC (pyrrolidine dithiocarbamate, 50 et 100 μ M) ; la voie de la PI3 Kinase par de la wortmannine (50 et 100 nM, Sigma-Aldrich) et du LY294002 (10 μ M, Sigma-Aldrich). Pour inhiber la voie des MAP Kinases, du U0126 (10 μ M) et PD98059 (50 μ M) inhibiteurs de Erk1/2, du SB203580 (10 μ M), inhibiteur de p38 et du SP600125 (10 μ M), inhibiteur de Jnk (Calbiochem) ont été ajoutés dans les cultures cellulaires pendant 1h avant le traitement par les cytokines.

Après le traitement, les cellules ont été décollées avec de la trypsine/EDTA 1X puis analysées par cytométrie en flux (cf. paragraphe 4 du matériel et méthodes).

10.2. Voies de signalisation après interaction des anticorps anti-HLA classe II avec les cellules endothéliales

Dans le cadre d'une étude portant sur l'effet des anticorps anti-HLA classe II sur les cellules endothéliales réalisées au sein de notre équipe, différentes voies de signalisation ont été analysées par Western Blot.

Pour cette étude, les HAEC ont été traitées pendant 72h avec de l'IFN γ (100 U/ml), ce qui permet d'induire l'expression des molécules HLA de classe II. A la fin de cette période d'activation, l'anticorps IgG2a anti-HLA-DR (HLA-DRB1 + DRB4) de souris (clone L243, 10 μ g/ml) (BD Biosciences) est ajouté dans les cultures selon une cinétique de 15 min à 4h. Toutes les cellules sont lysées à la fin du traitement selon la technique décrite.

Parallèlement, les cellules Raji sont également traitées avec l'anticorps anti-HLA-DR selon la même cinétique que pour les cellules endothéliales, puis lysées selon le même protocole. Ces cellules seront étudiées en parallèle des cellules endothéliales.

Pour étudier les voies de signalisation, les lysats cellulaires sont analysés selon la technique de Western Blot (cf. paragraphe 6.3 du matériel et méthodes) sur gel SDS-PAGE de 10 à 15%.

Dans un premier temps, la phosphorylation des tyrosines a été étudiée en réponse à la fixation des anticorps anti-HLA-DR à l'aide de l'anticorps anti-phospho-tyrosine (clone 4G10) de souris. Puis la voie de la protéine kinase C a été analysée à l'aide d'anticorps anti-PKC pan et anti-PKC α/β . Enfin, la voie de la PI3 Kinase a également été étudiée par Western Blot. Pour cela, la phosphorylation de la molécule Akt a été analysée.

11. Analyse statistique

Les résultats de cytométrie en flux et les tests de cytotoxicité représentent une moyenne de trois expériences différentes minimum. Les résultats de cytométrie en flux sont exprimés en moyenne de fluorescence (MFI) \pm écart standard à la moyenne (SEM) ou bien en pourcentage d'expression par rapport à une condition contrôle \pm SEM. Les résultats des tests de cytotoxicité sont exprimés en pourcentage de lyse spécifique, les données représentées dans les graphiques correspondent à la moyenne de plusieurs expériences \pm SEM.

Les figures de Western Blot et d'analyse du cycle cellulaire sont représentatives de trois expériences.

Pour analyser les résultats, des tests statistiques non paramétriques ont été utilisés. Le test de Student permet de comparer deux conditions d'expression et le test "one-way-ANOVA" permet de comparer plusieurs conditions. Nous considérons que les expériences sont significatives lorsque $p < 0,05$.

Résultats

A - Etude de l'expression et de la régulation de MICA par les cellules endothéliales vasculaires humaines.

Une partie des résultats montrés dans cette partie font l'objet d'un article soumis pour publication et présentés dans l'annexe 1

A. Chauveau, M. Chatelais, S. Coupel and B. Charreau.

Endothelial cell activation and proliferation modulates NKG2D activity by regulating MICA expression and shedding. (2007) **article soumis (cf. annexe 1).**

1. Expression de MICA par les cellules endothéliales humaines

1.1. Etude comparative par cytométrie en flux

Les premiers travaux réalisés sur MICA suggéraient une expression de cette protéine restreinte à quelques types cellulaires et tissus normaux incluant les cellules endothéliales (Zwirner et al., 1998), les fibroblastes (Zwirner et al., 1999) ou l'épithélium intestinal (Groh et al., 1996). La première étape de mon travail de thèse avait pour objectif de mieux caractériser l'expression de MICA par les cellules endothéliales vasculaires humaines.

Pour cette étude, nous avons testé différents anticorps spécifiques de MICA (cf. Tableau 2), de MICB ou réagissant avec MICA et MICB. Ces anticorps ont tout d'abord été testés sur la lignée C1R transfectée avec MICA*008 établie par le Pr. Antoine Toubert (Hôpital Saint-Louis, Paris, France) (Tieng et al., 2002). La lignée "mère" C1R, non transfectée, est utilisée comme contrôle.

La Figure 11 A montre que l'expression de MICA à la surface des cellules C1R-MICA est détectée de façon différente selon l'anticorps utilisé. Seul l'anticorps MAB1300 ne permet pas de détecter la protéine MICA sur nos cellules C1R-MICA. Il est possible que cet anticorps ne reconnaisse pas l'allèle MICA*008. Les autres anticorps utilisés permettent une détection de MICA plus ou moins forte à la surface des C1R-MICA. Parmi ces anticorps, l'anticorps AMO1 permet la détection la plus importante (moyenne de fluorescence : 204,3 pour AMO1

contre 110,8 pour BAMO1 ; 53,4 pour 6D4 et 22,4 pour BAMO3). Ces anticorps ne reconnaissent rien à la surface des C1R, par conséquent ils sont spécifiques des protéines MIC.

Dans un second temps, la même étude a été réalisée sur les HAEC (Figure 11 B). Les résultats montrés dans la Figure 11 B confirment l'expression de MICA à la surface des cellules endothéliales humaines vasculaires (HAEC). En comparant les intensités d'expression, nous constatons que l'expression constitutive de MICA par les cellules endothéliales est plus faible que l'expression de MICA par les C1R-MICA (moyenne de fluorescence de 33,7 pour les HAEC contre 204,3 pour les C1R-MICA avec l'anticorps AMO1). L'expérience représentative montrée dans la Figure 12 B confirme aussi le profil de réactivité des différents anticorps testés et montre que l'anticorps AMO1 donne le plus fort signal (moyenne de fluorescence de 33,7 pour l'anticorps AMO1 contre 29,1 pour BAMO1 ; 16,4 pour MAB1300 ; 13,1 pour 6D4 et 8,9 pour BAMO3). Les différences d'intensité de signal observées pourraient être dues au fait que ces anticorps ne reconnaissent pas la même région de la protéine. Ainsi, l'anticorps BAMO3 reconnaît la chaîne $\alpha 3$ de la protéine MICA alors que les anticorps AMO1 et BAMO1 reconnaissent les chaînes $\alpha 1$ et $\alpha 2$ de MICA.

Par conséquent, à l'issue de ces expériences, nous avons choisi d'utiliser l'anticorps anti-MICA AMO1 (dirigé contre MICA uniquement) pour notre analyse de l'expression de MICA par cytométrie en flux.

- Etude comparative de l'expression constitutive de MICA

D'après les travaux réalisés initialement par les équipes de N. Zwirner et de V. Groh, l'expression de MICA est restreinte aux cellules tumorales et à un petit nombre de cellules comprenant certaines cellules épithéliales, les monocytes, les fibroblastes, les kératinocytes (Groh et al., 1996; Zwirner et al., 1999; Zwirner et al., 1998). Les travaux de Zwirner et al. montrent aussi que les cellules endothéliales humaines (HUVEC) expriment MICA (Zwirner et al., 1999). Cependant, lorsque nous avons entrepris cette étude, l'expression de MICA par l'endothélium était encore peu documentée. Par conséquent, pour mieux caractériser l'expression de MICA par les cellules endothéliales, nous avons comparé, par cytométrie en flux, son expression constitutive à la surface des HAEC et de plusieurs lignées cellulaires. Cette analyse comparée, illustrée dans la Figure 12, indique que les HAEC ont un niveau d'expression de MICA relativement modeste en comparaison avec la lignée transfectée C1R-MICA ou les cellules épithéliales HeLa (moyenne de fluorescence de 33,7 pour les HAEC

contre 204,3 pour les CIR MICA et 98,9 pour les HeLa). En revanche, l'expression endothéliale de MICA est significativement supérieure à celle observée à la surface des différentes lignées leucocytaires et monocytaires testées. En effet, parmi ces lignées, seules les cellules K562 et Jurkat expriment faiblement MICA, les cellules Raji et U937 ne l'expriment pas. L'expression des molécules du HLA de classe I analysée en parallèle montre que l'expression de MICA n'est pas corrélée au niveau d'expression des molécules HLA de classe I classiques, détectée avec un anticorps anti-pan-HLA de classe I (clone W3/32). En effet, les cellules Jurkat, Raji et U937 qui expriment fortement les molécules HLA de classe I expriment peu (pour les Jurkat) ou pas (pour les Raji et les U937) MICA.

L'expression de MICA a été comparée parmi différents types de cellules (lignées de lymphocytes, monocytes, cellules épithéliales et cellules endothéliales) mais également selon la provenance des cellules endothéliales (cellules endothéliales provenant d'artères humaines : HAEC ou bien de veines ombilicales humaines : HUVEC). La Figure 13 montre que les HUVEC, comme les HAEC, expriment la protéine MICA à leur surface, HAEC et HUVEC expriment des niveaux forts et comparables de molécules HLA de classe I classiques (HLA-A, -B, -C) (Figure 13).

Au sein de notre équipe de recherche, nous avons mis en place un protocole d'isolement, de culture et de stockage systématique de cellules endothéliales (HAEC) à partir d'artères rénales ou aortes prélevées lors de transplantations dans notre centre (ITERT, CHU de Nantes, France). Cette "collection" comprend à ce jour une cinquantaine de cultures primaires des cellules endothéliales issues de donneurs. Ainsi, nous avons pu utiliser une partie de cette collection de cellules endothéliales provenant de différents donneurs pour évaluer la variabilité de l'expression de MICA par les cellules endothéliales. En comparant les HAEC de 7 donneurs différents, nous montrons que le niveau d'expression de MICA est comparable d'un donneur à l'autre comme le niveau d'expression des molécules HLA de classe I (Figure 14). Cependant, les moyennes de fluorescence des molécules MICA sont beaucoup plus faibles que celles des molécules HLA de classe I (moyenne de fluorescence de $24,2 \pm 2,6$ pour MICA contre $355,3 \pm 42,7$ pour HLA de classe I, $p < 0.01$, $n=7$) suggérant que MICA soit moins exprimée à la surface des cellules endothéliales que les molécules HLA de classe I classiques. Par ailleurs, nous n'avons pas observé de corrélation entre les niveaux d'expression de MICA et des molécules du HLA de classe I pour les différentes HAEC testées.

En comparaison avec l'expression de MICA, l'expression de la protéine MICB a été étudiée à la surface des différentes lignées de lymphocytes B (C1R, C1R-MICA et Daudi), de lymphocytes T (Jurkat) et de monocytes (U937) ainsi qu'à la surface des cellules endothéliales. Afin d'étudier l'expression de cette protéine par cytométrie en flux, un anticorps spécifique dirigé contre MICB, BMO1, a été utilisé. La Figure 15 montre que parmi les cellules testées seules les cellules de la lignée monocytöide U937 expriment MICB en l'absence de tout marquage spécifique avec l'anticorps anti-MICA. Ce résultat suggère que les cellules U937 expriment MICB mais pas MICA. Par contre avec la plupart des autres cellules testées, un marquage faible est détecté avec l'anti-MICB souvent associé à un marquage faible (Jurkat, Daudi) ou net (HAEC, CIRMICA) avec l'anti-MICA. Un marquage faible est aussi observé avec les cellules CIR. Il est donc difficile de conclure d'après cette expérience sur l'expression de MICB. L'interprétation la plus probable de ces observations étant que l'anticorps BMO1 donne un bruit de fond non spécifique important et/ou qu'il réagit aussi partiellement avec MICA (Figure 15).

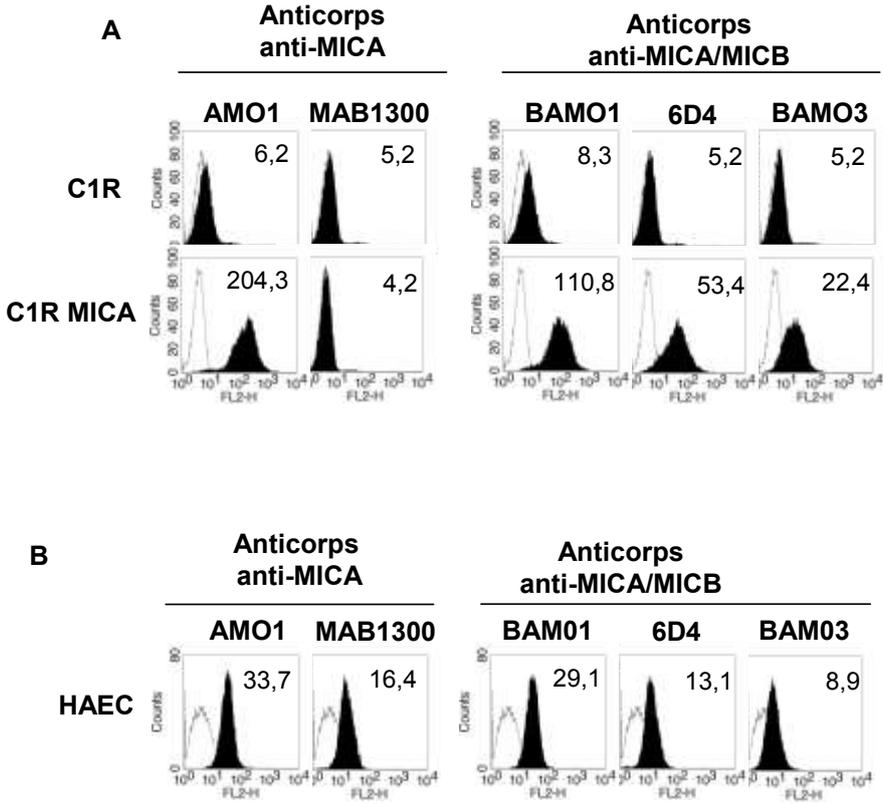


Figure 11 : Analyse de l'expression de MICA à l'aide de plusieurs anticorps.

L'expression de MICA est étudiée à la surface des cellules par cytométrie en flux. Plusieurs anticorps dirigés contre MICA ont été utilisés : les anticorps AMO1, BAMO1, BAMO3, 6D4, MAB1300.

A - Expression de MICA à la surface des cellules C1R et C1R-MICA, les cellules C1R servant de contrôle négatif pour l'expression de MICA.

B - Expression de MICA à la surface des HAEC.

L'histogramme noir correspond à l'expression de MICA, l'histogramme blanc correspond au contrôle négatif. Les moyennes de fluorescence sont indiquées sur chaque histogramme.

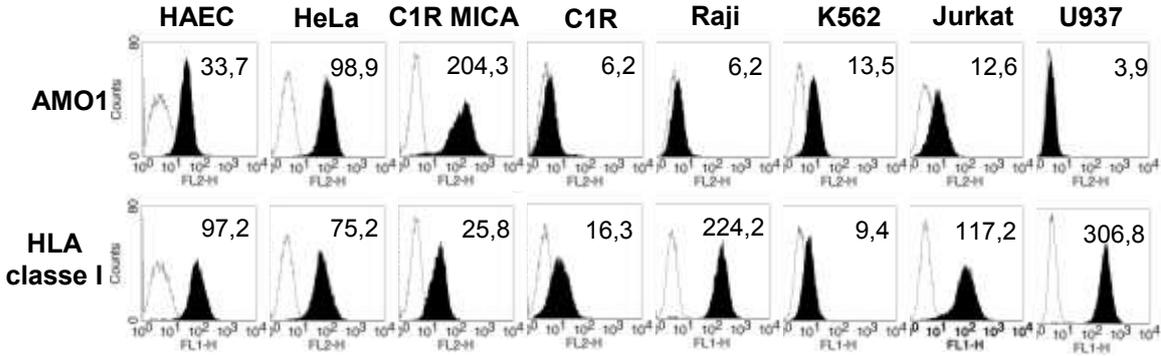


Figure 12 : Analyse comparative de l'expression constitutive de MICA par différentes cellules.

L'expression des protéines MICA (anticorps AMO1) et HLA de classe I (anticorps W6/32) est étudiée à la surface de différentes lignées cellulaires (HeLa, C1R-MICA, C1R, Raji, K562, Jurkat et U937) et des HAEC par cytométrie en flux. L'histogramme noir correspond à l'expression de MICA ou HLA de classe I, l'histogramme blanc correspond au contrôle négatif. Les moyennes de fluorescence sont indiquées sur chaque histogramme.

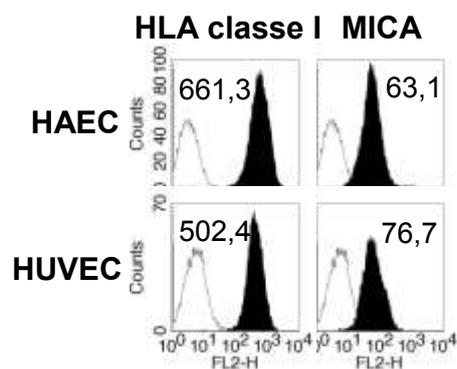


Figure 13 : Analyse de l'expression constitutive de MICA et de HLA de classe I par les HAEC et HUVEC. Les cellules endothéliales analysées par cytométrie en flux à l'aide des anticorps AMO1 et W6/32 révélés à l'aide d'un anticorps secondaire anti-souris couplé au PE. L'histogramme noir correspond à l'expression de MICA ou de HLA de classe I, l'histogramme blanc correspond au contrôle négatif. Les moyennes de fluorescence sont indiquées sur chaque histogramme.

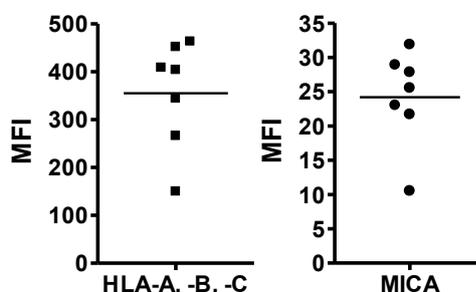


Figure 14 : Analyse comparative de l'expression de MICA par différentes HAEC. Les cellules endothéliales de 7 donneurs sont analysées par cytométrie en flux à l'aide des anticorps monoclonaux AMO1 (anti-MICA) et W6/32 (anti-HLA de classe I). L'expression des molécules du HLA de classe I et de MICA est exprimée en moyenne de fluorescence. La barre horizontale correspond à la moyenne des 7 valeurs.

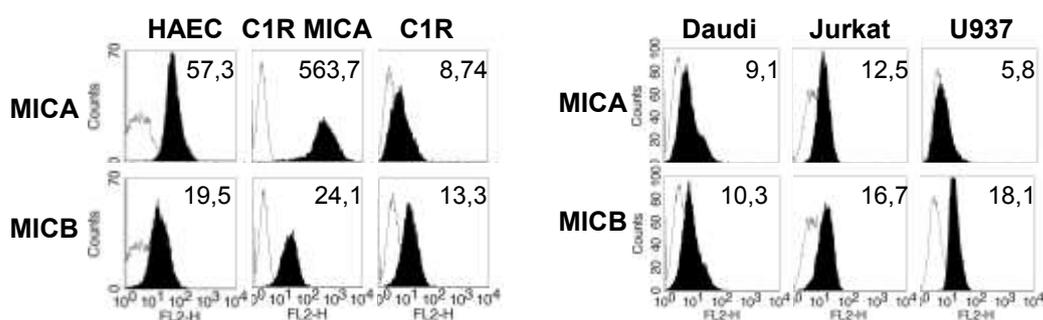


Figure 15 : Analyse comparative de l'expression de MICA et de MICB. L'expression de MICA et de MICB est analysée à la surface des HAEC, des lignées cellulaires C1R, C1R-MICA, Daudi, Jurkat et U937 par cytométrie en flux à l'aide des anticorps AMO1 et BMO1 révélés à l'aide d'un anticorps secondaire anti-souris couplé au PE. L'histogramme noir correspond à l'expression de MICA ou de MICB, l'histogramme blanc correspond au contrôle négatif. Les moyennes de fluorescence sont indiquées sur chaque histogramme.

1.2. Etude de la localisation intracellulaire de la protéine MICA dans les cellules endothéliales.

Pour poursuivre la caractérisation de l'expression constitutive de MICA par les cellules endothéliales, nous avons cherché à définir son expression intracellulaire par microscopie confocale. Pour cela, les cellules ont été perméabilisées avec du Triton X 0,1% puis marquées avec l'anticorps dirigé contre MICA (AMO1) ou contre les molécules HLA de classe I classiques (W6/32). Les noyaux sont visibles grâce à un marquage au Topro3. Nous pouvons observer (Figure 16 A) que la molécule MICA est présente dans le cytoplasme des cellules endothéliales. Comme pour son expression membranaire, l'expression intracytoplasmique de MICA est moins intense que celle des molécules du HLA de classe I.

Au moyen d'un double marquage, nous montrons la localisation de MICA au niveau intracellulaire (Figure 16 B). La protéine MICA est détectée à l'aide de l'anticorps AMO1 révélé par un anticorps anti-souris couplé au FITC (marquage en vert). Afin de localiser cette protéine au niveau intracellulaire, la rhodamine-B-hexyl ester (émission en rouge) a été utilisée pour marquer le réticulum endoplasmique, l'appareil de Golgi est visualisé grâce à un anticorps anti-golgin-97 révélé par un anticorps secondaire anti-souris couplé au TRITC (marquage en rouge). Après superposition des marquages, nous constatons que la protéine MICA est co-localisée avec le réticulum endoplasmique (marquage en jaune) alors que la co-localisation avec l'appareil de Golgi n'est que partielle. Au niveau intracellulaire, la protéine MICA est présente essentiellement dans le réticulum endoplasmique avant d'être présentée à la surface des cellules endothéliales.

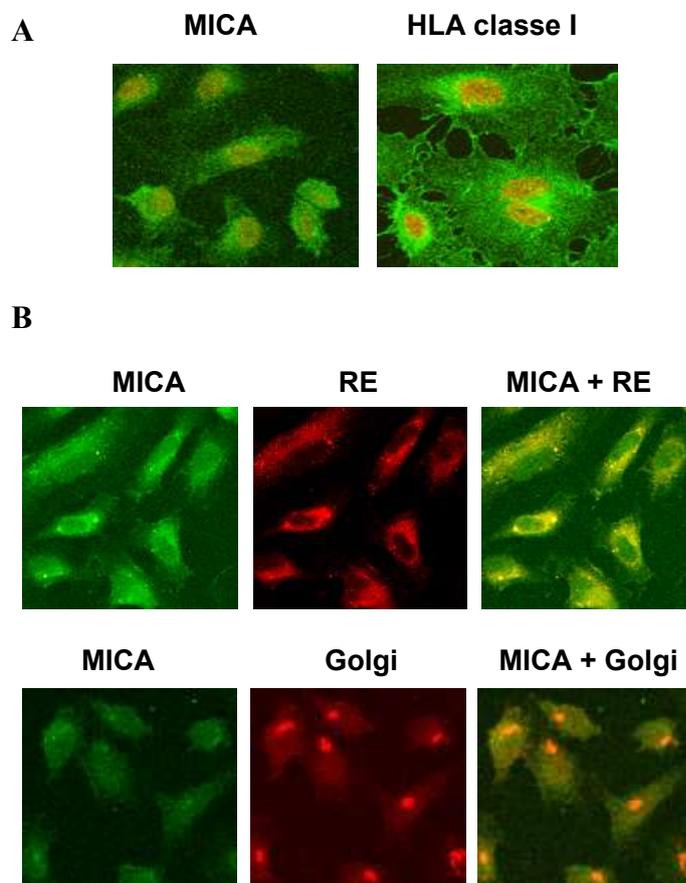


Figure 16 : Expression intracellulaire de MICA dans les cellules endothéliales humaines.

Les cellules endothéliales (HAEC) ont été analysées par microscopie confocale.

A - Marquage intracellulaire de HLA de classe I et de MICA dans des cellules endothéliales perméabilisées. Le noyau est marqué à l'aide du Topro3.

B - Marquage intracellulaire des cellules endothéliales montrant la co-localisation de MICA (en vert) avec le réticulum endoplasmique (RE ; en rouge) à l'aide de la rhodamine-B-hexyl ester ou avec l'appareil de Golgi (en rouge) à l'aide d'un anticorps anti-golgin 97, révélé avec un anticorps anti-souris couplé au TRITC.

1.3. Essai de détection de MICA par la technique de Western Blot

Dans le but d'utiliser une autre méthode d'étude de l'expression de MICA, complétant l'analyse par cytométrie en flux, nous avons essayé de détecter la présence de la protéine MICA par la technique de Western Blot. Cette technique d'analyse permet d'étudier les protéines membranaires et cytoplasmiques après avoir lysé les cellules.

Dans un premier temps, plusieurs anticorps ont été testés pour détecter une protéine de fusion recombinante MICA-Fc (R&D Systems) afin de déterminer lequel était le plus sensible pour la détection de MICA dans nos lysats cellulaires. A cause de la glycosylation et de la présence du fragment Fc, le poids moléculaire de cette protéine recombinante est autour de 90-100 kDa, c'est-à-dire plus important que la protéine MICA seule (poids moléculaire autour de 60 kDa). Trois anticorps dirigés contre MICA ont été testés sur différentes quantités de la protéine recombinante MICA-Fc : les anticorps AF1300, MAB1300 et BAMO1. Les anticorps AF1300 (polyclonal) et MAB1300 (monoclonal) reconnaissent exclusivement MICA. L'anticorps BAMO1 permet de reconnaître MICA (allèles MICA*01, MICA*04, MICA*07, MICA*08) et MICB (allèle MICB*02).

Comme le montre la Figure 17, nous pouvons constater que les trois anticorps permettent de détecter la protéine recombinante MICA-Fc. Pour une quantité de 25 ng de protéine recombinante MICA-Fc, nous observons que l'intensité de la bande obtenue avec l'anticorps BAMO1 est plus importante qu'avec les autres anticorps. De plus, l'anticorps BAMO1 est plus sensible que les autres anticorps puisqu'il permet de détecter jusqu'à 2 ng de protéine MICA contrairement aux anticorps MAB1300 et AF1300 (signal plus faible à 10 ng). L'anticorps BAMO1 semble donc le plus adapté pour la détection de la protéine MICA par la technique de Western Blot.

Dans un second temps, nous avons cherché à détecter l'expression de MICA dans différents lysats cellulaires (C1R, C1R-MICA, HeLa et cellules endothéliales) à l'aide de l'anticorps BAMO1. Comme l'indiquaient nos résultats sur l'expression membranaire obtenus par cytométrie en flux, nous confirmons la présence de MICA dans les cellules C1R-MICA, les cellules épithéliales HeLa ainsi que les cellules endothéliales (HAEC et HUVEC) mais pas dans les cellules C1R (Figure 18). La réhybridation de la membrane avec un anticorps dirigé contre la GAPDH sert de contrôle de quantité de protéines déposées sur le gel.

La Figure 18 confirme également que le niveau d'expression varie selon les types cellulaires et que les cellules épithéliales de la lignée HeLa expriment MICA plus fortement

que les cellules endothéliales testées (HAEC et HUVEC). De plus l'analyse par Western Blot attribue à la protéine MICA un poids moléculaire variant de 55 kDa à 70 kDa selon les cellules. Cette variation de taille de MICA est probablement due au degré de glycosylation de cette protéine qui peut varier selon les types cellulaires comme cela a été décrit (Spreu et al., 2006; Steinle et al., 2001).

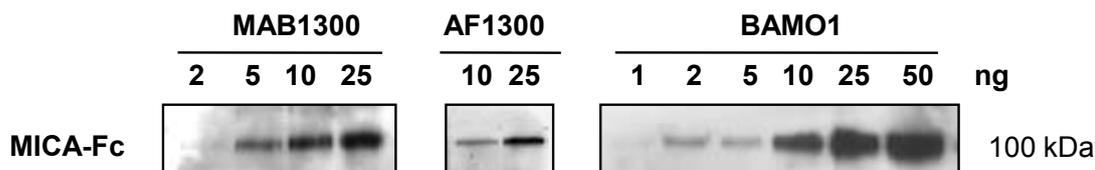


Figure 17 : Détection de la protéine recombinante MICA-Fc par différents anticorps anti-MICA.
Trois anticorps anti-MICA, AF1300, MAB1300 et BAMO1, sont testés pour détecter différentes quantités de la protéine MICA-Fc par Western Blot.

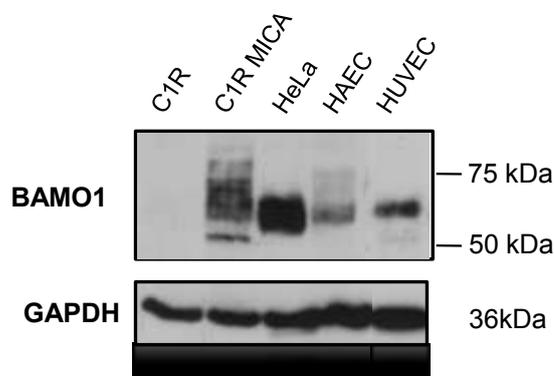


Figure 18 : Expression comparée de MICA dans les cellules endothéliales et épithéliales.
Les cellules C1R, C1R-MICA, HeLa et cellules endothéliales ont été lysées afin d’analyser par Western Blot l’expression de MICA. La membrane est hybridée avec l’anticorps anti-MICA BAMO1 puis deshybridée et réhybridée avec l’anticorps anti-GAPDH.

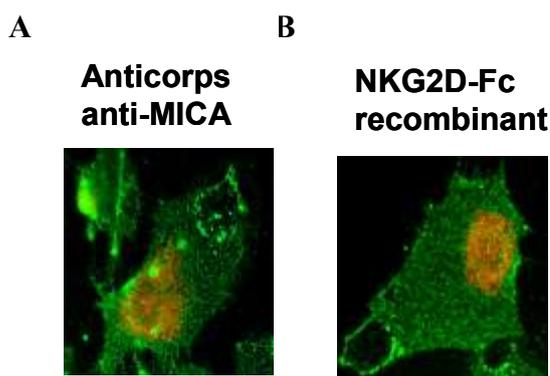


Figure 19 : Mise en évidence par microscopie confocale de l’interaction de MICA et de son récepteur NKG2D à la surface des cellules endothéliales.

A - L’expression de MICA est analysée après incubation avec un anticorps anti-MICA (AMO1) révélé par un anticorps secondaire couplé au FITC (marquage en vert).

B - Les cellules endothéliales sont incubées avec la protéine recombinante NKG2D-Fc. La détection de l’interaction NKG2D-MICA est réalisée à l’aide d’un anticorps anti-IgG couplé au FITC (marquage en vert).

Les noyaux des cellules endothéliales sont visualisés à l’aide de Topro 3 (marquage en rouge).

2. Mise en évidence du rôle fonctionnel de l'expression constitutive MICA par les cellules endothéliales

Les cellules NK sont des composants du système immunitaire qui interviennent dans la défense contre les cellules tumorales ou les cellules infectées par des virus ou des bactéries intracellulaires. Les cellules NK agissent par lyse cytotoxique dirigée contre ces cellules. Elles présentent à leur surface des récepteurs inhibiteurs (KIR et le complexe CD94/NKG2A) et activateurs (le complexe CD94/NKG2C et NKG2D). Ces récepteurs ont pour ligands des molécules de CMH de classe I classiques et non classiques (pour revues voir (Diefenbach et al., 2003; Vivier et al., 2002)). La protéine MICA est décrite comme étant un des ligands du récepteur activateur NKG2D présent à la surface des cellules NK et des lymphocytes T $\gamma\delta$ CD8⁺ (Bauer et al., 1999; Groh et al., 2001; Jamieson et al., 2002; Raulet, 2003). Après avoir confirmé la présence de la protéine MICA à la surface des cellules endothéliales, nous avons cherché à caractériser l'interaction NKG2D-MICA et d'analyser les conséquences fonctionnelles de cette interaction.

L'utilisation d'une protéine recombinante NKG2D-Fc (R&D Systems) nous a permis de mimer l'interaction du récepteur NKG2D avec son ligand MICA. Par microscopie confocale, nous observons que la protéine recombinante NKG2D-Fc se lie aux cellules endothéliales qui expriment MICA (Figure 19), ce qui indique que MICA exprimée à la surface des cellules endothéliales est capable d'interagir avec son récepteur NKG2D. Afin de mieux caractériser cette interaction, nous avons, dans un premier temps, étudié l'activité cytolytique des cellules présentant le récepteur NKG2D (cellules NK ou lignées de cellules NKL) vis-à-vis des cellules endothéliales. Dans un second temps, la modulation de l'expression du récepteur après interaction avec son ligand MICA a été analysée.

2.1. Mise en évidence de l'activité cytotoxique dépendante de NKG2D

Les cellules NK ont une activité lytique vis-à-vis des cellules étrangères ou modifiées. La balance entre les signaux activateurs et inhibiteurs reçus par leurs récepteurs va déterminer la fonction des cellules NK (Bauer et al., 1999). Le récepteur NKG2D est l'un des récepteurs activateurs. Afin d'étudier la fonctionnalité de l'interaction de MICA exprimé à la surface des cellules endothéliales humaines et le récepteur NKG2D exprimé par des cellules effectrices T CD8⁺ ou NK, nous avons utilisé un test de cytotoxicité cellulaire en présence de cellules NK fraîchement isolées de PBMC ou d'une lignée de cellules NK (NKL). Nous avons

tout d'abord mis au point ce test de lyse avec la lignée C1R transfectée avec l'ADNc de MICA*008 (C1R-MICA) exprimant de manière stable l'antigène MICA et qui est utilisée comme cellule cible. Pour cette mise au point, la lignée NKL, qui exprime de façon constitutive le récepteur NKG2D, est utilisée comme cellule effectrice. La quantité d'isotope radioactif (^{51}Cr) libéré par les cellules cibles est proportionnelle au pourcentage de lyse des cellules cibles par les cellules effectrices (NKL) et permet d'analyser, par la mesure de l'activité cytotoxique, l'activation des cellules NK. La Figure 20 A nous montre que les cellules C1R-MICA sont efficacement lysées par les cellules NKL ($56,1 \pm 6,3\%$ de C1R-MICA lysées pour un ratio E:C de 20:1, moyenne de 9 expériences). Dans les mêmes conditions, les cellules C1R, utilisées comme contrôle négatif de l'expression de MICA, sont faiblement lysées par ces cellules NKL ($18,3 \pm 4,7\%$ de cellules C1R, moyenne de 3 expériences). La lignée cellulaire C1R a pour caractéristique d'exprimer faiblement les molécules HLA de classe I classiques. Le pourcentage de lyse des cellules décroît avec le ratio Effectrice:Cibles. La différence de lyse spécifique entre les C1R-MICA et les C1R par les NKL est significative ($p < 0,05$ selon un test de Student) et montre que, dans nos conditions, l'activité cytotoxique est dépendante de l'interaction de NKG2D avec MICA exprimée par les cellules C1R-MICA. De plus, en utilisant des cellules NK purifiées comme cellules effectrices, nous observons une lyse des C1R-MICA identique à celle obtenue avec des NKL ($57,0 \pm 1,1\%$ de cellules lysées pour un ratio E:C de 20 :1, moyenne de 3 expériences) (Figure 20 B). Ces résultats confirment l'activation des cellules NK (NK purifiées à partir de PBMC et la lignée cellulaire NKL) en présence de cellules exprimant MICA.

En utilisant les cellules endothéliales (HAEC) comme cellules cibles, nous observons que les cellules NK purifiées lysent aussi les cellules endothéliales (Figure 20 B). En comparant l'activité cytolytique des cellules NK vis-à-vis des cellules endothéliales et des cellules C1R-MICA, nous constatons que la lyse des cellules endothéliales par les cellules NK est plus faible que celle des C1R-MICA ($62,3 \pm 4,4\%$ de C1R-MICA lysées contre $46,5 \pm 4,8\%$ de cellules endothéliales lysées pour le ratio E:C de 40:1). La Figure 20 B montre donc que l'activité cytotoxique des cellules NK est supérieure vis-à-vis des cellules C1R-MICA que des cellules endothéliales dont l'expression endogène de MICA est moins importante. Ces résultats suggèrent que cette différence entre HAEC et C1R-MICA pourrait être due à des niveaux d'expression différents de MICA à la surface de ces cellules. Par ailleurs, les cellules endothéliales humaines expriment à leur surface les molécules de CMH

de classe I classiques ainsi que d'autres molécules de CMH de classe I non classiques dont HLA-E (Coupel et al., 2007) qui peuvent également interagir avec les autres récepteurs des cellules NK, modifiant ainsi la balance entre les signaux activateurs et inhibiteurs et donc l'activité cytolytique des cellules NK.

Pour confirmer l'implication de MICA dans l'activation des cellules NK nous avons utilisé des anticorps bloquants spécifiques du récepteur NKG2D ou de MICA pour bloquer de façon sélective l'interaction NKG2D-MICA dans notre test de cytotoxicité. Dans un premier temps, l'efficacité du blocage a été testée en utilisant les C1R-MICA comme cibles et les NKL comme cellules effectrices. L'anticorps anti-NKG2D (2 µg/ml) a été incubé avec les cellules NKL avant la mise en contact avec les cellules C1R-MICA. Ces expériences nous ont permis de montrer que le blocage de NKG2D inhibe de façon significative la lyse des cellules C1R-MICA (inhibition de 45% à 55% par rapport à la lyse sans l'anticorps, $p < 0,05$) (Figure 21 A).

De la même manière, le blocage de l'interaction MICA-NKG2D avec l'anticorps anti-NKG2D pendant un test de cytotoxicité mettant en présence des cellules endothéliales (HAEC) et des cellules NK allogéniques, diminue de 15% la lyse cellulaire ($p < 0,05$) (Figure 21 B). Cette inhibition est dépendante de la quantité d'anticorps utilisée (Figure 22 A). Par conséquent, nos résultats indiquent que la lyse des cellules endothéliales par des cellules NK allogéniques est dépendante de la liaison NKG2D ce qui suggère que les cellules endothéliales peuvent activer les cellules NK via le récepteur NKG2D.

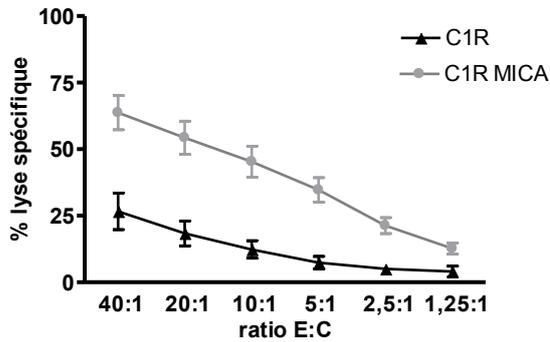
Pour confirmer la spécificité de l'anticorps anti-NKG2D, nous avons utilisé des anticorps anti-NKG2A et anti-NKG2C pour bloquer ces récepteurs respectivement inhibiteur (CD94/NKG2A récepteur de HLA-E) et activateur (CD94/NKG2C) des cellules NK. Contrairement au blocage de NKG2D, le blocage de ces 2 récepteurs n'a pas induit d'effet significatif sur la lyse des HAEC ou des C1R-MICA par les NK (Figure 22).

De façon complémentaire, nous avons cherché à bloquer l'interaction MICA-NKG2D en utilisant un anticorps bloquant de façon spécifique MICA (MAB1300, R&D Systems, à 1 µg/ml) dans un test de cytotoxicité utilisant des cellules C1R-MICA et les cellules NKL. Nous constatons que le blocage de MICA entraîne une diminution significative de 10 à 20%, selon les ratios E:C, de la lyse des C1R-MICA (Figure 23 A). Nous avons ensuite évalué l'effet du blocage de MICA sur l'activité cytolytique induite par les HAEC. Nos résultats

montrent que l'utilisation de cet anticorps bloquant anti-MICA au cours de la lyse des cellules endothéliales par les cellules NK ne permet pas d'obtenir un effet inhibiteur (Figure 23 B). Aucune inhibition n'a pu être obtenue quelle que soit la concentration d'anticorps utilisée (1, 2 ou 5 µg/ml).

L'ensemble des expériences de blocage montre que, quelle que soit la cellule cible, le blocage de NKG2D est plus efficace que celui de MICA, ce qui reflète peut être l'efficacité des différents anticorps bloquants utilisés dans notre étude. Ces résultats peuvent aussi indiquer que les cellules endothéliales, comme les cellules C1R, expriment d'autres ligands du récepteur NKG2D. En effet, NKG2D peut interagir avec de multiples ligands dont MICA et MICB mais aussi les protéines ULBP (*UL16 Binding Proteins*) (Borrego et al., 2002; Cao and He, 2004; Salih et al., 2003).

