

UNIVERSITE DE NANTES  
FACULTE DE MEDECINE

**ROLE DU HLA DANS LA SIGNALISATION  
DES CELLULES ENDOTHÉLIALES EN  
TRANSPLANTATION  
ET CONTRIBUTION DE HLA-E  
AUX FONCTIONS IMMUNORÉGULATRICES DE  
L'ENDOTHÉLIUM**

THESE DE DOCTORAT

Ecole doctorale : CHIME-BIOLOGIE

**Discipline : Biologie-Médecine-Santé**

Spécialité : Immunologie

Présentée et soutenue publiquement par

**COUPEL Stéphanie**

Le 25 Octobre 2006, devant le jury ci-dessous

**Président** PACAUD Pierre, Professeur d'Université, INSERM U533, Nantes

**Rapporteurs** PAUL Pascale, Chargé de Recherche, INSERM U608, Marseille  
MICHEL Jean-Baptiste, Directeur de Recherche, INSERM U698, Paris

**Directeur de Thèse :** CHARREAU Béatrice, Docteur en Science,  
INSERM U643, Nantes

## Table des Matières

LISTE DES ABRÉVIATIONS.....	4
AVANT-PROPOS.....	5
<b>CHAPITRE 1. INTRODUCTION GÉNÉRALE.....</b>	<b>7</b>
1.1. ACTIVATION ET DYSFONCTION ENDOTHELIALES.....	8
1.1.1. Activation Endothéliale : définition, caractéristiques et mécanismes.....	10
1.1.2. La voie NF- $\kappa$ B : voie de signalisation intra-cellulaire centrale de l'Activation Endothéliale.....	18
1.1.3. Apoptose des Cellules Endothéliales : importance, mécanismes et effecteurs.....	22
1.1.4. Survie et Prolifération des Cellules Endothéliales : mécanismes et importance en Transplantation.....	25
1.2. TRANSPLANTATION ET ENDOTHELIUM.....	29
1.2.1. Endothélium du Greffon : cible et acteur du rejet.....	29
1.2.2. Alloanticorps et Endothélium du Greffon : du rejet à l'accommodation.....	31
1.3. OBJECTIFS DU PROJET DE RECHERCHE.....	35
<b>CHAPITRE 2. CONTRIBUTION DE RHOA ET DE LA VOIE DE LA PI3 KINASE À LA PROLIFÉRATION DES CELLULES ENDOTHÉLIALES INDUITE PAR LA LIAISON DU HLA DE CLASSE I.....</b>	<b>37</b>
2.1. INTRODUCTION.....	38
2.2. RÉSULTATS.....	44
2.2.1. Résumé de l'article 1.....	44
2.2.2. Article 1.....	46
<b>CHAPITRE 3. LES CELLULES ENDOTHÉLIALES ÉCHAPPENT À L'APOPTOSE INDUITE PAR LES ALLOANTICORPS ANTI-HLA-DR.....</b>	<b>58</b>
3.1. INTRODUCTION.....	59
3.2. RÉSULTATS.....	61
3.2.1. Résumé de l'article 2.....	62
3.2.2. Article 2.....	63
<b>CHAPITRE 4. EXPRESSION ET RÉGULATION DE LA MOLÉCULE HLA-E PAR LES CELLULES ENDOTHÉLIALES ET MISE EN ÉVIDENCE D'UNE FORME SOLUBLE.....</b>	<b>75</b>
4.1. EXPRESSION ET FONCTIONS DE LA MOLÉCULE HLA-E.....	76
4.1.1. HLA-E : molécule du HLA de classe I non classique.....	76
4.1.2. Fonctions biologiques de la molécule HLA-E.....	79
4.1.2.1. HLA-E : Ligand du récepteur CD94/NKG2A.....	79
4.1.2.2. HLA-E et présentation antigénique aux lymphocytes T CD8 <sup>+</sup> : activation et immunosuppression ?.....	81
4.1.3. Expression et régulation de la molécule HLA-E.....	82
4.1.3.1. Expression et régulation transcriptionnelle de HLA-E.....	82
4.1.3.2. Expression de la molécule HLA-E <i>in vitro</i> et <i>in vivo</i> .....	83
4.2. RÉSULTATS : EXPRESSION ET RÉGULATION DE LA MOLÉCULE HLA-E PAR LES CELLULES ENDOTHÉLIALES ET MISE EN ÉVIDENCE D'UNE FORME SOLUBLE.....	84
4.2.1. Résumé de l'article 3.....	84
4.2.2. Article 3.....	86
<b>CHAPITRE 5. DISCUSSION GÉNÉRALE.....</b>	<b>129</b>
5.1. ALLOANTICORPS ET SIGNALISATION INTRACELLULAIRE DANS L'ENDOTHÉLIUM.....	130
5.2. IMPACT DES ANTICORPS ANTI-HLA COMPARÉ AUX ANTICORPS DIRIGÉS CONTRE LES CELLULES ENDOTHÉLIALES (AECA) DANS LE REJET DE GREFFE.....	135
5.3. EFFET IMMUNOMODULATEUR DES STATINES ET BÉNÉFICE EN TRANSPLANTATION.....	136
5.4. ENDOTHÉLIUM ET VOIES DE SIGNALISATION : VERS DE NOUVELLES APPROCHES THÉRAPEUTIQUES ?.....	140
5.4. CONTRIBUTION DE HLA-E AUX FONCTIONS IMMUNO-RÉGULATRICES DES CELLULES ENDOTHÉLIALES.....	142
5.4.1. Rôle de HLA-E dans la présentation des peptides allogéniques.....	143
5.4.2. HLA-E et Protection des cellules endothéliales contre la lyse par les CTL et cellules NK.....	144
5.4.3. Rôle de l'expression endothéliale de HLA-E dans la génération de lymphocytes T suppresseurs et l'induction de tolérance.....	146

5.5. IMPORTANCE DES FORMES SOLUBLES DU HLA POUR LE DIAGNOSTIC ET LE SUIVI DES PATHOLOGIES VASCULAIRES.....	147
5.6. HLA-E ET MÉLANOMES.....	149
<b>CONCLUSION ET PERSPECTIVES .....</b>	<b>150</b>
<b>ANNEXES .....</b>	<b>153</b>
A1. STÉPHANIE COUPEL - LISTE DE PUBLICATIONS.....	154
A2. ARTICLE COMPLÉMENTAIRE.....	155
<b>BIBLIOGRAPHIE.....</b>	<b>162</b>

## Liste des Abréviations

AECA	Anticorps anti-Cellules Endothéliales
ANCA	Anticorps anti-cytoplasme des polynucléaires neutrophiles (« Antineutrophil Cytoplasmic Antibodies »)
APC	Cellule Présentatrice d'Antigènes
CEC	Cellules Endothéliales Circulantes
CMH	Clompexe Majeur d'Histocompatibilité
CIITA	« Class II Transactivator A »
ELAM-1	« Endothelial-Leucocyte Adhesion Molecule-1 », E-sélectine ou CD62E
EPC	« Endothelial Progenitor Cells »
ERK	« Extracellular Signal-Regulated Kinase »
FGF	Facteur de croissance des fibroblastes (« Fibroblast Growth Factor »)
GSK3 $\beta$	Glycogène Synthétase Kinase 3 $\beta$
GTP	Guanosine Tri-phosphate
HAEC	« Human Arterial Endothelial Cell »
HLA	« Human Leucocyte Antigen »
SHLA	« soluble Human Leucocyte Antigen »
HMG-CoA	3-Hydroxy-3-Méthylglutaryl Coenzyme A
HO-1	Hème Oxygénase-1
HUVEC	« Human Umbilical Vein EC »
ICAM-1	« IntraCellular Adhesion Molecule-1 » ou CD54
IFN $\gamma$	Interféron Gamma
I $\kappa$ B	« Inhibitor of nuclear factor kappa B »
IL	InterLeukine
ILT	« Immunoglobulin-Like Transcript »
IP-10	« IFN- $\gamma$ inducible Protein of 10 kDa »
JNK	« C-Jun-N-terminal Kinase »
LPS	Lipopolysaccharide
MAPK	« Mitogen-Activated Protein Kinases »
MCP-1	« Monocyte Chemotactic Protein-1 »
MICA	« MHC class I related-Chain A »
NEMO	« NF- $\kappa$ B Essential ModulatoR »
NF- $\kappa$ B	« Nuclear Factor kappa B »
NK	« Natural Killer »
NO	Monoxyde d'azote
PAF	« Platelet-Activating Factor »
PAI-1	Inhibiteur de l'Activateur du Plasminogène de type 1
PECAM-1	« Platelet-Endothelial Cell Adhesion Molecule-1 », ou CD31
PI3-K	Phosphoinositol 3-Kinase
PKC	Protéine Kinase C
PSGL-1	« P-Selectin Glycoprotein Ligand 1 »
Ser	Sérine
TCR	« T Cell Receptor »
TGF $\beta$	« Tumor Growth Factor $\beta$ »
TNF $\alpha$	« Tumor Necrosis Factor $\alpha$ »
TNF-R	Récepteur au TNF
Tyr	Tyrosine
VCAM-1	« Vascular Cell Adhesion Molecule-1 », ou, CD106
VEGF	« Vascular Endothelial Growth Factors »

## Avant-Propos

### Transplantation d'organes : Limites actuelles et perspectives.

C'est en 1959 que furent obtenus les deux premiers succès de greffe rénale réalisés chez l'homme entre jumeaux hétérozygotes, l'une à Boston, sous la direction de J. Merrill, l'autre à Paris sous la direction de Jean Hamburger. La première greffe de coeur, réalisée au Cap en 1967 par Christian Barnard – survie à 17 jours – eut un retentissement mondial. Par la suite, la maîtrise des diverses techniques chirurgicales progressa plus vite que les procédures de réanimation, la lutte contre l'infection et les traitements immunologiques. En 1972, la découverte des propriétés immunosuppressives de la ciclosporine par Jean-François Borel (Sandoz, Bâle) modifia de façon spectaculaire la présentation clinique du rejet. Au début des années 1980, la ciclosporine fut complétée par d'autres modalités médicamenteuses et de surveillance qui réduisirent considérablement la fréquence et l'intensité des épisodes de rejet. L'amélioration conjointe des techniques chirurgicales, des techniques de « cross-match » pré-greffes, des traitements immunosuppresseurs et du suivi post-greffe ont permis d'atteindre des survies à court terme (1-3 ans) de l'ordre de 80% (rein). Néanmoins, les limites actuelles demeurent la lente amélioration des courbes de survie à long terme (>5ans post greffe) et la pénurie de greffon.

Ainsi, en 2006, en Europe, 260 000 personnes vivent avec un organe greffé et 80 000 sont en attente d'une Transplantation. Parmi les approches qui sont actuellement envisagées pour accroître et optimiser la transplantation d'organes, il y a, en amont, une politique de santé publique en matière d'organisation du prélèvement visant à augmenter la disponibilité des greffons. Augmenter la durée de vie du greffon et diminuer les risques associés aux traitements immunosuppresseurs constituent un autre défi majeur en santé publique. Les priorités de recherche en Transplantation portent actuellement sur le développement de nouveaux immunosuppresseurs, permettant l'induction de la tolérance immune, sur le contrôle du rejet chronique, et la prédiction précoce du devenir des greffes à partir de méthodes non invasives s'appuyant sur la biologie moléculaire, la génomique fonctionnelle et le monitoring des cellules du système immunitaire. Des approches alternatives à la transplantation d'organes allogéniques telles que la xénotransplantation ou l'utilisation des cellules souches sont également évaluées pour pallier la pénurie de greffons.

Parmi ces objectifs, la compréhension et le contrôle des mécanismes impliqués dans les dysfonctions endothéliales et le rejet chronique, principale cause de perte du greffon à long terme, représentent donc un objectif primordial.

# **Chapitre 1. Introduction Générale.**

## 1.1. ACTIVATION et DYSFONCTION ENDOTHELIALES.

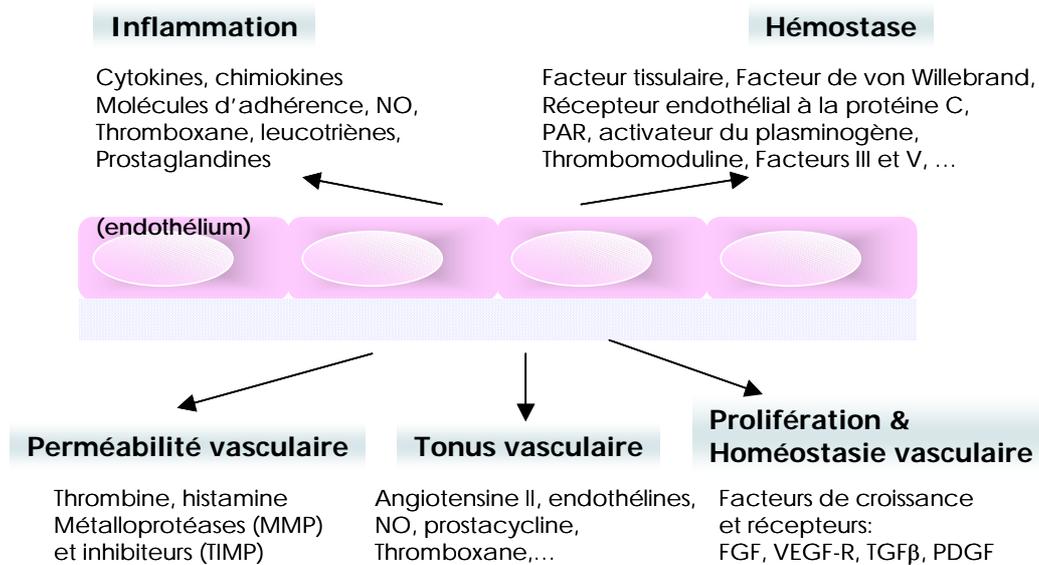
L'endothélium a été pendant longtemps considéré comme une « membrane inerte » qui délimite le système circulatoire avec comme fonction première essentielle le maintien de la perméabilité vasculaire. Ce n'est que dans les années 1950, suite aux études en microscopie électronique de la paroi vasculaire (par Palade (1)) et à la description des interactions physiologiques entre lymphocytes et endothélium des veinules post-capillaires par Gowan, que de nombreux travaux de recherche sur l'endothélium se sont développés et abouti à la conception actuelle de l'endothélium : un organe disséminé, hétérogène, dynamique, qui possède des fonctions vitales de sécrétion, de synthèse, métaboliques et immunologiques. Chez un homme adulte, l'endothélium est composé approximativement de  $1 \text{ à } 6 \times 10^{13}$  cellules ; il couvre environ une surface de  $1 \text{ à } 7 \text{ m}^2$  et pèse à peu près 1kg. Celui-ci est constitué d'une monocouche continue de cellules tapissant les vaisseaux de tous les organes, et il est séparé du sous-endothélium par une membrane basale, l'ensemble constituant l'intima. Ce tapis cellulaire sépare le sang de l'intima et de la média des artères et des veines, ainsi que de l'interstitium des tissus.

De nombreuses fonctions de l'endothélium sont décrites telles que le maintien du tonus vasculaire, la régulation du trafic cellulaire et des nutriments, le contrôle de la fluidité sanguine, le rôle dans l'équilibre entre médiateurs pro- et anti-inflammatoires et dans les réponses immunes, la participation à l'élaboration de nouveaux vaisseaux, et enfin, la régulation du renouvellement des cellules endothéliales (voir [Figure 1](#)). Il est important de comprendre que ces différentes fonctions diffèrent énormément selon le type d'endothélium, avec des différences selon le type de vaisseau, entre les organes et au sein même d'un tissu, mais aussi, elles peuvent changer au cours du temps : c'est la notion d'hétérogénéité des cellules endothéliales ou de diversité vasculaire, ce qui découle d'ailleurs des observations des pathologies atteignant certains lits vasculaires et pas d'autres.

La surface endothéliale est donc normalement anticoagulante et anti-inflammatoire, et c'est ce qui caractérise un endothélium dit « au repos » ou « quiescent ». Ceci s'oppose complètement aux modifications phénotypiques qui ont été décrites sous le terme « d'activation endothéliale », et, caractérisées par l'augmentation de la perméabilité vasculaire, l'acquisition de propriétés procoagulantes, l'expression de molécules d'adhésion et de chimiokines contribuant au passage transendothélial des leucocytes dans les tissus sous-jacents, tout ceci

participant activement à la réaction inflammatoire(2) (3) (4) (5). Cet état d'activation est rencontré après toute agression, qu'elle soit mécanique ou biochimique. Mais, il ne faut pas obligatoirement associer activation et pathologie, autrement dit, est-ce que l'état dit « de repos » des cellules endothéliales existe-t-il réellement *in vivo*.

**Figure 1.** Les fonctions de l'endothélium.



En effet, les cellules endothéliales sont constamment soumises à des contraintes mécaniques liées au flux sanguin (« shear stress ») et à des altérations de leur environnement local, telles que peuvent survenir lors de bactériémies transitoires, de traumatismes mineurs ou d'autres agressions quotidiennes et ordinaires. En d'autres termes, l'activation des cellules endothéliales doit être envisagée comme une réponse adaptative normale, la nature et la durée de celle-ci dépendant non seulement du type de stimulation, mais aussi du site et du moment auxquels elle survient. L'activation de l'endothélium n'est donc pas une réponse « du tout ou rien » mais un ensemble de réponses survenant à la fois dans des conditions physiologiques et pathologiques. Cette réponse peut être favorable à l'organisme et elle est alors dite fonctionnelle, physiologique, ou adaptative (6).

Par exemple, quand un agent pathogène envahit un tissu, les cellules endothéliales induisent localement la sécrétion de médiateurs pro-inflammatoires, le recrutement des leucocytes, et l'activation de la coagulation afin d'empêcher la propagation de l'infection. Durant ce processus, les cellules endothéliales peuvent subir la nécrose ou l'apoptose, le tissu étant

détruit puis réparé. Si l'on regarde au niveau de la cellule, la nécrose et/ou l'apoptose peuvent être considérées comme l'expression ultime de la dysfonction. Néanmoins, si l'on raisonne au niveau de l'individu, la perte locale de l'endothélium fait partie d'une réponse plus générale, coordonnée de défense anti-infectieuse (7) (8) (9). Le terme de « dysfonction endothéliale » est plus particulièrement réservée aux situations où la réponse endothéliale, qu'elle soit locale ou systémique, devient délétère. C'est dans le cas de l'infection, ce qui existe au cours du sepsis sévère : l'activation de l'endothélium est généralisée, excessive et persistante (10). En l'absence de réanimation, pratiquement tous les patients avec un sepsis sévère décèderaient de leur pathologie. En d'autres termes, la plupart de ces individus ont dépassé le seuil de la réponse adaptée à la réponse inadaptée.

La dysfonction vasculaire est impliquée dans de nombreuses pathologies responsables d'une morbidité considérable dans les pays développés, telles que l'athérosclérose, le cancer, le diabète, le choc septique, la prééclampsie, et enfin, en transplantation d'organes. Il apparaît donc fondamental de comprendre les mécanismes moléculaires clés régulant celle-ci et de les utiliser comme cibles de nouvelles approches thérapeutiques (pour revues, voir (11), (12)).

### 1.1.1. Activation Endothéliale : définition, caractéristiques et mécanismes.

L'activation endothéliale correspond aux modifications phénotypiques ou fonctionnelles des cellules endothéliales que provoquent la production locale ou systémique de médiateurs solubles, telles que histamine, thrombine, cytokines pro-inflammatoires –interleukine 1 (IL-1), « Tumor Necrosis Factor »  $\alpha$  (TNF $\alpha$ )-, le contact avec des produits d'origine bactérienne tels que le lipopolysaccharide (LPS), ou avec d'autres cellules ou des composants du sous-endothélium, ou enfin, l'exposition à des stimuli mécaniques. Ces modifications comprennent l'acquisition de propriétés procoagulantes, proadhésives vis-à-vis des plaquettes et des leucocytes favorisant leur transmigration, les altérations du tonus vasculaire et de la perméabilité vasculaire. Toutes ces modifications contribuent plus généralement à créer une réaction inflammatoire.

Les réponses des cellules endothéliales en fonction des médiateurs impliqués ont été divisées en deux grands types d'activation selon la nécessité ou non de synthèse protéique *de novo* (pour revue, voir (3)). L'activation de type I, ou « stimulation » (notion qui se réfère à d'autres phénomènes tels que la sécrétion cellulaire par dégranulation ou à la contraction musculaire), survient très rapidement, dans les 15 minutes qui suivent la l'exposition au

stimulus comme l'histamine ou la thrombine, et ne requiert pas de synthèse protéique. L'activation de type II, induite typiquement par l'IL-1 $\beta$  et le TNF $\alpha$ , est en général dépendante de la régulation de la transcription de gènes qui permet l'augmentation de l'expression de protéines déjà exprimées, mais en faible quantité au repos, ou l'induction de l'expression de nouvelles molécules. Ce processus nécessitant une synthèse protéique n'apparaît donc qu'après quelques heures voire jours.

L'activation de type I se caractérise par une grande diversité de réponses incluant la rétraction des cellules endothéliales, une exocytose contrôlée et la production de substances vasoactives, comprenant la prostacycline, le « Platelet-Activating Factor » (PAF) et le monoxyde d'azote (NO). La rétraction des cellules endothéliales normalement confluentes crée une augmentation du flux liquidien à travers la paroi vasculaire responsable d'œdème. L'exocytose, qui consiste en la fusion des corps de Weibel-Palade (qui sont les granules de stockage des cellules endothéliales) à la membrane plasmique, conduit à l'expression de formes de haut poids moléculaire du facteur de von Willebrand et à la translocation de la P-sélectine à la surface apicale des cellules endothéliales, ce qui associées au PAF, promeut l'adhésion et l'activation plaquettaire et leucocytaire. La liste des médiateurs de l'activation de type I est aussi diverse que les réponses elles-mêmes, et comprend notamment la thrombine, l'histamine, les leucotriènes –C4 et D4-, la fibrine, le complexe d'attaque membranaire et les radicaux libres oxygénés. Par conséquent, les sources principalement impliquées dans la production de ces médiateurs sont les systèmes enzymatiques plasmatiques du complément, de la coagulation, de la fibrinolyse, des kinines, et, au niveau des membranes cellulaires, les voies métaboliques de l'acide arachidonique. La plupart de ces activateurs, mais pas tous, provoquent une augmentation du calcium intra-cellulaire, ce qui active en aval la phospholipase A2, la « NO synthase » par exemple.

L'activation de type II, telle qu'elle a été décrite premièrement suite à l'action du TNF $\alpha$  et de l'IL-1 $\beta$  sur des cultures de CE humaines obtenues à partir de la veine ombilicale (HUVEC), se caractérise essentiellement par la synthèse protéique de molécules nombreuses et diverses telles que :

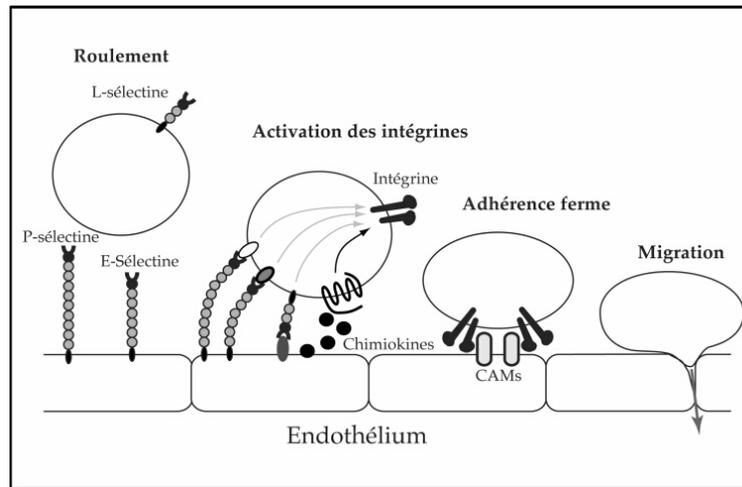
- \*) impliquées dans la coagulation ou la fibrinolyse : le facteur tissulaire, l'inhibiteur de l'activateur du plasminogène de type 1 (PAI-1)
- \*) des cytokines pro-inflammatoires : IL-1, IL-6
- \*) des chimiokines favorisant la transmigration leucocytaire : IL-8, MCP-1 (« Monocyte Chemotactic Protein-1 »)

\*) des molécules d'adhésion intervenant dans les interactions cellules endothéliales/ leucocytes: E-sélectine ou ELAM-1 (« Endothelial-Leucocyte Adhesion Molecule-1 », ou CD62E), ICAM-1 (« Intercellular Adhesion Molecule-1 », ou CD54), VCAM-1 (« Vascular Cell Adhesion Molecule-1 », ou CD106)

\*) enfin d'autres molécules telles que les molécules du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) de classe I et de classe II, TGF $\beta$  (« Tumor Growth Factor  $\beta$  ») ou I $\kappa$ B $\alpha$  (« Inhibitor of nuclear factor kappa B alpha »), l'inhibiteur de la principale voie de signalisation intracellulaire impliquée dans l'activation de type II. L'augmentation ou l'induction de l'expression de ces protéines est principalement due à la stimulation de la transcription des gènes correspondants qui nécessite l'action de facteurs transcriptionnels pré-existants, indépendamment de toute synthèse protéique (13) (14). La plupart des gènes impliqués dans cette activation possèdent notamment dans leur promoteur un ou plusieurs sites de fixation pour le facteur transactivateur NF- $\kappa$ B, impliqué dans la régulation rapide de l'expression de ces gènes (pour revue, voir (4)). Des études ont mis en évidence l'importance de cette voie dans l'activation endothéliale, et en particulier dans la régulation des gènes codant pour ELAM-1, ICAM-1 et VCAM-1 (15) (16) (17) (18) (19) (20) (21).

L'une des caractéristiques de l'activation de type II est donc l'expression *de novo* ou la surexpression de molécules d'adhésion et de chimiokines, essentielles au processus par lequel les leucocytes migrent à travers la paroi vasculaire du compartiment sanguin vers les sites tissulaires soumis à une réponse inflammatoire (22) (5). Ce processus implique une cascade d'interactions (« the adhesion cascade ») pouvant être divisées en quatre grandes étapes : l'attachement puis le roulement (ou « tethering and rolling »), le déclenchement (ou « triggering »), suivi de l'adhésion stable (ou « firm adhesion »), et enfin la transmigration (ou « transmigration »...) (22) (voir Figure 2).

Figure 2. La cascade d'adhésion des leucocytes sur l'endothélium, d'après Springer (1994).



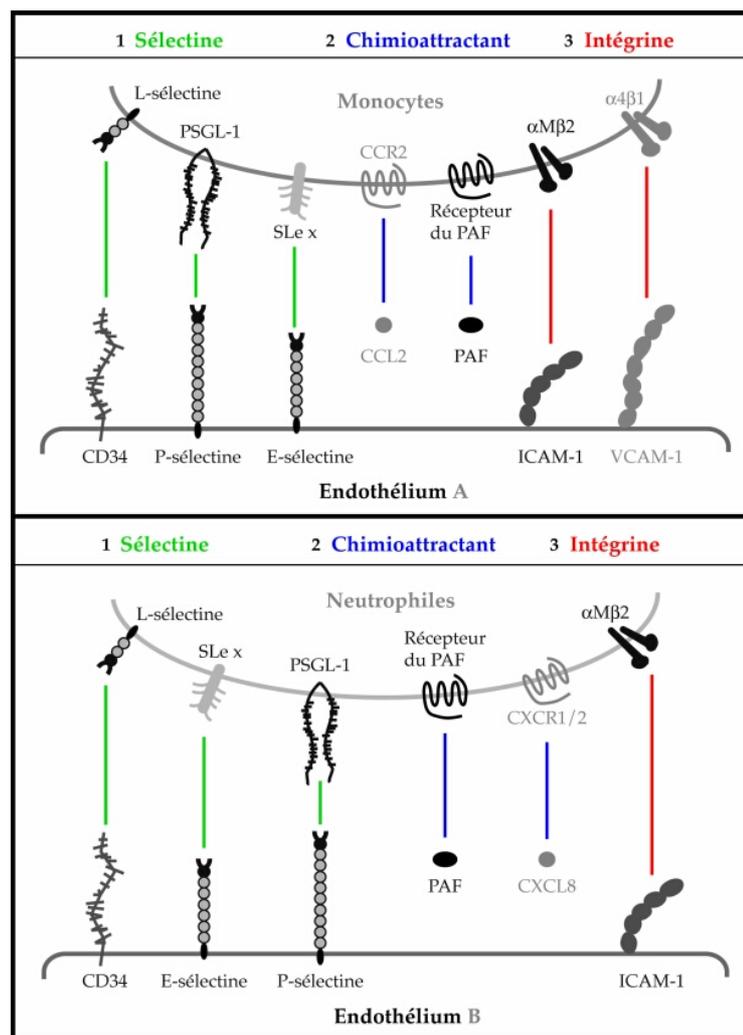
La première étape où les leucocytes s'attachent et roulent pour s'immobiliser transitoirement le long de l'endothélium est médiée par les sélectines (P-, E-, et L-sélectines), qui possèdent des domaines de type lectine interagissant avec des oligosaccharides ressemblant au sialyl-Lewis<sup>X</sup> (tels que ceux composant les glycoprotéines du groupe de la sialomucine), leurs ligands spécifiques exprimés à la surface des polynucléaires neutrophiles, des monocytes/macrophages ou des lymphocytes. La E-sélectine est une molécule d'adhésion dont l'expression est spécifiquement endothéliale et induite *de novo* par le TNF $\alpha$  ou l'IL-1 $\beta$ . Son expression atteint un maximum après environ 4 à 6 heures, pour retourner lentement à son niveau de base, qui est très faible, entre 24 et 48 heures (23) (24). La E-sélectine interagit préférentiellement avec les polynucléaires neutrophiles par l'intermédiaire de ligands contenant le sialyl-Lewis<sup>X</sup> ou le PSGL-1 (« P-Selectin Glycoprotein ligand 1 »).

Une fois immobilisés à la surface des cellules endothéliales, les leucocytes doivent être activés pour que la cascade de l'adhésion puisse se poursuivre, ce qui correspond à la phase de déclenchement. Ce signal est fourni par des molécules chimiotactiques et des chimiokines qui sont produites sur le site de l'inflammation par à la fois les globules blancs et les cellules endothéliales. Leur rôle est d'orienter la migration cellulaire selon un gradient de concentration : les cellules migrent vers les plus fortes concentrations de ces molécules, en sachant qu'elles peuvent avoir un effet direct dans la circulation mais qu'elles sont surtout

liées à l'endothélium au niveau des glycosaminoglycanes membranaires de type héparane, et, où elles peuvent donc interagir efficacement avec les leucocytes immobilisés en se fixant à des récepteurs spécifiques. Les chimiokines, d'abord reconnues pour leur rôle chimiotactique, sont une superfamille de cytokines divisée en quatre groupes (C, CC, CXC, et CX<sub>3</sub>C) selon la séquence en acides aminés de la région N-terminale caractérisée par la position d'une paire de résidus cystéine. Elles se distinguent par leur expression constitutive (« chimiokines lymphoïdes ») ou inductible (« chimiokines inflammatoires »), leurs récepteurs dont l'expression est également régulée au sein des différents types cellulaires selon notamment leur état de différenciation et en sachant qu'ils peuvent se lier à plusieurs chimiokines différentes, tout ceci contribuant à la complexité du système et à la particularité de chaque chimiokine avec une spécificité pour le type de leucocyte recruté. L'IL-8 (ou CXCL8) et le MCP-1 (ou CCL2), deux chimiokines induites au cours de l'activation endothéliale, sont impliqués dans le recrutement des polynucléaires neutrophiles (IL-8) et des monocytes/macrophages (MCP-1 et IL-8) mais aussi des lymphocytes. Cette étape de déclenchement provoque des modifications de la conformation des intégrines leucocytaires augmentant leur avidité pour leurs ligands endothéliaux (pour revue, voir (25), (26) et (27)). Ceci précède l'étape d'adhésion stable qui met donc en jeu les interactions des intégrines à la surface des leucocytes avec des molécules de la superfamille des immunoglobulines, ICAM-1 et VCAM-1, exprimées sur l'endothélium. ICAM-1 interagit notamment avec LFA-1 (« Leukocyte Function-associated Antigen-1 », ou  $\alpha$ 1 $\beta$ 2 intégrine, ou CD11aCD18) et VCAM-1 avec VLA-4 (« Very Late Antigen-4 », ou  $\alpha$ 4 $\beta$ 1 intégrine). ICAM-1 est exprimé faiblement par l'endothélium au repos mais aussi par de nombreux autres types cellulaires (28) (29). Sa cinétique d'expression diffère de celle de la E-sélectine, rendant compte de leurs fonctions différentes: l'augmentation de l'expression protéique ne débute seulement que quelques heures après la survenue du signal activateur (alors que celle de la E-sélectine commence à décliner), pour atteindre un plateau qui dure au moins 24 heures. La cinétique d'expression de VCAM-1 ressemble à celle d'ICAM-1, en sachant que son niveau d'expression est beaucoup plus faible, voire nul, dans les cellules endothéliales au repos, et par conséquent, que c'est une molécule d'adhésion induite fortement par l'IL-1 et le TNF $\alpha$ . D'autre part, les lymphocytes et les monocytes, mais pas les polynucléaires neutrophiles, expriment VLA-4, alors que LFA-1 est retrouvé chez tous les leucocytes (pour revues, voir (3) (27) (30)) (et voir Figure 3).

La dernière étape de l'adhésion est la transmigration des leucocytes solidement « amarrés » aux cellules endothéliales qui passent à travers les jonctions intercellulaires. L'expression endothéliale de PECAM-1 (« Platelet-Endothelial Cell Adhesion Molecule-1 », ou CD31) est concentrée au niveau de ces jonctions, ce qui permet d'interagir de manière homotypique avec PECAM-1 leucocytaire aboutissant à la transmigration. Une fois dans l'interstitium, les leucocytes se déplacent à travers la matrice extra-cellulaire grâce à des interactions  $\beta 1$  intégrines/ligands le long d'un gradient chimiotactique vers le site inflammatoire. Lors de cette étape, il est important de noter qu'il y a rupture de la membrane basale endothéliale, rupture favorisée par les leucocytes activés mais aussi par les cellules endothéliales. En effet, la balance protéases/antiprotéases est modifiée lors de l'activation endothéliale (31).

**Figure 3.** Interactions moléculaires impliquées dans le processus d'adhérence cellulaire entre l'endothélium et les monocytes (A) et l'endothélium et les neutrophiles (B).



Tous ces phénomènes contribuent par conséquent à la réaction inflammatoire qui se caractérise par une vasodilatation, une hyperperméabilité vasculaire, un infiltrat cellulaire, une activation de la coagulation, tout ceci contribuant à la description clinique, rougeur, chaleur, œdème lié à un exsudat et douleur. Ces modifications ont été observées préférentiellement au niveau des veinules post-capillaires mais peuvent s'étendre au niveau des capillaires, en particulier dans le poumon, le foie, le rein, les cellules endothéliales artérielles et artériolaires étant normalement protégées par le débit sanguin élevé et les contraintes mécaniques qui lui sont liés. La vasodilatation locale induit une augmentation du flux sanguin et favorise l'accumulation des leucocytes au site de l'inflammation. Quatre types d'altération des cellules endothéliales rencontrés dans les processus inflammatoires peuvent aboutir à créer l'augmentation de la perméabilité de la barrière endothéliale : la contraction des cellules endothéliales, la réorganisation du cytosquelette et des systèmes de jonction intercellulaire des cellules endothéliales, les lésions des cellules endothéliales avec rétraction, lyse et dénudation, et enfin, la dénudation sans lyse (3). La contraction des cellules endothéliales est rencontrée dans la stimulation endothéliale. Par contre, l'activation secondaire aux cytokines entraîne un réarrangement du cytosquelette des CE responsable d'une hyperperméabilité prolongée. Mais, l'IL-1 et le TNF $\alpha$  ne provoquent pas normalement directement des lésions des cellules endothéliales, mais, induisent l'adhésion des leucocytes aux cellules endothéliales et donc leur activation. Les leucocytes activés peuvent léser les cellules endothéliales qui alors se rétractent et meurent, créant un passage entre les cellules et exposant la matrice extra-cellulaire du sous-endothélium pro-coagulante. En cas de lésions sévères, les cellules endothéliales peuvent se détacher de la membrane basale sous-jacente. Si l'atteinte est localisée, il est possible que les cellules endothéliales voisines comblerent les espaces. Mais, si elle est trop étendue, il s'ensuit une fuite vasculaire marquée. Ce phénomène, contrairement aux autres précédemment décrits, peut concerner le lit capillaire en plus des veinules, comme il est décrit au niveau du poumon dans le syndrome de détresse respiratoire aigu. Enfin, le détachement des cellules endothéliales est aussi observé sans qu'il y ait obligatoirement lyse cellulaire suite à des modifications des interactions cellules endothéliales /matrice. De même, l'activation de la coagulation est en partie en rapport avec ces altérations de la barrière endothéliale, notamment par l'exposition de la matrice extra-cellulaire du sous-endothélium. Lors de la réaction inflammatoire, les trois phases de l'hémostase sont perturbées favorisant la formation de thrombus avec un rôle central de l'endothélium (32). L'activation plaquettaire

est notamment induite par la sécrétion de PAF, la perte à la surface des cellules endothéliales, suite à leur activation, des héparane sulfates, auxquels est fixée l'antithrombine III, et de la thrombomoduline (qui permet l'activation du système anticoagulant protéine C/ protéine S) a un rôle important dans l'activation de la coagulation (pour revue, voir (33)). Enfin, la capacité des cellules endothéliales activées à synthétiser du facteur tissulaire apparaît primordiale dans la formation du thrombus. De même, il y a production de PAI-1 ce qui inhibe la fibrinolyse.

La réaction inflammatoire se caractérise également par la formation d'un infiltrat cellulaire, auxquelles contribuent la vasodilatation et l'hyperperméabilité, dont la nature diffère selon le caractère aigu ou chronique reflétant l'implication ou non d'une immunité adaptative ; en effet, dans l'inflammation aiguë, l'infiltrat est essentiellement composé de polynucléaires avec peu de monocytes/macrophages, plus l'inflammation devient chronique, plus l'infiltrat comporte des monocytes/macrophages et des lymphocytes. Ceci s'explique à la fois par les différences entre la localisation de la réponse inflammatoire, la nature des stimuli inflammatoires, entre activations de type I et de type II, mais aussi, par la cinétique d'expression des différentes molécules d'adhésion, E-sélectine, ICAM-1, VCAM-1, au cours de l'activation de type II, avec leurs spécificités pour des groupes cellulaires donnés (E-sélectine pour les polynucléaires neutrophiles et les monocytes, ICAM-1 pour tous les leucocytes, et VCAM-1 pour les monocytes et les lymphocytes). Il faut également concevoir que tous ces phénomènes sont intriqués *in vivo*. Ainsi, on décrit par exemple en transplantation que le rejet suraigu est dû à l'activation de type I et le rejet vasculaire aigu au type II, mais, les cytokines, TNF $\alpha$  et IL-1 $\beta$ , en initiant la coagulation, génèrent de la thrombine, exemple d'intrication entre types I et II, en sachant que la thrombine à fortes concentrations est capable d'induire une activation des de type II et à plus faibles concentrations de potentialiser les effets des cytokines. Enfin, l'inflammation « immune » ou les réactions immunes à médiation cellulaire sont caractérisées par la production d'interféron gamma (IFN $\gamma$ ), cytokine lymphocytaire dont l'action sur les cellules endothéliales est particulière. L' IFN $\gamma$  n'est pas capable à lui seul d'induire l'expression endothéliale de la E-sélectine ou de VCAM-1, mais, il augmente l'expression d'ICAM-1 entre 24 et 72 heures. Il n'entraîne pas la formation d'IL-8, mais celle de MCP-1, et également, une autre chimiokine nommée IP-10 (« IFN $\gamma$  inducible Protein of 10 kDa », ou CXCL10). C'est une cytokine qui potentialise les effets activateurs du TNF $\alpha$  sur la cellule endothéliale, notamment sur sa capacité à induire la E-sélectine et ICAM-1. De plus, l'IFN $\gamma$  a un rôle essentiel dans la

régulation des molécules du CMH de classe I et II à la surface des cellules endothéliales (34) (35) (36) (37).

### 1.1.2. La voie NF- $\kappa$ B : voie de signalisation intra-cellulaire centrale de l'Activation Endothéliale.

Le système de facteurs de transcription Rel/ NF- $\kappa$ B est un élément clé des mécanismes de réponse immédiate qui permettent à la cellule vivante d'adapter rapidement son programme d'expression génique à une situation nouvelle. La caractéristique majeure de ce système dans de très nombreux types cellulaires est la possibilité, sous l'effet de stimuli variés (hormones, facteurs de croissance, cytokines, infections virale et bactérienne, LPS, esters de phorbol, radicaux libres oxygénés, rayonnement ultraviolet...), de mobiliser rapidement (quelques minutes) des réserves cytoplasmiques de facteurs de transcription inactifs vers le noyau. L'activation de NF- $\kappa$ B induit la transcription d'un grand nombre de gènes conduisant à l'expression de cytokines et de chimiokines, de molécules d'adhésion, de facteurs de croissance, des protéines aiguës de l'inflammation, de récepteurs impliqués dans le système immunitaire et notamment les molécules du CMH, de molécules impliquées dans la progression du cycle cellulaire. Par conséquent, NF- $\kappa$ B contrôle directement ou indirectement une grande variété de réponses biologiques, en particulier celles impliquées dans l'immunité innée et adaptative. C'est une voie d'activation de la transcription des gènes ubiquitaire et conservée entre les espèces, dont l'expression cellulaire est constitutive dans les lymphocytes B et T, les monocytes et les neurones, ou inductible dans les autres types cellulaires.

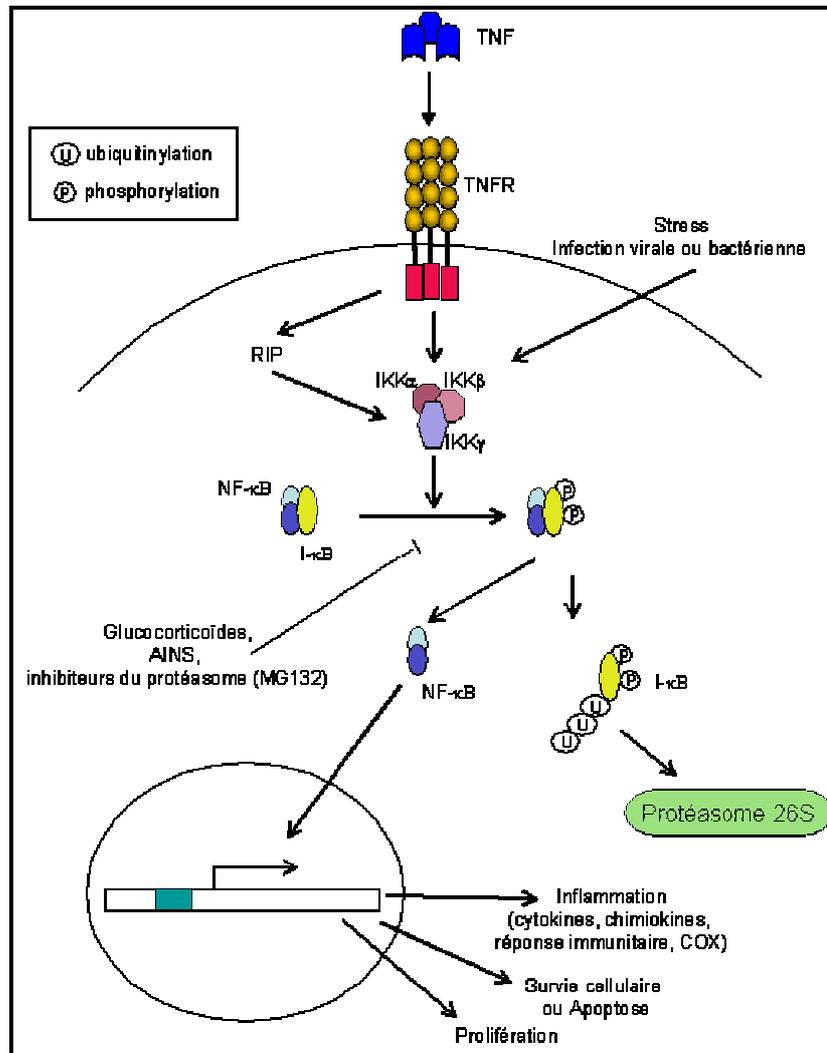
Initialement isolé dans les lymphocytes B matures par Sen et Baltimore en 1986, NF- $\kappa$ B (« Nuclear Factor of B lymphocytes » sécrétant les chaînes légères kappa) est un facteur de transcription nucléaire nécessaire pour stimuler les gènes J et C codant pour les chaînes légères kappa des immunoglobulines et des protéines du CMH (38). Les facteurs de transcription NF- $\kappa$ B forment une famille de protéines, dont le membre le mieux caractérisé est constitué d'un hétérodimère entre une protéine de 50 kDa (p50 ou NF- $\kappa$ B1) et une protéine de 65 kDa (p65 ou RelA). Dans la plupart des cellules, le dimère p65/p50 NF- $\kappa$ B forme un complexe cytoplasmique avec la protéine I $\kappa$ B $\alpha$  (« inhibitor of NF- $\kappa$ B »). Cette interaction a pour effet de séquestrer le facteur de transcription dans le cytoplasme et de l'empêcher ainsi de contacter ses sites de fixation sur l'ADN. L'activation cellulaire via un récepteur provoque

une phosphorylation des deux résidus sérines 32 et 36 de l'inhibiteur I $\kappa$ B $\alpha$  par un complexe enzymatique appelé IKK. Ce complexe est formé de deux sous-unités, IKK $\alpha$  et  $\beta$ , qui sont des protéines kinases à spécificité sérine/thréonine, et d'une sous-unité protéique, IKK $\gamma$  ou NEMO (« NF- $\kappa$ B Essential ModulatoR »), qui stabilise le complexe (39) (40) (41). Même si les deux sous-unités IKK $\alpha$  et  $\beta$  sont *in vitro* capables de phosphoryler I $\kappa$ B $\alpha$  au niveau des sites spécifiques, IKK $\beta$  a toutefois *in vivo* un rôle prépondérant dans l'activation de NF- $\kappa$ B en réponse aux stimuli pro-inflammatoires incluant le TNF $\alpha$ , IKK $\alpha$  n'étant pas essentiel (42) (43). Après phosphorylation par le complexe IKK, I $\kappa$ B $\alpha$  est ubiquitinylé et dégradé par le complexe du protéasome. La dégradation d'I $\kappa$ B $\alpha$  a pour conséquence de démasquer un site de location nucléaire (nls) au niveau de NF- $\kappa$ B, et donc libérer les dimères p65/p50 qui sont rapidement transférés dans le noyau (translocation), où ils se fixent dans la région promotrice de nombreux gènes (site NF- $\kappa$ B), permettant l'activation de leur transcription (44) (45) (voir [Figure 4](#)).

Le rôle essentiel de cette voie de signalisation intra-cellulaire a été mis en évidence grâce à l'utilisation de modèles d'inactivation génique par recombinaison homologue chez la souris (souris KO ou « knock-out ») : chez les souris invalidées pour RelA (p65  $-/-$ ), ont été observées mortalité embryonnaire et dégénérescence du foie par apoptose massive (46), et, chez les souris invalidées pour p50 (p50 $-/-$ ), il existe une altération de la réponse immune (47), ces expériences démontrant l'importance de NF- $\kappa$ B dans le développement embryonnaire et le système immunitaire. D'autre part, c'est une voie de signalisation essentielle qui se déclenche en réponse à plusieurs cytokines (TNF $\alpha$ , IL-1, IL-2), mais également, en réponse à des stress environnementaux comme le LPS.

Ainsi, il a été démontré que NF- $\kappa$ B joue un rôle majeur dans l'activation de l'endothélium: en effet, NF- $\kappa$ B, exprimé dans le cytoplasme des cellules endothéliales au repos, est en grande partie responsable de l'activation de la transcription de nombreux gènes dans l'endothélium, notamment des trois molécules d'adhésion -ELAM-1, ICAM-1 et VCAM-1-, suite à l'action stimulatrice du LPS, du TNF $\alpha$ , et de l'IL-1 (14).

Figure 4. Principales étapes de la voie d'activation du facteur NF- $\kappa$ B.



La voie d'activation NF- $\kappa$ B joue donc un rôle clé dans l'induction de gènes pro-inflammatoires et impliqués dans la réponse immune au cours de l'activation des cellules endothéliales. Par conséquent, pour que l'activation de NF- $\kappa$ B soit transitoire et limitée, il existe de nombreuses boucles de rétrocontrôle régulant négativement celle-ci. Ainsi, NF- $\kappa$ B lui-même provoque l'augmentation de la transcription du gène codant pour son inhibiteur I $\kappa$ B $\alpha$ . D'autre part, NF- $\kappa$ B régule également l'expression de gènes codant des protéines qui possèdent des propriétés anti-apoptotiques et/ou anti-inflammatoires, telles que Bcl-2 et Bcl-X<sub>L</sub>, A1, A20 et l'hème oxygénase-1 (HO-1) (48) (49). En effet, des travaux ont tout d'abord

montré qu'en inhibant spécifiquement NF- $\kappa$ B par I $\kappa$ B $\alpha$  (50) ou en utilisant un mutant de p65/RelA tronqué (51) l'induction de gènes pro-inflammatoires est bloquée. Néanmoins, cette inhibition de NF- $\kappa$ B par la surexpression de son inhibiteur spécifique I $\kappa$ B $\alpha$  sensibilise les cellules, y compris les cellules endothéliales, à l'apoptose induite par le TNF $\alpha$ , ce qui abolit l'intérêt de cette approche pour le contrôle de la transcription des gènes pro-inflammatoires (52) (53) (54). En effet, les gènes anti-apoptotiques Bcl-2 et Bcl-x<sub>L</sub>, A1, A20 et HO-1 ne sont plus alors exprimés. En effet, Bach et *al.* ont démontré que l'expression de ces gènes dans les CE *in vitro* inhibe l'activation de NF- $\kappa$ B et donc l'induction des gènes pro-inflammatoires (48) (55). De toutes ces données, découle la notion de gènes protecteurs qui ont une double fonction : ils protègent les cellules endothéliales d'une activation incontrôlée et de l'apoptose, ceci même quand NF- $\kappa$ B est bloqué (56) (57). Toutefois, dans des conditions extrêmes, comme un choc septique incontrôlé ou un rejet de greffe, malgré les niveaux élevés de protection fournis par l'expression associée de gènes protecteurs constitutivement exprimés ou induits, ceci n'est pas suffisant pour contrecarrer l'intensité de l'activation : il y a alors perte des cellules endothéliales par apoptose (57).

Un nombre croissant de publications a apporté une description de plus en plus précise de la voie NF- $\kappa$ B, des partenaires moléculaires impliqués et des interactions avec les autres voies de signalisation. Ainsi, dans une revue récente, Karin et *al.*, propose l'existence de 2 voies parallèles d'activation de NF- $\kappa$ B. (58). En effet si la plupart des études se sont initialement intéressées à comprendre le rôle pro-inflammatoire de NF- $\kappa$ B, la compréhension des mécanismes contrôlant l'activité de NF- $\kappa$ B est actuellement un axe de recherche qui permettrait d'identifier de cibles moléculaires pour le contrôle de cette voie d'activation. Le complexe des kinases I $\kappa$ B (IKK) contient 2 sous-unités catalytiques, IKK $\alpha$  and IKK $\beta$ , et contrôle l'activation des facteurs de transcription NF- $\kappa$ B. S'il est acquis que IKK $\beta$  est impliqué dans l'activation de NF- $\kappa$ B en réponse aux cytokines pro-inflammatoires et au LPS, il semble que la kinase IKK $\alpha$  régule une voie alternative impliquée dans la régulation négative de l'activation : elle accélère le renouvellement des sous-unités pro-inflammatoires RelA et c-rel, elle favorise leur remplacement par des dimères anti-inflammatoires contenant RelB, et, elle diminue leur interaction avec les promoteurs des gènes pro-inflammatoires (59). L'activation de la voie « classique » ou alterne pourrait dépendre de l'expression relative des récepteurs TNF-R1 et TNF-R2 à la surface des cellules. La contribution relative de ces deux voies d'activation a été démontrée dans les macrophages, leur rôle dans les cellules endothéliales reste à étudier. Dans ce contexte, il convient aussi de noter que l'expression

respective de TNF-R1 et TNF-R2 par les cellules endothéliales au repos ou dans un contexte inflammatoire demeure mal connue.

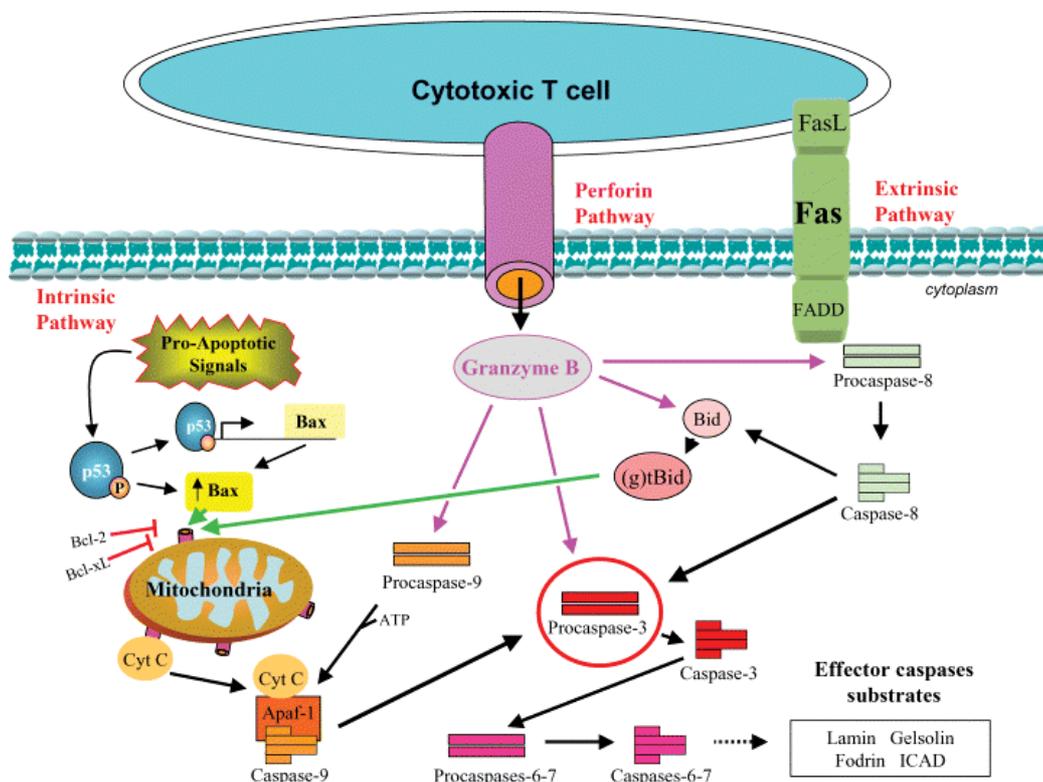
### 1.1.3. Apoptose des Cellules Endothéliales : importance, mécanismes et effecteurs.

Définie en 1972 par J. F. Kerr et A .H. Wyllie (60), l'apoptose est une forme de mort cellulaire définie par une séquence d'altérations morphologiques comprenant une condensation du cytoplasme et de la chromatine, une fragmentation de l'ADN, des mitochondries longtemps fonctionnelles et des organites longtemps intacts, un bourgeonnement de la membrane plasmique et une perte de l'asymétrie membranaire avec exposition de la phosphatidylsérine membranaire. Ces changements sont rapidement suivis de la phagocytose des débris cellulaires apoptotiques par les cellules avoisinantes ou les phagocytes mononucléés. Il existe d'autres tableaux morphologiques de mort cellulaire comme la mort nécrotique qui elle se caractérise par un gonflement cellulaire, un noyau longtemps intact, des mitochondries et autres organites rapidement altérés, et une lyse cellulaire. Contrairement à la nécrose, l'apoptose est une mort cellulaire programmée faisant appel à des voies biochimiques définies et en cascade, nécessitant de l'énergie et très finement régulée, tout ceci la différenciant de la nécrose. Il faut savoir que la séquence stéréotypée de modifications morphologiques définissant au départ l'apoptose n'accompagne pas forcément toute mort cellulaire programmée et l'on préfère parler maintenant de mort programmée au sens large (pour revue, voir (61)).

L'apoptose est un processus cellulaire fondamental physiologique qui intervient dans l'embryogénèse, la maturation du système immunologique, le remodelage et la réparation tissulaires. Mais, l'apoptose peut également survenir dans les cellules non destinées à mourir si celles-ci sont soumises à des stress extrêmes, en sachant que parfois la distinction entre apoptose et nécrose peut être floue puisque, en fonction de l'intensité du stimulus et du type cellulaire, la cellule subira apoptose ou nécrose. Un grand nombre de stimuli intra- et extra-cellulaires peuvent induire une apoptose incluant l'hypoxie, les radicaux libres oxygénés, le choc thermique, les radiations ionisantes ou ultraviolets, l'inflammation, les lésions de l'ADN, ou, des mitochondries (6).

Deux voies principales peuvent être décrites dans l'induction de l'apoptose: l'activation des récepteurs membranaires de "mort" (comme TRAIL, les récepteurs de la famille TNF, TNF-R1 ou le récepteur au ligand FAS nommé FAS/APO-1/CD95) et l'implication de la mitochondrie (voir Figure 5). Les signaux vont être intégrés par la cellule et de nombreuses voies de signalisation vont être ainsi activées aboutissant à l'activation des caspases. Les caspases (pour « Ced-3-like cysteine aspartate protease ») de la famille ICE (« Interleukine-1b Converting Enzyme ») sont des cystéines-protéases intracellulaires. Dix membres ont été identifiés (les caspases 2, 3, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 13 et 14) qui fonctionnent comme des initiateurs et des effecteurs de l'apoptose (pour revue, voir (62)). Les caspases sont les effecteurs principaux de toutes les voies de transduction d'un signal apoptotique. Elles sont synthétisées sous forme de proenzymes inactifs. Les caspases 8 et 9 sont des "initiateurs" de l'apoptose (63). Il est important de souligner que l'apoptose n'est pas le résultat d'une succession linéaire d'événements. De multiples voies de signalisation doivent communiquer et s'autoréguler.

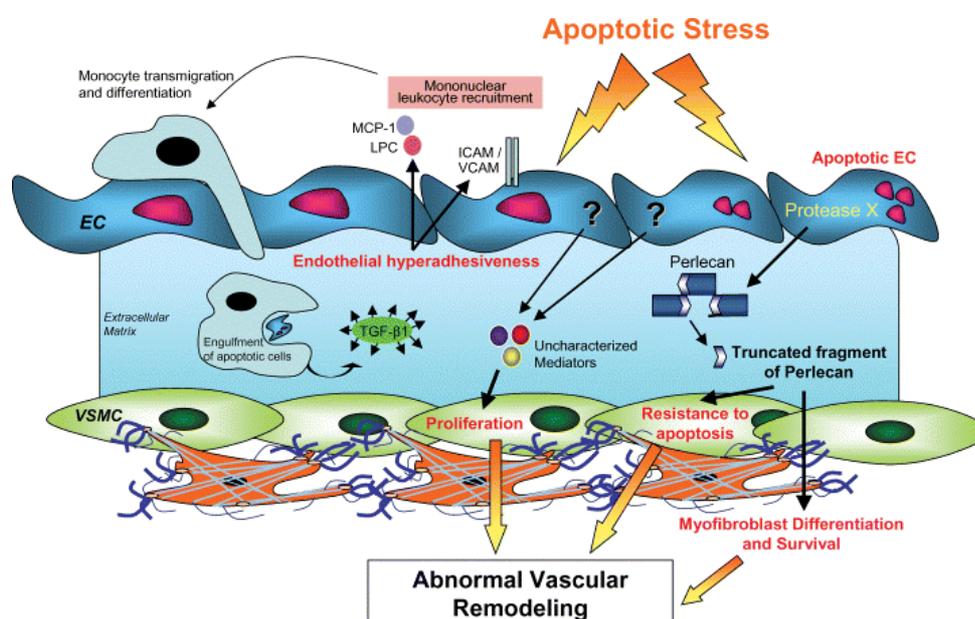
**Figure 5.** Représentation schématique des différentes voies d'apoptose : la voie intrinsèque ou voie des mitochondries, la voie extrinsèque activée par des récepteurs membranaires à domaines de mort (DD pour « Death domain ») tels que le TNF-R/TNF ou Fas/FasL, et la voie du granzyme B qui active directement les caspases 8 et 9 et la voie des mitochondries via un effet sur la molécule Bid (d'après Cailhier *et al.*, 2006).



Dans de nombreuses pathologies, telles que les cancers, les maladies auto-immunes, les maladies neurodégénératives ou cardiovasculaires, il est observé des altérations de la régulation de l'apoptose essentielles dans la genèse de ces maladies et comprendre ces mécanismes permet d'envisager de nouvelles cibles thérapeutiques spécifiques. Ainsi, dans l'athérosclérose ou l'artériosclérose du greffon en allotransplantation, alors que normalement seul un très faible pourcentage (<0,1%) des cellules endothéliales sont apoptotiques, l'apoptose de l'endothélium apparaît comme un élément-clé qui contribue au développement des lésions (7) (8) (64) (65) (66).

L'apoptose des cellules endothéliales associée à l'artériosclérose du greffon et au rejet chronique a été mise en évidence dans plusieurs modèles expérimentaux de transplantation montrant en outre que l'apoptose précède l'épaississement intimal (64) (66) et que l'incidence des lésions est moindre chez les souris invalidées par la perforine ou granzyme B (67) (68) (69). Parmi les mécanismes liant l'apoptose endothéliale à l'artériosclérose du greffon, il y a l'augmentation des propriétés d'adhésion et la perte du contrôle de la coagulation et de la fibrinolyse qui vont favoriser un statut pro-inflammatoire amplifié par le recrutement local des leucocytes. La phagocytose des cellules endothéliales apoptotiques va aussi augmenter la production de TGF $\beta$ . Enfin, l'apoptose des cellules endothéliales va induire la synthèse et l'activation de métalloprotéases conduisant le remaniement de la matrice extracellulaire et le remodelage vasculaire (70) (voir [Figure 6](#)).

**Figure 6.** Mécanismes liant l'apoptose endothéliale à l'artériosclérose du greffon, d'après Cailhier JF *et al.*, 2006.



Les travaux réalisés au cours des dix dernières années, caractérisant, d'une part, les cellules endothéliales circulantes (CEC) (71), et, démontrant, d'autre part, l'existence d'un microchimérisme endothélial post-transplantation (72), apportent d'autres preuves indirectes de l'apoptose des cellules endothéliales du greffon. Ils suggèrent que des mécanismes de réparation succèdent au détachement voire à l'apoptose d'une fraction des cellules endothéliales du greffon. L'identification de nouveaux marqueurs de surface des cellules endothéliales, en particulier de la molécule CD146 (ou S endo-1) (73) (74), et, l'évolution des techniques de tri par cytométrie de flux (75), a permis de mettre en évidence des CEC dans différentes pathologies associées à des atteintes vasculaires telles que les infections à *Rickettsia* (76), le choc septique, les infections à Herpes virus, mais aussi dans les vascularites à anticorps anti-cytoplasme des polynucléaires neutrophiles (ANCA) et le rejet de greffe en Transplantation rénale (77) (78). Le phénotype et la viabilité post-isolement des CEC dans les différents modèles demeurent mal caractérisés, et, selon les études et les modèles, les CEC sont activées (79) ou apoptotiques (80). Néanmoins, les études distinguent clairement les CEC des progéniteurs de cellules endothéliales (EPC). Les CEC dérivent de l'endothélium mature alors que les EPC sont issus de la moëlle osseuse. Ainsi, les marqueurs spécifiques des EPC sont le CD34 et le VEGF-R2 (ou KDR/Flk-1) ; les EPC sont aussi c-kit (CD107)+, FGF-R+ et CD133+. Les différentes études s'accordent pour considérer l'élévation du nombre de CEC comme la signature d'une dysfonction des cellules endothéliales.

#### **1.1.4. Survie et Prolifération des Cellules Endothéliales : mécanismes et importance en Transplantation.**

L'angiogénèse, ou la formation de nouveaux vaisseaux à partir du réseau vasculaire existant, est essentielle dans la régénération tissulaire et dans les phénomènes de cicatrisation. L'angiogénèse est aussi impliquée dans la croissance des tumeurs et la formation de métastases. Le temps de renouvellement normal des cellules endothéliales quiescentes est estimé entre 2 ans et demi et 3 ans. Toutefois, au cours de l'angiogénèse, les cellules endothéliales des capillaires peuvent se diviser tous les 5 jours. Le terme de « vasculogénèse » se réfère au développement chez l'embryon du système vasculaire au cours duquel les cellules endothéliales se divisent, se différencient et s'organisent en tubules. Angiogénèse et

vasculogénèse sont toutes deux initiées et régulées essentiellement par des facteurs de croissance spécifiques des cellules endothéliales, les VEGF ou « Vascular Endothelial Growth Factors ». La spécificité du VEGF pour l'endothélium résulte de l'expression quasi-exclusive de ses récepteurs à la surface des cellules endothéliales.

Les mécanismes impliqués dans la prolifération des cellules endothéliales en réponse aux facteurs de croissance (VEGF et bFGF) sont bien caractérisés (pour revue, voir (81)). Des études récentes suggèrent également un rôle du VEGF dans le rejet de greffe (82). Tout d'abord Reinders *et al.* ont mis en évidence une corrélation entre l'expression du VEGF dans les biopsies et la présence d'un infiltrat cellulaire composé de lymphocyte T CD3<sup>+</sup> et de monocytes/macrophages CD68<sup>+</sup> dans les greffes cardiaques. Dans cette étude, la présence de VEGF est aussi clairement associée au rejet de greffe (83). *In vitro*, la culture de cellules endothéliales humaines en présence de VEGF induit l'expression des molécules chémoattractantes IL-8, MCP-1 et IP-10 (83) impliquées dans l'adhérence des leucocytes à l'endothélium. La réduction de l'infiltrat leucocytaire et une inhibition significative du rejet sont obtenus par des anticorps anti-VEGF dans un modèle de greffe cardiaque allogénique chez la souris (83). Dans ce modèle expérimental, le blocage des deux récepteurs VEGF-R1 et VEGF-R2 semble nécessaire (84). La voie de signalisation majoritairement impliquée dans la prolifération des CE en réponse au VEGF est la voie de la phosphatidyl inositol 3-kinase (PI3-K) (85). Les PI3-Kinases forment à une famille d'enzymes qui phosphorylent les lipides inositols des membranes en position 3 du groupe inositol. Les PI3-Kinases phosphorylent spécifiquement deux substrats: les phosphatidylinositol (4) phosphates (ou PI4P) et les phosphatidylinositol (4,5) bisphosphates (ou PIP2) générant ainsi des phosphatidylinositol (3,4) bisphosphates (PI3,4-P2) et des phosphatidylinositol (3,4,5) trisphosphates (ou PIP3). Les phosphatidylinositols PI3,4-P2 et PI3,4,5-P3 sont absents à l'état normal dans les cellules quiescentes ; ils apparaissent en réponse à un stimulus extracellulaire et sont rapidement dégradés par des phosphatases. PTEN est une phosphatase spécifique des phosphoinositides qui régule négativement l'activité des PI3-Kinases.

La protéine PI3-K est constituée de deux sous-unités: une sous-unité régulatrice, p85 $\alpha$  qui contient un domaine SH3 et deux domaines SH2 et une sous-unité catalytique p110 $\alpha$  à activité kinase. La PI3-K est recrutée au niveau du récepteur via les domaines SH2 de p85. La sous-unité p85 s'associe à des tyrosines phosphorylées du récepteur au niveau d'un motif consensus p-Y-X-X-M. Par son activité lipide kinase, la PI3-K entraîne la phosphorylation et l'activation de Akt/PKB, une sérine/thréonine kinase. L'activation maximale de Akt se fait par

la double phosphorylation des résidus thréonine Thr308 et sérine Ser473 par deux kinases différentes appelées PDK1 et 2 (« Phosphatidyl inositol Dependent Kinase »). Akt sous forme activée phosphoryle de nombreux substrats cytoplasmiques qui sont impliqués dans les mécanismes de la prolifération et la survie cellulaire de différentes façons incluant (pour revue voir (85)):

- la régulation des gènes de la famille Bcl2 ou des caspases via des phosphorylations directes (phosphorylation de Bad, de la caspase 9).
- la régulation transcriptionnelle de gènes impliqués dans la survie cellulaire via l'activation de NF- $\kappa$ B et l'inactivation de la « glycogène synthase kinase 3  $\beta$  » (GSK3 $\beta$ ).
- l'inhibition de gènes pro-apoptotiques via la phosphorylation de facteurs de transcription séquestrés dans le cytoplasme.

Dans certaines proliférations tumorales, la diminution de l'apoptose est un événement important qui détermine une prolifération cellulaire incontrôlée. Les voies induisant l'apoptose et la prolifération sont donc intriquées, et, contrôlent l'expression ainsi que l'activité des protéines pro- et anti-apoptotiques impliquées dans la survie cellulaire.

Parmi ces molécules, on trouve les molécules anti-apoptotiques de la famille Bcl2 qui contiennent quatre domaines appelés BH (pour « Bcl2 Homology domain ») (BH1 à BH4) correspondant à des hélices  $\alpha$  et essentiels aux fonctions anti-apoptotiques de Bcl2. Le domaine BH4, spécifique des molécules anti-apoptotiques, n'est pas retrouvé dans les molécules pro-apoptotiques. Les membres de la famille Bcl2 ont la capacité de former des homodimères ou des hétérodimères, et, c'est le rapport entre le niveau des protéines pro- et anti-apoptotiques qui semble déterminer la sensibilité de la cellule à l'apoptose. Bcl2 et certaines protéines de cette famille (Bcl-X<sub>L</sub> par exemple) sont localisées sur les membranes externes de la mitochondrie, du noyau et du réticulum endoplasmique. Elles joueraient le rôle de canaux ioniques régulant ainsi le flux calcique et la libération du cytochrome c de la mitochondrie. Bcl2 et Bcl-X<sub>L</sub> exercent leur effet anti-apoptotique en partie en se liant à Bax, une molécule pro-apoptotique via leurs domaines BH1, BH2, BH3. Cette interaction empêche la libération du cytochrome c et l'activation du complexe caspase 9- APAF-1.

Par ailleurs, il existe, à côté de la voie PI3-K, une autre voie importante : celle des MAP (« Mitogen Activated Protein ») kinases (MAPK). Cette voie est activée au cours de l'activation des cellules endothéliales par le TNF et elle participe à la régulation de l'inflammation et de la prolifération des cellules endothéliales. La voie des MAPK comprend



## 1.2. Transplantation et Endothelium.

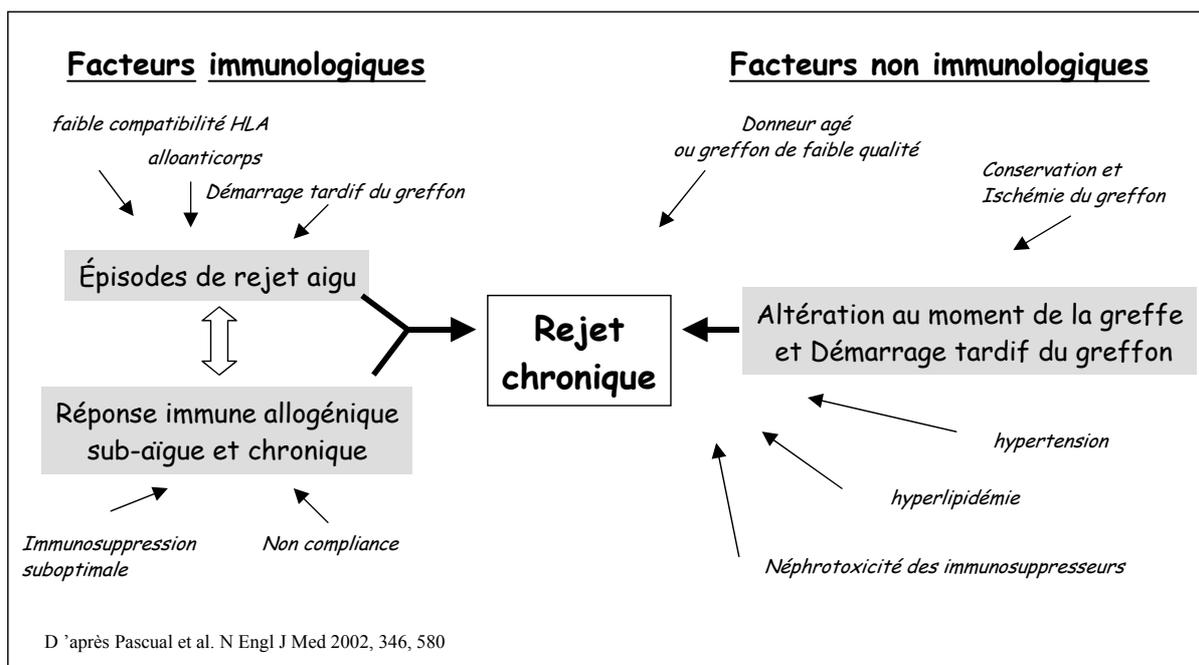
Les cellules endothéliales forment une barrière cellulaire entre le sang et les tissus qui assure le contrôle du tonus et de la perméabilité vasculaire, la coagulation et le trafic leucocytaire et leur activation est impliquée dans de nombreuses pathologies inflammatoires et maladies autoimmunes. Lors d'une Transplantation d'organes vascularisés (rein, coeur, foie, poumon, pancréas), les cellules endothéliales du greffon constituent une interface cellulaire entre l'organe greffé et le patient transplanté. Par conséquent, au delà de leur activité régulatrice conventionnelle, elles participent aussi par l'expression des molécules du CMH du donneur et de certaines molécules de costimulation, à la réponse immune du receveur (92). Il est désormais clairement établi que les cellules endothéliales participent aux différents types de rejets : vasculaire aigu, aigu cellulaire et dysfonction chronique du greffon (ou rejet chronique). Le rôle de l'endothélium est tout particulièrement important dans la physiopathologie du rejet chronique, principale cause de perte du greffon, au delà de la première année, en allotransplantation (93) (94).

### 1.2.1. Endothélium du Greffon : cible et acteur du rejet.

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). Cette amélioration progressive reflète en grande partie les progrès réalisés pendant la première année de transplantation concernant les techniques chirurgicales, la prévention des infections, le suivi médical et surtout les traitements immunosuppresseurs. 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 caractérisé 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 sont schématisés dans la Figure 8, ils comprennent à la fois des facteurs immunologiques et non-immunologiques (pour revues, voir (94) (95) (96)). 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 préudent, si cette réponse n'est pas freinée, à la migration de cellules musculaires lisses de la média vers l'intima et à leur prolifération, et à un remodelage de la paroi artérielle dont l'évolution se fait vers l'obstruction vasculaire.

**Figure 8:** Effecteurs immuns et non immuns du rejet chronique en Transplantation.



### 1.2.2. Alloanticorps et Endothélium du Greffon : du rejet à l'accommodation.

Au cours des dernières décades, les lymphocytes T régulateurs (CD4+ et CD8+T) et effecteurs (CD8+ CTL) ont été au centre des mécanismes du rejet de greffe, en raison notamment de l'absence de rejet observée après déplétion des lymphocytes T dans différents modèles animaux et en clinique (97). Par conséquent, la plupart des traitements immunosuppresseurs actuels pour prévenir ou traiter le rejet (anticorps anti-T, inhibiteurs de la calcineurine, mycophénolate mofétil, rapamycine, corticostéroïdes) cible les fonctions des cellules T. Ces traitements ont permis d'augmenter la survie des greffes à court terme pour obtenir jusqu'à 88-95% de survie à 1 an pour les allogreffes rénales et cardiaques. Néanmoins, bien que moins fréquents, les épisodes de rejet aigu subsistent. De plus, cette amélioration des survies à court terme ne s'accompagne pas d'une amélioration aussi significative des survies à long terme, et la dysfonction chronique du greffon demeure la principale perte du greffon au delà de la première année, post-transplantation (pour revues, voir (93) (94) (97)).

Bien que les anticorps alloréactifs soient depuis longtemps identifiés comme des médiateurs du rejet, plusieurs études récentes ont réévalué leur contribution et suggèrent que les anticorps sont impliqués dans une fraction des épisodes de rejet aigu faisant émerger le concept récent de rejet aigu dépendant des anticorps (AAMR ou « Acute Antibody-Mediated Rejection ») appelé aussi rejet aigu humoral (98) (et pour revue, voir (99)). De plus, les anticorps alloréactifs sont aussi désormais associés à la dysfonction chronique du greffon (93) (100) (101). Une étude portant sur 139 transplantés rénaux a montré que 100% des patients présentant une dysfonction chronique du greffon possédaient des anticorps dirigés contre le CMH ou anticorps anti-HLA (« Human Leucocyte Antigen ») avant le rejet alors que ces anticorps sont présent chez seulement 27% des patients avec un greffon stable (101).

La réponse humorale est initiée par l'interaction des cellules B immatures avec l'antigène via le BCR ; cette interaction enclenche d'une part l'internalisation de l'antigène et l'activation de voies de signalisation. Après internalisation, l'antigène est dégradé et présenté sous forme de peptides par le CMH de classe II. L'interaction du complexe CMH

de classe II/peptide avec le TCR (« T Cell Receptor ») approprié en présence de CD40/CD40L et B7h/ICOS produit l'activation de la cellule B et la production d'anticorps. La costimulation par CD40/CD40L et B7h/ICOS est essentielle pour induire la réponse humorale et le blocage spécifique de ces voies de costimulation a permis d'inhiber le rejet aigu ainsi que le rejet chronique dans des modèles expérimentaux (102). Cependant, l'effet du blocage de ces voies sur la production d'alloanticorps reste controversée pour CD40/CD40L alors que les approches bloquant sélectivement ICOS ou CD28/CTLA4 semblent efficaces.

L'utilisation de modèles animaux utilisant des souris KO ou mutantes (nude, RAG1, SCID) a permis de montrer l'importance des cellules CD8<sup>+</sup> T et B comme cellules effectrices du rejet chronique mais également leur dépendance vis-à-vis de la réponse CD4<sup>+</sup>T (103). Chez la souris SCID (déficiente en cellules B et T), l'allogreffe cardiaque n'entraîne pas de rejet mais l'injection d'anticorps anti-donneur provoque l'artériopathie du greffon (104). De façon intéressante et nouvelle, les travaux de Thauinat *et al.* montrent l'organisation de l'infiltrat cellulaire présent dans l'adventice de greffes d'aorte comme un organe lymphoïde secondaire, capable de produire des alloanticorps (105). Confirmée chez l'homme, cette étude est, à notre connaissance, la première démonstration d'une néogénèse lymphoïde au sein du greffon.

La conséquence de ce regain d'intérêt pour la réponse humorale est l'évaluation de nouvelles stratégies thérapeutiques visant le blocage de la réponse B combinant l'usage d'immunoglobulines intra-veineuses et/ou de plasmaphérèses associées à l'anticorps anti-CD20.

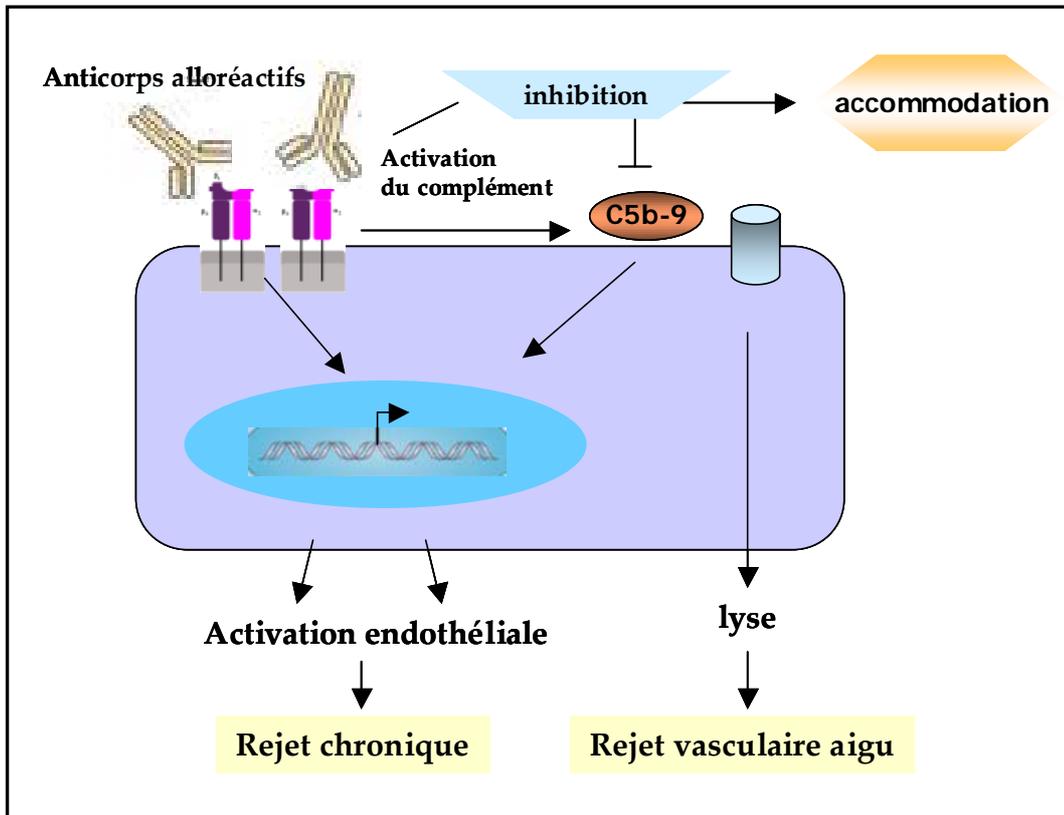
Dans sa « Théorie Humorale de la Transplantation » publiée en 2003 (106) et actualisée en 2005 (107), Paul Terasaki présente une analyse des études cliniques démontrant l'importance des alloanticorps dans le rejet de greffes et propose un meilleur suivi de la réponse anticorps allospécifique et une immunothérapie ciblant cette réponse pour prolonger la survie des transplantations. Dans cette étude, Terasaki souligne également les points restant à analyser qui incluent 1) définir les isotypes des alloanticorps, 2) déterminer et caractériser les anticorps non HLA, 3) définir le rôle du HLA soluble (sHLA) et enfin, 4) caractériser le ou les modes d'action des alloanticorps et en particulier les conséquences de leur interaction avec l'endothélium du greffon.

En effet, par l'expression des molécules du HLA de classe I et de classe II, les cellules endothéliales du greffon sont la première cible cellulaire des anticorps allospécifiques

préformés ou induits post-transplantation. Les mécanismes résultants de cette interaction sont multiples et leurs implications dans les différents types de rejet ne sont pas encore clairement établis (99) (108). La conséquence la plus « classique » est l'activation de la voie classique d'activation du complément aboutissant à la formation du complexe d'attaque membranaire (MAC pour « Membrane Attack Complex » ou C5b-9) qui va provoquer la lyse des cellules endothéliales et la destruction de l'endothélium qui selon l'intensité, la fréquence du signal et la cinétique d'apparition des anticorps va être associée au rejet vasculaire suraigu ou aigu et au rejet chronique (voir [Figure 9](#)). En effet, une activation sub-lytique du complément et/ou la signalisation induite directement par la liaison des molécules du HLA, vont produire une activation des cellules endothéliales capable de moduler les propriétés et fonctions des cellules endothéliales, en particulier l'apoptose et la prolifération (66) (109) (110) (111) (112). Par ailleurs, dans certaines circonstances et lorsque l'activation du complément est inhibée de façon transitoire, l'interaction des anticorps avec l'endothélium induit l'expression de molécules anti-apoptotiques dites « protectrices » (48) qui permettent la survie du greffon selon un phénomène dit d'« accommodation ». La nature des anticorps et des signaux responsables de l'accommodation ne sont pas connus.

La diversité de la réponse immune cellulaire dirigée contre le greffon contribue aussi au rejet chronique, ce qui sous-entend que l'agression permanente initiée par les lymphocytes T réactifs contre les peptides allogéniques provoque l'artériopathie spécifique du rejet chronique en allotransplantation (94) (113) (114). Ces cellules T activent/coopèrent avec les monocytes/macrophages pour induire les réactions de type hypersensibilité retardée et avec les lymphocytes B pour produire des alloanticorps spécifiques du donneur. De plus, ils sécrètent les cytokines et chimiokines nécessaires à l'activation des cellules endothéliales et des cellules musculaires lisses aussi bien qu'à l'invasion des cellules mononucléées dans le greffon, le tout amplifiant les lésions chroniques de rejet.

Figure 9. Conséquences de l'interaction des anticorps alloréactifs et de l'endothélium en transplantation d'après Colvin et Smith, 2005.



### 1.3. Objectifs du projet de recherche.

Le but de ce travail de doctorat était de mieux caractériser les conséquences des interactions humorales allospécifiques avec les cellules endothéliales vasculaires humaines dans un contexte de Transplantation d'organes vascularisés. Ce projet de recherche a été développé au sein de l'équipe 7 de l'Unité INSERM U643, dont la thématique est « L'étude des effecteurs et mécanismes de l'activation des cellules endothéliales en Transplantation », et, à laquelle je participe depuis mon DEA. Pour ce projet, nous avons utilisé la collection de cultures primaires de cellules endothéliales vasculaires de type artériel issues de donneurs d'organes (HAEC) développée par notre équipe depuis 3 ans. Cette collection comporte à ce jour, plus de 30 cultures primaires de cellules endothéliales et 12 cultures primaires de cellules musculaires lisses, ces cultures sont typées en HLA (classe I et classe II) et ont été caractérisées, par cytométrie de flux, par l'expression de différents marqueurs endothéliaux dont CD31 et CD146 et par leur capacité à répondre au  $TNF\alpha$  et à l' $IFN\gamma$ . Ces cultures primaires sont utilisées entre le passage 2 et le passage 6. Principalement, le travail de recherche présenté dans ce manuscrit a été élaboré à partir de trois séries d'observations. Premièrement, les travaux initiaux portant sur la signalisation par le CMH de classe I, et, plus récemment ceux de E. Reed et collaborateurs (UCLA, Los Angeles, USA) qui montraient un rôle des anticorps anti-HLA de classe I dans la signalisation des cellules endothéliales. Deuxièmement, les travaux, principalement issus du groupe de N. Mooney et D. Charron (Hôpital Saint-Louis, Paris), qui ont analysé de façon très précise la signalisation et les conséquences fonctionnelles pour les lymphocytes B et cellules présentatrices d'antigènes (APC) de la liaison aux molécules du HLA de classe II suggérant que ces interactions pouvaient également affecter les cellules endothéliales. Finalement, les travaux de plusieurs équipes montrant l'expression par l'endothélium de molécules de HLA de classe I non classique, et, en particulier, MICA (« MHC class I related-Chain A ») et son rôle en Transplantation (S. Sumitran-Holgersson, Karolinska Institut, Stockholm, Suède). À partir de ces résultats, les objectifs suivants ont été fixés :

1- Développer une étude d'analyse de l'expression des gènes par la technique de RT-PCR différentielle visant à identifier des molécules régulées de façon spécifique par les cellules endothéliales en réponse à la liaison des molécules du HLA de classe I.

2- Comprendre le rôle de la GTPase RhoA dans la dysfonction endothéliale et évaluer le rôle des statines.

3- Déterminer l'effet de la liaison des molécules du HLA de classe II par les alloanticorps à la surface des cellules endothéliales et le comparer à celui obtenu dans les lymphocytes B.

4- Analyser l'expression par les cellules endothéliales humaines d'autres molécules HLA et en particulier caractériser l'expression et la régulation endothéliale de la molécule de classe I non classique, HLA-E.

L'organisation du manuscrit est la suivante :

\*) L'introduction générale représente le chapitre 1 de la thèse.

\*) Le chapitre 2 présente les résultats d'une étude montrant l'implication de RhoA et de la voie de signalisation de la PI3-K dans la prolifération des cellules endothéliales induite par les alloanticorps anti-HLA de classe I ; il comprend l'article 1 précédé d'une introduction et d'un résumé en français

\*) Le chapitre 3 présente les résultats d'une étude montrant que les cellules endothéliales échappent à l'apoptose induite par les alloanticorps anti-HLA-DR ; il comprend l'article 2 précédé d'une introduction et d'un résumé en français.

\*) Le chapitre 4 présente les résultats d'une étude portant sur l'expression de la molécule HLA-E par les cellules endothéliales ; il comprend l'article 3 précédé d'une introduction et d'un résumé en français.

\*) Le chapitre 5 fait état d'une discussion générale sur l'ensemble de ces résultats. Il ouvre également sur l'implication clinique potentielle de ces résultats présentée dans la section conclusion et perspectives.

\*) L'annexe présente ma contribution à d'autres articles scientifiques sous la forme d'une liste de publications. L'annexe présente également une revue que j'ai écrite et qui a été publiée dans *Current Opinion in Organ Transplantation* en 2006.

\*) La bibliographie propre au manuscrit se trouve à la fin de la thèse. Les articles 1, 2 et 3 ont leur propre bibliographie.

**Chapitre 2. Contribution de RhoA et de la voie de la PI3 kinase à la prolifération des cellules endothéliales induite par la liaison du HLA de classe I.**

## 2.1. Introduction.

Il est admis que les anticorps anti-HLA sont capables de créer des lésions du greffon par un mécanisme complément dépendant. Des travaux plus récents suggèrent que ces anticorps sont capables à eux seuls de provoquer l'apoptose sans passer par l'activation du complément. Dans le système immunitaire, l'apoptose induite par les récepteurs membranaires est un mécanisme central pour l'homéostasie des lymphocytes T et B. Les molécules du CMH de classe I sont exprimés largement sur presque toutes les cellules nucléées chez l'homme. Le CMH de classe I est formé d'une chaîne lourde de 44kDa polymorphique liée de manière non covalente à une chaîne de 12kDa invariante, la  $\beta$ 2microglobuline. Le CMH de classe I joue un rôle majeur dans le système immunitaire des vertébrés, étant la molécule responsable de la présentation de peptides spécifiques du non-soi restreinte aux cellules T CD8+. L'activation des cellules T par les molécules du CMH de classe I initie une cascade de modifications biochimiques qui aboutissent soit à l'activation et la prolifération soit à l'arrêt du cycle cellulaire et l'apoptose (115) (116) (117) (118) (119). Daniel *et al.* ont démontré récemment qu'en plus de l'anticorps monoclonal de souris anti-HLA monomorphique W6/32, 85 à 96% des 25 anticorps monoclonaux humains testés, dirigés contre des épitopes HLA polymorphiques, indépendamment de leur isotype (IgM ou IgG), étaient capables d'induire l'apoptose des cellules mononucléées du sang périphérique humain au repos et des cellules T lymphoblastiques Jurkat (120). Dans des études précédentes, cet effet pro-apoptotique du W6/32 sur des lignées B lymphoblastoïdes, des cellules T Jurkat, ou des lymphocytes T et B périphériques, n'avait pas été retrouvé, ce qui peut probablement être expliqué par une quantité insuffisante d'anticorps monoclonal (121).

La stimulation des cellules T par le biais des molécules du CMH de classe I initie une cascade biochimique qui mène soit à l'activation et la prolifération, soit à l'arrêt du cycle cellulaire et l'apoptose (115) (116) (122). L'un des événements critiques qui survient rapidement et précocement dans la majorité des cas est l'activation des kinases à tyrosine, aboutissant à la phosphorylation des résidus tyrosine d'une variété de protéines incluant la phospholipase C- $\gamma$ 1 (PLC- $\gamma$ 1), et ZAP70 (117) (123). Associée à cette activation des kinases à tyrosine, il survient une stimulation de la voie phospholipide de l'inositol (avec génération d'inositol triphosphate), qui entraîne une augmentation du calcium intracellulaire et mène à la

production du diacylglycérol d'où activation de la kinase à protéines C. L'équipe de Claesson *et al.* (122) (123) a montré que l'activité kinase à tyrosine apparaît essentielle pour l'inhibition de la prolifération et l'apoptose induite par la liaison des molécules de classe I.

Toutefois, les mécanismes responsables de la mort cellulaire induite par les molécules de classe I ne sont pas encore clairement élucidés.

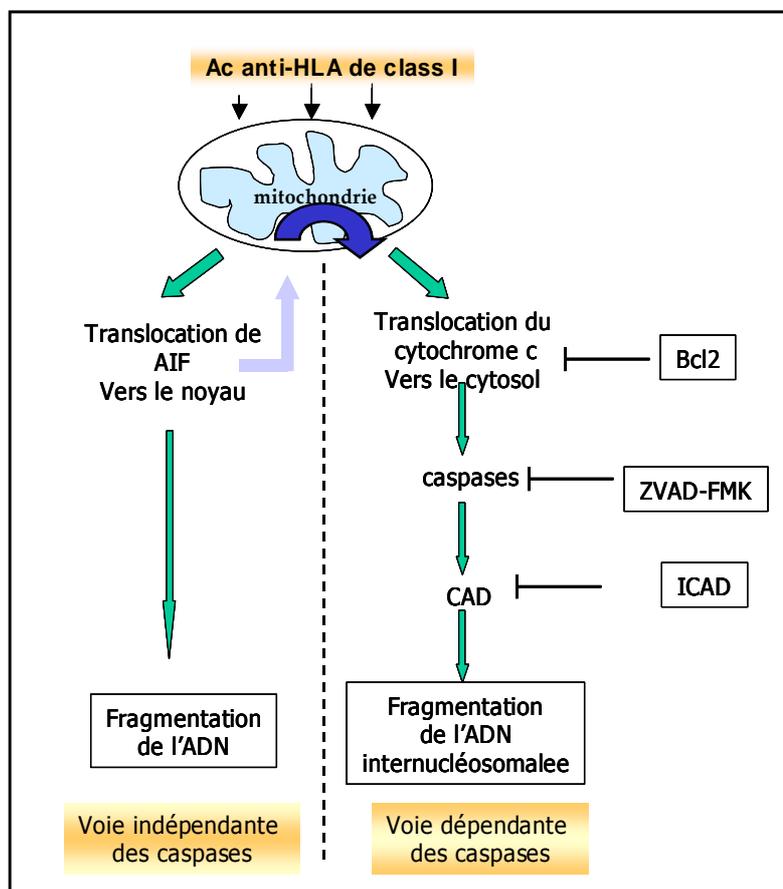
Un mécanisme caractéristique de l'apoptose est l'activation des caspases (cystéine protéases) et le relargage du cytochrome c de l'espace intermembranaire au niveau de la mitochondrie. Une fois dans le cytoplasme, le cytochrome c interagit avec Apaf-1 (« Apoptosis protease activating factor »), d'où son oligomérisation et le recrutement de la pro-caspase 9, qui devient auto-activé dans la structure appelée apoptosome (124). La caspase 9 active par protéolyse des caspases « executioner » comprenant la pro-caspase 3, qui initie la fragmentation de l'ADN en stimulant la « Caspase-Activated DNase » (DFF40/CAD). Celle-ci scinde alors l'ADN en fragments « internucléosomaux » (125). Des inhibiteurs spécifiques des caspases sont capables de bloquer les événements nucléaires et intra-cytoplasmiques de l'apoptose. Toutefois, il est possible d'observer une mort cellulaire en présence d'inhibiteurs « larges » des caspases, tels que Z-VAD-FMK ou BD-FMK, en faveur de l'existence de voies d'apoptose indépendantes des caspases (126). En plus des pro-caspases et des activateurs des caspases, l'espace intermembranaire mitochondrial contient des effecteurs de l'apoptose autres, tels que AIF (« Apoptosis-Inducing Factor »). Contrairement au cytochrome c, qui est relargué dans le cytoplasme et épargne en partie le noyau, AIF passe de l'espace intermembranaire de la mitochondrie via le cytoplasme dans le noyau (127) (128). Son rôle serait d'induire la condensation de la chromatine et la fragmentation de l'ADN en larges bandes/échelles (environ des paires de 50 kb), ce qui a été démontré sur des noyaux purifiés *in vitro* (129).

Des premiers travaux ont montré que l'apoptose induite dans les lymphocytes humains normaux et les cellules tumorales par les anticorps anti-classe I murins ne requiert pas la voie des caspases (117) (120) (121) (130), ce qui est également décrit pour l'apoptose médiée par les molécules HLA de classe II (131) (132) (133). En effet, dans ces travaux, la réponse apoptotique n'est pas affectée significativement par les inhibiteurs irréversibles des caspases, Z-VAD-FMK et Z-DEVD-FMK, et aucune activation directe ni clivage de la pro-caspase 3 n'ont été observés. Toutefois, les résultats concernant la fragmentation internucléosomale de

l'ADN sont plus sujets à controverse, certains en retrouvant, d'autres pas, selon la technique utilisée.

Récemment, Daniel *et al.* (134) ont émis l'hypothèse que l'apoptose médiée par les molécules de classe I est, au moins partiellement, dépendante de la voie des caspases, s'appuyant sur leur observation que les cellules Jurkat traitées par un anticorps humain anti-HLA-A3 présentent dans un tiers à la moitié des cas une fragmentation de l'ADN. Leurs résultats suggèrent l'existence d'au moins deux voies parallèles menant à l'apoptose via le CMH de classe I (voir [Figure 10](#) d'après Daniel, HI, 2004 (134)). Les anticorps anti-HLA déclenchent un processus intra-cellulaire aboutissant à la perméabilisation de la membrane mitochondriale externe et à la libération de AIF. Celui-ci a un effet direct sur le noyau, en produisant une fragmentation de l'ADN en grands fragments. Ce type de fragmentation de l'ADN précède la dégradation de l'ADN en oligonucléosomes dans plusieurs modèles d'apoptose et apparaît indépendant des caspases (135). Bcl-2 inhibe le relargage mitochondrial de AIF mais n'a pas d'effet cytoprotecteur une fois que AIF est dans le cytoplasme (129). Par conséquent, il est vraisemblable que AIF agisse au-delà ou indépendamment de Bcl-2 ou des caspases dans la mort cellulaire. En effet, d'après les travaux de Daniel *et al.*, la sur-expression de Bcl-2 ou les inhibiteurs des caspases ne bloquent pas de manière significative l'apoptose des cellules Jurkat en présence de l'anticorps anti-A3 (134). Dans le même temps, AIF provoque la redistribution du cytochrome c de la mitochondrie vers le cytoplasme. Le cytochrome c entraîne alors l'apoptose du noyau, avec l'aide d'autres molécules, telles que Apaf-1, ATP, et la pro-caspase9, qui ensemble activent la caspase 3 et d'autres caspases, d'où activation de DFF40/CAD et fragmentation internucléosomale. Néanmoins, les contributions relatives des événements caspase dépendants et indépendants survenant hors de la mitochondrie qui sont responsables de la mort cellulaire médiée par le HLA de classe I restent encore à être élucidées clairement.

**Figure 10.** Mécanismes de l'apoptose induite par les anticorps anti-HLA de classe I d'après Daniel *et al.* (2004).



Ces différents travaux suggèrent qu'il existe une voie de transduction du signal particulière aux molécules de classe I pouvant être responsable de mort cellulaire pour ce qui est des lymphocytes T et B. Plus généralement, les molécules du CMH ont la capacité à engager des signaux intracellulaires ayant des effets positifs ou négatifs, et par conséquent, régulant la reconnaissance, l'activation et l'adhésion lymphocytaires. Il est intéressant de noter que les réponses fonctionnelles différentes médiées par les molécules de classe I peuvent dépendre de la spécificité « pure, fine » de l'anticorps monoclonal, de son affinité, du degré de « cross-linking », des événements variés pouvant survenir au niveau de la signalisation cellulaire dépendant des degrés variables de l'agrégation moléculaire et de la dose d'anticorps, ainsi que de l'état d'activation de la cellule. Ainsi, Bregenholt *et al.* ont montré que des concentrations de l'ordre du picogramme (1 à 100) inhibent fortement la

prolifération des cellules T à l'inverse de concentrations de l'ordre du microgramme (122). Enfin, il a été démontré que l'effet pro-apoptique et la liaison des anticorps monoclonaux anti-HLA à la membrane cellulaire augmentait fortement quand les cellules Jurkat étaient prétraitées avec de l'IL-2 et de l'IFN $\gamma$ . Ceci est probablement expliqué par l'augmentation de l'expression transcriptionnelle du CMH dans les cellules tumorales Jurkat par ces cytokines, et, en conséquence, la fixation et l'induction de l'apoptose de manière plus marquée par les anticorps anti-HLA (120). Néanmoins, la plus grande susceptibilité à ce phénomène ne peut pas être seulement une conséquence de l'expression HLA plus importante. En effet, dans une autre étude portant sur les molécules de classe II, plusieurs lignées cellulaires différentes sont aisément tuées alors qu'elles expriment les molécules du HLA à un niveau faible, comparativement à d'autres cellules qui présentent une apoptose minimale malgré un niveau fort d'expression. De plus, la prolifération cellulaire n'est pas apparemment nécessaire, puisque les cellules tumorales arrêtées en mitose restent sensibles à la mort induite par les anticorps (133).

Par conséquent, il apparaît intéressant d'étudier le rôle spécifique des molécules de classe I, en dehors de leur fonction de présentation, dans un contexte d'allogreffe où des anticorps anti-HLA peuvent interagir directement, indépendamment du complément, avec les molécules du CMH de classe I, ceci au niveau des cellules endothéliales, premières cellules du donneur rencontrées au cours de la greffe.

Les travaux de l'équipe de Reed *et al.* montrent que la ligation du HLA de classe I par des anticorps monoclonaux induit dans les cellules endothéliales humaines la phosphorylation sur des résidus tyrosine de protéines intra-cellulaires, la génération d'inositol phosphate et favorise la prolifération endothéliale (109) (136). L'augmentation de la prolifération des cellules endothéliales, mais également des cellules du muscle lisse, en réponse à la ligation du HLA de classe I résulte de l'augmentation de l'expression du récepteur 1 au FGF (« Fibroblast Growth Factor »), ou FGF-R1 (137). La régulation du FGF-R1 révèle un mécanisme spécifique de la ligation du HLA ; en effet, elle n'est pas observée lors d'une activation par le TNF $\alpha$  ou l'IFN $\gamma$ , mais, ces cytokines augmentant fortement l'expression des molécules de classe I par les cellules endothéliales potentialisent par ce mécanisme l'effet des anticorps anti-HLA sur la surexpression du FGF-R1 (137). Par le biais de la surexpression du FGF-R1, les cellules endothéliales deviennent plus sensibles au FGF ce qui stimule la prolifération. L'effet des anticorps dirigés contre le HLA de classe I pourrait passer au moins

en partie par l'activation du facteur de transcription NF- $\kappa$ B, responsable de la régulation rapide et transitoire d'un grand nombre de gènes codant pour des molécules impliquées dans l'inflammation (136). Ces études ont utilisé des anticorps murins monomorphiques ou des fractions IgG humaines dirigés contre des allèles HLA spécifiques, voire des sérums avec une spécificité connue. Dans ce contexte, il convient de noter qu'une étude *in vivo*, réalisée chez le rat, par groupe de Plissonnier et al. a montré que la présence d'anticorps alloréactifs, spécifiques du donneur, induit l'apoptose des cellules vasculaires (cellules endothéliales et cellules musculaires lisses) chez des receveurs alloimmunisés d'une greffe aortique (66). Dans ce modèle, l'apoptose des cellules a également été observée *in vitro* après incubation les sérums allogéniques. Ces résultats suggèrent la spécificité et/ou l'affinité des anticorps, leur cible et leur concentration sérique pourraient influencer la signalisation et les conséquences fonctionnelles de la liaison des molécules du CMH.