A



B

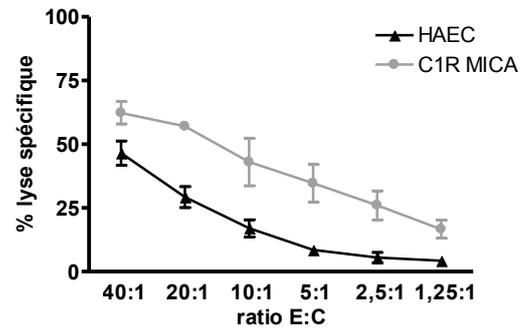


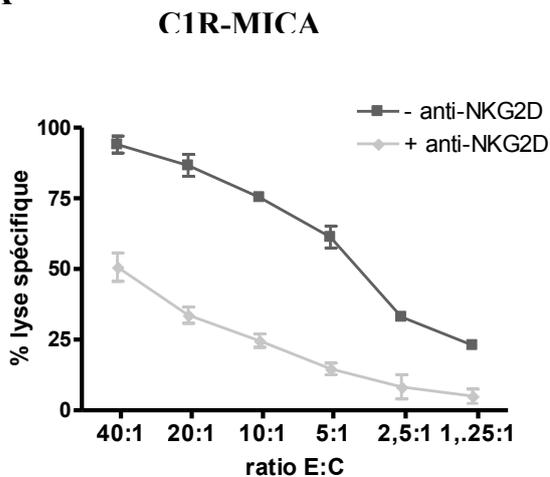
Figure 20 : Tests de cytotoxicité.

A - Lyse des C1R et C1R-MICA (cellules cibles) par les cellules NKL (cellules effectrices).

B - Comparaison de la lyse des C1R-MICA et des cellules endothéliales (cellules cibles) par les cellules NK (cellules effectrices).

Chaque graphique correspond à la moyenne de lyse spécifique de 3 expériences \pm SEM.

A



B

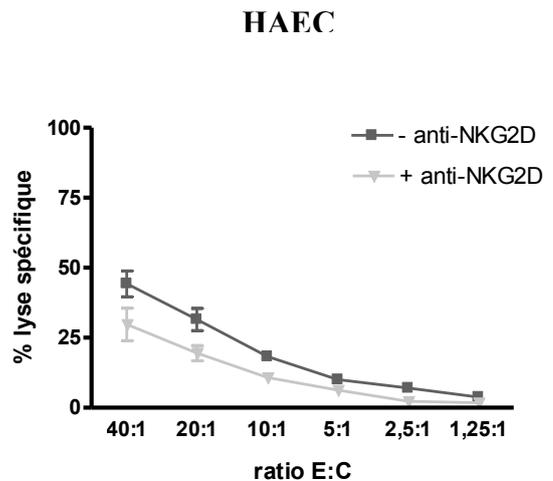


Figure 21 : Effet de l'anticorps anti-NKG2D sur la lyse des C1R-MICA et des HAEC.

A - Lyse des C1R-MICA (cellules cibles) par les cellules NKL (cellules effectrices) en présence ou non de l'anticorps anti-NKG2D à 2 μ g/ml.

B - Lyse des HAEC par les cellules NK en présence ou non de l'anticorps anti-NKG2D.

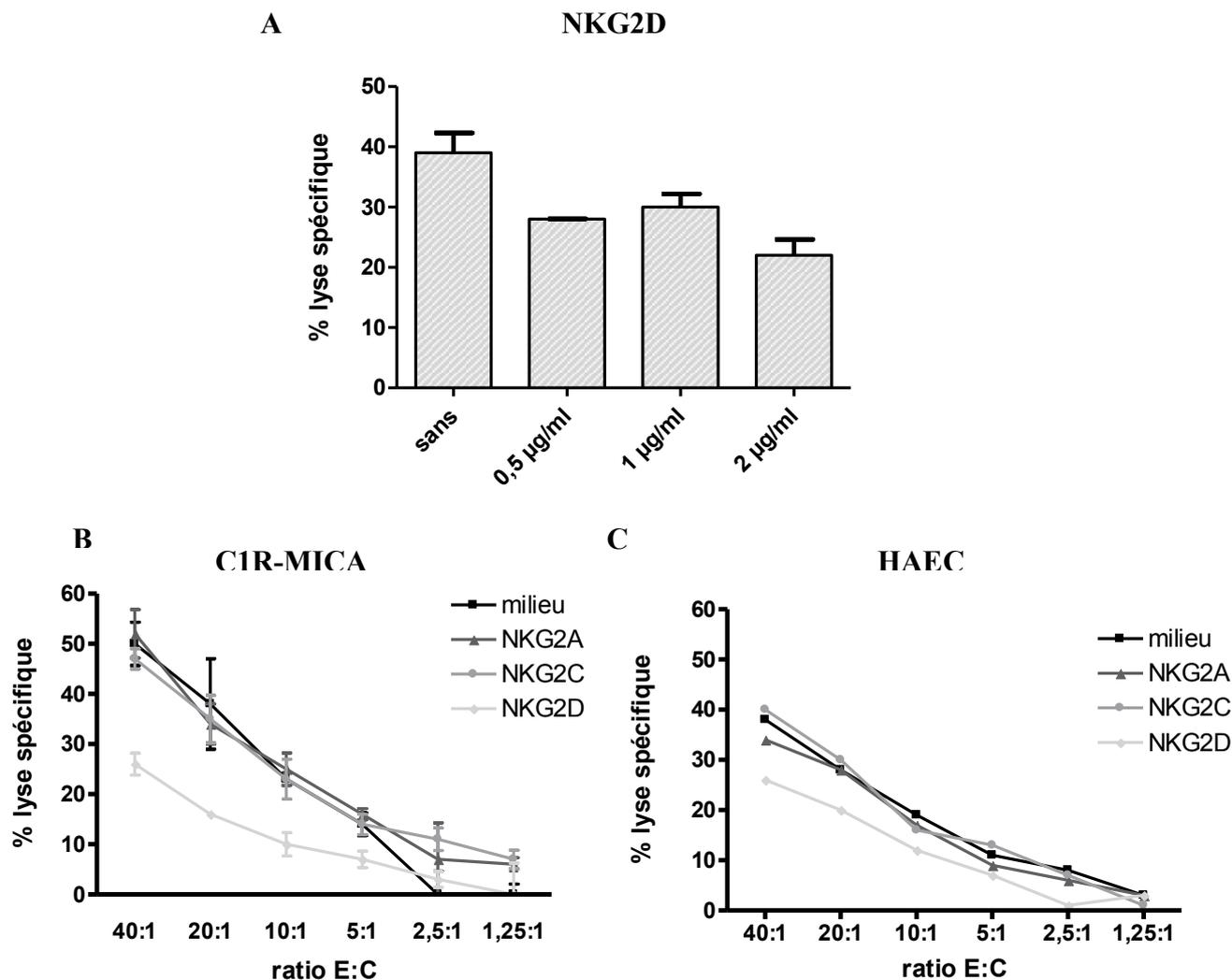


Figure 22 : Effet du blocage des récepteurs NKG2.

A – Effet de l’anticorps anti-NKG2D sur la lyse des HAEC par des cellules NK. L’anticorps anti-NKG2D est incubé avec les cellules NK à différentes concentrations : 0,5, 1 et 2 µg/ml pendant 20 minutes. Les cellules cibles (HAEC) sont mises en présence des cellules effectrices (NK) selon un ratio 40:1. Figure représentative.

B – Effet des différents anticorps anti-NKG sur la lyse des C1R-MICA par des cellules NKL. Les anticorps anti-NKG2A, anti-NKG2C et anti-NKG2D (1µg/ml) sont incubés avec les cellules NKL pendant 20 minutes. Les cellules cibles (C1R-MICA) sont mises en présence des cellules effectrices (NKL) selon un ratio 40:1. Figure représentative.

C – Effet des différents anticorps anti-NKG sur la lyse des HAEC par des cellules NK. Les anticorps anti-NKG2A, anti-NKG2C et anti-NKG2D (1µg/ml) sont incubés avec les cellules NKL pendant 20 minutes. Les cellules cibles (HAEC) sont mises en présence des cellules effectrices (NK) selon un ratio 40:1. Figure représentative.

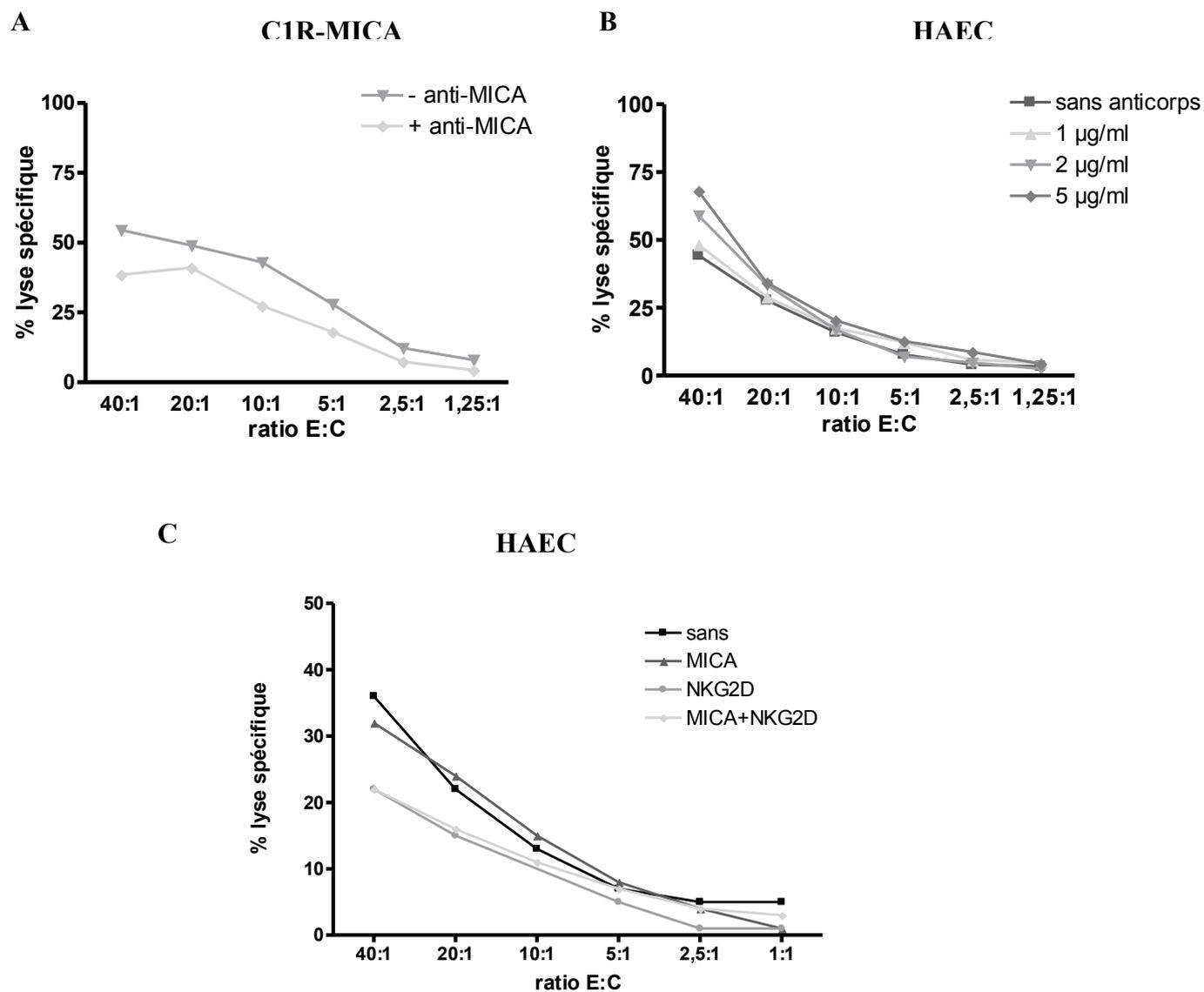


Figure 23 : Effet de l'anticorps anti-MICA sur la lyse des C1R-MICA et des HAEC.

A - Lyse des C1R-MICA (cellules cibles) par les cellules NKL (cellules effectrices) en présence ou non de l'anticorps anti-MICA (MAB1300) à 1 µg/ml.

B - Lyse des HAEC par les cellules NK en présence ou non de l'anticorps anti-MICA (MAB1300). Plusieurs concentrations d'anticorps anti-MICA sont utilisées (1, 2 et 5 µg/ml).

C - Effet comparé des anticorps bloquants MICA et NKG2D.

2.2. Effet de MICA sur la modulation de l'expression du récepteur NKG2D

La modulation de l'expression du récepteur NKG2D a été observée au cours d'une étude *in vitro* réalisée sur des souris diabétiques (souris NOD). L'expression de ce récepteur est diminuée à la surface des cellules NK des souris NOD et serait due à la co-expression du ligand RAE-1 par ces cellules (Ogasawara et al., 2003). Des travaux *in vivo* sur des souris transgéniques pour MICA ont permis de mettre en évidence que la présence permanente de MICA permet de diminuer l'expression de NKG2D sur des cellules NK et des cellules T CD8⁺ activées (Wiemann et al., 2005).

Pour poursuivre la caractérisation de l'expression de MICA par l'endothélium, nous avons analysé l'expression de récepteur NKG2D à la surface des cellules NKL dans un modèle de co-culture avec les cellules endothéliales vasculaires humaines (HAEC). L'expression du récepteur NKG2D a été analysée à la surface des cellules NKL par cytométrie en flux. La Figure 24 montre que les cellules NKL expriment différents récepteurs dont le CD94, NKG2D et NKG2A (moyenne de fluorescence respective de 211,6, 125,3 et 35,2 au cours de cette expérience).

2.2.1. Influence de la co-culture avec les cellules C1R-MICA

Da même que pour la mesure de l'activation des cellules effectrices NK, nous avons modélisé notre test au moyen des lignées C1R et C1R-MICA. Dans ces expériences, les cellules NKL sont mises en culture avec les cellules C1R ou C1R-MICA pendant 12h. Les cellules NKL, C1R et C1R-MICA sont des cellules en suspension. Afin de pouvoir distinguer les deux populations au cours de l'analyse, nous avons étudié simultanément l'expression des récepteurs NKG2D et CD94, deux récepteurs spécifiques des cellules NK. Les cellules C1R et C1R-MICA présentant un phénotype négatif par rapport aux cellules NKL pour ces deux récepteurs, nous pouvons observer, au moyen d'un "dot plot", 2 populations distinctes au cours de la co-culture (Figure 25 A) et sélectionner la population NKL (population double positive NKG2D⁺ CD94⁺), pour l'analyse montrée sous forme d'un histogramme indiquant la moyenne de fluorescence pour chaque condition (Figure 25 B).

La Figure 25 C montre l'expression du récepteur NKG2D et du récepteur CD94 suite à la co-culture des cellules NKL avec les C1R ou les C1R-MICA. Cette figure représente la moyenne de trois expériences. Nous constatons que l'expression de NKG2D est fortement réduite après une co-culture avec des C1R-MICA alors qu'elle ne l'est pas en présence des

cellules C1R ($53,4 \pm 2,1$ % de l'expression constitutive après co-culture avec les C1R-MICA, $p < 0,01$, versus $92,9 \pm 3,0$ % après la co-culture avec les C1R ; moyenne de trois expériences distinctes). Dans les mêmes conditions de culture, aucune variation d'expression du récepteur CD94 n'est observée après une co-culture avec les C1R-MICA ou C1R (Figure 25 C). Ces résultats montrent clairement que l'expression de MICA par les C1R-MICA entraîne une diminution significative et forte de l'expression du récepteur NKG2D.

2.2.2. Influence de la co-culture avec les cellules endothéliales

De la même façon, l'expression du récepteur NKG2D par les cellules NKL a été analysée après une co-culture avec des cellules endothéliales (HAEC) pendant 12h. Les surnageants de culture contenant les cellules NKL sont alors récupérés et les cellules NKL sont étudiées par cytométrie en flux. La Figure 25 D montre que l'expression de NKG2D à la surface des cellules NKL est fortement diminuée après incubation avec des cellules endothéliales (diminution de l'expression de 43% par rapport à l'expression constitutive, moyenne de 4 expériences, $p < 0,05$ selon un test de Student). Contrairement à NKG2D et comme attendu, l'expression du récepteur CD94 n'est pas modifiée par la co-culture avec les cellules endothéliales (moyenne de 3 expériences).

Nos résultats montrent donc que la co-culture de cellules NK avec des cellules exprimant MICA (C1R-MICA ou HAEC), diminue de manière importante et spécifique (pas d'effet sur CD94) l'expression du récepteur activateur NKG2D. Bien que l'expression de MICA à la surface des cellules endothéliales soit moins importante que celle des cellules C1R-MICA, l'expression de NKG2D est diminuée de la même manière en présence de MICA. Cette observation pourrait indiquer que des niveaux d'expression plus faibles sont suffisants pour avoir un effet modulateur sur l'expression du récepteur NKG2D alors que l'activation des NK et l'induction de l'activité cytolytique sont dépendantes du niveau d'expression de MICA.

Cette étude fonctionnelle montre aussi que l'expression de MICA à la surface des cellules endothéliales humaines a pour conséquence, selon le contexte et les conditions étudiées, un effet activateur des cellules effectrices NK conduisant une activation de la fonction cytotoxique et un effet protecteur résultant de la diminution du récepteur NKG2D à la surface des cellules effectrices.

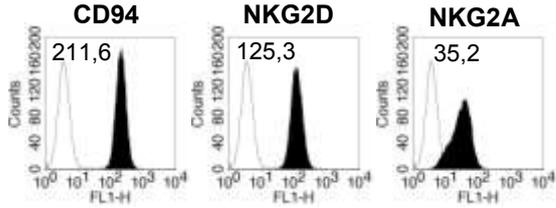


Figure 24 : Phénotype des cellules NKL.

Expression des récepteurs à la surface des NKL par cytométrie en flux à l'aide des anticorps (10µg/ml) dirigés contre CD94, NKG2A et NKG2D.

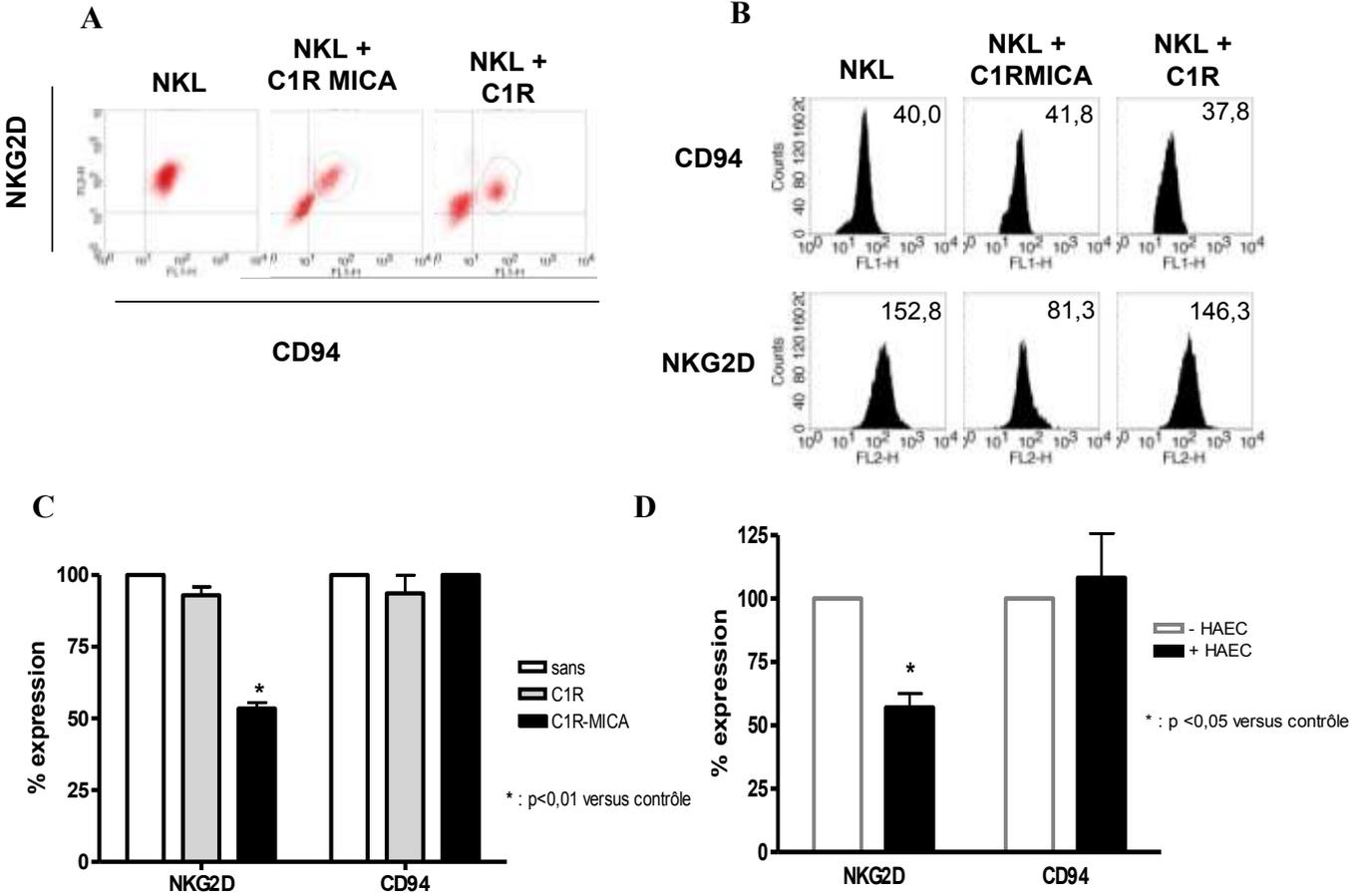


Figure 25 : Expression des récepteurs NKG2D et de CD94 après co-culture.

Les cellules NKL sont mises en culture avec les cellules C1R, C1R MICA ou cellules endothéliales. L'expression des récepteurs NKG2D et CD94 est analysée à la surface des cellules NKL par cytométrie en flux à l'aide des anticorps anti-NKG2D et anti-CD94.

A – Dot plot montrant l'expression de CD94 et NKG2D sur les NKL, NKL en co-culture avec les C1R et NKL en co-culture avec les C1R-MICA.

B – Histogramme représentatif montrant l'expression de CD94 et NKG2D après co-culture des NKL avec les C1R ou C1R-MICA après avoir sélectionné les NKL sur le dot plot.

C – Expression de CD94 et NKG2D à la surface des NKL après co-culture avec les C1R ou C1R-MICA.

D – Expression de CD94 et NKG2D à la surface des NKL après co-culture avec les cellules endothéliales.

Chaque histogramme (C et D) correspond à la moyenne de 3 expériences ± SEM

3. Régulation de l'expression de MICA et conséquences fonctionnelles

MICA est exprimée par un certain nombre de cellules (les cellules épithéliales, les cellules endothéliales, les cellules tumorales, etc.). Bien qu'elle ne soit pas présente de façon constitutive à la surface des lymphocytes T, l'expression de MICA est induite à la surface des lymphocytes T activés par de la phytohemagglutinine (PHA) (Zwirner et al., 1998) ou par l'engagement du complexe TCR/CD3 et la co-stimulation par CD28 (Molinero et al., 2002). L'expression de MICA peut donc être modulée par certains stimuli mais sa régulation reste encore mal définie surtout par les cellules endothéliales. Compte tenu de l'impact fonctionnel important de MICA que nous venons de montrer, il nous a paru important de mieux définir les conditions capables d'induire la régulation de MICA par les cellules endothéliales.

3.1. Régulation de MICA par les cytokines TNF α et l'IFN γ

Au cours de l'inflammation, des cytokines telles que le TNF α , l'IL1 β et l'IFN γ sont produites. Ces cytokines peuvent induire des modifications transcriptionnelles et fonctionnelles de l'endothélium. Ceci correspond à l'activation endothéliale. Ce phénomène se traduit par la synthèse de protéines à la surface de l'endothélium (Gerritsen and Bloor, 1993; Mantovani et al., 1997; Pober et al., 1996; Pober and Cotran, 1990a; Pober and Cotran, 1990b). Notre étude définit le profil de régulation de MICA après stimulation par des cytokines. Pour cela, les cellules endothéliales sont incubées des cytokines TNF α (100 U/ml) ou l'IFN γ (100 U/ml) pendant 24h, afin d'analyser l'expression de MICA par cytométrie de flux.

Pour vérifier l'activation des cellules endothéliales par les cytokines, nous avons analysé l'expression des molécules du HLA de classe I (HLA-A, -B, -C) au moyen d'un anticorps monoclonal pan-HLA de classe I (clone W6/32).

Comme décrit précédemment (Johnson, 2000; Johnson, 2003), nos résultats confirment que l'expression des molécules HLA de classe I par les cellules endothéliales est fortement augmentée au cours d'une activation des cellules par les cytokines TNF α et IFN γ (augmentation de 3,06 fois et 2,96 fois respectivement par rapport à l'expression constitutive, * $p < 0,05$). Contrairement aux molécules HLA de classe I, l'expression de MICA est régulée de façon modeste et différente en réponse à ces cytokines. Son expression est augmentée de 36% par un traitement de 24h au TNF α alors que le traitement à l'IFN γ diminue son expression de 45% (* $p < 0,05$) (Figure 26). Donc contrairement aux molécules de HLA de

classe I dont l'expression est fortement augmentée en réponse à l'IFN γ , nous montrons ici que l'IFN γ diminue de manière significative l'expression de MICA à la surface des cellules endothéliales vasculaires humaines.

3.2. Analyse des conséquences fonctionnelles de la régulation de MICA sur la modulation du récepteur NKG2D et sur l'activation dépendante de NKG2D des cellules NK.

Nous avons montré que l'expression de MICA par les cellules endothéliales est régulée au cours d'une activation par les cytokines TNF α et IFN γ . Nous avons étudié l'incidence qu'avait cette modulation d'expression sur l'expression de son récepteur NKG2D. Pour cette étude, les cellules endothéliales activées ou non par de l'IFN γ ont été mises en culture avec des cellules NKL pendant 12h. L'expression des récepteurs NKG2D et CD94 a été étudiée par cytométrie en flux. Comme le montre la Figure 27, lorsque les cellules NKL sont en présence des cellules endothéliales non activées l'expression du récepteur NKG2D est diminuée par rapport à l'expression basale. Cependant, lorsque les cellules endothéliales sont activées par de l'IFN γ , l'expression de ce récepteur NKG2D est plus élevée que l'expression après la co-culture avec les cellules endothéliales non activées : nous observons une diminution d'expression de NKG2D de 48,2% après une co-culture avec les cellules endothéliales non activées contre une diminution de 18,2% après une co-culture avec les cellules endothéliales activées par de l'IFN γ (*p<0,05). Ce résultat suggère que la diminution de l'expression de MICA à la surface des cellules endothéliales induite par l'IFN γ a pour conséquence d'empêcher la diminution de l'expression du récepteur NKG2D observée avec des cellules endothéliales non activées. En comparaison, l'expression du récepteur CD94, utilisé comme contrôle, n'est pas modulée par la présence des cellules endothéliales activées ou non par l'IFN γ .

Etant donné que le récepteur NKG2D est modulé suite à la co-culture des cellules NKL avec des cellules endothéliales activées ou non par de l'IFN γ , nous avons étudié l'incidence de cette modulation de l'interaction NKG2D-MICA sur l'activité cytolytique des cellules NK. Après avoir mis en culture les cellules NKL avec les cellules endothéliales, les cellules NKL sont utilisées comme cellules effectrices lors d'un test de cytotoxicité redirigée utilisant des cellules C1R-MICA comme cellules cibles. La diminution de l'expression de NKG2D à la surface des cellules NKL est vérifiée après la co-culture avec les cellules

endothéliales (Figure 28 B) ainsi que la diminution de l'expression de MICA par l'endothélium après l'activation par l'IFN γ (Figure 28 A). Ainsi, nous confirmons que l'expression de MICA est réduite lorsque les cellules endothéliales sont activées par l'IFN γ (MFI de 54,9 pour les cellules endothéliales non activées contre 37,2 pour les cellules endothéliales activées par l'IFN γ pour cette expérience représentative) et que l'expression du récepteur NKG2D est régulée suite à la co-culture avec les cellules endothéliales (MFI de 66,8 pour les NKL cultivées en présence des cellules endothéliales non activées, 83,2 pour les NKL cultivées en présence des cellules endothéliales activées par l'IFN γ contre 125,3 pour l'expression constitutive pour cette expérience représentative).

La modulation de NKG2D semble avoir un léger effet sur la lyse des cellules C1R-MICA. En effet, d'après la Figure 28 C, nous pouvons observer une baisse de la lyse des cellules C1R-MICA par les cellules NKL qui ont été, au préalable, en contact avec les cellules endothéliales non activées (environ 10 à 15% de d'inhibition de la lyse). En revanche, la lyse est restaurée lorsque les cellules NKL ont été en contact avec des cellules endothéliales activées par l'IFN γ .

Par conséquent, la modulation de l'expression de MICA par les cellules cibles ou bien la modulation de l'expression du récepteur NKG2D par les cellules effectrices modifie l'interaction NKG2D-MICA et semble avoir un effet sur l'activité des cellules NKL.

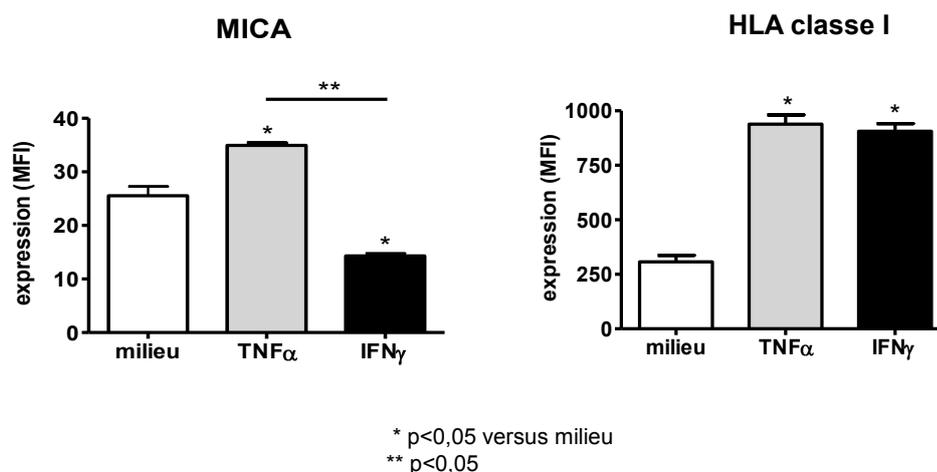


Figure 26 : Régulation de l'expression de MICA et HLA classe I par les cytokines TNF α et IFN γ .

Les HAEC sont cultivées en présence de TNF α (100 U/ml) ou IFN γ (100 U/ml) pendant 24h. Les expressions de MICA et HLA de classe I à la surface des cellules endothéliales sont analysées par cytométrie en flux. L'anticorps AMO1 est utilisé pour détecter MICA et l'anticorps W6/32 pour détecter HLA de classe I. Les moyennes de fluorescence (MFI) sont montrées sur l'histogramme.

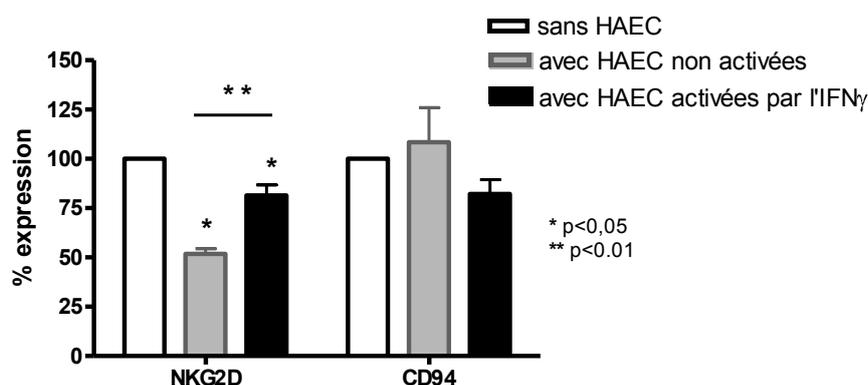
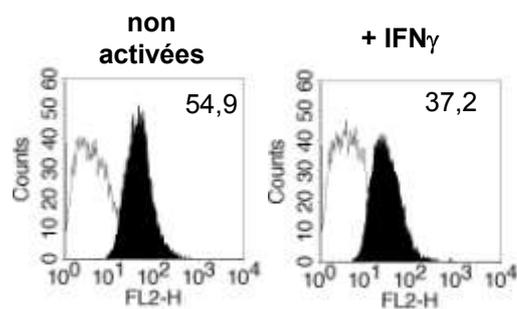


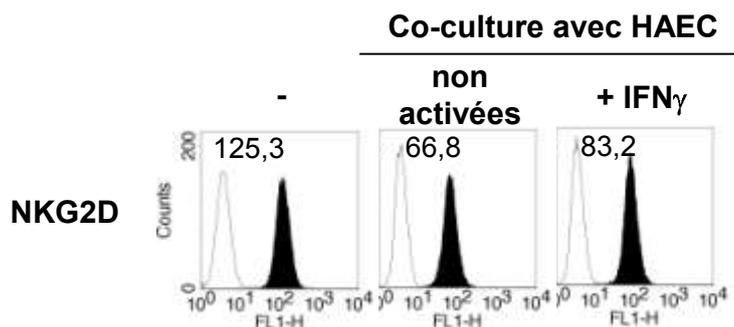
Figure 27 : Expression de NKG2D et de CD94 après co-culture avec des HAEC activées ou non par de l'IFN γ .

Les cellules NKL sont mises en culture avec des cellules endothéliales activées par de l'IFN γ ou non activées pendant 12h. L'expression des récepteurs NKG2D et CD94 est analysée par cytométrie en flux. Les résultats sont exprimés en pourcentage de fluorescence par rapport à l'expression constitutive des récepteurs.

A



B



C

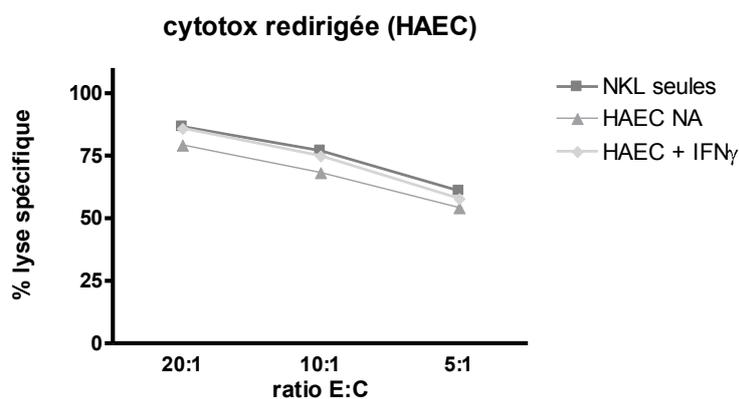


Figure 28 : Analyse de l'activité cytolytique des cellules NKL après modulation de l'expression du récepteur NKG2D.

L'expression du récepteur NKG2D est modulée par la co-culture des cellules NKL avec les cellules endothéliales activées ou non par de l'IFN γ . Les cellules NKL sont ensuite utilisées au cours d'un test de cytotoxicité dirigé contre les cellules C1R-MICA.

A – Expression de MICA à la surface des cellules activées ou non par de l'IFN γ . L'expression de MICA est représentée sous forme de dot blot sur lesquels sont indiquées les moyennes de fluorescences.

B - Expression de NKG2D à la surface des cellules NKL après la co-culture avec les cellules endothéliales activées ou non par de IFN γ . Les moyennes de fluorescence sont indiquées sur chaque histogramme.

C – Lyse des C1R-MICA par les cellules NKL qui ont été mises en culture au préalable avec les cellules endothéliales activées ou non par de l'IFN γ .

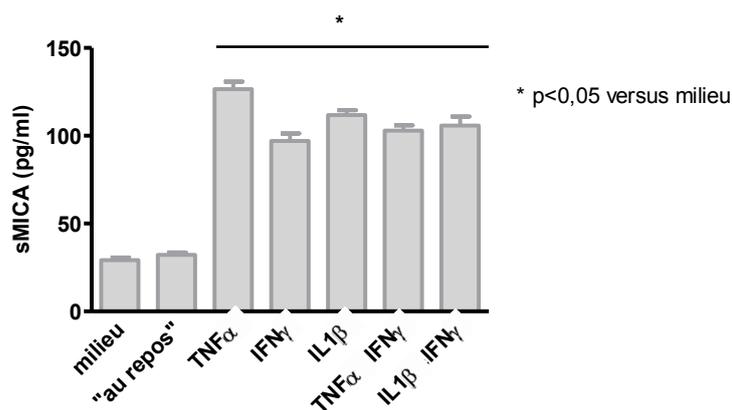


Figure 29 : Mise en évidence de la forme soluble de MICA.

Les cellules endothéliales sont activées par des cytokines : TNF α , IFN γ ou IL1 β pendant 24h. La détection de sMICA dans les surnageants de culture est réalisée par un test ELISA (Immatics).

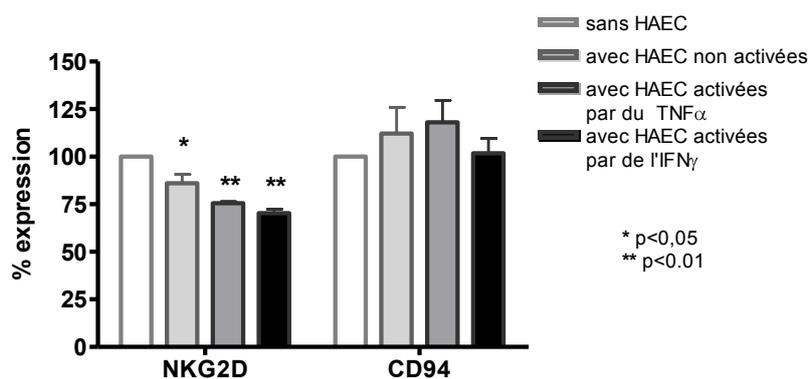


Figure 30 : Expression des récepteurs NKG2D et CD94 après co-culture avec des surnageants de culture de cellules endothéliales activées ou non.

Les cellules NKL sont mises en culture avec des surnageants de culture de cellules endothéliales activées ou non par du TNF α ou IFN γ pendant 36h. L'expression des récepteurs NKG2D et CD94 est analysée par cytométrie en flux. Les résultats sont exprimés en pourcentage de MFI par rapport à l'expression constitutive des récepteurs.

3.3. Mise en évidence de la forme soluble de MICA (sMICA) dans les surnageants de culture de cellules endothéliales

Plusieurs travaux ont montré la présence de la forme soluble de MICA dans des sérums de patients ayant des tumeurs (Groh et al., 2002; Rebmann et al., 2007; Salih et al., 2003; Salih et al., 2002) ou plus récemment dans le sérum de patients transplantés cardiaques (Suarez-Alvarez et al., 2006b). Au cours de notre étude, nous avons étudié l'expression de la forme soluble de MICA dans les surnageants de culture de cellules endothéliales activées ou non par des cytokines à l'aide d'un test ELISA. Ainsi, nous avons mis en évidence que les cellules endothéliales "au repos" ne produisent pas de sMICA alors que les cellules endothéliales activées par les cytokines ($\text{TNF}\alpha$, $\text{IFN}\gamma$ ou $\text{IL1}\beta$) en produisent ($32,1 \pm 1,4$ pg/ml pour les CE non activées contre $126,5 \pm 4,3$ pg/ml pour les cellules endothéliales activées par le $\text{TNF}\alpha$ et $97,0 \pm 4,3$ pg/ml pour les cellules endothéliales activées par l' $\text{IFN}\gamma$) (Figure 29). Bien que les quantités de sMICA détectées dans nos culture *in vitro* soient inférieures à 150 pg/ml, la présence de sMICA dans les surnageants de culture de cellules endothéliales activées par les cytokines est significative par rapport à la quantité présente dans les surnageants de culture de cellules endothéliales "au repos" (* $p < 0,05$). Cependant, les quantités de sMICA détectées dans nos cultures *in vitro* sont nettement inférieures à celles détectées dans les sérums de patients (Rebmann et al., 2007; Salih et al., 2003; Suarez-Alvarez et al., 2006b).

Pour confirmer la présence de sMICA dans les surnageants de culture de cellules endothéliales activées par des cytokines, nous avons étudié, de façon indirecte, l'effet de ces surnageants sur l'expression de NKG2D à la surface de cellules NK. Pour cela, les cellules endothéliales ont été activées par du $\text{TNF}\alpha$ ou de l' $\text{IFN}\gamma$ pendant 48h. Les surnageants de cultures ont été prélevés puis incubés avec les cellules NKL pendant 36h. A la fin de la culture, l'expression des récepteurs NKG2D et CD94 est analysée par cytométrie en flux. Nous constatons qu'en présence des surnageants de culture de cellules endothéliales, l'expression du récepteur NKG2D par les cellules NKL cultivées avec les surnageants de culture de cellules endothéliales non activées est diminuée de 15% par rapport à son expression constitutive (* $p < 0,05$) et est diminuée de 25 à 30% (* $p < 0,01$ par rapport à l'expression basale) avec les surnageants de cultures activées par les cytokines (Figure 30). Comme nous l'avons montré précédemment (Figure 29), les surnageants de cultures de cellules endothéliales activées par le $\text{TNF}\alpha$ ou l' $\text{IFN}\gamma$ contiennent du sMICA. Par conséquent,

la diminution de l'expression du récepteur NKG2D en présence de ces surnageants suggère un effet de sMICA sur la modulation du récepteur NKG2D. En comparaison, le récepteur CD94 n'est pas modifié de façon significative suite à la co-culture avec les différents surnageants de culture.