De plus, dans une étude plus récente, le groupe d'Elaine Reed a également montré que la liaison du HLA de classe I active les adhésions focales et modifie le cytosquelette d'actine. La phosphorylation de Src, de FAK (« Focal Adhesion Kinase ») ainsi que de la paxilline a été observée en réponse à la fixation d'anticorps anti-HLA de classe I : la phosphorylation et l'activation de Src semblent contrôler à la fois la translocation du récepteur au FGF et la phosphorylation des protéines FAK et paxilline (110). L'ensemble de ces travaux suggèrent que la liaison du HLA de classe I active de multiples voies de signalisation impliquées dans le contrôle de la prolifération, mais aussi, l'adhésion et la migration des cellules endothéliales et renforce donc, en particulier, l'impact potentiel de ces mécanismes dans l'initiation et la progression de l'artériosclérose du greffon (pour revue, voir (108)).

## 2.2. Résultats.

Les alloanticorps dirigés contre les antigènes du HLA du donneur contribuent à la dysfonction chronique du greffon en participant au mécanisme de rejet aigu, facteur de risque majeur pour la survie du greffon. Ce premier rôle est complété par leur capacité à induire des modifications fonctionnelles de l'endothélium du greffon après fixation sur les molécules du HLA de classe I exprimées par les cellules endothéliales, et en particulier, à favoriser la prolifération des cellules endothéliales vasculaires, comme cela a été montré par plusieurs études récentes.

Lors d'une première étude utilisant la technique de « RNA differential display » RT-PCR, nous avons observé une forte augmentation des transcrits pour la « GTP binding » protéine RhoA dans les cellules endothéliales humaines en réponse à la fixation des anticorps anti-HLA de classe I. RhoA appartient à la famille des petites protéines liant le GTP et est impliqué dans la signalisation, l'organisation du cytosquelette, la régulation du cycle cellulaire, la prolifération et l'apoptose (138) (139) (140) (141) (142).

### 2.2.1. Résumé de l'article 1.

Cette étude montre l'activation de RhoA consécutive à la liaison du HLA de classe I à la surface des cellules endothéliales vasculaires humaines par la mise en évidence de la translocation de RhoA du cytoplasme à la membrane, par la technique dite de « pull down assay » et microscopie confocale. De plus, nous avons relié l'activation de RhoA, et sa translocation dans les cellules traitées, à une réorganisation du cytosquelette et à l'apparition de fibres de stress d'actine.

Secondairement, nous avons démontré par Western blot que l'activation de RhoA résultant de la fixation des alloanticorps induit l'activation de la voie de signalisation de la PI3-K) qui se traduit par la phosphorylation et l'activation de la kinase Akt. Dans ce modèle, l'activation d'Akt aboutit à la phosphorylation de la kinase GSK3 $\beta$  et à une augmentation de l'expression de PTEN. L'inhibition spécifique de la phosphorylation des kinases Akt et GSK3 $\beta$  par l'utilisation d'un inhibiteur de RhoA (C3 exoenzyme de *Clostridium botulinum*) suggère fortement que, dans ce modèle, RhoA contrôle l'activation de la voie PI3-K. Pour

relier l'activation de RhoA et de la PI3-K à un effet fonctionnel des anticorps anti-HLA, nous avons développé une nouvelle technique d'étude de la prolifération des cellules endothéliales reposant sur l'utilisation du 5, 6-carboxyfluorescéine diacétate succinimidyl ester (CFSE). Ce marqueur fluorescent permet après lecture en cytométrie de flux et analyse des résultats, au moyen du logiciel « ModFitLT », une quantification précise de la progression du cycle cellulaire et de la prolifération. Bien que très utilisé pour l'étude de la prolifération lymphocytaire *in vitro* et *in vivo*, l'utilisation du CFSE pour l'étude de la prolifération des cellules endothéliales n'a pas été décrite à ce jour. Dans un premier temps, nous avons comparé les résultats obtenus par cette méthode à ceux classiquement obtenus par incorporation de thymidine tritiée en utilisant comme conditions contrôle des cellules endothéliales traitées par du FGF2. La mise au point de cette méthode nous a permis de montrer un net effet prolifératif des anticorps anti-HLA, qu'ils soient dirigés contre un épitope polymorphe (HLA-A2) ou monomorphe (HLA-A,B,C). L'effet de ces anticorps se traduit par un index de prolifération accru ainsi que par un pourcentage plus important de cellules dans les dernières générations. Ce test de prolifération nous a également permis de confirmer que RhoA joue un rôle central dans le mécanisme conduisant à la prolifération endothéliale puisque son blocage à l'aide de la C3 exoenzyme abolit cet effet fonctionnel des anticorps anti-HLA. Nous avons également observé la contribution majeure de la PI3-K puisque son inhibition par le LY294002 ou la wortmannine prévient, de façon similaire au blocage de RhoA, la prolifération des cellules endothéliales. De plus, la prolifération endothéliale consécutive à l'activation de RhoA et de la PI3-K peut être efficacement inhibée par une statine, la simvastatine, utilisée à des doses thérapeutiques (0.1µM). L'inhibition de l'isoprénylation, modification post-traductionnelle des protéines, est le mécanisme central du mode d'action de ces molécules. C'est par ce mécanisme que les statines exercent leur effet inhibiteur sur RhoA (141). Notre étude montre que l'effet inhibiteur de la simvastatine sur la prolifération des cellules endothéliales obtenue par les alloanticorps est annulé par l'addition de géranylgeranylpyrophosphate, mais pas par l'addition de farnésylpyrophosphate, ce qui indique que la prolifération endothéliale requiert la géranylgeranylation de RhoA et souligne son rôle central dans ce mécanisme à médiation « immunitaire » de la prolifération endothéliale.

L'ensemble de ces résultats est présenté dans l'**article 1**.

### 2.2.2. Article 1.

Coupel Stéphanie, Le Bœuf Fabrice, Boulday Gwénola, Soulillou Jean-Paul and Charreau Béatrice.

RhoA Activation Mediates PI3-Kinase-dependent Proliferation of Human Vascular Endothelial Cells : An Alloimmune Mechanism of Chronic Allograft Nephropathy.

*The Journal of the American Society of Nephrology* (2004) 15: 2429-2439.

# RhoA Activation Mediates Phosphatidylinositol 3-Kinase–Dependent Proliferation of Human Vascular Endothelial Cells: An Alloimmune Mechanism of Chronic Allograft Nephropathy

STÉPHANIE COUPEL, FABRICE LEBOEUF, GWÉNOLA BOULDAY, JEAN-PAUL SOULILLOU, and BÉATRICE CHARREAU

*Institut National de la Santé Et de la Recherche Médicale Unité 643 “Immunointervention en Allo et Xénotransplantation” and Institut de Transplantation et de Recherche en Transplantation, C.H.U. Hôtel-Dieu, Nantes, France*

**Abstract.** HLA class I ligation on graft endothelial cells (EC) has been shown to promote graft arteriosclerosis and chronic allograft nephropathy. This study investigated transcriptional and functional changes mediated by anti-HLA antibodies (Ab), developed by transplant recipient, on vascular renal EC. For mimicking interactions that occur between alloantibodies and graft endothelium, HLA-typed primary cultures of human EC were incubated *in vitro* in the presence of monomorphic or polymorphic anti-HLA class I Ab. Gene expression analysis identified the upregulation of several molecules involved in cell signaling and proliferation, including the GTP-binding protein RhoA. It was demonstrated further that HLA class I ligation on EC induced a rapid translocation of RhoA to the cell membrane associated with F-actin stress fiber formation and cytoskeleton reorganization. Western blot analysis showed that anti-HLA class I Ab induced, in addition to RhoA, the

activation of phosphatidylinositol 3-kinase, reflected by the phosphorylation of Akt (Ser473) and GSK3 $\beta$  (Ser9), in EC. C3 exoenzyme, an inhibitor of RhoA, inhibited RhoA translocation in response to HLA class I ligation and reduced phosphatidylinositol 3-kinase activation. EC proliferation and cell cycle progression, examined by 5,6-carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester staining, demonstrated that anti-HLA-induced EC proliferation was efficiently prevented by the 3-hydroxy-3-methylglutaryl CoA reductase inhibitor simvastatin (0.1  $\mu$ mol/L) through inhibition of RhoA geranylgeranylation. Taken together, these findings support the conclusion that RhoA is a key mediator of signaling pathways that lead to cytoskeletal reorganization and EC proliferation in response to alloantibodies that bind to HLA class I and demonstrate the specific and potent inhibitory effect of simvastatin on allostimulated EC growth.

Chronic allograft nephropathy is the major factor limiting long-term survival of renal allografts (1,2). The hallmark of chronic allograft nephropathy is transplant arteriosclerosis, which is characterized by the intimal proliferation of endothelial cells (EC), smooth muscle cells (SMC), and fibroblasts, leading to vessel obstruction and ischemia that causes late graft failure (3). Several risk factors have been identified, including both immune injury to transplant vessels and nonimmunological factors (*e.g.*, ischemia/reperfusion, hypertension, hyperlipidemia). The immunologic mechanisms that induce chronic allograft nephropathy are poorly understood, but it is suspected that the associated vascular changes are a result of early injury to the endothelium of the graft mediated by allogeneic T cells

and anti-HLA alloantibodies (2). The incidence of transplant arteriosclerosis is increased in transplant recipients who produce anti-donor HLA antibodies (Ab) after transplantation, suggesting that anti-HLA Ab play a role in the pathogenesis of the disease (4,5). In previous studies, it has been shown that anti-HLA Ab, developed by transplant recipients after transplantation, are capable of transducing signals *via* HLA class I molecules, which stimulate cell proliferation (6). Furthermore, ligation of class I molecules with Ab also results in increased tyrosine phosphorylation of several intracellular proteins on EC (7,8). Treatment of cells with IFN- $\gamma$  and TNF- $\alpha$  upregulated MHC class I expression and potentiated anti-HLA Ab-mediated proliferative responses (9). These findings support a role for anti-HLA Ab in the transduction of proliferative signals, which stimulate the development of intimal hyperplasia associated with chronic allograft nephropathy and renal transplant loss.

We previously demonstrated that natural, preformed, anti-donor Ab mediated changes in EC gene expression according to their specificity (10,11). In the present study, we investigated the effect of HLA class I ligation mediated by anti-HLA Ab on endothelial gene expression. Primary cultures of HLA-

Received June 25, 2003. Accepted June 2, 2004.

Correspondence to Dr. Béatrice Charreau, 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: charreau@nantes.inserm.fr

1046-6673/1509-2429

Journal of the American Society of Nephrology

Copyright © 2004 by the American Society of Nephrology

DOI: 10.1097/01.ASN.0000138237.42675.45

typed human vascular EC, isolated from cadaveric transplant donors, were incubated with anti-HLA mAb directed to either monomorphic or polymorphic HLA class I regions. RNA differential display reverse transcription-PCR (RT-PCR) was used to compare gene expression between resting and anti-HLA-treated EC and to identify genes and molecular mechanisms upregulated upon HLA class I ligation. Among the candidate genes found to be overexpressed, several cell-cycle regulators were identified, including the GTP-binding protein RhoA. These changes in transcription suggested that anti-HLA class I Ab could trigger EC proliferation *via* a Rho-dependent pathway. Thus, our study further examined the implication of RhoA protein in signaling pathways that lead to EC proliferation and transplant arteriosclerosis. The fluorescent dye 5,6-carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester (CFSE) has been used to monitor EC division and proliferation and therefore was used to demonstrate that control of Rho GTPase activation could modulate EC proliferation.

## Materials and Methods

### Reagents

Simvastatin was supplied by Merck, Sharp & Dohme. Thrombin, inhibitors of phosphatidylinositol 3-kinase (PI3-K) LY294002 and wortmannin, and isoprenoid compounds farnesyl pyrophosphate (FPP) and geranylgeranyl pyrophosphate (GGPP) were obtained from Sigma-Aldrich (Saint Quentin Fallavier, France). *Clostridium botulinum* C3 exoenzyme was purchased from Biomol Research Laboratories (Plymouth, PA). Basic fibroblast growth factor (bFGF) was from R&D Systems (Abingdon, UK).

### Primary EC Isolation and Culture

Human arterial EC were isolated from renal artery patches taken before kidney transplantation, as described previously (12). EC were grown in Endothelial Cell Growth Medium (ECGM) supplemented with 10% FCS, 0.004 ml/ml ECGS/Heparin, 0.1 ng/ml human EGF, 1 ng/ml human bFGF, 1  $\mu$ g/ml hydrocortisone, 50  $\mu$ g/ml gentamicin, and 50 ng/ml amphotericin B (C-22010; PromoCell, Heidelberg, Germany) at 37°C in a humidified 5% CO<sub>2</sub> atmosphere.

### Gene Expression Analysis

**RNA Differential Display RT-PCR.** EC were incubated for 2 h at 37°C in medium that contained 100 U/ml recombinant human TNF- $\alpha$  (provided by Prof. Müller Neuman, Ludwigshafen, Germany) or 10  $\mu$ g/ml anti-HLA class I mAb. Treatment of EC was performed using either monomorphic (anti-HLA-A,B,C mAb:W6/32, IgG2a) or polymorphic (anti-HLA-A2, anti-HLA-B51, and anti-HLA-Bw4) anti-HLA class I purified Ab (OneLambda, Canoga Park, CA). EC that were incubated with isotypic control mouse IgG1 or IgG2a (10  $\mu$ g/ml; Sigma-Aldrich) or medium alone were used as controls.

RNA isolation and RNA differential display RT-PCR were performed as described previously (10) using the RNA image kit (GenHunter, Brookline, MA). Selection, cloning, and sequencing of cDNA fragments and bioinformatic analysis were performed as previously reported (11,13).

**Quantitative Real-Time RT-PCR.** The ABI PRISM 7700 sequence detection application program (PE Applied Biosystems, Foster City, CA) was used to measure fluorescence emitted during PCR amplification of targeted sequences in a 96-well reaction plate. Real-time detection of PCR products was monitored by measuring the

increase in fluorescence caused by the binding of SYBR Green (PE Applied Biosystems) to DNA. A standard curve using serial dilutions of the purified target sequence (10<sup>7</sup>, 10<sup>6</sup>, 10<sup>5</sup>, 10<sup>4</sup>, 10<sup>3</sup>, and 10<sup>2</sup> copies/well) allowed quantification. Normalization was obtained by the concomitant quantification of hypoxanthine-guanine phosphoribosyl transferase transcripts in each sample. Each sample was analyzed in duplicate.

Oligonucleotide primers pairs for hypoxanthine-guanine phosphoribosyl transferase (sense, 5'-TGGAAAAGCAAAATACAAAGCC-3'; antisense, 5'-CATGCAAAAAGGTCTACTAAGCAG-3') and for RhoA (sense, 5'-TTAGTCCACGGTCTGGTCTTCA-3'; antisense, 5'-TATGAGCAAGCATGTCTTTCCA-3') generated PCR products of 140 and 177 bp, respectively.

**Semiquantitative RT-PCR.** Primer pairs were as follows: RhoA (sense, 5'-CAGTCCCAGAGGTGTATGT-3'; antisense, 5'-AGACAAGGCAACCAGATTTT-3') and  $\beta$ -actin (sense, 5'-AATCTGGCACCACACCTTCTACA-3'; antisense, 5'-CGACGTAGCACAGCTTCTCCTTA-3'). The PCR conditions were 18 cycles for  $\beta$ -actin and for RhoA, at a denaturation temperature of 94°C for 30 s, annealing at 60°C for 30 s, and extension at 72°C for 30 s. PCR products were run on 1.2% agarose gels and stained with ethidium bromide.

### Immunofluorescence Microscopy

EC were grown on four-well glass slides (Lab-Teck; Nunc, Naperville, IL), and confluent monolayers were treated with anti-HLA-A,B,C mAb (W6/32: 10  $\mu$ g/ml), thrombin (1 U/ml), or TNF- $\alpha$  (100 U/ml) after a 24-h deprivation period. EC that were treated with culture medium alone or an isotypic mouse IgG2a were used as controls. After treatment, EC were fixed in 4% paraformaldehyde-PBS for 20 min and permeabilized in 0.1% Triton X-100 at room temperature for 15 min. For F-actin staining, cells were incubated with 2  $\mu$ g/ml TRITC-phalloidin (Sigma-Aldrich) for 20 min. For immunofluorescent detection of RhoA, assessed on resting or treated confluent EC, cells were stained with 2  $\mu$ g/ml FITC-labeled anti-RhoA mAb. The slides were examined with a fluorescence microscope (Eclipse E600 Y-FL Epifluorescence, Nikon, Japan). Images were acquired using ACT-1 software (Nikon).

### Western Blotting and Pull-Down Assays

Lysis of the EC membrane was performed on ice in 5 mmol/L MgCl<sub>2</sub>, 100 mmol/L NaCl, 1% NP-40, 1 mmol/L PMSF, 0.2 U/ml aprotinin, and 100  $\mu$ g/ml leupeptin. Total cell lysates were obtained using 10 mmol/L Tris-HCl (pH 7.4), 125 mmol/L NaCl, 1% SDS, 1 mmol/L PMSF, 0.2 U/ml aprotinin, and 100  $\mu$ g/ml leupeptin. Cell membrane fractions were obtained after ultracentrifugation and solubilization as described previously (14). For Western blot analysis, proteins (10 to 20  $\mu$ g per lane) were separated by SDS-PAGE and transferred onto nitrocellulose membranes (ECL Hybond; Amersham Biotech UK, Little Chalfont, England). Membranes were washed for 30 min with TBS 0.1% Tween 20 (TBST) and preblocked for 2 h in TBST that contained 5% BSA (blocking solution; Sigma). Incubation with primary Ab diluted in blocking solution was performed overnight at 4°C. After extensive washing with TBST, the bound antibody was detected by a peroxidase-conjugated anti-mouse or anti-rabbit secondary antibody (CST). After 45 min of washing, the blots were developed using the ECL Western blotting detection system (Amersham, Les Ulis, France). Ab used in this study were rabbit polyclonal IgG anti-Akt, anti-Phospho-Akt (Ser473), anti-Phospho-Akt (Thr308), anti-phospho GSK3 $\beta$  (Ser9), anti-PTEN, anti-I $\kappa$ B $\alpha$ , and anti-phospho-I $\kappa$ B $\alpha$  (Ser36), all were from Cell Signaling Technology (CST, Beverly, MA). Mouse anti-glyceraldehyde-3-phosphate dehydroge-

nase mAb was from Chemicon (Temecula, CA) and anti-RhoA specific (26C4) from Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA). Anti-rabbit and anti-mouse IgG, horseradish peroxidase–linked Ab (CST) were used as secondary Ab in chemiluminescent Western blot assays. RhoA activation was determined by affinity precipitation of the active GTP-bound RhoA using a glutathione S-transferase (GST)-fusion protein of the Rho-binding domain of the Rho effector rho-kinase (GST-RBD) using the EZ-Detect Rho Activation kit (Pierce Biotechnology, Rockford, IL). The active or GTP-Rho pulled down from lysate was detected by Western blot using a specific anti-RhoA antibody (26C4; Santa Cruz Biotechnology).

#### CFSE Staining and EC Proliferation Analysis

EC monolayers were grown to confluence and quiescent cells were cultured with 2% FCS in the absence of growth supplements for 12 h before treatment. EC were then incubated for 24 h with 10  $\mu$ g/ml anti-HLA mAb (anti-HLA-A,B,C: W6/32 or anti-HLA-A2: HB-117), 10  $\mu$ g/ml control IgG1 (for HB-117) or IgG2a (for W6/32), 10 ng/ml bFGF, or medium alone. After treatment, cells were harvested with trypsin/EDTA, washed twice in culture medium, and incubated in the presence of 5  $\mu$ mol/L of CFSE (Molecular Probes, Eugene, OR) in PBS for 10 min at 37°C. After washing, labeled cells were plated onto six-well culture plates and cultured for the indicated period of time (24 or 48 h) in ECGM supplemented with 2% FCS. Cells were then harvested, washed three times in PBS, and fixed in PBS that contained 1% paraformaldehyde. Fluorescence was measured on 10,000 cells/sample using a FAC-Scalibur (Becton Dickinson, Mountain View, CA). Data were analyzed using CellQuestPro and ModFitLT software (Becton Dickinson Immunocytometry Systems, San Jose, CA). Cell proliferation was calculated using the Proliferation Wizard Model. Parent cells correspond to cells labeled and fixed immediately after the labeling step. The proliferation index is the sum of the cells in all generations divided by the computed number of original parent cells present at the start of the experiment. Results are representative of at least three independent experiments.

#### Statistical Analyses

Data are shown as mean  $\pm$  SD. All data were evaluated with two-tailed, unpaired *t* test or compared by one-way ANOVA. *P* < 0.05 was considered significant for all tests.

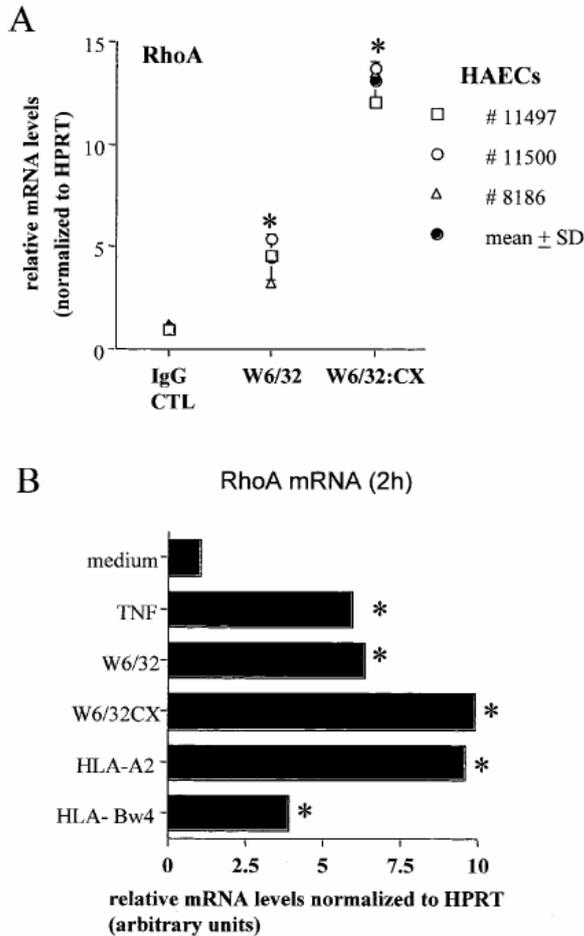
## Results

### HLA Class I Ligation on Vascular EC Increases Expression of Genes Related to Cell Proliferation

For mimicking the Ab-mediated allospecific interactions involved in the chronic allograft nephropathy, cultured HLA-typed primary EC were incubated with monomorphic (HLA-A,B,C: W6/32) or polymorphic (HLA-A2, HLA-Bw4, HLA-B51) anti-HLA class I Ab. EC that were incubated with culture medium or stimulated with TNF- $\alpha$  were used as negative and positive controls, respectively. After a 2-h treatment, total RNA was extracted and subjected to RNA differential display RT-PCR analysis. Among the 45 cDNA fragments found to be overexpressed in response to anti-HLA Ab binding, several encoded proteins related to cell-cycle signaling, regulation, and proliferation, including the GTP-binding protein RhoA, the cytoplasmic microtubule motor protein dynein, the microtubule-associated protein 1B, the nibrin protein, the ribonucleoprotein A2/B1, and the syntaxin 3A (Table 1). For further exploring the signaling pathway involved in EC proliferation-mediated graft arteriosclerosis, a particular focus was given to determine the role of the GTP-binding protein RhoA. For providing additional evidence that RhoA could be overexpressed by EC in response to class I HLA ligation, primary cultures of these cells were assessed for RhoA expression at the level of mRNA by using real-time quantitative RT-PCR. Up-regulation of the transcript level for RhoA was first confirmed by quantitative RT-PCR analysis, performed independently on three different primary EC cultures incubated with anti-HLA mAb, alone or cross-linked with anti-mouse IgG (Figure 1A). RhoA mRNA expression was observed further in response to both monomorphic and polymorphic anti-HLA binding with a maximal increase obtained for anti-HLA-A,B,C (W6/32) and anti-HLA-A2 (HB-117) mAb (Figure 1B), both directed to the largest number of determinants on vascular EC. Concomitant to enhanced mRNA level for RhoA, mRNA for RhoB and RhoC but not Rac1 and Cdc42 were also increased at 2 h after anti-HLA class I Ab binding to vascular EC (data not shown).

Table 1. Genes upregulated in endothelial cells in response to anti-HLA class I antibody binding

Gene Product (NCBI Accession No.)	Functions	Length of cDNA Fragment (bp)	% of Sequence Homology
GTP binding protein RhoA (XM-003287)	Signal transduction, cell proliferation, cytoskeletal remodeling	450	100
Nijmegen breakage syndrome 1 (Nibrin, NBS1) (XM-005310)	DNA double-strand-break repair	200	96
Microtubule associated protein 1B (MAP-1B) (NM-005909)	Development and cellular regeneration	430	95
Ribonucleoprotein A2/B1 (BC000506)	Transcription, pre-mRNA processing, cytoplasmic mRNA translation	180	100
Syntaxin 3A (XM-004177)	Membrane fusion during cell division	420	100
Dynein, cytoplasmic, intermediate polypeptide1 (DNCI-1) (XM-004944)	Spindle orientation and cytoskeletal reorientation during mitosis	150	99

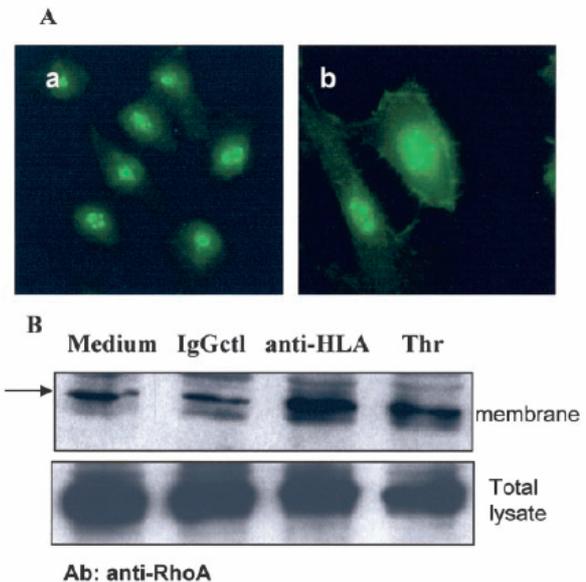


**Figure 1.** Quantitative analysis of RhoA mRNA expression by reverse transcription-PCR (RT-PCR). (A) RhoA transcript levels were analyzed by real-time quantitative RT-PCR as described in Materials and Methods and expressed as arbitrary units after normalization to hypoxanthine-guanine phosphoribosyl transferase. \* $P < 0.05$  versus controls. RT-PCR was performed on RNA from three independent, HLA-typed cultures of primary endothelial cells (EC; #1147, #11500, and #8186) that were treated for 2 h with an isotypic control IgG2a (IgG control), anti-HLA class I antibodies (Ab; W6/32, 10  $\mu$ g/ml) alone or cross-linked with anti-mouse IgG (W6/32: CX, 10  $\mu$ g/ml each). (B) RT-PCR was performed on RNA from EC (#8186) that were treated for 2 h with 10  $\mu$ g/ml of different anti-HLA class I Ab (anti-HLA-A,B,C:W6/32 alone or cross-linked with anti-mouse IgG: W6/32:CX, anti-HLA-A2 or anti-HLA-Bw4). EC that were incubated with culture medium alone or TNF- $\alpha$  (100 U/ml) were used as controls.

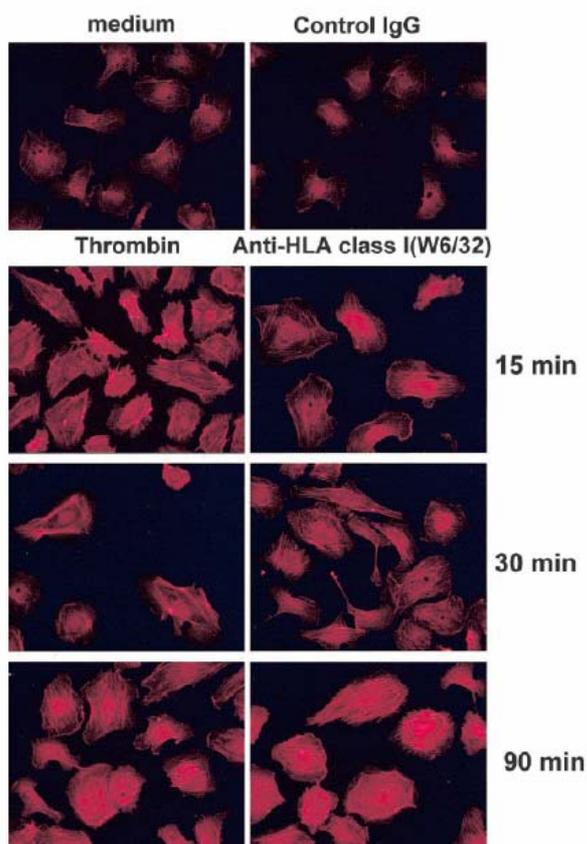
#### HLA Class I Ligation Induces RhoA Translocation on EC and Cytoskeleton Reorganization

To assess activation of RhoA in response to HLA class I ligation, we investigated RhoA translocation by immunofluorescence and immunoblot detection. Intracellular localization

of RhoA was first analyzed by immunofluorescent labeling of RhoA in confluent EC monolayers (Figure 2A). Our data indicated that, in the resting state, RhoA is mainly localized in the Golgi-ER (endoplasmic reticulum) system. Incubation of EC in the presence of anti-HLA Ab for 8 min leads to the translocation of RhoA protein from the cytosolic part to the inner side of the cell membrane. The translocation was also confirmed by Western blots performed on membrane fractions. EC that were stimulated with thrombin were used as positive controls and with irrelevant mouse IgG as negative controls. Figure 2B shows the increase in protein level for RhoA corresponding to the 23-kD band detected by immunoblotting on cell membrane lysates. In contrast, the overall amount of RhoA did not change. RhoA plays an important role in temporal and spatial determination of the actin cytoskeletal control (15). Figure 3 shows that anti-HLA binding to EC surface induced the formation of cytoplasmic stress fibers and accumulation of a pronounced ring of F-actin. Time-course analyses indicated that cytoskeleton reorganization begins 15 min after HLA class I binding and is reflected by an increase in fluorescence intensity as compared with resting and control cells. EC that were stimulated with thrombin, used as controls, also exhibited a rapid increase in F-actin staining and stress fiber appearance (maximal at 15 min).



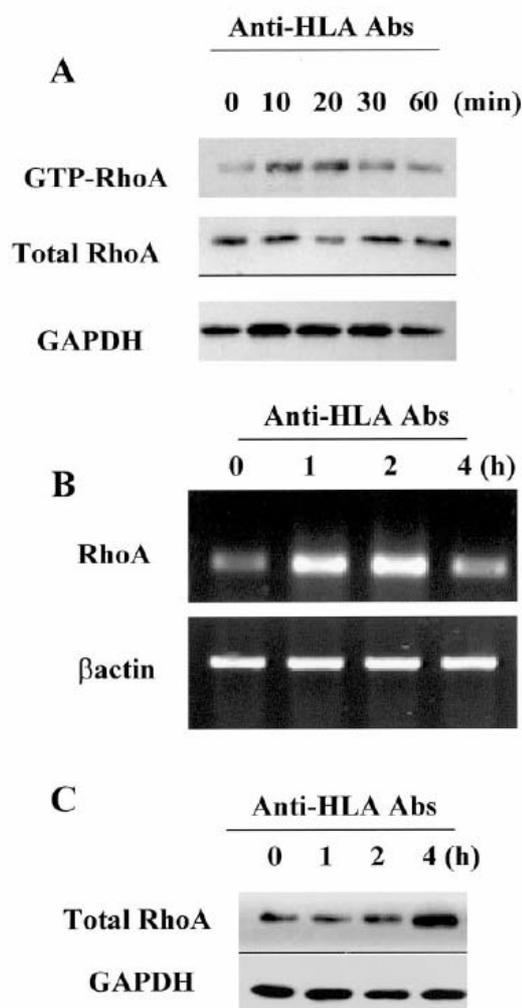
**Figure 2.** RhoA translocation in response to HLA class I ligation on EC. (A) Representative immunofluorescence for RhoA localization was performed on confluent EC monolayers that were incubated for 8 min with 10  $\mu$ g/ml irrelevant mouse IgG2a (a) or anti-HLA class I W6/32 mAb (b). Photographs are representative of three different experiments. (B) Western blot analysis performed on EC membrane fractions (top) and total lysates (bottom) after treatment for 10 min with medium alone, thrombin, an isotypic control IgG, or anti-HLA class I (10  $\mu$ g/ml for both). Magnification,  $\times 600$  in A.



**Figure 3.** F-actin staining and stress fiber formation. EC were grown to confluence in four-well glass slides and cultured without growth factors in the presence of 2% FCS (fetal calf serum) for 12 h. EC monolayers were then incubated with 1 U/ml thrombin or anti-HLA class I mAb (W6/32, 10  $\mu$ g/ml) for the indicated period of time. After treatment, EC were fixed, permeabilized, and stained with 2  $\mu$ g/ml TRITC-phalloidin. Photographs are representative of three different experiments. Magnification,  $\times$  600.

#### *RhoA* Activation in Response to HLA Class I Ligation Precedes *RhoA* Upregulation at mRNA and Protein Levels

The activation of RhoA subsequent to HLA class I cross-linking was characterized further by pull-down assays. As shown in Figure 4A, an increase in GTP-bound RhoA protein was observed in response to HLA class I cross-linking. Time-course analysis showed that active (GTP-bound) RhoA requires 10 to 20 min to reach a maximum and then declined before returning to baseline at 60 min. During the same period, the amount of RhoA in whole lysates did not change significantly. Thus, concomitant to membrane translocation, RhoA activation, in response to HLA class I ligation, was confirmed by an increase in GTP-bound RhoA. In additional experiments, the effect of HLA ligation was examined on RhoA mRNA and protein levels after 1, 2, and 4 h. RT-PCR for 18 cycles



**Figure 4.** RhoA activation and upregulation at mRNA and protein levels. EC were incubated in the presence of anti-HLA class I mAb (10  $\mu$ g/ml) for the indicated period of time. (A) Pull-down assay. RhoA activation was determined by affinity precipitation of the active GTP-bound RhoA using a glutathione S-transferase (GST)-fusion protein of the Rho-binding domain of the Rho effector rho-kinase (GST-RBD). The GTP-Rho pulled down from lysate was detected by Western blot using a specific anti-RhoA antibody. The total amount of RhoA in cell lysates was used as a control for the comparison of RhoA activity. Blots were reprobed with anti-glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) Ab to ensure equal loading. (B) Semiquantitative RT-PCR analysis of RhoA mRNA levels. Total RNA was extracted from EC and subjected to RT-PCR (18 cycles of amplification). The specific PCR bands were separated in 1.2% agarose gels and stained with ethidium bromide.  $\beta$ -Actin mRNA was amplified as a control. (C) Western blot analysis of RhoA protein level in cell lysates. Immunoblot analysis was performed with anti-RhoA Ab, detected with horseradish peroxidase (HRP)-conjugated anti-mouse Ab, and visualized with enhanced chemiluminescence. Bottom panel shows GAPDH levels in samples from a blot reprobed with anti-GAPDH Ab. Results shown are representative of three separate experiments.

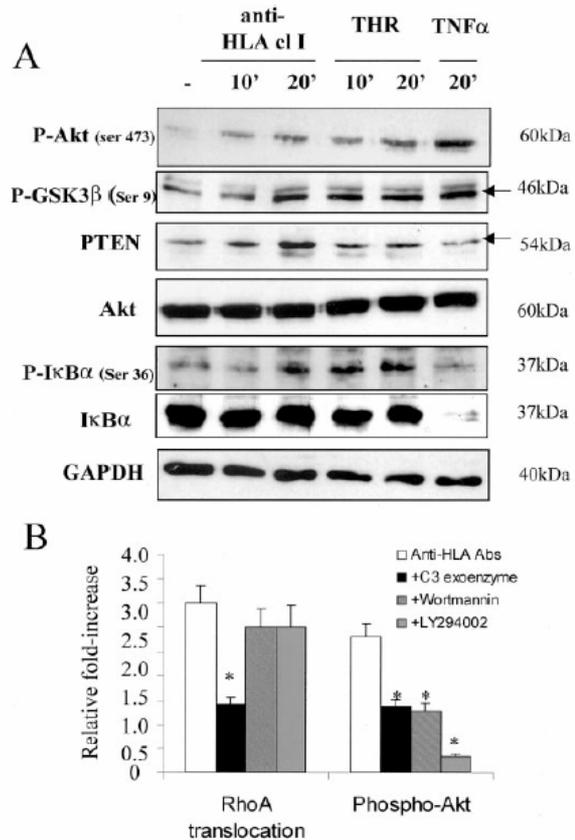
indicates a strong increase in RhoA mRNA expression level at 1 and 2 h after HLA class I cross-linking, which returns to basal level at 4 h (Figure 4B). In parallel experiments, EC were harvested and lysed to measure RhoA protein by Western blots. It is interesting that increase in mRNA level precedes a significant increase in RhoA total protein level in whole-cell lysates observed at 4 h (Figure 4C). Taken together, these results suggest that activation of RhoA may feed back to promote an increase in both RhoA mRNA and protein levels.

#### RhoA Mediates PI3-K/Akt Pathway Activation in EC

Western blot analysis was performed to explore signaling events related to RhoA activation in response to alloantibodies binding on human EC. EC that were stimulated with 1 U/ml thrombin or 100 U/ml TNF- $\alpha$  were used as controls. By Western blotting, we further examined PI3-K activity and found that, concomitant to RhoA activation, HLA class I ligation promotes Akt activation through phosphorylation at Ser473 (Figure 5A) and at Thr308 (data not shown). In contrast, the total amount of Akt protein showed no difference. Immunoblots also indicated that anti-HLA class I Ab mediate the induction of PTEN and the phosphorylation of GSK3 $\beta$  at Ser9 in EC, both maximal 20 min after treatment. I $\kappa$ B $\alpha$  phosphorylation at Ser36 was also observed but, in contrast with TNF- $\alpha$ -induced phosphorylation of I $\kappa$ B $\alpha$ , was not correlated with a decreased level of constitutive I $\kappa$ B $\alpha$ . For addressing more directly the role of RhoA protein in anti-HLA-mediated PI3-K activation, Rho GTPases were selectively inhibited by clostridial cytotoxin. Pretreatment of EC with C3 exoenzyme, which selectively inactivates RhoA/B/C proteins (16), efficiently reduced RhoA translocation to the cell membrane and reduces Akt phosphorylation (Figure 5B) as well as PTEN expression and GSK3 $\beta$  phosphorylation (data not shown). However, the specific PI3-K inhibitors wortmannin and LY294002 also prevent Akt without decreasing RhoA translocation. Taken together, these data strongly suggest that PI3-K/Akt is a downstream target of Rho GTPases in this process.

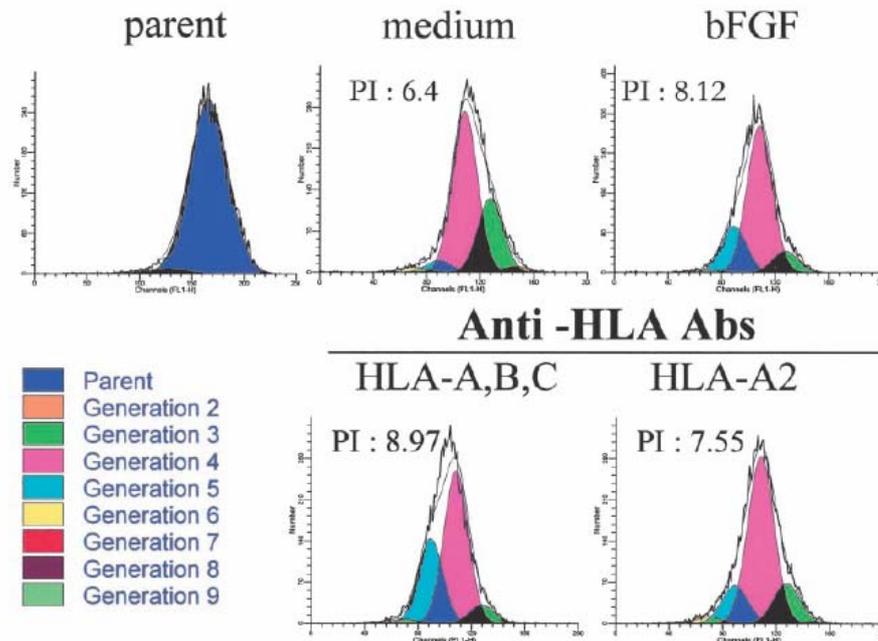
#### CFSE Analysis of Anti-HLA-Induced EC Proliferation

Increased proliferation of EC is the major functional consequence attributed to anti-HLA class I Ab (7,9,17). For further linking the signaling pathway to the cell proliferation, CFSE staining has been used to document further EC division and proliferation promoted by anti-HLA class I alloantibodies. In contrast with cell proliferation assays that measure bulk cell division over a narrow window of time or can identify cells that have recently divided without determining how many generations have occurred, CFSE staining allows the clear resolution and quantitative analysis of eight to 10 sequential cell divisions (18). The data in Figure 6 show the CFSE staining profiles of EC over a 24-h period. Cells that were treated with culture medium or 10 ng/ml bFGF were used as negative and positive controls, respectively. The proliferative effect of HLA ligation on EC was reflected by a higher proliferation index (8.97 and 7.55 for anti-HLA-A,B,C and -A2, respectively, versus 6.4 for



**Figure 5.** Activation of phosphatidylinositol 3-kinase (PI3-K) pathway in response to HLA class I ligation on EC. (A) Representative Western blots for PI3-K and NF- $\kappa$ B activation. EC were incubated in the presence of anti-HLA class I mAb (10  $\mu$ g/ml), 1 U/ml thrombin, or 100 U/ml TNF- $\alpha$  for the indicated period. Cell lysates were resolved by SDS-PAGE (10 to 15%) and subjected to Western immunoblot analysis by using the following antibodies: rabbit polyclonal IgG anti-Phospho-Akt (Ser473), anti-Akt, anti-phospho GSK3 $\beta$  (Ser9), anti-PTEN, anti-I $\kappa$ B $\alpha$ , and anti-phospho-I $\kappa$ B $\alpha$  (Ser36). Anti-rabbit and anti-mouse IgG, HRP-linked Ab were used as secondary Ab in chemiluminescent Western blot assays. For verifying the amount of loaded proteins, blots were reprobed with anti-GAPDH mAb. (B) Quantitative analysis of immunoblots showing RhoA translocation and Akt phosphorylation (Ser 473) after HLA class I ligation for 15 min on EC with or without a pretreatment (60 min) with C3 exoenzyme (2  $\mu$ g/ml), wortmannin (10 nmol/L), or LY294002 (1  $\mu$ mol/L). Results from three independent experiments are expressed as a mean of relative fold increase in protein ( $\pm$  SEM) as compared with medium-treated cells (\* $P$  < 0.01 versus cells treated in the absence of inhibitors).

medium). Moreover, a higher percentage of EC committed to proliferate was observed in response to both polymorphic (HLA-A2) and monomorphic (HLA-A,B,C) anti-HLA class I mAb compared with medium-treated cells.



**Figure 6.** 5,6-Carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester (CFSE) profiles of anti-HLA class I-induced EC cycle progression and proliferation. CFSE profiles of EC that were analyzed 24 h after CFSE labeling. Before labeling, EC were incubated for 24 h with 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$  anti-HLA (anti-HLA-A,B,C: W6/32, anti-HLA-A2:HB117) mAb, 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$  of an isotype control IgG, 10 ng/ml basic fibroblast growth factor (bFGF), or medium alone. CFSE staining was measured by flow cytometry, and data were analyzed using CellQuestPro and ModFitLT software. Cell proliferation was calculated using the Proliferation Wizard Model. PI, proliferation index.

#### *Simvastatin Prevents HLA Class I-Induced Proliferation of EC by Inhibiting Geranylgeranylation of RhoA*

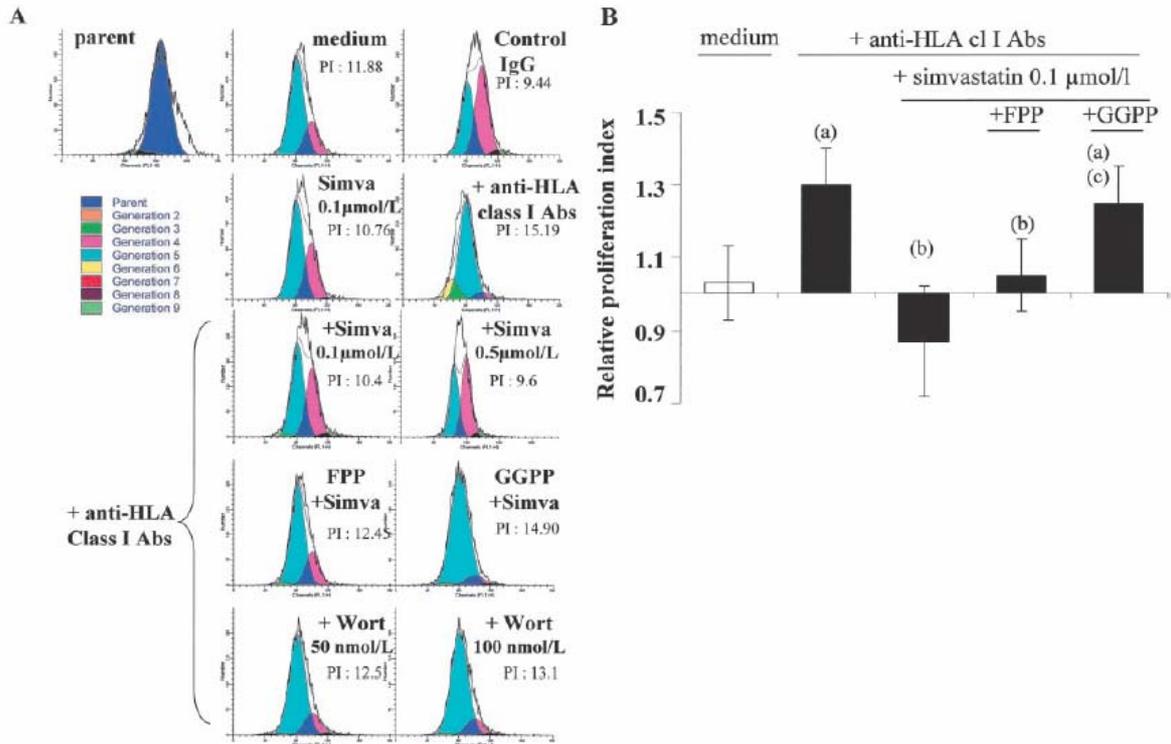
To provide a functional link between anti-HLA-induced proliferation and signaling pathways, we compared the effect of RhoA and PI3-K inhibitors. On the basis of our results, we examined the possibility that clinically relevant inhibitors of RhoA, such as 3-hydroxy-3-methylglutaryl CoA (HMG-CoA) reductases inhibitors or statins (14,19,20), may prevent RhoA-mediated EC proliferation in response to anti-HLA Ab. CFSE staining showed that a low, clinically relevant dose (0.1  $\mu\text{mol}/\text{L}$ ) of simvastatin efficiently abrogates the proliferative effect of HLA class I ligation on vascular EC (Figure 7). Similar inhibition was achieved at 0.5  $\mu\text{mol}/\text{L}$  without affecting cell viability. As shown in Figure 7A, pretreatment of EC with wortmannin before treatment with anti-HLA class I mAb also reduced EC proliferation assessed by CFSE staining. The inhibitory effect was reflected by both a decreased proliferation index and a lower percentage of the last cell generation.

HMG-CoA reductase is a proximal rate-limiting enzyme in the cholesterol synthesis pathway from acetyl CoA. This pathway also generates several metabolic compounds that have important cellular functions, including FPP and GGPP that contribute to lipid modifications of various proteins. To determine whether the inhibitory effect of simvastatin on EC proliferation in our model results from a reduction in lipid intermediates, we made attempts to reverse simvastatin's effect by the addition of the downstream byproducts FPP and GGPP at the onset of simvastatin treatment. As shown in Figure 7, A and B, GGPP abrogates the inhibitory effect of simvastatin (relative proliferation index:  $1.25 \pm 0.1$  versus  $1.3 \pm 0.1$  [ $P > 0.1$ ]

and  $0.87 \pm 0.15$  [ $P < 0.05$ ] for EC treated with anti-HLA in the absence or presence of simvastatin, respectively). In contrast, FPP was not able to reverse the inhibitory effect of simvastatin on cell division, suggesting that simvastatin prevents anti-HLA-mediated EC proliferation through inhibition of RhoA geranylgeranylation. To explore further the impact of RhoA activation on the subsequent RhoA mRNA upregulation, we treated EC with or without simvastatin (0.1  $\mu\text{mol}/\text{L}$ ) before cross-linking of HLA class I with specific Ab. Cells that were incubated with irrelevant IgG were used as controls. As expected, simvastatin completely prevents the induction of active GTP-bound RhoA in response to HLA class I ligation (Figure 8A). Effect of simvastatin on RhoA transcription was then examined at later time points by RT-PCR. In the presence of simvastatin, no increase of RhoA mRNA was observed as compared with resting levels (Figure 8B). These results demonstrate that blocking RhoA activation with simvastatin also prevents upregulation of RhoA transcription.

#### **Discussion**

HLA class I signaling pathways have been shown to be involved in the proliferation of vascular EC and SMC associated with transplant arteriosclerosis (6,7,9). However, molecular mechanisms and signaling pathways implicated in HLA class I-mediated EC proliferation remain unclear. Allospecific Ab-mediated ligation of class I molecules expressed on the surface of EC have been shown to trigger intracellular signaling events reflected by phosphorylation of Src, paxillin, and focal adhesion kinase (8). Activation of the PI3-K/Akt pathway also occurs in response to class I ligation on EC (21). Together, these findings indicate that multiple pathways may act in



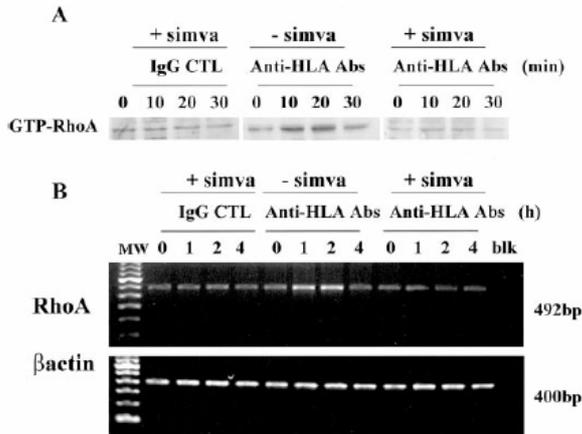
**Figure 7.** Inhibitory effect of simvastatin on EC proliferation induced by HLA class I ligation. CFSE staining of EC that were incubated for 24 h with 10  $\mu\text{g/ml}$  anti-HLA Ab (W6/32), 10  $\mu\text{g/ml}$  of an isotype control IgG, or medium alone. Pretreatment with inhibitors (50 and 100 nmol/L wortmannin, 10  $\mu\text{mol/L}$  geranylgeranyl pyrophosphate [GGPP] or farnesyl pyrophosphate [FPP]) was performed for 2 h. Pretreatment with simvastatin (0.1 and 0.5  $\mu\text{mol/L}$ ) was performed for 18 h. (A) CFSE staining was measured by flow cytometry, and data were analyzed using CellQuestPro and ModFitLT software. Cell proliferation was calculated using the Proliferation Wizard Model. Results are representative of at least three independent experiments. (B) Respective effects of the isoprenoid compounds FPP and GGPP on cell proliferation in the presence of anti-HLA-class I Ab and simvastatin. Results from three independent experiments are expressed as mean  $\pm$  SEM of relative PI calculated as a ratio between treated and culture medium-treated cells. (a) $P < 0.01$  versus culture medium-treated cells; (b) $P < 0.01$  versus cells treated with anti-HLA Ab alone; (c) $P > 0.1$  versus cells treated with anti-HLA Ab alone.

concert to promote EC proliferation. However, upstream signaling events and the hierarchical activation cascade remain to be established. The present work demonstrates that HLA class I ligation on vascular EC induces transcriptional changes, including the upregulation of genes implicated in the cell cycle and proliferation, and identified RhoA as a key target for this angiogenic process.

Differential gene expression analysis is a powerful tool to investigate transcriptional changes in cells or tissues. However, the change in the transcription level of a gene is not always correlated with the causal role of that gene. Moreover, changes in gene expression are not invariably associated with changes in protein synthesis. Thus, gene expression analysis may be viewed as a guiding tool to initiate functional investigations. Rho GTPases, including RhoA, play a central role in eukaryotic cells, coordinately controlling the organization of the actin cytoskeleton with other cellular activities such as gene transcription, cell-cycle progression, and migration (22). The Rho

GTPases also function as key regulators of important signaling pathways. This study demonstrated that RhoA was rapidly activated and then upregulated at the transcriptional level in response to HLA class I ligation on vascular EC. To our knowledge and as reported in recent publications (23,24), regulation of RhoA at a transcription or protein level is almost unknown. These studies showed an increase of RhoA mRNA associated with enhanced RhoA protein level. It is extremely interesting that, in EC, intercellular adhesion molecule-1 cross-linking also induced upregulation of RhoA at both mRNA and protein levels (25). Consistent with these data, our results may suggest that mRNA upregulation may reflect of RhoA activation and consumption and may constitute a feedback response to RhoA activation, providing more RhoA for subsequent activation.

Although other GTPases can be upregulated, our attention was focused on determining the role of the signaling protein RhoA in class I-mediated signaling leading to angiogenesis in



**Figure 8.** Inhibitory effect of simvastatin on RhoA activation and transcription induced by HLA class I cross-linking. EC were pre-treated for 18 h with or without simvastatin ( $0.1 \mu\text{mol/L}$ ) before incubation with anti-HLA class I Ab (W6/32,  $10 \mu\text{g/ml}$ ) or irrelevant isotype control IgG for the indicated period. (A) Pull-down assays. The GTP-Rho pulled down from lysate was detected by Western blot using a specific anti-RhoA antibody. (B) Semiquantitative RT-PCR analysis of mRNA expression for RhoA. Total RNA was extracted from EC and subjected to RT-PCR (18 cycles of PCR amplification). The specific PCR bands were separated in 1.2% agarose gels and stained with ethidium bromide.  $\beta$ -Actin mRNA was amplified as a control. Results are from a representative experiment of three performed.

human EC. Consistent with previous results reported on PI3-K implication on EC angiogenesis after alloantibodies binding (21), we demonstrated that concomitant with RhoA activation, PI3-K activation occurred in human EC because of HLA class I ligation. In our study, using C3 exoenzyme, an inhibitor of RhoA/B/C activation, indicating that PI3K/Akt is a downstream target of RhoA in this process, efficiently blocked PI3-K activation. These data are consistent with previous findings showing that RhoA may regulate PI3-K activity, suggesting that PI3-K is downstream of RhoA, such as in fibroblasts, platelets (26), and SMC (27).

Our results indicate that inhibition of RhoA using C3 exoenzyme or a clinically relevant dose of simvastatin efficiently prevents anti-HLA-induced EC growth. Indeed, simvastatin reproduced the inhibitory effect of C3 exoenzyme that selectively inactivates Rho GTPases, the processing of which involves geranylgeranylation. The ability of GGPP but not FPP to reverse the inhibitory effect of simvastatin on allospecific EC proliferation highlights the involvement of geranylgeranylation of proteins and further suggests the contribution of RhoA to this signaling pathway. Furthermore, similar results were achieved by the inhibition of PI3-K activity with the synthetic inhibitors wortmannin or LY294002, suggesting a key role of this pathway in our model. Mechanistically, our data also provide evidence that simvastatin prevents both RhoA activation and the further upregulation of RhoA at the mRNA level.

The PI3-K/Akt signaling pathway is a key regulator of the angiogenic phenotype in EC (28). Activated PI3-K and Akt have been shown to stimulate angiogenesis through increased expression of vascular endothelial growth factor mRNA in EC (29). Akt has several downstream targets that are involved in the regulation of the cell cycle, including E2F, forkhead transcription factor, S6 protein kinase, and GSK3 $\beta$  (30). A recent study documented the signaling pathways involved in angiogenesis by demonstrating that phosphorylation of GSK3 $\beta$ , one of the many substrates for Akt, is essential for EC survival and migration *in vitro* and angiogenesis *in vivo* (31). Akt down-regulates GSK3 $\beta$  through site-specific phosphorylation at Ser9. GSK3 $\beta$  is a cyclin D1 protein kinase (32). Inactivation of GSK3 $\beta$  through Akt-mediated phosphorylation, as observed in response to HLA class I ligation on EC, has been shown to decrease turnover and to stabilize cyclin D1 (32). Consequently, we can hypothesize that modulation of cyclin D1 through GSK3 $\beta$  inactivation could provide a second target for PI3-K in the regulation of the cell cycle. Supporting this hypothesis, we observed by flow cytometer analysis that a preincubation (18 h) with simvastatin, which in our study efficiently inhibits EC proliferation, significantly reduced cyclin D1 expression in EC (data not shown).

PTEN and PI3-K have opposing functions in the control of cell-cycle progression (30). Indeed, PTEN overexpression inhibits cell growth in a variety of normal and transformed cells. PTEN is primarily expressed, in parallel to Akt, in the mid to late G<sub>1</sub> phase during cell-cycle progression before pRb hyperphosphorylation (33). However, coexpression of PTEN with activated PI3-K or Akt, as reported in our study, efficiently antagonizes PTEN-mediated growth suppression (33). Therefore, PTEN induction may suggest the existence of a negative feedback loop that occurs after Rho-dependent PI3-K activation. Nevertheless, the respective role and downstream targets of GSK3 $\beta$  and PTEN have to be investigated.

Inhibitors of HMG-CoA reductase, or statins, have been shown to be useful in the reversal of endothelial dysfunction, an effect that may be independent of the reduction in cholesterol levels. Although their contribution to angiogenesis could vary according to the type of statin and dose levels (34), statins have been showed to have direct beneficial effects, including inhibition of SMC and EC proliferation (14) and preendothelin-1 gene expression (19). Most of these actions resulted from RhoA inactivation (35,36). Recently, it was shown that simvastatin prevents thrombin-induced translocation of RhoA to the plasma membrane in EC (36). In accordance, we now demonstrate that simvastatin also inhibits activation of RhoA and further regulation mediated by HLA class I cross-linking. In repressing allogeneic-induced angiogenesis through RhoA and subsequently PI3-K inhibition, statins therefore provide a new type of immunomodulation that could prevent chronic transplant nephropathy. The clinical relevance of statins is supported by recent data showing the improvement in long-term graft survival in heart (37) and kidney (38) transplant recipients under statin therapy.

In this study, RNA differential display RT-PCR also identified several other molecules involved in cell-cycle progres-

sion and regulation (Table 1). Although their precise regulation at mRNA and protein levels remains to be analyzed, the functions of these proteins further indicate that anti-HLA alloantibodies alter EC cell cycle and proliferation. In addition, our data do not exclude roles for other Rho GTPases, most notably RhoB and RhoC.

Collectively, our data suggest that RhoA-dependent activation of the PI3-K/Akt signaling pathway promotes cell-cycle progression and proliferation of vascular EC that are treated with anti-HLA alloantibodies. Our data established a specific effect of the HMG-CoA reductase inhibitor simvastatin on HLA-induced vascular EC proliferation. Consistent with previous reports (14,19,36), this antiangiogenic effect is dependent on the interference of simvastatin with geranylgeranylation and the membrane localization of RhoA.

### Acknowledgments

This work was supported by grants from la Fondation de France "Recherche Cardiovasculaire" and from L'Établissement Français des Greffes.

This study was presented, in part, at the American Transplant Congress, Washington, DC, May 30–June 4, 2003.

We thank Merck, Sharp & Dohme for providing simvastatin.

### References

- Paul LC: Chronic allograft nephropathy: An update. *Kidney Int* 56: 783–793, 1999
- Joosten SA, Van Kooten C, Paul LC: Pathogenesis of chronic allograft rejection. *Transpl Int* 16: 137–145, 2003
- Libby P, Pober JS: Chronic rejection. *Immunity* 14: 387–397, 2001
- McKenna RM, Takemoto SK, Terasaki PI: Anti-HLA antibodies after solid organ transplantation. *Transplantation* 69: 319–326, 2000
- Lee PC, Terasaki PI, Takemoto SK, Lee PH, Hung CJ, Chen YL, Tsai A, Lei HY: All chronic rejection failures of kidney transplants were preceded by the development of HLA antibodies. *Transplantation* 74: 1192–1194, 2002
- 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* 10: 1315–1323, 1998
- Bian H, Harris PE, Mulder A, Reed EF: Anti-HLA antibody ligation to HLA class I molecules expressed by endothelial cells stimulates tyrosine phosphorylation, inositol phosphate generation, and proliferation. *Hum Immunol* 53: 90–97, 1997
- Jin YP, Singh RP, Du ZY, Rajasekaran AK, Rozengurt E, Reed EF: Ligation of HLA class I molecules on endothelial cells induces phosphorylation of Src, paxillin, and focal adhesion kinase in an actin-dependent manner. *J Immunol* 168: 5415–5423, 2002
- Bian H, Reed EF: 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, 1999
- Boulday G, Coupel S, Coulon F, Souillou JP, Charreau B: Antigrraft antibody-mediated expression of metalloproteinases on endothelial cells. Differential expression of TIMP-1 and ADAM-10 depends on antibody specificity and isotype. *Circ Res* 88: 430–437, 2001
- Boulday G, Coulon F, Fraser CC, Souillou JP, Charreau B: Transcriptional up-regulation of the signaling regulatory protein LNK in activated endothelial cells. *Transplantation* 74: 1352–1354, 2002
- Le Bas-Bernardet S, Hourmant M, Coupel S, Bignon JD, Souillou JP, Charreau B: Non-HLA-type endothelial cell reactive alloantibodies in pre-transplant sera of kidney recipients trigger apoptosis. *Am J Transplant* 3: 167–177, 2003
- Nagasaka T, Boulday G, Fraser CC, Coupel S, Coulon F, Tesson L, Heslan JM, Souillou JP, Charreau B: Rapid selection of differentially expressed genes in TNF $\alpha$ -activated endothelial cells. *Mol Med* 8: 559–567, 2002
- Park HJ, Kong D, Iruela-Arispe L, Begley U, Tang D, Galper JB: 3-Hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase inhibitors interfere with angiogenesis by inhibiting the geranylgeranylation of RhoA. *Circ Res* 91: 143–150, 2002
- Sasaki T, Takai Y: The Rho small G protein family-Rho GDI system as a temporal and spatial determinant for cytoskeletal control. *Biochem Biophys Res Commun* 245: 641–645, 1998
- Aktories K: Bacterial toxins that target Rho proteins. *J Clin Invest* 99: 827–829, 1997
- Nath N, Bian H, Reed EF, Chellappan SP: HLA class I-mediated induction of cell proliferation involves cyclin E-mediated inactivation of Rb function and induction of E2F activity. *J Immunol* 162: 5351–5358, 1999
- Lyons AB: Analysing cell division in vivo and in vitro using flow cytometric measurement of CFSE dye dilution. *J Immunol Methods* 243: 147–154, 2000
- Hernandez-Perera O, Perez-Sala D, Soria E, Lamas S: Involvement of Rho GTPases in the transcriptional inhibition of pre-endothelin-1 gene expression by simvastatin in vascular endothelial cells. *Circ Res* 87: 616–622, 2000
- Hippenstiel S, Soeth S, Kellas B, Fuhrmann O, Seybold J, Krull M, Eichel-Streiber C, Goebeler M, Ludwig S, Suttrop N: Rho proteins and the p38-MAPK pathway are important mediators for LPS-induced interleukin-8 expression in human endothelial cells. *Blood* 95: 3044–3051, 2000
- Jin Y, Reed E: Ligation of class I molecules on endothelial cells stimulates phosphorylation of focal adhesion kinase at TYR-576/577 and triggers the PI3K/AKT signaling cascade. *Hum Immunol* 63: 552, 2002
- Mackay DJ, Hall A: Rho GTPases. *J Biol Chem* 273: 20685–20688, 1998
- Turcotte S, Desrosiers RR, Beliveau R: HIF-1 $\alpha$  mRNA and protein upregulation involves Rho GTPase expression during hypoxia in renal cell carcinoma. *J Cell Sci* 116: 2247–2260, 2003
- Sauzeau V, Rolli-Derkinderen M, Marionneau C, Loirand G, Pacaud P: RhoA expression is controlled by nitric oxide through cGMP-dependent protein kinase activation. *J Biol Chem* 278: 9472–9480, 2003
- Thompson PW, Randi AM, Ridley AJ: Intercellular adhesion molecule (ICAM)-1, but not ICAM-2, activates RhoA and stimulates c-fos and rhoA transcription in endothelial cells. *J Immunol* 169: 1007–1013, 2002
- Ren XD, Schwartz MA: Regulation of inositol lipid kinases by Rho and Rac. *Curr Opin Genet Dev* 8: 63–67, 1998
- Wang P, Bitar KN: Rho A regulates sustained smooth muscle contraction through cytoskeletal reorganization of HSP27. *Am J Physiol* 275: G1454–G1462, 1998
- Shiojima I, Walsh K: Role of Akt signaling in vascular homeostasis and angiogenesis. *Circ Res* 90: 1243–1250, 2002

29. Jiang BH, Zheng JZ, Aoki M, Vogt PK: Phosphatidylinositol 3-kinase signaling mediates angiogenesis and expression of vascular endothelial growth factor in endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97: 1749–1753, 2000
30. Roymans D, Slegers H: Phosphatidylinositol 3-kinases in tumor progression. *Eur J Biochem* 268: 487–498, 2001
31. Kim HS, Skurk C, Thomas SR, Bialik A, Suhara T, Kureishi Y, Birnbaum M, Keaney JF Jr, Walsh K: Regulation of angiogenesis by glycogen synthase kinase-3 $\beta$ . *J Biol Chem* 277: 41888–41896, 2002
32. Diehl JA, Cheng M, Roussel MF, Sherr CJ: Glycogen synthase kinase-3 $\beta$  regulates cyclin D1 proteolysis and subcellular localization. *Genes Dev* 12: 3499–3511, 1998
33. Paramio JM, Navarro M, Segrelles C, Gomez-Casero E, Jorcano JL: PTEN tumour suppressor is linked to the cell cycle control through the retinoblastoma protein. *Oncogene* 18: 7462–7468, 1999
34. Urbich C, Dermach E, Zeiher AM, Dimmeler S: Double-edged role of statins in angiogenesis signaling. *Circ Res* 90: 737–744, 2002
35. Laufs U, Liao JK: Post-transcriptional regulation of endothelial nitric oxide synthase mRNA stability by Rho GTPase. *J Biol Chem* 273: 24266–24271, 1998
36. van Nieuw Amerongen GP, Vermeer MA, Negre-Aminou P, Lankelma J, Emeis JJ, van Hinsbergh VW: Simvastatin improves disturbed endothelial barrier function. *Circulation* 102: 2803–2809, 2000
37. Wenke K, Meiser B, Thiery J, Nagel D, von Scheidt W, Krobot K, Steinbeck G, Seidel D, Reichart B: Simvastatin initiated early after heart transplantation: 8-year prospective experience. *Circulation* 107: 93–97, 2003
38. Cosio FG, Pesavento TE, Pelletier RP, Henry M, Ferguson RM, Kim S, Lemeshow S: Patient survival after renal transplantation III: The effects of statins. *Am J Kidney Dis* 40: 638–643, 2002

### **Chapitre 3. Les Cellules Endothéliales échappent à l'apoptose induite par les alloanticorps anti-HLA-DR.**

### 3.1. Introduction.

Si la présence d'anticorps anti-HLA de classe I avant la greffe est une contre-indication stricte à la transplantation, la présence d'anticorps anti-HLA de classe II reste, en revanche, mal définie et controversée. La spécificité des anticorps anti-HLA est classiquement déterminée par la technique de cross-match lymphocytaire B et T réalisée sur un panel de lymphocytes, ou, en pré-greffe, sur les lymphocytes du receveur. Ce test de cytotoxicité dépendante du complément identifie des anticorps réagissant avec les lymphocytes B et/ou T. Une réaction anti-B ou crossmatch B signant la présence d'anticorps anti-classe II alors qu'une réactivité anti-T est supposée signer la présence d'anticorps anti-classe I. Cependant, les lymphocytes B sont des cibles cellulaires très sensibles à la cytotoxicité qui, de plus, expriment à la fois les molécules de CMH de classe I et de classe II, ce qui limite l'interprétation du test. Les études analysant l'effet du crossmatch B sur la survie des greffes ont fourni des résultats parfois contradictoires (143) (144). Ainsi une étude récente réalisée sur 5949 receveurs de greffes rénales montrait que le groupe des 642 receveurs, possédant des anticorps anti-classe II en l'absence d'anticorps anti-classe I, présentait une survie du greffon à 3 ans de  $80 \pm 1\%$ , survie identique à celle du groupe des 4561 receveurs ne possédant ni anticorps anti-classe I ni anti-classe II (144). De même, une étude réalisée par notre laboratoire, qui visait à identifier la nature des anticorps responsables du cross-match B positif (en l'absence de cross-match T) ainsi que leur incidence sur la survie des transplantations rénales, a identifié des anticorps anti-HLA classe II dans seulement 23% des cas et montré l'absence d'effet délétère sur la survie des greffes (145). L'évolution récente des techniques d'identification des anticorps anti-HLA (Elisa, cytométrie de flux et analyses de multiplexes) permet à l'heure actuelle une réévaluation du rôle des anticorps anti-HLA dans le rejet de greffe (106) (146).

L'expression constitutive tissulaire des molécules de classe II, qui sont des dimères associant une chaîne  $\alpha$  de 31-34 kDa à une chaîne  $\beta$  de 26-29 kDa, est beaucoup plus restreinte que celle des molécules de classe I (147) (148). Dans le sang, seules les cellules dendritiques, les lymphocytes B et les monocytes en possèdent en surface. Dans les tissus, outre les macrophages et les cellules dendritiques, les molécules de classe II existent sur les endothéliums capillaires et certaines cellules de l'épithélium de l'intestin grêle. Néanmoins, sous l'effet de cytokines comme l'IFN $\gamma$  ou le TNF $\alpha$ , de nombreuses cellules parenchymateuses

et les lymphocytes T peuvent synthétiser et exprimer des molécules HLA de classe II. Inversement l'IL-10, le TGF $\beta$ , l'interféron  $\beta$  inhibent la synthèse des molécules HLA de classe II des APC. Dans un greffon, les principales cellules exprimant les molécules du HLA de classe II du donneur sont les cellules endothéliales. En effet contrairement aux cellules endothéliales de souris et de rat, les cellules endothéliales humaines, de même que les cellules endothéliales de porc, expriment de façon constitutive les molécules de classe II (35) (149). Une étude récente montre que le maintien en culture des cellules endothéliales humaines est associé à la décroissance progressive de l'expression des classe II *in vitro*. Les auteurs de cette étude associent la perte d'expression de HLA-DR à une perte de l'expression du promoteur IV du gène codant pour le facteur transactivateur des classe II, CIITA (« class II Transactivator A »). L'expression constante de HLA-DR peut être maintenue par l'addition au milieu de culture de faibles doses d'IFN $\gamma$ . Une concentration d'IFN $\gamma$  équivalente à la concentration sérique normale, soit environ 15pg/ml, est suffisante pour le maintien de l'expression de HLA-DR par les cellules endothéliales en culture (150). Cette étude montre également que l'expression des molécules HLA-DR par les cellules endothéliales cultivées en présence d'IFN $\gamma$  est efficacement inhibée par l'atorvastatine à 1 $\mu$ M, confirmant l'effet inhibiteur des statines sur le promoteur IV du CIITA (151).

La signalisation et les conséquences fonctionnelles de l'interaction des anticorps anti-HLA de classe II avec les cellules endothéliales vasculaires humaines n'ont pas été étudiées, à ce jour. En revanche, de nombreuses études *in vitro* rapportent la signalisation induite par des anticorps anti-HLA de classe II dans les lymphocytes B et les APC, au sens large, ainsi que les conséquences fonctionnelles qui en découlent.

Les premiers travaux, publiés dès 1986, ont tout d'abord montré que le traitement de lymphocytes B humains avec divers anticorps monoclonaux dirigés contre les molécules HLA-DR ou HLA-DQ avait pour conséquence de réguler les phases précoces de l'activation des lymphocytes B en bloquant la prolifération des B immatures (152). L'effet inhibiteur des anticorps anti- HLA de classe II sur la prolifération des lymphocytes B était confirmé dans une étude publiée à la même époque par un autre groupe (153). Ces travaux suggéraient, en outre, que la signalisation par le HLA de classe II pouvait affecter différentes étapes de l'activation et de la différenciation des lymphocytes B et se distinguait de celle observée avec le HLA de classe I (153). La nature du signal activé par la liaison du HLA de classe II a

ensuite été examinée dans différents types cellulaires en réponse soit à la fixation d'anticorps anti-HLA de classe II soit à la liaison avec le TCR. La signalisation intracellulaire activée par le HLA de classe II est complexe et elle comprend l'activation de tyrosine kinases (154) (155), la mobilisation de Ca<sup>2+</sup>, la production d'AMPc et l'activation des voies NF-κB, MAPK ERK1/2 et du facteur de transcription AP-1 (156) (157) (et pour revue, voir (158)). Les conséquences de cette signalisation sont également multiples incluant l'augmentation de molécules de costimulation telle que CD86 (159), la production de cytokines (160) (161) (162) et de facteurs de croissance, une augmentation de l'adhérence via la surexpression de LFA-1, l'induction de la différenciation des cellules B et l'induction de l'apoptose (131) (163) (164) (165). Les voies de signalisation du HLA-DR conduisant à l'apoptose des lymphocytes B et des APC sont les mécanismes les mieux décrits (131) (132) (154) (164) (166) (167). De plus, différents facteurs peuvent également moduler la nature et la force du signal induit par le HLA de classe II et les conséquences fonctionnelles de cette signalisation. Parmi ces facteurs, on peut citer, le stade d'activation des lymphocytes B, l'haplotype HLA et l'espèce étudiés. D'autres facteurs ont aussi été identifiés tels que l'interférence des signaux intracellulaires produits par le BCR (« B cell réceptor ») ou les corécepteurs du BCR dont CD19 et CD22 (168) ou par CD40 (169). Plus récente est la mise en évidence de l'influence de la voie de capture et de processing de l'antigène sur l'expression membranaire du CMH de classe II et sa signalisation dans les lymphocytes B (159) (170). La signalisation par le HLA de classe II dans les lymphocytes B est donc un phénomène complexe capable de contrôler, selon le contexte physiologique ou pathologique, la maturation, l'activation, la prolifération et la survie des lymphocytes B.

## 3.2. Résultats.

De façon complémentaire au travail réalisé sur la signalisation cellulaire activée par le CMH de classe I dans les cellules endothéliales, j'ai contribué à l'étude de la signalisation cellulaire activée par le CMH de classe II dans les cellules endothéliales initiée par Stéphanie Le Bas-Bernadet à la fin de sa thèse. Pour cette étude, j'ai en particulier mis au point le test d'analyse de la fragmentation d'ADN (« cellular DNA content ») par cytométrie de flux après marquage de l'ADN à l'iodure de propidium ; j' ai utilisé ce test pour comparer l'effet d'anticorps

monoclonaux dirigé contre HLA-DR sur l'apoptose des cellules endothéliales et leucocytaires.

### 3.2.1. Résumé de l'article 2.

Les cellules endothéliales vasculaires humaines en culture perdent rapidement l'expression des molécules HLA de classe II. L'expression du HLA de classe II (HLA-DR, DP et DQ) peut être induite par l'activation des cellules endothéliales par l'IFN $\gamma$ . Toutefois, notre étude comparative indique que l'expression optimale de HLA-DR à la surface des cellules endothéliales activées par l'IFN $\gamma$  reste modérée et inférieure à celle de lignées lymphocytaires B (Raji, Daudi) ou monocyttaire (U937) mais également à celle de lymphocytes B purifiés à partir du même donneur. Nous avons ensuite comparé la capacité des anticorps anti-HLA-DR à induire l'apoptose des cellules endothéliales et des lymphocytes B. Nous montrons que la fixation d'anticorps anti-HLA-DR (monomorphiques ou polymorphiques) induit l'apoptose des lymphocytes B mais n'a pas d'effet sur les cellules endothéliales issues du même donneur. Pour tester l'hypothèse que les cellules endothéliales échappent à l'apoptose en raison de leur faible expression de HLA-DR, nous avons analysé la signalisation intracellulaire induite par le HLA-DR dans les cellules endothéliales. Nos résultats démontrent que la liaison de HLA-DR est suffisante pour induire une modulation de la phosphorylation des protéines tyrosines dans les cellules endothéliales selon un profil spécifique. De plus dans les cellules endothéliales, le signal activé par HLA-DR provoque la phosphorylation de la PKC $\alpha/\beta$  et de la kinase Akt suggérant une activation de la voie PI3-K. En conclusion, l'ensemble de nos résultats suggère que les cellules endothéliales échappent à l'apoptose non pas en raison d'un niveau d'expression de HLA-DR insuffisant à la transduction d'un signal apoptotique, mais plutôt, par l'activation d'une voie de survie impliquant la PI3-K.

L'ensemble des ces résultats est présenté dans **l'article 2**.

### 3.2.2. Article 2.

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

# 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 Soullillou, 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)- $\gamma$ -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- $\gamma$ -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- $\alpha/\beta$  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 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 "Immuno-intervention en Allo et Xénotransplantation" 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)- $\gamma$ -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  $\mu$ g/mL hydrocortisone, 50  $\mu$ g/mL gentamicin, and 50 ng/mL amphotericin B (C-22010; PromoCell, Heidelberg, Germany) at 37°C in a humidified 5% CO<sub>2</sub> 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- $\gamma$  (Imukin, Boehringer Ingelheim, Germany) or 100 U/mL recombinant human tumor necrosis factor-alpha (TNF- $\alpha$ ; 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% NaN<sub>3</sub>, and then incubated on ice for 30 minutes with a saturating con-

centration of primary Ab. After three washes in 1% BSA/0.1% NaN<sub>3</sub>/PBS, cells were incubated with a fluorescein isothiocyanate (FITC)-labeled goat anti-mouse F(ab')<sub>2</sub> 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% NaN<sub>3</sub>/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  $\mu$ g/mL propidium iodide (PI), 100 U/mL RNase A, and 1 mg/mL glucose in PBS ( $1 \text{ mL}/1 \times 10^6$  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

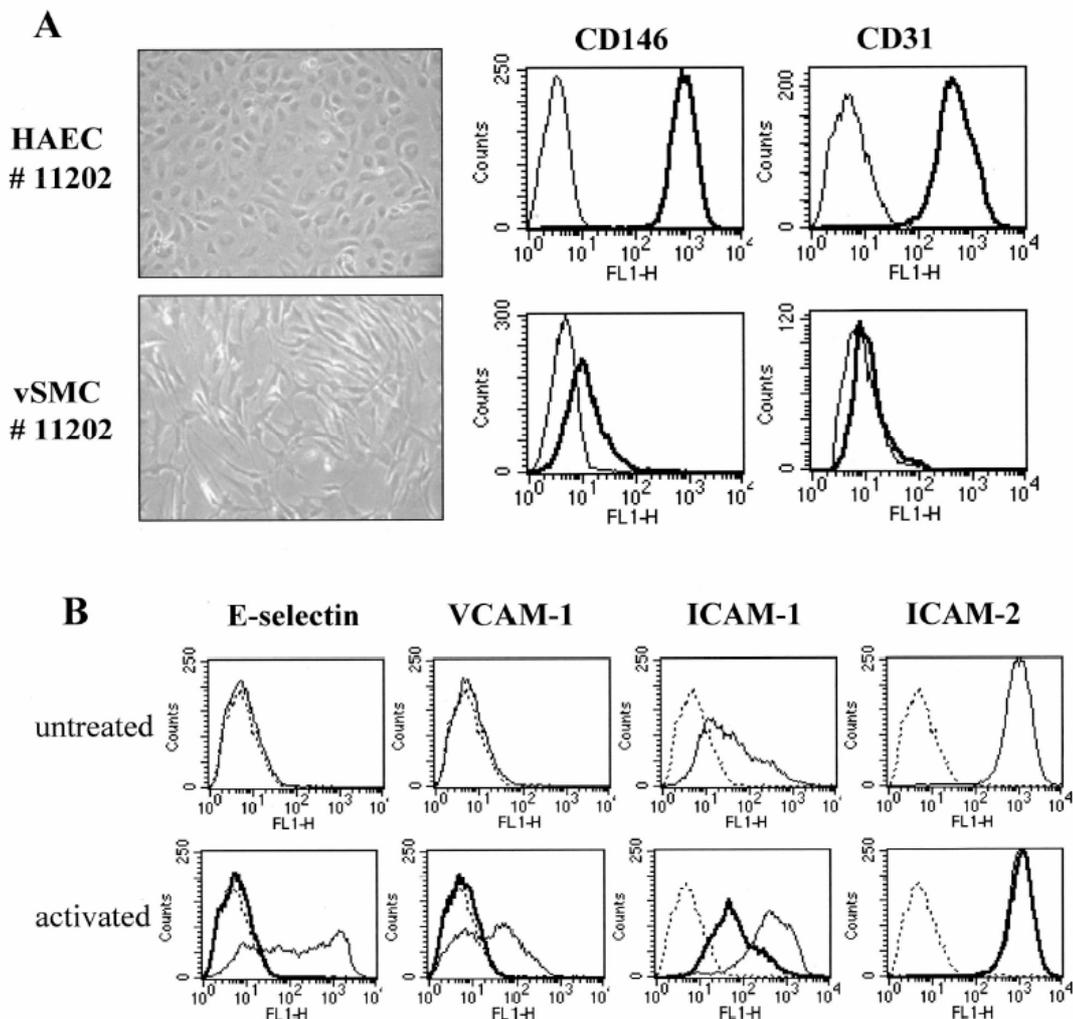
After treatment, floating ECs were collected, and adhesive cells were trypsinized and harvested from six-well plates. The pellet was washed twice in PBS, then resuspended in binding buffer (10 mmol/L HEPES/NaOH [pH 7.4], 140 mmol/L NaCl, and 2.5 mmol/L CaCl<sub>2</sub>). Annexin-V-FITC was added to a final concentration of 100 ng/mL, and the cells were incubated in the dark for 10 minutes, then washed and

resuspended in 300  $\mu$ 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).

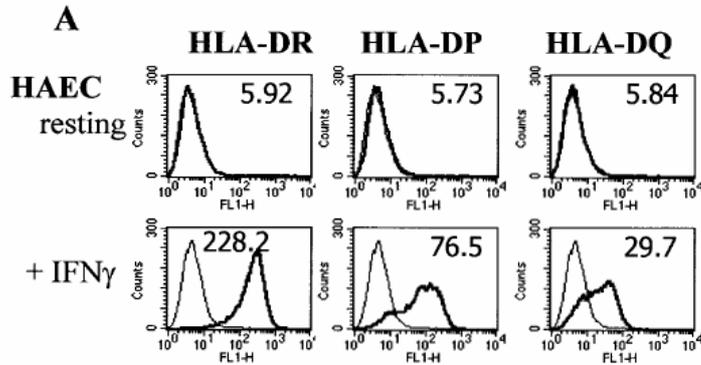
#### Western Blot Analysis

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-

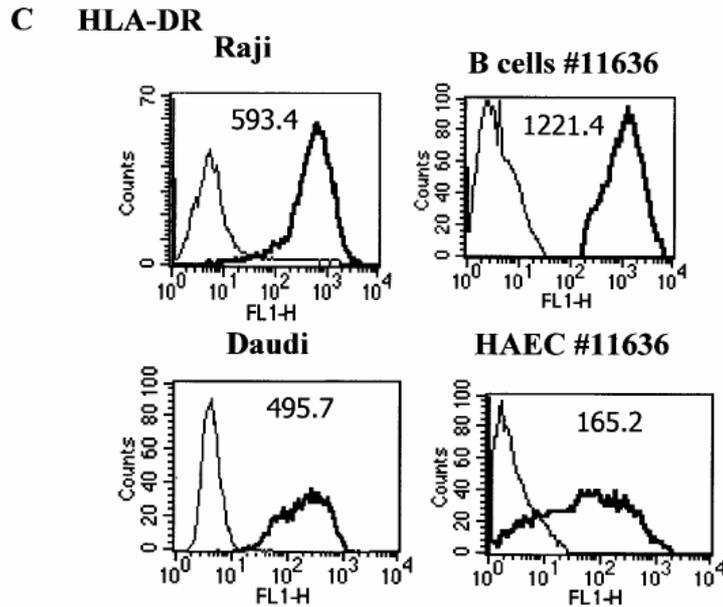
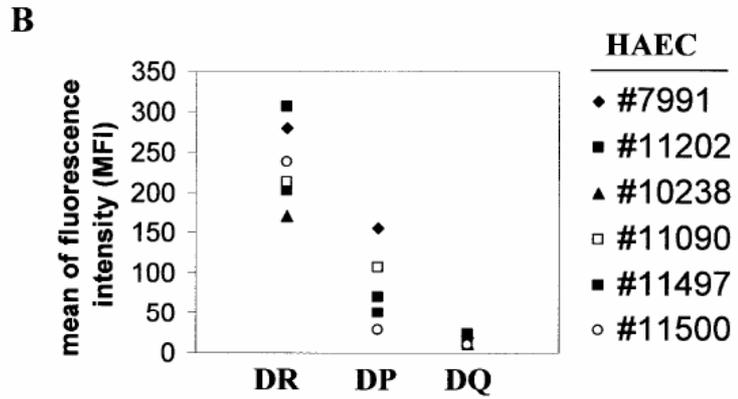
methylsulfonyl fluoride, 0.2 U/mL aprotinin, and 100  $\mu$ g/mL leupeptin. Protein concentrations were measured using BCA Protein Assay Reagent (Pierce, Rockford, IL). Cell lysates (15  $\mu$ g protein) were resolved by sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (10–15%) and subjected to Western immunoblot analysis using the following Abs: rabbit polyclonal IgG antiphospho-PKC- $\alpha$ / $\beta$ 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)- $\alpha$  (100 U/mL, *thin line*) or interferon (IFN)- $\gamma$  (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.



**FIGURE 2.** (A) Expression of human leukocyte antigen (HLA)-DR, -DP, and -DQ on resting and IFN- $\gamma$ -activated ECs. HAECs were cultured for 72 hours with or without 100 U/mL recombinant human IFN- $\gamma$ . After treatment, cells were harvested and incubated with anti-HLA-DR, -DQ, or -DP mAb (*bold lines*). FITC-labeled goat anti-mouse IgG was used as the secondary antibody. Negative controls (*thin line*) were performed by incubating the cells with FITC-labeled goat anti-mouse Ab alone. Mean values for fluorescence intensity are indicated. (B) Comparative analysis of HLA-DR, -DP, and -DQ expression on vascular ECs from individual donors. HAECs from six individual donors were cultured for 72 hours with 100 U/mL recombinant human IFN- $\gamma$ . After treatment, cells were harvested and incubated with anti-HLA-DR, -DQ, or -DP mAb as the primary Ab and then with FITC-labeled goat anti-mouse Ab as the secondary Ab. Data are presented as means of fluorescence intensity (MFI). (C) Comparative analysis of HLA-DR expression on vascular ECs and B cells. HAECs (#11636) were activated with 100 U/mL IFN- $\gamma$  for 72 hours before staining. Anti-HLA-DR (L243) mAb was used as the primary Ab and was detected with FITC-labeled goat anti-mouse IgG. Fluorescence was measured on 10,000 cells/sample using fluorescence-activated cell sorter (FACS). Data are presented in histograms plotting MFI on a four-decade logarithmic scale (x-axis) versus cell number (y-axis).



(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  $\alpha$ -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- $\alpha$  or IFN- $\gamma$  (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.

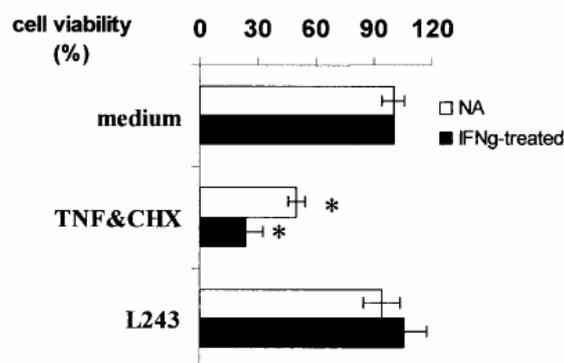
### Expression and Regulation of HLA Class II Molecules on HAECs

Vascular ECs do not constitutively express HLA class II antigens. Expression of HLA-DR, -DQ, and -DP was selectively induced by IFN- $\gamma$  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).

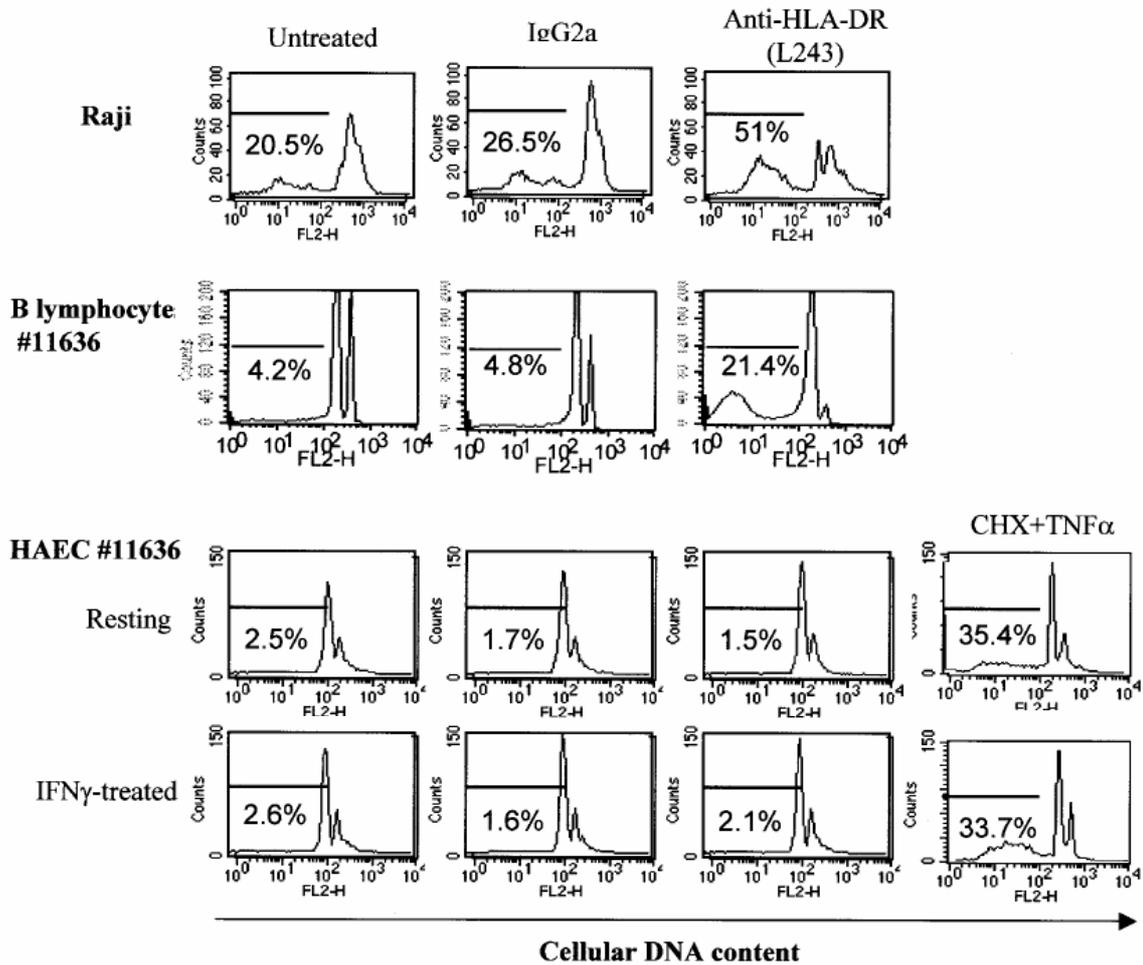
### HLA-DR Ligation on Vascular ECs does not Trigger Apoptosis

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- $\gamma$ -activated HAECs incubated for 24 hours with anti-HLA-DR mAb (L243) or in the presence of TNF- $\alpha$  and cycloheximide (CHX). As previously reported, TNF- $\alpha$  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- $\alpha$  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- $\gamma$ -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- $\alpha$  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- $\gamma$ -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- $\gamma$  for 72 hours and then incubated for 24 hours with culture medium, cycloheximide (CHX, 2.5  $\mu$ g/mL), and TNF- $\alpha$  (100 U/mL) or anti-HLA-DR (L243; 10  $\mu$ 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 5 hours at 37°C, and optical density (OD) was measured at 550 nm.



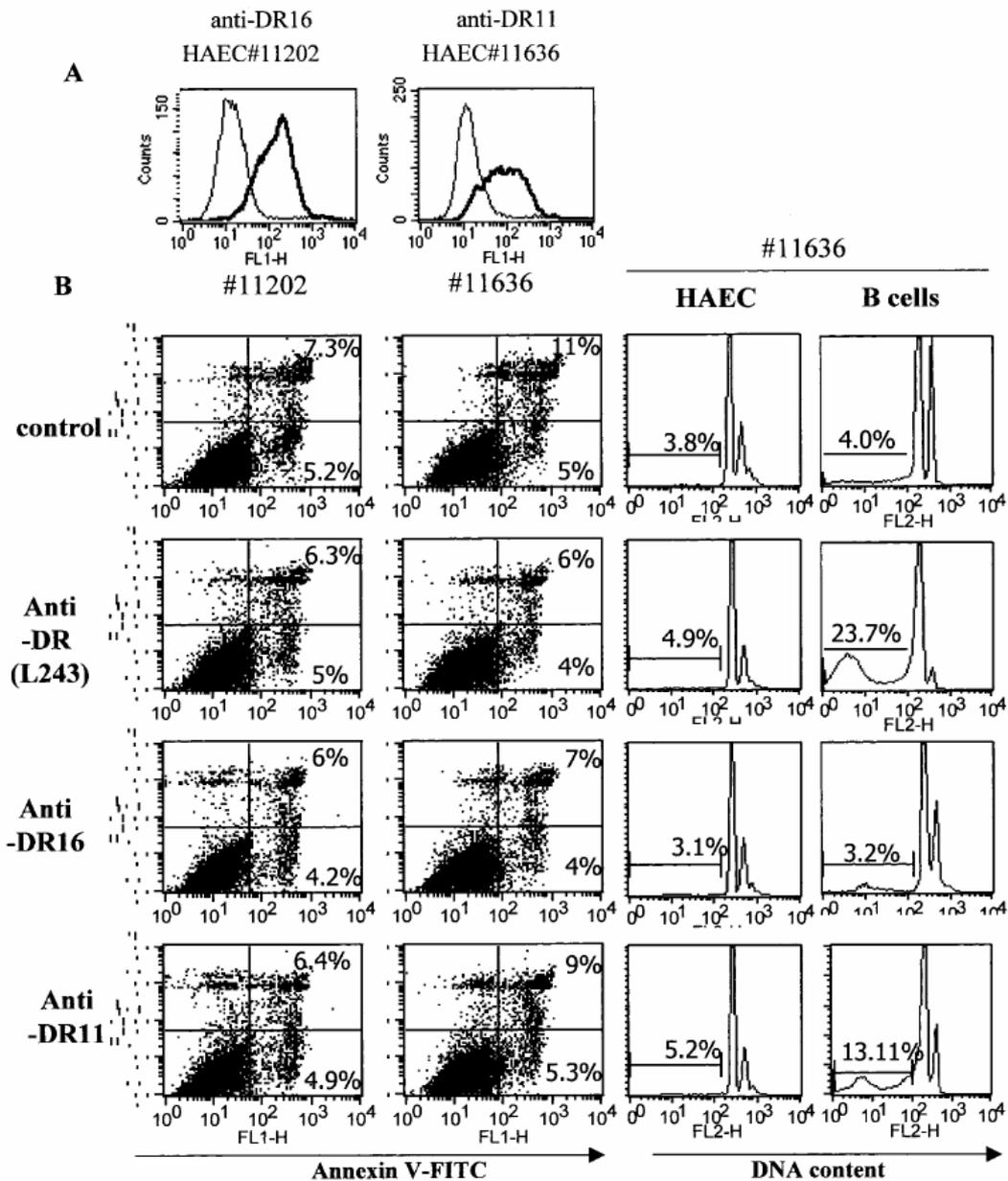
**FIGURE 4.** Comparative effects of monomorphic anti-HLA-DR Ab on EC and B-cell apoptosis. HAECs were preactivated with or without 100 U/mL IFN- $\gamma$  for 72 hours to induce HLA-DR expression. Raji, CD19+ B cells (#11636), and HAECs (#11636) were incubated in culture medium with 10  $\mu$ g/mL anti-HLA-DR mAb (L243) for 48 hours. IgG2a (10  $\mu$ 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/ $1 \times 10^6$  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).

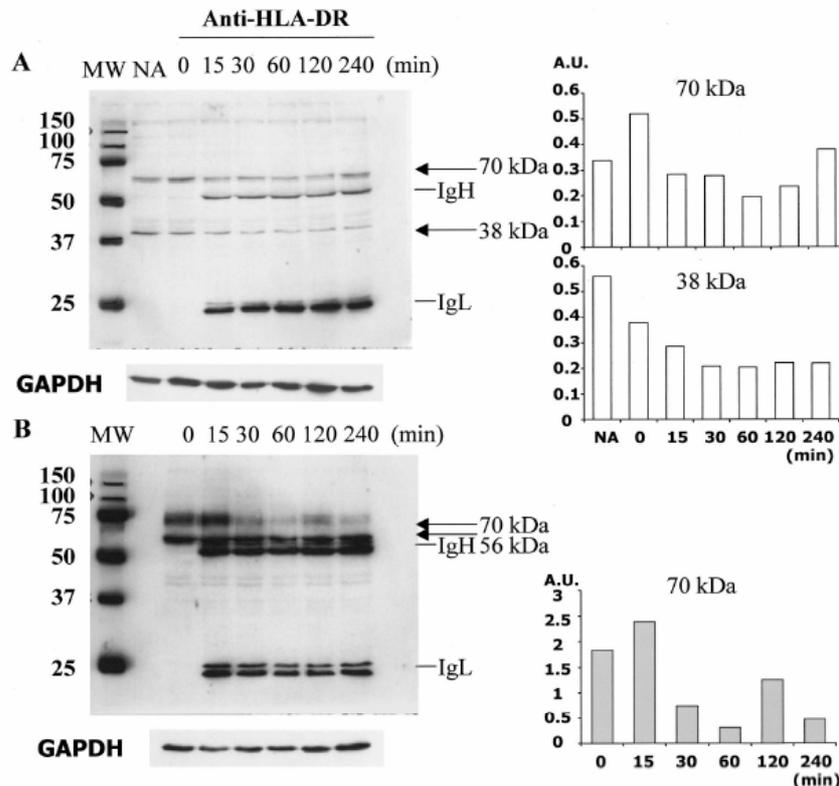
#### Operative Signaling Pathways Mediated by HLA-DR Ligation in ECs

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- $\gamma$  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- $\gamma$  for 72 hours to induce HLA-DR expression. HAECs and purified CD19+ B lymphocytes were incubated for 48 hours in culture medium with 10  $\mu$ 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<sup>6</sup> 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.



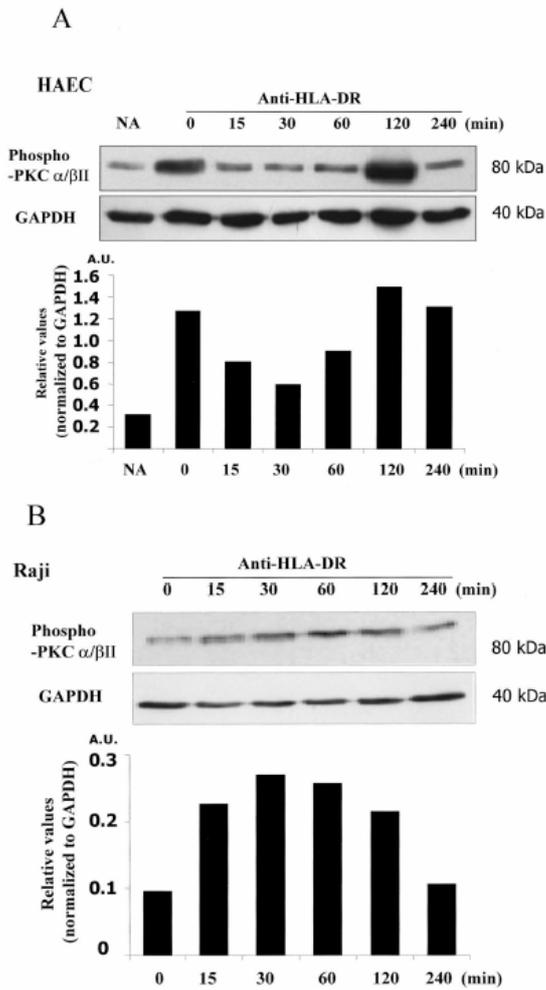
**FIGURE 6.** Pattern of tyrosine-phosphorylated proteins in response to HLA-DR ligation. HAECs were pretreated with IFN- $\gamma$  for 72 hours. HAECs (A) and Raji cells (B) were incubated with 10  $\mu$ g/mL anti-HLA-DR (L243) mAb for the indicated times. After treatment, cell lysates were harvested 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  $\alpha/\beta$  in response to anti-HLA-DR Ab (Fig. 7A). The decrease in PKC- $\alpha/\beta$  phosphorylation was transient, beginning 15 minutes after DR ligation and ending at 120 minutes. In contrast, anti-HLA-DR clearly promoted PKC- $\alpha/\beta$  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- $\alpha/\beta$  may be involved in the signaling pathway mediated by HLA-DR ligation on ECs. Nevertheless, PKC- $\alpha/\beta$  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- $\alpha/\beta$  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- $\alpha/\beta$  and PI3-kinase activation.

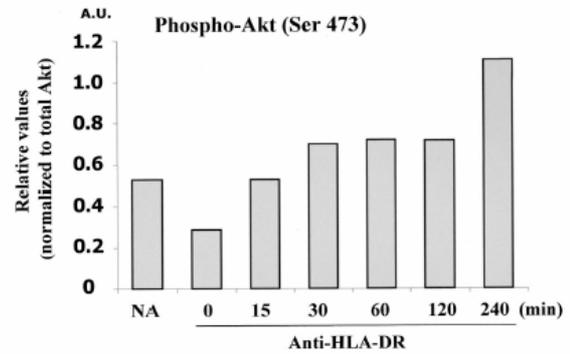
## DISCUSSION

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)  $\alpha/\beta$ II in response to HLA-DR ligation. HAECs (A) and Raji (B) were pretreated with IFN- $\gamma$  for 72 hours and incubated with 10  $\mu$ 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 $\alpha/\beta$ 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- $\gamma$ . 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- $\gamma$  for 72 hours and incubated with 10  $\mu$ 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- $\gamma$  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- $\alpha$  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- $\alpha$ , 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 $\delta$  (25). Recently, Guo et al. (26) demonstrated that HLA-DR-induced PKC- $\beta$  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- $\alpha$  and PKC- $\beta$ , 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- $\alpha/\beta$ II transiently decreased in ECs incubated with anti-DR mAbs, suggesting that DR ligation mediates PKC- $\alpha/\beta$  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- $\alpha$  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- $\alpha/\beta$  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  $\alpha$ - and  $\beta$ -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, Cicciarelli 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, Hadjilias 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- $\alpha$  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- $\kappa$ 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 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 isotypes. *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 C alpha 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.