3.4. Régulation par le choc thermique

Le choc thermique entraîne, au niveau cellulaire et moléculaire, la synthèse de protéines dites "protéines de choc thermique" ou Hsp (*Heat Shock Proteins*). Le choc thermique traduit une réponse au stress. Cette famille de molécules Hsp comprend plusieurs membres dont Hsp70. Ces molécules possèdent des séquences essentielles pour l'expression des molécules Hsp en réponse aux stress dont le choc thermique. Ces séquences consensus sont appelées Heat Shock Element (HSE) et sont situées dans le promoteur des gènes. La séquence nucléotidique de MICA contient des séquences HSE qui présentent des homologies avec celles de Hsp70 humain (Bahram et al., 1996). MICA a été initialement décrit comme étant un gène de réponse au stress régulé par le choc thermique (Groh et al., 1996). L'augmentation des transcrits de MICA suite au choc thermique a été montré dans les cellules épithéliales (Groh et al., 1998).

Compte tenu de la faible régulation de MICA observée dans nos conditions en réponse aux cytokines TNF α et IFN γ , nous avons voulu étendre l'étude de la régulation de cette molécule à d'autres modes de stimulation ou d'activation dont le choc thermique et la prolifération cellulaire. Dans un premier temps nous avons cherché à reproduire l'effet du choc thermique décrit pour les cellules épithéliales HeLa (Groh et al., 1996). Le choc thermique a été défini pour nos expériences comme une période d'incubation de 1h à 42,5°C dans un incubateur avec 5% de CO₂ suivi d'une période de culture post choc thermique à 37°C allant de 2 à 24h. Suite à ce traitement, les cellules sont analysées par Western Blot et par cytométrie en flux. Les membranes de Western Blot ont été incubées avec un anticorps dirigé contre la protéine Hsp70 afin de confirmer l'induction d'un choc thermique puis avec un anticorps dirigé contre la GAPDH (servant de contrôle pour la quantité de protéines dans les différents échantillons déposés sur le gel). Nos résultats montrent une augmentation de l'expression de la protéine Hsp70 dès 2h d'incubation à 37°C après le choc thermique, ce qui valide notre modèle de choc thermique. L'expression de cette protéine est maximale après 4h d'incubation puis diminue jusqu'à retourner à son niveau basal à 12h. (Figure 31 A).

Après le choc thermique (culture à 42,5°C pendant 1h), les cellules endothéliales sont étudiées par cytométrie en flux afin d'analyser l'expression membranaire de MICA et de HLA de classe I (comme contrôle). D'après la Figure 31 B et C, nous n'avons pas observé de différence d'expression de MICA, ce qui suggère que MICA n'est pas régulée de façon significative à la surface des cellules endothéliales par un choc thermique d'une heure à 42,5°C suivi d'une période d'incubation à 37°C pendant une période de 2 à 24h. De même, l'expression membranaire des protéines HLA de classe I n'est pas modifiée dans ces conditions de traitement.

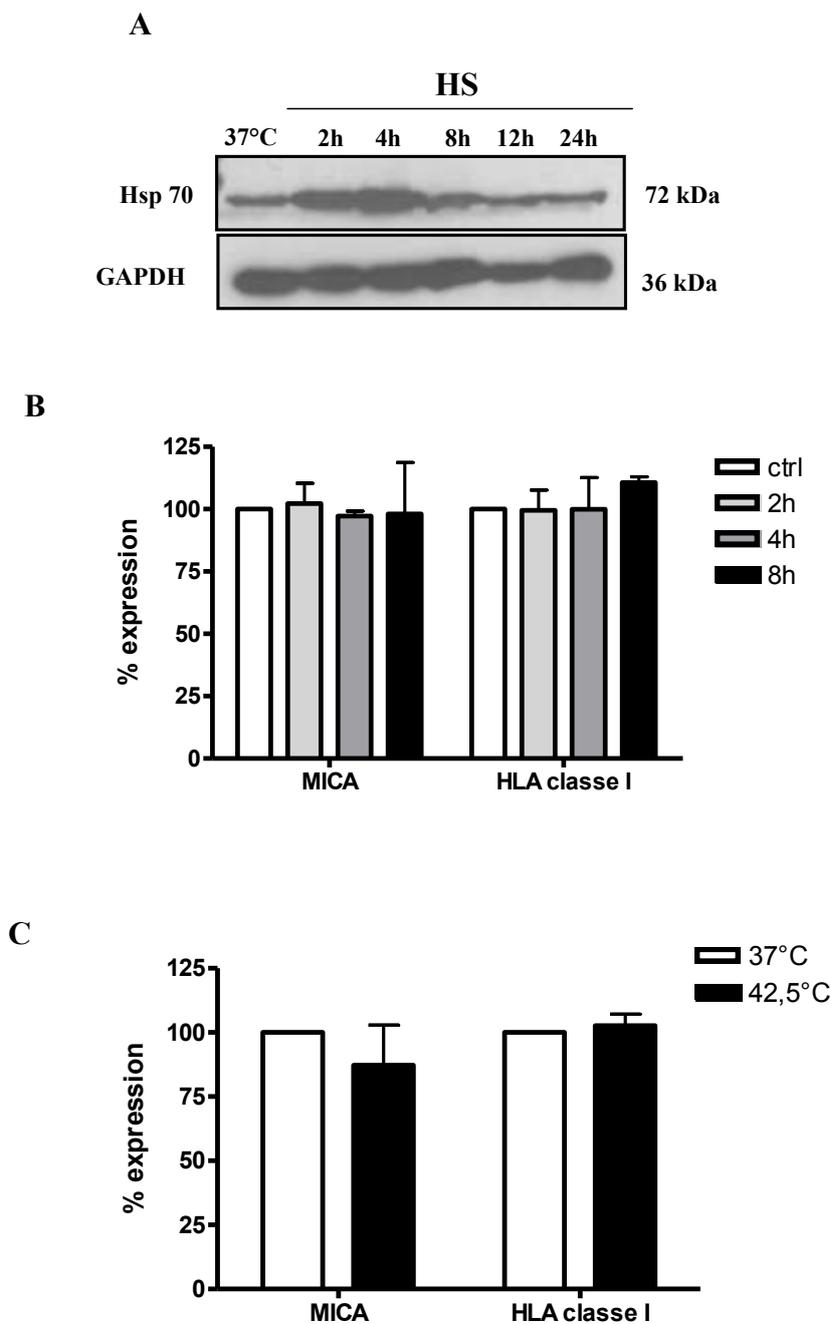


Figure 31 : Analyse de MICA sur des cellules endothéliales ayant subi un choc thermique.

A - Analyse de l'expression de Hsp70 par Western Blot. Les cellules endothéliales sont mises en culture à 42,5°C pendant 1h puis à 37°C pendant une période allant de 2 à 24h. Les lysats cellulaires sont ensuite analysés par Western Blot. La membrane est hybridée avec l'anticorps anti-Hsp70 puis deshybridée pour être à nouveau hybridée avec l'anticorps anti-GAPDH (contrôle).

B - Analyse de l'expression de MICA et HLA de classe I par cytométrie en flux. Les cellules endothéliales subissent un choc thermique à 42,5°C pendant 1h puis sont incubées à 37°C pendant 2, 4 ou 8h et sont analysées par cytométrie en flux à l'aide de l'anticorps anti-MICA (AMO1) et anti-HLA de classe I (W-/32). Les résultats sont exprimés en pourcentage de MFI par rapport à l'expression constitutive des récepteurs.

C- Les cellules endothéliales subissent un choc thermique à 42,5°C pendant 1h puis sont incubées à 37°C pendant 24h et sont analysées par cytométrie en flux

3.5. Régulation de MICA au cours de la prolifération cellulaire

Au cours de nos différents travaux, les cellules endothéliales ont été traitées ou activées à confluence après une période de culture dans un milieu ne contenant que 2 % de SVF et aucun facteur de croissance. Ces conditions de culture permettent d'obtenir un tapis cellulaire confluent constitué de cellules quiescentes et de limiter l'effet des conditions de culture et de croissance des cellules sur les phénomènes analysés. Cependant pour l'étude de la régulation de MICA il nous a semblé important d'évaluer l'effet de la prolifération sur l'expression de MICA. Pour cela, les cellules endothéliales (HAEC) ont été mises en culture de manière à obtenir différentes densités cellulaires (correspondant à des densités allant de 12,5% à 100% de confluence). L'expression de MICA dans les différentes conditions est alors analysée par cytométrie de flux.

Comme montré dans la Figure 32 A, l'expression de MICA est plus importante lorsque les cellules endothéliales ne sont pas confluentes et où elles prolifèrent. Cette expression diminue au fur et à mesure que les cellules endothéliales deviennent de plus en plus confluentes. A l'inverse, l'expression des molécules HLA de classe I ne varie pas selon l'état de la densité cellulaire. Il semble donc d'après ces expériences que les cellules endothéliales qui prolifèrent expriment plus fortement MICA à leur surface que les cellules quiescentes. Les travaux de Yizhou Zou ont également montré une diminution de l'expression de MICA à la surface des fibroblastes lorsque ces cellules sont à confluence (Zou et al., 2006).

Parallèlement à l'étude par cytométrie en flux, l'expression de MICA a été analysée par la technique de Western Blot. Un lysat de cellules épithéliales HeLa a été utilisé comme contrôle pour la détection de MICA par Western blot. En comparant l'expression de MICA dans des lysats cellulaires de cellules endothéliales avec des niveaux de densité cellulaires différentes (25, 50, 75 et 100% confluentes), nous confirmons les résultats obtenus par cytométrie en flux montrant la variation du niveau d'expression de MICA en fonction de la densité cellulaire (Figure 32 B). Ces expériences nous permettent de montrer un lien entre le niveau d'expression de MICA et la capacité des cellules endothéliales à proliférer.

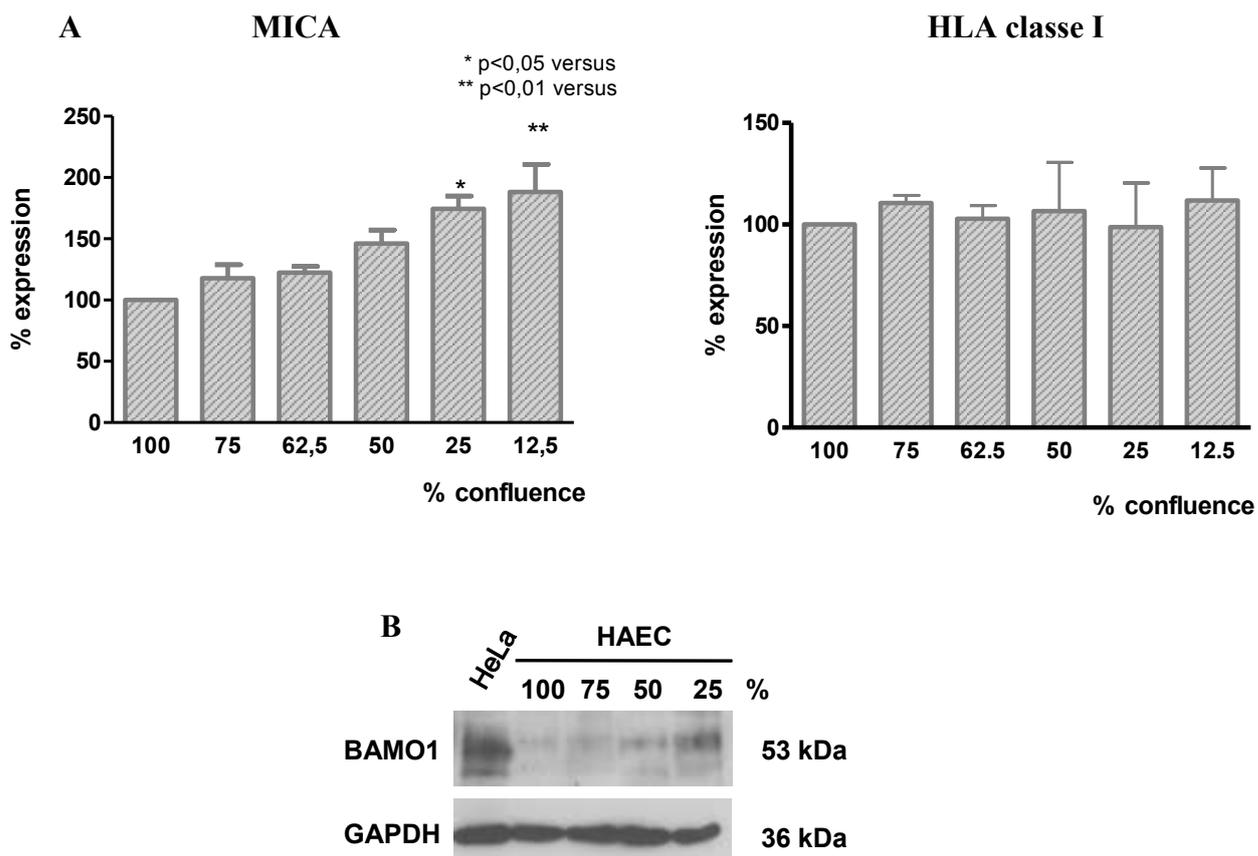


Figure 32 : Effet de la densité cellulaire sur l'expression de MICA et HLA classe I.

A – L'expression de MICA et de HLA de classe I est analysée à la surface des cellules endothéliales en fonction de la densité cellulaire par cytométrie en flux

B – L'expression de MICA est analysée à la surface des cellules endothéliales par Western Blot. La membrane est incubée avec l'anticorps anti-MICA BAMO1 puis deshybridée et réhybridée avec l'anticorps anti-GAPDH.

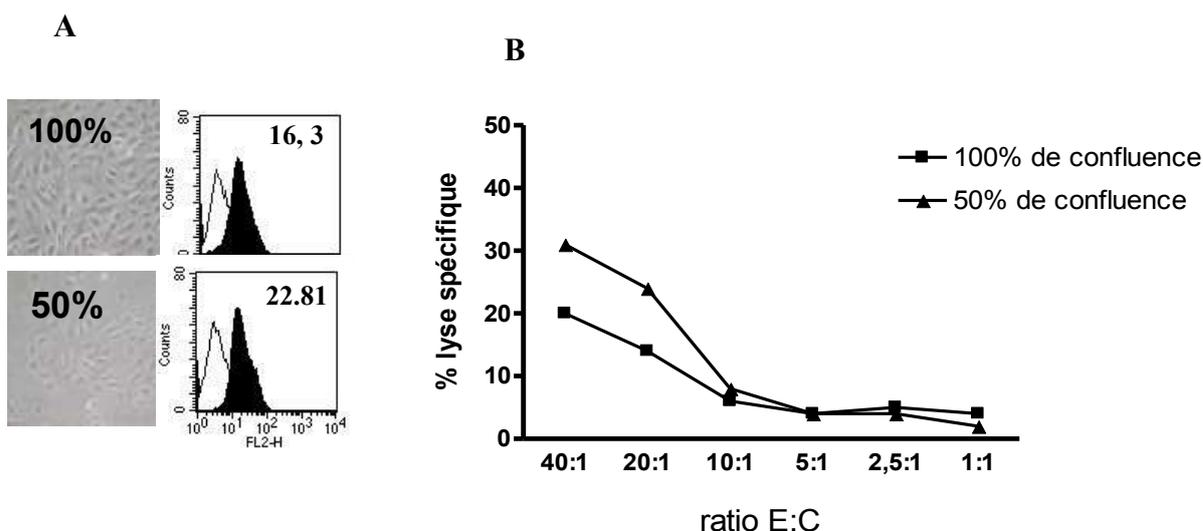


Figure 33 : Influence de la densité cellulaire des cellules endothéliales sur la lyse par les NK.

A – Phénotype des cellules endothéliales confluentes ou semi-confluentes. L'expression de MICA est analysée par cytométrie en flux. Les moyennes de fluorescence sont indiquées sur les histogrammes.

B – Lyse des cellules endothéliales à différentes densités par les cellules NK.

Afin de déterminer l'incidence de cette régulation, induite par la densité cellulaire, de MICA à la surface des cellules endothéliales sur la fonction cytolytique des cellules NKL, des cultures endothéliales confluentes à 100% et confluentes à 50% sont utilisées comme cellules cibles, les cellules NKL étant les cellules effectrices dans un test de cytotoxicité. Nos résultats indiquent que les cellules confluentes exprimant moins de MICA (Figure 33 A) sont moins lysées par les cellules NKL que les cellules endothéliales qui ne sont pas à confluence et qui donc expriment plus de MICA. Ce résultat confirme, par un effet fonctionnel, la régulation de MICA décrite ci-dessus.

Pour poursuivre l'étude de la prolifération cellulaire et son effet sur l'expression de MICA nous avons induit la prolifération des cellules endothéliales avec des facteurs de croissance dont le FGF-2 (*Fibroblast Growth Factor-2*) et le VEGF (*Vascular Endothelial Growth Factor*). L'étude de la prolifération cellulaire a été réalisée sur des cellules endothéliales semi-confluentes (densité cellulaire de 50%). Le milieu de culture des cellules endothéliales est remplacé par du milieu sans supplément de croissance auquel nous ajoutons du FGF-2 (5 et 20 ng/ml) ou du VEGF (10 et 25 ng/ml) pendant 24h. L'analyse de la prolifération est réalisée par analyse du cycle cellulaire après fixation des cellules et marquage des noyaux avec de l'iodure de propidium. Parallèlement à cette analyse, le phénotype des cellules endothéliales est étudié par cytométrie en flux. Comme pour toute notre étude, l'expression de MICA à la surface des cellules endothéliales est comparée à l'expression des molécules HLA de classe I.

La technique de "DNA content" permet d'analyser les cellules en fonction de la quantité d'ADN qu'elles possèdent, donc en fonction de la phase du cycle cellulaire dans laquelle elles se retrouvent. Pour l'étude de la prolifération, nous nous intéressons à la phase S (réplication de l'ADN). Les

Figure 34 A et Figure 35 B montrent les profils d'analyse du cycle cellulaire obtenus par cette technique. Nous pouvons constater qu'en présence de FGF-2, il y a plus de cellules endothéliales en phase S (18,7% versus 7% sans FGF-2), donc en phase de prolifération. L'effet du FGF-2 sur la prolifération est maximal dès 5 ng/ml de FGF-2 (Figure 34 A). Cependant, l'analyse par cytométrie en flux ne montre pas d'effet sur MICA (Figure 34 B).

De même, l'expression de HLA de classe I ne varie pas en fonction de la prolifération cellulaire induite par le FGF-2.

Dans ces conditions de culture et en présence de VEGF, nous observons un faible effet sur la prolifération endothéliale (13,6 *versus* 10,4% sans VEGF) (Figure 35 A). Quelle que soit la dose de VEGF ajoutée dans les cultures, l'expression de MICA et de HLA de classe I ne varie pas à la surface des cellules endothéliales (Figure 35 B).

Par conséquent, nos résultats montrent que dans les conditions de traitement que nous avons utilisées, le FGF-2, et à un moindre degré le VEGF, augmente le pourcentage de cellules endothéliales en phase S suggérant un effet prolifératif. Cependant, nos expériences ne mettent pas en évidence une variation nette de l'expression de MICA.

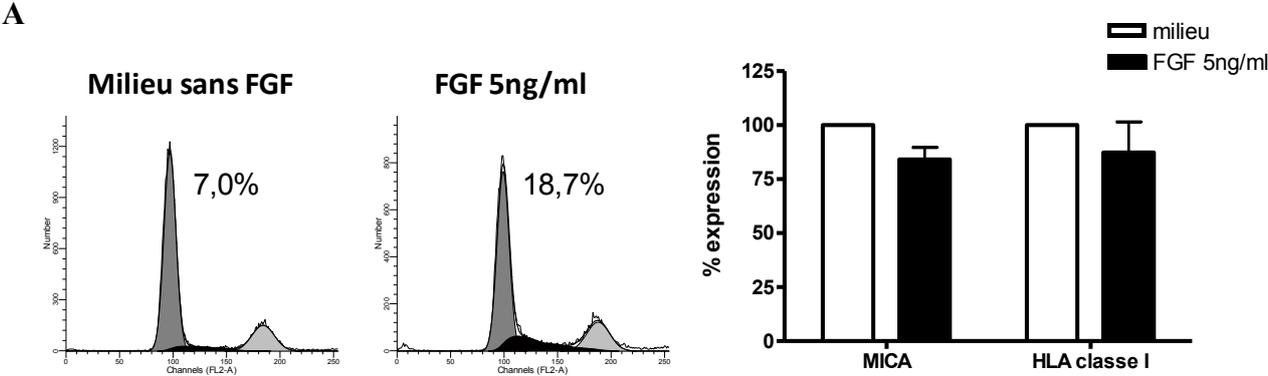


Figure 34 : Effet du FGF-2 sur les cellules endothéliales.
A – Effet du FGF-2 sur la prolifération des cellules endothéliales. Les cellules endothéliales sont cultivées en présence ou non de FGF-2. La prolifération des cellules est analysée à l’aide de iodure de propidium. Le pourcentage de cellules en phase S est indiqué sur chaque graphique. Figure représentative de 3 expériences.
B - Effet du FGF-2 sur l’expression de MICA et de HLA classe I. L’expression de MICA et de HLA de classe I à la surface de cellules endothéliales cultivées en présence ou non de FGF-2 est analysée par cytométrie en flux. Les résultats représentent la moyenne d’expression de 3 expériences.

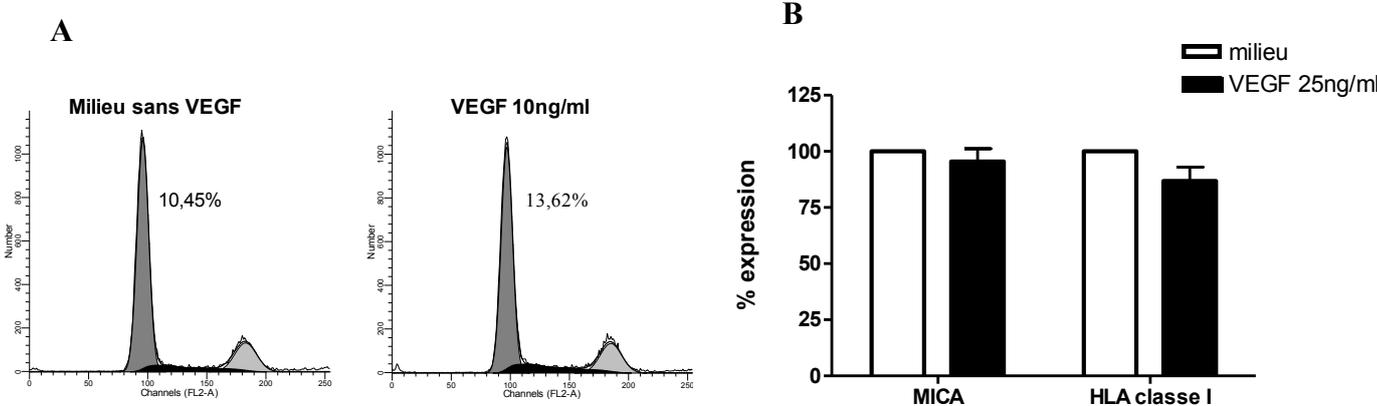


Figure 35 : Effet du VEGF sur les cellules endothéliales.
A – Effet du VEGF sur la prolifération des cellules endothéliales. Les cellules endothéliales sont cultivées en présence ou non de VEGF. La prolifération des cellules est analysée à l’aide de iodure de propidium. Le pourcentage de cellules en phase S est indiqué sur chaque graphique. Figure représentative de 3 expériences.
B - Effet du VEGF sur l’expression de MICA et de HLA classe I. L’expression de MICA et de HLA de classe I à la surface de cellules endothéliales cultivées en présence ou non de VEGF est analysée par cytométrie en flux. Les résultats représentent la moyenne d’expression de 3 expériences.

4. Mécanismes impliqués dans la régulation de MICA par les cellules endothéliales

4.1. Importance de la glycosylation des protéines

La protéine MICA se caractérise par la présence de plusieurs sites de glycosylation (Groh et al., 1996; Stephens, 2001). Dans le but d'étudier l'importance de la glycosylation sur l'expression de MICA, nous avons utilisé, dans nos cultures de cellules endothéliales activées ou non par de l'IFN γ ou du TNF α , un inhibiteur de la N-glycosylation, la tunicamycine. Cet inhibiteur a été employé à plusieurs concentrations (0,1, 0,2 et 0,5 $\mu\text{g/ml}$). Une fois le traitement par la tunicamycine terminé, les cellules endothéliales sont analysées par cytométrie en flux. L'expression de MICA à la surface des cellules endothéliales est comparée à l'expression des molécules HLA de classe I classique.

Comme le montre la Figure 36, l'expression de MICA est fortement inhibée en présence de l'inhibiteur de la glycosylation. Cette inhibition est maximale dès la plus faible dose de tunicamycine (0,1 $\mu\text{g/ml}$). Lorsque les cellules endothéliales sont activées par les cytokines, l'expression de MICA est modulée, elle est augmentée par le TNF α et diminuée par l'IFN γ (cf. Figure 26). Cependant, quelle que soit la cytokine employée pour activer les cellules, en présence de tunicamycine, l'expression de MICA est inhibée de la même façon que lorsque les cellules ne sont pas activées. En comparaison, la tunicamycine inhibe également l'expression constitutive des molécules HLA de classe I par les cellules endothéliales. Contrairement à MICA, cette inhibition est dose dépendante. Cependant, bien que l'expression des molécules HLA de classe I par les cellules endothéliales activées soit plus faible en présence de tunicamycine, nous observons que les cytokines augmentent quand même l'expression de ces molécules. Par conséquent, la tunicamycine n'empêche pas l'effet des cytokines sur l'expression des protéines HLA de classe I classiques. Cependant, l'inhibition de la glycosylation ne permet plus la régulation de l'expression de MICA par les cytokines TNF α ou IFN γ .

Ces résultats suggèrent un rôle majeur des mécanismes de glycosylation dans le contrôle de l'expression de MICA par les cellules endothéliales.

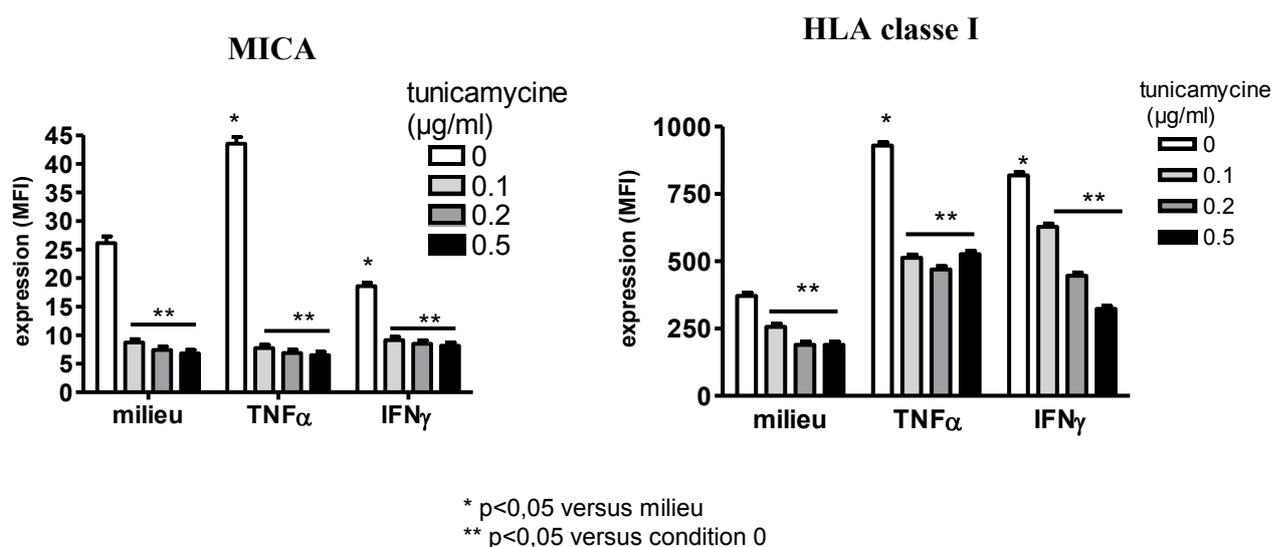


Figure 36 : Effet de la glycosylation sur l'expression de la protéine MICA.

L'expression de MICA et de HLA de classe I est analysée à la surface des cellules endothéliales par cytométrie en flux à l'aide des anticorps AMO1 et W6/32. Les cellules endothéliales sont activées par du TNF α ou de l'IFN γ . La tunicamycine est ajoutée au milieu de culture à différentes concentrations. Les moyennes de fluorescence (MFI) sont indiquées sur chaque graphique.

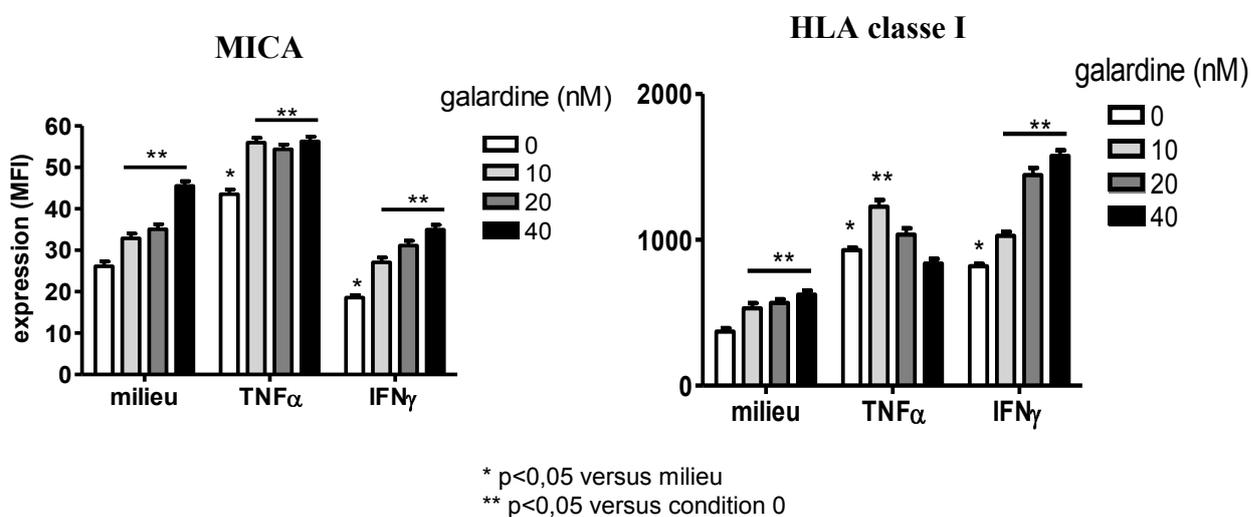


Figure 37 : Effet des métalloprotéases sur l'expression de la protéine MICA.

L'expression de MICA et de HLA de classe I est analysée à la surface des cellules endothéliales par cytométrie en flux à l'aide des anticorps AMO1 et W6/32. Les cellules endothéliales sont activées par du TNF α ou de l'IFN γ . La galardin est ajoutée au milieu de culture à différentes concentrations. Les moyennes de fluorescences (MFI) sont indiquées sur chaque graphique.

4.2. Importance des métalloprotéases matricielles (MMP)

Plusieurs études ont montré la présence de la forme soluble de MICA dans le sérum de patients atteints de cancers (Groh et al., 2002; Salih et al., 2002) ou de certains patients transplantés (Suarez-Alvarez et al., 2006b). sMICA libérée par les cellules tumorales peut moduler l'expression de son récepteur NKG2D et pourrait participer à un mécanisme d'échappement tumoral en déviant la réponse immune anti-tumorale. La production de MICA par les cellules tumorales est due à des métalloprotéases (Salih et al., 2002). Afin de comprendre les mécanismes de production de MICA par les cellules endothéliales activées par les cytokines *in vitro*, un inhibiteur des métalloprotéases à spectre large, la galardine (appelée aussi GM6001), est ajouté dans les cultures de cellules endothéliales 1h avant l'activation des cellules par des cytokines. L'expression de MICA et de HLA de classe I est analysée par cytométrie en flux.

Comme le montre la

Figure 37, l'inhibition des métalloprotéases augmente le niveau d'expression constitutif de MICA, de façon dose-dépendante (valeur plus élevée avec la plus forte dose de galardine utilisée, 40 nM). Lorsque les cellules endothéliales sont activées par les cytokines TNF α ou IFN γ , l'expression est régulée (comme décrite dans le paragraphe 3.1 des Résultats). L'ajout de l'inhibiteur de métalloprotéases dans des cultures de cellules activées par les cytokines permet d'obtenir le même effet qu'avec des cellules non activées, l'expression de MICA est augmentée. Cependant, nous constatons que l'ajout de galardine sur des cellules endothéliales activées par le TNF α ne permet pas d'augmenter l'expression membranaire de MICA de manière dose-dépendante mais l'effet est maximal dès la plus faible concentration de galardine (10 μ M). Par ailleurs, l'inhibition des MMP inhibe totalement la régulation par l'IFN γ et restaure un niveau d'expression comparable voire supérieur au niveau basal. En comparaison, l'expression de HLA de classe I classiques est également augmentée de façon dose-dépendante en présence de galardine à la surface des cellules endothéliales non activées ou activées par l'IFN γ .

Par conséquent, l'inhibition de plusieurs métalloprotéases permet d'augmenter l'expression de MICA à la surface des cellules endothéliales. Comme pour les cellules tumorales, ces métalloprotéases doivent avoir un rôle dans le relargage de la forme soluble de MICA par les cellules endothéliales.

4.3. Implication des voies de signalisation dans la régulation de MICA

De nombreux travaux ont montré que l'activation des cellules endothéliales par les cytokines pro-inflammatoires et en particulier par le TNF α résulte de l'activation de multiples cascades de signalisation intracellulaires impliquant trois voies de signalisation majeures : la voie du facteur de transcription NF κ B, la voie de la phospho-inositol 3-kinase (PI3 Kinase) et la voie des Mitogen-Activated Phospho Kinases (MAP Kinases) (Poher, 2002). Afin de déterminer quelles voies pourraient être impliquées dans la régulation de MICA, nous avons utilisés des inhibiteurs pharmacologiques pour le blocage sélectif de ces voies dans les cellules endothéliales. Les cellules endothéliales ont été traitées avec un inhibiteur de NF κ B, du PDTC ou bien des inhibiteurs des MAPKinases : inhibiteur de JNK, SP600125, un inhibiteur de Erk1/2, PD98059 et un inhibiteur de p38, SB203580. Ces inhibiteurs sont ajoutés dans les cultures de cellules endothéliales 1h avant l'activation par les cytokines TNF α ou IFN γ pendant 24h. L'expression de MICA est ensuite analysée par cytométrie en flux.

Comme démontré précédemment, les cytokines TNF α et IFN γ modulent l'expression de MICA à la surface des cellules endothéliales. La Figure 38 montre que l'utilisation de l'inhibiteur PDTC dans nos cultures de cellules endothéliales empêche la régulation de l'expression de MICA par les cytokines TNF α et IFN γ (MFI 33,8 pour les cellules non activées contre 34,7 et 31,6 pour les cellules endothéliales activées respectivement par le TNF α et l'IFN γ). La voie NF κ B est donc impliquée dans les mécanismes de régulation de MICA. Pour étudier la voie des MAP Kinases, trois molécules impliquées dans cette voie ont été utilisées : JNK, Erk1/2 et p38. Quel que soit l'inhibiteur de la voie des MAP kinases utilisé, l'effet de l'IFN γ sur l'expression de MICA est bloqué. En effet, en présence de PD98059, l'inhibiteur de Erk1/2, le niveau d'expression de MICA par les cellules endothéliales activées par l'IFN γ est comparable à celui des cellules endothéliales non activées (MFI 27,8 pour les cellules endothéliales non activées et 27,3 pour les cellules endothéliales activées par l'IFN γ). En présence des inhibiteurs SP600125, inhibiteur de Jnk ou SB203580, inhibiteur de p38, l'expression de MICA par les cellules endothéliales activées par l'IFN γ est au contraire augmentée (MFI de 30,2 pour les cellules endothéliales non activées contre 49,1 pour les cellules endothéliales activées par l'IFN γ en utilisant l'inhibiteur de Jnk). Cependant, ces inhibiteurs des MAP Kinases ont un effet différent sur les cellules endothéliales activées par le TNF α . L'inhibition de JNK empêche l'augmentation de MICA

par l'activation par le $TNF\alpha$ (MFI 30,2 pour les cellules endothéliales non activées contre 33,7 pour les cellules endothéliales activées par le $TNF\alpha$). L'inhibition de Erk1/2 ou de p38 n'empêche pas cette régulation de MICA par le $TNF\alpha$, au contraire, elle l'augmente davantage (MFI de 27,8 pour les cellules endothéliales non activées contre 87,3 pour les cellules endothéliales activées par le $TNF\alpha$ en utilisant l'inhibiteur de Erk 1/2).

Par conséquent, les voies $NF\kappa B$ et des MAP Kinases sont impliquées dans la régulation de MICA par les cytokines. La voie $NF\kappa B$ et la voie passant par JNK interviennent dans l'augmentation de MICA par le $TNF\alpha$. La diminution de MICA par l' $IFN\gamma$ nécessite l'intervention des voies $NF\kappa B$ mais aussi de la voie des MAP Kinases passant par Jnk, Erk1/2 et p38.

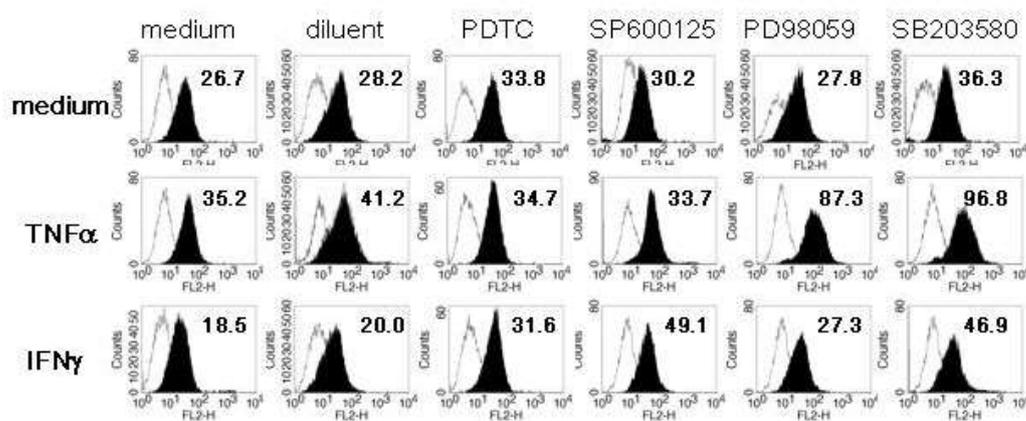


Figure 38 : Implication des voies de signalisation sur l'expression de la protéine MICA.

Les cellules endothéliales activées ou non par du $TNF\alpha$ ou de l' $IFN\gamma$ sont mises en culture avec différents inhibiteurs des voies de signalisation : PDTC ($NF\kappa B$), SP600125 (Jnk), PD98059 (Erk1/2) ou SB203580 (p38). L'expression de MICA est analysée par cytométrie en flux à l'aide de l'anticorps AMO1. Les moyennes de fluorescence sont indiquées sur chaque histogramme.

B - Contribution à l'étude de la signalisation intracellulaire induite par les anticorps anti-HLA de classe II dans les cellules endothéliales vasculaires humaines.

Ces résultats ont été publiés dans *Transplantation* ; cet article est présenté dans l'annexe 2 :

Le Bas-Bernardet S, Coupel S, Chauveau A, Souillou JP, Charreau B. Vascular Endothelial Cells Evade Apoptosis Triggered by Human Leukocyte Antigen-DR Ligation Mediated by Allospecific Antibodies. *Transplantation*. 2004 Dec 27;78(12):1729-39 (cf. **annexe 2**).

Des études précédentes ont montré que les sérums de patients transplantés possédaient des anticorps anti-HLA de classe I et de classe II lors d'un rejet vasculaire aigu (Trpkov et al., 1996) et d'un rejet de greffe chronique (Lee et al., 2002). Ces anticorps sont généralement présents avant le rejet et peuvent être un élément prédictif de celui-ci. Ils peuvent se fixer à l'endothélium et déclencher des mécanismes visant à altérer l'endothélium. Les travaux de Bian *et al.* ont montré que les anticorps anti-HLA de classe I du donneur présents après une transplantation permettent la transduction de signaux intracellulaires. Ceci stimule la prolifération cellulaire. Ainsi, il a été montré que la présence de ces anticorps anti-HLA de classe I augmente la phosphorylation des tyrosines de plusieurs protéines intracellulaires des cellules endothéliales (Bian et al., 1998). De plus, la liaison des anticorps anti-HLA de classe II régule la prolifération et la différenciation des cellules B (Al-Daccak et al., 2004). Cependant, l'effet des anticorps anti-HLA de classe II sur les cellules endothéliales n'était pas encore identifié. C'est pourquoi, notre équipe s'est intéressée à l'effet de la liaison d'anticorps anti-HLA classe II sur l'apoptose des cellules endothéliales (cf. article). Au cours de cette étude, les cellules endothéliales sont activées pendant 72h par de l'IFN γ pour induire l'expression des molécules HLA de classe II. Les cellules sont ensuite incubées avec un anticorps anti-HLA-DR (clone L243). Par comparaison avec l'effet de cet anticorps sur les lymphocytes B, la viabilité et l'apoptose des cellules endothéliales ont été étudiées. Cette étude a montré que la liaison de l'anticorps anti-HLA-DR induit l'apoptose des lymphocytes B mais n'a pas d'effet sur la viabilité des cellules endothéliales. Afin de comprendre pourquoi

les cellules endothéliales ne réagissent pas de la même façon à la liaison de l'anticorps anti-HLA-DR, nous avons analysé l'effet de cet anticorps sur la phosphorylation des protéines intracellulaires et sur l'expression des protéines kinases C (PKC) et de la voie de signalisation PI3-Kinase/Akt.