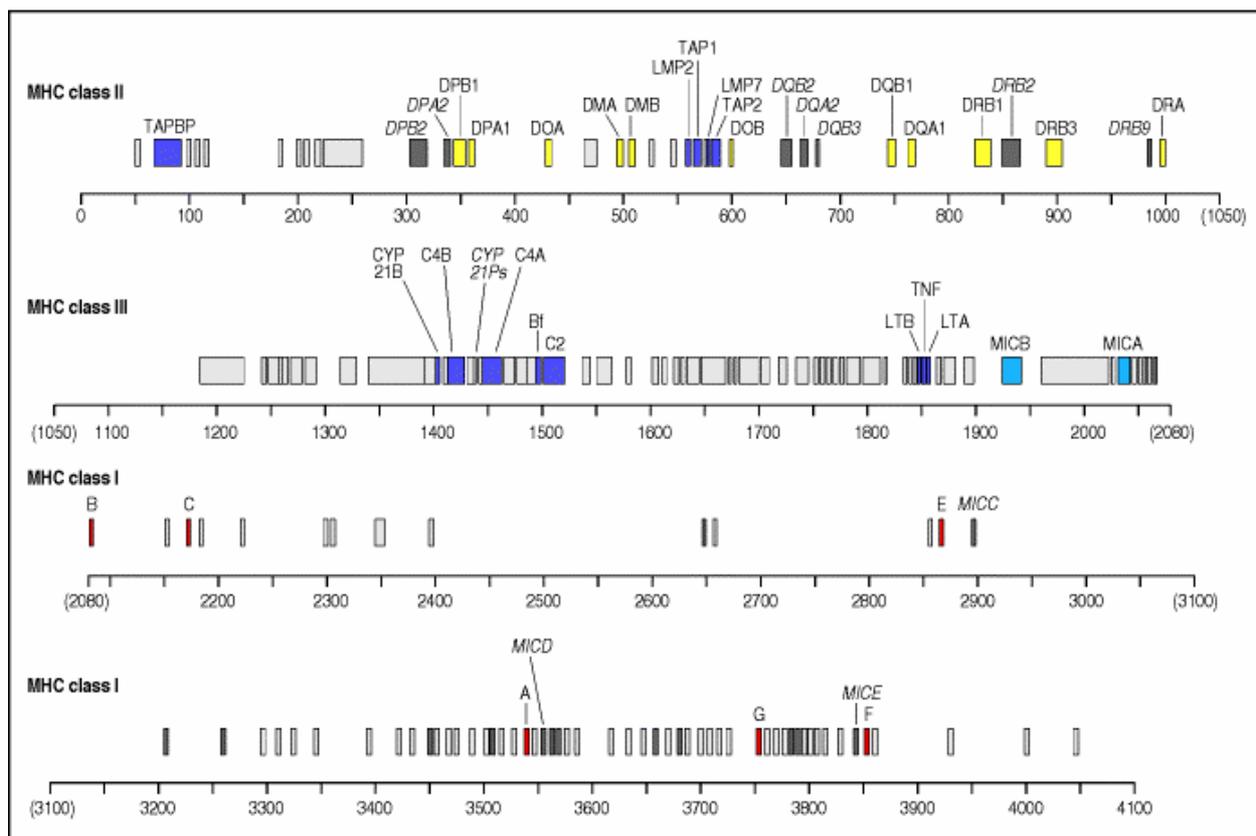
**Chapitre 4.** Expression et Régulation de la molécule HLA-E par les cellules endothéliales et mise en évidence de HLA-E soluble.

## 4. 1. Expression et Fonctions de la molécule HLA-E.

Les cellules endothéliales humaines expriment de façon constitutive les molécules du CMH de classe I dites classiques (ou Ia) HLA-A, HLA-B et HLA-C (171). Si l'on compare les niveaux d'expression à la surface de cellules endothéliales quiescentes, non activées, HLA-A est plus fortement exprimé que HLA-B, lui-même exprimé de façon plus importante que HLA-C. Cette répartition est observée au niveau transcriptionnel, et, elle est corrélée à des variations quantitatives du nombre de molécules exprimées à la surface des cellules endothéliales. La régulation de ces différents allèles au cours de l'activation par des cytokines inflammatoires (TNF $\alpha$ , IFN $\gamma$ ) a fait l'objet de plusieurs études récentes qui ont montré que l'expression transcriptionnelle puis protéique est très fortement régulée pour HLA-B, le taux d'ARN messager pouvant varier d'un facteur 10 en réponse à l'une ou l'autre de ces cytokines. En comparaison, l'expression de HLA-A augmente de façon modérée et celle de HLA-C varie peu (172) (173). Au cours de ma thèse, nous avons entrepris l'étude de la régulation, au niveau transcriptionnel, des différents allèles du HLA de classe I au cours de l'activation endothéliale. Nous avons alors mis en évidence la régulation de la transcription de la molécule du HLA de classe I non classique, ou Ib, HLA-E dans les cellules endothéliales activées.

### 4.1.1. HLA-E : molécule du HLA de classe I non classique.

HLA-E appartient avec HLA-F et HLA-G aux molécules du HLA de classe I dites non classiques ou Ib (174) (175). Contrairement aux molécules du HLA de classe I dites classiques (HLA-A, -B et -C), ces molécules ont un polymorphisme restreint et sont très conservées. Ces caractéristiques ainsi que leur localisation dans le génome suggèrent qu'elles pourraient participer à la reconnaissance antigénique. Néanmoins, leur faible polymorphisme et leur profil d'expression restreint limitent, a priori, leurs fonctions dans le contrôle de la réponse immune. HLA-G, qui est exprimé essentiellement dans le placenta et joue un rôle important dans la protection du fœtus contre la lyse par les cellules « Natural Killer » (NK) maternelles, est probablement la mieux caractérisée des trois molécules de classe Ib (176) (et pour revue voir (177)). En revanche, peu de choses sont connues sur HLA-F (178). HLA-E a été initialement décrite par Koller *et al.* en 1988 (179). Il est intéressant de noter que dans le génome, HLA-E est situé entre HLA-A et HLA-C (voir Figure 11).

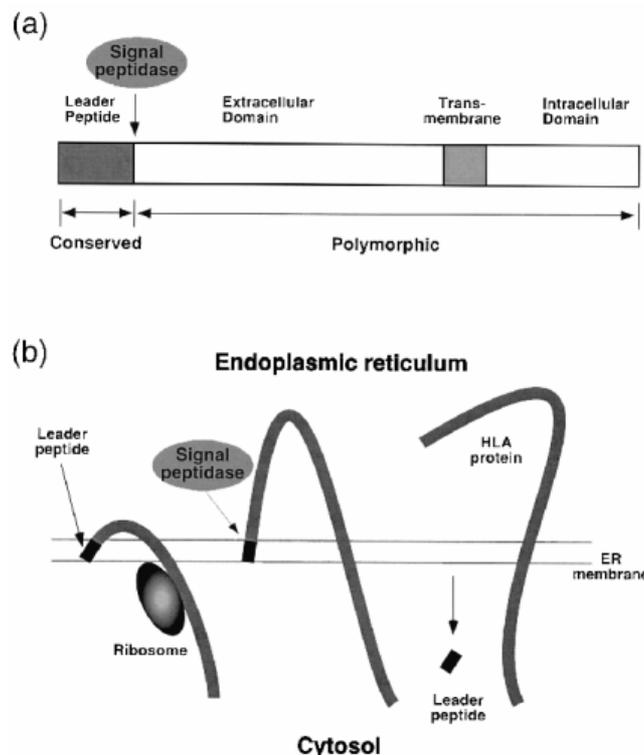


**Figure 11** : Localisation des gènes codant pour les molécules du CMH humain (D'après RD Campbell et J Trowsdale. Map of the human major histocompatibility complex, Immunol Today, 1993, 14 : 350-351.).

Les connaissances acquises sur la molécule Qa-1b, homologue de HLA-E chez la souris, ont permis d'améliorer rapidement la caractérisation de la molécule HLA-E. HLA-E et son homologue murin Qa-1b partagent certaines similarités de séquences, et en particulier, deux résidus sérine en position 143 et 147 substituant respectivement une thréonine et un tryptophane présents dans la poche à peptide de la plupart des molécules de classe I. Les travaux du groupe de Geraghty ont montré que, comme pour Qa-1b, l'expression membranaire de HLA-E nécessite l'expression par la cellule du peptide leader des molécules de classe Ia (180) (181). Au cours de la synthèse des molécules de classe I, le peptide leader, ou peptide signal, qui est situé dans la partie NH<sub>2</sub>-terminale de la protéine, est synthétisé en premier par le ribosome. Une fois synthétisé, le peptide leader interagit avec le « signal recognition particle » qui le transporte avec le ribosome vers le réticulum endoplasmique. Une fois le transport accompli, le peptide est clivé par une signal peptidase (voir [Figure 12](#)). La

séquence MAVMAPRTVLLSGALALTQTTWA du peptide leader est très conservée parmi les molécules de classe I. L'utilisation de peptides de synthèse a permis la mise évidence de la séquence de 9 acides aminés VMAPRTVLL qui se lie à HLA-E (182). Cette séquence est très fortement conservée, un polymorphisme portant sur un acide aminé (thréonine en position 2) a cependant été décrit pour certaines molécules de classe Ia HLA-B (183). Dans ce cas, la présence du résidu thréonine empêche la fixation de HLA-E. Cette particularité ne semble pas avoir de conséquence biologique puisque le peptide leader peut être fourni par les allèles HLA-A et HLA-C. La liaison de HLA-E et du peptide leader est nécessaire pour l'expression membranaire de la protéine, mais également, pour la stabilité de la molécule. Le peptide leader de HLA-G peut également se lier à HLA-E (184). Michaelson et *al.* ont montré récemment la capacité de HLA-E de se lier au peptide leader de la « heat shock protein » (hsp) 60, cette interaction a pour conséquence une augmentation de l'expression de HLA-E et de hsp60 à la surface de la cellule au cours du stress (185).

**Figure 12** : Structure (a) et mode de synthèse (b) des molécules du HLA de classe I HLA-A, -B et -C (D'après O'Callaghan et al. (186)).



## 4.1.2. Fonctions biologiques de la molécule HLA-E.

### 4.1.2.1. HLA-E : Ligand du récepteur CD94/NKG2A.

L'identification des récepteurs de HLA-E a été définie au moyen de tétramères. Ces protéines HLA recombinantes, qui peuvent être marquées avec un fluorochrome pour une analyse en cytométrie de flux, se fixent avec une forte affinité sur les cellules qui portent le TCR spécifique à une combinaison peptide/HLA donnée, et, sont d'un usage courant pour l'identification de populations T alloréactives. L'utilisation de tétramères HLA-E a permis de montrer que les cellules qui fixent HLA-E expriment le CD56 et le CD16, deux marqueurs des cellules NK.

Les cellules NK représentent, chez l'homme, 5 à 10% des leucocytes du sang périphérique, elles sont globalement caractérisées par l'absence d'expression de CD3 et par l'expression de CD16 (FcγRIII, récepteur pour le fragment Fc des IgG) et de la molécule CD56 (molécule d'adhésion de type N-CAM). Cellules relais entre immunités naturelle et acquise, les NK se caractérisent de façon générale par leur activité cytotoxique vis-à-vis des cellules déficientes en molécules du CMH de classe I. Le phénomène de reconnaissance des cellules cibles par les NK est finement régulé par un ensemble de signaux positifs et négatifs contrôlés par l'expression de récepteurs activateurs et inhibiteurs. Deux familles de récepteurs NK ont été identifiées à ce jour chez l'homme, chacune comprend à la fois des récepteurs capables d'activer ou d'inhiber l'activité cytotoxique des NK (pour revue, voir (187)) :

- *les récepteurs de la superfamille des immunoglobulines* comprennent les KIR ou « killer immunoglobulin-like receptor » (ou CD158). Selon le nombre de domaines « Immunoglobulin-like », ces molécules sont appelées 2D ou 3D. De plus, la longueur de la partie intra-cytoplasmique (longue associée à une activité inhibitrice, ou, courte associée à une activité activatrice) permet une seconde subdivision : L et S. KIR2DL1 à 5 possèdent une spécificité de reconnaissance pour les allèles HLA-C, KIR3DL1 est spécifique d'allèles HLA6B, et, KIRDL2 spécifique de HLA-A. Les KIR activateurs sont KIR2DS1 à 5 et KIR3DS1. Comme d'autres protéines à fonction inhibitrice, les KIR inhibiteurs possèdent 2 séquences ITIM (« Immunoreceptor Tyrosine-based Inhibition Motif ») capables d'activer les phosphatases SHP1 ou 2. Les récepteurs KIR activateurs ne possèdent pas de séquences ITIM mais transmettent un signal activateur via une molécule associée, DAP12. Chaque chaîne du dimère possède un ITAM (« Immunoreceptor Tyrosine-based Activation Motif »).

- les récepteurs de type *C-lectine* sont des hétérodimères de la molécules CD94 liées par des ponts disulfure à NKG2A, B, C ou E.

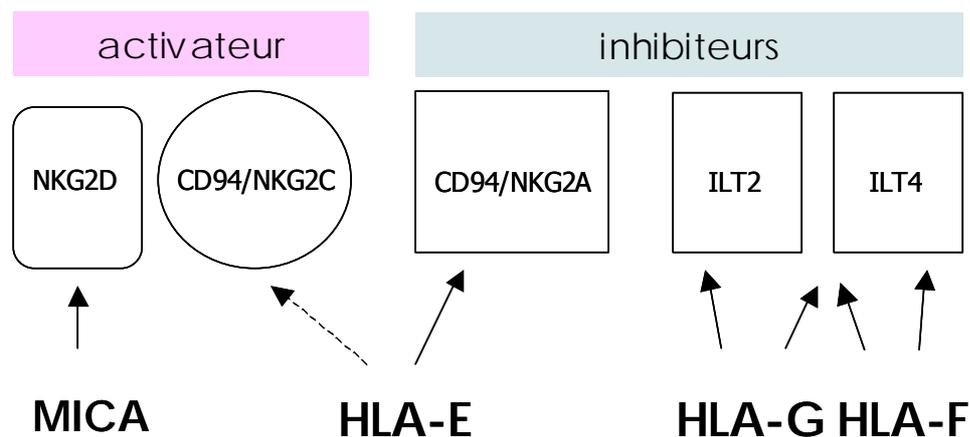
On distingue :

- 1) Récepteurs NKG délivrant un signal inhibiteur via un motif ITIM: (I/L/V)<sub>x</sub>Y<sub>xx</sub>(L/V).
- 2) Récepteurs NKG délivrant un signal activateur. Le signal est délivré par l'intermédiaire des molécules associées:

- DAP12 qui possède un motif ITAM: Y<sub>xx</sub>(L/I)<sub>x<sub>7</sub>-x<sub>8</sub></sub>Y<sub>xx</sub>(L/I)
- DAP10 qui recrute la PI-3-kinase.

Ces récepteurs à domaines « C-type lectin homology » reconnaissent des molécules HLA-E ou d'autres molécules homologues de classe Ib (MICA, MICB) (voir [Figure 13](#)).

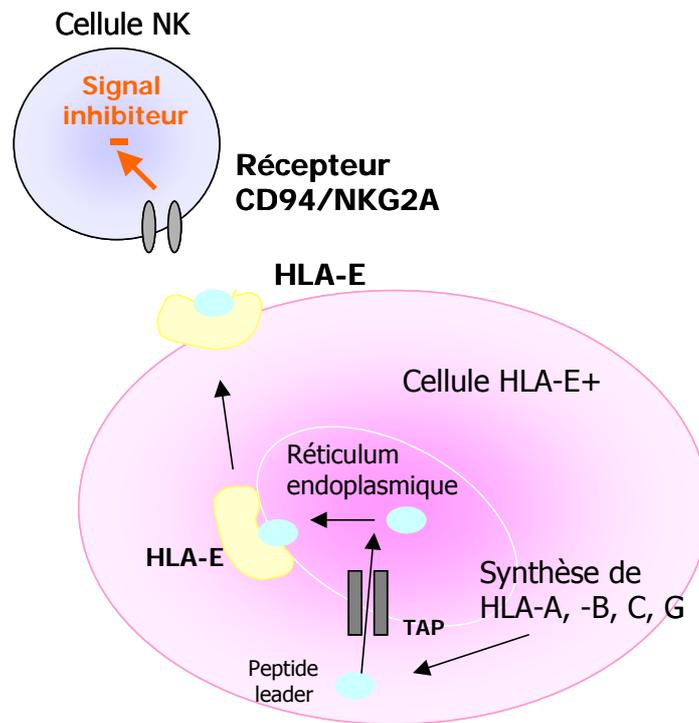
**Figure 13** : Représentation schématique des interactions des molécules de classe I non classiques avec leurs récepteurs.



Le blocage spécifique de cette interaction par un anticorps dirigé contre l'hétérodimère CD94/NKG2A et les expériences de transfection de ce récepteur conduisant à la fixation des tétramères de HLA-E ont permis d'identifier HLA-E comme le ligand du récepteur CD94/NKG2A, B ou C (184) (188) (189) (190) (191). L'interaction de HLA-E avec CD94/NKG2A produit un signal inhibiteur protégeant la cellule qui exprime HLA-E de la lyse par les cellules NK selon le schéma présenté dans la [Figure 14](#). Cette protection est rompue par un anticorps bloquant anti-CD94/NKG2A ou anti-HLA-E (184) (188). Il convient également de noter que le récepteur CD94/NKG2A est aussi exprimé par une petite

population de lymphocytes T représentant 5% des T CD8+. L'expression de ce récepteur s'étend à la majorité des T CD8+ lors d'une activation du TCR.

**Figure 14** : Interaction de la molécule HLA-E avec le récepteur CD94/NKG2A des cellules NK conduisant à un signal inhibant la lyse des cellules cibles.



#### 4.1.2.2. HLA-E et présentation antigénique aux lymphocytes T CD8+ : activation et immunosuppression ?

Les lymphocytes T CD8<sup>+</sup> cytotoxiques (CTL) exprimant le TCRαβ reconnaissent généralement les peptides en association avec les molécules du CMH de classe I classique (HLA-A, -B, -C, chez l'homme). Globalement, il existe assez peu d'informations sur la reconnaissance des molécules de classe I non classiques (HLA-E, -F, -G) par les lymphocytes T. Cependant, plusieurs études indiquent que HLA-E représente un nouvel élément de restriction pour l'activation lymphocytaire et la génération de CTL. Dans des conditions physiologiques, HLA-E s'associe à des peptides dérivés des séquences leader de différentes molécules de classe I -HLA-A, -B, -C et aussi -G- (183) (188). De plus, des études récentes ont également montré que HLA-E peut présenter des peptides issus de virus dont le Cytomégalovirus, l'Epstein-Barr virus et l'Influenza virus (192) (193), de bactéries

(*Mycobacterium tuberculosis*) (194), mais aussi, des protéines de choc thermique telles que hsp60 (185) (192) (193). De plus, il a été proposé que certains peptides issus du TCR V $\beta$  s'associent à HLA-E exprimé par les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> et induisent une réponse CD8<sup>+</sup> CTL (195). Différentes études chez la souris montrent que l'homologue murin de HLA-E, Qa-1, joue un rôle important dans la réponse immune anti-infectieuse en présentant des nonapeptides bactériens et en induisant la production de CTL spécifiques. Par ailleurs, une sous-population de T CD8<sup>+</sup>, les cellules NK-T reconnaissent également de façon spécifique HLA-E (196) (197). Ces cellules possèdent une activité cytotoxique de large spectre dirigée contre de nombreuses cibles cellulaires allogéniques sensibles à la cytolysse par les NK. Ces cellules NK-T ou NK-CTL sont caractérisées par un phénotype mémoire et l'expression membranaire de récepteurs NK inhibiteurs (198). Une propriété de ces cellules est leur capacité à proliférer en réponse à des cellules allogéniques en culture mixte. Les travaux du groupe de Léonard Chess suggèrent aussi un rôle important de HLA-E dans le développement de certaines populations T régulatrices, et, plus particulièrement, des cellules T CD8<sup>+</sup> suppressives (199) (200). La fonction première des cellules T suppressives est d'inhiber la croissance de cellules T CD4<sup>+</sup> activées autoréactives. Ces études proposent de nouvelles approches de thérapie cellulaire utilisant HLA-E pour le contrôle des maladies autoimmunes par la génération de cellules T suppressives spécifiques (199).

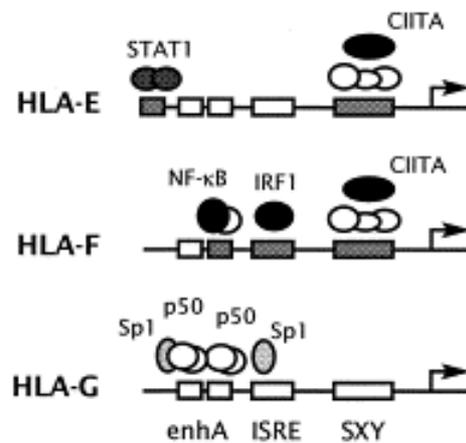
### 4.1.3. Expression et régulation de la molécule HLA-E .

#### 4.1.3.1. Expression et régulation transcriptionnelle de HLA-E.

L'analyse de la transcription du gène codant pour HLA-E par Northern blot a permis d'identifier deux transcrits de 1,8 et 2,7 kb (180). Ces transcrits ne sont pas le résultat d'un épissage alternatif puisque la séquence en 5' des deux messagers est identique (jusqu'à l'extrémité 3' de l'exon 4), ils codent pour la même protéine et ne diffèrent que par la taille de leur région 3' non traduite (201). Le ratio entre ces deux transcrits est variable selon les cellules et leur état d'activation, l'ARN messager de 1,8 kb étant plus abondant dans les cellules activées.

La régulation transcriptionnelle des molécules HLA-E, -F et -G a fait l'objet d'une étude comparative qui a montré que l'expression de HLA-F est sous le contrôle du facteur de transcription NF- $\kappa$ B, de « l'Interferon Regulatory Factor 1 » (IRF-1) et de CIITA. HLA-E est induite par CIITA et par l'IFN $\gamma$ . Enfin, HLA-G se distingue de HLA-E et -F puisqu'il n'est

sous le contrôle ni de CIITA, ni de NF- $\kappa$ B ni du facteur IRF-1 ; sa régulation fait intervenir les facteurs RFX et SP1 (202).



**Figure 15 :** Facteurs contrôlant la transcription et l'expression des molécules du HLA de classe I non classique HLA-E, HLA-F et HLA-G ( d'après Gobin et al. 2000 (202)).

#### 4.1.3.2. Expression de la molécule HLA-E *in vitro* et *in vivo*.

Bien qu'initialement mise en évidence dans les lymphocytes T (179), l'expression des ARN messagers codant pour HLA-E semble ubiquitaire avec des variations quantitatives selon les types cellulaires (180) (203). En revanche, peu de choses sont connues sur l'expression protéique de ces molécules *in vitro* et *in vivo*. En effet, la plupart des études définissant les propriétés et fonctions de la molécule HLA-E ont été réalisées à l'aide de lignées cellulaires transfectées. Cette absence de cartographie s'explique par l'absence, jusqu'à une date récente, d'anticorps spécifiques nécessaires à ce genre d'étude. Néanmoins, les anticorps anti-HLA-E produits par différents groupes ont permis de mettre en évidence l'expression de cette molécule dans certaines cellules du trophoblaste (204), des lymphocytes normaux ou transformés par l'EBV (205) et dans des lignées de cellules tumorales (206). De façon intéressante, les travaux de Menier *et al.* visant à caractériser et à valider plusieurs anticorps monoclonaux dirigés spécifiquement contre HLA-E ou HLA-G, ont montré que les cellules endothéliales du trophoblastes expriment HLA-E.

## 4.2. Résultats : Expression et Régulation de la molécule HLA-E par les cellules endothéliales et mise en évidence d'une forme soluble.

### 4.2.1. Résumé de l'article 3.

La molécule HLA-E appartient avec HLA-F et HLA-G aux molécules du HLA de classe I dit non classique ou Ib. HLA-E joue, par son interaction avec le récepteur avec CD94/NKG2A, un rôle encore mal défini dans des processus d'immunorégulation liant les réponses immunitaires, innée et adaptative. Bien qu'initialement mise en évidence dans les lymphocytes T, l'expression des ARN messagers codant pour HLA-E semble ubiquitaire avec des variations quantitatives selon les types cellulaires. Peu de choses sont connues chez l'homme sur l'expression protéique de ces molécules *in vitro* et *in vivo*. Cette absence de cartographie s'explique par l'absence, jusqu'à une date récente, d'anticorps spécifiques utilisables chez l'homme. Dans cette étude, nous avons montré que l'expression de HLA-E est en fait restreinte à un petit nombre de types cellulaires dont les cellules endothéliales humaines. En effet, l'analyse par immunohistologie révèle que *in vivo* HLA-E est essentiellement exprimée par les cellules endothéliales dans les différents tissus testés (rein, foie, estomac...). Dans les organes lymphoïdes (rate et ganglions lymphatiques), où HLA-E est fortement exprimé par les lymphocytes B et T ainsi que par les monocytes/macrophages, HLA-E est exprimé par cellules endothéliales des capillaires lymphatiques et par les cellules endothéliales des « High Endothelial Venule ». *In vitro*, nous avons montré que l'expression membranaire de HLA-E est fortement augmentée au cours de la stimulation des cellules endothéliales humaines, issues de veine ombilicale ou d'artère rénale (HUVEC et HAEC), par les cytokines pro-inflammatoires TNF $\alpha$ , IFN $\gamma$  et IL-1 $\beta$ . L'effet le plus important est observé en présence de TNF $\alpha$  et d'IFN $\gamma$  suggérant un effet additif de ces deux cytokines pour la régulation de l'expression de HLA-E. De plus, nous montrons que l'activation endothéliale est associée, non seulement à la sur-expression en surface de HLA-E, mais également, à la production de HLA-E soluble (sHLA-E) dans le surnageant de culture des cellules activées. De la même façon que pour l'expression membranaire, l'association du TNF $\alpha$  et de l'IFN $\gamma$  produit la plus importante production de sHLA-E dans les surnageants de culture. La présence de sHLA-E dans les surnageants est détectée dès 18 heures d'activation est maximale à 48 heures. Lors de cette étude nous avons montré que l'inhibition de la synthèse protéique par le

cycloheximide ou d'exocytose par la bréfeldine A abolit la production de sHLA-E dans le surnageant de culture des cellules endothéliales activées par les cytokines. Inversement, l'inhibition des protéases lors du traitement par les cytokines augmente fortement l'expression membranaire de la molécule HLA-E. L'ensemble de ces résultats suggère la contribution au moins partielle du clivage protéolytique dans la production de sHLA-E. Nos résultats sont aussi les premiers à suggérer que sHLA-E est absent dans le sérum de sujets sains mais présent dans le sérum de patients atteints de vascularites à ANCA. La molécule HLA-E pourrait donc représenter un marqueur spécifique de la dysfonction endothéliale au cours des vascularites à ANCA mais aussi avoir un rôle dans les mécanismes immunologiques responsables de cette inflammation vasculaire.

L'ensemble des ces résultats est présenté dans **l'article 3**.

#### 4.2.2. Article 3.

Coupel Stéphanie, Moreau Anne, Hamidou Mohamed, Horesji Vaclav, Jean-Paul Soulillou and Béatrice Charreau.

Expression and Release of soluble HLA-E feature Endothelial Cell Activation and provide new Immunoregulatory Functions to the Endothelium .

(2006) *article en révision dans Blood*.

[Blood](#). 2006 Dec 19; [Epub ahead of print]

### Expression and release of soluble HLA-E is an immunoregulatory feature of endothelial cell activation.

- [Coupe](#)l S, [Moreau](#) A, [Hamidou](#) M, [Horejsi](#) V, [Soulillou](#) JP, [Charreau](#) B.

Institut National de la Sante Et de la Recherche Medicale, Unit 643, Institut de Transplantation et de Recherche en Transplantation, Nantes, France.

HLA-E belongs, with HLA-G and HLA-F, to the nonclassic MHC class I (Ib) molecules, broadly defined by a limited polymorphism and a restricted pattern of cellular expression. In contrast to HLA-G, the expression and function of HLA-E and HLA-F in physiological and pathologic processes remain poorly established. In the present study, we show that HLA-E protein expression, in normal human nonlymphoid organs is mainly restricted to endothelial cells (ECs). HLA-E is also basally expressed by B and T lymphocytes, NK cells and by macrophages. We demonstrate that TNFalpha, IL-1beta and IFNgamma up-regulate the cell surface expression of HLA-E on ECs in vitro and induce the release of soluble HLA-E (sHLA-E). HLA-E up-regulation protects IFNgamma-activated ECs from NK-mediated cell lysis while sHLA-E protects bystander cells. Finally, sHLA-E is not detected in normal sera and increased serum levels correlate with disease activity in patients with anti-neutrophil cytoplasmic antibody-associated systemic vasculitis. Thus, HLA-E expression and release of sHLA-E are features of EC activation and emphasize immunoregulatory functions of the endothelium. The present identification of soluble HLA-E molecules may have important implications in understanding the pathogenesis of immune-mediated vascular diseases and for the diagnosis and monitoring of patients.

PMID: 17179229 [PubMed - as supplied by publisher]

**Expression and release of soluble HLA-E is an immunoregulatory feature of endothelial cell activation**

Stéphanie Coupel<sup>1</sup>, Anne Moreau<sup>2</sup>, Mohamed Hamidou<sup>3</sup>, Vaclav Horejsi<sup>4</sup>, Jean-Paul Soulillou<sup>1</sup> and Béatrice Charreau<sup>1</sup>

From Institut National de la Santé Et de la Recherche Médicale<sup>1</sup>, Unit 643, Institut de Transplantation et de Recherche en Transplantation, Nantes, France ; <sup>2</sup> CHU Hôtel-Dieu, Service d'Anatomo-Pathologie, Nantes, France ; <sup>3</sup>CHU Hôtel-Dieu, Service de médecine interne, Nantes, France ; <sup>4</sup>Institute of Molecular Genetics, Praha, Czech Republic.

**Authors' contributions :** S. Coupel designed the research and performed the experiments; A. Moreau performed immunohistochemistry analysis; M. Hamidou provided sera from patients with AASV and analyzed the data; Vaclav Horejsi contributed new anti-HLA-E monoclonal antibodies; J.P. Soulillou analyzed data; and B. Charreau designed and performed the experiments and wrote the paper.

Short title: **Endothelial expression and release of HLA-E**

**Word counts :** total, 5028 (text); abstract, 196

**Corresponding author:** Dr. Béatrice Charreau, PhD, INSERM U643, 30 bd J. Monnet, Nantes, F-44093 France. Phone: +33 2 40 08 74 16; Fax: +33 2 40 08 74 11; e-mail: [Beatrice.Charreau@univ-nantes.fr](mailto:Beatrice.Charreau@univ-nantes.fr)

**Reprints:** Béatrice Charreau , INSERM U643, 30 bd J. Monnet, Nantes, F-44093 France.

**Notes :** This work was supported by a grant "Recherche et Greffe 2005" from l'Agence de Biomédecine and a grant from the Société de Néphrologie.

**Abbreviations:**

AASV, anti-neutrophil cytoplasmic antibody-associated systemic vasculitis ; ANCA, anti-neutrophil cytoplasmic antibodies ; BrfA, brefeldin A ; CHX, cyclohexamide ; CRP, C reactive protein ; EC, endothelial cell ; HAEC, human arterial endothelial cell ; HUVEC, human umbilical vein endothelial cell ; MPA, microscopic polyangiitis ; sHLA-E, soluble HLA-E ; VEGF, vascular endothelial growth factor ; WG, Wegener's granulomatosis.

## Abstract

(196 words)

HLA-E belongs, with HLA-G and HLA-F, to the nonclassic MHC class I (Ib) molecules, broadly defined by a limited polymorphism and a restricted pattern of cellular expression. In contrast to HLA-G, the expression and function of HLA-E and HLA-F in physiological and pathologic processes remain poorly established. In the present study, we show that HLA-E protein expression, in normal human nonlymphoid organs is mainly restricted to endothelial cells (ECs). HLA-E is also basally expressed by B and T lymphocytes, NK cells and by macrophages. We demonstrate that TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$  and IFN $\gamma$  up-regulate the cell surface expression of HLA-E on ECs *in vitro* and induce the release of soluble HLA-E (sHLA-E). HLA-E up-regulation protects IFN $\gamma$ -activated ECs from NK-mediated cell lysis while sHLA-E protects bystander cells. Finally, although not detectable in normal sera, presence of sHLA-E in the sera correlates with disease activity in patients with anti-neutrophil cytoplasmic antibody-associated systemic vasculitis. Thus, HLA-E expression and release of sHLA-E are features of EC activation and emphasize immunoregulatory functions of the endothelium. The present identification of soluble HLA-E molecules may have important implications in understanding the pathogenesis of immune-mediated vascular diseases and for the diagnosis and monitoring of patients.

## INTRODUCTION

HLA-E belongs, with HLA-G and HLA-F, to the non-classical MHC class I (Ib) molecules, broadly defined by a limited polymorphism and a restricted pattern of cellular expression.<sup>1</sup> HLA-G plays an important role in immune tolerance during pregnancy, and in the escape of tumors from immune control. By contrast, the expression and function of HLA-E and HLA-F in physiological and pathological processes remain poorly established. Among Ib molecules, HLA-E was initially characterized by a broad pattern of mRNA expression in different cell types.<sup>2</sup> Nevertheless, the surface expression of HLA-E requires the availability of a set of highly conserved nonameric peptides derived from the leader sequence of various HLA class I molecules including HLA-A, -B, -C, and -G<sup>3,4</sup>, suggesting that HLA-E cell surface expression may be limited to some cell type and/or cell activation processes.

HLA-E has been identified as a ligand of CD94/NKG2A and CD94/NKG2C receptors expressed on natural killer (NK) cells and a subset of T cells.<sup>5,6</sup> The interaction of HLA-E with the inhibitory CD94/NKG2A receptor results in inhibition of NK cell- and cytotoxic T lymphocyte (CTL)-dependent lysis.<sup>5,7</sup> HLA-E molecules not only provide a protective pathway but also play a role in the regulation of T cell function. HLA-E complexed with peptides can interact with  $\alpha\beta$  and  $\gamma\delta$  TCRs expressed on CD8<sup>+</sup> T cells to trigger conventional CTL function.<sup>8-10</sup> HLA-E forms a heterodimer with  $\beta$ 2-microglobulin, which binds and presents peptides derived from self or foreign proteins<sup>10</sup> after infection<sup>11</sup>, immunization or transplantation<sup>12</sup>. Finally, *in vitro* studies using human cells<sup>10</sup> and the demonstration that Qa-1 (homologous to HLA-E in mice)-deficient mice<sup>13</sup> have defects in immunoregulation mediated by CD8<sup>+</sup> T cells also provide evidence of the involvement of HLA-E-restricted CD8<sup>+</sup> suppressor cells in controlling the adaptive immune response to both foreign and self antigens.<sup>14,15</sup> Together, these findings suggest that HLA-E may have unique regulatory

functions in both the innate and cognate immune responses. Nevertheless, unlike HLA-G, the expression and function of HLA-E in physiological and pathologic processes remain poorly established. Indeed, although HLA-E transcripts have been detected in almost all cell types, only few *in vitro* experiments have examined protein and cell surface expression<sup>16-19</sup> and *in vivo* analysis of HLA-E expression and function still need to be explored.

The endothelium is a functional barrier between the vessel wall and the blood stream. It exhibits a variety of important functions, including control of coagulation, fibrinolysis, vascular tone, growth, and immune responses<sup>20</sup>. It is now clear that activation of the endothelium disturbs the physiological protective regulatory balance, this is a critical factor in the progression of inflammatory and autoimmune diseases, in atherosclerosis and in transplant rejection.<sup>21</sup> Human vascular ECs basally display class I and II MHC-peptide complexes on their surface as well as some costimulatory molecules, enabling them to activate CD8+ and CD4+ T cells.<sup>22</sup> For instance, the vascular endothelium of an allograft is a primary target for immune-mediated rejection and activation of resting CD8+ T cells to effector CTL occurring after recognition of MHC class I-expressing EC that leads to EC damage and vascular injury.<sup>23</sup> Endothelial graft cells may also elicit humoral, donor-specific, anti-MHC response following transplantation. We have shown that, beyond complement activation, antibody-mediated cross-linking of donor MHC-class I<sup>24</sup> and class II<sup>25</sup> molecules on human ECs results in EC activation implicating specific signaling pathways. However, whether other MHC related molecules including the non classical class I MHC molecules could be expressed on ECs and trigger either humoral or cellular response, or both, has been proposed but remains to be studied. Here, we investigated HLA-E protein expression *in vivo* and explored both regulation and function of HLA-E molecules on vascular endothelium *in vitro* and *in vivo*.

## MATERIALS AND METHODS

### **Tissue samples and sera**

Comparative expression of HLA-E and HLA-G proteins was studied in various normal human tissues including first-trimester placenta tissue, kidney, lymph node, spleen, salivary gland, urinary bladder, thyroid, endometrium, skin, stomach and liver. For each tissue, at least 3 independent samples were immunostained and analyzed. Tissues were fixed in 10% formalin and routinely processed for paraffin embedding. Serum samples (n=22) from 10 patients with ANCA-associated vasculitis (WG and MPA) were analyzed. Disease activity was scored using the validated Birmingham Vasculitis Scoring Index (BVAS). Serum samples were obtained in the active phase (at diagnosis or relapse) and in remission (6 to 9 months later). The study was performed according to the guidelines of the local ethics committee (CCPRB, CHU de Nantes, France). Sera from healthy blood donors (n=9 individuals and a pool of 20 donors) were provided by EFS (Nantes, France) and used as controls. CRP level was determined by turbidimetry. Quantification of the levels of sIL-2R $\alpha$ , IL-8, thrombomodulin and VEGF was carried out using ELISA kits (Quantikine assays; R&D Systems, Abington, UK) performed, in triplicates according to the manufacturer's instructions.

### **Anti-HLA-E-specific antibodies**

The following anti-HLA-E-specific mAbs were used : MEM-E/02, MEM-E/07 and MEM-E/08 whose HLA-E specificity was previously defined by flow cytometry on the Third International Conference on HLA-G (Paris, July 2003) and confirmed in independent studies.<sup>19,26</sup> MEM-E/02 recognizes the denaturated form of HLA-E molecules and was used for western blotting and immunohistochemistry. MEM-E/07 and MEM-E/08 mAbs recognize the native surface HLA-E molecule and were used for confocal microscopy, fluorescence-

activated cell sorting (facs) analysis and cytotoxicity assays. In contrast with MEM-E/03 and MEM-E/06, which exhibit the broadest cross-reactivities, MEM-E/02, MEM-E/07 and MEM-E/08 are specific anti-HLA-E mAbs that exhibit only minimal cross-reactivities with some classical MHC antigens. MEM-E/02 (IgG1) does not cross-react with HLA-A, -B, -C or -G. MEM-E/07 (IgG1) cross-reacts with some classical MHC Class I molecules: HLA B7 (strongly); HLA B8 (moderately); HLA B27 and HLA-B44 (weakly). MEM-E/08 (IgG1) is remarkably specific for HLA E, it only shows weak cross-reactivity with the following classical MHC Class I molecules: HLA A24, B7, B27, B51, B54 and C7. Mouse IgG1 monoclonal antibody MEM-G/01 reacts with the denatured HLA-G heavy chain of all isoforms and was purchased from Serotec (Cergy Saint-Christophe, France).

#### **Cell culture**

Human umbilical vein ECs (HUVEC), arterial ECs (HAEC) and vascular smooth muscle cells (SMCs) were isolated and cultured as described.<sup>24,25</sup> ECs were HLA-typed and selected to avoid non-HLA-E-specific cross-reactivity with the anti-HLA-E mAbs listed above. The following EC types were used: HUVEC #Gd (HLA-A02,A26,B08,B51(5)), HAEC #8186 (HLA-A01,02,B51(5),52(5)), HAEC #9007 (HLA-01,02, B35,39); HAEC #9054 (HLA-A2,26,B51 (5) 62 (15); HAEC #10238 (HLA-A24(9),33(19),B14,35); HAEC #11202 (A02,24,B18,51); HAEC #11636 (HLA-A02,29(19),B44(12)35), HAEC#14756 (HLA-A01,30(19), B18,57). ECs were cultured in Endothelial Cell Growth Medium (ECBM) supplemented with 10% FCS, 0.004 mL ECGS/Heparin, 0.1 ng/mL hEGF, 1 ng/ml hbFGF, 1 µg/mL hydrocortisone, 50 µg/mL gentamicin and 50 ng/mL amphotericin B (C-22010, PromoCell, Heidelberg, Germany). For activation, confluent EC monolayers were incubated with recombinant human TNF $\alpha$  (100 U/mL, kindly provided by Prof. P. Neuman, BASF, Ludwigshafen, Germany), IFN $\gamma$  (100 U/mL, Imukin, Boehringer Ingelheim, Germany), IL-1 $\beta$

(5 ng/mL, from R&D Systems) for the indicated period of time in ECBM supplemented with 2% FCS. Culture supernatants were collected at the indicated times post-activation and kept frozen. When needed, supernatants were concentrated (10x) using Microcon YM-3 (Millipore, Bedford, MA). PBMC from random healthy volunteers were purified by Ficoll/Hypaque density centrifugation. NK cells were purified (>95% of CD3-CD56<sup>+</sup> and/or CD16<sup>+</sup>, as assessed by facs) by negative selection using NK Cell Isolation kits according to the manufacturer's recommendations (Miltenyi Biotec, Paris, France).

### **Immunohistochemistry**

Four micrometer-thick paraffin sections were mounted on pre-treated slides, deparaffinized with toluene, rehydrated through a graded series of ethanol, and rinsed in distilled water. Tissue sections were then subjected to epitope retrieval in a microwave oven using citrate buffer (pH 6.0). Tissue sections were stained using a two-step visualization system based on a peroxidase-conjugated dextran backbone (Dako Envision+™ System, Dako, Trappes, France). The following mAbs were used: anti-human HLA-E (MEM-E/02) and anti human HLA-G (MEM-G/01). Sections were incubated with primary antibody at RT for 30 min and then incubated with the HRP-conjugated secondary antibody for 30 min at RT. Immunostaining was visualized using the 3,3-diaminobenzidine/H202 substrate and tissues were counterstained with haematoxylin.

For immunofluorescence, ECs were grown to confluence on glass coverslips. Cultures were washed with PBS and fixed for 20 min in PBS containing 4% paraformaldehyde. Cells were incubated ON at 4°C with blocking buffer (5% BSA in PBS) and then incubated with an anti-HLA class I (W6/32) or anti-HLA-E (MEM-E/07) mAbs (10 µg/mL) in blocking buffer with or without Triton X-100 for 1 h. Slides were rewashed and incubated with FITC-conjugated goat anti-mouse antibodies (5 µg/mL, Jackson Lab., West Grove, Pennsylvania)

for 1 h. ER and Golgi staining were performed using rhodamine-B-hexyl ester (2.5 µg/mL, Molecular Probes, Eugene, Oregon) 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 To-Pro-3 (1:1000 dilution, Molecular Probes). Slides were washed in PBS, dried and mounted with ProLong<sup>®</sup> antifade reagent (Molecular Probes). Fluorescence microscopy was performed with a Leica DM-IRBE<sup>®</sup> laser scanning confocal microscope (Leica AG, Heerbrugg, Switzerland) using a 63x1.4 oil p-Aplo lens (Leica) and analyzed using Leica TCS NT<sup>®</sup> software.

#### **RNA analysis and RT-PCR**

RNA was isolated using TRIzol reagent (Invitrogen, Carlsbad, California) and analyzed by competitive PCR as described previously<sup>27</sup>. Briefly, total RNA (2 µg) was reverse transcribed with oligo (dT), treated with RNase H, and made up to 50 µl. cDNAs were diluted 1/2 for competitions. Competitor templates were initially diluted 1/10<sup>6</sup>, followed by four serial dilutions of 1/3 each. The primer sequences were: HLA-A (334 bp) sense: 5'-CTACCCTGCGGAGATCA-3', antisense: 5'-GCTCCCTCCTTTTCTATCTG-3', HLA-B (255 bp) sense: CTACCCTGCGGAGATCA, antisense: ACAGCCAGGCCAGCAACA, HLA-E (257 bp) sense: 5'-CTACCCTGC GGAGATCA-3', antisense: 5'-AGAGAACCAGGCCAGCAAT-3', HPRT (78 bp) sense: 5'-GGACAGGACTGAACGTCTTGC-3', antisense: 5'-TTGAGCACACAGAGGGCTACA-3'. PCR products were sequenced by Genosys (Sigma-Aldrich, Saint Quentin Fallavier, France). Internal standards were obtained by mutagene PCR amplifications to generate mutated fragment by the deletion of 5 nucleotides as previously described<sup>28</sup>. PCR products were separated on a 4% acrylamide gel and analyzed by capillary electrophoresis on an ABI

PRISM 310 DNA Sequencer (PE Applied Biosystem, Foster City, California) using GeneScan® Analysis software.

Semi-quantitative PCR for HLA-E and  $\beta$ -actin was carried out for 20 and 18 cycles, respectively, as follows: 94°C for 30 sec, 60°C for 30 sec, and 72°C for 30 sec, with a final extension at 72°C for 3 min. PCR primers were: 5'-CCACCATGG TAGATGGAACCC-3', and antisense: 5'-GCTTTACAAGCTGTCAGACTC-3' for HLA-E and sense: 5'-AATCTGGCACACACCTTCTACA-3', and antisense: 5'-CGACGTAGCACAGCTTCTCCTTA-3' for  $\beta$ actin. PCR products were separated on 1.5% agarose gels in the presence of ethidium bromide.

#### **Western Blotting**

When applicable, cells were treated for 12-72 h with 100 U/mL TNF $\alpha$ , 100 U/mL IFN $\gamma$ , and 5 ng/mL IL-1 $\beta$ . When applicable, cells were incubated with 2  $\mu$ g/mL brefeldin A (BrfA) or 10 $\mu$ M galardin as an MMP inhibitor (Sigma-Aldrich) for the last 6 h. Alternatively, cells were treated for 1 h with 2.5  $\mu$ g/mL cyclohexamide (CHX) before stimulation. Cells ( $3 \times 10^6$ ) were washed in PBS and incubated in 300  $\mu$ L lysis buffer (20 mM Tris-HCl, pH 7.4, 137 mM NaCl, 0.05% Triton X-100 and complete protease inhibitor cocktail from Sigma-Aldrich) for 15 min on ice. Equal amounts of protein (15  $\mu$ g) or equal volumes of culture supernatants (20  $\mu$ L) or sera (7  $\mu$ L) were loaded under reducing conditions and resolved by 12% SDS-PAGE. Immunoblotting was performed on nitrocellulose membranes (Amersham-Pharmacia, Orsay, France) using the mAbs anti-HLA-E (MEM-E/02), anti-HLA-G (MEM-G/01), anti-MHC class I (W6/32 from American Tissue Culture Collection), anti- $\beta$ 2-microglobulin (Exbio Praha, Czech Republic) and anti-VCAM-1 (R&D systems, Abingdon, UK). Anti-mouse IgG, HRP-linked Abs (Cell Signaling Technology, Beverly, MA) were used as secondary Abs in chemiluminescent western blot assays using ECL<sup>®</sup> system (Amersham-

Pharmacia). When applicable, blots were reprobed with mouse anti-GAPDH or anti-tubulin mAbs (Chemicon, Temecula, California). For deglycosylation with Endo H and PNGase F (both from Sigma-Aldrich), lysates of IFN $\gamma$ -treated ECs were boiled in 0.5% SDS, 1%  $\beta$ -mercaptoethanol for 5 min. Afterward, the solution was adjusted to 1% Nonidet P-40, and either 50 mM sodium phosphate, pH 7.5, and 0.6 U of PNGase F, or 50 mM sodium acetate, pH 6.5, with 15 mU of Endo H (both with a protease inhibitors mixture). Digestion was performed overnight at 37 °C followed by SDS-PAGE and immunoblotting, as described above.

### **Flow cytometry**

Cells were harvested, washed twice with PBS containing 1% BSA and 0.1% NaN<sub>3</sub>, and then incubated on ice for 30 min with a saturating concentration of the primary antibody. After three washes, cells were incubated with an FITC-labeled goat anti-mouse F(ab')<sub>2</sub> IgG antibody (Jackson Lab.) at 4°C for 30 min. Finally, cells were suspended in 1% paraformaldehyde in PBS. Negative controls were performed for each cell treatment by incubating the cells with isotype-matched control antibodies. The mouse mAbs used for this study were anti-HLA-A2/A28 (ATCC) and anti-HLA-E (MEM-E/07 or MEM-E/08). Fluorescence was measured on 10,000 cells/sample using a FACScalibur<sup>®</sup> (Becton Dickinson, Mountain View, CA) and analyzed using CellQuestPro<sup>®</sup> software (Becton Dickinson).

### **Cytotoxicity assays**

ECs were cultured with or without 100 U/mL IFN $\gamma$  for 3 days to generate optimal quantities of sHLA-E for analysis. Conditioned media were harvested and the presence of sHLA-E was assessed by western blot analysis. Purified NK cells were pre-incubated for 20 min with antibodies, conditioned medium or culture medium. Target cells ( $4 \times 10^3$ /well)

labeled with  $^{51}\text{Cr}$  were incubated with NK cells for 4 h at various E:T ratios. Blocking experiments were performed by preincubating cells with saturating amounts of anti-NKG2A, anti-NKG2C, anti-ILT2 mAbs (all from R&D Systems) or an isotype-matched irrelevant antibody for 10 min. Cytolytic activity was calculated using 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.

### Statistical analysis

The data are expressed as the mean  $\pm$  SD and were compared using one-way ANOVA test. Differences were considered significant at  $p < 0.05$ .

## RESULTS

### HLA-E protein expression is restricted to leucocytes and endothelial cells.

First, we examined HLA-E expression in human tissues by immunohistochemistry using monoclonal antibodies specific for HLA-E or HLA-G, as a control (Fig. 1A). In placenta, comparative immunostaining indicated that HLA-E, as well as HLA-G was expressed in extravillous trophoblast cells as previously reported<sup>17,19</sup>. In all other normal, nonlymphoid, human tissues tested (kidney, skin, liver, salivary gland, urinary bladder, thyroid, stomach, endometrium) HLA-E staining was restricted to ECs and was consistently observed on ECs from all types of vessels including arteries, veins, capillaries, and lymphatics. As illustrated in figure 1A, endothelial expression for HLA-E in kidney sections was present in vascular, capillary and glomerular ECs. No staining was observed on

mesenchymal, tubular, mesangial, muscle cells or adipocytes. In lymphoid organs such as spleen and lymph nodes (Fig. 1B) endothelial expression for HLA-E was also observed on high endothelial venules (HEVs), concomitant with a strong expression in B and T lymphocytes as well as monocytes and macrophages (Fig. 1B). Megakaryocytes but not erythrocytes also showed HLA-E immunostaining basally. HLA-E distribution among mesenchymal, epithelial and hematopoietic cells in various tissues is summarized in **online supplementary Table 1**.

HLA-E expression at mRNA and protein levels was investigated *in vitro* using primary cultures of human vascular ECs. Because inflammation affects EC phenotype and functions<sup>20,29</sup>, we studied the effects of the cytokines TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$  and IFN $\gamma$  on HLA-E expression and regulation. First, we quantified HLA-A, -B and -E mRNA levels in cultured ECs by competitive RT-PCR using locus-specific primers and a competitor template with an internal deletion as previously reported<sup>27</sup>. Transcripts encoded by all three HLA loci were detected in resting ECs, demonstrating that ECs express HLA-E constitutively. Although there were lower levels of HLA-B transcripts than HLA-A transcripts (\*p<0.05) in ECs, ECs expressed HLA-E mRNA at levels nearly equal to those of HLA-A (Fig. 2A). Both TNF $\alpha$  and IFN $\gamma$  increased HLA-E transcript levels, peaking at 24 h (Fig. 2B).

Endothelial expression for HLA-E protein was investigated further on cultured human ECs. ECs were selected carefully according to their HLA type to avoid the reported cross-reactivity of the anti-HLA-E-specific mAbs with some classical MHC antigens, as described in “Materials and Methods”.

Immunofluorescence and confocal microscopy were used as a first attempt to examine surface and intracellular HLA-E expression in human arterial ECs (HAECs). Although

weaker in intensity than staining for HLA-A, -B and -C, HLA-E staining was found on non-permeabilized cells (Fig. 2C), confirming that HLA-E protein is localized at the outer surface of ECs. Intracellularly, HLA-E had a perinuclear distribution in permeabilized ECs (Fig. 2C and 2D), where HLA-E fully colocalized with the endoplasmic reticulum (ER) and a partly with the Golgi apparatus (Fig. 2D), suggesting that HLA-E molecules may be secreted actively.

Endothelial expression of HLA-E protein is up-regulated by pro-inflammatory cytokines.

Western blot analysis, performed on total cell lysates from HAECs and HUVECs and using MEM-E/02 as anti-HLA-E specific mAbs, revealed a single band at 42 kDa, consistent with the molecular weight for HLA-E protein (Fig. 3A) and distinct from classical HLA class I proteins detected at 45 kDa (Fig. 3F). Cell lysates were treated with endoglycanase F (PNGase F) or endoglycosidase H (EndoH) and analyzed by Western blot (Figure 3B). Our data indicates that EndoH partially converted the 42 kDa form of HLA-E to a single band of lower molecular (40 kDa) indicating that part of the cytoplasmic HLA-E protein was in an EndoH-sensitive form. However, approximately 50% of HLA-E was EndoH-resistant, implying passage through the medial Golgi, a feature of mature MHC class I proteins. These HLA-E molecules likely represent that found at the plasma membrane and is consistent with our results from confocal microscopy. In contrast, and as expected, most of HLA-E was PNGase sensitive. Indeed, PNGase F cleaves nearly all types of N-glycans and was used as a control for glycosylation. Using flow cytometry, we were able to detect HLA-E at the cell surface where basal expression of HLA-E protein was low but significant and this was observed consistently in cultures from HAECs and HUVECs (Fig. 3C). Comparative cell surface expression for HLA-A,-B,-C and HLA-E was assessed by flow cytometry using

W6/32 and MEM-E/07 mAbs on 7 independent HAEC cultures (Fig. 3D). Although lower than those of classical HLA class I (HLA-A, -B, -C), basal expression of HLA-E protein was significant and was consistently observed on the membrane of the different cultures. Similar immunostaining was obtained with two different anti-HLA-E-specific mAbs (MEM-E/07 and MEM-E/08) both recognizing the native HLA-E molecule<sup>26</sup>, although immunostaining with MEM-E/08 appeared weaker than with MEM-E/07 mAbs (data not shown). In response to IFN $\gamma$ , both total and cell-bound HLA-E levels were increased and reached a maximal level at 48h after stimulation (data not shown).

Next, we compared endothelial expression for HLA-E after stimulation with TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$  and IFN $\gamma$ , alone or in combination. Immunoblotting showed an increase in HLA-E protein in ECs stimulated with these cytokines. Consistent with immunohistochemistry on human tissues, Figure 3E shows that no HLA-G expression was found in cultured ECs, even after treatment with cytokines; immunostaining for VCAM-1 and  $\beta$ 2-microglobulin are shown as controls. Facs analysis confirmed that cytokines resulted in a significant increase in membrane-bound HLA-E as compared with constitutive levels (Fig. 3G). Combined treatment with TNF $\alpha$  and IFN $\gamma$  (Fig. 3G) produced further increases in HLA-E expression. Although moderate, IFN $\gamma$ -induced up-regulation of HLA-E protein expression was dose-dependant and paralleled those of classical class I HLA (Figs 3F and 3G). Indeed, these cytokines induced a 4- to 7-fold increase in HLA-A2 expression in ECs and up to 3-fold increase in HLA-E over a 48 h period in ECs.

#### Cytokine-activated ECs produce soluble HLA-E molecules.

Next, we examined whether overexpression of HLA-E might be linked with the release of soluble HLA-E molecules, as described for other nonclassical class I MHC molecules including HLA-G. Using western blotting, we were able to detect the presence of

soluble HLA-E (sHLA-E) in culture media from cytokine-activated ECs, whereas sHLA-E was below the detection threshold in conditioned medium from untreated ECs. Release of soluble HLA-E molecules was driven equally by TNF $\alpha$ , IFN $\gamma$  and IL-1 $\beta$  (Fig. 4A). The combination of IFN $\gamma$  and TNF $\alpha$  has an additive effect on its surface expression and release. Soluble HLA-E was detected as a major band of 37 kDa (a doublet of 36 and 37 kDa) which may correspond to the metalloproteinase-dependent shedding of membrane-bound protein, but also as a minor band of 42 kDa corresponding to the full length protein which may result from alternative gene splicing, as reported for other soluble HLA molecules<sup>30</sup>. Time course analysis revealed that soluble HLA-E protein was detectable by 12-24h after of activation and was maximal at 72h after treatment with TNF $\alpha$  or IFN $\gamma$  (Fig. 4B). The kinetics of this process suggests that the cytokine-inducible release of sHLA-E likely occurs through new biosynthesis of the HLA-E protein. Our findings indicated that cyclohexamide (CHX), an inhibitor of protein synthesis, and brefeldin A, a specific inhibitor of exocytosis, prevented HLA-E expression and release by activated ECs (Figs 4A, 4C). In contrast, metalloproteinase inhibitor significantly increased expression of HLA-E at the membrane (Figure 4C) but abrogated release of sHLA-E, confirming that ECs, at least in part, generate sHLA-E by proteolytic shedding. Therefore, EC activation by inflammatory cytokines results in both increased membrane-bound HLA-E expression and release of sHLA-E.

As expected, flow cytometry analysis performed on freshly isolated PBMCs and cell lines (Jurkat, Raji, U937, NKL) confirmed constitutive HLA-E expression on CD3+, CD4+, CD8+, CD19+ and CD14+ leucocyte subsets (see **online supplement figure 1**). When production of sHLA-E was examined, the presence of the sHLA-E was not detected under most conditions, except for purified NK cells and a NK cell line (NKL) activated by IL-2 (see **online supplement figure 1**). Together, these findings suggest that among HLA-E expressing

cells, the production of sHLA-E is limited to a restricted set of activated cells including endothelial and NK cells.

Membrane-bound and soluble endothelial HLA-E molecules protect cells from CD94/NKG2A-mediated cytotoxicity.

The functions of surface-bound and soluble HLA-E molecules, expressed and released by ECs, were evaluated in cell-mediated cytotoxicity assays. NK cells were purified from PBMCs and used as effector cells in cytotoxicity assays where target cells were the class I-deficient cell lines C1R and K562, and primary cultures of smooth muscle cells (SMCs), which do not express HLA-E, or ECs (resting or activated for 48h with IFN $\gamma$ ). Experiments were performed in the presence or absence of a blocking anti-HLA-E mAb (MEM-E/07). As shown in Figure 5A, cells that expressed no HLA-E at the cell surface (C1R, K562 and SMCs) were efficiently lysed by NK cells with no effect of the anti-HLA-E blocking mAb. Resting ECs were also efficiently killed by allogeneic NK cells and blocking HLA-E slightly increased cell lysis (Fig. 5B, upper panel). This suggests that a basal level of surface HLA-E on quiescent ECs provides a moderate but significant degree of protection. EC activation with IFN $\gamma$  decreased NK-mediated cytotoxicity dramatically compared with resting ECs, in the same experiment (Fig. 5B, lower panel). Blocking HLA-E on IFN $\gamma$ -activated HAECs significantly restored cell lysis suggesting that up-regulation of HLA-E, at cell surface, upon IFN $\gamma$  stimulation provides a protection against NK cytotoxicity. Remarkably, the selective blockade of the two potential HLA-E receptors NKG2A and NKG2C also confirmed HLA-E bioactivity (Fig. 5C). Indeed, blocking NKG2A increased EC lysis, thus confirming our results using anti-HLA-E mAbs while blocking the activating receptor NKG2C decreases EC cytotoxicity significantly. Interestingly, blocking ILT2, a receptor for HLA-G and HLA-F, also strongly reduced cytotoxicity. In an attempt to determine the biological activity of sHLA-

E, we measured the cytotoxic activity of NK cells toward cells with no or low HLA-E expression (quiescent ECs and SMCs) in the presence of cell-conditioned medium with or without sHLA-E. These experiments indicate that cell lysis decreased significantly when sHLA-E was present (Figs 5C and 5D). Moreover, blocking soluble HLA-E with anti-HLA-E specific mAbs partially restores NK-mediated EC lysis (Fig. 5E). Consistent with a previous report<sup>31</sup>, we found no down-regulation of CD94/NKG2A receptors on NK cells following coculture with ECs (data not shown).

**Presence of soluble HLA-E in the patient's sera correlates with disease activity in patients with ANCA-associated systemic vasculitis.**

As a prerequisite to determine the clinical relevance of soluble HLA-E in physiological or pathological situations, we tested for sHLA-E in the sera of patients with anti-neutrophil cytoplasmic antibody (ANCA)-associated systemic vasculitis (AASV), including Wegener's granulomatosis (WG) and microscopic polyangiitis (MPA). This well-defined primary vasculitis subgroup is predominantly characterized by systemic inflammation of small vessels, and provides a relevant clinical model to investigate the relation between clinical inflammation and endothelial activation<sup>32,33</sup>. Disease activity in 10 patients was assessed according to clinical features and levels of ANCA and C-reactive protein (CRP). Serum samples of patients (n= 10, 22 sera) with active (diagnosis or relapse) or inactive disease (remission) and of healthy volunteers (n=9) were collected and assayed for sHLA-E. The presence of sHLA-E in sera, examined by immunoblot analysis of sera, revealed a band at 37 kDa, similar to that of sHLA-E released in cell culture medium (Fig. 6A). No significant amount of sHLA-E was detected in any of the healthy volunteers (Fig. 6A and Table 1). In contrast, sera from 9 out of 11 sera from patients with active disease (at diagnosis or relapse) showed the presence of sHLA-E, whereas sHLA-E was detectable in sera from only 3 out of

11 patients in the remission phase (\* $p < 0.01$ , Table 1). The presence of sHLA-E was correlated with elevated levels of CRP and soluble IL-2R $\alpha$  (sIL-2R $\alpha$ ), IL-8, VEGF and thrombomodulin in the patients' sera as determined by Elisa assays (Fig. 6B). In samples collected during the remission phase, we found significant elevations in sIL-2R $\alpha$  levels relative to normal volunteers (\*\* $p < 0.01$ ). No evidence of sHLA-E was found in the sera from patients (n=5) with sepsis and elevated CRP (data not shown). These data indicate that sHLA-E is released in significant amounts from cells *in vivo* in response to inflammatory processes affecting ECs, suggesting that shedding of sHLA-E may reflect vascular injury.

## DISCUSSION

Here we found that in contrast to the ubiquitously expressed classical HLA class I molecules, expression of the nonclassical HLA-E was restricted to specific cells including ECs and immune cells (B, T lymphocytes, NK cells, monocytes, macrophages). The first conclusion of this study is that although HLA-E transcripts can always be detected<sup>2</sup>, the HLA-E protein is not always expressed despite the availability of peptides linked to HLA class I expression in most cells. Therefore, this suggests that specific post-transcriptional regulatory mechanisms might be critical for HLA-E protein expression in endothelial and immune cells. These mechanisms remain to be elucidated. Interestingly, as reported here and in previous studies, and similar to HLA-G, HLA-E is also expressed in trophoblast as is HLA-G<sup>16,17,19</sup> and in some tumor cells<sup>18,26,34,35</sup>. Here, the expression of HLA-G was checked both *in vivo* and *in vitro* and found to be negative in ECs even upon inflammation. Furthermore, we found no evidence for the binding of soluble HLA-E to an endothelial receptor, as recently reported for soluble HLA-G and the CD160 receptor on ECs<sup>36</sup> (data not shown). Therefore, our findings provide another example of constitutive expression for nonclassical class Ib

molecules in a selected set of cells and thereby raise the possibility that HLA-E drives specific function in immune and vascular homeostasis.

HLA-E is tightly up-regulated upon cytokine-induced activation at the EC surface. This upregulation paralleled those of the classical HLA class I at EC surface but remained moderate compared with those HLA class Ia. We also demonstrated a link between increased cell surface expression and the release of sHLA-E in the extracellular compartment. Functionally, these experiments show the capability of sHLA-E to protect HLA-E-negative cells from NK cytotoxicity and provide the first evidence for a role of sHLA-E as an immunoregulatory molecule. Consistent with previous studies performed on HLA-E-<sup>30</sup> or HLA-G-<sup>37</sup> transfected cells, our experiments using inhibitors of metalloproteinase suggest that HLA-E undergoes proteolysis after reaching the EC surface. Release of a secreted form of HLA-E resulting from alternative gene splicing is also supported by our data and is under further investigation. Soluble forms of classical or nonclassical class I HLA molecules have been shown to exhibit various functions. Soluble isoforms of HLA-G have been detected in biological fluids, such as amniotic fluid and serum, they inhibit NK cytotoxicity<sup>37</sup> and induce apoptosis of activated T cells<sup>38</sup>. Another soluble nonclassical MHC molecule, the MHC class I-related molecule MICA, acts as a competitive mimic that blocks recognition of membrane-bound ligand, and as a suppressor that down-regulates NKG2D expression<sup>39</sup>.

We have recently shown in a concomitant study that IFN $\gamma$  also up-regulates HLA-E expression and induces the release of soluble HLA-E from melanoma cells<sup>35</sup>. We speculate that such abundant expression of membrane associated and soluble HLA-E molecules in malignant tumor cells might promote tumor growth.

Furthermore, we found that sHLA-E release, as recently reported for HLA-G<sup>40</sup> and MICA<sup>41</sup>, may correlate with clinical outcome and is of potential relevance for the diagnosis and monitoring of patients. Indeed, we established the presence of sHLA-E in patients with

active WG, a form of small vessel vasculitis where endothelial activation in vessels parallels disease activity and systemic inflammation.<sup>33</sup> Although, little is known about the etiology of ANCA-associated systemic vasculitis, it is now becoming apparent that EC activation as well as immune mechanisms are central to the pathogenesis of these diseases.

Functionally, we found that enhanced HLA-E expression on IFN $\gamma$ -activated ECs impaired CD94/NKG2A-dependent NK cytotoxicity whereas soluble HLA-E molecules provided protection to HLA-E-negative target cells. To our knowledge this is the first evidence for a biological activity of membrane-associated and soluble HLA-E molecules on normal non-transfected cells. This protective pathway could have substantial relevance by counteracting classical class I down-regulation on virally infected ECs (e.g. CMV) and in the setting of vascularized allografts where other inhibitory NK receptors may not operate.<sup>42</sup>

Although not investigated in the present study, we speculate that HLA-E may also affect antigen presentation by the endothelium. Indeed, HLA-E displays features of antigen-presenting molecules whereas ECs display features of APC<sup>22,23,43</sup>. HLA-E recognition by human CTL has been reported<sup>10</sup> and TCR $\alpha\beta$ <sup>+</sup> alloreactive CTL specific for HLA-E have now been identified<sup>12</sup>. Therefore, it can be hypothesized that HLA-E complexed with  $\beta$ 2m and peptide might also play a role in autologous and allogeneic peptide presentation by ECs to CD8<sup>+</sup> T cells.

Self peptide presentation by HLA-E is thought to be central in the generation of suppressive CD8<sup>+</sup> T cells controlling the expansion of pathogenic autoreactive T cells.<sup>14,15</sup> Because the HLA-E-peptide complexes can interact with the CD94/NKG2 receptors expressed on NK or classical CD8<sup>+</sup> T cells to regulate function either positively or negatively, HLA-E may not only serve as the target of CD8 suppression, but might also regulate the function of CD8<sup>+</sup> suppressor T cells via the CD94-NKG2 receptors. Suppressor T cells are

essential for the control of autoimmunity and are also involved in the control of the immune response to transplanted allografts <sup>44</sup>. In some conditions, ECs also suppress CD8+T cell activation by professional APC, resulting in a form of immune tolerance. <sup>45,46</sup> Whether endothelial HLA-E contributes to T cell suppression rather than to T cell activation has yet to be elucidated.

To conclude, here we have established clearly that HLA-E expression and release of sHLA-E can be considered as markers of EC activation in inflammatory and autoimmune diseases. Given the putative impact of HLA-E bioactivity, we speculate that endothelial HLA-E may play a role in the pathogenesis of vascular diseases. Increased HLA-E and sHLA-E levels in response to inflammatory insults may serve as a protective response of EC to injury aimed at curbing NK-mediated lysis. Moreover, increased expression of HLA-E may either be deleterious through the recognition of this non-classical HLA molecule by CTL, mediating allograft rejection or beneficial through the generation of suppressive CD8+ T cells, as shown in mice models with the Qa-1 molecule. Overall, this implies that endothelial HLA-E may regulate multiple functions and therefore underscores the fundamental role of ECs in immune regulation pathways.

#### ACKNOWLEDGMENTS

The authors wish to thank Jeanne Souchet, Estelle Drouet and Bernadette Denis for technical assistance and Annabelle Chauveau for excellent assistance with confocal microscopy.

## REFERENCES

1. Carosella ED, Paul P, Moreau P, Rouas-Freiss N. HLA-G and HLA-E: fundamental and Pathophysiological aspects. *Immunol Today*. 2000;21:532-534
2. Ulbrecht M, Honka T, Person S, Johnson JP, Weiss EH. The HLA-E gene encodes two differentially regulated transcripts and a cell surface protein. *J Immunol*. 1992;149:2945-2953
3. Braud V, Jones EY, McMichael A. The human major histocompatibility complex class Ib molecule HLA-E binds signal sequence-derived peptides with primary anchor residues at positions 2 and 9. *Eur J Immunol*. 1997;27:1164-1169
4. Lee N, Goodlett DR, Ishitani A, Marquardt H, Geraghty DE. HLA-E surface expression depends on binding of TAP-dependent peptides derived from certain HLA class I signal sequences. *J Immunol*. 1998;160:4951-4960
5. Braud VM, Allan DS, O'Callaghan CA, Soderstrom K, D'Andrea A, Ogg GS, Lazetic S, Young NT, Bell JI, Phillips JH, Lanier LL, McMichael AJ. HLA-E binds to natural killer cell receptors CD94/NKG2A, B and C. *Nature*. 1998;391:795-799
6. Lee N, Llano M, Carretero M, Ishitani A, Navarro F, Lopez-Botet M, Geraghty DE. HLA-E is a major ligand for the natural killer inhibitory receptor CD94/NKG2A. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998;95:5199-5204
7. Borrego F, Ulbrecht M, Weiss EH, Coligan JE, Brooks AG. Recognition of human histocompatibility leukocyte antigen (HLA)-E complexed with HLA class I signal sequence-derived peptides by CD94/NKG2 confers protection from natural killer cell-mediated lysis. *J Exp Med*. 1998;187:813-818

8. Leibson PJ. Cytotoxic lymphocyte recognition of HLA-E: utilizing a nonclassical window to peer into classical MHC. *Immunity*. 1998;9:289-294
9. Ulbrecht M, Modrow S, Srivastava R, Peterson PA, Weiss EH. Interaction of HLA-E with peptides and the peptide transporter in vitro: implications for its function in antigen presentation. *J Immunol*. 1998;160:4375-4385
10. Li J, Goldstein I, Glickman-Nir E, Jiang H, Chess L. Induction of TCR Vbeta-specific CD8+ CTLs by TCR Vbeta-derived peptides bound to HLA-E. *J Immunol*. 2001;167:3800-3808
11. Tomasec P, Braud VM, Rickards C, Powell MB, McSharry BP, Gadola S, Cerundolo V, Borysiewicz LK, McMichael AJ, Wilkinson GW. Surface expression of HLA-E, an inhibitor of natural killer cells, enhanced by human cytomegalovirus gpUL40. *Science*. 2000;287:1031
12. Romagnani C, Pietra G, Falco M, Millo E, Mazzarino P, Biassoni R, Moretta A, Moretta L, Mingari MC. Identification of HLA-E-specific alloreactive T lymphocytes: a cell subset that undergoes preferential expansion in mixed lymphocyte culture and displays a broad cytolytic activity against allogeneic cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002;99:11328-11333
13. Hu D, Ikizawa K, Lu L, Sanchirico ME, Shinohara ML, Cantor H. Analysis of regulatory CD8 T cells in Qa-1-deficient mice. *Nat Immunol*. 2004;5:516-523
14. Panoutsakopoulou V, Huster KM, McCarty N, Feinberg E, Wang R, Wucherpfennig KW, Cantor H. Suppression of autoimmune disease after vaccination with autoreactive T cells that express Qa-1 peptide complexes. *J Clin Invest*. 2004;113:1218-1224
15. Sarantopoulos S, Lu L, Cantor H. Qa-1 restriction of CD8+ suppressor T cells. *J Clin Invest*. 2004;114:1218-1221

16. King A, Allan DS, Bowen M, Powis SJ, Joseph S, Verma S, Hiby SE, McMichael AJ, Loke YW, Braud VM. HLA-E is expressed on trophoblast and interacts with CD94/NKG2 receptors on decidual NK cells. *Eur J Immunol.* 2000;30:1623-1631
17. Ishitani A, Sageshima N, Lee N, Dorofeeva N, Hatake K, Marquardt H, Geraghty DE. Protein expression and peptide binding suggest unique and interacting functional roles for HLA-E, F, and G in maternal-placental immune recognition. *J Immunol.* 2003;171:1376-1384
18. Marin R, Ruiz-Cabello F, Pedrinaci S, Mendez R, Jimenez P, Geraghty DE, Garrido F. Analysis of HLA-E expression in human tumors. *Immunogenetics.* 2003;54:767-775
19. Menier C, Saez B, Horejsi V, Martinozzi S, Krawice-Radanne I, Bruel S, Le Danff C, Reboul M, Hilgert I, Rabreau M, Larrad ML, Pla M, Carosella ED, Rouas-Freiss N. Characterization of monoclonal antibodies recognizing HLA-G or HLA-E: new tools to analyze the expression of nonclassical HLA class I molecules. *Hum Immunol.* 2003;64:315-326
20. Pober J, Orosz CG, Rose ML, Savage CO. Can graft endothelial cells initiate a host anti-graft immune response? *Transplantation.* 1996;61:343-349
21. Libby P, Pober JS. Chronic rejection. *Immunity.* 2001;14:387-397
22. Choi J, Enis DR, Koh KP, Shiao SL, Pober JS. T lymphocyte-endothelial cell interactions. *Annu Rev Immunol.* 2004;22:683-709
23. Dengler TJ, Pober JS. Human vascular endothelial cells stimulate memory but not naive CD8+ T cells to differentiate into CTL retaining an early activation phenotype. *J Immunol.* 2000;164:5146-5155.
24. Coupel S, Leboeuf F, Boulday G, Soullillou JP, Charreau B. RhoA activation mediates phosphatidylinositol 3-kinase-dependent proliferation of human vascular endothelial

cells: an alloimmune mechanism of chronic allograft nephropathy. *J Am Soc Nephrol.* 2004;15:2429-2439

25. 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;78:1729-1739

26. Palmisano GL, Contardi E, Morabito A, Gargaglione V, Ferrara GB, Pistillo MP. HLA-E surface expression is independent of the availability of HLA class I signal sequence-derived peptides in human tumor cell lines. *Hum Immunol.* 2005;66:1-12

27. Johnson DR. Differential expression of human major histocompatibility class I loci: HLA-A, -B, and -C. *Hum Immunol.* 2000;61:389-396

28. Vincent R, Louis P, Gongora C, Papa I, Clot J, Eliaou JF. Quantitative analysis of the expression of the HLA-DRB genes at the transcriptional level by competitive polymerase chain reaction. *J Immunol.* 1996;156:603-610

29. Mantovani A, Bussolino F, Introna M. Cytokine regulation of endothelial cell function: from molecular level to the bedside. *Immunol Today.* 1997;18:231-240

30. Dong Y, Lieskovska J, Kedrin D, Porcelli S, Mandelboim O, Bushkin Y. Soluble nonclassical HLA generated by the metalloproteinase pathway. *Hum Immunol.* 2003;64:802-810

31. Borrego F, Kabat J, Sanni TB, Coligan JE. NK cell CD94/NKG2A inhibitory receptors are internalized and recycle independently of inhibitory signaling processes. *J Immunol.* 2002;169:6102-6111

32. Taekema-Roelvink ME, van Kooten C, Verburgh CA, Daha MR. Role of proteinase 3 in activation of endothelium. *Springer Semin Immunopathol.* 2001;23:299-314

33. Kallenberg CG, Rarok A, Stegeman CA, Limburg PC. New insights into the pathogenesis of antineutrophil cytoplasmic autoantibody-associated vasculitis. *Autoimmun Rev.* 2002;1:61-66
34. Malmberg KJ, Levitsky V, Norell H, de Matos CT, Carlsten M, Schedvins K, Rabbani H, Moretta A, Soderstrom K, Levitskaya J, Kiessling R. IFN-gamma protects short-term ovarian carcinoma cell lines from CTL lysis via a CD94/NKG2A-dependent mechanism. *J Clin Invest.* 2002;110:1515-1523
35. Derre L, Corvaisier M, Charreau B, Moreau A, Godefroy E, Moreau-Aubry A, Jotereau F, Gervois N. Expression and release of HLA-E by melanoma cells and melanocytes: potential impact on the response of cytotoxic effector cells. *J Immunol.* 2006;177:3100-3107
36. Fons P, Chabot S, Cartwright JE, Lenfant F, L'Faqihi F, Giustiniani J, Herault JP, Gueguen G, Bono F, Savi P, Aguerre-Girr M, Fournel S, Malecaze F, Bensussan A, Plouet J, Le Bouteiller P. Soluble HLA-G1 inhibits angiogenesis through an apoptotic pathway and by direct binding to CD160 receptor expressed by endothelial cells. *Blood.* 2006;108:2608-2615
37. Park GM, Lee S, Park B, Kim E, Shin J, Cho K, Ahn K. Soluble HLA-G generated by proteolytic shedding inhibits NK-mediated cell lysis. *Biochem Biophys Res Commun.* 2004;313:606-611
38. Bahri R, Hirsch F, Josse A, Rouas-Freiss N, Bidere N, Vasquez A, Carosella ED, Charpentier B, Durrbach A. Soluble HLA-G inhibits cell cycle progression in human alloreactive T lymphocytes. *J Immunol.* 2006;176:1331-1339
39. Groh V, Wu J, Yee C, Spies T. Tumour-derived soluble MIC ligands impair expression of NKG2D and T-cell activation. *Nature.* 2002;419:734-738
40. Qiu J, Terasaki PI, Miller J, Mizutani K, Cai J, Carosella ED. Soluble HLA-G Expression and Renal Graft Acceptance. *Am J Transplant.* 2006

41. Wu JD, Higgins LM, Steinle A, Cosman D, Haugk K, Plymate SR. 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
42. Baldwin WM, 3rd, Larsen CP, Fairchild RL. Innate immune responses to transplants: a significant variable with cadaver donors. *Immunity.* 2001;14:369-376
43. Briscoe DM, Sayegh MH. A rendezvous before rejection: where do T cells meet transplant antigens? *Nat Med.* 2002;8:220-222
44. Walsh PT, Taylor DK, Turka LA. Tregs and transplantation tolerance. *J Clin Invest.* 2004;114:1398-1403
45. Manavalan JS, Kim-Schulze S, Scotto L, Naiyer AJ, Vlad G, Colombo PC, Marboe C, Mancini D, Cortesini R, Suci-Foca N. Alloantigen specific CD8+CD28-FOXP3+ T suppressor cells induce ILT3+ ILT4+ tolerogenic endothelial cells, inhibiting alloreactivity. *Int Immunol.* 2004;16:1055-1068
46. Coupel S, Soulillou JP, Charreau B. Endothelial expression of non classical HLA molecules : functions and potential implication in clinical transplantation. *Curr. Op. Org. Transpl.* 2006; ,11:433-438.

## FIGURE LEGENDS

**Figure 1. Immunoperoxidase staining showing HLA-E expression in human normal tissues.**

**(A)** Comparative staining for HLA-E (a, c, e) and HLA-G (b, d, f) in paraffin-embedded sections of human first-trimester trophoblast (a, b) and kidney (c, d, e, f) **(B)** Comparative expression of HLA-E protein was studied in paraffin-embedded sections of human spleen (a, b) and lymph node (c, d). Arrowheads indicate ECs, M: macrophages, MK: megakaryocytes and sEC: sinusoidal EC. Original magnification: x400.

**Figure 2. HLA-E mRNA and protein expression in cultured human ECs.**

**(A)** Quantification and comparative analysis of mRNA steady state levels for HLA-A, HLA-B and HLA-E in cultured ECs by competitive RT-PCR. Values are mean  $\pm$  SD (n=3). \* $P < 0.01$  versus HLA-B. **(B)** Regulation of HLA-E mRNA in response to TNF $\alpha$  or IFN $\gamma$  was assessed by semi-quantitative RT-PCR. PCR amplifications for  $\beta$ -actin were used as controls. RNA 18S and 28S are shown below. **(C)** Confocal microscope images showing comparative cell surface staining for HLA-A, -B, -C (a, c) and HLA-E (b, d) on nonpermeabilized (a and b) and permeabilized (c and d) vascular ECs. Nuclei were stained with To-pro-3 (red). **(D)** The colocalization of HLA-E (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. Scale Bar : 15  $\mu$ m (applies to all figures).

**Figure 3. Regulation of total and cell surface HLA-E in cultured ECs upon inflammation.**

**(A)** HLA-E protein expression in untreated and IFN $\gamma$ -activated ECs. Confluent monolayers of HAECs and HUVECs were incubated with culture medium or with 100 U/mL IFN $\gamma$  for 48h. Cell lysates were immunoblotted using MEM-E/02 as anti-HLA-E mAbs. Immunoblots were reprobed with anti-GAPDH mAb to compare protein loading within samples. A representative immunoblot is shown. **(B)** Total cell lysates from IFN-treated ECs were digested with EndoH or PNGaseF for 12 h at 37°C, loaded onto a 10% SDS-PAGE, and examined by western blotting with anti-HLA-E antibody. For controls, samples were incubated without the enzymes (NT). Immunoblots were reprobed with anti-tubulin mAbs.

**(C)** FACS analysis showing cell surface HLA-E expression (solid histograms) on HAECs and HUVECs either untreated or activated with IFN $\gamma$  for 48h. Controls were performed by using an isotype-matched control antibody (empty histograms). Mean of fluorescence intensity are indicated. **(D)** Comparative analysis of HLA class Ia (HLA-A, -B, -C) and HLA-E on the surface 7 independent cultures of HAEC. Results are express as means of fluorescence intensity (MFI). **(E)** Western blot analysis showing HLA-E, HLA-G, VCAM-1 and  $\beta$ 2-microglobulin in cell lysates from HAEC treated for 48h with 100 U/mL TNF $\alpha$ , 2.5 ng/mL IL1 $\beta$  or 100U/mL IFN $\gamma$  or culture medium alone (-). Immunoblots were reprobed with anti-tubulin mAbs to compare protein loading within samples. A representative immunoblot out of 3 experiments is shown. **(F)** Western blot analysis showing HLA-E, classical HLA-class I, VCAM-1 and  $\beta$ 2-microglobulin in cell lysates from HAEC treated for 48h with 0 to 400 U/mL IFN $\gamma$ . Immunoblots were reprobed with anti-tubulin mAbs to compare protein loading within samples. A representative immunoblot is shown. **(G)** Flow cytometry analysis comparing HLA-A2 and HLA-E expression at the cell surface after 48h of treatment with

TNF $\alpha$ , IFN $\gamma$ , IL-1 $\beta$ , TNF $\alpha$  and IFN $\gamma$  or culture medium alone. Mean of fluorescence intensity are indicated.

**Figure 4. Production of sHLA-E by cytokine-activated ECs.**

ECs were incubated with cytokines for 48h or cultured for 18h in the absence (medium) or in the presence of IFN $\gamma$  after a pre-incubation with cyclohexamide (CHX) for 1h or with brefeldin A (BrfA) or galardin as a metalloproteinase inhibitor (MP inhibitor) for the last 6h of culture. **(A)** Supernatants were collected, sHLA-E was then detected by western blotting in normal (1x) or concentrated (10x) supernatants (20 $\mu$ L/sample). One representative experiment out of five performed **(B)** Time course analysis by western blotting of sHLA-E release by ECs treated with IFN $\gamma$ . Data are from one representative experiment out of three performed. **(C)** Cells were harvested for analysis of membrane-bound HLA-E by flow cytometry following immunostaining with MEM-E/07 mAbs (solid histograms) or an isotype-matched control antibody (histograms in dotted line). Means of fluorescence intensity are indicated above. One representative experiment out of three performed.

**Figure 5. Protective effect of cell surface and soluble HLA-E molecules against CD94/NKG2A-dependent NK cell cytotoxicity.**

**(A and B)** Cell surface expression of HLA-E mediates protection toward NK cell cytotoxicity. **(A)** Cytotoxicity assays were performed using target cells with no HLA-E expression at the cell surface including the class I-deficient lymphoblastoid cell lines (C1R and K562) and primary cultures of SMC. Target cells were pre-incubated with culture medium, control IgG (mouse IgG1; 10 $\mu$ g/mL) or anti-HLA-E mAbs (10 $\mu$ g/mL) for 20 min at RT. **(B)** Cytotoxicity assays were performed using ECs as target cells with a regulated HLA-E expression at the cell surface ECs . ECs were untreated (upper panel) or activated with

100U/ml IFN $\gamma$  for 48h (lower panel). ECs were labeled with <sup>51</sup>Cr and pre-incubated with culture medium, control IgG (mouse IgG1; 10 $\mu$ g/mL) or anti-HLA-E mAb (10 $\mu$ g/mL) for 20 min at RT before incubation with purified NK cells for 4h at 37°C. **(C)** Blocking experiments were performed after preincubation of NK cells with anti-NKG2A, NKG2C or ILT2 receptor (10  $\mu$ g/mL for each). Control was achieved using an isotype-matched control IgG. **(D and E)** Soluble HLA-E provides protection toward NK cell cytotoxicity to cells with no or low HLA-E expression at the membrane. **(D)** Resting ECs (left panel) and SMC (right panel) were pre-incubated with culture medium (w/o sHLA-E) or conditioned medium from IFN $\gamma$ -treated HAECs (with sHLA-E) for 20 min at RT before incubation with freshly purified NK cells. **(E)** Resting ECs were pre-incubated with culture medium (w/o sHLA-E) or conditioned medium from IFN $\gamma$ -treated HAECs (with sHLA-E) for 20 min at RT. ECs were then treated with culture medium, control IgG (mouse IgG1; 10 $\mu$ g/mL) or anti-HLA-E mAbs (10 $\mu$ g/mL) for 20 min at RT before incubation with NK cells. For all these experiments, results, expressed as mean of specific lysis  $\pm$  SD, are representative of at least three independent experiments, \*p<0.01 versus control.

**Figure 6. Detection of soluble HLA-E in sera from patients with AASV and correlation with soluble markers of inflammation.** **(A)** Representative immunoblots showing the detection of soluble HLA-E in sera from patients with AASV (see Materials and methods). The upper panel shows the absence of sHLA-E in the serum from 3 healthy volunteers as compared with negative and positive controls. The lower panel illustrates the presence of sHLA-E in 3 sera from patients (#1, #2, #3) with active phase and in 2 sera from one patient (#4) (Rem : remission; Rel: relapse). Results are representative of 5 independent experiments. **(B)** Quantitative analysis of soluble IL-2R $\alpha$ , CRP, IL-8, VEGF and thrombomodulin by Elisa assays; \*p<0.01 versus normal, \*\*p<0.01 versus inactive.

**Table 1**

**Presence of sHLA-E in patient's sera correlates with disease activity in vasculitis  
(Wegener's Granulomatosis and Microscopic polyangiitis)**

	Sera (patients)	Soluble HLA-E	C-reactive protein (mg/L)	sIL-2R $\alpha$ ( $\mu$ g/mL)	IL-8 (pg/mL)	VEGF (pg/mL)
<b>Total vasculitis (WG &amp; MPA)</b>	22 (10)					
Active phase	11	9*	143 $\pm$ 69*,**	5.6 $\pm$ 3.2*,**	585 $\pm$ 73*	1055 $\pm$ 265*,**
Inactive phase	11	3	3.4 $\pm$ 0.4	2.1 $\pm$ 0.9**	$\leq$ 30	214 $\pm$ 104
Controls	9 (9)	0	$\leq$ 3.2	0.65 $\pm$ 0.36	$\leq$ 30	209 $\pm$ 18

Soluble HLA-E was detected by Western blot assays as described in "Materials and Methods"

Sera from patients or healthy controls were assayed for the sIL-2R $\alpha$ , IL-8 and VEGF by ELISA assays. Data are shown as mean  $\pm$  SD.

\* $P < 0.01$  versus inactive phase

\*\* $P < 0.01$  versus controls (sera from healthy donors)

Figure 1A

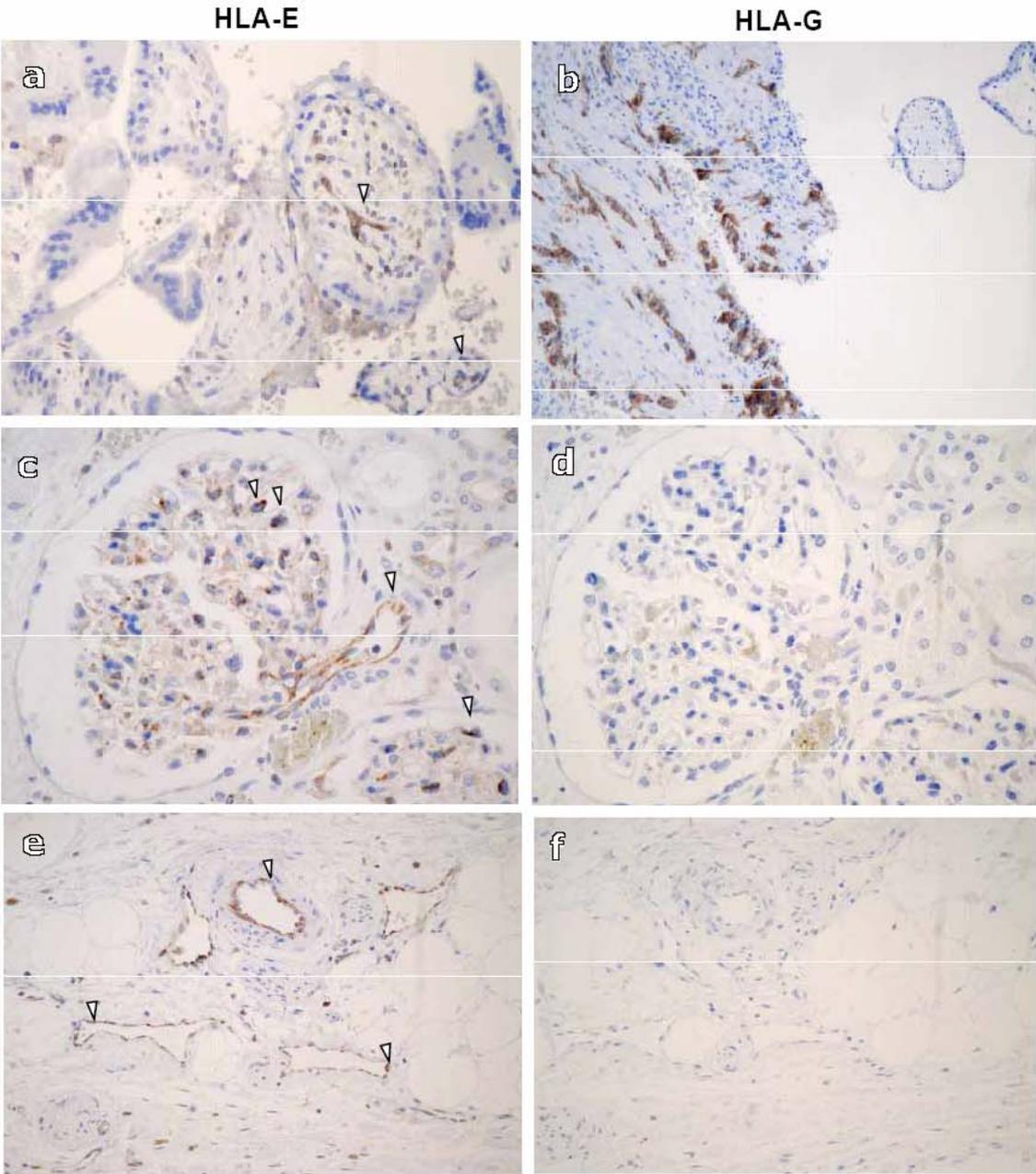


Figure 1B

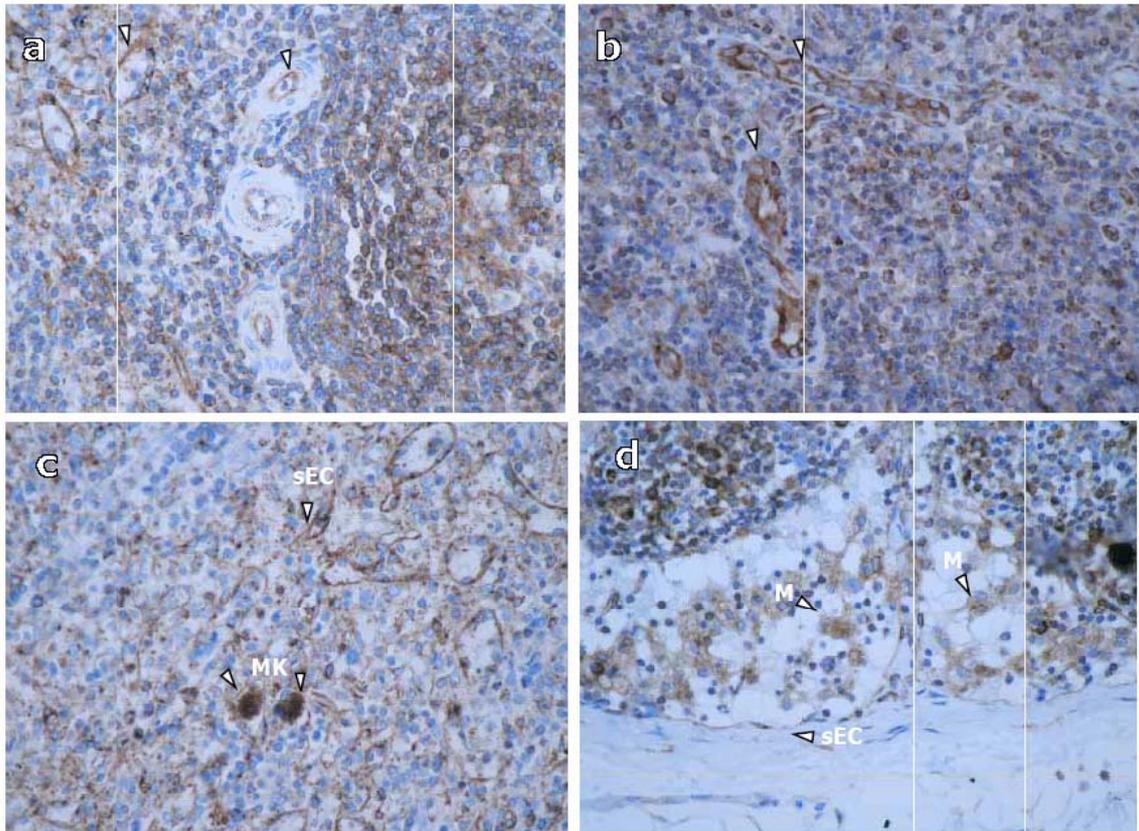


Figure 2

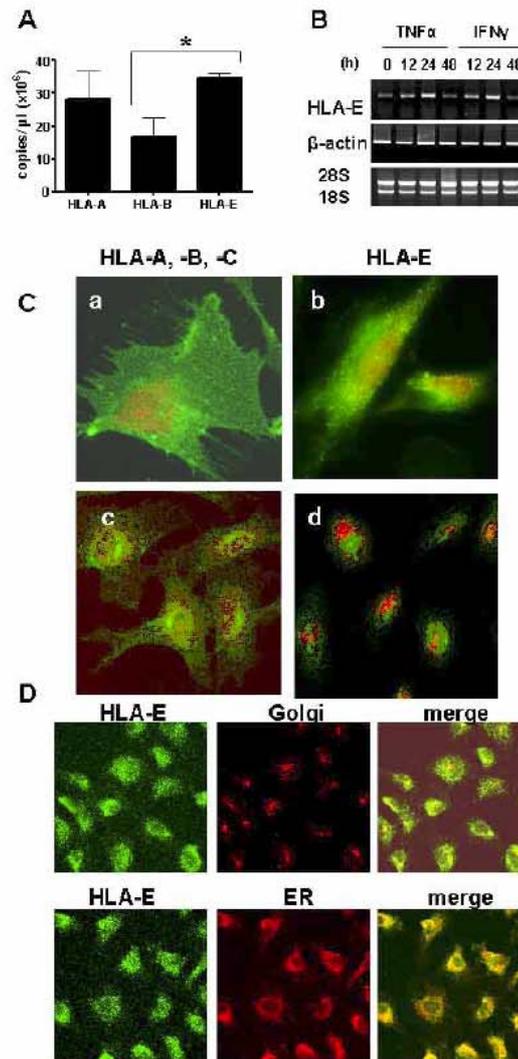


Figure 3

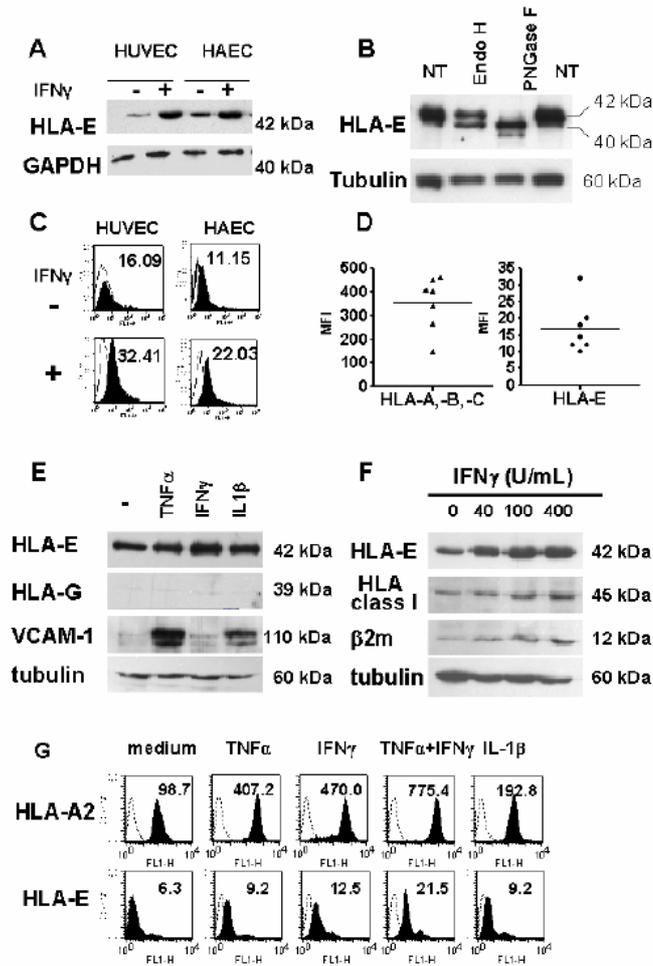


Figure 4

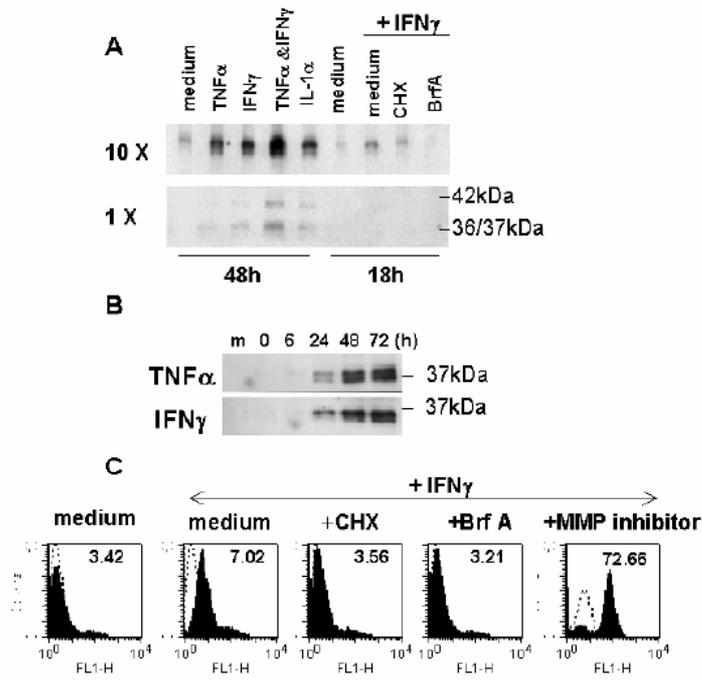


Figure 5

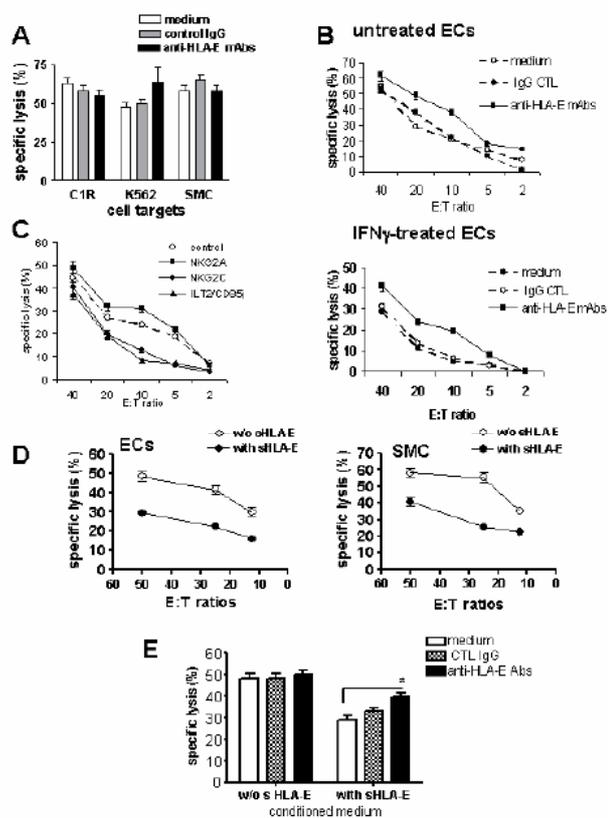
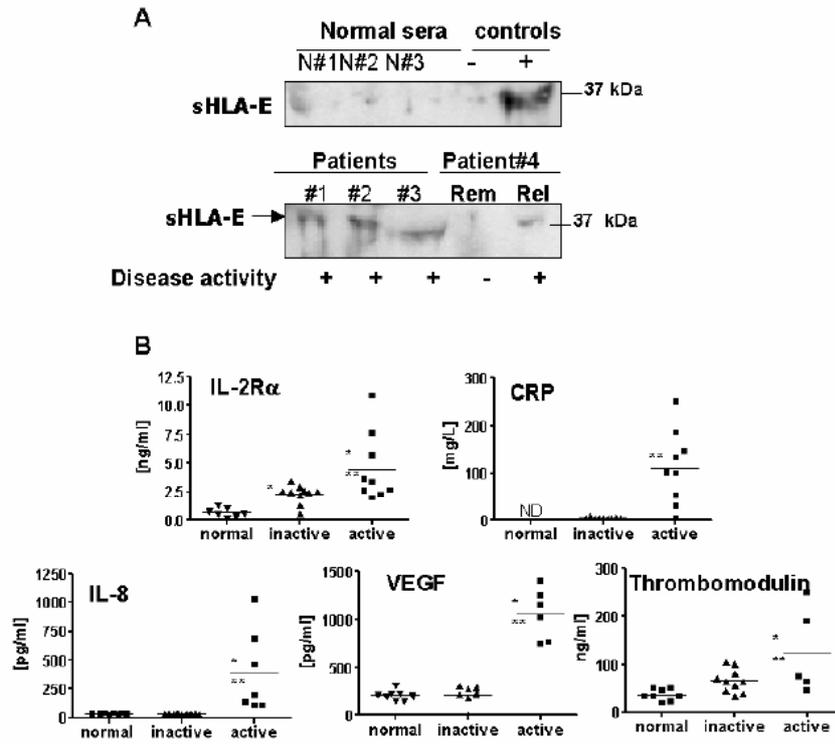


Figure 6



Online Supplement

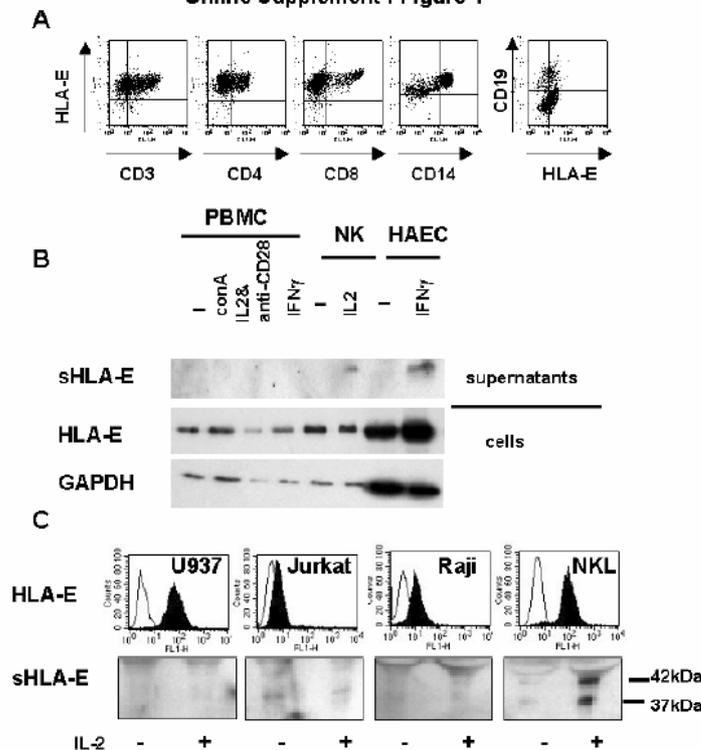
Table 1

HLA-E expression in various normal tissues

	HLA-E negative	HLA-E positive
Mesenchymal cells	Fat cells Fibroblasts Smooth muscle cells (vascular wall, muscularis of urinary bladder and stomach) Striated muscle cells Peripheral nerves and ganglion cells	Endothelial cells of arteries, veins, lymphatics Macrophages
Epithelial cells	Salivary acinis and ducts Thyroid follicular cells Liver	Few urothelial cells of urinary bladder Strong staining of secretory endometrial cells during pregnancy Epiderma and its appendages
Lymphoid tissues (lymph node and spleen)	Interdigitated cells	Lymphoid B cells (lymphoid follicle) Lymphoid T cells Macrophages Endothelial cells of postcapillary venules, sinus of the spleen
Hematopoietic cells	Erythroblasts	Megakaryoblasts

HLA-E protein expression was investigated in the following normal tissues: kidney, spleen lymph node, salivary gland, urinary bladder, thyroid, endometrium, skin, liver, stomach. For each tissue, at least 3 independent samples were immunostained and analyzed.