1. Phosphorylation des tyrosines

Dans le but de savoir si la liaison de l'anticorps anti-HLA-DR sur les cellules endothéliales entraîne une activation de la signalisation intracellulaire, la phosphorylation des tyrosines a été étudiée par Western Blot. Les cellules endothéliales ainsi que les cellules Raji (lignée de lymphocytes B) ont été incubées avec l'anticorps anti-HLA-DR selon une cinétique de 15 minutes à 4h. Afin de détecter la phosphorylation des tyrosines dans les différents lysats cellulaires, les membranes ont été incubées avec un anticorps de souris anti-phospho-tyrosine (clone 4G10). D'après la Figure 39, nous pouvons remarquer que plusieurs protéines phosphorylées sur des résidus tyrosine sont détectées par cette technique. En comparant le profil de ces protéines après le traitement avec l'anticorps anti-HLA-DR, nous constatons des différences entre les cellules endothéliales et les lymphocytes B. La liaison de l'anticorps anti-HLA-DR aux lymphocytes B provoque aussi une diminution d'expression de protéines phosphorylées de 70 kDa. En comparaison, la liaison de cet anticorps sur les cellules endothéliales entraîne une diminution d'expression de deux protéines phosphorylées : une protéine de 70 kDa, comme pour les lymphocytes B, et une protéine de 38 kDa.

Par conséquent, la signalisation intracellulaire est modifiée suite à la liaison de l'anticorps anti-HLA classe II aux lymphocytes B comme aux cellules endothéliales. Bien qu'une partie de la signalisation cellulaire modulée par cet anticorps semble similaire dans les deux types de cellules, une partie semble spécifique aux cellules endothéliales.

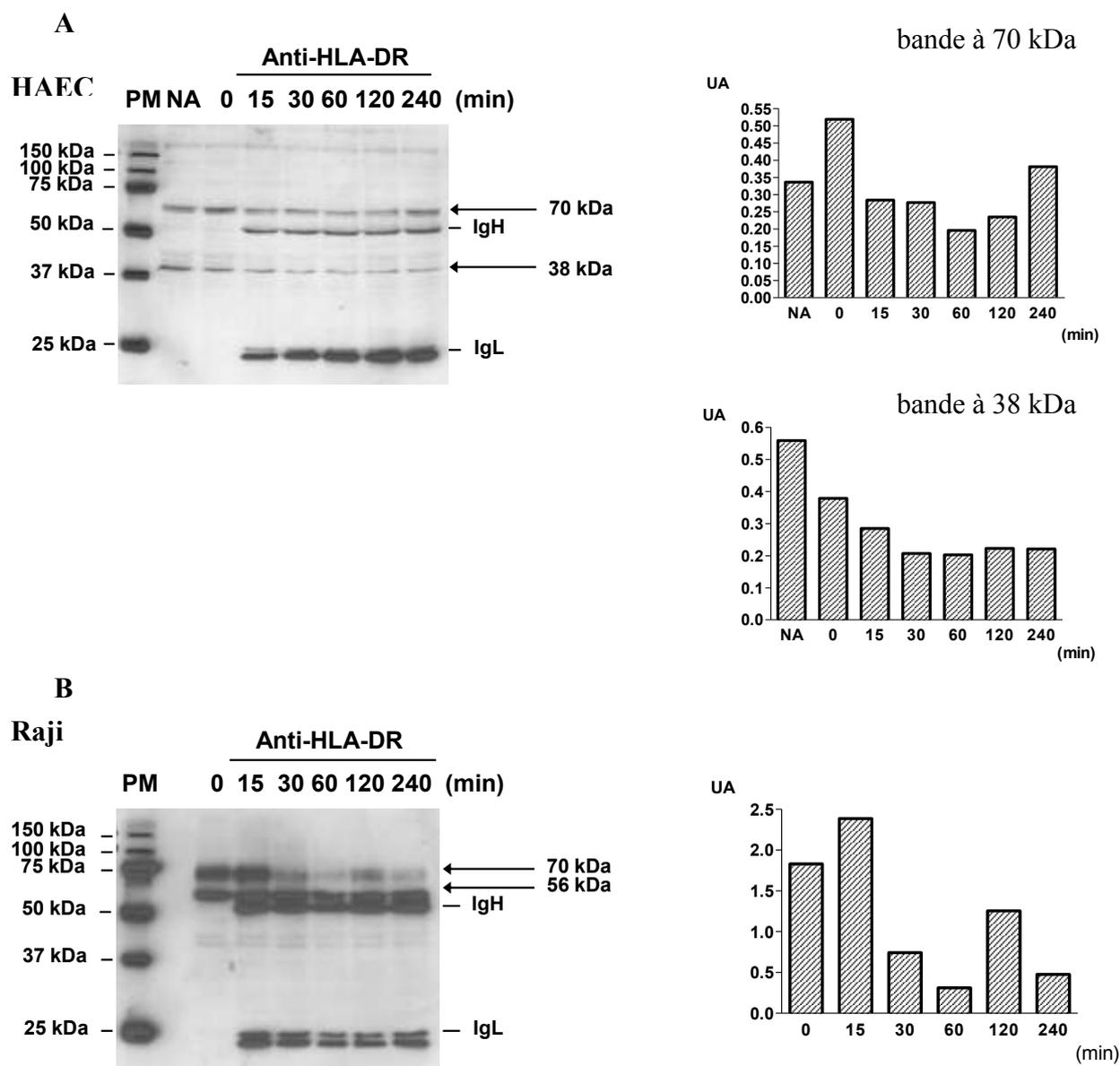


Figure 39 : Etude de la phosphorylation des tyrosines après traitement par l'anticorps anti-HLA-DR.

Les cellules endothéliales sont pré-traitées avec de l'IFN γ pendant 72h. Les cellules endothéliales (A) et les lymphocytes B (Raji) (B) sont incubés avec l'anticorps anti-HLA-DR (clone L243) selon une cinétique de 15 minutes à 4h. Après le traitement, les lysats cellulaires sont analysés par Western Blot. Les membranes sont incubées avec l'anticorps anti-phospho-tyrosine (clone 4G10) et révélées avec un anticorps anti-souris couplé à HRP et visualisé par chemoluminescence. La GAPDH sert de protéine de ménage. Les quantifications des protéines sont normalisées à la GAPDH et exprimées en unités arbitraires (UA). Cette image est représentative de trois expériences distinctes. IgH (chaîne lourde d'Ig) et IgL (chaîne légère d'Ig) attestent de la liaison de l'anticorps anti-HLA-DR.

2. Etude des voies de signalisation

Dans le but d'identifier les voies de signalisation modulées lors de la liaison de l'anticorps anti-HLA-DR aux cellules endothéliales et aux lymphocytes B, deux voies majeures de signalisation ont été étudiées : la voie de la protéine kinase C et la voie de la PI3 Kinase.

2.1 Etude de la protéine kinase C

La protéine kinase C se trouve impliquée dans différentes fonctions physiologiques de la cellule comme les phénomènes d'apoptose, l'activation des plaquettes, la conformation de l'actine dans le cytosquelette, la modulation de l'activité des canaux ioniques, la sécrétion et la prolifération cellulaire (Toker, 1998). Cette famille des protéines kinases C comprend 10 isoformes : α , β I, β II, γ , δ , ϵ , η , θ , ζ , μ/λ et μ . Selon des études sur des cellules présentatrices d'antigènes, de nombreux signaux intracellulaires sont déclenchés via les molécules de CMH de classe II (Al-Daccak et al., 2004). Notamment, dans les cellules B, la protéine kinase C est activée et transmet son signal via les molécules de HLA de classe II. Puisque cette voie est mise en jeu dans les lymphocytes B suite à la liaison avec l'anticorps anti-HLA de classe II, nous nous sommes interrogés sur la régulation de cette voie à la suite de l'interaction de l'anticorps anti-HLA-DR sur les cellules endothéliales. Les cellules endothéliales ont été traitées comme décrit précédemment puis analysées par Western Blot. Dans un premier temps, la phosphorylation de PKC pan (les isoformes α , β I, β II, δ , ϵ et η) a été observée sur les lysats cellulaires de cellules endothéliales activées par l'IFN γ pendant 72h et de cellules Raji traitées par l'anticorps anti-HLA-DR. Une augmentation de la phosphorylation de la PKC est constatée dans les cellules endothéliales activées par l'IFN γ par rapport aux cellules endothéliales non activées. En présence de l'anticorps anti-HLA-DR, cette augmentation de la phosphorylation est plus importante et est dépendante du temps (Figure 40).

Dans un second temps, plusieurs anticorps (dirigés contre PKC α/β II, PKC δ et PKC μ) ont été utilisés pour identifier la phosphorylation des différentes isoformes des PKC. Seule l'isoforme PKC α/β II est modulée en fonction de l'interaction de l'anticorps anti-HLA-DR avec les cellules. D'après la Figure 41, nous constatons une différence de profil de la phosphorylation de PKC α/β II entre les cellules endothéliales et les lymphocytes B. L'activation des cellules endothéliales par l'IFN γ augmente la phosphorylation de la

PKC α/β II. En présence de l'anticorps anti-HLA-DR, la phosphorylation décroît de façon transitoire, pour retrouver son niveau initial après 2h d'incubation avec l'anticorps. En comparaison, en présence de l'anticorps anti-HLA-DR, la PKC α/β II est activée dans les lymphocytes B puisque la phosphorylation de cette kinase est augmentée de façon transitoire et est maximale après 30 minutes de traitement par cet anticorps. Par conséquent, la liaison de l'anticorps anti-HLA-DR sur les cellules endothéliales et sur les lymphocytes B module de façon différente la PKC. La PKC est phosphorylée par les cellules endothéliales activées puis est déphosphorylée en présence de l'anticorps. L'interaction de l'anticorps anti-HLA-DR avec les cellules endothéliales inactive la PKC. Contrairement aux cellules endothéliales, l'interaction de l'anticorps avec les cellules B entraîne une phosphorylation de la PKC α/β II, donc une activation de cette protéine kinase.

Cependant, le profil obtenu pour la phosphorylation de PKC α/β est différent de celui de PKC pan. L'anticorps PKC pan détecte plusieurs isoformes dont les isoformes α et β II. Puisque le profil d'expression n'est pas similaire, on peut supposer que d'autres isoformes de PKC, comme PKC ϵ ou PKC η , sont également modulées par les anticorps anti-HLA-DR.

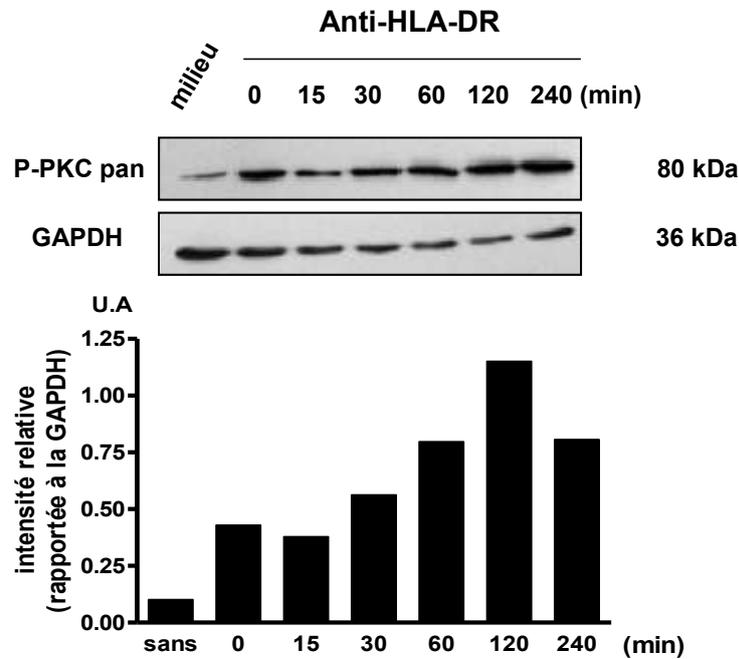


Figure 40 : Etude de la phosphorylation de PKC par les cellules endothéliales après traitement par l'anticorps anti-HLA-DR.

Les cellules endothéliales sont pré-traitées avec de l'IFN γ pendant 72h puis incubées avec l'anticorps anti-HLA-DR selon une cinétique de 15 minutes à 4h. Les lysats cellulaires sont analysés par Western Blot. Les membranes sont incubées avec l'anticorps anti-P-PKC pan puis deshybridées et réhybridées avec un anticorps anti-GAPDH. La quantification des protéines est normalisée à la GAPDH et exprimée en unités arbitraires (U.A). Cette image est représentative de trois expériences distinctes.

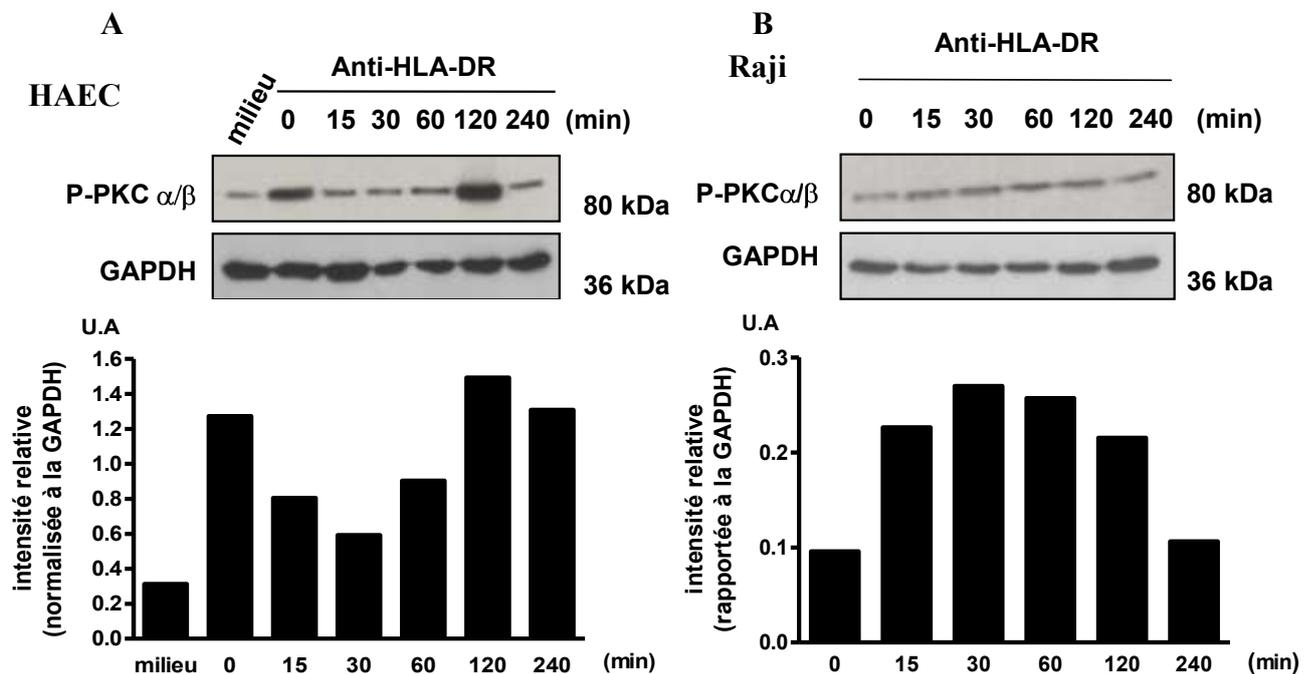


Figure 41 : Etude de la protéine kinase C (PKC) α/β II après traitement avec l'anticorps anti-HLA-DR.

Les cellules endothéliales sont pré-traitées avec de l'IFN γ pendant 72h. (A) Les cellules endothéliales et (B) les cellules B sont incubées avec l'anticorps anti-HLA-DR (clone L243) selon une cinétique de 15 minutes à 4h. Après le traitement, les lysats cellulaires sont analysés par Western Blot. Les membranes sont incubées avec l'anticorps anti-phospho-PKC α/β II et révélées avec un anticorps anti-lapin couplé à HRP et visualisé par chemoluminescence. La GAPDH sert de protéine de ménage. Les quantifications des protéines sont normalisées à la GAPDH et exprimées en unités arbitraires (U.A). Ces images sont représentatives de trois expériences distinctes.

2.2 Etude de la signalisation par Akt

L'anticorps anti-HLA-DR a des effets différents sur la phosphorylation de la protéine kinase C selon les cellules sur lesquelles il se fixe. L'effet de l'interaction de cet anticorps avec les cellules endothéliales sur la voie de signalisation PI3 Kinase a également été étudié. La voie de signalisation intracellulaire PI3 Kinase intervient aussi dans de nombreux mécanismes dont la prolifération et la survie cellulaire. Pour étudier cette voie, nous avons principalement analysé la phosphorylation de la protéine Akt, protéine impliquée dans la voie PI3 Kinase. Pour cela, les cellules endothéliales et les lymphocytes B (Raji) ont été traités comme décrit précédemment puis analysés par Western Blot. La Figure 42 montre que la protéine Akt est phosphorylée suite au traitement par l'anticorps anti-HLA-DR. Cette phosphorylation est fonction du temps de traitement. La phosphorylation d'Akt est associée avec la déphosphorylation de PKC par les cellules endothéliales activées. La protéine Akt est peu phosphorylée dans les cellules Raji traitées par l'anticorps anti-HLA-DR. (Figure 42 B). Dans notre modèle, la voie PI3 Kinase est peu activée lorsque l'anticorps anti-HLA-DR se fixe à la surface des cellules endothéliales ou à la surface des lymphocytes B.

Par conséquent, nous montrons que les voies de signalisation PKC et PI3 Kinase sont impliquées dans la signalisation induite par l'anticorps anti-HLA-DR dans les cellules endothéliales.

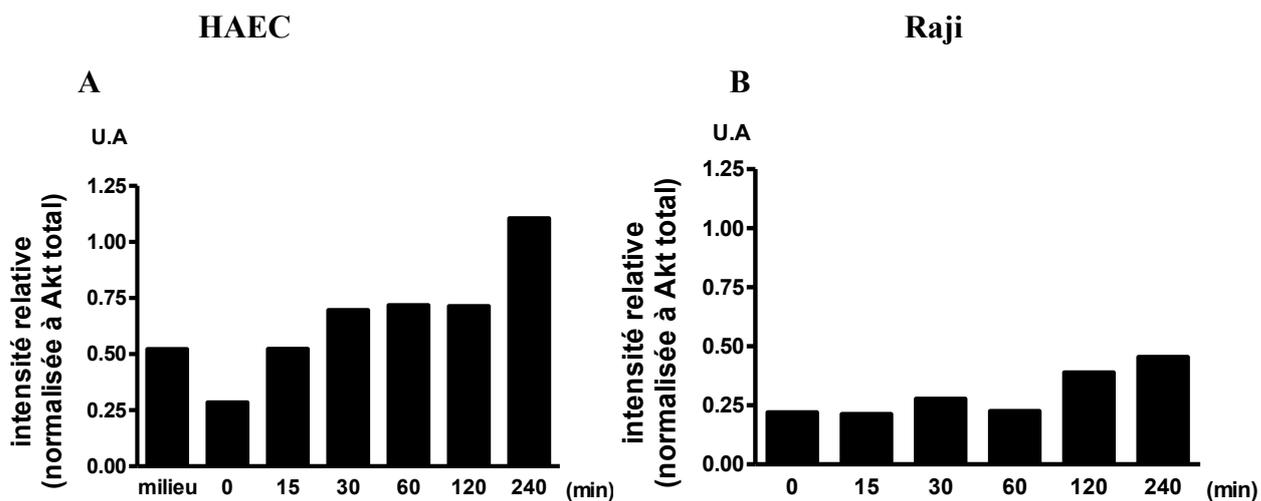


Figure 42 : Etude de la phosphorylation d'Akt après traitement avec l'anticorps anti-HLA-DR.

Les cellules endothéliales sont pré-traitées avec de l'IFN γ pendant 72h. (A) Les cellules endothéliales et (B) les cellules B sont incubées avec l'anticorps anti-HLA-DR (clone L243) selon une cinétique de 15 minutes à 4h. Après le traitement, les lysats cellulaires sont analysés par Western Blot. Les membranes sont incubées avec l'anticorps anti-phospho-Akt, révélées avec un anticorps anti-lapin couplé à HRP et visualisé par chemoluminescence. Les membranes sont deshybridées puis réhybridées avec un anticorps anti-Akt total. Les quantifications des protéines sont normalisées à la protéine Akt totale exprimées en unités arbitraires (U.A). Ces images sont représentatives de trois expériences distinctes.

Discussion.

1. Expression endothéliale de MICA.

Lorsque nous avons initié cette étude en 2004 il était globalement admis que MICA, comme MICB, était une molécule de classe I non classique dont l'expression était restreinte à un petit nombre de cellules et de tissus normaux comprenant certaines cellules épithéliales (épithélium intestinal), les kératinocytes, monocytes et certaines cellules endothéliales (HUVEC) (Zwirner et al., 1998). L'expression de MICA par l'endothélium avait été montrée dans plusieurs études *in vitro* et en particulier par les premières études d'analyse de l'expression réalisées par le groupe de Zwirner (Zwirner et al., 1999; Zwirner et al., 1998). Plus récents, les travaux du groupe de Sumitran-Holgersson ont apportés des données supplémentaires sur l'expression de MICA par l'endothélium et ont surtout souligné l'importance de l'expression endothéliale de MICA en Transplantation d'organes (Sumitran-Holgersson et al., 2002). L'expression de MICA a également été confirmée par marquage en immunohistochimie sur des coupes de tissus issus d'organes transplantés (pancréas, rein) dans les cellules épithéliales et les îlots pancréatiques (Hankey et al., 2002) suggérant que, dans certaines conditions, le profil d'expression de MICA pouvait être élargi. Beaucoup plus récemment, l'expression de MICA dans des cellules activées (cellules dendritiques, lymphocytes T, cellules épithéliales bronchiques) a été démontrée par plusieurs études (Borchers et al., 2006; Ebihara et al., 2007; Molinero et al., 2003; Molinero et al., 2004).

Le profil d'expression de MICA dans les tumeurs et les tissus sains a été récemment réévalué par l'analyse comparative systématique d'un grand nombre de tissus qui montre la présence d'ARNm pour MICA et MICB, dans la plupart des tissus et organes à l'exception notable du système nerveux central. Cette étude unique réalisée 15 ans après la première description de MICA (Groh et al., 1996) démontre que l'expression de MICA n'est pas restreinte dans les tissus normaux mais semble plutôt corrélée à celle du CMH de classe I (non exprimé dans le système nerveux central) (Schrambach et al., 2007). De même, dans les tumeurs, cette étude ne montre aucune spécificité de tissus ou d'organes comme observé pour les tissus sains (Schrambach et al., 2007). La spécificité des anticorps utilisés, le polymorphisme important de ces molécules (plus de 60 allèles décrits à ce jour pour MICA, cf. HLA *sequence data base*, <http://www.anthonynolan.com/HIG/>) mais aussi l'importance de la glycosylation (8 sites de N-glycosylation) sont les hypothèses avancées pour expliquer ces

variations dans la description du profil d'expression de MICA (Bahram et al., 1994; Steinle et al., 2001).

Dans ce contexte, notre étude montre que MICA est exprimé de façon constitutive par les cellules endothéliales vasculaires humaines (HAEC et HUVEC) en culture. Nos résultats comparant le niveau d'expression de MICA à la surface des cellules endothéliales (HAEC) issues de 7 individus suggèrent que l'expression de MICA n'est pas corrélée à celle de HLA de classe I. L'expression, détectée par plusieurs anticorps, semble faible, comparée à celle de HLA - A, -B, -C mais elle est observée de façon constante sur toutes les cellules endothéliales testées.

Nous avons montré que MICA interagit avec le récepteur NKG2D (protéine recombinante ou récepteur exprimé par des cellules NK). Cette interaction est suffisante pour induire soit une activation des cellules NK (définie par la mesure de l'activité cytotoxique) soit la diminution de l'expression du récepteur NKG2D à la surface des NK, selon les conditions expérimentales utilisées. Donc, bien que modérée, l'expression de MICA par les cellules endothéliales est suffisante pour une interaction fonctionnelle avec le récepteur NKG2D. Il convient de noter que dans notre modèle, le blocage de MICA au moyen d'un anticorps bloquant spécifique n'a pas permis de réduire l'activité cytolytique des NK de manière significative. Cet anticorps bloque de façon nette la lyse de cellules transfectées et exprimant MICA. Une inhibition étant obtenue avec un anti-NKG2D, nos résultats suggèrent que les cellules endothéliales pourraient exprimer d'autres ligands de NKG2D tels que les *UL16-binding proteins* (ULBP) (Cosman et al., 2001) comme cela a été montré pour les cellules endothéliales porcines (Lilienfeld et al., 2006).

Dans nos expériences, réalisées avec des cellules humaines, nous avons utilisé un test de cytotoxicité mettant en présence des cellules NK et des cellules endothéliales allogéniques. Dans ce cas, les cellules effectrices et cibles n'expriment pas les mêmes molécules du HLA de classe I et de classe II. Bien que le typage HLA de nos cellules endothéliales soit défini, il n'a pas été cependant possible de déterminer le degré de compatibilité/incompatibilité des combinaisons étudiées. Dans nos conditions, la lyse des cellules endothéliales par des NK allogéniques est variable selon les conditions et combinaisons effectrices:cibles utilisées ; elle est aussi globalement modérée (50-60% de lyse) comparée celle obtenue avec des C1R-MICA comme cibles (70-100% de lyse).

Lorsque l'on réalise des expériences de co-culture en présence des cellules NK et des cellules endothéliales nous observons une diminution du récepteur NKG2D comme cela a été

montré dans des modèles de co-culture utilisant des cellules tumorales (Yokoyama, 2002). Bien que l'on ne puisse pas totalement exclure la participation d'autres ligands de NKG2D, qu'il serait important de définir, nos résultats suggèrent aussi que l'expression de MICA par l'endothélium est suffisante pour moduler l'activité des cellules effectrices exprimant NKG2D. Nous avons montré que l'activation des cellules endothéliales par l'IFN γ , qui diminue l'expression de MICA, empêche cet effet modulateur. Bien qu'une preuve directe soit nécessaire pour confirmer un effet direct de MICA sur NKG2D dans ce modèle, ces observations sont en faveur d'un rôle de MICA dans la modulation de récepteur NKG2D dans notre modèle.

L'expression de MICA par l'endothélium dans un contexte de Transplantation d'organes allogénique a plusieurs conséquences. Tout d'abord le polymorphisme de MICA (plus de 60 allèles décrits) va favoriser la production d'alloanticorps capables de fixer et de lyser l'endothélium du greffon par activation de la cascade du complément. Plusieurs études ont associé la présence d'anticorps anti-MICA avec une incidence de rejet plus importante en transplantation rénale (Mizutani et al., 2005; Mizutani et al., 2006b; Suarez-Alvarez et al., 2006b; Sumitran-Holgersson et al., 2002). Au delà d'un rôle dans la réponse humorale allospécifique, l'expression de MICA et la production de MICA soluble par les cellules endothéliales du greffon vont aussi conférer à l'endothélium de l'organe greffé un rôle dans la réponse allogénique en modulant l'activation des cellules NK et T du receveur (voir Figure 43). L'interaction NK/endothélium a été globalement peu étudiée en Transplantation (Baldwin et al., 2001; Blanco et al., 1992) mais son importance a été soulignée en xénotransplantation (Forte et al., 2005) où la réponse innée et l'endothélium occupent une place prépondérante. L'analyse des modèles animaux d'allogreffe de cœur ou de peau après déplétion de populations lymphocytaires a montré que les NK sont ni nécessaires ni suffisants pour induire un rejet aigu (Heidecke et al., 1985), ce qui n'exclut pas toute contribution des NK. L'expression de MICA peut moduler, via NKG2D, la réponse immune allogénique selon plusieurs scénarii selon probablement le degré de compatibilité entre les molécules du CMH de classe I du donneur et les récepteurs KIR du receveur. En effet, la capacité d'une cellule NK à lyser une cellule allogénique cible relève d'un équilibre entre des signaux d'activation et d'inhibition. La contribution de l'interaction MICA-NKG2D va donc activer ou inhiber, par modulation négative de l'expression du récepteur, l'activité NK (activité cytotoxique et

production de cytokines et chemokines). MICA va également pouvoir fournir un signal de costimulation aux lymphocytes T NKG2D+.

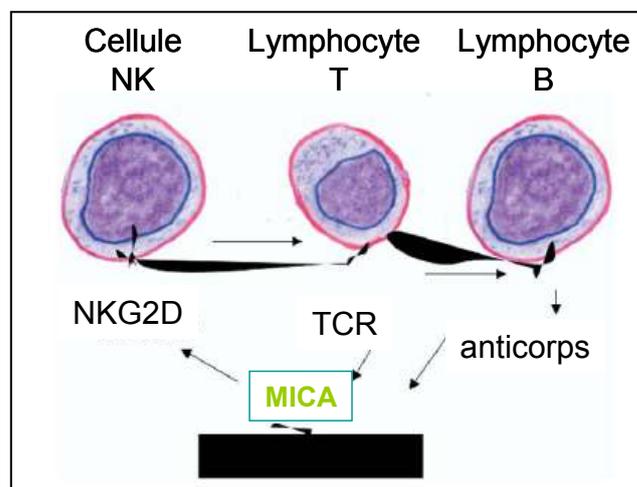


Figure 43 : Réponse immunitaire induite par MICA dans un contexte de transplantation allogénique.

(d'après Stasny *et al.* (Stasny, 2006) Les sites polymorphiques de MICA sont reconnus par les lymphocytes T et B au moyen de leurs récepteurs spécifiques. MICA est aussi le ligand du récepteur activateur NKG2D. Dans cette représentation schématique, MICA interagit avec NKG2D exprimé par les cellules NK et induit la sécrétion de cytokines qui vont favoriser la réponse T helper. Cette activation produit la synthèse d'anticorps par les lymphocytes B.

2. Régulation de MICA par les cellules endothéliales : effecteurs et mécanismes.

L'expression des molécules du HLA de classe I (HLA-A, -B, -C) est fortement régulée par l'IFN γ (Virelizier *et al.*, 1984). De plus, les travaux réalisés plus récemment par le groupe de Johnson ont apporté une caractérisation précise de l'expression du HLA de classe I par les cellules endothéliales humaines (Johnson, 2000; Johnson, 2003). Ces travaux ont montré que les cellules endothéliales expriment beaucoup de transcrits pour HLA-A et -B mais peu pour HLA-C. A l'inverse, les cellules épithéliales de la lignée HeLa expriment plus de transcrits pour HLA-C que HLA-B. Les cytokines TNF α , IFN β et γ augmentent fortement le taux de d'ARNm pour HLA-B mais ont un effet faible sur HLA-A et -C dans les deux types cellulaires. L'association du TNF α et des IFN a un effet synergique pour HLA-A et -B

mais pas pour HLA-C (Johnson, 2003). Contrairement aux molécules du HLA de classe I classiques, la régulation des molécules du HLA de classe Ib est moins bien connue. Ainsi pour MICA, bien que les travaux initiaux publiés par Groh (Groh et al., 1996) et Zwirner (Zwirner et al., 1998) suggéraient déjà une absence de régulation de MICA par l'IFN γ , l'effet de l'IFN n'a été rapporté que récemment (pour revue voir (Stastny, 2006)). Les résultats que nous montrons dans ce manuscrit vont dans le même sens puisqu'ils mettent en évidence une diminution significative de MICA à la surface des cellules endothéliales humaines après une stimulation par l'IFN γ . Nous n'avons pas testé l'effet de l'IFN α qui augmente l'expression de MICA dans les cellules dendritiques (Jinushi et al., 2003) et dans certaines cellules tumorales (Marten et al., 2006). Dans nos conditions l'expression de MICA diminue d'environ 50% en réponse à l'IFN γ . A l'inverse, nous montrons que la cytokine pro-inflammatoire TNF α induit une augmentation de l'expression de MICA. Cette régulation est faible de l'ordre de 30% du niveau basal, comparée à celles observée pour le HLA de classe I (-A, -B, -C). Nos résultats montrent que la régulation de l'expression de MICA à la surface des cellules endothéliales humaines par les cytokines est à la fois qualitativement et quantitativement différente de celle observée pour le HLA de classe I. La faible amplitude de cette régulation par les cytokines pourrait suggérer que de faibles variations d'expression sont suffisantes pour induire des modifications fonctionnelles importantes comme cela est aussi suggéré par nos expériences de cytotoxicité redirigée après co-culture.

Plusieurs études montrent une régulation sélective des différents ligands de NKG2D en fonction des cellules (Groh et al., 1996; Salih et al., 2003). Cette sélectivité justifierait l'existence de ces multiples ligands servant une même fonction. En accord avec cette hypothèse, malgré une forte homologie de séquences entre les ligands, les régions promotrices ne présentent que peu d'homologie, suggérant des mécanismes de régulation multiples et encore mal identifiés (Eagle et al., 2006; Lopez-Soto et al., 2006).

Contrairement à notre attente, nous n'avons pas observé de régulation de MICA en réponse au choc thermique. Cependant, l'induction de la Hsp70 détectée par Western Blot valide notre modèle d'étude. Par conséquent, bien qu'un site HSF-1 soit présent dans le promoteur du gène codant pour MICA (Eagle et al., 2006), ce mécanisme de régulation ne semble pas prédominant dans les cellules endothéliales.

De façon assez étonnante, la régulation la plus évidente de MICA a été observée dans notre étude en faisant varier la densité cellulaire. Ainsi, nous avons montré que les cellules endothéliales expriment plus fortement MICA lorsque le tapis cellulaire n'est pas confluent et

qu'il n'y a pas d'inhibition de contact. Un travail récent rapporte la même observation avec des fibroblastes en culture (Zou et al., 2006). Ces auteurs supposent que l'inhibition de contact diminue l'expression de MICA. Nous avons voulu tester l'hypothèse que la prolifération cellulaire pouvait augmenter l'expression basale de MICA. Nos premiers résultats utilisant du VEGF ou du FGF-2 ne montrent pas d'effet significatif, mais ils devront être confirmés par d'autres expériences. En effet des travaux récents associent prolifération et/ou différenciation et régulation des ligands de NKG2D. Ainsi, dans les lymphocytes T, les NKG2DL sont exprimés par les cellules en division (mesurée par marquage au CFSE) soit 10 à 50% des cellules proliférantes (Cerboni et al., 2007). L'ensemble de ces observations suggère une relation entre l'expression de ces ligands incluant MICA et l'état d'activation/prolifération/différenciation des cellules (Cerboni et al., 2007; Rohner et al., 2007).

Concernant les voies de signalisation impliquées dans la régulation par les cytokines TNF α et IFN γ présentée dans notre étude, nos résultats proposent un effet de NF κ B et des MAP Kinases sont impliquées dans la régulation de MICA par les cytokines. La voie NF κ B et la voie passant par JNK interviennent dans l'augmentation de MICA par le TNF α . La diminution de MICA par l'IFN γ nécessite l'intervention des voies NF κ B mais aussi de la voie des MAP Kinases passant par JNK, ERK1/2 et p38. L'implication de la voie du facteur de transcription NF κ B a déjà été montrée par plusieurs études (Molinero et al., 2004) et elle est soutenue par la présence d'un site de fixation dans l'intron 1 (Eagle et al., 2006) (Figure 44). En revanche, le rôle des MAP Kinases est nouveau, il reste à confirmer.

| | | |
|-----------------|-------|------------------------------------|
| κ B-MICA | +538 | GAGTAGGGGCCCTCCTTTCT |
| | | NF-κB p50 |
| ULBP2 | +350 | GGGGCGGGGATCCCTGGTGC |
| ULBP1 | +1435 | AGGGCGGGGATCCCTAGTGC |
| RAET1G | +349 | GGAGCGGGGATCCCTAGTGC |
| ULBP3 | +296 | GGGGAGGGGATCCCTGGTGC |

Figure 44 : Sites de fixation potentiels pour le facteur de transcription NF κ B dans les séquences des gènes codant pour les ligands de NKG2D.

Le premier intron de MICA contient un site de fixation potentiel pour NF κ B retrouvé aussi dans l'intron 1 des séquences de ULBP1, ULBP2, ULBP3, and RAET1G (Eagle et al., 2006).

3. Importance des formes solubles de MICA et autres molécules du HLA non classique pour le suivi des patients transplantés.

Nos travaux sont les premiers à décrire une forme soluble pour MICA dans les surnageants de cellules endothéliales en culture. Ces résultats préliminaires indiquent que les cellules endothéliales activées produisent plus de sMICA que les cellules endothéliales non activées. Les quantités de sMICA détectées par ELISA restent modestes comparées à celles présentes dans le sérum de patients (Groh et al., 2002; Marten et al., 2006; Salih et al., 2002). De façon surprenante, nous montrons que l'IFN γ et le TNF α provoquent le relargage de quantités similaires de sMICA bien que ces cytokines conduisent des régulations opposées de MICA à la surface des cellules endothéliales. L'utilisation d'un inhibiteur des MMP à spectre large (GM6001 ou galardine) nous a permis de montrer l'importance de l'activité des MMP dans le contrôle de l'expression de MICA. En effet, l'inhibition des MMP augmente l'expression de MICA par les cellules endothéliales non activées ou activées par le TNF α ou l'IFN γ . Néanmoins, en présence d'IFN γ , l'expression de MICA reste plus faible malgré l'inhibition des MMP. Ces résultats suggèrent que d'autres mécanismes sont impliqués dans cette régulation. L'incubation de cellules pancréatiques tumorales avec de l'IFN γ augmente MICA sans produire de sMICA (Marten et al., 2006) suggérant que différents mécanismes peuvent intervenir selon les cellules et les cytokines étudiées. Dans cette étude, il ne nous a pas été possible de mesurer l'effet de l'inhibiteur de MMP sur la production de MICA soluble dans les surnageants de culture car le test ELISA utilisé pour ce dosage est peu sensible et ne permet pas d'apprécier de petites variations de concentration.

L'importance de la forme soluble de MICA pour le suivi des dysfonctions vasculaires et du rejet de greffe reste à déterminer comme cela a été fait pour HLA-G et HLA-E.

L'épissage alternatif du transcrit HLA-G conduit à l'expression de 4 protéines membranaires (HLA-G1 à G4) et de 3 protéines solubles (HLA-G5 à G7) (Carosella et al., 2000). Le clivage protéolytique semble également produire des formes solubles de HLA-G présentant une activité biologique (Dong et al., 2003; Park et al., 2004). L'obtention des anticorps spécifiques des différentes isoformes et la mise au point de technique de dosage nécessaires à la caractérisation des formes solubles de HLA-G et à leur quantification sont relativement récentes (Paul et al., 2000a; Paul et al., 2000b). Les formes solubles de sHLA-G ont été mises en évidence dans différentes pathologies ; plusieurs études montrent la valeur

diagnostique du dosage de sHLA-G et suggèrent l'importance du dosage de sHLA-G pour le suivi des patients transplantés. Ainsi, deux études indépendantes associent la présence de sHLA-G à une incidence de rejet plus faible chez les receveurs de greffe cardiaque (Luque et al., 2006) et rénale (Qiu et al., 2006). Parallèlement, plusieurs études *in vitro* documentent les fonctions de sHLA-G et indiquent un effet inhibiteur de la prolifération des lymphocytes T alloréactifs (Bahri et al., 2006; Le Friec et al., 2003) et la capacité d'induire des cellules T régulatrices (Le Rond et al., 2006). Ces travaux complètent les propriétés protectrices molécules HLA-G membranaires et solubles déjà décrites. L'ensemble de ces travaux suggère l'utilisation de sHLA-G à des fins diagnostiques et thérapeutiques en Transplantation.

De même que HLA-G, la forme soluble de MICA a fait l'objet d'une description récente (Groh et al., 2002; Salih et al., 2002). Contrairement à HLA-G, la forme soluble de MICA résulte principalement du clivage de la forme membranaire par des métalloprotéases. La forme soluble de MICA est faiblement présente dans le sérum normal (<30 pg/ml ; n =62) mais sa concentration augmente de façon significative chez les patients atteints de tumeurs épithéliales et gastro-intestinales (161 pg/ml de sMICA en moyenne dans le sérum de patients atteint de cancers de l'estomac ou de colon, n= 296) (Holdenrieder et al., 2006a; Salih et al., 2002). La présence de MICB soluble a été plus récemment décrite (Salih et al., 2006) et semble corrélée à celle de sMICA dans les tumeurs (Holdenrieder et al., 2006a; Holdenrieder et al., 2006b). D'un point de vue fonctionnel, les molécules MICA solubles ont la capacité de diminuer l'expression du récepteur NKG2D en favorisant l'internalisation du complexe sMICA/NKG2D, mécanisme impliqué dans l'échappement tumoral (Yokoyama, 2002). Les premiers travaux analysant la présence de sMICA après transplantation cardiaque dans une cohorte de 31 patients associent la présence de sMICA avec une meilleure survie et une absence de rejet aigu ($p < 0.03$, OR=7.9), association observée en l'absence d'anticorps anti-MICA. La valeur prédictive de sMICA pour la survie des greffe reste à étudier (Suarez-Alvarez et al., 2006b).

Les travaux de notre équipe sont aussi les premiers à décrire une forme soluble pour HLA-E dans les surnageants de cellules endothéliales en culture (Coupel et al., 2007). Une étude collaborative avec le groupe de N. Gervois et F. Joterreau, nous a aussi permis de montrer la production de sHLA-E dans le surnageant de culture de lignées de mélanomes après activation par l'IFN γ (Derre et al., 2006). Ces premiers résultats suggèrent également que comme sMICA, HLA-E soluble possède une activité biologique. En effet, nos expériences réalisées avec des surnageant de culture de cellules endothéliales contenant du

HLA-E soluble montrent un effet protecteur sur la lyse de cellules cibles par des cellules NK. Ces résultats préliminaires nécessitent d'être confirmés après purification de la protéine à partir des surnageants ou par la production de protéine HLA-E soluble recombinante. HLA-E soluble rejoint donc les autres molécules solubles du HLA de classe I non classiques ou apparentées telles que HLA-G et MICA solubles.

D'autres ligands solubles du récepteur NKG2D ont été décrits dont les ULBP solubles (Waldhauer and Steinle, 2006) qui sont capables de moduler l'expression de NKG2D (Song et al., 2006).

En résumé, les cellules endothéliales vasculaires humaines n'expriment pas HLA-G (résultats non montrés) mais elles expriment de façon constitutive à la fois MICA et HLA-E, les ligands respectifs des récepteurs NKG2D et CD94/NKG2A. Les cellules endothéliales activées par des cytokines produisent dans le milieu extracellulaire les formes solubles de MICA et de HLA-E. MICA soluble et HLA-E soluble vont induire des mécanismes protecteurs (downrégulation de NKG2D, activation de CD94/NKG2A). Bien que les fonctions de ces molécules solubles restent à éclaircir, leur production confère à l'endothélium de nouvelles propriétés immunorégulatrices dont la connaissance pourrait fournir de nouvelles stratégies d'immunointervention.

4. Signalisation intracellulaire induite par les anticorps anti-HLA-DR dans les cellules endothéliales.

Au cours de ce travail de thèse, j'ai aussi contribué à l'analyse de l'interaction des anticorps anti-HLA de classe II (HLA-DR) avec les cellules endothéliales humaines en culture. A l'état basal, *in vivo*, les cellules endothéliales humaines expriment les molécules du HLA de classe II. En revanche, les cellules endothéliales en culture perdent rapidement l'expression des molécules de classe II et la présence d'une faible concentration d'IFN γ suffit à maintenir cette expression qui requiert l'activation du promoteur IV du CIITA (Muczynski et al., 2003). Nous avons stimulé nos cultures de cellules endothéliales avec 100 U/ml d'IFN γ pendant 48h-72h pour obtenir une expression maximale du HLA-DR. Dans ces conditions, les niveaux d'expression de HLA-DR sont comparables pour les différentes cellules endothéliales testées mais restent très inférieurs à ceux observés sur les leucocytes et en particulier sur les

lymphocytes B non activés (d'un facteur 5 environ). Nous avons montré que la fixation des anticorps anti-HLA-DR sur l'endothélium activé n'induit pas l'apoptose des cellules endothéliales alors que, dans les mêmes conditions expérimentales, cette liaison induit l'apoptose d'une fraction significative de lymphocytes B issus du même individu. Diverses observations suggèrent que le niveau d'expression des molécules de classe II est déterminant dans l'initiation du processus apoptotique. Par conséquent, nous avons émis l'hypothèse que l'absence d'apoptose dans notre modèle pouvait être due au faible niveau d'expression du HLA-DR à la surface des HAEC en culture, même après stimulation optimale en présence d'IFN γ (100 U/ml pendant 72h) (Poher et al., 1986). Pour tester cette hypothèse, nous avons essayé d'évaluer si cette faible expression de HLA-DR était néanmoins suffisante pour initier l'activation de voie de signalisation dans les cellules endothéliales. Les mécanismes et voies de signalisation activées par la liaison des molécules de classe II sont complexes et multiples (pour revue voir (Al-Daccak et al., 2004)). L'apoptose est associée à l'activation des protéines kinases C (PKC) alors que l'activation (production de cytokines) est, elle, associée aux tyrosines kinases. Notre étude, très préliminaire, des voies de signalisation induite par les molécules HLA-DR dans les cellules endothéliales humaines montre tout d'abord que l'interaction des alloanticorps avec leurs cibles est suffisante pour activer la phosphorylation de plusieurs protéines sur des résidus tyrosine. Certaines de ces protéines sont aussi phosphorylées dans les lymphocytes B (bande à 70 kDa) alors que la phosphorylation de certaines protéines semble spécifiquement modulée dans les cellules endothéliales et pas dans les lymphocytes B (exemple de la bande à 38 kDa). Cela suggère l'activation de signaux partiellement communs aux lymphocytes B et aux cellules endothéliales mais aussi de signaux spécifiques aux cellules endothéliales. La nature de ces protéines reste à identifier. Nous avons testé l'effet des anti-HLA-DR sur l'expression et la phosphorylation des différents isoformes de PKC (α , β , ζ , etc.) et nous avons montré que le profil de phosphorylation des PKC α/β II était différent dans les lymphocytes B et les cellules endothéliales traités par les anti-HLA-DR. Nos premiers résultats montrent aussi que la voie de la PI3-Kinase est activée par la liaison des molécules HLA-DR. L'ensemble de ces résultats démontre que la liaison des molécules de classe II, modélisée par la fixation d'anticorps monoclonal, active des signaux intracellulaires et ce malgré une expression modeste des molécules à la surface des cellules endothéliales. Cette activation aboutit à la phosphorylation de protéines sur des résidus tyrosines et des PKC α/β II selon un profil spécifique aux cellules endothéliales, et également à l'activation de la PI3-K reflétée par la

phosphorylation d'Akt. L'implication de PI3-Kinase/Akt dans l'absence d'apoptose reste à caractériser. Il serait en particulier important de définir les cibles moléculaires d'Akt dans ce modèle comme nous l'avons fait pour les anticorps anti-classe-I (Coupel et al., 2007) pour définir si l'activation d'Akt procure une protection active contre l'apoptose par la régulation de molécules protectrices, par exemple. Ainsi, Akt phosphoryle la molécule pro-apoptotique Bad, libérant ainsi la molécule anti-apoptotique Bcl2 qui protège les cellules endothéliales de l'apoptose (Karsan et al., 1996). Il serait aussi important d'étudier les autres voies de signalisation qui pourraient être activées telles que la voie des MAPK et du facteur de transcription NF κ B qui sont impliquées dans la régulation du phénotype et des fonctions des cellules endothéliales (apoptose, prolifération, etc.).

Conclusion et perspectives.

Au cours de ce travail de thèse, j'ai caractérisé l'expression et la régulation de MICA par les cellules endothéliales vasculaires en réponse aux cytokines. Poursuivre ce projet permettrait de mieux identifier les mécanismes moléculaires de ces régulations et en particulier les voies de signalisations intracellulaires et les mécanismes de protéolyse impliqués dans le contrôle de l'expression membranaire de MICA par l'endothélium. Notamment, l'inhibition (inhibiteurs pharmacologiques ou transfection de dominant négatifs, de mutants ou de siRNA) des voies de signalisation et de diverses métalloprotéases dans des cellules activées ou non par les cytokines est une approche qui permettra de mieux définir les mécanismes moléculaires impliqués. Une part importante du projet qui reste à compléter comprend aussi l'étude des fonctions de MICA exprimée par les cellules endothéliales et pour cela des siRNA sont disponibles et déjà testés dans notre équipe afin d'invalider l'expression de MICA avant de réaliser des tests de cytotoxicité cellulaire ou de co-culture en présence de cellules NK et T CD8+. Il serait aussi intéressant d'analyser l'expression par les cellules endothéliales d'autres ligands potentiels du récepteur NKG2D et en particulier les ULBP dont l'expression a été montrée pour les cellules endothéliales porcines (Lilienfeld et al., 2006). Enfin, la production de MICA soluble par les cellules endothéliales pourrait être un biomarqueur utile pour suivre l'activation des cellules endothéliales in vivo, la valeur prédictive de sMICA pour la survie du greffon a été suggérée (Suarez-Alvarez et al., 2006b) mais reste à confirmer.

Annexe 1

Endothelial cell activation and proliferation modulate NKG2D activity by regulating MICA expression and shedding

A. Chauveau, M. Chatelais, S. Coupel and B. Charreau.

Article soumis en 2007

**Endothelial cell activation and proliferation modulate NKG2D activity
by regulating MICA expression and shedding**

Annabelle Chauveau¹, Mathias Chatelais¹, Stéphanie Coupel^{1*} and Béatrice Charreau^{1*}

INSERM, U643, Nantes, F44000 France; CHU Nantes, Institut de Transplantation et de Recherche en Transplantation, ITERT, Nantes, F44000 France; Université de Nantes, Faculté de Médecine, Nantes, F44000 France.

* both authors contributed equally as senior investigators

Corresponding author:

Dr. Béatrice Charreau, PhD

INSERM U643, 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

Key words: Endothelial cells, MICA, cytokines, NKG2D

Abbreviations: EC: endothelial cell; ER: endoplasmic reticulum; HAEC : human arterial EC;

MICA: MHC class I related chain A, PDTC: pyrrolidine dithiocarbamate

SUMMARY

MICA are highly polymorphic MHC class I related molecules, expressed by endothelial cells (ECs), that may be target for specific alloantibodies and NKG2D-expressing NK and T effector cells in organ allografts. In this study, we show that basal levels of MICA expressed on human vascular ECs is sufficient to functionally modulate the immunoreceptor NKG2D expression and activity in allogeneic NK cells. We found that MICA expression was differentially regulated at the EC surface in response to cytokines. TNF α up-regulated MICA while IFN γ significantly decreased MICA at cell surface. Both cytokines induced the release of soluble MICA in culture supernatant from activated ECs. Modulation of NKG2D by ECs correlated with MICA level on cell surface. We identify glycosylation and metalloproteinase activities as major posttranscriptional mechanisms controlling MICA regulation and function in ECs. Our results indicate that, in addition to the NF κ B pathway, the MAPKs JNK, ERK1/2 and p38 are key signaling pathways in the control of MICA by the cytokines. Finally, we show that EC proliferation upon wound healing increases MICA level and functions. Together, our data indicated that EC activation and proliferation modulate NKG2D activity by regulating MICA expression and shedding and thus further highlight a role for ECs in immunomodulatory processes.

1. Introduction

The endothelium is a functional barrier between the vessel wall and blood stream, and endothelial cells (EC) are involved in regulating several key physiological functions, both immune and non-immune including control of coagulation, fibrinolysis, vascular tone, growth [1]. Dysfunction of the endothelium disturbs the physiological protective regulatory balance, which is a critical factor in the progression of inflammatory [2] and cardiovascular diseases [3] and in transplant rejection [4]. Upon inflammation, ECs regulate the trafficking and modulate the functions of leucocytes by expressing in a regulated way chemokines, adhesion molecules and cytokines [2]. Activated ECs also modulate the immune response through innate and cognate interactions with T and NK cells [5] [6]. Current evidence supports the idea that ECs not only play a critical role in the recruitment of immune cells, but can also influence the outcome of the immune response [7]. Human vascular graft EC basally display donor class I and II MHC-peptide complexes on their surface and are thought to stimulate allogeneic humoral and cellular responses *in vivo* [5] [7, 8].

The classical HLA class I loci within the MHC (*HLA-A*, *-B*, *-C*) are characterized by their ubiquitous expression and their wide polymorphism [9]. By contrast, the human MHC class I chain-related genes (*MICA* and *MICB*), located within the HLA class I region of chromosome 6, show a restricted cell and tissue distribution. MICA proteins are physiologically expressed on the cell surface of intestinal epithelial cells, and at low levels by endothelial cells (ECs) and fibroblasts, but are not present on unstimulated T and B lymphocytes [10] [11] [12]. MICA is frequently found expressed on tumor cell lines and primary tumor cells. Moreover, early evidence for heat and virus-induced up-regulation of MIC protein cell-surface expression has led to the concept that MIC proteins are markers of stress in the epithelia [13]. Today, however, this view is changing, as more and more

experimental evidences report that MIC can be expressed on a broader set of normal cells and tissues than initially expected [14].

MICA, unlike their classical HLA class I counterparts, do not bind β 2-microglobulin (β 2-m) and are independent of any transporter-associated protein (TAP) which exclude a role for MICA in peptide binding and antigen presentation [10]. 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, in humans and mice (for review see [15]).

Unlike other non classical HLA class I genes (*HLAE*, *-F* and *-G*), the *MIC* genes are highly polymorphic [16]. Consistent with the high polymorphism of MIC molecules, specific antibodies against MICA have been reported in the serum of patients who had rejected kidney allografts, suggesting a potential role for these molecules in transplant immunopathology [17] [18] [19] [20]. Renal and pancreatic grafts with evidence of both acute and chronic rejection have been shown to express MIC proteins, and anti-MIC antibodies have been identified in the serum of these patients. Expression of MICA and MICB in transplanted organs has been demonstrated [21]. It is likely that the polymorphic MICA molecule may be target for specific antibodies and T cells in solid organ grafts [21] [18] [22].

We previously reported that alloreactive antibody binding to MHC class I and class II molecules expressed on vascular ECs mediates specific signaling events controlling EC survival and proliferation [23, 24]. Moreover, we showed that activated ECs overexpressed the non classical MHC class I molecule HLA-E and produce a soluble form of HLA-E [25]. In this study, we show that basal levels of MICA expressed on human vascular ECs is sufficient to modulate NKG2D expression and activity in allogeneic NK effector cells. We show that MICA expression was differentially regulated at the EC surface in response to cytokines (TNF α , IL1 β , IFN γ). We found that cytokines induced the release of soluble MICA in culture

supernatant from activated vascular ECs. We identify several molecular mechanisms, at posttranscriptional and signaling level, that control MICA regulation and function in ECs. Together, our data indicated that EC activation and proliferation modulate NKG2D activity by regulating MICA expression and release and thus provide further evidence for a role for ECs in immunomodulatory processes.

2. Results

Constitutive expression of functional MICA on vascular ECs.

Basal expression for MICA was first examined by indirect immunofluorescence using confocal microscopy (**Figure 1**). EC labeling, performed on non permeabilized cells, using either specific anti-MICA mAbs (AM01) or a recombinant NKG2D-Fc fusion protein, revealed a similar membrane staining confirming cell surface expression and also indicated that membrane-bound MICA could be functionally relevant due to its ability to bind to NKG2D, its receptor on effector cells (**Fig. 1A**). **Figure 1B** further shows that intracellular MICA proteins co-localize with the endoplasmic reticulum (ER) while co-localization with the Golgi apparatus was only partial. Western blotting confirmed the expression of MICA in ECs (HAEC and HUVEC) (**Figure 1C**). Presumably because of heterogeneity among the *N*-linked carbohydrates of mature MICA, gel electrophoresis produced a diffuse smear in the 55–70 kDa range instead of a compact protein band.

Facs analysis, performed using different anti-MICA specific mAbs, further confirmed that MICA is expressed by human vascular ECs (HAEC) at the cell surface (**Figure 2A**). By contrast, no MICB was detected (data not shown). No significant expression for MICA was found on lymphoid (Jurkat and Raji) and monocytoid (U937) cell lines (**Figure 2B**). When compared to classical HLA class I, MICA expression was lower than expression for classical HLA class I (HLA-A, -B, -C) but was significant and consistently observed, at roughly similar levels, on ECs (HAEC) issued from different individuals (n=7) (**Figure 2C**). No correlation between HLA class I and MICA basal levels was observed.

Function of endothelial MICA proteins toward NKG2D expression and NKG2D-mediated cytotoxicity

As a first attempt to assess the function of the MICA-mediated signal in NK cell activation and cytotoxic activity, a cytotoxicity assay using freshly isolated NK cells and allogeneic HAEC, as target cells, was performed in the presence of anti-NKG2 receptors and/or anti-MICA blocking mAbs (**Figure 3**). First, our findings show that NK cells efficiently kill allogeneic ECs (specific lysis ranging from 40-75% at 40:1 E:T ratio). **Figure 3A** indicates that, among NKG2 receptors, only NKG2D blockade significantly protect ECs from NK-mediated cytotoxic activity. NKG2D blockade dose-dependently decreases NK-mediated EC lyses with a maximal reduction of $56 \pm 4\%$ as compared to controls ($p < 0.05$) suggesting the ability of basal MICA level on ECs to activate NK cells through a NKG2D-dependent process (**Figure 3B**). Next, to further address functional consequences of constitutive MICA expression on vascular ECs, we analyzed the expression of NKG2D on NK cells in co-culture experiments. To this aim, NKL cells, a cell line of human NK cells, and HAEC were co-cultured for 12, 24 and 48 h. Next, NKG2D expression on NKL was examined by flow cytometry. FACS analysis in **Figure 3C and 3D** showed that NKG2D surface levels were reduced on NKL cells cocultured with ECs for 12 and 24h when compared with controls ($53.7 \pm 30.8\%$ and $65.9 \pm 6.5\%$ of control at 12h and 24h respectively, $*p < 0.05$ for both). Expression of CD94, used as a control, was found unchanged (data not shown). Next, we determined whether NKG2D down-regulation could impair NKG2D function using a redirected cytotoxicity assay. To this end, NKL cells were first cocultured with EC monolayers for 24h, then NKL were harvested and incubated with MICA-transfected CIR cells (CIR-MICA), as target cells, at various E:T ratios. **Figure 3E** indicates that NKL cytotoxic activity toward CIR-MICA cells was slightly but significantly reduced after a coculture period with ECs (a mean of $13.05 \pm 2.82\%$ decrease *versus* controls for the various E:T ratios; $p < 0.05$) indicating that EC-induced down-regulation of NKG2D functionally impaired NK activity. Together these data suggest that MICA expressed at endothelial surface efficiently modulates NKG2D expression and activity.

TNF α and IFN γ trigger an opposite regulation of MICA at EC surface

EC stimulation with proinflammatory cytokines, such as TNF α and IL1 β , or IFN γ modify EC phenotype and functions leading to a status referred to as EC activation [5]. As previously reported [26], we observed that both TNF α and IFN γ significantly increase the expression classical HLA class I (HLA-A, -B, -C) on human ECs (**figure 4A**). At 24 h post-treatment, TNF α and IFN γ induces a 3.06-fold and 2.96-fold increase as compared to control, respectively (n =4; *p<0.05). In contrast to HLA class I, **Figure 4A** shows that MICA is differentially regulated at EC surface in response to TNF α or IFN γ (**p<0.05). TNF α promotes a significant but moderate increase in MICA level (1.36-fold increase as compare to basal level, *p<0.05) while IFN γ reduces MICA level on ECs (0.55-fold increase as compare to basal level, *p<0.05). The biological relevance of MICA down-regulation was assessed by analyzing the capacity of IFN γ -treated ECs to downmodulate NKG2D expression in coculture experiments. Our findings indicate that IFN γ -mediated decrease of cell surface MICA correlates with a partially impaired regulatory effect of endothelial cells on NKG2D expression (**Figures 4B and 4C**). Together these findings could suggest that a modest variation in MICA level (30-50%) is sufficient to functionally affect NKG2D-bearing cells. These data further support the hypothesis that non classical MHC class I molecules, including MICA, provide to ECs a fine tune regulatory action toward NK and T cells.

Glycosylation, matrix metalloproteinase activity and shedding provide a posttranscriptional control to MICA expression.

Since, as demonstrated above, only slight modulation in MICA level is sufficient to deeply affect MICA receptors, we sought to investigate the molecular mechanisms involved in the control MICA expression in ECs. Mechanistically, we observed that cell surface expression was not affected by blockade of mRNA or protein synthesis with actinomycin D and

cycloheximide, respectively (data not shown) but mostly rely on protein glycosylation and activity of matrix metalloproteinases. In **Figure 5A**, we show that inhibition of protein glycosylation with tunicamycin strongly reduces MICA at cell surface. Inhibition was achieved at low dose of tunicamycin (0.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) and was similar and consistently observed on both resting and cytokine-activated ECs. As comparison, tunicamycin also reduced both basal and regulated classical HLA class I expression but did not prevent HLA class I upregulation by TNF α and IFN γ .

Tumor cells of epithelial origin spontaneously release a soluble form of MICA (sMICA) encompassing the three extracellular domains, which is present at high levels in sera of patients with gastrointestinal malignancies [27]. Soluble MICA downregulates NKG2D receptor expression and thus may account for tumor immune escape [28]. Therefore, we wondered to investigate whether shedding of MICA from activated ECs may also occur upon inflammation. To this aim, cultured ECs were pretreated with galardin, an inhibitor of matrix metalloproteinase (MMP), before stimulation with cytokines. MICA expression was analyzed by flow cytometry and compared to the expression of HLA class I molecules. **Figure 5B** indicates that inhibition of MMPs significantly enhances MICA expression. This effect was dose-dependent and a maximal effect was observed at 40 nM. Interestingly, MMP blockage totally prevents the MICA downregulation in response to IFN γ . Similar results were obtained with classical HLA class I molecules. Due to the role of MMP in both basal and regulated expression for MICA, we sought to determine whether EC could release the soluble form of MICA (sMICA) using a dedicated Elisa assay. Increased level of soluble MICA was detected in the culture supernatants from activated ECs as compared to resting ECs (**Figure 5C**). sMICA level from IFN γ -treated ECs was significantly lower than in supernatants from cells activated with TNF α or IL1 β and was maximal at 24h (≤ 150 ng/ml) indicating that lower expression in response to IFN γ also correlates with a lower shedding of sMICA.

ERK1/2, p38, JNK MAPKs and NF κ B are the signaling pathways controlling cytokines-mediated regulation of MICA in ECs.

Modulation of EC functions involves three major signaling pathways including the phosphatidylinositol 3-kinase (PI3-K), nuclear factor κ B (NF κ B) and mitogen-activated protein kinase (MAPK) pathways [29]. The respective involvement of these signaling pathways in MICA expression and regulation by ECs was examined by facs in comparison to HLA-class I. Hence, ECs were pre-treated with or without inhibitors of NF κ B (PDTC, IKK2 inhibitor), PI3-K (wortmannin, LY294002), ERK1/2 (U0126, PD98059), p38 (SB203580) and JNK (SP600125) MAPK for 1 h before activation with TNF α or IFN γ for 24 h, a time point leading to maximal MICA regulation. Specific and efficient inhibition of the respective pathways was confirmed for each inhibitor by Western blotting, as previously described [30] (data not shown). In **Figure 6** we show that blockade of NF κ B and JNK MAPK prevents both up-regulation by TNF α and down-regulation by IFN γ suggesting a key role for these pathways. Moreover, we found that inhibition of ERK1/2 and p38 MAPKs also efficiently abrogate decrease in MICA by IFN γ . These finding strongly suggest that, in addition to the NF κ B pathway, the MAPKs are key players in the control of MICA by IFN γ . No significant effect was obtained using PI3-K inhibitors, suggesting that this pathway is not implicated in the regulation of MICA by cytokines in the ECs (data not shown). Interestingly, we found that, in parallel experiments, HLA-A,-B,-C up-regulation by both TNF α and IFN γ was strictly NF κ B –dependent (data not shown).

Endothelial cell proliferation regulates MICA expression at cell surface.

Next, we sought to explore whether cellular events implicated in EC dysfunction or injury such as loss of endothelial monolayer integrity and EC proliferation could either promote or impair MICA expression (**Figure 7**). Firstly, effect of cell density was measured by Facs analysis. Our results demonstrate that quiescent ECs significantly express a lower level of

MICA as compared to growing ECs (a maximal $42 \pm 5\%$ decrease, $*p < 0.05$ versus non confluent cells). Moreover, functional impact of the proliferation-dependent regulation of MICA was examined using a NK-mediated cytotoxicity assay. Our data show that EC quiescence significantly reduces NK cell activation compared to proliferating ECs suggesting a relationship between MICA level and NKG2D activity. **Figure 7B** indicates that increased expression of MICA on proliferative ECs allows a higher NK cytotoxic activity. Wounds were established in cultured ECs monolayers to determine and reconfirm the regulation of MICA in repair processes *in vitro* suggested above. After wound induction, ECs were cultured in presence of 10%FCS and growth factors for 24h and the cells were fixed. EC proliferation and wound repair were assessed by immunofluorescence using anti-KI67 staining to identify proliferative ECs and anti-MICA mAbs in double staining assays. **Figure 7C** illustrates our findings that proliferative ECs expressed higher level of MICA at cell surface.

3. Discussion

This study is the first to examine the expression of MICA and its regulation on vascular human ECs. Our results confirm that MICA is constitutively expressed at EC surface and show that basal MICA expression is sufficient to allow a functional interaction with the activating receptor NKG2D expressed on NK cells. Constitutive MICA expression on ECs was consistently observed on ECs from different donors (n = 7) and using different anti-MICA antibodies. No correlation between HLA class I and MICA levels was found. When we analysed the same EC culture with 5 different anti-MICA specific antibodies (see **Figure 2**) we found different degrees of reactivity, with the highest level of MICA obtained using the mAb AMO1 (specific for the $\alpha 1\alpha 2$ domain of MICA). These discrepancies in staining may reflect allelic preferences and/or glycosylation pattern [31]. A high degree of variability in the levels of some NKG2D ligands expressed on B, T cells, monocytes and granulocytes among different donors has been previously reported [32] [33]. In contrast, our results showed that basal MICA was low as compared to expression of HLA class I (-A, -B, -C) but similar levels of MICA were observed on ECs isolated from individual transplant donors (n =7).

Functionally, we demonstrated that endothelial MICA triggers an activating signal in allogeneic polyclonal NK cells through the immunoreceptor NKG2D that may account for a significant part in EC lysis by allogeneic NK cells. Indeed, basal expression of MICA on the cell surface of resting ECs rendered them susceptible to lysis by allogeneic NK cells since blockade by an anti-NKG2D mAb decreased EC lysis with a dose-dependent effect. Moreover, we also observed that, in coculture assays in vitro, endothelial MICA interacting with NKG2D provides an immunosuppressive pathway by downregulating NKG2D on NK cell surface. The C-type lectin-like NKG2D is an activating cell surface receptor expressed on a

wide range of effector cells including NK, NKT, $\gamma\delta$ T and $\alpha\beta$ T CD8⁺ cells [34]. When co-expressed and associated non covalently with the adaptor protein DAP10, NKG2D transduces signals that activate or costimulate effector functions of these cytotoxic lymphocytes. NKG2D recognizes several families of ligands expressed on interacting stressed, transformed, or pathogen-infected cells including the MHC class I chain-related proteins A and B (MICA and MICB) encoded in the human MHC, and a diverse family of proteins present in both mice and humans, including mouse Rae1 (retinoic acid early transcript 1), H60, Mult1 (murine UL16-binding protein-like transcript 1), and the human UL16-binding proteins (ULBP) or RAET1 proteins. We cannot rule out the involvement, at least partial, that other NKG2D ligands, such as ULBPs, that remains to be explore. It remains unclear whether sustained MICA expression by the endothelium *in vivo* promotes chronic immune activation or chronic immune. Previous studies have established that sustained NKG2D ligand expression, even when restricted to the epithelia, elicits broad impairments in NK cell function. In contrast to the systemic immunosuppression of NK activities, primary T cell responses were mostly unaffected by NKG2D downregulation in Rae-1⁺ transgenic mice [35]. In addition, the diversity of NKG2D ligands may provide various modes of immunoregulation or activation. Of note, NKG2D ligands differ in their expression patterns and in their membrane associations.

In contrast with recent reports showing a clear induction of MICA on activated T cells [32], we found that the pro-inflammatory cytokines TNF α and IL1 β (not shown), only slightly increase MICA at EC membrane. Moreover, EC stimulation with IFN γ significantly decreases endothelial MICA expression suggesting that IFN γ may protect EC from NKG2D-mediated allogeneic NK lysis. Overall, our data provide some evidence for a role for endothelial MICA in cellular alloimmune response beyond a role in alloimmunization. An interesting but poorly explored issue is the fact that MICA is highly polymorphic (more than 50 alleles have been yet described). Indeed, the frequency of MICA mismatch and its clinical impact on alloimmunization and transplant outcome remain unknown. In addition, considering that

different MICA alleles may vary in their affinity for NKG2D, these variations may affect the thresholds of recognition by NK cells and T lymphocytes, and subsequently may affect the functionality of MICA/NKG2D interaction.

Recently, we demonstrated that IFN γ upregulated the nonclassical MHC class Ib molecule HLA-E. HLA-E is a ligand for the inhibitory receptor CD94/NKG2A, on EC, and thus provides a protective pathway to EC [25]. Consequently, both the inhibitory and activating NKG2 receptor complexes interact with the nonclassical MHC class I molecules HLA-E and MICA on the surface of target cells. Thus, the ratio of ligands for inhibitory and activating immunoreceptors expressed on endothelial surface is likely to be an important determinant of the functional status of a NK cell. Competition for binding of activating and inhibitory NKG2 molecules to CD94 may also regulate the balance between receptors expressed on the cell surface. Moreover, our data also indicate that cytokines promote the release of soluble HLA-E and MICA by ECs. Both soluble molecules are biologically active and confer an overall inhibition to NK cytotoxic activity. Together these findings may suggest a role for ECs in a specific immune suppression pathway.

Shedding of MICA could be a mechanism an additive step of a regulatory process required for a fine tune control of MICA expression at endothelial cell surface. Our study provides the first line of evidence that activated EC release soluble MICA in the extracellular compartment. We demonstrated that inhibition of MMP increases MICA at cell surface suggesting that MMP contribute to the shedding of sMICA from ECs as reported for tumor cells [27]. The possible contribution of sMICA as a bioactive molecule modulating T and NK cells alloreactivity and/or as a biomarker characterizing graft's endothelium status remains to be established.

We also observed that MICA was differentially expressed according to EC density and proliferation. Our findings suggest that MICA level increases on proliferating ECs as compared to resting ECs. These findings are consistent with a recent study showing that NKG2D ligands, including MICA, were expressed on a large fraction of antigen-activated CD4+ and CD8+ proliferating T cells, ranging from 10 to 50% [32]. Similarly, Zou *et al.* also demonstrated that Contact inhibition causes strong downregulation of expression of MICA in human fibroblasts and decreased NK cell killing [36] Overall these data suggest a fine tune regulated expression of MICA related to a particular state of activation, proliferation or differentiation that could suggest a role for MICA beside controlling immune functions.

The molecular mechanisms controlling MICA expression in ECs are not well established. The first intron of the *MICA* gene contains a NF- κ B-binding site that binds p65 (RelA)/p50 heterodimers and p50/p50 homodimers of the NF- κ B transcription factor family. A previous report showed that these NF- κ B complexes play a role in the regulated expression of the stress/activation-inducible MICA molecule [37]. Our results confirm a role for the NF κ B pathway in the cytokine-regulated expression of MICA. In addition, we demonstrate that the MAPK ERK1/2, p38 and JNK also participate in the downregulation of MICA by IFN γ . Inhibition of JNK MAPK was also able to prevent the upregulation by TNF α suggesting a pivotal role for NF κ B and JNK MAPK in the molecular processes controlling MICA level on the endothelium. Consistent with our data, the MAP kinase inhibitors were able to block MICA/B expression in T cells [38] and in MRO87 and HeLa cells [39]. This demonstration of the intracellular pathways involved in activation-induced expression of MICA, may reveal potential targets for immune intervention to modulate MICA expression.

To conclude, these results provide a basis for further investigation of biology underlying the endothelial expression of MICA and the shedding of soluble MICA molecules and their impact in both innate and allospecific immune responses and in transplant outcome.

4. Materials and methods

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 and MICA/B (AMO1, BAM01, BAMO3) were kindly provided by Dr. A. Steinle (Eberhard-Karls-University Tübingen, Germany). Anti-MICA/B (clone 6D4) was from Santa Cruz Biotechnology. Anti-MICA (AF1300 and MAB1300) Abs and anti-NKG2D mAbs as well as NKG2D-Fc protein were purchased from R&D Systems, (Lille, France). FITC and PE-conjugated anti-mouse F(ab')₂ and anti-goat IgG were from Jackson ImmunoResearch Laboratories (West Grove, PE). For activation, ECs were incubated with the following recombinant human cytokines: TNF α (100 U/mL, kindly provided by Prof. P. Neuman, BASF, Ludwigshafen, Germany), IFN γ (100 U/mL, Imukin, Boehringer Ingelheim, Germany), IL-1 β (5 ng/mL, from R&D Systems). Tunicamycin, galardin (GM6001), pyrrolidine dithiocarbamate (PDTC), LY294002 (10 μ M), wortmannin (100 nM), U0126 (10 μ M) SB203580 (10 μ M), PD98059 (50 μ M) and SP600125 (10 μ M) inhibitors were purchased from Calbiochem (St Quentin Fallavier, France).

Cell culture

Human arterial ECs (HAEC) were isolated and characterized as we previously described [40]. 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 μ g/mL hydrocortisone, 50 μ g/mL gentamicin and 50 ng/mL amphotericin B (C-22010, PromoCell, Heidelberg, Germany). For activation, confluent EC monolayers were starved overnight and incubated with recombinant human TNF α or IFN γ for the indicated period of time in ECBM supplemented with 2% FCS. ECs were used between passage 2 and 5. PBMC from random healthy volunteers were purified by Ficoll/Hypaque density centrifugation and NK cells were

isolated (>95% of CD3-CD56⁺ and/or CD16⁺, as assessed by facs) by negative selection using NK Cell Isolation kits according to the manufacturer's recommendations (Miltenyi Biotec, Paris, France). 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). HeLa, Raji, U937 and Jurkat cell lines were from ATCC. NKL cell line was kindly provided by Dr. Eric Vivier (Marseille, France). C1R and CIR transfected with MICA*008 (C1RMICA) cells were kindly provided by Dr. A. Toubert (INSERM Unité 662, Hôpital Saint-Louis, Paris, France) [41].

Immunofluorescence and confocal microscopy

ECs were grown to confluence on glass coverslips. Cultures were washed with PBS and fixed for 20 min in 4% paraformaldehyde. Cells were incubated ON at 4°C with blocking buffer (5% BSA in PBS) and then incubated with an anti-MICA (AM01) mAbs or NKG2D-Fc (both 10 µg/mL) for 1 h. Cells were then incubated with FITC-conjugated goat anti-mouse or anti-human antibodies (5 µg/mL, Jackson Lab.) for 1 h. ER and Golgi staining were performed after cell permeabilization with 0.1% Triton X-100 using rhodamine-B- hexyl ester (2.5 µg/mL, Molecular Probes, Eugene, OR) and anti-golgi mAbs (5µg/mL; anti-golgin-97, clone CDF4, Molecular Probes), respectively. Anti-golgi mAbs were revealed using TRITC-conjugated goat anti-mouse antibodies (5 µg/mL, Jackson Lab.). Nuclear staining was performed using propidium iodure (Sigma). Slides were washed in PBS, dried and mounted with ProLong® antifade reagent (Molecular Probes). Fluorescence microscopy was performed with a Leica DM-IRBE laser scanning confocal microscope (Leica AG, Heerbrugg, Switzerland) using a 63x1.4 oil p-aplo lens and analyzed using Leica TCS NT software.

Immunoblotting

Cells were lysed on ice in 20 mmol/L Tris-HCl (pH 7.4), 137 mmol/L NaCl, 0.05% Triton X-100, 1 mmol/L supplemented with protease inhibitors (PIC, Sigma–Aldrich). Cell lysates (20 µg) were resolved by SDS-PAGE (12%) and subjected to Western immunoblot analysis using specific antibodies for MICA (BAMO1) and GAPDH (Chemicon, Val de Fontenay, France), 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).

Flow cytometry

Cells ($1-2 \times 10^5$ cells/sample) were suspended with Trypsin-EDTA (Gibco BRL), washed twice with PBS containing 1% BSA and 0.1% NaN_3 , and then incubated on ice for 30 min with a saturating concentration of first antibody. After three washes, cells were incubated with a FITC-labeled goat anti-mouse F(ab')₂ IgG (Jackson Lab.) at 4 °C for 30 min. Cells were fixed in 1% paraformaldehyde. Negative controls were performed using an isotype-matched IgG control. Fluorescence was measured on 10,000 cells/sample using a fluorescence activated cell sorter (FACScalibur®: Becton Dickinson, Mountain View, CA) and analyzed using CellQuestPro® software (Becton Dickinson). Data are depicted in histograms plotting mean fluorescence intensity (MFI) on a four-decade logarithmic scale (x-axis) *versus* cell number (y-axis).

Cell-mediated cytotoxicity assays

Target cells labelled with ^{51}Cr were incubated with effector cells (freshly isolated NK or 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. Blocking experiments were performed using anti-NKG2D -specific Abs (R&D Systems) at a concentration from 0.5 to 2 µg/mL and an isotype-matched control IgG. For redirected cytotoxicity assays, NKL cells were incubated with or without ECs for 24 h, harvested and then assayed for cytotoxicity against C1RMICA cells; C1R were used as control (data not shown).

ELISA for soluble MICA

Detection of sMICA was done using a sandwich-ELISA from Immatics (Tubingen, Germany). In brief, for detection of sMICA the mAb AMO1 and BAMO3 were used for capture and detection at 5 and 1 µg/mL, respectively, with recombinant sMICA*04 as a standard. Assays were processed using anti-mouse IgG2a-horseradish peroxidase (1:4,000) and developed using the TMB Peroxidase Substrate Reagent (R&D Systems). O.D. was measured at 450 nm.

Scratch wound assays

For scratch wound assays, glass coverslips were coated with 1% gelatin and ECs were plated at a density of $2 \cdot 10^5$ cells/35-mm dish. Confluent monolayers were then starved for 24h in 2%FCs-containing medium. The cell monolayer was scratched with a single pass of a pipette tip, washed twice with PBS, and then incubated in medium supplemented with growth factors and 10% FCS for 24 h. After culture with, cells were fixed and stained with anti-MICA Abs (AF1300) followed by a Alexa-568-labeled anti-goat F(ab')₂ (Invitrogen). Cells were then permeabilized and stained with an anti-KI-67 mAbs (clone MM1; Novocastra Labs,

UK) followed by a FITC-labeled anti-mouse F(ab')₂ (Jackson Lab.), as described above. Nuclear staining was performed using Dapi (Sigma). Slides were washed in PBS, dried and mounted with ProLong® antifade reagent (Molecular Probes). Fluorescence microscopy was performed with a NIKON a Nikon Diaphot microscope (Nikon, Japan). The data are representative of experiments repeated three times with similar results.

Statistical analysis

The data are expressed as the mean and SD and compared using two-tailed Student's *t* tests, and analysis of variance when more than two conditions were compared. A value of *p* < 0.05 was considered statistically significant.

Acknowledgments:

This work was supported by grants from l'Agence de Biomédecine and La Société de Néphrologie. This work was also in part supported by a EU-funded Integrated Project in Life Sciences, Genomics and Biotechnology for Health LSHB-CT-2006-037377. A. Chauveau was supported by a grant from La Société de Néphrologie.

Conflict of interest: The authors disclose no financial or commercial conflicts of interest.

References

- 1 Gerritsen, M. E. and Bloor, C. M., Endothelial cell gene expression in response to injury. *Faseb J.* 1993. 7: 523-532.
- 2 Mantovani, A., Bussolino, F. and Introna, M., Cytokine regulation of endothelial cell function: from molecular level to the bedside. *Immunol Today* 1997. 18: 231-240.
- 3 Dimmeler, S., Haendeler, J. and Zeiher, A. M., Regulation of endothelial cell apoptosis in atherothrombosis. *Curr Opin Lipidol* 2002. 13: 531-536.
- 4 Libby, P. and Pober, J. S., Chronic rejection. *Immunity* 2001. 14: 387-397.
- 5 Pober, J., Orosz, C. G., Rose, M. L. and Savage, C. O., Can graft endothelial cells initiate a host anti-graft immune response? *Transplantation* 1996. 61: 343-349.
- 6 Choi, J., Enis, D. R., Koh, K. P., Shiao, S. L. and Pober, J. S., T lymphocyte-endothelial cell interactions. *Annu Rev Immunol* 2004. 22: 683-709.
- 7 Briscoe, D. M. and Sayegh, M. H., A rendezvous before rejection: where do T cells meet transplant antigens? *Nat Med* 2002. 8: 220-222.
- 8 Rothermel, A. L., Wang, Y., Schechner, J., Mook-Kanamori, B., Aird, W. C., Pober, J. S., Tellides, G. and Johnson, D. R., Endothelial cells present antigens in vivo. *BMC Immunol* 2004. 5: 5.
- 9 Mason, P. M. and Parham, P., HLA class I region sequences, 1998. *Tissue Antigens* 1998. 51: 417-466.
- 10 Groh, V., Bahram, S., Bauer, S., Herman, A., Beauchamp, M. and Spies, T., Cell stress-regulated human major histocompatibility complex class I gene expressed in gastrointestinal epithelium. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996. 93: 12445-12450.
- 11 Zwirner, N. W., Fernandez-Vina, M. A. and Stastny, P., MICA, a new polymorphic HLA-related antigen, is expressed mainly by keratinocytes, endothelial cells, and monocytes. *Immunogenetics* 1998. 47: 139-148.
- 12 Zwirner, N. W., Dole, K. and Stastny, P., Differential surface expression of MICA by endothelial cells, fibroblasts, keratinocytes, and monocytes. *Hum Immunol* 1999. 60: 323-330.
- 13 Bauer, S., Groh, V., Wu, J., Steinle, A., Phillips, J. H., Lanier, L. L. and Spies, T., Activation of NK cells and T cells by NKG2D, a receptor for stress-inducible MICA. *Science* 1999. 285: 727-729.