Online Supplement : Figure 1



Expression and release of HLA-E by PBMC and cell lines

PBMC from random healthy volunteers were purified by Ficol/Hypaque density centrifugation. NK cells were purified (>95% of CD3-CD56<sup>+</sup> and/or CD16<sup>+</sup>) by negative selection using the NK Cell Isolation kit according to manufacturer's recommendations (Miltenyi Biotec, Paris, France). U937, Raji, C1R, K562 and Jurkat cell lines were obtained from American Tissue Culture Collection (Rockville, MD). NKL cell line was kindly provided by Dr. Eric Vivier (CIML, Marseille-Luminy, France).

(A) For flow cytometry analysis of cell surface HLA-E expression, untreated cells were double stained with FITC-labeled anti-CD3, -CD4, -CD8, -CD14 or PE-labeled anti-CD19 mAbs and anti-HLA-E (MEM-E/8) mAbs, revealed using a PE- or FITC-labeled anti-mouse secondary Abs. Results are expressed as dot plots after subset selection according to cytometric side scatter and forward scatter parameters. Results are representative of three independent experiments. (B) Fresh PBMC and purified NK subset were cultured for 48h with Con A, IL-2 and anti-CD28 mAb or IFN $\gamma$ . At the end of treatment, cells and culture supernatants were collected for western blot and flow cytometry analyses. Membrane-bound HLA-E and sHLA-E were then detected by western blot in lysates (15  $\mu$ g/sample) and supernatants (10  $\mu$ l/sample), respectively. Immunoblots were reprobed with anti-GAPDH mAb to compare protein loading within samples. (C) Cell surface expression of HLA-E on monocytoid (U937), T (Jurkat), B (Raji) and NK (NKL) cell lines analyzed by flow cytometry. HLA-E staining (solid histograms) was compared to labeling obtained using an isotype-matched irrelevant mAb (empty histograms). Detection by western blotting of sHLA-E in culture supernatants from cell lines treated for 24h with or without 150 U/ml IL-2.

## **Chapitre 5. DISCUSSION GENERALE.**

## 5.1. Alloanticorps et signalisation intracellulaire dans l'endothélium.

Lorsque nous avons entrepris l'étude de l'interaction des alloanticorps dirigés contre le HLA de classe I avec l'endothélium, plusieurs études avaient déjà montré que la fixation d'anticorps anti-HLA-A, B, et -C sur des cellules endothéliales, ou des cellules du muscle lisse, en culture avait un effet prolifératif (109) (110) (137) (207) (208) (209) (210). Le principal mécanisme attribué à cet effet sur la croissance cellulaire était la surexpression du récepteur au FGF (FGF-R) à la surface des cellules. Ces études initiales montraient également que la fixation des anticorps anti-HLA-A ou anti-HLA-B provoquait la phosphorylation sur des résidus tyrosine de plusieurs protéines (109) (137). De façon complémentaire, les mêmes auteurs ont ensuite montré que la signalisation intracellulaire par le HLA de classe I provoquait l'activation et la redistribution des adhésions focales (phosphorylation des kinases FAK et de la molécule adaptatrice paxilline) associées à une réorganisation du cytosquelette d'actine. L'activation de la kinase Src semble être responsable de la phosphorylation de FAK et de paxilline alors que la réorganisation du cytosquelette est indispensable à la translocation du FGF-R du noyau vers la membrane qui est inhibé en présence de cytochalasine D (110) (210). Notre étude cherchait à mettre en évidence d'autres mécanismes et voies de signalisation par une étude de l'expression différentielle des gènes par « RT-PCR differential display ». Cette étude, réalisée en collaboration avec Fabrice Leboeuf pendant son stage de DEA, a abouti à la sélection d'une trentaine de « molécules candidates » correspondant à des ARN messagers dont le niveau d'expression était spécifiquement régulé par la fixation des alloanticorps. La sélection rigoureuse des candidats a été réalisée grâce à l'introduction de nombreux contrôles positifs et négatifs (cinétique de traitement, traitement avec des anticorps anti-HLA dirigés contre différents locus, traitement de cellules endothéliales primaires issues de 3 donneurs différents, etc...) dans l'expérience. Malgré ces précautions, moins d'une dizaine de candidats ont pu être confirmés et validés et, faute de temps, à ce jour, seule la GTPase RhoA a pu faire l'objet d'une caractérisation complète. Il convient de noter que parmi les molécules initialement retenues et induites par les anticorps anti-HLA de classe I, figuraient aussi la molécule d'adhésion VCAM-1, la dynéine, la nibrine, la syntaxine 3A, la ribonucleoprotéine A2/B1, MAP-1B (« microtubule associated protein 1B ») (cf (211)).

Au cours de ma thèse, j'ai choisi d'étudier l'expression de RhoA dans les cellules endothéliales et de caractériser son rôle dans la dysfonction endothéliale associée au rejet chronique. Nous avons pu montrer que RhoA était activé en réponse à la fixation des anticorps anti-HLA de classe I, et, que cette activation induisait l'activation de la voie de signalisation de la PI3-K dans les cellules endothéliales vasculaires. Dans une étude publiée quelques semaines après la nôtre, le groupe d'Elaine Reed impliquait aussi la voie PI3-K dans la signalisation induite par les alloanticorps dans les cellules endothéliales. Cependant, ces auteurs relient l'activation de la PI3-K à la surexpression de gènes anti-apoptotiques, tels que Bcl2, et, proposent Bad comme cible moléculaire d'Akt. La phosphorylation de Bad par Akt libère la molécule Bcl-2 et protège les cellules endothéliales de l'apoptose (112). De plus, suite à nos travaux, la même équipe a également confirmé l'implication de RhoA et de ROCK dans la signalisation par les anticorps anti-HLA de classe I (212). L'ensemble de ces travaux suggère que, si le complément n'est pas activé par la fixation des alloanticorps dirigés contre le HLA de classe I porté par les cellules endothéliales du greffon, la fixation des anticorps pourrait induire un signal favorisant la prolifération et/ou la survie des cellules endothéliales. La balance entre un effet sur la prolifération et un effet protecteur pourrait être influencée par l'affinité et la concentration des anticorps (212). L'induction de gènes protecteurs tels que Bcl2, A1, A20 par les alloanticorps a été confirmée par une autre étude émanant d'un autre groupe (213) ; elle « réactive » le concept « d'accommodation ». L'accommodation est un phénomène qui a été initialement décrit à la fin des années 1970 par Alexandre lors de greffes rénales entre donneurs et receveurs vivants apparentés ABO incompatibles. Ces travaux montraient que la déplétion avant la greffe des anticorps anti-ABO préformés permettait la survie du greffon, et ce malgré le retour progressif des anticorps, après la transplantation (pour revue, voir (214)). Ces travaux initiaux suggéraient la mise en place de mécanismes de protection de l'endothélium, à la fois spécifiques des anticorps et des cellules endothéliales, nécessaires à la survie du greffon. Ce concept a été ensuite développé pour prévenir le rejet en xénotransplantation (57) (215) (216). Comprendre les bases moléculaires de l'accommodation constitue à l'heure actuelle un objectif majeur pour le développement de nouvelles approches thérapeutiques en xénotransplantation, mais aussi, en allotransplantation (214) (217).

Au cours de cette étude, nous avons également abordé les mécanismes impliqués dans l'activation de RhoA . En effet, une difficulté des études d'expression différentielle des gènes est de relier la variation du taux de transcrits observé par ces méthodes, à une régulation transcriptionnelle, voire dans la cas présent, à une activité de la protéine. Très peu de choses

sont connues sur la régulation de l'expression des molécules du signal. Ces molécules sont activées, souvent par phosphorylation, dans les minutes qui suivent l'interaction récepteur/ligand. Dans notre étude, nous avons montré que l'augmentation des ARN messagers pour RhoA est consécutive à l'activation, analysée ici par les méthodes dites de « pull down assay » et Western blot, et la translocation de RhoA dans les cellules endothéliales. Par Western blot, nous avons pu corrélérer l'augmentation des ARN messagers à une augmentation de la protéine RhoA dans les cellules. L'ensemble de ces résultats suggère que la transcription de RhoA augmente pour reconstituer le stock de protéine selon une boucle de rétrocontrôle. Des résultats similaires ont été obtenus dans notre équipe pour une protéine adaptatrice impliquée dans la signalisation, Ink (218).

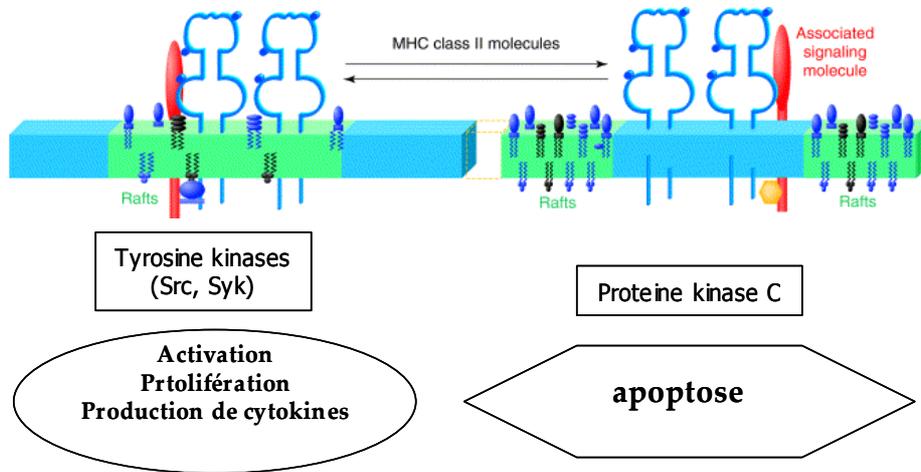
Pour compléter cette étude de la signalisation induite par les alloanticorps, j'ai contribué à l'analyse de l'interaction des anticorps anti-HLA de classe II (HLA-DR) avec les cellules endothéliales humaines en culture. Cette étude nous a tout d'abord permis de comparer l'expression des molécules de classe II à la surface des cellules endothéliales humaines (HAEC) issues de différents donneurs (n=7), la distribution relative de HLA-DR, DQ et DP et aussi la comparaison de l'expression de HLA-DR à la surface de cellules endothéliales et de lymphocytes B d'un même donneur. A l'état basal, *in vivo*, les cellules endothéliales humaines expriment les molécules du HLA de classe II (36). Le niveau d'expression semble varier en fonction du type de vaisseaux (36). En revanche, les cellules endothéliales en culture perdent rapidement l'expression des molécules de classe II et aucune de nos cultures d'HAEC n'exprime de classe II à l'état basal. Une étude récente documente la perte d'expression du HLA-DR par les cellules endothéliales en culture et montre que la présence d'une faible concentration d'IFN $\gamma$  suffit à maintenir cette expression qui requiert l'activation du promoteur IV du CIITA (150). Nous avons stimulé nos cultures de cellules endothéliales avec 100U/ml d'IFN $\gamma$  pendant 48 à 72 heures pour obtenir une expression maximale des molécules de classe II. 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 de lymphocytes B non activés (d'un facteur 5 environ). Il n'existe pas d'étude comparant l'expression des molécules de classe II dans les cellules et les tissus *in vivo* qui permettraient de valider cette hypothèse et les moyens techniques pour une étude quantitative sont difficilement accessibles (microdissection laser , biacore ).

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. Les nombreux travaux, émanant pour la plupart du groupe de Dominique Charron (Hôpital Saint Louis, Paris), ont montré que le signal pro-apoptotique associé à la signalisation par les molécules HLA-DR dépend des propriétés de présentation antigénique des cellules cibles. Ainsi, des études comparant monocytes/macrophages et cellules dendritiques immatures et matures, indiquent que, les cellules sont d'autant plus sensibles à l'apoptose via HLA-DR qu'elles sont des APC professionnelles, expriment fortement les molécules de classe II et molécules de costimulation (CD80, CD86, CD40) (166). Ces 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 $\gamma$  (100U/ml pendant 72 heures) (34) (35). Un moyen de tester cette hypothèse sera de transfecter des cellules endothéliales pour obtenir une expression constante et forte de HLA-DR, comparable à celle des cellules dendritiques matures par exemple. Dans cette attente, nous avons essayé d'évaluer si cette faible expression de HLA-DR était néanmoins suffisante pour initier l'activation de voies 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 (158)) . Activation lymphocytaire et l'apoptose semblent être induits de façon sélective et reflètent la relocalisation et l'agrégation des molécules de classe II dans les radeaux lipidiques (« lipid rafts ») de la membrane plasmique. L'apoptose est associée à l'activation des protéines kinases C (PKC) alors que l'activation (production de cytokines) est, elle, associée aux tyrosine kinases (voir Figure 16). Notre étude, très préliminaire, des voies de signalisation induites 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 CE. 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 ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\zeta$ , ...), et, nous avons montré que le profil de phosphorylation des PKC $\alpha/\beta$ II était différent dans les lymphocytes B et les cellules endothéliales traitées par les anticorps anti-HLA-DR. Nos premiers résultats montrent aussi que la voie de la PI3Kinase est activée par la liaison des molécules de 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 des résidus tyrosine et des PKC  $\alpha/\beta$ II selon un profil spécifique aux cellules endothéliales, et également, à l'activation de la PI3-K reflétée par la phosphorylation de Akt. L'implication de PI3-K/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 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 (219) (220). Il serait aussi important d'étudier les autres voies de signalisation qui pourraient être activées, telles que les voies des MAPK et du facteur de transcription NF- $\kappa$ B qui sont impliquées dans la régulation du phénotype et des fonctions des cellules endothéliales (apoptose, prolifération, ...). De plus, la participation de ces voies à la signalisation des molécules du CMH de classe II a déjà été démontrée dans d'autres modèles (156) (157). En effet, au-delà de l'activation des voies de signalisation, il serait tout aussi important de chercher les conséquences fonctionnelles éventuelles de la signalisation par les molécules de classe II telles que l'activation endothéliale incluant les modifications du phénotype et la production de cytokines, chimiokines et facteurs solubles, la prolifération cellulaire ou la différenciation.

Il serait aussi important de définir la signalisation activée en présence simultanée d'anticorps anti-HLA de classe I et de classe II, condition qui, en clinique, est fréquente et semble être associée à une diminution de la survie des transplantations rénales (144).

**Figure 16.** Mécanismes supposés de la signalisation des molécules du CMH de classe II (d'après Al Daccak et al, 2004).



## 5.2. Impact des anticorps anti-HLA comparé aux anticorps dirigés contre les cellules endothéliale (AECA) dans le rejet de greffe.

Dans une étude réalisée dans notre équipe par Stéphanie Le Bas et publiée en 2003 dans l'American Journal of Transplantation (221), la présence d'anticorps dirigés contre les cellules endothéliales a été mise en évidence dans une cohorte de patients transplantés rénaux. Cette étude, réalisée par cytométrie de flux sur des cultures d'HAEC, a montré la présence d'anticorps dirigés contre des antigènes de surface exprimés par les cellules endothéliales. Ces antigènes membranaires semblent être exprimés par les cellules endothéliales, mais pas par les lymphocytes, ce qui semble exclure les molécules du HLA, qu'elles soient de classe I ou de classe II. Par ailleurs, ils sont fortement surexprimés après stimulation des cellules par le TNF $\alpha$  ou l'IFN $\gamma$ . La nature des protéines reconnus par ces anticorps appelés anticorps anti-cellules endothéliales (AECA pour « Anti-Endothelial Cell Antibodies ») reste à identifier. Néanmoins ce travail a permis de montrer que la fixation de ces anticorps à la surface des cellules endothéliales induit l'apoptose d'une fraction significative des cellules *in vitro*. Les mécanismes de l'apoptose induite par les AECA reste à déterminer. Ces résultats indiquent que, contrairement aux anticorps anti-HLA étudiés dans les deux études présentées dans ce

manuscrit, d'autres anticorps dirigés contre des antigènes exprimés de façon assez spécifique par l'endothélium sont clairement délétères en induisant la mort cellulaire par apoptose, au moins *in vitro*. J'ai étudié le devenir des greffes de cette cohorte de patients ; elle indique une corrélation entre la présence de ces anticorps AECA et une diminution de la fonction du greffon à 1 an (résultats non montrés). Une autre étude récente suggère également que des cibles antigéniques portés par l'endothélium du greffon peut induire une réponse anticorps spécifique, non liée au HLA, et, la présence de ces anticorps a été trouvée associée au rejet en l'absence d'anticorps anti-HLA (222). Dans aucune de ces 2 études, on peut exclure la possibilité que les anticorps étudiés reconnaissent des molécules du HLA non classique telles que MICA dont le polymorphisme élevé (223) a été associé à une réponse humorale allogénique (224) (225). De plus, MICA est exprimé par les cellules endothéliales et pourrait être régulé au cours du rejet de greffe (226).

### 5.3. Effet immunomodulateur des Statines et bénéfique en Transplantation.

Dans notre étude *in vitro*, la simvastatine inhibe la prolifération des cellules endothéliales induite par les alloanticorps dirigés contre le HLA de classe I, ce qui peut suggérer un effet bénéfique des statines dans la prévention de l'artériosclérose du greffon, mécanisme physiopathologique responsable du rejet chronique en allotransplantation (94). L'effet des statines sur le contrôle du cycle cellulaire a été amplement étudié.

Les inhibiteurs de la 3-hydroxy-3-méthylglutaryl coenzyme A réductase (HMG-CoA réductase), ou statines, sont devenus le traitement de référence de la plupart des formes d'hypercholestérolémie (227). Le mécanisme d'action principal des statines est d'inhiber la biosynthèse du cholestérol par inhibition compétitive de l'HMG-CoA réductase. Cette inhibition compétitive est due à l'analogie structurale des statines avec l'HMG-CoA, le substrat naturel de l'enzyme (228).

Au-delà de leur effet hypolipémiant, les statines contrôlent de multiples mécanismes cellulaires et de nombreuses études montrent que les statines exercent un effet sur le système immunitaire (pour revue voir (227)). Parmi les effets documentés des statines *in vitro* et *in vivo* sur l'endothélium, il convient de citer la stimulation de la production de NO, la

modulation de la prolifération, la modulation de l'expression de molécules d'adhésion et de cytokines, l'apoptose, l'augmentation de l'activité fibrinolytique et la régulation de facteurs de transcription et récepteurs nucléaires (229) (230) (231). L'inhibition de l'isoprénylation, modification post-traductionnelle des protéines, est le mécanisme central du mode d'action des statines (232). C'est par ce mécanisme que les statines exercent leur effet inhibiteur sur les protéines G hétérotrimériques et petites protéines G telles que Ras, Rac et Rho. Les petites protéines G forment une superfamille de protéines essentielles à la transduction du signal, à l'organisation du cytosquelette et au transport cellulaire. Ainsi, les statines inhibent la prolifération cellulaire en contrôlant l'activité de la GTPase RhoA (141).

La démonstration d'un effet immunomodulateur a tout d'abord été apportée par Kwak *et al.* dont les travaux ont montré une action inhibitrice des statines sur l'expression des molécules du CMH de classe II (151). Cet effet inhibiteur s'exerce sur l'induction des molécules CMH de classe II (cellules endothéliales et monocytes/macrophages) par l'IFN $\gamma$ , et non, sur l'expression constitutive des molécules CMH de classe II. En effet, alors que l'expression constitutive du CMH de classe II est restreinte à un petit nombre de cellules spécialisées, l'expression du CMH de classe II peut être induite par l'IFN $\gamma$  dans de nombreux types cellulaires. Cette régulation complexe est sous le contrôle du facteur transactivateur CIITA dont l'expression est très finement régulée par une série de promoteurs permettant la transcription de CIITA dans des conditions physiologiques distinctes. L'induction des molécules du CMH de classe II par l'IFN $\gamma$  et l'effet inhibiteur des statines sur ce mécanisme impliquent le promoteur IV du facteur transactivateur CIITA (151). L'inhibition de l'expression induite du CMH de classe II par les cellules endothéliales a pour conséquence de diminuer la capacité de ces cellules à activer des lymphocytes T allogéniques (151). Depuis, d'autres études ont montré un effet des statines sur des molécules de costimulation, telles que CD40 (233), et étendu l'effet des statines à d'autres types cellulaires impliqués dans la réponse immune telles que les cellules dendritiques. L'ensemble de ces observations suggère l'utilisation des statines comme molécules immunomodulatrices. Dans un contexte de greffe d'organes, une étude portant sur 1574 receveurs d'une transplantation rénale a indiqué un net bénéfice (24% d'augmentation) du traitement par les statines sur la survie des patients (234).

Dans notre étude, nous avons montré que la simvastatine diminue la prolifération des cellules endothéliales sans affecter l'expression des molécules du HLA de classe I à la surface des cellules (résultats non montrés) Afin de compléter cette étude associant RhoA et la

signalisation par les molécules du MHC de classe I, nous avons ensuite comparé *in vitro* l'effet des statines, et plus particulièrement, de 4 statines (simvastatine, pravastatine, atorvastatine et fluvastatine) sur l'expression basale et la régulation par l'IFN $\gamma$  des molécules du CMH de classe I et de classe II. Cette étude a été réalisée par cytométrie de flux sur des cultures primaires de cellules endothéliales issues de veines de cordons ombilicaux (HUVEC) et comparait trois concentrations de statine (0,01 ; 0,1 et 1  $\mu$ M).

Nous avons ainsi pu montrer que seule la fluvastatine affecte, *in vitro*, l'expression des molécules du CMH de classe I portées par les cellules endothéliales humaines. Nos observations confirment l'effet inhibiteur des statines sur l'induction de l'expression endothéliale des molécules du CMH de classe II déjà rapporté par Kwak et al. (151). Cependant, notre étude indique que la fluvastatine affecte également l'expression des molécules du CMH de classe I (HLA-A, -B, -C). Dans ce cas, la fluvastatine a pour effet d'augmenter l'expression constitutive des molécules du CMH de classe I. Nous n'avons pas observé cet effet avec d'autres statines testées dans les mêmes conditions (simvastatine, pravastatine, atorvastatine). Initialement, l'étude de Kwak *et al.*, réalisée avec l'atorvastatine, ne montrait pas d'effet significatif de cette statine sur l'expression du MHC de classe I. L'effet d'une forte concentration de fluvastatine (1 $\mu$ M) a le même effet que le traitement par l'IFN $\gamma$  (augmentation d'un facteur 2 de l'expression des molécules de classe I à la surface des cellules endothéliales). La fluvastatine exerce aussi un effet agoniste vis-à-vis de l'IFN $\gamma$  et potentialise à forte dose (1 $\mu$ M) la régulation induite par cette cytokine. L'effet global de la fluvastatine sur l'expression endothéliale du CMH est dose-dépendant, il apparaît dès 0,01  $\mu$ M pour l'inhibition du CMH de classe II, et, dès 0,1  $\mu$ M pour le CMH de classe I. Ces résultats ont été publiés dans *Néphrologie et Thérapeutique* (Belliard G., Coupel S. *et al.*, 2005, cf liste de publications).

L'ensemble de ces résultats confirme l'effet immunomodulateur des statines, déjà observé pour les molécules du CMH de classe II (151) et CD40 (233), et, l'étend aux molécules du CMH de classe I pour de fortes doses de fluvastatine. Contrairement à l'effet inhibiteur décrit pour le CMH de classe II et CD40 dont l'effet immunomodulateur est clairement établi, les conséquences fonctionnelles de l'augmentation des molécules du CMH de classe I observée *in vitro* avec la fluvastatine dans notre étude restent à évaluer.

En effet, dans un contexte de transplantation allogénique, l'expression des molécules du CMH de classe I du donneur par les cellules endothéliales du greffon participe à la réponse immune du receveur par la présentation directe des alloantigènes aux lymphocytes T CD8+ du receveur. L'expression accrue des molécules du CMH de classe I du donneur pourrait également favoriser la réponse humorale et l'induction d'anticorps anti-donneur. Les molécules de classe I interviennent également dans le contrôle de l'activité des cellules NK par la reconnaissance des récepteurs exprimés par les cellules NK. Par conséquent, il serait également important de définir si l'effet régulateur de la statine sur l'expression du CMH de classe I modifie l'activité cytotoxique des cellules NK. Les cellules NK participent aussi à l'immunité naturelle par la cytolysse des cellules infectées ou tumorales. Il convient de noter qu'une étude récente n'a pas montré d'effet à 10 ans de la simvastatine sur la mortalité ni sur l'incidence de cancer sur une cohorte de 2000 patients, traités ou non pendant 5 ans par la simvastatine puis traités librement (235). A ce jour, les études cliniques ont démontré un effet bénéfique des statines sur la survie, le sévérité du rejet et l'artériopathie du greffon cardiaque. En revanche, le bénéfice des statines sur la survie des greffes de rein reste à démontrer. Une étude récente sur une petite cohorte de 77 transplantés rénaux indique une modeste amélioration de la survie du greffon à un an dans le groupe des patients traités par les statines (236). L'effet majeur rapporté est une réduction des maladies cardiaques qui sont la principale cause de décès, avec un greffon fonctionnel, chez les receveurs de transplantation rénale (237). Ces résultats, en faveur d'un effet net des statines sur l'inflammation et l'athérogénèse lié à une diminution du cholestérol, montrent que leur effet immunosuppresseur n'est pas totalement défini (238). Des études récentes ont montré que les statines pouvaient agir directement en contrôlant l'activation des lymphocytes T (239) (240) (241). L'effet des statines rapporté dans l'étude *in vitro* de Ghittoni *et al.* est directement lié à l'inhibition de la HMG-CoA réductase qui, en modifiant la composition des lipides membranaires, altère les « lipîd raft » et la signalisation intracellulaire (239). Ces travaux montrent aussi que l'inhibition de la prénylation des protéines par la simvastatine inhibe la signalisation par les GTPases, et en particulier, ils identifient la voie Ras/MAPKinase comme une cible moléculaire majeure de l'action immunospressive de la simvastatine dans les lymphocytes T (239). Une autre étude *in vitro* montre que les statines (l'atorvastatine) activent sélectivement la MAPkinase ERK1, sans effet sur ERK2, et, suggère que cet effet est nécessaire pour induire l'anergie des lymphocytes T (241). D'autres études proposent également un effet des statines sur la production de cytokines, et, sur l'expression de marqueurs d'activation, tels que CD25 et CD69 (240), et de molécules d'adhésion impliquées dans le trafic leucocytaire, ce

qui confère ainsi aux statines un effet anti-inflammatoire, à ajouter à leur effet immunomodulateur (pour revue, voir (242)).

## 5.4. Endothélium et voies de signalisation : vers de nouvelles approches thérapeutiques ?

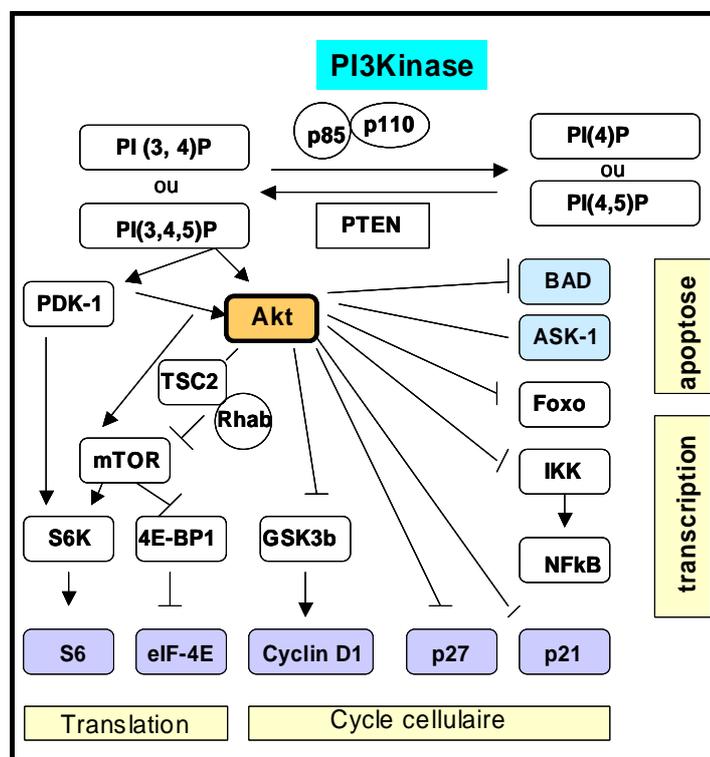
Une partie des travaux présentés dans cette thèse souligne l'importance de la voie de la PI3-K dans les mécanismes de prolifération et de survie des cellules endothéliales vasculaires. En effet, nous avons montré que la prolifération des cellules endothéliales induite *in vitro* par les anticorps anti-HLA de classe I résulte de l'activation de la PI3-K (chapitre 2). L'inactivation par phosphorylation de la kinase GSK3 $\beta$  semble dans ce cas être la cible moléculaire impliquée dans le contrôle de la prolifération. Nous montrons aussi que cette voie est activée par la liaison des anticorps de classe II et pourrait fournir un signal anti-apoptotique (chapitre 3).

La voie PI3-K contrôle de multiples événements signalétiques et cellulaires impliqués dans l'apoptose, la transcription, la translation, le métabolisme et la progression du cycle cellulaire (pour revue, voir (85)). Elle est, par conséquent, fortement associée au développement et à la progression tumorale, et, son contrôle constitue donc un objectif majeur pour la recherche de nouvelles approches thérapeutiques en cancérologie. Une vue d'ensemble des effecteurs moléculaires de la voie de la PI3-K est présentée dans la Figure 17. A l'heure actuelle, l'état des connaissances n'a pas permis de privilégier une cible unique d'Akt pour inhiber le développement tumoral. Le substrat d'Akt le mieux caractérisé reste certainement la sérine/thréonine kinase mTOR.. La rapamycine (et analogues) est l'inhibiteur de mTOR le plus utilisé actuellement en clinique, et notamment, en Transplantation pour son effet immunosuppresseur. De nombreux autres inhibiteurs sont testés en laboratoire voire en phase d'essai clinique pour certains (pour revue, voir (243)). Les cibles moléculaires au sein de la voie PI3-K sont variées et ces nouvelles molécules comprennent :

- les inhibiteurs de la PI3-K : les deux inhibiteurs, LY294002 et la wortmannine, agissent sur la sous-unité catalytique p110 de la PI3-K. Leur efficacité *in vitro* et *in vivo* dans divers modèles animaux est bien établie, mais, leur toxicité et leur faible solubilité, limitent leur utilisation en clinique. Des dérivés de la wortmannine, tels que PX-866 ou IC486068 (inhibiteur spécifique de l'isoforme p110 $\delta$ ) et la « deguelin », sont actuellement testés.

- les inhibiteurs de PDK1, kinase responsable de la phosphorylation d'Akt, tels que les molécules, UCN-01 et OSU-03012, dérivées de deux médicaments bien caractérisés, la staurosporine et le celecoxib, qui manquent de spécificité et inhibent également d'autres kinases telles que les protéines kinases C.
- les inhibiteurs de la kinase Akt, la perfosine et PX-316, sont en essais cliniques de phase I et II chez patients atteints de tumeurs au stade terminal.
- les inhibiteurs de mTOR, analogues de la rapamycine.

Figure 17 . Représentation schématique de la voie PI3K/Akt.



## 5.4. Contribution de HLA-E aux fonctions immuno-régulatrices des cellules endothéliales.

Si l'on considère d'une part les propriétés de la molécule HLA-E telles que définies *in vitro* dans différents modèles, et, d'autre part, le fait que l'expression de cette molécule semble, d'après notre étude, restreinte à un petit nombre de cellules incluant les cellules immunes (lymphocytes B, T, NK monocytes/macrophages), cellules du trophoblaste (204) (244) et certaines cellules tumorales dont les mélanomes (206), l'expression endothéliale de HLA-E offre de nouvelles fonctions aux cellules endothéliales dans la modulation de la réponse immune.

Si la place de l'endothélium a été fortement réévaluée au cours des dix dernières années par de nombreux travaux montrant son importance dans le contrôle de l'hémostase et de l'inflammation, sa contribution à la réponse immune reste, quant à elle, toujours controversée. L'une des raisons est la difficulté d'étudier ces fonctions *in vivo* chez l'animal et chez l'homme, ce qui limite cette recherche à des études *in vitro*, et, initialement restreintes à des études réalisées avec des cultures d'HUVEC (pour revue, voir (245)).

Les cellules endothéliales ne peuvent pas être totalement définies comme des APC. En effet, contrairement aux lymphocyte B ; macrophages et cellules dendritiques qui sont des APC dites « professionnelles », les cellules endothéliales se distinguent par une expression faible, et parfois absente, des molécules de HLA de classe II (35) (36), et, l'absence de certaines molécules de costimulation telles que B7-1 (CD80) et B7-2 (CD86) (pour revue, voir (246) (245)). Les premiers travaux analysant l'effet des cellules endothéliales en culture sur l'activation des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> montraient que seules les cellules stimulées par l'IFN $\gamma$ , et donc, exprimant les molécules du MHC de classe II, induisait la prolifération de lymphocytes CD4<sup>+</sup>T allogéniques (247). Les expériences de blocage au moyen d'anticorps démontraient l'importance des récepteurs LFA1, et des couples LFA-3/CD2 et VCAM-1/VLA4 dans l'interaction cellules endothéliales/lymphocytes CD4<sup>+</sup>T (247). Une étude du même laboratoire montrait à la même période la capacité des cellules endothéliales à stimuler la prolifération et la production d'IFN $\gamma$  par les lymphocytes CD8<sup>+</sup>T de façon MHC classe I-dépendante (248). Depuis ces travaux initiaux, d'autres études sont venues moduler l'impact des cellules endothéliales sur l'activation lymphocytaire des T CD4<sup>+</sup> (249) mais aussi des CD8<sup>+</sup>. Ainsi une étude comparant l'activation lymphocytaire induite par des lymphocytes B

ou des cellules endothéliales du même donneur montrent que les cellules endothéliales ont une capacité relativement faible comparée aux cellules B à stimuler les lymphocytes T CD8+ en cellules T cytotoxiques (CTL) (250). Cette étude montre que les cellules endothéliales activent préférentiellement les T CD8+ mémoires. Elles confèrent aux T CD8+ naïves un phénotype de type « activation précoce » qui se distingue par l'expression des marqueurs CD25, CD69 et CD62L et la faible expression de perforine (250). Le pouvoir des cellules endothéliales sur l'expansion des T allogéniques est de 5 à 40 fois plus faible que celui des cellules B (114). Ces articles étaient les premiers distinguant les cellules endothéliales des APC conventionnelles. Les travaux plus récents ont aussi apporté l'identification de nouveaux récepteurs de costimulation, tels que CD40 (251), mais aussi, ICOS, 4-1BB et OX40 qui interviennent dans la génération des cellules T effectrices/mémoires, et, dont certains ligands sont exprimés par les cellules endothéliales (B7-h ou ICOS-L, OX40L et 4-1BBL) (252). Shiao *et al.* ont montré récemment que ces trois ligands sont exprimés et régulés à la surface des cellules endothéliales des microvaisseaux et qu'ils participent à l'activation des lymphocytes T mémoires par les cellules endothéliales *in vitro* et au rejet de greffe *in vivo* (252). Le blocage de ces trois récepteurs constitue un axe important de recherche pour prévenir le rejet de greffe.

Par ailleurs, plusieurs études suggèrent également que le phénotype et le mode de présentation antigénique spécifiques aux cellules endothéliales pourraient donner à celles-ci des propriétés tolérogènes. En particulier, les travaux montrant le rôle des molécules ILT2, 3 et 4 exprimées par les cellules dendritiques dans l'induction de lymphocytes T suppressives de phénotype CD8+CD28- foxp3+ ont été adaptés aux cellules endothéliales (253) (254) (255). Le point intéressant de ces travaux est la mise évidence de l'expression des récepteurs ILT3 et ILT4 par les cellules endothéliales, ce qui suggère des interactions spécifiques des cellules endothéliales avec des cellules portant les ligands correspondants dont HLA-G.

Dans ce contexte, nos observations concernant l'expression de HLA-E ainsi que la production des formes solubles de HLA-E nous permettent de faire quelques remarques et hypothèses sur le rôle potentiel de ces molécules dans les fonctions immunes de l'endothélium en particulier dans le contexte de la Transplantation d'organes vascularisés.

#### 5.4.1. Rôle de HLA-E dans la présentation des peptides allogéniques.

L'obtention de souris transgéniques pour HLA-E (256) et leur caractérisation (205) ont montré l'induction *in vivo* de CTL allogéniques anti-HLA-E chez des souris transgéniques

pour HLA-B27. Bien que la plupart des observations rapportées dans cet article porte en fait sur la xénorecognition de HLA-E chez la souris, ce sont les rares travaux portant sur HLA-E *in vivo*. Ils montrent que dans ce modèle animal, HLA-E se comporte comme HLA de classe Ia et induit une forte réponse immune conduisant au rejet de greffes de peau (205). Par ailleurs, de nombreuses études *in vitro* ont permis de caractériser le rôle de HLA-E dans la présentation de peptides du soi, bactériens ou viraux mais aussi allogéniques (197). Les CTL allogéniques sont classiquement dirigés contre les allèles HLA-A ou HLA-B, moins fréquemment HLA-C. Compte-tenu du polymorphisme élevé des molécules de classe I, les CTL alloréactifs sont généralement très spécifiques d'un allèle du HLA de classe I donné. La mise en évidence de CTL alloréactifs spécifiques de la molécule faiblement polymorphique HLA-E offre donc un nouveau scénario. Ces observations pourraient avoir une implication importante en Transplantation. En effet, il est concevable que des CTL spécifiques de HLA-E, qui prolifèrent *in vitro* en culture mixte lymphocytaire et qui présentent une activité cytotoxique pour un large panel de cellules allogéniques, jouent un rôle dans le rejet de greffe dans un contexte où les cellules du donneur expriment des molécules du HLA de classe I qui ne sont pas reconnues par les récepteurs KIR du receveur. Leur large spectre de réactivité et leur indépendance vis-à-vis des molécules de classe I classique confèrent à ces CTL HLA-E-spécifiques un fort pouvoir de réponse à une stimulation allogénique et un nouvel élément pour une meilleure compréhension de la réponse alloimmune.

#### 5.4.2. HLA-E et Protection des cellules endothéliales contre la lyse par les CTL et cellules NK.

Nos résultats indiquent que l'expression constitutive de HLA-E à la surface des cellules endothéliales est modeste comparée à celle des molécules de HLA de classe I classique mais l'expression de HLA-E a été observée avec des niveaux d'expression comparables sur des cellules endothéliales de différents donneurs. Notre première approche pour analyser la fonction de HLA-E membranaire a été de comparer la cytotoxicité de cellules NK allogéniques pour des HAEC activées ou non par de l'IFN $\gamma$ , et donc, présentant un niveau basal ou une sur-expression de HLA-E à la membrane. Nous avons montré dans notre étude que la sur-expression de HLA-E par les cellules endothéliales traitées par l'IFN $\gamma$  confère une protection significative des cellules endothéliales contre la lyse par ces cellules NK allogéniques (cf [article 3](#)). Cet effet protecteur est conforme aux résultats déjà publiés sur les fonctions de HLA-E définies dans des modèles de transfection (184) (188) (257). Les travaux

qui ont mis en évidence le rôle protecteur de HLA-E ont aussi identifié le récepteur inhibiteur CD94/NKG2A comme médiateur de cette protection (184) (188) (257).

Dans notre étude, nous avons obtenu un blocage significatif de la protection des cellules endothéliales traitées par l'IFN en présence d'un anticorps anti-NKG2A. Cependant, nous avons aussi observé un effet en utilisant un anticorps bloquant le récepteur activateur NKG2C à la surface des effecteurs NK. Ces résultats préliminaires pourraient suggérer que la liaison HLA-E/CD94/NKG2C soit fonctionnelle et pourrait jouer un rôle. En effet, il a été montré lors de la caractérisation initiale des récepteurs de HLA-E, que HLA-E pouvait interagir avec CD94/NKG2A et CD94/NKG2C mais présentait une affinité plus forte pour le récepteur inhibiteur NKG2A (184) (258). NKG2A contient une séquence ITIM dans son domaine cytoplasmique qui, en réponse à la stimulation du récepteur, va subir une phosphorylation sur les résidus tyrosine permettant le recrutement de SHP-1 ou SHP-2, qui vont inhiber les fonctions effectrices des NK (259). Contrairement à NKG2A, NKG2C ne possède pas d'ITIM mais s'associe avec la protéine DAP12 pour conduire le signal activateur. (259). CD94 est nécessaire pour le transport de NKG2A et NKG2C à la surface des cellules. L'interaction sélective avec NKG2A ou NKG2C semble dépendre aussi du peptide présenté par HLA-E (260). Des expériences complémentaires sont nécessaires pour mieux analyser l'interaction de HLA-E porté par l'endothélium avec ces récepteurs et les conséquences fonctionnelles. Nous souhaitons dans un premier temps faire une étude de dose-réponse de ces anticorps, et aussi, analyser l'effet du blocage simultané de ces deux récepteurs. Nous souhaitons également compléter cette étude par l'étude de HLA-E vis-à-vis des CD8+ CTL allogéniques.

Donc, nos résultats suggèrent que l'activation des cellules endothéliales du greffon pourrait protéger, par l'expression de HLA-E, ces cellules de la lyse par les NK et les CD8+ allogéniques. Le rôle des cellules NK en Transplantation reste mal défini ; il a fait l'objet de relativement peu d'études (261), les NK étant classiquement associés à l'inflammation et au rejet de greffe. Néanmoins une étude récente suggère leur participation à la régulation de la réponse acquise, et en particulier, attribue un rôle aux cellules NK dans l'induction de tolérance. Dans cette étude, la tolérance à une allogreffe d'îlots pancréatiques est induite par un traitement des souris receveuses par un anticorps anti-CD40L. Les auteurs montrent que, dans ce modèle, l'expression du CMH de classe I est nécessaire pour induire la tolérance qui requiert la présence des NK, et non des CD8+T, et, l'expression de la perforine (262). Ces travaux suggèrent que moduler l'activité des NK est une stratégie potentielle pour induire la tolérance à une greffe allogénique.

Les régions extracellulaires de NKG2A et NKG2C qui reconnaissent HLA-E présentent 92 % d'homologie de séquence (263) alors que leurs domaines transmembranaires et intracellulaires ne partagent que 60% d'homologie, NKG2C ne possédant pas le domaine ITIM présent dans la molécule NKG2A. Le « trafficking » du récepteur inhibiteur CD94/NKG2A est différent de celui de CD94/NKG2C. L'internalisation de CD94/NKG2A est indépendante de la fixation du ligand, l'association/dissociation du couple récepteur/ligand est rapide et ce récepteur est constamment recyclé probablement pour assurer une expression constante de CD94/NKG2A à la surface des NK. La fine régulation de l'expression de ce récepteur suggère un rôle important de NKG2A dans le contrôle de l'activité cytotoxique et l'autoimmunité (264).

#### 5.4.3. Rôle de l'expression endothéliale de HLA-E dans la génération de lymphocytes T suppresseurs et l'induction de tolérance.

La régulation de la réponse immune comprend des mécanismes intrinsèques à l'activation et la différenciation antigène-dépendante des cellules immunocompétentes, et, des mécanismes extrinsèques sous le contrôle des cellules suppressives. La caractérisation des populations de cellules lymphocytaires régulatrices ou suppressives et leur utilisation potentielle pour dévier la réponse immune vers la tolérance est un axe de recherche majeur en Transplantation (265). Plusieurs travaux importants proposent un rôle de HLA-E dans la génération de cellules T CD8<sup>+</sup> suppressives et le contrôle de l'autoimmunité. Ces études ont été faites chez la souris et portent sur l'homologue murin de HLA-E, Qa-1 (266).

Plusieurs caractéristiques des molécules Qa-1/HLA-E justifient un rôle potentiel de ces molécules comme éléments de restriction de la réponse immune. Tout d'abord, l'expression de Qa-1 par les cellules CD4<sup>+</sup> activées et leur faible expression par les cellules au repos. De plus, leur expression transitoire protège les cellules CD4<sup>+</sup> non activées qui ne les expriment pas. HLA-E a un polymorphisme limité et peut présenter des peptides du soi ou des peptides exogènes aux T CD8<sup>+</sup>. Cependant, au cours de l'activation des cellules T, HLA-E peut aussi présenter divers peptides hydrophobiques qui vont servir de cibles antigéniques pour les T CD8<sup>+</sup>. Le complexe HLA-E/peptide va interagir avec le récepteur CD94/NKG2A porté par les NK ou les CD8<sup>+</sup>T classiques.

## 5.5. Importance des formes solubles du HLA pour le diagnostic et le suivi des pathologies vasculaires.

Nos travaux sont les premiers à décrire une forme soluble pour HLA-E dans les surnageants de cellules endothéliales en culture. Une étude collaborative avec le groupe de N. Gervois et F. Jotereau, 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 $\gamma$  (cf ci-dessous chapitre 5.6., Derre *et al.* (287)). Nos premiers résultats suggèrent également que sHLA-E possède une activité biologique. En effet, nos expériences réalisées avec des surnageants de culture de cellules endothéliales contenant du sHLA-E montrent un effet protecteur sur la lyse de cellules cibles par des 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. sHLA-E rejoint donc les autres molécules solubles du HLA de classe I non classique ou apparentées telles que HLA-G et MICA solubles.

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) (267) (268). Le clivage protéolytique semble également produire des formes solubles de HLA-G présentant une activité biologique (269) (270). L'obtention des anticorps spécifiques des différentes isoformes, la mise au point de techniques de dosage nécessaires à la caractérisation des formes solubles de HLA-G et à leur quantification, sont relativement récentes (178) (268). Par conséquent, certaines études montrant la présence des différentes isoformes dans les fluides biologiques et publiées au cours des deux dernières années, semblent divergentes voire contradictoires, probablement en raison des techniques et réactifs différents utilisés (271) (272) (273). Néanmoins, les formes solubles de HLA-G ont été mise 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 (274) et rénale (275). Parallèlement, plusieurs études *in vitro* documentent les fonctions de sHLA-G et indiquent un effet inhibiteur de la prolifération des lymphocytes T alloréactifs (276) (277) et la capacité d'induire des cellules T régulatrices (278). Ces travaux complètent les propriétés protectrices des molécules

HLA-G membranaires et solubles déjà décrites. L'ensemble de ces travaux suggèrent l'utilisation de sHLA-G à des fins diagnostiques et thérapeutiques en Transplantation.

De façon intéressante, une étude récente montre que la forme soluble de HLA-G se fixe sur les cellules endothéliales via le récepteur CD160 ; cette interaction inhibe l'angiogénèse induite par le VEGF ou le FGF-2 et induit l'apoptose des cellules endothéliales, ce qui suggère l'utilisation de sHLA-G pour la prévention de la néoangiogénèse des tumeurs (279).

De même que HLA-G, la forme soluble de MICA a fait l'objet d'une description récente (280) (281). 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 MICA soluble en moyenne dans le sérum de patients atteint de cancers de l'estomac ou du côlon, n= 296) (280) (282). La présence de MICB soluble a été plus récemment décrite (283) et semble corrélée à celle de MICA soluble dans les tumeurs (284). 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 (285).

En résumé, les connaissances actuelles indiquent que HLA-G a un rôle immunosuppresseur via son interaction avec les récepteurs inhibiteurs ILT2 et ILT4 (286), et que sHLA-G contrôle la prolifération des lymphocytes T alloréactifs (276) (277) et l'induction des cellules T régulatrices (278). De plus, MICA soluble inhibe l'expression de son récepteur NKG2D à la surface des cellules effectrices NK et CTL, et, confère donc une protection aux cellules exprimant MICA. Nos premiers résultats suggèrent que sHLA-E est une troisième molécule potentiellement immunosuppressive qui protège de la lyse, par les cellules NK et les lymphocytes CD8<sup>+</sup> cytotoxiques, les cellules exprimant peu ou pas HLA-E telles que les cellules endothéliales non activées ou les cellules du muscle lisse. Notre étude, réalisée par Western blot au moyen des anticorps anti-HLA-E produits par Vaclav Horesji (MEM/E-2), montre la présence de sHLA-E dans le sérum de patients atteint de vascularites à ANCA. Chez ces patients, nos premiers résultats suggèrent que la présence de sHLA-E est plus fréquente chez les patients en phase active (au moment du diagnostic et épisodes de rechute) que chez les patients en phase de rémission. Une étude sur une cohorte plus importante de patients est nécessaire pour valider ces observations. De plus, la production d'anticorps monoclonaux qui permettront de développer un test de dosage Elisa quantitatif est

une étape importante pour le développement de ce projet. La production de la protéine recombinante est en cours (Plate-forme de production de protéines recombinantes, INSERM U601, Nantes) ; elle permettra, outre la production d'anticorps, de caractériser cette nouvelle molécule soluble et d'étudier les fonctions biologiques de HLA-E soluble.