- 14 Schrambach, S., Ardizzone, M., Leymarie, V., Sibilia, J. and Bahram, S., In Vivo Expression Pattern of MICA and MICB and Its Relevance to Auto-Immunity and Cancer. *PLoS ONE* 2007. 2: e518.
- 15 Ogasawara, K. and Lanier, L. L., NKG2D in NK and T Cell-Mediated Immunity. *J Clin Immunol* 2005. 25: 534-540.
- 16 Stephens, H. A., MICA and MICB genes: can the enigma of their polymorphism be resolved? *Trends Immunol* 2001. 22: 378-385.
- 17 Zwirner, N. W., Marcos, C. Y., Mirbaha, F., Zou, Y. and Stastny, P., Identification of MICA as a new polymorphic alloantigen recognized by antibodies in sera of organ transplant recipients. *Hum Immunol* 2000. 61: 917-924.
- 18 Sumitran-Holgersson, S., Wilczek, H. E., Holgersson, J. and Soderstrom, K., Identification of the nonclassical HLA molecules, mica, as targets for humoral immunity associated with irreversible rejection of kidney allografts. *Transplantation* 2002. 74: 268-277.
- 19 Amezaga, N., Crespo, M., Lopez-Cobos, M., Millan, M. A., Vinas, O., Sole, M., Oppenheimer, F., Martorell, J. and Ercilla, M. G., Relevance of MICA antibodies in acute humoral rejection in renal transplant patients. *Transplant immunology* 2006. 17: 39-42.
- 20 Terasaki, P. I., Ozawa, M. and Castro, R., Four-year follow-up of a prospective trial of HLA and MICA antibodies on kidney graft survival. *American journal of transplantation* 2007. 7: 408-415.
- 21 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., MIC expression in renal and pancreatic allografts. *Transplantation* 2002. 73: 304-306.
- 22 Collins, R. W., Human MHC class I chain related (MIC) genes: their biological function and relevance to disease and transplantation. *Eur J Immunogenet* 2004. 31: 105-114.
- 23 Coupel, S., Leboeuf, F., Boulday, G., Souillou, J. P. and 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* 2004. 15: 2429-2439.
- 24 Le Bas-Bernardet, S., Coupel, S., Chauveau, A., Souillou, J. P. and Charreau, B., Vascular endothelial cells evade apoptosis triggered by human leukocyte antigen-DR ligation mediated by allospecific antibodies. *Transplantation* 2004. 78: 1729-1739.

- 25 Coupel, S., Moreau, A., Hamidou, M., Horejsi, V., Souillou, J. P. and Charreau, B., Expression and release of soluble HLA-E is an immunoregulatory feature of endothelial cell activation. *Blood* 2007. 109: 2806-2814.
- 26 Johnson, D. R., Locus-specific constitutive and cytokine-induced HLA class I gene expression. *J Immunol* 2003. 170: 1894-1902.
- 27 Salih, H. R., Rammensee, H. G. and Steinle, A., Cutting edge: down-regulation of MICA on human tumors by proteolytic shedding. *J Immunol* 2002. 169: 4098-4102.
- 28 Groh, V., Wu, J., Yee, C. and Spies, T., Tumour-derived soluble MIC ligands impair expression of NKG2D and T-cell activation. *Nature* 2002. 419: 734-738.
- 29 Pober, J. S., Endothelial activation: intracellular signaling pathways. *Arthritis Res* 2002. 4 Suppl 3: S109-116.
- 30 Fitau, J., Boulday, G., Coulon, F., Quillard, T. and Charreau, B., The adaptor molecule LNK negatively regulates TNFalpha-dependent VCAM-1 expression in endothelial cells through inhibition of the ERK1 and 2 pathways. *The Journal of Biological Chemistry* 2006. in press.
- 31 Wu, J. D., Higgins, L. M., Steinle, A., Cosman, D., Haugk, K. and Plymate, S. R., Prevalent expression of the immunostimulatory MHC class I chain-related molecule is counteracted by shedding in prostate cancer. *J Clin Invest* 2004. 114: 560-568.
- 32 Cerboni, C., Zingoni, A., Cippitelli, M., Piccoli, M., Frati, L. and Santoni, A., Antigen-activated human T lymphocytes express cell surface NKG2D ligands via an ATM/ATR-dependent mechanism and become susceptible to autologous NK cell lysis 2007.
- 33 Nowbakht, P., Ionescu, M. C., Rohner, A., Kalberer, C. P., Rossy, E., Mori, L., Cosman, D., De Libero, G. and Wodnar-Filipowicz, A., Ligands for natural killer cell-activating receptors are expressed upon the maturation of normal myelomonocytic cells but at low levels in acute myeloid leukemias. *Blood* 2005. 105: 3615-3622.
- 34 Vivier, E., Tomasello, E. and Paul, P., Lymphocyte activation via NKG2D: towards a new paradigm in immune recognition? *Current opinion in immunology* 2002. 14: 306-311.
- 35 Oppenheim, D. E., Roberts, S. J., Clarke, S. L., Filler, R., Lewis, J. M., Tigelaar, R. E., Girardi, M. and Hayday, A. C., Sustained localized expression of ligand for the activating NKG2D receptor impairs natural cytotoxicity in vivo and reduces tumor immunosurveillance. *Nat Immunol* 2005. 6: 928-937.
- 36 Zou, Y., Mirbaha, F. and Stastny, P., Contact inhibition causes strong downregulation of expression of MICA in human fibroblasts and decreased NK cell killing. *Human immunology* 2006. 67: 183-187.

- 37 Molinero, L. L., Fuertes, M. B., Girart, M. V., Fainboim, L., Rabinovich, G. A., Costas, M. A. and Zwirner, N. W., NF-kappa B regulates expression of the MHC class I-related chain A gene in activated T lymphocytes. *Journal of immunology (Baltimore, Md.* 2004. 173: 5583-5590.
- 38 Molinero, L. L., Fuertes, M. B., Fainboim, L., Rabinovich, G. A. and Zwirner, N. W., Up-regulated expression of MICA on activated T lymphocytes involves Lck and Fyn kinases and signaling through MEK1/ERK, p38 MAP kinase, and calcineurin. *Journal of leukocyte biology* 2003. 73: 815-822.
- 39 Xu, X., Rao, G., Gaffud, M. J., Ding, H. G., Maki, G., Klingemann, H. G., Groh, V., Spies, T., Caillat-Zucman, S., Gattuso, P., Plate, J. and Prinz, R. A., Clinicopathologic significance of major histocompatibility complex class I-related chain A and B (MICA/B) expression in thyroid cancer. *J Clin Endocrinol Metab* 2006.
- 40 Le Bas-Bernardet, S., Hourmant, M., Coupel, S., Bignon, J. D., Souillou, J. P. and Charreau, B., Non-HLA-Type Endothelial Cell Reactive Alloantibodies in Pre-Transplant Sera of Kidney Recipients Trigger Apoptosis. *Am J Transplant* 2003. 3: 167-177.
- 41 Tieng, V., Le Bouguenec, C., du Merle, L., Bertheau, P., Desreumaux, P., Janin, A., Charron, D. and Toubert, A., 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* 2002. 99: 2977-2982.

Figure Legends

Figure 1. MICA expression and localization in human vascular ECs. (A) Immunofluorescence showing cell surface staining for MICA on non-permeabilized vascular ECs using an anti-MICA mAbs (AMO1) or recombinant NKG2D-Fc protein. Nuclei were stained with To-pro-3 (red). (B) Confocal microscope images showing the colocalization of MICA (left panel; green), rhodamine-B hexyl ester (for ER staining) or anti-golgin-97 (for Golgi staining, both middle panel; red) on permeabilized ECs. Merged images are shown on the right panel. Colocalization is shown in yellow. Original magnification: x63. (C) Immunoblotting of MICA in cellular lysates from C1R, C1RMICA, HeLa and primary cultures of human vascular ECs (HUVEC and HAEC). Blot was reprobated using anti-GAPDH mAb to ensure equal loading. A representative immunoblot is shown out of 3 independent experiments.

Figure 2. Constitutive expression of functional MICA at EC surface

(A) **Flow cytometry analysis comparing HLA-A, -B, -C and MICA expression** at the cell surface on resting, unstimulated, HAEC using various anti-MICA/B mAbs. Mean of specific fluorescence intensity are indicated. (B) **Comparative analysis of basal MICA expression** on ECs and lymphoid T (Jurkat), B (Raji) and monocytoid (U937) cell lines. (C) **Profiles of classical HLA class I and MICA expression on vascular ECs isolated from transplant donors.** HAEC isolated from normal volunteers ($n = 7$) were stained with mAbs for HLA-A, -B, -C (W6/32) or MICA (AMO1) as described in *Materials and Methods*. Cell surface expression of HLA-A, -B, -C and MICA cells was examined by flow cytometry and was expressed as mean of fluorescence intensity (MFI), the horizontal bar represents the mean of the 7 determinations.

Figure 3. Basal MICA expressed on ECs trigger a functional duality toward NKG2D-bearing cells.

(A - B) **Endothelial MICA activates NK cell cytotoxicity.** Cytotoxicity assays were performed using ECs as target cells and freshly isolated polyclonal allogeneic NK cells as effectors. NK cells

were pre-incubated with culture medium, control IgG (mouse IgG1; 10µg/mL) and anti-NKG2A, NKG2C or anti-NKG2D mAbs (0.5 - 2µg/mL) for 20 min at RT before addition of EC. Results are expressed as mean of specific lysis \pm SD, and are representative of at least three independent experiments, * p <0.05 *versus* control, ** p <0.05 for TNF α *versus* IFN γ .

(C-E). Endothelial MICA down-regulates NKG2D expression and activity. **(C)** A time course analysis showing NKG2D expression on NKL cells after a coculture period with a monolayer of resting ECs. Mean of specific fluorescence intensity are indicated above histograms. **(D)** Results are expressed in percentages from a quantitative analysis of 4 separate experiments. **(E)** After a 24h-coculture period with ECs, NKL cells were used in a redirected cytotoxicity assay using MICA-transfected C1R cells as target. Results are expressed as mean of specific lysis \pm SD, and are representative of at least three independent experiments, * p <0.05 *versus* control.

Figure 4. Comparative effect of cytokines on MICA expression and function

(A) Facs analysis comparing HLA -A, -B, -C (left) and MICA (right) expression at EC surface before and after 48h of treatment with TNF α or IFN γ . Results are expressed as a quantitative analysis from 4 separate experiments. **(B)** Facs analysis showing NKG2D and CD94 levels expressed on NKL cells after a coculture period with resting or IFN γ -activated ECs. Mean of specific fluorescence intensity are indicated above histograms. **(C)** Quantification of CD94 and NKG2D expression on NKL after a 24h-coculture period with C1R, C1RMICA, HeLa, HAEC (resting or stimulated for 48h with 100U/mL IFN γ), * p <0.05 *versus* controls, ** p <0.05 *versus* untreated ECs.

Figure 5. Post-transcriptional and signalling events controlling MICA expression

(A) Impact of cell glycosylation. Facs analysis comparing HLA -A, -B, -C (left) and MICA (right) expression at EC surface before and after 24h of treatment with tunicamycin. Results are expressed as a quantitative analysis from 4 separate experiments. **(B) Impact of MMP activity.** Facs analysis comparing HLA -A, -B, -C (left) and MICA (right) expression at EC surface before and after 24h of treatment with galardin. Results are expressed as a quantitative analysis from 4 separate experiments. **(C) Release of soluble MICA in conditioned medium from activated ECs.** ECs were treated for various period of time with TNF α , IL1 β or IFN γ . After treatment, cell culture supernatants were

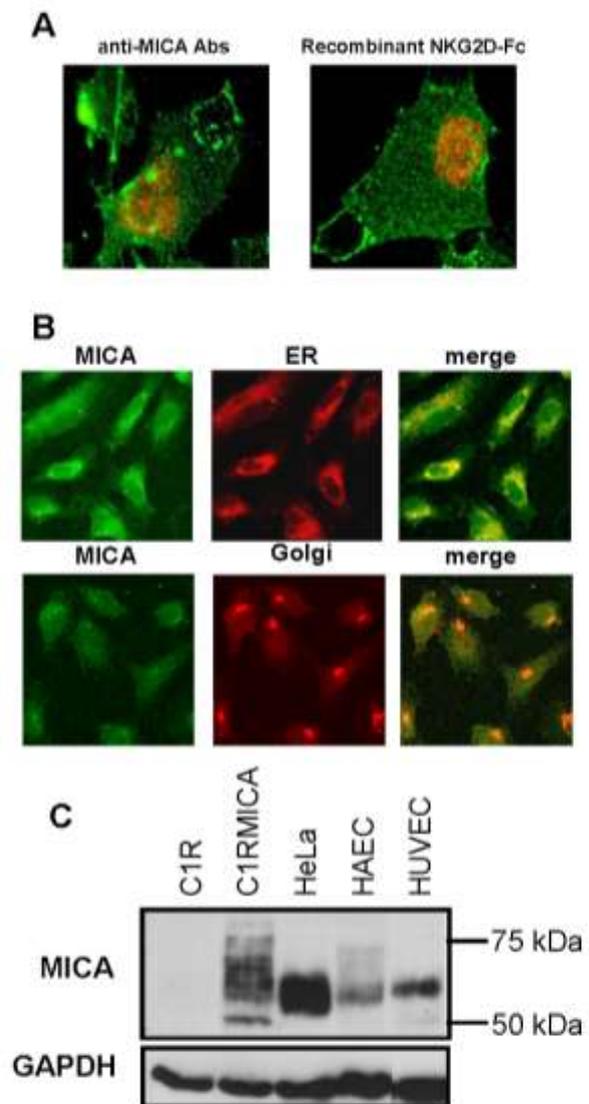
collected and soluble MICA was quantified using a sandwich ELISA assay. Left panel shows level of sMICA in supernatants from cytokine-activated ECs at 48h and the right panel shows a time course analysis of sMICA release by ECs treated with cytokines. Results are shown as mean of triplicate and are representative of 3 independent experiments. (D) ECs were pretreated with inhibitors for 1h before stimulation with TNF α (left panel) or IFN γ (right panel) for 24h. MICA levels were analyzed by facs. Results from 3 independent experiments were expressed as a percentage of MICA

Figure 6. Signaling pathways triggering changes in MICA expression in response to cytokines. A quantitative analysis, from 4 independent experiments performed by Facs analysis and showing the cell surface level of MICA on ECs treated with TNF α (100U/mL, left) or IFN γ (100U/mL, right) for 24h after a 1h-preincubation with selective inhibitors of signaling pathways, *p<0.05 versus controls without cytokines and **p<0.05 versus cytokines-treated controls (medium and IgG controls).

Figure 7. Regulatory effect of cell contact inhibition and proliferation on MICA levels.

(A) ECs were plated at various cell densities (0.25 – 2.0.10⁵ cells/well) and cultured for 12h. Cells were then harvested and MICA expression was analyzed by flow cytometry using anti-MICA mAbs (AM01). Results are expressed as percentages calculated from MFI issued from 3 experiments, *p<0.05 versus the lowest cell density (0.25.10⁵ cells/well). **(B)** Representative photographs of confluent (100%) and semi-confluent (50%) EC monolayers are shown on the left (phase contrast microscope, original magnification; X10). Right panel shows a representative cytotoxicity assay performed using ECs harvested from a confluent (100%) or a semi-confluent monolayer (50%) as target cells and freshly isolated polyclonal allogeneic NK cells as effectors. Results are expressed as mean of specific lysis \pm SD, and are representative of three independent experiments. **(C)** HAEC monolayers were mechanically wounded using a sterile pipette tips, allowed to repair for 24h and then fixed. Cells were first stained with an anti-MICA mAbs revealing using a TRITC-labeled secondary Ab (red) and subsequently permeabilized and stained with a FITC-labelled anti-KI67 Ab (green). Nuclei were stained with Dapi (blue). Merged images are shown on the right panel. Original magnification: x40. Wound edge is materialized by a broken line (q: quiescent, p: proliferative)

Figure 1



Chauveau A. *et al.*

Figure 2

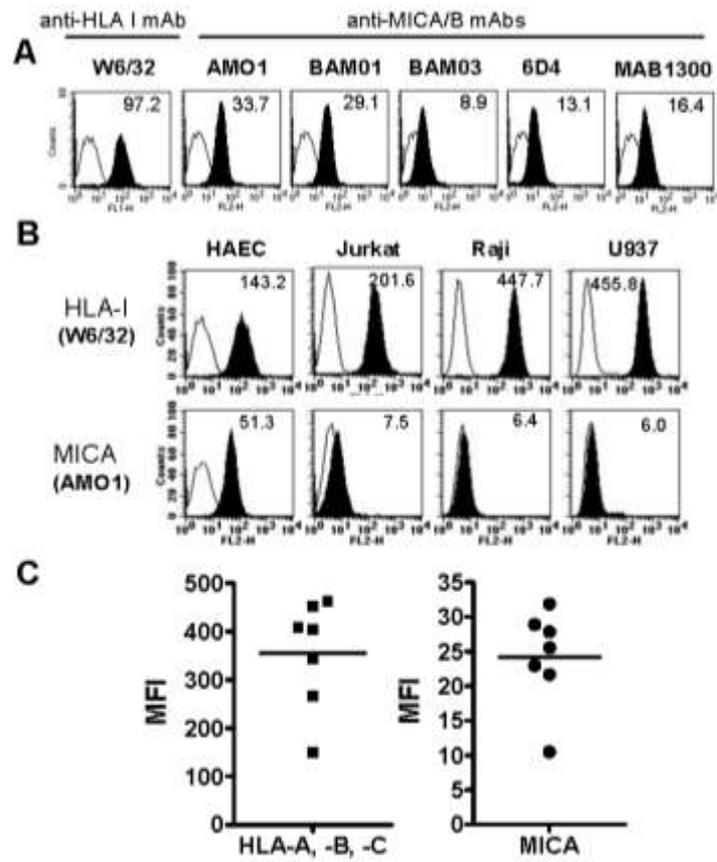


Figure 3

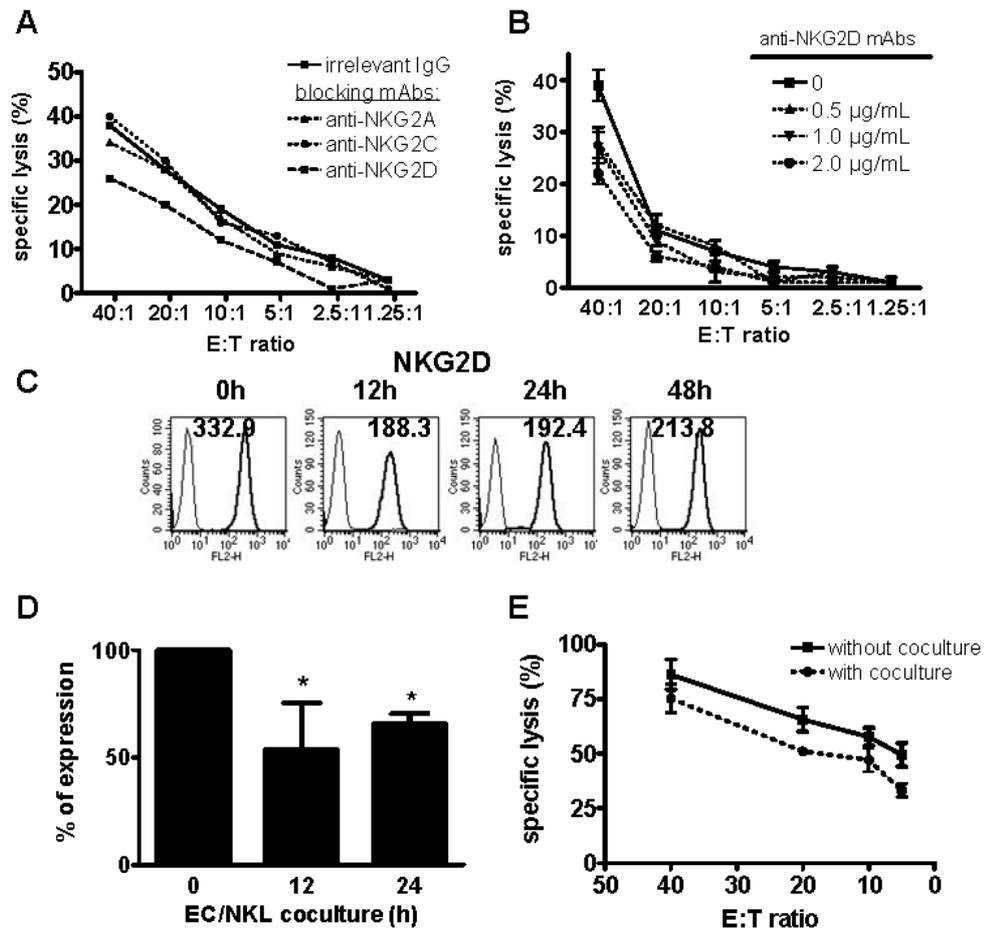
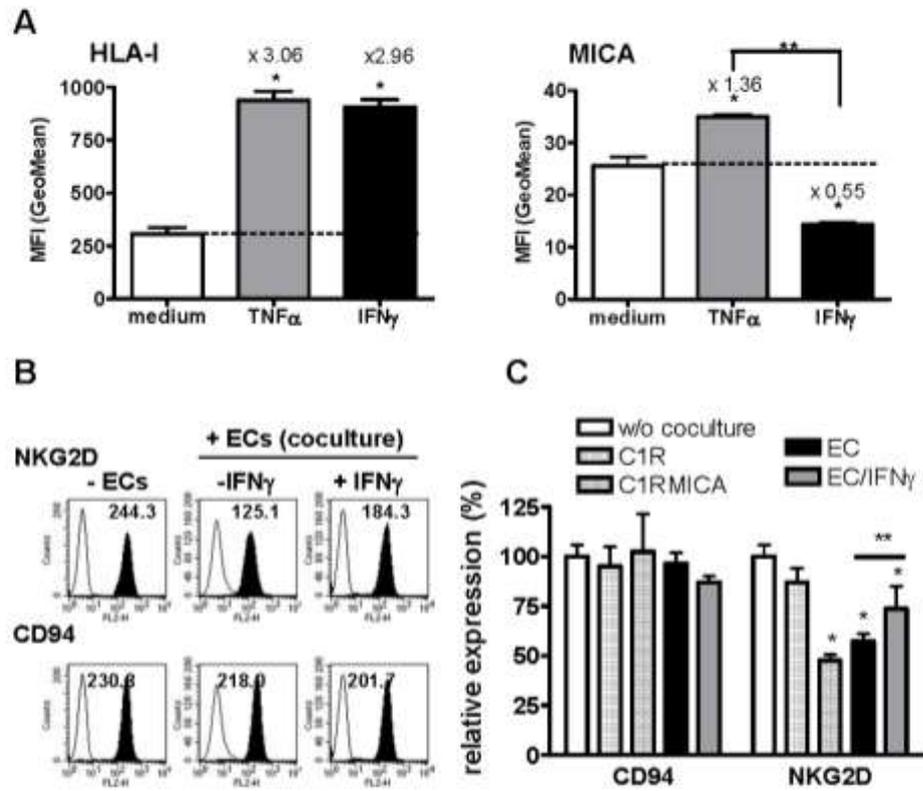
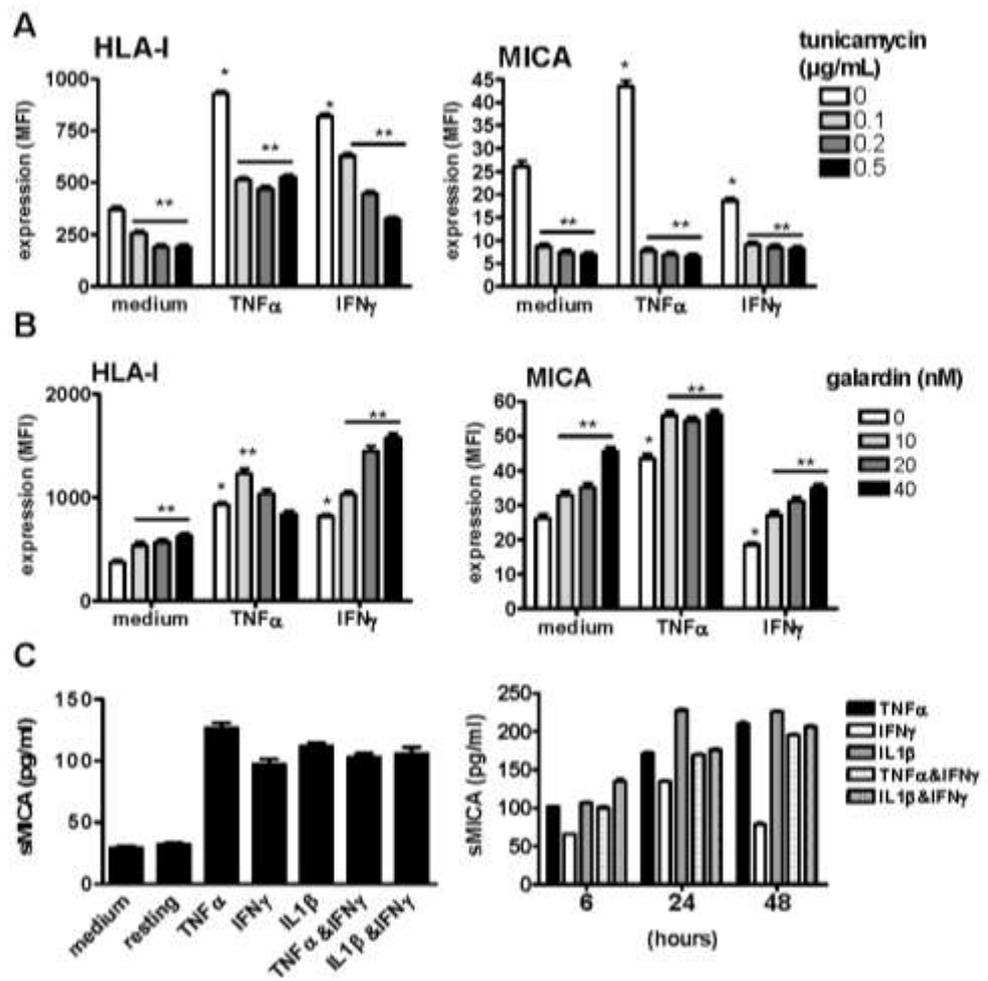


Figure 4



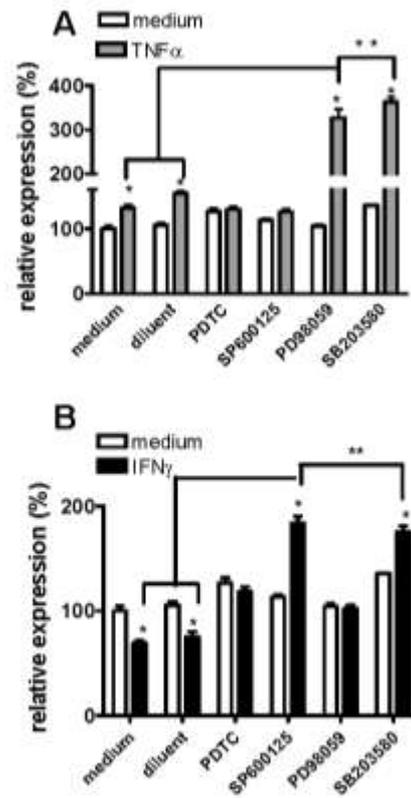
Chauveau A. et al.

Figure 5



Chauveau A. et al.

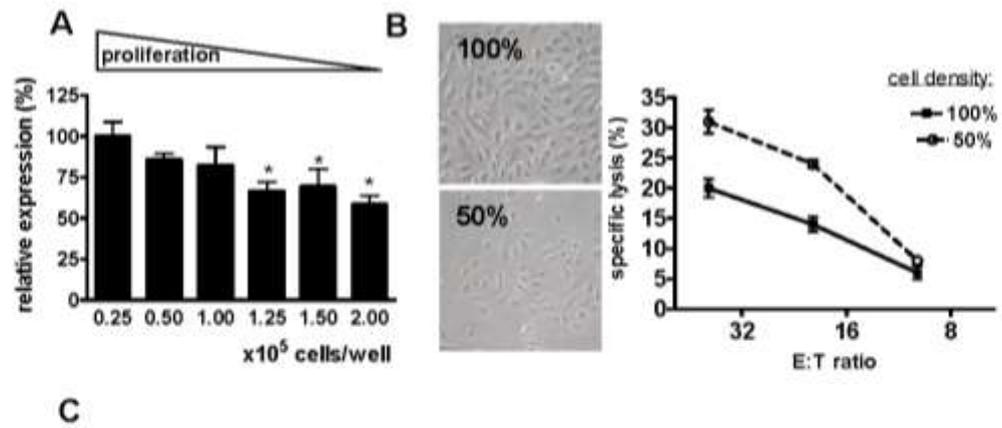
Figure 6

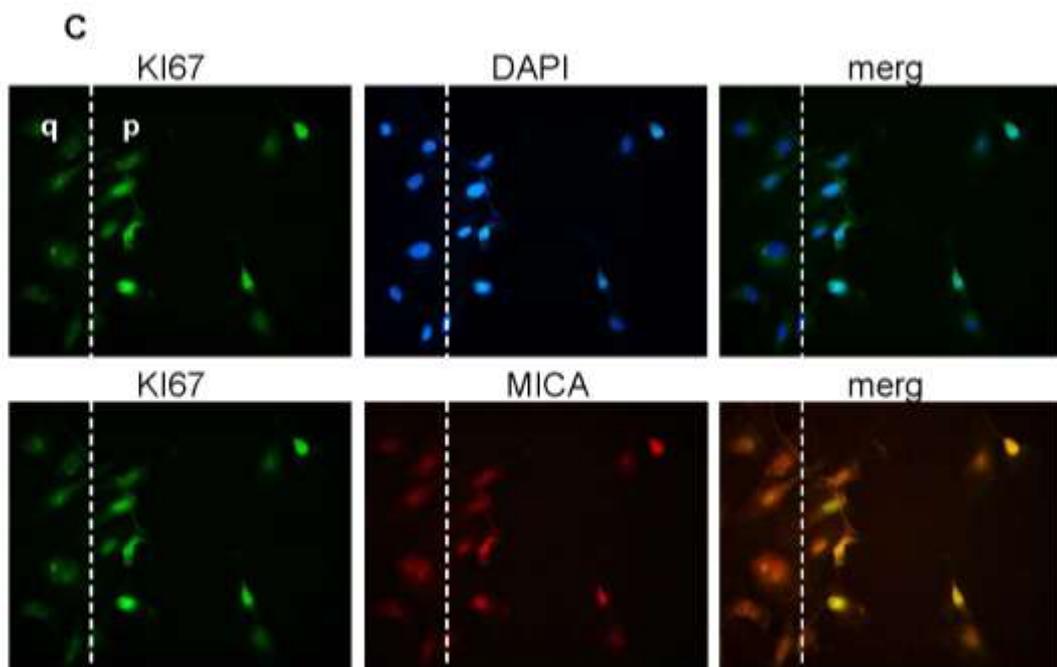


33

Chauveau A. et al.

Figure 7





Annexe 2

Vascular endothelial cells evade apoptosis triggered by human leukocyte antigen-DR ligation mediated by allospecific antibodies

Le Bas-Bernardet S, Coupel S, Chauveau A, Souillou JP, Charreau B.

Article publié en décembre 2004 dans la revue “**Transplantation**”

Vascular Endothelial Cells Evade Apoptosis Triggered by Human Leukocyte Antigen-DR Ligation Mediated by Allospecific Antibodies

Stéphanie Le Bas-Bernardet, Stéphanie Coupel, Annabelle Chauveau, Jean-Paul Soulillou, and Béatrice Charreau

Background. Human leukocyte antigen (HLA)-DR ligation mediates cell death of antigen-presenting cells (APC), including mature B cells, macrophages, and dendritic cells. This study investigates the apoptotic effects of HLA class II ligation mediated by anti-HLA antibodies on activated human vascular graft endothelial cells (ECs).

Methods. HLA class II expression was examined by flow cytometry using a panel of HLA-typed vascular ECs isolated from transplant donors and compared with that of B lymphocytes. The apoptotic effects of anti-HLA-DR monoclonal antibodies (mAbs) were investigated using viability assays, DNA content analysis, and annexin-V labeling. Intracellular signaling pathways mediated by HLA-DR ligation on ECs were examined by Western blotting.

Results. Even with optimal stimulation, the expression of HLA-DR on interferon (IFN)- γ -treated ECs was quantitatively lower (3–5-fold) than that on B cells. Whereas anti-HLA-DR monomorphic mAbs induced apoptosis of B cells (approximately 22%), no significant apoptosis of IFN- γ -activated (DR-positive) ECs (<5%), collected from the same donor, was observed under the same conditions. Similarly, specific polymorphic anti-HLA-DR11 or -DR16 antibodies were unable to induce EC apoptosis. Nevertheless, antibody-binding to HLA-DR on ECs is sufficient to induce intracellular signaling, as evident in the modulation of tyrosine phosphorylation and protein kinase (PK)C- α/β and PKB/Akt activation. Our results suggest that HLA-DR ligation induces both common and divergent signaling events in ECs and B cells.

Conclusion. Collectively, our data suggest that, in contrast with professional APC, graft ECs evade apoptosis mediated by HLA-DR ligation, not as a result of moderate HLA-DR expression but rather as a result of a specific signaling pathway.

Keywords: Endothelial cells, Alloantibodies, HLA-DR, Apoptosis, Kidney, Transplantation.

(*Transplantation* 2004;78: 1729–1739)

Hyperacute vascular graft rejection, the direct consequence of preformed donor-reactive human leukocyte antigen (HLA)-directed antibodies (Abs), has become rare since the introduction of the complement-dependent lymphocytotoxic cross-match test, in which recipient serum is reacted against donor lymphocytes before transplantation. Currently, transplantation against a positive T-cell cross-match (indicating donor-specific anti-HLA class I Abs) is strictly avoided in routine clinical practice.

The prognosis for grafts performed on recipients pre-sensitized to donor HLA class II is still controversial. In some studies, the presence of anti-HLA class II Abs has been associated with a higher incidence of graft rejection (1, 2).

In a previous cross-match study, we showed that donor-specific anti-HLA class II Abs, in the absence of donor-specific anti-HLA class I Abs, are not necessarily harmful to the transplanted organ (3). Supporting these results, a recent

study demonstrated that only the simultaneous presence of preformed anti-HLA class I and class II Abs has a significantly adverse effect on kidney graft outcome, and that recipients with either class I or class II Abs have good graft survival rates, even if they receive transplants against mismatches in the corresponding HLA antigen class (4). After transplantation, the presence of these Abs is not routinely monitored, although increasing evidence associates the presence of elicited anti-HLA Abs with a higher incidence of acute and chronic graft rejection (5). Recent studies indicate that the posttransplantation production in transplant recipients of Abs directed against donor HLA mismatches is predictive of graft failure (6–8). Nevertheless, the individual contributions of anti-HLA class I and class II Abs to this phenomenon are still poorly understood (9). Moreover, how noncomplement-fixing anti-HLA alloantibodies affect donor-cell function has yet to be established. In previous studies, it has been shown that anti-HLA Abs, developed by transplant recipients after transplantation, are capable of transducing signals by way of HLA class I molecules, which stimulate cell proliferation (10). This also results in increased tyrosine phosphorylation of several intracellular proteins in endothelial cells (ECs) (11). Until now, the effects of HLA class II ligation on vascular ECs have not been elucidated.

The class II HLAs are constitutively expressed on antigen-presenting cells (APC) and are essential for alloantigen presentation to CD4+ T lymphocytes. Signal transduction by HLA class II molecules can initiate apoptosis of mature APC, including B cells (12) and dendritic cells (DCs) (13). CD34+

This work was supported by the Fondation Progreffe and a fellowship from the Fondation pour la Recherche Médicale (to SLB).

Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, Unité 643 "Immunointervention en Allo et Xenotransplantation" and Institut de Transplantation et de Recherche en Transplantation, C.H.U. Hôtel-Dieu, Nantes, France.

Address correspondence to: Dr. Béatrice Charreau, INSERM U643-ITERT, 30 bd J. Monnet, 44093 Nantes cedex 01, France. E-mail: charreau@nantes.inserm.fr.

Received 21 April 2004. Revision requested 26 May 2004. Accepted 24 August 2004.

Copyright © 2004 by Lippincott Williams & Wilkins

ISSN 0041-1337/04/7812-1729

DOI: 10.1097/01.TP.0000147339.31581.99

hematopoietic progenitors and monocytes are resistant to HLA-DR-mediated apoptosis, whereas macrophages, B cells, and DCs are sensitive to it, and are even more sensitive after maturation, suggesting a correlation between differentiation state or APC capacity (13).

Because they express donor HLA class I and class II antigens (14) (15), activated graft ECs can be the cellular targets of preformed or elicited anti-HLA alloantibodies, but also present alloantigens to host T cells, as nonprofessional APC (16). In the present study, we examined the effect of HLA class II ligation, mediated by anti-HLA-DR Abs, on EC apoptosis. To this end, human primary cultures of HLA- and ABO-typed vascular ECs, isolated from cadaveric kidney-transplant donors, were incubated in vitro with monoclonal Abs (mAbs) specific for monomorphic or polymorphic determinants of the HLA-DR molecules expressed by interferon (IFN)- γ -treated ECs. EC viability and apoptosis were evaluated by 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) staining, cellular DNA content, and annexin-V-labeling and compared with those of B cells. The ability of Ab-mediated ligation of HLA-DR to trigger intracellular signaling and protein kinase C (PKC) and the PI3-kinase/Akt activation in ECs was further analyzed by immunoblotting.

MATERIALS AND METHODS

Endothelial Cell Isolation, Culture, and Activation

Human arterial endothelial cells (HAEC) were isolated from unused pieces of renal artery taken from cadaveric organ donors before kidney transplantation. Primary cultures were generated by digestion with 0.2% collagenase A (Boehringer, Mannheim, Germany) for 30 minutes at 37°C. After digestion, ECs were harvested and cultured in EC growth medium supplemented with 10% fetal calf serum, 0.4% EC growth supplement/heparin, 0.1 ng/mL human epidermal growth factor, 1 ng/mL human basic fibroblast growth factor, 1 μ g/mL hydrocortisone, 50 μ g/mL gentamicin, and 50 ng/mL amphotericin B (C-22010; PromoCell, Heidelberg, Germany) at 37°C in a humidified 5% CO₂ atmosphere. For experiments, ECs were used between the second and fifth passages. For activation, EC monolayers were cultured with 100 U/mL recombinant human gamma IFN- γ (Imukin, Boehringer Ingelheim, Germany) or 100 U/mL recombinant human tumor necrosis factor- α (TNF- α ; kindly provided by Prof. P. Neuman, Ludwigshafen, Germany) for 24 to 96 hours. CD19+ B cells were isolated from peripheral blood mononuclear cells (PBMC) by positive selection using the CD19-Microbead Selection Kit (Miltenyi Biotec, Paris, France). The Daudi and Raji B-cell lines are well-characterized B-lymphoblast cell lines established from Burkitt's lymphoma and were purchased from the American Type Culture Collection (ATCC).

Flow Cytometry and Antibodies

ECs (1–2 $\times 10^5$ cells/sample) were suspended in trypsin-ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA; Gibco BRL), washed twice with phosphate-buffered saline (PBS) containing 1% bovine serum albumin (BSA) and 0.1% NaN₃, and then incubated on ice for 30 minutes with a saturating con-

centration of primary Ab. After three washes in 1% BSA/0.1% NaN₃/PBS, cells were incubated with a fluorescein isothiocyanate (FITC)-labeled goat anti-mouse F(ab')₂ immunoglobulin (Ig)G (Jackson Laboratories, West Grove, PA) at 4°C for 30 minutes. This step was followed by three washes in cold 1% BSA/0.1% NaN₃/PBS, and the cells were suspended in 1% formaldehyde in PBS. Negative controls were performed by incubating the cells with FITC-labeled goat anti-mouse Ab alone. Mouse mAbs used for this study were anti-HLA class I (clone W6/32; ATCC), monomorphic anti-HLA-DR (clone L243: anti-HLA-DRB1 + DRB4 IgG2a, monomorphic), anti-HLA DQ1 and DQ3 (clone SK10: DQw1 and DQw3), anti-HLA DP (clone B7/21), anti-CD31(PECAM-1) (clone WM59; Becton Dickinson, Le Pont de Claix, France), anti-CD146 (S-endo-1; kindly provided by Dr. F. Dignat-Georges, CHU Marseille, France), anti-CD102 (intercellular adhesion molecule [ICAM]-2) (clone BT1; Beckman Coulter), anti-ICAM-1 (clone BH-7), anti-E-selectin (R&D Systems, Lille, France), and anti-vascular cell adhesion molecule (VCAM)-1 (R&D Systems). Polymorphic Abs specific for HLA-DR11 or -DR16 were purchased from One Lambda (Canoga Park, CA).

Fluorescence was measured on 10,000 cells/sample using a fluorescence-activated cell sorter (FACS; FACSCalibur, Becton Dickinson, Mountain View, CA). Data are presented in histograms plotting mean fluorescence intensity (MFI) on a four-decade logarithmic scale (x-axis) versus cell number (y-axis).

Apoptosis Assays

MTT Colorimetric Assay

ECs were plated onto 96-well plastic plates (Nunc, Roskilde, Denmark) precoated with 1% gelatin at 1 $\times 10^4$ cells/well. After treatment, cell viability was assessed by incubation with 1 mg/mL MTT for 5 hours at 37°C, with optical density measured at 550 nm. Experiments were performed in triplicate, and the results are expressed as a percentage \pm SD.

Cellular DNA Content Analysis

After treatment, B cells were harvested, and floating ECs were collected and pooled with residual attached ECs harvested by trypsin treatment. Each sample of pooled cells was washed once with PBS, fixed in ice-cold 70% ethanol, and incubated for 24 hours at 4°C. Fixed cells were then stained with 50 μ g/mL propidium iodide (PI), 100 U/mL RNase A, and 1 mg/mL glucose in PBS (1 mL/1 $\times 10^6$ cells). Fluorescence was measured on 10,000 cells/sample using FACS (FACSCalibur) and analyzed using CellQuestPro software (Becton Dickinson). Data are presented in histograms of cellular DNA content versus cell number, and the percentage of apoptotic cells (hypodiploid cells in sub-G1) is indicated.

Annexin-V Labeling

After treatment, floating ECs were collected, and adhesive cells were trypsinized and harvested from six-well plates. The pellet was washed twice in PBS, then resuspended in binding buffer (10 mmol/L HEPES/NaOH [pH 7.4], 140 mmol/L NaCl, and 2.5 mmol/L CaCl₂). Annexin-V-FITC was added to a final concentration of 100 ng/mL, and the cells were incubated in the dark for 10 minutes, then washed and

resuspended in 300 μ L of binding buffer. PI was added to each sample before flow cytometric analysis. Fluorescence was measured on 10,000 cells/sample using FACS (FACSCalibur) and analyzed using CellQuestPro software (Becton Dickinson).

Western Blot Analysis

Cells were lysed on ice in 20 mmol/L Tris-HCl (pH 7.4), 137 mmol/L NaCl, 0.05% Triton X-100, 1 mmol/L phenyl-

methylsulfonyl fluoride, 0.2 U/mL aprotinin, and 100 μ g/mL leupeptin. Protein concentrations were measured using BCA Protein Assay Reagent (Pierce, Rockford, IL). Cell lysates (15 μ g protein) were resolved by sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (10–15%) and subjected to Western immunoblot analysis using the following Abs: rabbit polyclonal IgG antiphospho-PKC- α/β II (Thr638/641), anti-Akt, anti-Phospho-Akt (Ser473) from Cell Signaling Technology (Beverly, MA), and mouse antiphospho-tyrosine

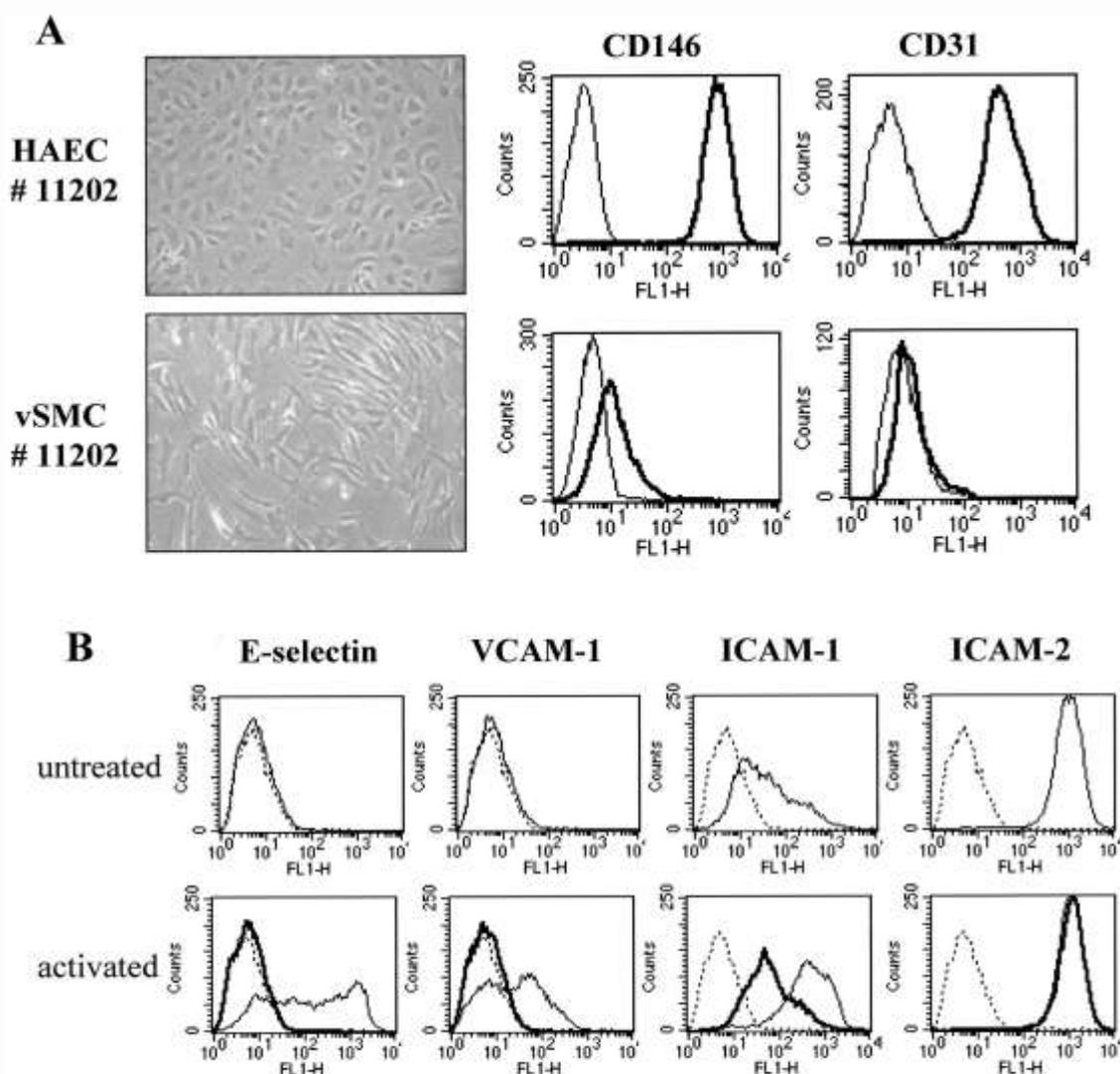
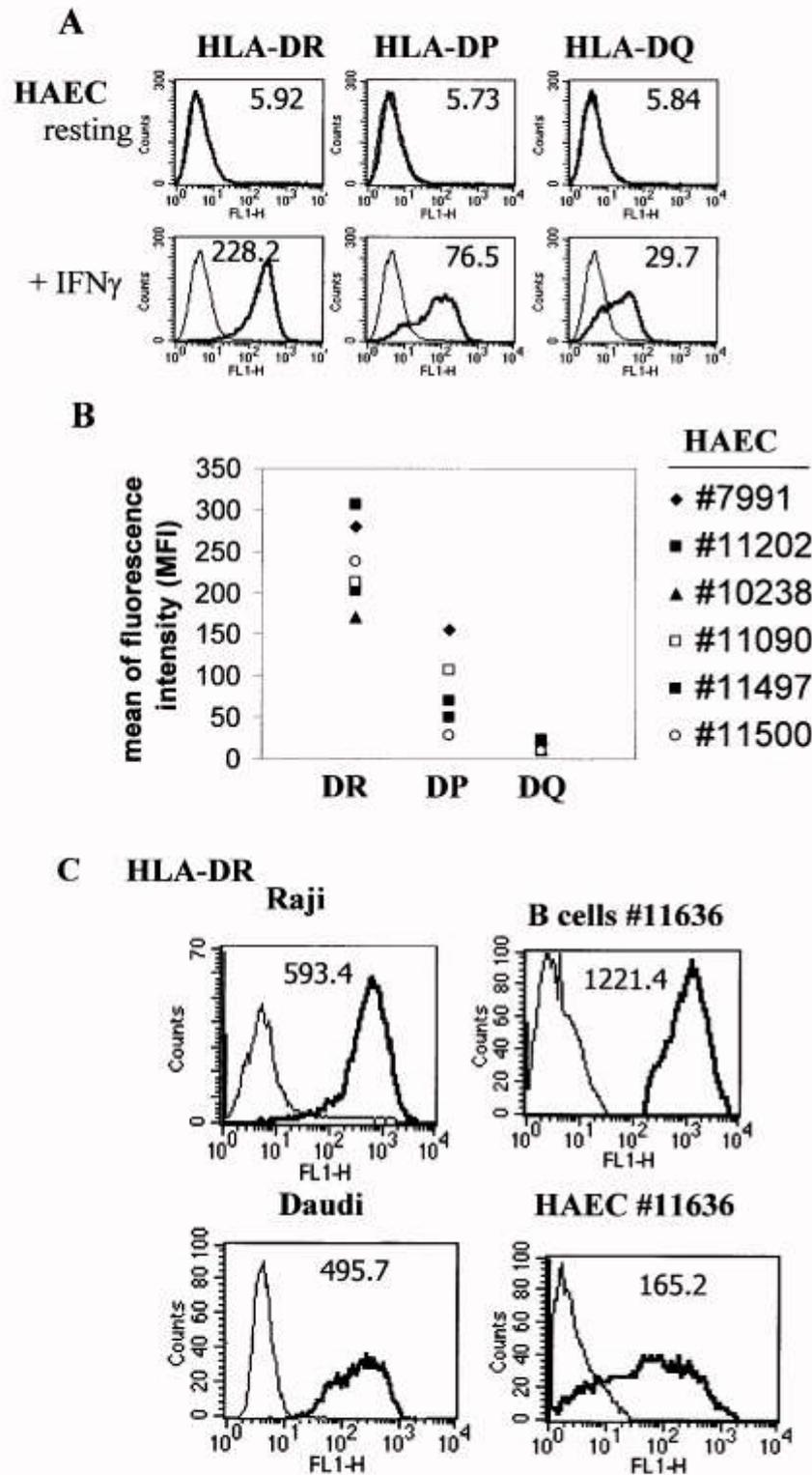


FIGURE 1. (A) Characterization of human vascular endothelial cell (EC) cultures. Comparative analysis of the morphology and phenotype of vSMCs and human aortic endothelial cells (HAECs) isolated from the same individual. Cell morphology was assessed by phase-contrast microscopy ($\times 400$), and phenotype was defined by flow cytometry using anti-CD146 and anti-CD31 monoclonal antibodies (mAbs). (B) Phenotypic comparison of resting (upper) and cytokine-activated HAECs (lower). ECs were treated with medium alone or incubated with tumor necrosis factor (TNF)- α (100 U/mL, *thin line*) or interferon (IFN)- γ (100 U/mL, *bold line*) for 6 hours. After treatment, ECs were harvested and incubated with anti-E-selectin, anti-vascular cell adhesion molecule (VCAM)-1, anti-intercellular adhesion molecule (ICAM)-1, or anti-ICAM-2 primary mAbs. Fluorescein isothiocyanate (FITC)-labeled goat anti-mouse immunoglobulin (Ig)G was used as the secondary antibody. Negative controls (*dashed line*) were performed by incubating the cells with FITC-labeled goat anti-mouse Ab alone.



(4G10) (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA). Horseradish peroxidase-conjugated anti-rabbit and anti-mouse IgGs (Cell Signaling Technology) were used as secondary Abs in chemiluminescent Western blot assays. To verify the amount of proteins loaded, blots were reprobed with mouse monoclonal anti-glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) Ab (Chemicon, Temecula, CA). Blot quantification was performed by densitometry analysis with Kodak Digital Science Image Station 440 CF and Kodak Digital Science Image Analysis 1D software (Eastman Kodak Company, Rochester, NY). Data are representative of at least three independent experiments.

Statistical Analysis

Data are shown as means \pm SEM. All data were evaluated with two-tailed unpaired Student's *t* test or compared by one-way analysis of variance. A *P* value of less than 0.05 was deemed significant for all tests.

RESULTS

Isolation and Characterization of HAECs

A collection ($n=17$) of primary HAECs was isolated from HLA- and ABO-typed individual organ donors. The phenotype of each primary EC culture was determined by flow cytometry using Abs to the endothelial-specific antigens CD146 (S-endo-1) and CD31. As illustrated in Figure 1A, cultured HAECs (donor #11202) constitutively expressed both CD146 or CD31. In contrast, vascular smooth-muscle cells (vSMCs) isolated from the same donor (vSMCs #11202) did not express CD146 and CD31 but did express α -actin (data not shown). The phenotypic analysis shown in Figure 1B indicates that, at rest (upper panel), primary cultures of HAECs also expressed ICAM-1 and ICAM-2 but not E-selectin or VCAM-1. EC activation with recombinant TNF- α or IFN- γ (lower panel) selectively triggered the transient induction of E-selectin and VCAM-1 and the up-regulation of ICAM-1 expression, typical hallmarks of EC activation.

Expression and Regulation of HLA Class II Molecules on HAECs

Vascular ECs do not constitutively express HLA class II antigens. Expression of HLA-DR, -DQ, and -DP was selectively induced by IFN- γ and reached a maximum level at 72 hours, as shown in Figure 2A. The induced expression of HLA-DQ was lower than that of HLA-DP, whereas the induced expression of HLA-DP was lower than that of HLA-DR, as previously reported (15) (Fig. 2A). This hierarchy in the levels of HLA class II expression was consistently observed for ECs collected from different donors ($n=6$), with little variation between individuals (Fig. 2B). Comparative analysis indicated that the inducible expression of HLA-DR on ECs was lower (approximately 3-fold) than constitutive HLA-DR expression on Raji or Daudi B cell lines. This discrepancy was further confirmed when HLA-DR levels were compared on HAECs and B cells isolated from the same donor (donor #11636) (MFI=165.2 vs. 1221.4 for ECs and B cells, respectively) (Fig. 2C).

HLA-DR Ligation on Vascular ECs does not Trigger Apoptosis

Cell death and apoptosis were assessed by three different methods: MTT staining for cell viability, PI staining and DNA content analysis, and annexin-V labeling. First, viability assays were performed on resting or IFN- γ -activated HAECs incubated for 24 hours with anti-HLA-DR mAb (L243) or in the presence of TNF- α and cycloheximide (CHX). As previously reported, TNF- α promotes EC apoptosis when mRNA or protein synthesis is inhibited by actinomycin D or CHX (17). Data shown in Figure 3 indicate that CHX plus TNF- α strongly reduced cell viability (26.7–49.9% cell viability compared with controls, $*P<0.05$), whereas anti-HLA-DR mAb had no significant effect ($P>0.05$). Apoptosis was further investigated by cellular DNA content analysis. Our results indicate that the incubation of Raji B cells with monomorphic anti-HLA-DR (L243) mAb induced apoptosis in 51% of cells, whereas background levels of apoptosis induced by irrelevant Abs was 26.5% (Fig. 4). Similarly, the incubation of B cells, purified from PBMC (donor #11636), with anti-HLA-DR (L243) mAb resulted in a significant increase in apoptotic cell number (21.4% increase in apoptotic cells). Under the same conditions, no significant apoptosis of resting (DR-negative) or IFN- γ -activated (DR-positive) ECs was observed (1.7% and 1.6% apoptosis, respectively) (Fig. 4). Cross-linking anti-HLA-DR mAbs with an anti-mouse IgG did not enhance cell apoptosis (data not shown). In contrast, incubation of HAECs with TNF- α in the presence of CHX efficiently induced EC apoptosis (35.4% and 33.7% apoptotic cells in resting and activated ECs, respectively).

To further investigate the effects of HLA-DR ligation on vascular ECs, IFN- γ -treated ECs (HAEC #11202: DR16+, DR11-; and HAEC #11636: DR11+, DR16-) were incubated with polymorphic Abs specific for HLA-DR11 or -DR16. The binding of specific anti-HLA-DR IgG to HAEC cultures is shown in Figure 5A. FACS analysis performed after double staining with PI (FL2) and annexin-V-FITC (FL1)

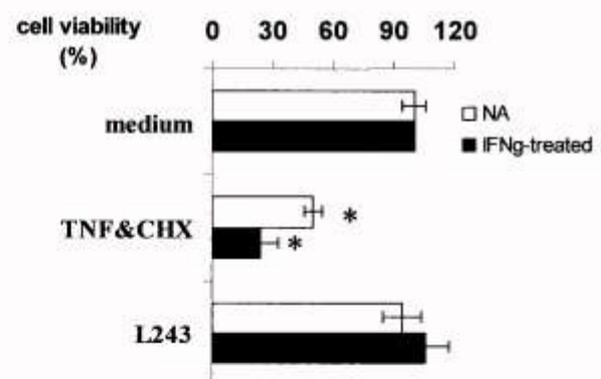


FIGURE 3. Cell viability assays. HAECs were preactivated with or without 100 U/mL IFN- γ for 72 hours and then incubated for 24 hours with culture medium, cycloheximide (CHX, 2.5 μ g/mL), and TNF- α (100 U/mL) or anti-HLA-DR (L243; 10 μ g/mL) mAb. After treatment, cell monolayers were incubated with 1 mg/mL 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) for 8 hours at 37°C, and optical density (OD) was measured at 550 nm.

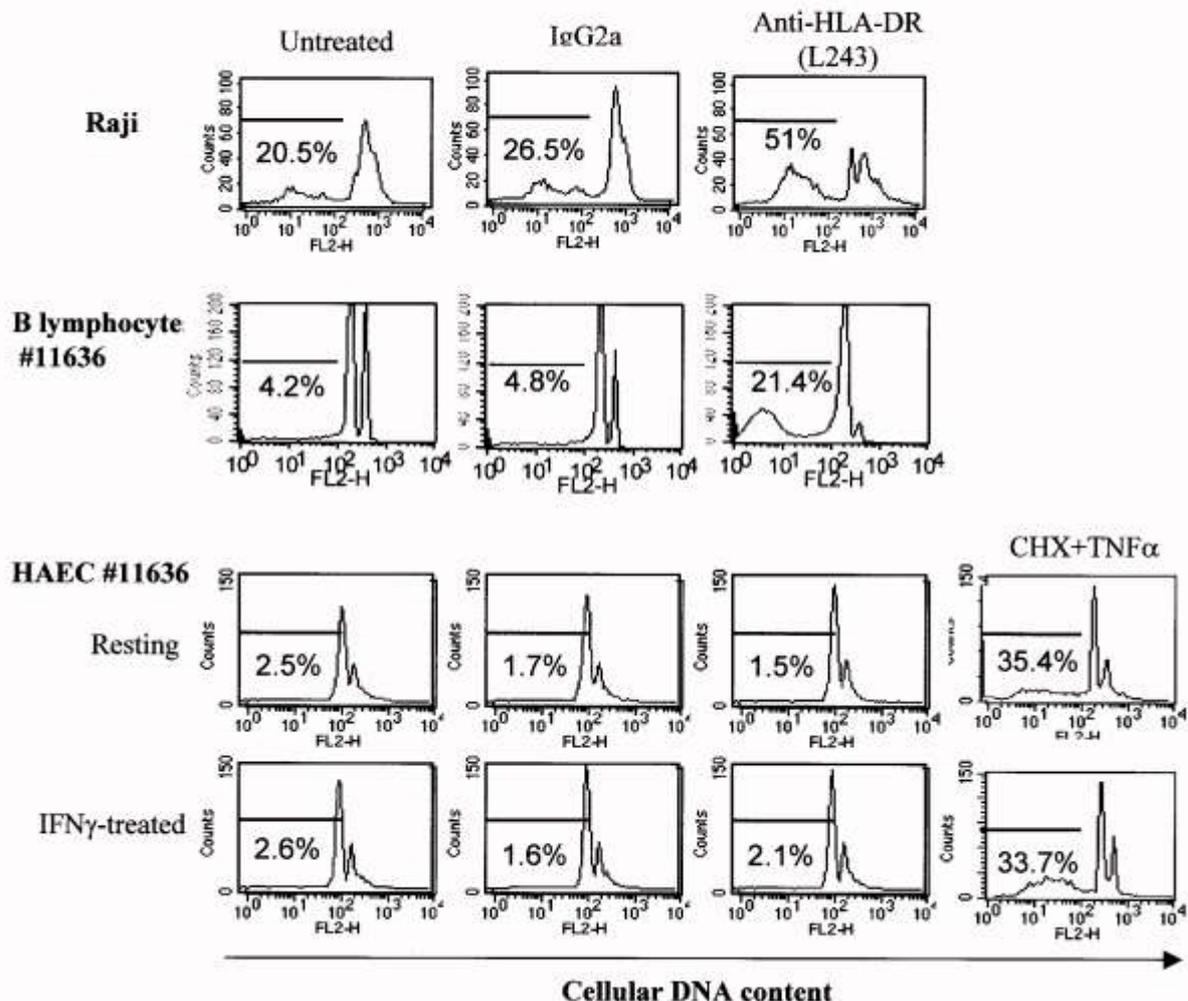


FIGURE 4. Comparative effects of monomorphic anti-HLA-DR Ab on EC and B-cell apoptosis. HAECs were preactivated with or without 100 U/mL IFN- γ for 72 hours to induce HLA-DR expression. Raji, CD19+ B cells (#11636), and HAECs (#11636) were incubated in culture medium with 10 μ g/mL anti-HLA-DR mAb (L243) for 48 hours. IgG2a (10 μ g/mL) irrelevant-matched control Ig was used as the negative control. After treatment, cells were harvested, fixed in ice-cold 70% ethanol, stained with propidium iodide (PI) staining solution (1 mL/ 1×10^6 cells), and analyzed with FACS. Data are presented in a histogram of cellular DNA content (FL2) versus cell number; percentages of apoptotic cells (sub-G1) are indicated.

indicates that, similar to monomorphic Abs, specific polymorphic anti-HLA-DR11 or -DR16 Abs were unable to induce EC apoptosis (Fig. 5B). Failure of both monomorphic and polymorphic anti-HLA-DR Abs to promote apoptosis of HAEC (#11636) was further confirmed by DNA content analysis. In contrast, apoptosis of B cells collected from the same donor (#11636) occurred specifically in response to anti-HLA-DR11 but not in response to irrelevant anti-DR16 Ab binding (13.11% apoptosis).

Operative Signaling Pathways Mediated by HLA-DR Ligation in ECs

Because of the moderate level of HLA-DR expression observed in ECs, we sought to determine whether ligation of

HLA-DR on vascular ECs is sufficient to trigger the activation of intracellular signaling pathways. The ability of anti-HLA-DR mAbs to modulate phosphorylation at tyrosine residues was analyzed by Western blotting using an antiphospho-tyrosine mAb (Fig. 6). Figure 6 clearly shows that HLA-DR ligation decreased the expression of a tyrosine-phosphorylated protein of 70 kDa in both endothelial and Raji cells. In ECs, but not in B cells, treatment with anti-HLA-DR also reduced tyrosine phosphorylation of a 38 kDa protein. Similar results were obtained with ECs from two different donors (data not shown). These data indicate that signaling was activated and suggest that HLA-DR ligation induces both common and divergent signaling events in ECs and B cells.

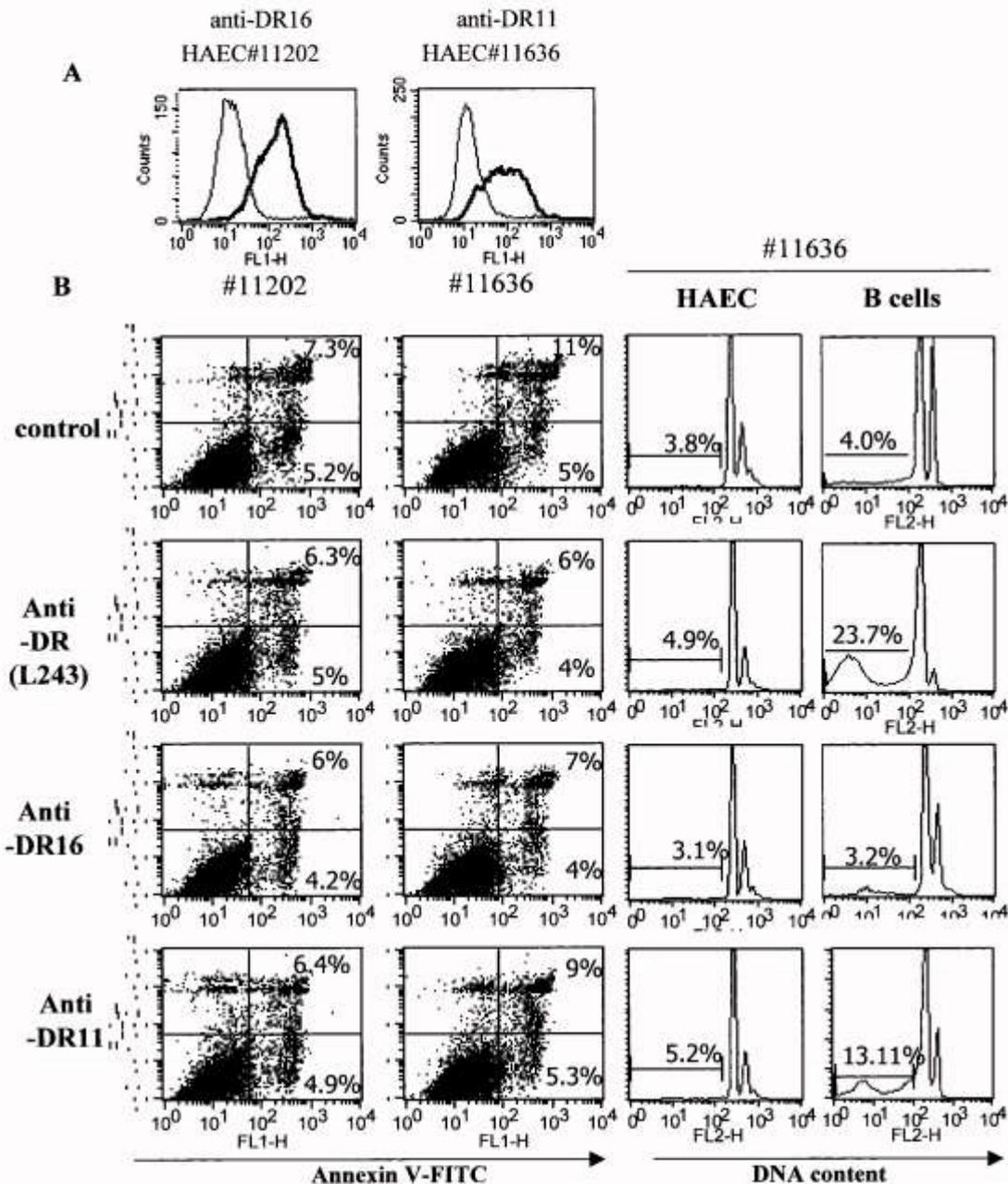


FIGURE 5. Effects of polymorphic anti-HLA-DR11 and -DR16 Abs on EC apoptosis. (A) Representative binding of specific anti-HLA-DR mAb to HAECs #11636 (DR11+) and HAECs #11202 (DR16+). HAECs were preactivated with 100 U/mL IFN- γ for 72 hours and incubated with specific anti-HLA-DR11 and -DR16 mAbs (diluted 1:4). The binding of anti-HLA-DR mAbs was detected using FITC-labeled anti-mouse IgG and analyzed with FACS. Negative controls (*thin line*) were performed by incubating the cells with FITC-labeled anti-mouse Ab alone. Data are presented in histograms plotting MFI on a four-decade logarithmic scale (x-axis) versus cell number (y-axis). (B) Apoptosis in response to anti-HLA-DR11 or -DR16 mAbs. HAECs were preactivated with 100 U/mL IFN- γ for 72 hours to induce HLA-DR expression. HAECs and purified CD19+ B lymphocytes were incubated for 48 hours in culture medium with 10 μ g/mL anti-HLA-DR (L243), anti-HLA-DR16, or anti-HLA-DR11 (diluted 1:4) mAbs. After treatment, cells were harvested and labeled with annexin-V-FITC; FACS was used to quantify apoptosis by measuring the percentage of cells stained with annexin V but not with PI. Data presented in dot plots of annexin-V-FITC (FL1) versus PI (FL2). For DNA content analysis, cells were harvested, fixed in ice-cold 70% ethanol, stained with PI staining solution (1 mL/1 $\times 10^6$ cells), and analyzed with FACS. Data are presented in histograms of cellular DNA content (FL2) versus cell number; percentages of apoptotic cells (sub-G1) are indicated.

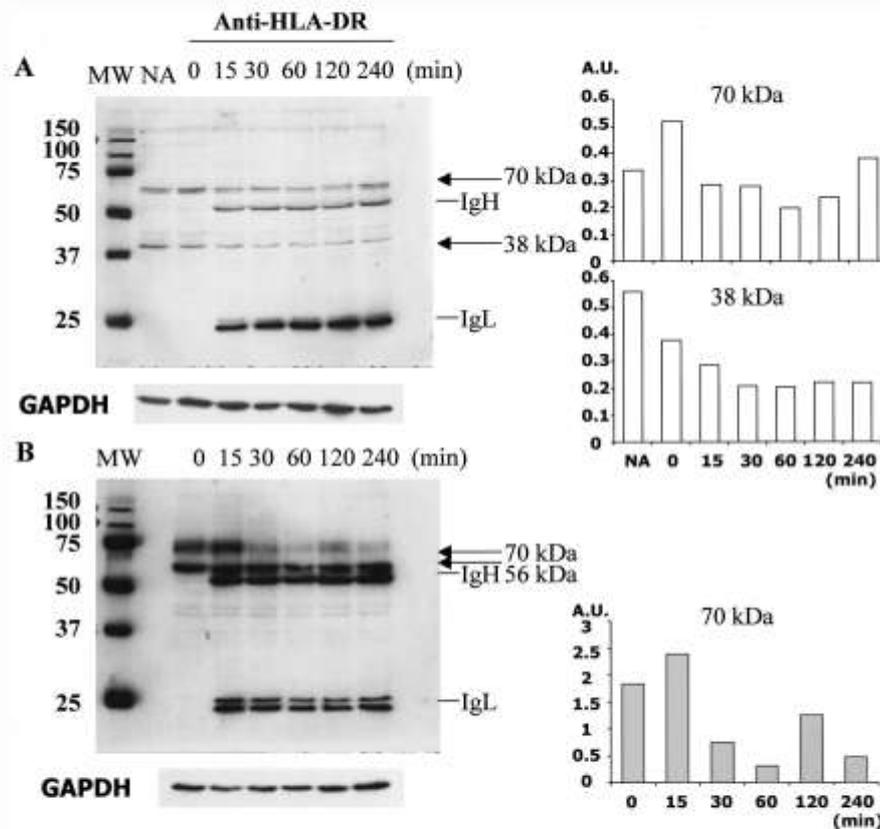


FIGURE 6. Pattern of tyrosine-phosphorylated proteins in response to HLA-DR ligation. HAECs were pretreated with IFN- γ for 72 hours. HAECs (A) and Raji cells (B) were incubated with 10 μ g/mL anti-HLA-DR (L243) mAb for the indicated times. After treatment, cell lysates were harvested and subjected to 12.5% sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE). Immunoblot analysis was performed with anti-phospho-tyrosine (4G10) Ab, detected with horseradish peroxidase (HRP)-conjugated anti-mouse Ab, and visualized with enhanced chemiluminescence (ECL). (lower) GAPDH levels in samples from a blot reprobed with anti-GAPDH Ab. For blot quantification (right), data were normalized to GAPDH levels and expressed as arbitrary units (A.U.). Results shown are representative of three separate experiments. IgL, Ig light chain; IgH, Ig heavy chain reflecting the binding of anti-HLA-DR mAbs.

The activation of PKC is an important pathway downstream from major histocompatibility (MHC) class II proteins, and transmission of PKC signals through these molecules was initially demonstrated in B cells and further confirmed in other APCs (18). In the present study, PKC phosphorylation induced by anti-HLA-DR (L243) mAb in ECs was analyzed. Our data demonstrate a time-dependent decrease in the phosphorylated form of PKC isoforms α/β in response to anti-HLA-DR Ab (Fig. 7A). The decrease in PKC- α/β phosphorylation was transient, beginning 15 minutes after DR ligation and ending at 120 minutes. In contrast, anti-HLA-DR clearly promoted PKC- α/β phosphorylation in B cells (Fig. 7B) with a maximal effect at 30 minutes (2.8-fold increase as compared with control). These data suggest that PKC- α/β may be involved in the signaling pathway mediated by HLA-DR ligation on ECs. Nevertheless, PKC- α/β activation is not associated with cell death through apoptosis in ECs. Therefore, we next examined whether HLA-DR crosslinking on ECs could mediate further activation of the protective PI3-kinase signaling pathway. Figure 8 shows that

concomitant with the decrease in PKC- α/β phosphorylation, we found an increase in the level of phosphorylated Akt proteins resulting from PI3-K activation. Altogether, these data suggest that the expression of HLA-DR by vascular ECs is sufficient to trigger intracellular signaling through the modulation of tyrosine phosphorylation and PKC- α/β and PI3-kinase activation.

DISCUSSION

It has previously been demonstrated that HLA-DR-mediated cell death is a common feature of all mature APCs (i.e., B cells, macrophages, and DCs) and that this apoptosis can occur independently of Fas/Fas-ligand (L) interaction (12). Moreover, the hierarchy of susceptibility to HLA-DR signals leading to apoptosis of APC has been correlated with the hierarchy of Ag-presentation capacity reflected by the expression of HLA-DR, CD40, CD80, and CD86 (13). HLA-DR-mediated apoptosis is stronger in mature DCs than in immature DCs and in macrophages than in monocytes (13).

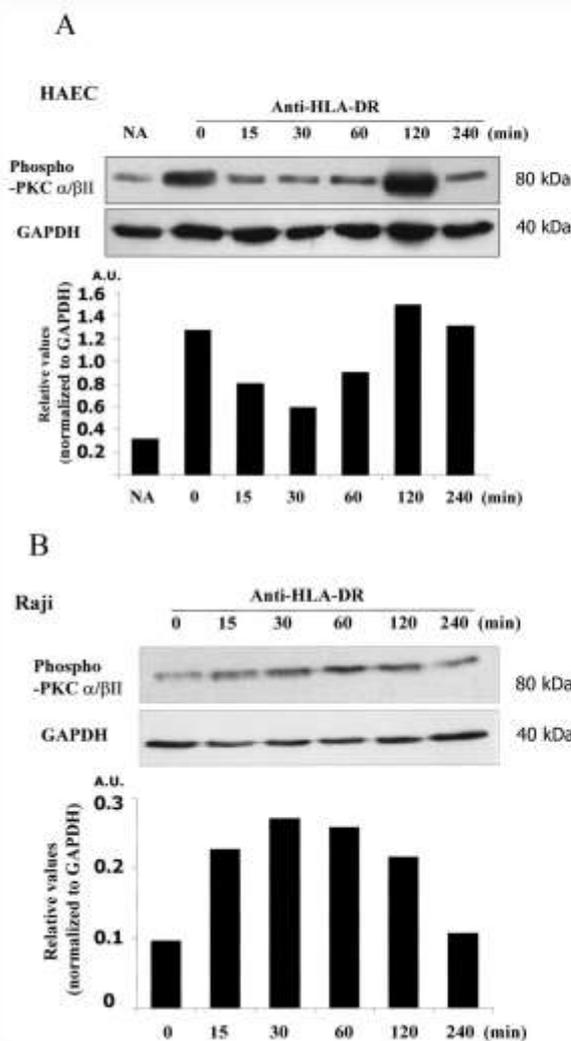


FIGURE 7. Phosphorylation of protein kinase C (PKC) α/β II in response to HLA-DR ligation. HAECs (A) and Raji (B) were pretreated with IFN- γ for 72 hours and incubated with 10 μ g/mL anti-HLA-DR (L243) mAb for the indicated times. After treatment, cell lysates were harvested and subjected to 12.5% SDS-PAGE. Immunoblot analysis was performed with antiphospho-PKC α/β II (Thr638/641) Ab, detected with HRP-conjugated anti-rabbit Ab, and visualized with ECL. (lower) GAPDH levels in samples from a blot re-probed with anti-GAPDH Ab. For blot quantification, data were normalized to GAPDH levels and expressed as A.U. Results shown are representative of three separate experiments.

In contrast with professional APCs, cultured human vascular ECs do not express HLA class II molecules at rest. As shown by others (14, 15, 19) and in the present study, HLA class II molecules can be induced upon EC activation with IFN- γ . This expression is regulated by MHC class II transactivator (CIITA), the MHC class II-specific transcription factor. When HLA class II (-DR, -DP, -DQ) levels were compared

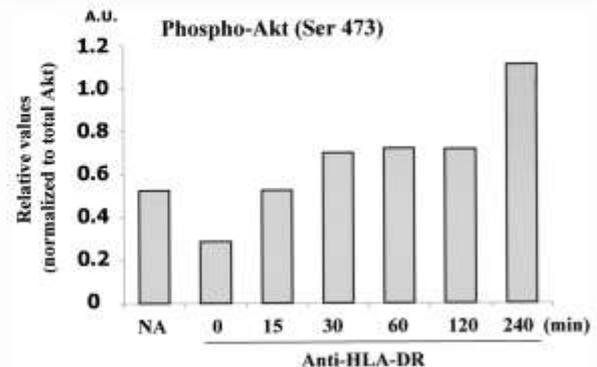


FIGURE 8. Phosphorylation of Akt in response to HLA-DR ligation. HAECs were pretreated with IFN- γ for 72 hours and incubated with 10 μ g/mL anti-HLA-DR (L243) mAb for the indicated times. After treatment, cell lysates were harvested and subjected to 12.5% SDS-PAGE. Immunoblot analysis was performed with anti-phospho-Akt (Ser 473) Ab, detected with HRP-conjugated anti-rabbit Ab, and visualized with ECL (data not shown). Total Akt level in samples was determined from a blot re-probed with anti-Akt Ab. For blot quantification, data were normalized to total Akt levels and expressed as A.U. Results shown are representative of three separate experiments.

after treatment with IFN- γ for 72 hours, on HAEC from different donors ($n=6$) (Fig. 2B), expression levels were found to be roughly similar. Nevertheless, when compared with the expression on B cells, including those isolated from the same donor, endothelial HLA-DR expression on activated cells was quantitatively lower. We showed that HLA-DR ligation mediated by specific mAbs directed to either monomorphic or polymorphic (DR11, DR16) HLA determinants efficiently induced the apoptosis of B cells but did not affect EC viability. However, when ECs were exposed to both TNF- α and CHX, apoptosis occurred in approximately 35% of ECs, as previously reported (17). The induction of apoptosis under these conditions results from the inhibition by CHX of anti-apoptotic and protective genes regulated by TNF- α , such as A1, A20, and heme oxygenase-1 (20–22).

In addition to only moderate levels of HLA-DR expression, human ECs do not express some costimulatory molecules, including CD80 and CD86 (16). Collectively, it could be speculated that the absence of HLA-DR-mediated cell death reflects the particular antigen-presentation capacity of human vascular ECs and in particular the relatively low HLA-DR expression on activated ECs, as compared with B cells. Similar observations have been reported for other molecules that mediate apoptotic pathways, such as Fas/FasL. Macrophages express Fas and readily undergo apoptosis when incubated with anti-Fas Abs. In contrast, although ECs can express the Fas molecule, Fas ligation is insufficient to induce apoptosis (23).

To test this hypothesis, signaling mediated by anti-HLA-DR binding in ECs was investigated. Comparative analysis of protein phosphorylation in response to HLA-DR ligation showed that HLA-DR-mediated signaling efficiently operates in ECs, indicating that DR expression is sufficient to trigger intracellular signaling. Nevertheless, the patterns of

tyrosine phosphorylation in HAECs and B cells treated with anti-HLA-DR Abs suggest that both common and cell-specific signaling events may occur in response to HLA-DR ligation.

PKC translocation after HLA class II stimulation has been observed in both human and murine B cells (24). The intracellular signal initiated by HLA-DR ligation on DCs involves the translocation and activation of PKC δ (25). Recently, Guo et al. (26) demonstrated that HLA-DR-induced PKC- β activation is essential for the induction of B cell death by way of HLA-DR. Activation of PKC is usually associated with membrane translocation, but phosphorylation has also emerged as an important regulatory mechanism of all PKCs. For both PKC- α and PKC- β , there is evidence that activation-loop phosphorylation is required for activity (27). On chronic activation, dephosphorylation precedes the characteristic down-regulation of PKC protein and its degradation (28). In the present study, we showed that the phosphorylation of PKC- α/β II transiently decreased in ECs incubated with anti-DR mAbs, suggesting that DR ligation mediates PKC- α/β dephosphorylation. PKC plays a central role in the growth-factor signal transduction pathway and regulates a wide variety of cellular functions, including cell death but also cell proliferation and differentiation (29). Interestingly, a functional role has been identified for PKC- α in Bcl2 phosphorylation and in resistance to apoptosis (30). PKC-mediated Akt activity has been reported to play an essential role in vascular endothelial growth factor-stimulated angiogenesis (31). Both Bcl2 and Akt activation are implicated in EC survival pathways (32). In the present study, we demonstrated that cross-linking of HLA-DR on ECs also promotes phosphorylation of Akt, suggesting that the PI3-K pathway, involved in EC survival, is activated. Nevertheless, the downstream effectors of both PKC- α/β and Akt must be defined to determine how HLA-DR ligation drives a survival pathway in ECs that involves both PKC and PKB/Akt activation. Alternatively, the possibility should be tested that an endothelial-specific cytoprotective pathway counteracts the apoptotic signal mediated by HLA-DR ligation.

Our data show that anti-HLA-DR Abs mediate signaling but do not induce apoptosis in vascular ECs. Similarly, anti-HLA class I Abs do not affect EC viability but rather increase cell proliferation (33). Interestingly, we recently reported the presence of non-HLA-type EC-reactive Abs (AECA) in allosensitized transplant recipients. These Abs bind to activated HAECs and consistently trigger EC death through apoptosis (34). Although the molecular targets of AECA and the mechanisms of apoptosis remain to be elucidated, these data indicate that some alloreactive Abs can induce the apoptosis of vascular ECs, at least in vitro.

HLA-DR-induced apoptosis, which may occur as a result of anti-HLA binding but also as a result of T-cell-APC interactions, has been proposed as a mechanism that down-regulates the immune response (13). The escape of vascular ECs from HLA-DR-mediated apoptosis may result from a specific pattern of HLA regulation and signaling that impairs typical APC functions but preserves cell survival and cell properties.

Finally, our data suggest that the presence of non-complement-fixing anti-HLA-DR alloantibodies may not damage graft ECs. Nevertheless, because transmembrane and

intracellular domains are markedly different in the α - and β -chains of HLA-DR, -DQ, and -DP, it is possible that HLA-DR, -DQ, and -DP drive distinct signal transduction pathways (35). Therefore, the possibility that the ligation of HLA-DQ or HLA-DP to allospecific Abs mediates EC injury remains to be evaluated.

REFERENCES

- Scornik JC, LeFor WM, Ciccirelli JC, et al. Hyperacute and acute kidney graft rejection due to antibodies against B cells. *Transplantation* 1992; 54(1): 61.
- Itescu S, Tung TC, Burke EM, et al. Preformed IgG antibodies against major histocompatibility complex class II antigens are major risk factors for high-grade cellular rejection in recipients of heart transplantation. *Circulation* 1998; 98(8): 786.
- Le Bas-Bernardet S, Hourmant M, Valentin N, et al. Identification of the antibodies involved in B-cell crossmatch positivity in renal transplantation. *Transplantation* 2003; 75(4): 477.
- Susal C, Opelz G. Kidney graft failure and presensitization against HLA class I and class II antigens. *Transplantation* 2002; 73(8): 1269.
- McKenna RM, Takemoto SK, Terasaki PI. Anti-HLA antibodies after solid organ transplantation. *Transplantation* 2000; 69(3): 319.
- Lee PC, Terasaki PI, Takemoto SK, et al. All chronic rejection failures of kidney transplants were preceded by the development of HLA antibodies. *Transplantation* 2002; 74(8): 1192.
- Palmer SM, Davis RD, Hadjiliadis D, et al. Development of an antibody specific to major histocompatibility antigens detectable by flow cytometry after lung transplant is associated with bronchiolitis obliterans syndrome. *Transplantation* 2002; 74(6): 799.
- Worthington JE, Martin S, Al-Husseini DM, et al. Posttransplantation production of donor HLA-specific antibodies as a predictor of renal transplant outcome. *Transplantation* 2003; 75(7): 1034.
- Fuller A, Profaizer T, Roberts L, et al. Repeat donor HLA-DR mismatches in renal transplantation: is the increased failure rate caused by noncytotoxic HLA-DR alloantibodies? *Transplantation* 1999; 68(4): 589.
- Bian H, Harris PE, Reed EF. Ligation of HLA class I molecules on smooth muscle cells with anti-HLA antibodies induces tyrosine phosphorylation, fibroblast growth factor receptor expression and cell proliferation. *Int Immunol* 1998; 10(9): 1315.
- Bian H, Harris PE, Mulder A, et al. Anti-HLA antibody ligation to HLA class I molecules expressed by endothelial cells stimulates tyrosine phosphorylation, inositol phosphate generation, and proliferation. *Hum Immunol* 1997; 53(1): 90.
- Drenou B, Blancheteau V, Burgess DH, et al. A caspase-independent pathway of MHC class II antigen-mediated apoptosis of human B lymphocytes. *J Immunol* 1999; 163(8): 4115.
- Bertho N, Drenou B, Laupeze B, et al. HLA-DR-mediated apoptosis susceptibility discriminates differentiation stages of dendritic/monocytic APC. *J Immunol* 2000; 164(5): 2379.
- Pober JS, Collins T, Gimbrone MA Jr, et al. Inducible expression of class II major histocompatibility complex antigens and the immunogenicity of vascular endothelium. *Transplantation* 1986; 41(2): 141.
- Markus BH, Colson YL, Fung JJ, et al. HLA antigen expression on cultured human arterial endothelial cells. *Tissue Antigens* 1988; 32(5): 241.
- Pober JS, Orosz CG, Rose ML, et al. Can graft endothelial cells initiate a host anti-graft immune response? *Transplantation* 1996; 61(3): 343.
- Pohlman TH, Harlan JM. Human endothelial cell response to lipopolysaccharide, interleukin-1, and tumor necrosis factor is regulated by protein synthesis. *Cell Immunol* 1989; 119(1): 41.
- Al-Daccak R, Mooney N, Charron D. MHC class II signaling in antigen-presenting cells. *Curr Opin Immunol* 2004; 16(1): 108.
- Savage CO, Hughes CC, McIntyre BW, et al. Human CD4+ T cells proliferate to HLA-DR + allogeneic vascular endothelium. Identification of accessory interactions. *Transplantation* 1993; 56(1): 128.
- Karsan A, Yee E, Harlan JM. Endothelial cell death induced by tumor necrosis factor- α is inhibited by the Bcl-2 family member, A1. *J Biol Chem* 1996; 271(44): 27201.
- Ferran C, Stroka DM, Badrichani AZ, et al. A20 inhibits NF- κ B

- activation in endothelial cells without sensitizing to tumor necrosis factor-mediated apoptosis. *Blood* 1998; 91(7): 2249.
22. Soares MP, Usheva A, Brouard S, et al. Modulation of endothelial cell apoptosis by heme oxygenase-1-derived carbon monoxide. *Antioxid Redox Signal* 2002; 4(2): 321.
 23. Richardson BC, Lalwani ND, Johnson KJ, et al. Fas ligation triggers apoptosis in macrophages but not endothelial cells. *Eur J Immunol* 1994; 24(11): 2640.
 24. Rich T, Lawler SE, Lord JM, et al. HLA class II-induced translocation of PKC alpha and PKC beta II isoforms is abrogated following truncation of DR beta cytoplasmic domains. *J Immunol* 1997; 159(8): 3792.
 25. Bertho N, Blancheteau VM, Setterblad N, et al. MHC class II-mediated apoptosis of mature dendritic cells proceeds by activation of the protein kinase C-delta isoenzyme. *Int Immunol* 2002; 14(8): 935.
 26. Guo W, Castaigne JG, Mooney N, et al. Signaling through HLA-DR induces PKC beta-dependent B cell death outside rafts. *Eur J Immunol* 2003; 33(4): 928.
 27. Parekh DB, Ziegler W, Parker PJ. Multiple pathways control protein kinase C phosphorylation. *EMBO J* 2000; 19(4): 496.
 28. Hansra G, Garcia-Paramio P, Prevostel C, et al. Multisite dephosphorylation and desensitization of conventional protein kinase C isoforms. *Biochem J* 1999; 342(Pt 2): 337.
 29. Newton AC. Regulation of the ABC kinases by phosphorylation: protein kinase C as a paradigm. *Biochem J* 2003; 370(Pt 2): 361.
 30. Ruvolo PP, Deng X, Carr BK, et al. A functional role for mitochondrial protein kinase Calpha in Bcl2 phosphorylation and suppression of apoptosis. *J Biol Chem* 1998; 273(39): 25436.
 31. Gliki G, Wheeler-Jones C, Zachary I. Vascular endothelial growth factor induces protein kinase C (PKC)-dependent Akt/PKB activation and phosphatidylinositol 3'-kinase-mediated PKC delta phosphorylation: role of PKC in angiogenesis. *Cell Biol Int* 2002; 26(9): 751.
 32. Madge LA, Pober JS. A phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway, activated by tumor necrosis factor or interleukin-1, inhibits apoptosis but does not activate NFkappaB in human endothelial cells. *J Biol Chem* 2000; 275(20): 15458.
 33. Nath N, Bian H, Reed EF, et al. HLA class I-mediated induction of cell proliferation involves cyclin E-mediated inactivation of Rb function and induction of E2F activity. *J Immunol* 1999; 162(9): 5351.
 34. Le Bas-Bernardet S, Hourmant M, Coupel S, et al. Non-HLA-type endothelial cell reactive alloantibodies in pre-transplant sera of kidney recipients trigger apoptosis. *Am J Transplant* 2003; 3(2): 167.
 35. Matsuoka T, Tabata H, Matsushita S. Monocytes are differentially activated through HLA-DR, -DQ, and -DP molecules via mitogen-activated protein kinases. *J Immunol* 2001; 166(4): 2202.

Bibliographie

- Al-Daccak, R., Mooney, N., and Charron, D. (2004). MHC class II signaling in antigen-presenting cells. *Curr Opin Immunol* *16*, 108-113.
- Amezaga, N., Crespo, M., Lopez-Cobos, M., Millan, M. A., Vinas, O., Sole, M., Oppenheimer, F., Martorell, J., and Ercilla, M. G. (2006). Relevance of MICA antibodies in acute humoral rejection in renal transplant patients. *Transplant immunology* *17*, 39-42.
- 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., Inoko, H., Shiina, T., and Radosavljevic, M. (2005). MIC and other NKG2D ligands: from none to too many. *Curr Opin Immunol* *17*, 505-509.
- Bahram, S., Mizuki, N., Inoko, H., and Spies, T. (1996). Nucleotide sequence of the human MHC class I MICA gene. *Immunogenetics* *44*, 80-81.
- Bahri, R., Hirsch, F., Josse, A., Rouas-Freiss, N., Bidere, N., Vasquez, A., Carosella, E. D., Charpentier, B., and Durrbach, A. (2006). Soluble HLA-G inhibits cell cycle progression in human alloreactive T lymphocytes. *J Immunol* *176*, 1331-1339.
- Baldwin, W. M., 3rd, Larsen, C. P., and Fairchild, R. L. (2001). Innate immune responses to transplants: a significant variable with cadaver donors. *Immunity* *14*, 369-376.
- Ball, B., Mousson, C., Ratignier, C., Guignier, F., Glotz, D., and Rifle, G. (2000). Antibodies to vascular endothelial cells in chronic rejection of renal allografts. *Transplant Proc* *32*, 353-354.
- Ballermann, B. J. (1998). Endothelial cell activation. *Kidney Int* *53*, 1810-1826.
- Bannerman, D. D., and Goldblum, S. E. (2003). Mechanisms of bacterial lipopolysaccharide-induced endothelial apoptosis. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* *284*, L899-914.
- 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.
- Bevilacqua, M. P., Stengelin, S., Gimbrone, M. A., Jr., and Seed, B. (1989). Endothelial leukocyte adhesion molecule 1: an inducible receptor for neutrophils related to complement regulatory proteins and lectins. *Science* *243*, 1160-1165.

Bian, H., Harris, P. E., and Reed, E. F. (1998). Ligation of HLA class I molecules on smooth muscle cells with anti-HLA antibodies induces tyrosine phosphorylation, fibroblast growth factor receptor expression and cell proliferation. *Int Immunol* *10*, 1315-1323.

Bian, H., and Reed, E. F. (1999). Alloantibody-mediated class I signal transduction in endothelial cells and smooth muscle cells: enhancement by IFN-gamma and TNF-alpha. *J Immunol* *163*, 1010-1018.

Blanco, G., Buzelin, F., Dantal, J., Hourmant, M., Cantarovich, D., Baatard, R., Bonneville, M., Vie, H., Bugeon, L., and Soulillou, J. P. (1992). Evidence that early acute renal failure may be mediated by CD3- CD16+ cells in a kidney graft recipient with large granular lymphocyte proliferation. *Transplantation* *53*, 1242-1247.

Borchers, M. T., Harris, N. L., Wesselkamper, S. C., Vitucci, M., and Cosman, D. (2006). NKG2D ligands are expressed on stressed human airway epithelial cells. *American journal of physiology* *291*, L222-231.

Borrego, F., Kabat, J., Kim, D. K., Lieto, L., Maasho, K., Pena, J., Solana, R., and Coligan, J. E. (2002). Structure and function of major histocompatibility complex (MHC) class I specific receptors expressed on human natural killer (NK) cells. *Mol Immunol* *38*, 637-660.

Braud, V. M., Allan, D. S., O'Callaghan, C. A., Soderstrom, K., D'Andrea, A., Ogg, G. S., Lazetic, S., Young, N. T., Bell, J. I., Phillips, J. H., *et al.* (1998). HLA-E binds to natural killer cell receptors CD94/NKG2A, B and C. *Nature* *391*, 795-799.

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.

Cao, W., and He, W. (2004). UL16 binding proteins. *Immunobiology* *209*, 283-290.

Carosella, E. D., Paul, P., Moreau, P., and Rouas-Freiss, N. (2000). HLA-G and HLA-E: fundamental and Pathophysiological aspects. *Immunol Today* *21*, 532-534.

Cerboni, C., Zingoni, A., Cippitelli, M., Piccoli, M., Frati, L., and Santoni, A. (2007). Antigen-activated human T lymphocytes express cell surface NKG2D ligands via an ATM/ATR-dependent mechanism and become susceptible to autologous NK cell lysis.

Choi, J., Enis, D. R., Koh, K. P., Shiao, S. L., and Poher, J. S. (2004). T lymphocyte-endothelial cell interactions. *Annu Rev Immunol* *22*, 683-709.

Cines, D. B., Pollak, E. S., Buck, C. A., Loscalzo, J., Zimmerman, G. A., McEver, R. P., Poher, J. S., Wick, T. M., Konkle, B. A., Schwartz, B. S., *et al.* (1998). Endothelial cells in physiology and in the pathophysiology of vascular disorders. *Blood* *91*, 3527-3561.

- Cosman, D., Mullberg, J., Sutherland, C. L., Chin, W., Armitage, R., Fanslow, W., Kubin, M., and Chalupny, N. J. (2001). ULBPs, novel MHC class I-related molecules, bind to CMV glycoprotein UL16 and stimulate NK cytotoxicity through the NKG2D receptor. *Immunity* *14*, 123-133.
- Costa, A. N., Scolari, M. P., Iannelli, S., Buscaroli, A., D'Arcangelo, G. L., Brando, B., Indiveri, F., Savi, M., Borgnino, L. C., DeSanctis, L. B., *et al.* (1997). The presence of posttransplant HLA-specific IgG antibodies detected by enzyme-linked immunosorbent assay correlates with specific rejection pathologies. *Transplantation* *63*, 167-169.
- Coupel, S., Leboeuf, F., Boulday, G., Soulillou, J. P., and 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.
- Coupel, S., Moreau, A., Hamidou, M., Horejsi, V., Soulillou, J. P., and Charreau, B. (2007). Expression and release of soluble HLA-E is an immunoregulatory feature of endothelial cell activation. *Blood* *109*, 2806-2814.
- Coupel, S., Soulillou, J., and Charreau, B. (2006). Endothelial expression of non classical HLA molecules: functions and potential implication in clinical transplantation. *Cur Op Or Transplant* *in press*.
- Derre, L., Corvaisier, M., Charreau, B., Moreau, A., Godefroy, E., Moreau-Aubry, A., Jotereau, F., and Gervois, N. (2006). Expression and release of HLA-E by melanoma cells and melanocytes: potential impact on the response of cytotoxic effector cells. *J Immunol* *177*, 3100-3107.
- Diefenbach, A., Hsia, J. K., Hsiung, M. Y., and Raulet, D. H. (2003). A novel ligand for the NKG2D receptor activates NK cells and macrophages and induces tumor immunity. *Eur J Immunol* *33*, 381-391.
- Diefenbach, A., Jamieson, A. M., Liu, S. D., Shastri, N., and Raulet, D. H. (2000). Ligands for the murine NKG2D receptor: expression by tumor cells and activation of NK cells and macrophages. *Nat Immunol* *1*, 119-126.
- Dong, Y., Lieskovska, J., Kedrin, D., Porcelli, S., Mandelboim, O., and Bushkin, Y. (2003). Soluble nonclassical HLA generated by the metalloproteinase pathway. *Hum Immunol* *64*, 802-810.
- 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.
- Ebihara, T., Masuda, H., Akazawa, T., Shingai, M., Kikuta, H., Ariga, T., Matsumoto, M., and Seya, T. (2007). Induction of NKG2D ligands on human dendritic cells by TLR ligand stimulation and RNA virus infection. *Int Immunol* *19*, 1145-1155.

- Epperson, D. E., and Pober, J. S. (1994). Antigen-presenting function of human endothelial cells. Direct activation of resting CD8 T cells. *J Immunol* *153*, 5402-5412.
- Esmon, C. T. (2000). The endothelial cell protein C receptor. *Thromb Haemost* *83*, 639-643.
- Forte, P., Lilienfeld, B. G., Baumann, B. C., and Seebach, J. D. (2005). Human NK cytotoxicity against porcine cells is triggered by NKp44 and NKG2D. *J Immunol* *175*, 5463-5470.
- Fukudome, K., and Esmon, C. T. (1995). Molecular cloning and expression of murine and bovine endothelial cell protein C/activated protein C receptor (EPCR). The structural and functional conservation in human, bovine, and murine EPCR. *J Biol Chem* *270*, 5571-5577.
- Garrity, D., Call, M. E., Feng, J., and Wucherpfennig, K. W. (2005). The activating NKG2D receptor assembles in the membrane with two signaling dimers into a hexameric structure. *Proc Natl Acad Sci U S A* *102*, 7641-7646.
- Gerritsen, M. E., and Bloor, C. M. (1993). Endothelial cell gene expression in response to injury. *Faseb J* *7*, 523-532.
- Glienke, J., Sobanov, Y., Brostjan, C., Steffens, C., Nguyen, C., Lehrach, H., Hofer, E., and Francis, F. (1998). The genomic organization of NKG2C, E, F, and D receptor genes in the human natural killer gene complex. *Immunogenetics* *48*, 163-173.
- Gopalan, P. K., Burns, A. R., Simon, S. I., Sparks, S., McIntire, L. V., and Smith, C. W. (2000). Preferential sites for stationary adhesion of neutrophils to cytokine-stimulated HUVEC under flow conditions. *J Leukoc Biol* *68*, 47-57.
- 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., Rhinehart, R., Randolph-Habecker, J., Topp, M. S., Riddell, S. R., and Spies, T. (2001). Costimulation of CD8 α beta T cells by NKG2D via engagement by MIC induced on virus-infected cells. *Nat Immunol* *2*, 255-260.
- 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., 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., 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.

- 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.
- Heidecke, C. D., Araujo, J. L., Kupiec-Weglinski, J. W., Abbud-Filho, M., Araneda, D., Stadler, J., Siewert, J., Strom, T. B., and Tilney, N. L. (1985). Lack of evidence for an active role for natural killer cells in acute rejection of organ allografts. *Transplantation* *40*, 441-444.
- Holdenrieder, S., Stieber, P., Peterfi, A., Nagel, D., Steinle, A., and Salih, H. R. (2006a). Soluble MICA in malignant diseases. *International journal of 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 immunology, immunotherapy* *55*, 1584-1589.
- Horrevoets, A. J., Fontijn, R. D., van Zonneveld, A. J., de Vries, C. J., ten Cate, J. W., and Pannekoek, H. (1999). Vascular endothelial genes that are responsive to tumor necrosis factor-alpha in vitro are expressed in atherosclerotic lesions, including inhibitor of apoptosis protein-1, stannin, and two novel genes. *Blood* *93*, 3418-3431.
- Houchins, J. P., Yabe, T., McSherry, C., and Bach, F. H. (1991). DNA sequence analysis of NKG2, a family of related cDNA clones encoding type II integral membrane proteins on human natural killer cells. *J Exp Med* *173*, 1017-1020.
- Jaffe, E. A., Nachman, R. L., Becker, C. G., and Minick, C. R. (1973). Culture of human endothelial cells derived from umbilical veins. Identification by morphologic and immunologic criteria. *J Clin Invest* *52*, 2745-2756.
- Jamieson, A. M., Diefenbach, A., McMahon, C. W., Xiong, N., Carlyle, J. R., and Raulet, D. H. (2002). The role of the NKG2D immunoreceptor in immune cell activation and natural killing. *Immunity* *17*, 19-29.
- Jinushi, M., Takehara, T., Kanto, T., Tatsumi, T., Groh, V., Spies, T., Miyagi, T., Suzuki, T., Sasaki, Y., and Hayashi, N. (2003). Critical role of MHC class I-related chain A and B expression on IFN-alpha-stimulated dendritic cells in NK cell activation: impairment in chronic hepatitis C virus infection. *J Immunol* *170*, 1249-1256.
- Johnson, D. R. (2000). Differential expression of human major histocompatibility class I loci: HLA-A, -B, and -C. *Hum Immunol* *61*, 389-396.
- Johnson, D. R. (2003). Locus-specific constitutive and cytokine-induced HLA class I gene expression. *J Immunol* *170*, 1894-1902.
- Kajikawa, M., Baba, T., Tomaru, U., Watanabe, Y., Koganei, S., Tsuji-Kawahara, S., Matsumoto, N., Yamamoto, K., Miyazawa, M., Maenaka, K., *et al.* (2006). MHC class I-like

MILL molecules are beta2-microglobulin-associated, GPI-anchored glycoproteins that do not require TAP for cell surface expression. *J Immunol* 177, 3108-3115.

Karsan, A., Yee, E., and Harlan, J. M. (1996). Endothelial cell death induced by tumor necrosis factor-alpha is inhibited by the Bcl-2 family member, A1. *J Biol Chem* 271, 27201-27204.

Koller, B. H., Geraghty, D. E., Shimizu, Y., DeMars, R., and Orr, H. T. (1988). HLA-E. A novel HLA class I gene expressed in resting T lymphocytes. *J Immunol* 141, 897-904.

Le Bas-Bernardet, S., Coupel, S., Chauveau, A., Soulillou, 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.

Le Bas-Bernardet, S., Hourmant, M., Coupel, S., Bignon, J. D., Soulillou, 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 Bouteiller, P., and Lenfant, F. (1996). Antigen-presenting function(s) of the non-classical HLA-E, -F and -G class I molecules: the beginning of a story. *Res Immunol* 147, 301-313.

Le Fric, G., Gros, F., Sebti, Y., Guilloux, V., Pangault, C., Fauchet, R., and Amiot, L. (2004). Capacity of myeloid and plasmacytoid dendritic cells especially at mature stage to express and secrete HLA-G molecules. *J Leukoc Biol* 76, 1125-1133.

Le Fric, G., Laupeze, B., Fardel, O., Sebti, Y., Pangault, C., Guilloux, V., Beauplet, A., Fauchet, R., and Amiot, L. (2003). Soluble HLA-G inhibits human dendritic cell-triggered allogeneic T-cell proliferation without altering dendritic differentiation and maturation processes. *Hum Immunol* 64, 752-761.

Le Rond, S., Azema, C., Krawice-Radanne, I., Durrbach, A., Guettier, C., Carosella, E. D., and Rouas-Freiss, N. (2006). Evidence to support the role of HLA-G5 in allograft acceptance through induction of immunosuppressive/ regulatory T cells. *J Immunol* 176, 3266-3276.

Le Rond, S., Le Maoult, J., Creput, C., Menier, C., Deschamps, M., Le Fric, G., Amiot, L., Durrbach, A., Dausset, J., Carosella, E. D., and Rouas-Freiss, N. (2004). Alloreactive CD4+ and CD8+ T cells express the immunotolerant HLA-G molecule in mixed lymphocyte reactions: in vivo implications in transplanted patients. *Eur J Immunol* 34, 649-660.

Lee, N., Llano, M., Carretero, M., Ishitani, A., Navarro, F., Lopez-Botet, M., and Geraghty, D. E. (1998). HLA-E is a major ligand for the natural killer inhibitory receptor CD94/NKG2A. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 5199-5204.

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.

- Lepin, E. J., Bastin, J. M., Allan, D. S., Roncador, G., Braud, V. M., Mason, D. Y., van der Merwe, P. A., McMichael, A. J., Bell, J. I., Powis, S. H., and O'Callaghan, C. A. (2000). Functional characterization of HLA-F and binding of HLA-F tetramers to ILT2 and ILT4 receptors. *Eur J Immunol* *30*, 3552-3561.
- 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.
- Liaw, P. C., Neuenschwander, P. F., Smirnov, M. D., and Esmon, C. T. (2000). Mechanisms by which soluble endothelial cell protein C receptor modulates protein C and activated protein C function. *J Biol Chem* *275*, 5447-5452.
- Libby, P., and Pober, J. S. (2001). Chronic rejection. *Immunity* *14*, 387-397.
- 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.
- Lopez-Soto, A., Quinones-Lombrana, A., Lopez-Arbesu, R., Lopez-Larrea, C., and Gonzalez, S. (2006). Transcriptional regulation of ULBP1, a human ligand of the NKG2D receptor. *J Biol Chem* *281*, 30419-30430.
- Luque, J., Torres, M. I., Aumente, M. D., Marin, J., Garcia-Jurado, G., Gonzalez, R., Pascual, D., Guerra, N., Lopez-Rubio, F., Alvarez-Lopez, M. R., *et al.* (2006). Soluble HLA-G in heart transplantation: their relationship to rejection episodes and immunosuppressive therapy. *Hum Immunol* *67*, 257-263.
- Mamdouh, Z., Chen, X., Pierini, L. M., Maxfield, F. R., and Muller, W. A. (2003). Targeted recycling of PECAM from endothelial surface-connected compartments during diapedesis. *Nature* *421*, 748-753.
- Mantovani, A., Bussolino, F., and Introna, M. (1997). Cytokine regulation of endothelial cell function: from molecular level to the bedside. *Immunol Today* *18*, 231-240.
- Marten, A., von Lilienfeld-Toal, M., Buchler, M. W., and Schmidt, J. (2006). Soluble MIC is elevated in the serum of patients with pancreatic carcinoma diminishing gammadelta T cell cytotoxicity. *International journal of cancer* *119*, 2359-2365.
- McEver, R. P. (2002). Selectins: lectins that initiate cell adhesion under flow. *Curr Opin Cell Biol* *14*, 581-586.
- McEver, R. P., Beckstead, J. H., Moore, K. L., Marshall-Carlson, L., and Bainton, D. F. (1989). GMP-140, a platelet alpha-granule membrane protein, is also synthesized by vascular endothelial cells and is localized in Weibel-Palade bodies. *J Clin Invest* *84*, 92-99.

- Mizutani, K., Terasaki, P., Bignon, J. D., Hourmant, M., Cesbron-Gautier, A., Shih, R. N., Pei, R., Lee, J., and Ozawa, M. (2006a). Association of kidney transplant failure and antibodies against MICA. *Human immunology* *67*, 683-691.
- Mizutani, K., Terasaki, P., Rosen, A., Esquenazi, V., Miller, J., Shih, R. N., 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., Terasaki, P. I., Shih, R. N., Pei, R., Ozawa, M., and Lee, J. (2006b). Frequency of MIC antibody in rejected renal transplant patients without HLA antibody. *Human immunology* *67*, 223-229.
- Molinero, L. L., Fuertes, M. B., Fainboim, L., Rabinovich, G. A., and Zwirner, N. W. (2003). Up-regulated expression of MICA on activated T lymphocytes involves Lck and Fyn kinases and signaling through MEK1/ERK, p38 MAP kinase, and calcineurin. *Journal of leukocyte biology* *73*, 815-822.
- 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. *Journal of immunology (Baltimore, Md)* *173*, 5583-5590.
- Molinero, L. L., Fuertes, M. B., Rabinovich, G. A., Fainboim, L., and Zwirner, N. W. (2002). Activation-induced expression of MICA on T lymphocytes involves engagement of CD3 and CD28. *Journal of leukocyte biology* *71*, 791-797.
- Muczynski, K. A., Ekle, D. M., Coder, D. M., and Anderson, S. K. (2003). Normal human kidney HLA-DR-expressing renal microvascular endothelial cells: characterization, isolation, and regulation of MHC class II expression. *J Am Soc Nephrol* *14*, 1336-1348.
- 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.
- Panigrahi, A., Gupta, N., Siddiqui, J. A., Margoob, A., Bhowmik, D., Guleria, S., and Mehra, N. K. (2007). Post transplant development of MICA and anti-HLA antibodies is associated with acute rejection episodes and renal allograft loss. *Hum Immunol* *68*, 362-367.
- Park, G. M., Lee, S., Park, B., Kim, E., Shin, J., Cho, K., and Ahn, K. (2004). Soluble HLA-G generated by proteolytic shedding inhibits NK-mediated cell lysis. *Biochem Biophys Res Commun* *313*, 606-611.
- Paul, P., Cabestre, F. A., Ibrahim, E. C., Lefebvre, S., Khalil-Daher, I., Vazeux, G., Quiles, R. M., Bermond, F., Dausset, J., and Carosella, E. D. (2000a). Identification of HLA-G7 as a new splice variant of the HLA-G mRNA and expression of soluble HLA-G5, -G6, and -G7 transcripts in human transfected cells. *Hum Immunol* *61*, 1138-1149.

- Paul, P., Rouas-Freiss, N., Moreau, P., Cabestre, F. A., Menier, C., Khalil-Daher, I., Pangault, C., Onno, M., Fauchet, R., Martinez-Laso, J., *et al.* (2000b). HLA-G, -E, -F preworkshop: tools and protocols for analysis of non-classical class I genes transcription and protein expression. *Hum Immunol* *61*, 1177-1195.
- Pober, J., Orosz, C. G., Rose, M. L., and Savage, C. O. (1996). Can graft endothelial cells initiate a host anti-graft immune response? *Transplantation* *61*, 343-349.
- Pober, J. S. (2002). Endothelial activation: intracellular signaling pathways. *Arthritis Res* *4 Suppl 3*, S109-116.
- Pober, J. S., Collins, T., Gimbrone, M. A., Jr., Libby, P., and Reiss, C. S. (1986). Inducible expression of class II major histocompatibility complex antigens and the immunogenicity of vascular endothelium. *Transplantation* *41*, 141-146.
- 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.
- Qiu, J., Terasaki, P. I., Miller, J., Mizutani, K., Cai, J., and Carosella, E. D. (2006). Soluble HLA-G Expression and Renal Graft Acceptance. *Am J Transplant*.
- Raulet, D. H. (2003). Roles of the NKG2D immunoreceptor and its ligands. *Nat Rev Immunol* *3*, 781-790.
- Rebmann, V., Schutt, P., Brandhorst, D., Opalka, B., Moritz, T., Nowrousian, M. R., and Grosse-Wilde, H. (2007). Soluble MICA as an independent prognostic factor for the overall survival and progression-free survival of multiple myeloma patients. *Clinical immunology (Orlando, Fla)* *123*, 114-120.
- Reed, E. F., Hong, B., Ho, E., Harris, P. E., Weinberger, J., and Suci-Foca, N. (1996). Monitoring of soluble HLA alloantigens and anti-HLA antibodies identifies heart allograft recipients at risk of transplant-associated coronary artery disease. *Transplantation* *61*, 566-572.
- 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.
- Robertson, M. J., Cochran, K. J., Cameron, C., Le, J. M., Tantravahi, R., and Ritz, J. (1996). Characterization of a cell line, NKL, derived from an aggressive human natural killer cell leukemia. *Exp Hematol* *24*, 406-415.

- Robson, S. C., Candinas, D., Hancock, W. W., Wrighton, C., Winkler, H., and Bach, F. H. (1995). Role of endothelial cells in transplantation. *Int Arch Allergy Immunol* *106*, 305-322.
- Rohner, A., Langenkamp, U., Siegler, U., Kalberer, C. P., and Wodnar-Filipowicz, A. (2007). Differentiation-promoting drugs up-regulate NKG2D ligand expression and enhance the susceptibility of acute myeloid leukemia cells to natural killer cell-mediated lysis. *Leuk Res* *31*, 1393-1402.
- Rouas-Freiss, N., Moreau, P., Menier, C., Lemaoult, J., and Carosella, E. D. (2007). Expression of tolerogenic HLA-G molecules in cancer prevents antitumor responses. *Semin Cancer Biol.*
- 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. *Human immunology* *67*, 188-195.
- 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.
- Schrambach, S., Ardizzone, M., Leymarie, V., Sibilia, J., and Bahram, S. (2007). In Vivo Expression Pattern of MICA and MICB and Its Relevance to Auto-Immunity and Cancer. *PLoS ONE* *2*, e518.
- Smith, J. D., Lawson, C., Yacoub, M. H., and Rose, M. L. (2000). Activation of NF-kappa B in human endothelial cells induced by monoclonal and allospecific HLA antibodies. *Int Immunol* *12*, 563-571.
- Song, H., Kim, J., Cosman, D., and Choi, I. (2006). Soluble ULBP suppresses natural killer cell activity via down-regulating NKG2D expression. *Cellular immunology* *239*, 22-30.
- Spreu, J., Stehle, T., and Steinle, A. (2006). Human cytomegalovirus-encoded UL16 discriminates MIC molecules by their alpha2 domains. *Journal of immunology (Baltimore, Md)* *177*, 3143-3149.
- Stastny, P. (2006). Introduction: MICA/MICB in innate immunity, adaptive immunity, autoimmunity, cancer, and in the immune response to transplants. *Human immunology* *67*, 141-144.
- Steinle, A., Groh, V., and Spies, T. (1998). Diversification, expression, and gamma delta T cell recognition of evolutionarily distant members of the MIC family of major histocompatibility complex class I-related molecules. *Proc Natl Acad Sci U S A* *95*, 12510-12515.

- 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.
- Stephens, H. A. (2001). MICA and MICB genes: can the enigma of their polymorphism be resolved? *Trends Immunol* 22, 378-385.
- Suarez-Alvarez, B., Lopez-Vazquez, A., Diaz-Molina, B., Bernardo-Rodriguez, M. J., Alvarez-Lopez, R., Pascual, D., Astudillo, A., Martinez-Borra, J., Lambert, J. L., Gonzalez, S., and Lopez-Larrea, C. (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.
- Suarez-Alvarez, B., Lopez-Vazquez, A., Diaz-Pena, R., Diaz-Molina, B., Blanco-Garcia, R. M., Alvarez-Lopez, M. R., and Lopez-Larrea, C. (2006b). Post-transplant soluble MICA and MICA antibodies predict subsequent heart graft outcome. *Transplant immunology* 17, 43-46.
- Sumitran-Holgersson, S., Wilczek, H. E., Holgersson, J., and Soderstrom, 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.
- Sutherland, C. L., Chalupny, N. J., Schooley, K., VandenBos, T., Kubin, M., and Cosman, D. (2002). UL16-binding proteins, novel MHC class I-related proteins, bind to NKG2D and activate multiple signaling pathways in primary NK cells. *J Immunol* 168, 671-679.
- 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. *American journal of transplantation* 7, 408-415.
- Tieng, V., Le Bouguenec, 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.
- Toker, A. (1998). Signaling through protein kinase C. *Front Biosci* 3, D1134-1147.
- Trpkov, K., Campbell, P., Pazderka, F., Cockfield, S., Solez, K., and Halloran, P. F. (1996). Pathologic features of acute renal allograft rejection associated with donor-specific antibody, Analysis using the Banff grading schema. *Transplantation* 61, 1586-1592.
- Vestweber, D. (2003). Lymphocyte trafficking through blood and lymphatic vessels: more than just selectins, chemokines and integrins. *Eur J Immunol* 33, 1361-1364.
- Villoutreix, B. O., Blom, A. M., and Dahlback, B. (1999). Structural prediction and analysis of endothelial cell protein C/activated protein C receptor. *Protein Eng* 12, 833-840.

- Virelizier, J. L., Perez, N., Arenzana-Seisdedos, F., and Devos, R. (1984). Pure interferon gamma enhances class II HLA antigens on human monocyte cell lines. *Eur J Immunol* *14*, 106-108.
- Vivier, E., Tomasello, E., and Paul, P. (2002). Lymphocyte activation via NKG2D: towards a new paradigm in immune recognition? *Current opinion in immunology* *14*, 306-311.
- Waaga, A. M., Gasser, M., Laskowski, I., and Tilney, N. L. (2000). Mechanisms of chronic rejection. *Curr Opin Immunol* *12*, 517-521.
- Wainwright, S. D., Biro, P. A., and Holmes, C. H. (2000). HLA-F is a predominantly empty, intracellular, TAP-associated MHC class Ib protein with a restricted expression pattern. *J Immunol* *164*, 319-328.
- Waldhauer, I., and Steinle, A. (2006). Proteolytic release of soluble UL16-binding protein 2 from tumor cells. *Cancer Res* *66*, 2520-2526.
- Wiemann, K., Mittrucker, H. W., Feger, U., Welte, S. A., Yokoyama, W. M., Spies, T., Rammensee, H. G., and Steinle, A. (2005). Systemic NKG2D down-regulation impairs NK and CD8 T cell responses in vivo. *J Immunol* *175*, 720-729.
- Wu, J., Cherwinski, H., Spies, T., Phillips, J. H., and Lanier, L. L. (2000). DAP10 and DAP12 form distinct, but functionally cooperative, receptor complexes in natural killer cells. *The Journal of experimental medicine* *192*, 1059-1068.
- Wu, 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. D., Higgins, L. M., Steinle, A., Cosman, D., Haugk, K., and Plymate, S. R. (2004). Prevalent expression of the immunostimulatory MHC class I chain-related molecule is counteracted by shedding in prostate cancer. *J Clin Invest* *114*, 560-568.
- Xu, J., Qu, D., Esmon, N. L., and Esmon, C. T. (2000). Metalloproteolytic release of endothelial cell protein C receptor. *J Biol Chem* *275*, 6038-6044.
- Xu, X., Rao, G., Gaffud, M. J., Ding, H. G., Maki, G., Klingemann, H. G., Groh, V., Spies, T., Caillat-Zucman, S., Gattuso, P., *et al.* (2006). Clinicopathologic significance of major histocompatibility complex class I-related chain A and B (MICA/B) expression in thyroid cancer. *J Clin Endocrinol Metab.*
- Yokoyama, W. M. (2002). Immunology: catch us if you can. *Nature* *419*, 679-680.
- Zhao, Y. P., Yang, J. Q., Ge, Y., Fan, L. A., Loiseau, P., and Colombani, J. (1993). HLA-DR and -DQB1 genotyping in a Chinese population. *Eur J Immunogenet* *20*, 293-297.

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., Mirbaha, F., and Stastny, P. (2006). Contact inhibition causes strong downregulation of expression of MICA in human fibroblasts and decreased NK cell killing. *Human immunology* *67*, 183-187.

Zou, Y., Stastny, P., Susal, C., Dohler, B., and Opelz, G. (2007). Antibodies against MICA antigens and kidney-transplant rejection. *N Engl J Med* *357*, 1293-1300.

Zucker, S., Mirza, H., Conner, C. E., Lorenz, A. F., Drews, M. H., Bahou, W. F., and Jesty, J. (1998). Vascular endothelial growth factor induces tissue factor and matrix metalloproteinase production in endothelial cells: conversion of prothrombin to thrombin results in progelatinase A activation and cell proliferation. *Int J Cancer* *75*, 780-786.

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., Fernandez-Vina, 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., 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.

RESUME

Etude de l'expression constitutive et régulée de la molécule de CMH de classe I non classique MICA par les cellules endothéliales vasculaires humaines : conséquences fonctionnelles et mécanismes de contrôle.

MICA est une molécule du CMH, dite de classe I non classique. Fortement polymorphique, MICA est le ligand du récepteur activateur NKG2D. L'objectif de cette étude était de caractériser l'expression et les fonctions des molécules MICA exprimées par l'endothélium et d'évaluer leur importance dans un contexte de Transplantation d'organes. Nos résultats confirment l'expression basale de MICA par les cellules endothéliales (CE) vasculaires et montrent que, bien que modérée, l'expression de MICA est suffisante pour activer des cellules NK allogéniques via le récepteur NKG2D. La co-culture de CE et de NK induit l'internalisation de NKG2D et réduit l'activité cytotoxique. Les cytokines modulent l'expression de MICA selon un profil spécifique puisque le TNF α augmente son expression alors que l'IFN γ diminue MICA à la surface des CE activées. L'expression de MICA est fortement contrôlée par la glycosylation et par l'activité des métalloprotéases de la matrice (MMP). Nos travaux montrent aussi pour la première fois que la régulation de la protéine MICA par les CE humaines dans un contexte inflammatoire est associée à la production de MICA soluble. Enfin, des inhibiteurs pharmacologiques des principales voies de signalisation intracellulaires nous ont aidés pour montrer l'importance des voies NF κ B et MAPKines dans la régulation de MICA par les cytokines TNF α et IFN γ . En conclusion, nos résultats soulignent l'impact fonctionnel de l'expression de MICA par les CE ; la régulation sélective de MICA à la membrane et la production de sMICA affectent l'activation des effecteurs (cellules NK et CTL) via NKG2D et procurent de nouvelles fonctions immunorégulatrices à l'endothélium.

Mots clés : cellules endothéliales, CMH de classe I, récepteurs NK, activité cytotoxique, antigène soluble

ABSTRACT

Constitutive and Regulated Expression of MICA on Vascular Endothelial Cells: Functional Impact and Control

MICA are highly polymorphic MHC class I related molecules shown to be expressed by endothelial cells (ECs). Consequently, MICA may be target for specific alloantibodies and NKG2D-expressing NK and T effector cells in organ allografts. In this study, we show that basal levels of MICA expressed on human vascular ECs, isolated from transplant donors, is sufficient to functionally modulate the immunoreceptor NKG2D expression and activity in allogeneic NK cells. We found that MICA expression is differentially regulated at the EC surface in response to cytokines. TNF α , up-regulated MICA while IFN γ significantly decreased MICA at the EC surface. Both cytokines induced the release of soluble MICA in culture supernatant from activated vascular ECs. Allogeneic NK-mediated lysis of ECs correlated with MICA level on the EC cell surface. We identified several molecular mechanisms, including glycosylation and metalloproteinase activities that control MICA regulation and function at posttranscriptional level in ECs. Our results indicate that, in addition to the NF κ B pathway, the MAPKs JNK, ERK1/2 and p38 are key signaling pathways in the control of MICA by the cytokines. Together, the fine tune modulation of MICA expression and release provides further evidence for an immunomodulatory role for graft's ECs.

Keywords: endothelial cell, MHC class I, NK receptors, cell-mediated cytotoxicity, soluble antigens