## 5.6. HLA-E et mélanomes.

Au cours de cette étude, nous avons collaboré avec le groupe de Nadine Gervois et Francine Jotereau (UMR INSERM 601, Nantes) pour tester l'expression et la régulation de HLA-E à la surface de lignées et cultures primaires de mélanomes, ainsi que, la production de HLA-E soluble par ces cellules. Cette collaboration a permis de montrer que, comme pour les cellules endothéliales, l'IFN $\gamma$  augmente l'expression membranaire de HLA-E dans différentes lignées de mélanomes et conduit également à la production de la forme soluble de HLA-E. De façon intéressante, l'étude immunohistologique réalisée au cours de cette étude indique que l'expression de HLA-E décroît au cours du développement tumoral avec une expression de HLA-E plus forte et plus fréquente dans les tumeurs primaires que dans les métastases.

Les résultats de cette étude ont fait l'objet d'une publication : *Derre L. et al. J. Immunol. 2006 (287).*

## **CONCLUSION et PERSPECTIVES**

## Détection de nouveaux marqueurs endothéliaux cellulaires et plasmatiques pour une exploration non invasive de la paroi vasculaire.

Un objectif de notre projet de recherche est de transposer les connaissances acquises au développement d'une recherche biologique et clinique appliquée à la Transplantation d'organes mais aussi aux pathologies vasculaires (vascularites à ANCA, maladies auto-immunes, athérosclérose, et plus particulièrement, dans l'insuffisance rénale).

### Importance de HLA-E soluble pour le diagnostic.

A ce titre il nous paraît important de tester et valider l'utilité de sHLA-E pour le diagnostic et l'immunothérapie (**brevet INSERM déposé**). La description de HLA-E soluble étant nouvelle, il n'existe à l'heure actuelle aucun test de routine pour sa détection dans des fluides biologiques. Nous avons utilisé la méthode de Western blot pour montrer que sHLA-E, absent d'un sérum sain, pouvait être détecté dans le sérum de patients présentant une inflammation vasculaire (vascularites à ANCA) où il est corrélé à des taux sériques élevés de CRP, IL2-R $\alpha$ , IL-8 et de VEGF. La production des réactifs spécifiques (protéine purifiée recombinante et anticorps monoclonaux) est en cours pour la mise au point d'un test de dosage (ELISA sandwich) de la forme soluble de HLA-E. Ce test sera utilisé pour mesurer la présence de la forme soluble de HLA-E dans le sérum des transplantés rénaux de notre centre (**BioCol INSERM n° 02G55**) et d'une cohorte de patients atteints de vascularites à ANCA pour lesquels des résidus d'échantillons sanguins ont été conservés au laboratoire d'Immunologie du CHU de Nantes. De façon complémentaire, cette étude analysera la présence d'autres marqueurs endothéliaux solubles, et en particulier, MICA et EPCR qui font l'objet d'études dans notre équipe. Notre équipe a obtenu deux allocations de recherche issues de l'Agence de Biomédecine et de la Société de Néphrologie pour le développement de ces projets.

### Recherche de nouveaux marqueurs endothéliaux.

Nous disposons d'une banque de sérums, cellules et biopsies des patients transplantés rénaux de notre centre et de cellules endothéliales des donneurs réunis au sein d'une **BioCollection INSERM** (**BioCol INSERM n° 02G55**) que nous utiliserons pour une étude clinique visant à rechercher de nouveaux marqueurs endothéliaux sériques caractérisant la survenue du rejet

chronique. L'objectif de ce projet est d'obtenir un test de dosage de la dysfonction endothéliale prédictif du rejet chronique. Cette étude sera développée en collaboration avec la **plate-forme de protéomique haut débit de la Génopôle-Ouest** (Innova, Rennes). L'analyse et la comparaison des sérums de patients (et des protéines endothéliales) seront réalisées après séparation des protéines sur gels 2D et séquençage des peptides par spectrométrie de masse (SELDI-TOF).

# **ANNEXES**

## A1. Stéphanie Coupel - liste de publications.

1. **Coupel, S.**, Soullillou, J. P., and Charreau, B., Endothelial expression of non classical HLA molecules : functions and potential implication in clinical transplanation, *Current Opinion in Organ Transplantation*, 11(2006), 433-438.
2. **Coupel, S.**, Moreau, A., Hamidou, M., Horejsi, V., Soullillou J. P., and Charreau, B., Expression and release of soluble HLA-E feature endothelial cell activation and vascular inflammation, *Blood*, (2006), *en révision*.
3. Belliard, G., **Coupel, S.**, and Charreau, B., Effet de la fluvastatine sur l'expression du CMH de classe I par les cellules endothéliales humaines, *Néphrologie et Thérapeutique*, 1(2005), 221-227.
4. **Coupel, S\***, Lair, D\*, Giral, M., Hourmant, M., Karam, G., Usal, C., Bignon, J. D., Brouard, S., and Soullillou, J. P., The effect of a first kidney transplant on a subsequent transplant outcome: an experimental and clinical study, *Kidney Int.* 67(2005), 2368-2375.
5. Le Bas-Bernardet, S., **Coupel, S.**, Chauveau, A., Soullillou, J. P., and Charreau, B., Vascular endothelial cells evade apoptosis triggered by human leukocyte antigen-DR ligation mediated by allospecific antibodies, *Transplantation.* 78(2004), 1729-1739.
6. Coupel, S., Leboeuf, F., Boulday, G., Soullillou, 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.* 15(2004), 2429-2439.
7. Boulday, G., Fitau, J., **Coupel, S.**, Soullillou, J. P., and Charreau, B., Exogenous tissue inhibitor of metalloproteinase-1 promotes endothelial cell survival through activation of the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway, *Ann N Y Acad Sci.* 1030(2004), 28-36.
8. Le Bas-Bernardet, S., Hourmant, M., **Coupel, S.**, Bignon, J. D., Soullillou, J. P., and Charreau, B., Non-HLA-type endothelial cell reactive alloantibodies in pre-transplant sera of kidney recipients trigger apoptosis, *Am J Transplant.* 3(2003), 167-177.
9. **Coupel, S.**, Giral-Classe, M., Karam, G., Morcet, J. F., Dantal, J., Cantarovich, D., Blancho, G., Bignon, J. D., Daguin, P., Soullillou, J. P., and Hourmant, M., Ten-year survival of second kidney transplants: impact of immunologic factors and renal function at 12 months, *Kidney Int.* 64(2003), 674-680.
10. Nagasaka, T., Boulday, G., Fraser, C. C., **Coupel, S.**, Coulon, F., Tesson, L., Heslan, J. M., Soullillou, J. P., and Charreau, B., Rapid selection of differentially expressed genes in TNF $\alpha$ -activated endothelial cells, *Mol Med.* 8(2002), 559-567.
11. Giral, M., Pascuariello, G., Karam, G., Hourmant, M., Cantarovich, D., Dantal, J., Blancho, G., **Coupel, S.**, Josien, R., Daguin, P., Mechineau, S., and Soullillou, J. P., Acute graft pyelonephritis and long-term kidney allograft outcome, *Kidney Int.* 61(2002), 1880-1886.
12. **Coupel, S.**, Boulday, G., Charreau, B., La xénotransplantation : une définition simple pour un pari biologique humain et animal, *Médecine Thérapeutique.* 8(2002), 293-300
13. Boulday, G., **Coupel, S.**, Coulon, F., Soullillou, J. P., and Charreau, B., Antigrft antibody-mediated expression of metalloproteinases on endothelial cells. Differential expression of TIMP-1 and ADAM-10 depends on antibody specificity and isotype, *Circ Res.* 88(2001), 430-437.
14. Boulday, G., **Coupel, S.**, Coulon, F., Soullillou, J., and Charreau, B., Early induction of TIMP-1 in endothelial cells in response to human xenoreactive IgG, *Transplant Proc.* 33(2001), 701-702.
15. Charreau, B., **Coupel, S.**, Boulday, G., and Soullillou, J. P., Cyclosporine inhibits class II major histocompatibility antigen presentation by xenogeneic endothelial cells to human T lymphocytes by altering expression of the class II transcriptional activator gene, *Transplantation.* 70(2000), 354-361.
16. Charreau, B., **Coupel, S.**, Goret, F., Pourcel, C., and Soullillou, J. P., Association of glucocorticoids and cyclosporin A or rapamycin prevents E-selectin and IL-8 expression during LPS- and TNF $\alpha$ -mediated endothelial cell activation, *Transplantation.* 69(2000), 945-953.

## A2. Article complémentaire.

S. Coupel, J.P. Souillou et B. Charreau.

Endothelial expression of non classical HLA molecules : functions and potential implication in clinical transplantation.

*Current Opinion in Organ Transplantation*, (2006), 11:433-438.

## Endothelial expression of nonclassic HLA molecules: functions and potential implication in clinical transplantation

Stéphanie Coupel<sup>a</sup>, Jean-Paul Souillou<sup>b</sup> and Béatrice Charreau<sup>c</sup>

### Purpose of review

This review highlights expression and functions of nonclassic HLA class I molecules, their expression by human endothelial cells, and mechanisms by which they may significantly affect alloimmune responses to organ transplantation.

### Recent findings

In contrast with classic class I major histocompatibility complex molecules, nonclassic major histocompatibility complex class I molecules such as class I-related chain A, HLA-G, and HLA-E are defined by limited polymorphism and restricted pattern of cellular expression. Human vascular endothelial cells have been shown to express major histocompatibility complex class I-related chain A, HLA-E, and receptors for HLA-G (immunoglobulinlike transcripts 3 and 4). The possibility that nonclassic class I molecules, expressed on graft endothelial cells, actively control regulatory mechanisms not only to impair the destructive immune response mediated by natural killer cells and allospecific cytotoxic T lymphocytes but also to trigger specific tolerance induction is attractive but must be validated.

### Summary

In addition to classic class I and II major histocompatibility complex molecules, graft endothelial cells express nonclassic class I major histocompatibility complex molecules and receptors. The roles that the tightly regulated expression of nonclassic class I major histocompatibility complex molecules play in innate and acquired allogeneic response must be elucidated.

### Keywords

activation, allogeneic response, endothelial cells, innate immunity, natural killer cells and receptors

### Abbreviations

<b>APC</b>	antigen-presenting cell
<b>CTL</b>	cytotoxic T lymphocyte
<b>ILT</b>	immunoglobulinlike transcript
<b>MHC</b>	major histocompatibility complex
<b>MICA</b>	major histocompatibility complex class I-related chain A
<b>NKG2D</b>	natural killer cell receptor

© 2006 Lippincott Williams & Wilkins  
1087-2418

### Introduction

The endothelium is a functional barrier between the vessel wall and bloodstream and endothelial cells are involved in regulating several key physiological functions, both immune and nonimmune, including control of coagulation, fibrinolysis, and vascular tone and growth. It is now clear that dysfunction of the endothelium disturbs a physiological protective regulatory balance, which is a critical factor in the progression of inflammatory and cardiovascular diseases and in transplant rejection. Current evidence also supports the idea that endothelial cells present at the vascular endothelium not only play a critical role in the recruitment of immune cells but also can influence the outcome of the immune response [1]. Human vascular graft endothelial cells display donor class I and II major histocompatibility complex (MHC)-peptide complexes on their surface and are thought to stimulate alloresponses *in vivo* [2,3]. This review presents recent findings indicating that endothelial cells express several nonclassic class I MHC molecules including major histocompatibility complex class I-related chain A (MICA), HLA-E, and the inhibitory receptors immunoglobulinlike transcripts 3 and 4 (ILT3 and ILT4) that could trigger immunomodulatory functions.

### Major histocompatibility complex class I-related chain A

The classic HLA class I loci within the MHC (*HLA-A*, *HLA-B*, *HLA-C*) are characterized by their ubiquitous expression and their extraordinary polymorphism. In contrast with classic HLA class I, the human MHC class I chain-related genes (*MICA* and *MICB*) show an unusual tissue distribution [4]. Unlike other nonclassic HLA class I genes (*HLA-E*, *HLA-F*, and *HLA-G*), MICAs are highly polymorphic [5]. Moreover, their organization, expression, and products differ considerably from classic HLA class I genes [6]. MICAs are constitutively expressed on

Curr Opin Organ Transplant 11:000-000. © 2006 Lippincott Williams & Wilkins.

<sup>a</sup>INSERM, U643, <sup>b</sup>ITERT, Institut de Transplantation et de Recherche en Transplantation, CHU and <sup>c</sup>Université de Nantes, UFR de médecine, Nantes, France

Correspondence to: Pr Jean-Paul Souillou, INSERM U643 and ITERT, 30 bd Jean Monnet, F-44093 Nantes, France  
Tel: +334 087 410; fax: +334 087 411;  
e-mail: Jean-Paul.Souillou@univ-nantes.fr

Current Opinion in Organ Transplantation 2006, 11:000-000

## 2 Histocompatibility

the cell surface of freshly isolated gastric epithelium, endothelial cells, and fibroblasts but are not present on CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cells or B cells [4,6]. Furthermore, cell surface MICA proteins appear to be considerably dysregulated or overexpressed in transformed cells of various types, particularly in those of an epithelial origin, suggesting a role for MICAs in the immune escape of tumours. Evidence for heat and virus-induced upregulation of MIC protein cell surface expression has led to the concept that MIC proteins are markers of stress in the epithelia.

Both MICA and MICB show homology with classic HLA molecules, but they do not associate with  $\beta_2$ -microglobulin, do not bind peptide, and are not expressed on normal circulating lymphocytes. MIC molecules are ligands for the natural killer cell receptor NKG2D, a highly conserved C-type lectinlike membrane glycoprotein expressed on essentially all natural killer cells, as well as on  $\gamma\delta$  and  $\alpha\beta$  CD8<sup>+</sup> T cells, in humans and mice (for review see Ogasawara and Lanier [7]). NKG2D ligands (NKG2DLs) mark malignant cells for recognition by natural killer cells and cytotoxic T lymphocytes via the activating immunoreceptor NKG2D [8]. This led to the hypothesis that NKG2DLs play a critical role in tumour immune surveillance. Recently, the UL16-binding proteins have been identified as additional ligands of NKG2D; their expression *in vivo* is as yet undefined [9]. Functionally, similar stimulatory effects on natural killer and CD8<sup>+</sup> T cells have been initially described for all NKG2D ligands, and the NKG2D receptor/ligand system has therefore been interpreted as a sensor system involved in tumour immune surveillance and activation of immune responses.

Recently, it was demonstrated that MICA is released as a soluble form from the cell surface of tumour cells and can be detected at high levels in sera of patients with gastrointestinal and hematopoietic malignancies but not in healthy donors [10,11]. Soluble MICA released by epithelial tumours downregulates NKG2D surface expression and leads to a functional impairment of tumour antigen-specific cytotoxic lymphocytes [12,11]. We found that cultured vascular human arterial endothelial cells constitutively expressed MICA at the cell surface. Cytokines modulated membrane-bound MICA expression but also promote shedding of soluble MICA (B. Charreau and S. Coupel, personal communication).

The MICA molecule is highly polymorphic in the transmembrane region and the extracellular domain and more than 51 alleles have been reported so far. 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 immuno-

pathology [13,14]. 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 [15]. A total of 53 individual renal and 19 pancreas transplant biopsy specimens were assayed for MICA expression by immunohistology. No MICA staining was observed in seven of 10 kidneys showing no rejection. In contrast, all 11 of the kidney specimens with acute rejection were positive, and nine of the 11 kidney specimens with chronic rejection. The acini of normal, nontransplanted pancreas (control specimens) were consistently negative; however, islets were positive in all specimens. MICA expression and regulation by endothelial cells are still not well defined. While it was initially found expressed at the cell surface of monocytes, fibroblasts, and endothelial [4], endothelial expression for MICA was further confirmed and documented *in vitro* [14]. In this study, 748 serum samples from 139 patients taken before and at various time points after kidney transplantation were investigated for the presence, frequency, and specificity of kidney microvascular endothelial cell-reactive anti-MICA antibodies. As a result, a significant correlation was established for pretransplantation or posttransplantation MICA humoral immunity and graft loss [14].

Despite the fact that MICA/NKG2D interaction is expected to be detrimental to graft endothelial cells, it has recently been shown that the NKG2D ligands H60 and MICA can also mediate strong suppressive effects on T-cell proliferation [16\*\*]. MICA-mediated suppression requires interleukin-10 and involves a receptor other than NKG2D. These findings could explain why strong *in-vivo* NKG2D ligand expression, such as that found on tumour cells, sometimes fails to support an effective immune response.

### The nonclassic major histocompatibility complex class Ib: HLA-G and HLA-E

The HLA-E antigen belongs, with HLA-G and HLA-F, to the nonclassic MHC class I (Ib) molecules, broadly defined by a limited polymorphism and a restricted pattern of cellular expression [17]. HLA-G plays an important role in immune tolerance during pregnancy and in the escape from immune response by tumours. In contrast to HLA-G, the expression and function of HLA-E and HLA-F in physiological and pathologic processes remain poorly established.

### HLA-G and immunoglobulinlike transcript inhibitory receptors: an immunosuppressive balance?

The nonclassic HLA class I antigen HLA-G is an inhibitory molecule involved in immune tolerance and immune escape. Over the past few years, HLA-G has been the

center of intensive investigations that have led to the description of its particular structural and functional properties. Although located in the HLA class I region of chromosome 6, the *HLA-G* gene may be distinguished from other HLA class I genes by its low polymorphism and restricted tissue distribution. HLA-G also differs from other class I molecules in that the gene can be alternatively spliced to produce four membrane-bound (HLA-G1, HLA-G2, HLA-G3, and HLA-G4) and three soluble isoforms (HLA-G5, HLA-G6, and HLA-G7). Structurally, HLA-G1 and HLA-G5 are similar to classic HLA class I molecules in their ability to associate with  $\beta_2$ -microglobulin and to present peptides.

Tissue distribution of HLA-G proteins is restricted to normal fetal and adult tissues (thymic epithelial cells) that display a tolerogenic function towards both innate and acquired immune cells. In pathologic conditions, HLA-G is found expressed in various tissues (skin, muscle, brain) on inflammation and by tumours and HIV-infected cells. HLA-G can also be expressed by infiltrating mononuclear cells within allogeneic transplants [18].

The HLA-G molecule exerts its inhibitory functions via interaction with inhibitory receptors ILT2, ILT4, and KIR2DL4, differentially expressed by natural killer, CD4<sup>+</sup>, and CD8<sup>+</sup> T cells, and antigen-presenting cells. Interestingly, HLA-G is able to upregulate the expression of inhibitory receptors [19<sup>\*</sup>]. HLA-G has inhibitory functions and can be found as a soluble or a membrane-bound molecule. Although in multiple sclerosis brain specimens HLA-G was found expressed in microglial cells, macrophages, and endothelial cells [20], there is still no evidence for HLA-G expression on vascular endothelial cells. Moreover and consistent with its low polymorphism, no alloimmunization against HLA-G has been yet reported. Nevertheless, several studies support the hypothesis that HLA-G may protect allografts. Firstly, HLA-G expression has been observed in cardiac allografts and found to be correlated with a decreased incidence of both acute and chronic rejection [17]. Correlation between HLA-G and graft outcome was further confirmed in a larger cohort of recipients ( $n = 51$ ) [18]. In-vitro experiments substantiated a role for HLA-G in allogeneic transplantation by providing further evidence for its inhibitory functions. These studies demonstrated HLA-G-mediated inhibition of allogeneic natural killer and CD8<sup>+</sup> T-cytolytic function [21] and CD4<sup>+</sup> T-cell alloproliferative response [22]. Soluble HLA-G5 protein was found secreted by allospecific CD4<sup>+</sup> T cells and also suppresses the alloproliferative response [23], suggesting that HLA-G exerts a direct suppressive effect on CD4<sup>+</sup> T lymphocytes.

Despite the fact that endothelial cells fail to express HLA-G, their capacity to express ILT3 and ILT4 in

some conditions has been established *in vitro* after interaction with alloantigen-specific CD8<sup>+</sup> T-suppressor cells. This interaction triggered the induction of ILT3 and ILT4, inhibitory receptors expressed by monocytes and dendritic cells, on endothelial cell surfaces while a down-regulation of costimulatory and adhesion molecules (CD58 and CD86) occurred, thus rendering endothelial cells tolerogenic. Conversely, tolerized endothelial cells elicit the differentiation of CD8<sup>+</sup>CD28<sup>-</sup> FOXP3<sup>+</sup> T-suppressor cells [24], anergize CD4<sup>+</sup> T cells, and can induce the generation of antigen-specific CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T-regulatory cells [25,26<sup>\*</sup>]. As HLA-G has been shown to upregulate ILT2, ILT3, and ILT4 in antigen-presenting cells (APCs), natural killer cells, and T cells [19<sup>\*</sup>], it is tempting to speculate that the concomitant HLA-G expression in transplant and endothelial expression of inhibitory receptors ILT3 and ILT4 could be involved in tolerance induction or maintenance.

#### **HLA-E: a ligand for the inhibitory receptor CD94/NKG2A**

The HLA-E antigen was initially characterized by a broad pattern of mRNA expression on different cell types [27,28]. Cell surface expression of HLA-E required the availability of a set of highly conserved nonameric peptides derived from the leader sequence of various HLA class I molecules including HLA-A, HLA-B, HLA-C, and HLA-G [29,30], suggesting that HLA-E cell surface expression could be limited to some cell type or cell activation processes. Few data are available, however, concerning HLA-E protein and cell surface expression [31,32]. Cell expression and regulation of HLA-E *in vivo* are almost unknown. Recently, we showed that HLA-E expression in kidney is mainly restricted to endothelial cells, where HLA-E immunostaining was consistently found in all endothelial cells from large and small vessels (S. Coupel, in preparation). Our data also indicate that *in vitro* tumor necrosis factor- $\alpha$ , interleukin-1 $\beta$ , and interferon- $\gamma$  upregulated the cell surface expression of HLA-E on endothelial cells and induced the release of soluble HLA-E (S. Coupel, in preparation).

Previous studies demonstrated that HLA-E is a ligand for CD94/NKG2A and CD94/NKG2C receptors expressed on natural killer cells and a subset of T cells [27]. The interaction of HLA-E with the inhibitory CD94/NKG2A receptor results in inhibition of natural killer cell-dependent and cytotoxic T lymphocyte (CTL)-dependent lysis [27]. HLA-E molecules not only provide a protective pathway but also play a role in the regulation of T-cell function. HLA-E forms a heterodimer with  $\beta_2$ -microglobulin, which binds and presents peptides derived from self or foreign proteins [33] after infection [34], immunization, or transplantation [35,36]. HLA-E/peptide complexes can interact with  $\alpha\beta$  T-cell receptors expressed on CD8<sup>+</sup> T cells to trigger conventional CTL function [36]. Moreover, Qa-1 (homologous

#### 4 Histocompatibility

to HLA-E in mice)–deficient mice [37] have defects in immunoregulation mediated by CD8<sup>+</sup> T cells, providing evidence for the involvement of HLA-E–restricted CD8<sup>+</sup> suppressor cells in controlling the adaptive immune response to both foreign and self-antigens [38,39]. The respective contribution of T-cell and NKG2 receptors to HLA-E–mediated regulation of suppressor CD8<sup>+</sup> T-cell functions is still unknown. Altogether, these findings suggest that graft endothelial cells expressing HLA-E may have unique regulatory functions in both the innate and cognate immune responses.

Considering its low polymorphism, alloimmunization against HLA-E is unlikely. Nevertheless, two alleles of HLA-E have been found, E\*0101 and E\*0103, and have been referred to as HLA-E<sup>G</sup> (E\*0101) and HLA-E<sup>R</sup> (E\*0103) because they are distinguished by having either an arginine (–E<sup>R</sup>) or a glycine (–E<sup>G</sup>) at position 107 of the protein, located on a loop between  $\beta$ -strands in the  $\alpha$ 2 domain of the heavy chain. HLA-E<sup>G</sup> and HLA-E<sup>R</sup> are found at nearly equal frequencies in diverse populations. Preliminary data [40] indicated that the HLA-E<sup>G</sup> allele was expressed at significantly higher levels on transfected and normal cells. Whether haplotype-dependent variability in cell surface expression levels might confer functional differences toward cell-mediated cytotoxicity and alloantigen presentation must be defined.

##### **Xenograft protection provided by HLA-E and HLA-G expression on porcine endothelial cells**

The protective effect of HLA-E and HLA-G was clearly demonstrated *in vitro* in the context of xenotransplantation. Porcine endothelial cells are susceptible to human natural killer–mediated lysis probably due to the inability of porcine MHC class I molecules to signal through human natural killer cell inhibitory receptors [41]. Earlier *in-vitro* experiments demonstrated that the coexpression of HLA-G and  $\beta$ <sub>2</sub>-microglobulin efficiently protects porcine endothelial cells from natural killer–mediated cytotoxicity [42]. In contrast, HLA-E–expressing porcine cells were shown to be partially protected from lysis mediated by human polyclonal natural killer populations and completely protected from killing by NKG2A<sup>bright</sup> natural killer clones [43]. Interestingly, a recent study [44] also investigated the role of activating natural killer receptors including NKp30, NKp44, NKp46, and NKG2D in human xenogeneic natural killer cytotoxicity against porcine endothelial cells. These data indicated that the lysis of pig endothelial cells mediated by activated human natural killer cells depended on both NKp44 and NKG2D, because a complete protection of porcine endothelial cells was achieved only by simultaneous blocking of these activating natural killer cell receptors. Collectively, these findings suggest that natural killer cell cytotoxicity could be overcome by the

induction of HLA-E and HLA-G protective molecules while an additional step of protection may be provided by inhibiting NKG2D ligands on vascular xenogeneic endothelial cells.

##### **Conclusion**

In contrast with APCs such as dendritic cells, endothelial cells are currently referred to as ‘semiprofessional’ APCs because they do not express certain costimulatory molecules such as B7 molecules (CD80 and CD86) [2]. Nevertheless, human endothelial cells express the costimulatory molecules leukocyte function antigen-3 (CD58) and CD40 and, in response to tumor necrosis factor- $\alpha$ , activated endothelial cells also express the more recently described costimulatory molecules, ICOS ligand, OX40 ligand, and 4-1BB ligand [45]. Many previous studies examining the role of endothelial cells in T-cell activation have shown that cultured human endothelial cells are able to activate allogeneic memory T cells but not naive T cells. Memory T cells are thought to play an important role in allograft rejection because requirements for memory T cells’ activation appear to be less stringent than those of naive T cells, and memory T cells may be more difficult to inhibit or to tolerize [46]. Consequently, although restricted, antigen presentation by endothelial cells may contribute to allograft rejection. The ability of endothelial cells to act as APCs *in vivo*, however, is still to be established. Moreover, recent findings mostly obtained in mice also suggest that graft endothelial cells may play a role in tolerance induction. Krupnick *et al.* [47\*\*] have further analyzed the interaction between vascular endothelium and allogeneic CD4<sup>+</sup> T lymphocytes and showed that murine activated vascular endothelial cells generate alloantigen-specific CD4<sup>+</sup>25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> regulatory T cells, which inhibit T-cell proliferation both *in vitro* and *in vivo*. Although the generation of MHC class II restricted CD4<sup>+</sup> regulatory T cells has been shown to be central to allograft tolerance in rodents, new findings [48\*\*] also suggested an unexpected role in tolerance induction for MHC class I–dependent responses that involve natural killer cells. Using a mouse model of tolerance to islet allograft induced by anti-CD40 ligand antibodies, Beilke *et al.* [48\*\*] showed that tolerance induction absolutely required host expression of MHC class I but was independent of CD8<sup>+</sup> T cell–dependent immunity. Rather, tolerance required innate immunity involving NK1.1<sup>+</sup> cells but was independent of CD1d-restricted natural killer T cells. Therefore, graft-protective versus graft-destructive functions of natural killer cells still require a careful evaluation. Collectively, these studies suggest that graft endothelium may play specific roles in tolerance induction processes.

A possibility exists that nonclassic class I molecules, expressed on graft endothelial cells, actively control regulatory mechanisms not only to impair the destructive

immune response mediated by natural killer and allo-specific CTLs but also to trigger specific tolerance induction. This attractive concept remains to be validated *in vitro* and *in vivo*. Our preliminary results further suggest that endothelial cells also release soluble non-classical MHC class I or related molecules including MICA and HLA-E. Although the protective function of soluble MICA has been clearly established [12,10], the functional properties of soluble HLA-E require further investigation.

## References and recommended reading

Papers of particular interest, published within the annual period of review, have been highlighted as:

- of special interest
- of outstanding interest

Additional references related to this topic can also be found in the Current World Literature section in this issue (pp. 000–000).

- 1 Briscoe DM, Sayegh MH. A rendezvous before rejection: where do T cells meet transplant antigens? *Nat Med* 2002; 8:220–222.
- 2 Pober J, Orosz CG, Rose ML, Savage CO. Can graft endothelial cells initiate a host antigraft immune response? *Transplantation* 1996; 61:343–349.
- 3 Rothmel AL, Wang Y, Schechner J, *et al.* Endothelial cells present antigens *in vivo*. *BMC Immunol* 2004; 5:5.
- 4 Zwirner NW, Dole K, Stastny P. Differential surface expression of MICA by endothelial cells, fibroblasts, keratinocytes, and monocytes. *Hum Immunol* 1999; 60:323–330.
- 5 Stephens HA. MICA and MICB genes: can the enigma of their polymorphism be resolved? *Trends Immunol* 2001; 22:378–385.
- 6 Groh V, Bahram S, Bauer S, *et al.* Cell stress-regulated human major histocompatibility complex class I gene expressed in gastrointestinal epithelium. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996; 93:12445–12450.
- 7 Ogasawara K, Lanier LL. NKG2D in NK and T cell-mediated immunity. *J Clin Immunol* 2005; 25:534–540.
- 8 Bauer S, Groh V, Wu J, *et al.* Activation of NK cells and T cells by NKG2D, a receptor for stress-inducible MICA. *Science* 1999; 285:727–729.
- 9 Cao W, He W. UL16 binding proteins. *Immunobiology* 2004; 209:283–290.
- 10 Salih HR, Rammensee HG, Steinle A. Cutting edge: down-regulation of MICA on human tumors by proteolytic shedding. *J Immunol* 2002; 169:4098–4102.
- 11 Salih HR, Antropius H, Gieseke F, *et al.* Functional expression and release of ligands for the activating immunoreceptor NKG2D in leukemia. *Blood* 2003; 102:1389–1396.
- 12 Groh V, Wu J, Yee C, Spies T. Tumour-derived soluble MIC ligands impair expression of NKG2D and T-cell activation. *Nature* 2002; 419:734–738.
- 13 Zwirner NW, Marcos CY, Mirbaha F, *et al.* Identification of MICA as a new polymorphic alloantigen recognized by antibodies in sera of organ transplant recipients. *Hum Immunol* 2000; 61:917–924.
- 14 Sumitran-Holgersson S, Wilczek HE, Holgersson J, 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.
- 15 Hankey KG, Drachenberg CB, Papadimitriou JC, *et al.* MIC expression in renal and pancreatic allografts. *Transplantation* 2002; 73:304–306.
- 16 Kriegeskorte AK, Gebhardt FE, Porcellini S, *et al.* NKG2D-independent suppression of T cell proliferation by H60 and MICA. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005; 102:11805–11810.
- This study shows that MICA can also mediate strong suppressive effects on T-cell proliferation. These findings provide a new function for MICA in immune escape.
- 17 Lila N, Carpentier A, Amrein C, *et al.* Implication of HLA-G molecule in heart-graft acceptance [letter to the editor]. *Lancet* 2000; 355:2138.
- 18 Lila N, Amrein C, Guillemin R, *et al.* Human leukocyte antigen-G expression after heart transplantation is associated with a reduced incidence of rejection. *Circulation* 2002; 105:1949–1954.
- 19 LeMaoult J, Zafaranloo K, Le Danff C, Carosella ED. HLA-G up-regulates ILT2, ILT3, ILT4, and KIR2DL4 in antigen presenting cells, NK cells, and T cells. *FASEB J* 2005; 19:662–664.
- This *in-vitro* study reveals that expression of the inhibitory receptors ILT2, ILT3, ILT4, and KIR2DL4 is upregulated by HLA-G in APCs, natural killer cells, and T cells.
- 20 Wiendl H, Feger U, Mittelbronn M, *et al.* Expression of the immune-tolerogenic major histocompatibility molecule HLA-G in multiple sclerosis: implications for CNS immunity. *Brain* 2005; 128:2689–2704.
- 21 Riteau B, Rouas-Freiss N, Menier C, *et al.* HLA-G2, -G3, and -G4 isoforms expressed as nonmature cell surface glycoproteins inhibit NK and antigen-specific CTL cytotoxicity. *J Immunol* 2001; 166:5018–5026.
- 22 Bainbridge DR, Ellis SA, Sargent IL. HLA-G suppresses proliferation of CD4(+) T-lymphocytes. *J Reprod Immunol* 2000; 48:17–26.
- 23 Lila N, Rouas-Freiss N, Dausset J, *et al.* Soluble HLA-G protein secreted by allo-specific CD4+ T cells suppresses the allo-proliferative response: a CD4+ T cell regulatory mechanism. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001; 98:12150–12155.
- 24 Manavalan JS, Kim-Schulze S, Scotto L, *et al.* Alloantigen specific CD8+CD28–FOXP3+ T suppressor cells induce ILT3+ILT4+ tolerogenic endothelial cells, inhibiting alloreactivity. *Int Immunol* 2004; 16:1055–1068.
- 25 Suciu-Foca N, Manavalan JS, Scotto L, *et al.* Molecular characterization of allospecific T suppressor and tolerogenic dendritic cells: review. *Immunopharmacol* 2005; 5:7–11.
- 26 Kim-Schulze S, Seki T, Vlad G, *et al.* Regulation of ILT3 gene expression by processing of precursor transcripts in human endothelial cells. *Am J Transplant* 2006; 6:76–82.
- This study documented ILT3 mRNA and protein expression in human endothelial cells.
- 27 Braud VM, Allan DS, O'Callaghan CA, *et al.* HLA-E binds to natural killer cell receptors CD94/NKG2A, B and C. *Nature* 1998; 391:795–799.
- 28 Lee N, Llano M, Carretero M, *et al.* HLA-E is a major ligand for the natural killer inhibitory receptor CD94/NKG2A. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998; 95:5199–5204.
- 29 Braud V, Jones EY, McMichael A. The human major histocompatibility complex class Ib molecule HLA-E binds signal sequence-derived peptides with primary anchor residues at positions 2 and 9. *Eur J Immunol* 1997; 27:1164–1169.
- 30 Lee N, Goodlett DR, Ishitani A, *et al.* HLA-E surface expression depends on binding of TAP-dependent peptides derived from certain HLA class I signal sequences. *J Immunol* 1998; 160:4951–4960.
- 31 King A, Allan DS, Bowen M, *et al.* HLA-E is expressed on trophoblasts and interacts with CD94/NKG2 receptors on decidual NK cells. *Eur J Immunol* 2000; 30:1623–1631.
- 32 Menier C, Saez B, Horejsi V, *et al.* Characterization of monoclonal antibodies recognizing HLA-G or HLA-E new tools to analyze the expression of non-classical HLA class I molecules. *Hum Immunol* 2003; 64:315–326.
- 33 Li J, Goldstein I, Glickman-Nir E, *et al.* Induction of TCR Vbeta-specific CD8+ CTLs by TCR Vbeta-derived peptides bound to HLA-E. *J Immunol* 2001; 167:3800–3808.
- 34 Heinzl AS, Grotzke JE, Lines RA, *et al.* HLA-E-dependent presentation of Mtb-derived antigen to human CD8+ T cells. *J Exp Med* 2002; 196:1473–1481.
- 35 Pacasova R, Martinozzi S, Boulouis HJ, *et al.* Cell-surface expression and alloantigenic function of a human nonclassical class I molecule (HLA-E) in transgenic mice. *J Immunol* 1999; 162:5190–5196.
- 36 Romagnani C, Pietra G, Falco M, *et al.* Identification of HLA-E-specific alloreactive T lymphocytes: a cell subset that undergoes preferential expansion in mixed lymphocyte culture and displays a broad cytolytic activity against allogeneic cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002; 99:11328–11333.
- 37 Hu D, Iizawa K, Lu L, *et al.* Analysis of regulatory CD8 T cells in Qa-1-deficient mice. *Nat Immunol* 2004; 5:516–523.
- 38 Panoutsakopoulou V, Huster KM, McCarty N, *et al.* Suppression of autoimmune disease after vaccination with autoreactive T cells that express Qa-1 peptide complexes. *J Clin Invest* 2004; 113:1218–1224.
- 39 Sarantopoulos S, Lu L, Cantor H. Qa-1 restriction of CD8+ suppressor T cells. *J Clin Invest* 2004; 114:1218–1221.
- 40 Strong RK, Holmes MA, Li P, *et al.* HLA-E allelic variants correlating differential expression, peptide affinities, crystal structures, and thermal stabilities. *J Biol Chem* 2003; 278:5082–5090.
- 41 Watier H, Guillaumin JM, Vallee I, *et al.* Human NK cell-mediated direct and IgG-dependent cytotoxicity against xenogeneic porcine endothelial cells. *Transpl Immunol* 1996; 4:293–299.

## 6 Histocompatibility

- 42 Matsunami K, Miyagawa S, Nakai R, *et al*. The possible use of HLA-G1 and G3 in the inhibition of NK cell-mediated swine endothelial cell lysis. *Clin Exp Immunol* 2001; 126:165–172.
- 43 Forte P, Baumann BC, Weiss EH, Seebach JD. HLA-E expression on porcine cells: protection from human NK cytotoxicity depends on peptide loading. *Am J Transplant* 2005; 5:2085–2093.
- 44 Forte P, Lilienfeld BG, Baumann BC, Seebach JD. Human NK cytotoxicity against porcine cells is triggered by Nkp44 and NKG2D. *J Immunol* 2005; 175:5463–5470.
- 45 Shiao SL, McNiff JM, Pober JS. Memory T cells and their costimulators in human allograft injury. *J Immunol* 2005; 175:4886–4896.
- 46 Lakkis FG, Sayegh MH. Memory T cells: a hurdle to immunologic tolerance. *J Am Soc Nephrol* 2003; 14:2402–2410.
- 47 Krupnick AS, Gelman AE, Barchet W, *et al*. Murine vascular endothelium •• activates and induces the generation of allogeneic CD4<sup>+</sup>25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> regulatory T cells. *J Immunol* 2005; 175:6265–6270.
- This paper report that alloantigen presentation by vascular endothelium to CD4<sup>+</sup> T lymphocytes activates and induces CD4<sup>+</sup>25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> regulatory T cells, which can inhibit proliferation of alloreactive T cells both *in vitro* and *in vivo* in mice.
- 48 Beilke JN, Kuhl NR, Van Kaer L, Gill RG. NK cells promote islet allograft •• tolerance via a perforin-dependent mechanism. *Nat Med* 2005; 11:1059–1065.
- The authors propose that innate natural killer and natural killer T cells, which also require host expression of MHC class I molecules, might be involved in allograft tolerance.

# Bibliographie

1. Palade, G.E., and Bruns, R.R. 1968. Structural modulations of plasmalemmal vesicles. *J Cell Biol* 37:633-649.
2. Pohlman, T.H., and Harlan, J.M. 1989. Human endothelial cell response to lipopolysaccharide, interleukin-1, and tumor necrosis factor is regulated by protein synthesis. *Cell Immunol* 119:41-52.
3. Pober, J.S., and Cotran, R.S. 1990. The role of endothelial cells in inflammation. *Transplantation* 50:537-544.
4. Gerritsen, M.E., and Bloor, C.M. 1993. Endothelial cell gene expression in response to injury. *Faseb J.* 7:523-532.
5. 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.
6. Pohlman, T.H., and Harlan, J.M. 2000. Adaptive responses of the endothelium to stress. *J Surg Res* 89:85-119.
7. Dimmeler, S., and Zeiher, A.M. 2000. Endothelial cell apoptosis in angiogenesis and vessel regression. *Circ Res* 87:434-439.
8. Dimmeler, S., Haendeler, J., and Zeiher, A.M. 2002. Regulation of endothelial cell apoptosis in atherothrombosis. *Curr Opin Lipidol* 13:531-536.
9. 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.
10. Esmon, C.T. 2002. Protein C pathway in sepsis. *Ann Med* 34:598-605.
11. Cines, D.B., Pollak, E.S., Buck, C.A., Loscalzo, J., Zimmerman, G.A., McEver, R.P., Pober, 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.
12. Aird, W.C. 2003. The role of the endothelium in severe sepsis and multiple organ dysfunction syndrome. *Blood* 101:3765-3777.
13. Read, M.A., Whitley, M.Z., Williams, A.J., and Collins, T. 1994. NF-kappa B and I kappa B alpha: an inducible regulatory system in endothelial activation. *J Exp Med* 179:503-512.
14. Collins, T., Read, M.A., Neish, A.S., Whitley, M.Z., Thanos, D., and Maniatis, T. 1995. Transcriptional regulation of endothelial cell adhesion molecules: NF-kappa B and cytokine-inducible enhancers. *Faseb J* 9:899-909.
15. Montgomery, K.F., Osborn, L., Hession, C., Tizard, R., Goff, D., Vassallo, C., Tarr, P.I., Bomsztyk, K., Lobb, R., Harlan, J.M., et al. 1991. Activation of endothelial-leukocyte adhesion molecule 1 (ELAM-1) gene transcription. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88:6523-6527.
16. Neish, A.S., Read, M.A., Thanos, D., Pine, R., Maniatis, T., and Collins, T. 1995. Endothelial interferon regulatory factor 1 cooperates with NF-kappa B as a transcriptional activator of vascular cell adhesion molecule 1. *Mol Cell Biol* 15:2558-2569.
17. Read, M.A., Neish, A.S., Gerritsen, M.E., and Collins, T. 1996. Postinduction transcriptional repression of E-selectin and vascular cell adhesion molecule-1. *J Immunol* 157:3472-3479.

18. Cobb, R.R., Felts, K.A., Parry, G.C., and Mackman, N. 1996. Proteasome inhibitors block VCAM-1 and ICAM-1 gene expression in endothelial cells without affecting nuclear translocation of nuclear factor-kappa B. *Eur J Immunol* 26:839-845.
19. Korenaga, R., Ando, J., Kosaki, K., Isshiki, M., Takada, Y., and Kamiya, A. 1997. Negative transcriptional regulation of the VCAM-1 gene by fluid shear stress in murine endothelial cells. *Am J Physiol* 273:C1506-1515.
20. Read, M.A., Whitley, M.Z., Gupta, S., Pierce, J.W., Best, J., Davis, R.J., and Collins, T. 1997. Tumor necrosis factor alpha-induced E-selectin expression is activated by the nuclear factor-kappaB and c-JUN N-terminal kinase/p38 mitogen-activated protein kinase pathways. *J Biol Chem* 272:2753-2761.
21. Lawson, C., Ainsworth, M., Yacoub, M., and Rose, M. 1999. Ligation of ICAM-1 on endothelial cells leads to expression of VCAM-1 via a nuclear factor-kappaB-independent mechanism. *J Immunol* 162:2990-2996.
22. Springer, T.A. 1994. Traffic signals for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration: the multistep paradigm. *Cell* 76:301-314.
23. 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.
24. Bevilacqua, M.P. 1993. Endothelial-leukocyte adhesion molecules. *Annu Rev Immunol* 11:767-804.
25. Fuggle, S.V., Sanderson, J.B., Gray, D.W., Richardson, A., and Morris, P.J. 1993. Variation in expression of endothelial adhesion molecules in pretransplant and transplanted kidneys--correlation with intragraft events. *Transplantation* 55:117-123.
26. Colvin, B.L., and Thomson, A.W. 2002. Chemokines, their receptors, and transplant outcome. *Transplantation* 74:149-155.
27. von Andrian, U.H., and Mackay, C.R. 2000. T-cell function and migration. Two sides of the same coin. *N Engl J Med* 343:1020-1034.
28. Marlin, S.D., and Springer, T.A. 1987. Purified intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) is a ligand for lymphocyte function-associated antigen 1 (LFA-1). *Cell* 51:813-819.
29. Diamond, M.S., Staunton, D.E., de Fougères, A.R., Stacker, S.A., Garcia-Aguilar, J., Hibbs, M.L., and Springer, T.A. 1990. ICAM-1 (CD54): a counter-receptor for Mac-1 (CD11b/CD18). *J Cell Biol* 111:3129-3139.
30. Fuggle, S.V., and Koo, D.D. 1998. Cell adhesion molecules in clinical renal transplantation. *Transplantation* 65:763-769.
31. Goetzl, E.J., Banda, M.J., and Leppert, D. 1996. Matrix metalloproteinases in immunity. *J Immunol* 156:1-4.
32. Minami, T., Sugiyama, A., Wu, S.Q., Abid, R., Kodama, T., and Aird, W.C. 2004. Thrombin and phenotypic modulation of the endothelium. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 24:41-53.
33. Esmon, C.T. 2000. The endothelial cell protein C receptor. *Thromb Haemost* 83:639-643.
34. Collins, T., Korman, A.J., Wake, C.T., Boss, J.M., Kappes, D.J., Fiers, W., Ault, K.A., Gimbrone, M.A., Jr., Strominger, J.L., and Pober, J.S. 1984. Immune interferon activates multiple class II major histocompatibility complex genes and the associated invariant chain gene in human endothelial cells and dermal fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci USA* 81:4917-4921.
35. 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.

36. Markus, B.H., Colson, Y.L., Fung, J.J., Zeevi, A., and Duquesnoy, R.J. 1988. HLA antigen expression on cultured human arterial endothelial cells. *Tissue Antigens* 32:241-253.
37. Goes, N., Urmson, J., Hobart, M., and Halloran, P.F. 1996. The unique role of interferon-gamma in the regulation of MHC expression on arterial endothelium. *Transplantation* 62:1889-1894.
38. Sen, R., and Baltimore, D. 1986. Inducibility of kappa immunoglobulin enhancer-binding protein NF-kappa B by a posttranslational mechanism. *Cell* 47:921-928.
39. DiDonato, J.A., Hayakawa, M., Rothwarf, D.M., Zandi, E., and Karin, M. 1997. A cytokine-responsive IkappaB kinase that activates the transcription factor NF-kappaB. *Nature* 388:548-554.
40. Heilker, R., Freuler, F., Vanek, M., Pulfer, R., Kobel, T., Peter, J., Zerwes, H.G., Hofstetter, H., and Eder, J. 1999. The kinetics of association and phosphorylation of IkappaB isoforms by IkappaB kinase 2 correlate with their cellular regulation in human endothelial cells. *Biochemistry* 38:6231-6238.
41. Yamaoka, S., Courtois, G., Bessia, C., Whiteside, S.T., Weil, R., Agou, F., Kirk, H.E., Kay, R.J., and Israel, A. 1998. Complementation cloning of NEMO, a component of the IkappaB kinase complex essential for NF-kappaB activation. *Cell* 93:1231-1240.
42. Stancovski, I., and Baltimore, D. 1997. NF-kappaB activation: the I kappaB kinase revealed? *Cell* 91:299-302.
43. Delhase, M., Li, N., and Karin, M. 2000. Kinase regulation in inflammatory response. *Nature* 406:367-368.
44. Ozes, O.N., Mayo, L.D., Gustin, J.A., Pfeffer, S.R., Pfeffer, L.M., and Donner, D.B. 1999. NF-kappaB activation by tumour necrosis factor requires the Akt serine-threonine kinase. *Nature* 401:82-85.
45. Wardle, E.N. 2001. Nuclear factor kappaB for the nephrologist. *Nephrol Dial Transplant* 16:1764-1768.
46. Beg, A.A., Sha, W.C., Bronson, R.T., Ghosh, S., and Baltimore, D. 1995. Embryonic lethality and liver degeneration in mice lacking the RelA component of NF-kappa B. *Nature* 376:167-170.
47. Sha, W.C., Liou, H.C., Tuomanen, E.I., and Baltimore, D. 1995. Targeted disruption of the p50 subunit of NF-kappa B leads to multifocal defects in immune responses. *Cell* 80:321-330.
48. Bach, F.H., Ferran, C., Hechenleitner, P., Mark, W., Koyamada, N., Miyatake, T., Winkler, H., Badrichani, A., Candinas, D., and Hancock, W.W. 1997. Accommodation of vascularized xenografts: expression of "protective genes" by donor endothelial cells in a host Th2 cytokine environment. *Nat Med* 3:196-204.
49. Soares, M.P., Usheva, A., Brouard, S., Berberat, P.O., Gunther, L., Tobiasch, E., and Bach, F.H. 2002. Modulation of endothelial cell apoptosis by heme oxygenase-1-derived carbon monoxide. *Antioxid Redox Signal* 4:321-329.
50. Wrighton, C.J., Hofer-Warbinek, R., Moll, T., Eytner, R., Bach, F.H., and de Martin, R. 1996. Inhibition of endothelial cell activation by adenovirus-mediated expression of I kappa B alpha, an inhibitor of the transcription factor NF-kappa B. *J Exp Med* 183:1013-1022.
51. Anrather, J., Csizmadia, V., Brostjan, C., Soares, M.P., Bach, F.H., and Winkler, H. 1997. Inhibition of bovine endothelial cell activation in vitro by regulated expression of a transdominant inhibitor of NF-kappa B. *J Clin Invest* 99:763-772.
52. Beg, A.A., and Baltimore, D. 1996. An essential role for NF-kappaB in preventing TNF $\alpha$ -induced cell death. *Science* 274:782-784.

53. Van Antwerp, D.J., Martin, S.J., Kafri, T., Green, D.R., and Verma, I.M. 1996. Suppression of TNF $\alpha$ -induced apoptosis by NF-kappaB. *Science* 274:787-789.
54. Wang, C.Y., Mayo, M.W., and Baldwin, A.S., Jr. 1996. TNF- and cancer therapy-induced apoptosis: potentiation by inhibition of NF-kappaB. *Science* 274:784-787.
55. Cooper, J.T., Stroka, D.M., Brostjan, C., Palmethofer, A., Bach, F.H., and Ferran, C. 1996. A20 blocks endothelial cell activation through a NF-kappaB-dependent mechanism. *J Biol Chem* 271:18068-18073.
56. Ferran, C., Millan, M.T., Csizmadia, V., Cooper, J.T., Brostjan, C., Bach, F.H., and Winkler, H. 1995. Inhibition of NF-kappa B by pyrrolidine dithiocarbamate blocks endothelial cell activation. *Biochem Biophys Res Commun* 214:212-223.
57. Bach, F., H., Hancock, W., W., and Ferran, C. 1997. Protective genes expressed in endothelial cells: a regulatory response to injury. *Immunol. Today* 18:483-486.
58. Karin, M., and Greten, F.R. 2005. NF-kappaB: linking inflammation and immunity to cancer development and progression. *Nat Rev Immunol* 5:749-759.
59. Lawrence, T., Bebien, M., Liu, G.Y., Nizet, V., and Karin, M. 2005. IKKalpha limits macrophage NF-kappaB activation and contributes to the resolution of inflammation. *Nature* 434:1138-1143.
60. Kerr, J.F., Wyllie, A.H., and Currie, A.R. 1972. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* 26:239-257.
61. Couzinet, A., Hérics, Z., and Hueber, A.-O. 2002. Régulation de la mort cellulaire programmée: vers une conception plus dynamique. *Med. Sciences* 18:841-852.
62. Cryns, V., and Yuan, J. 1998. Proteases to die for. *Genes Dev* 12:1551-1570.
63. Engels, I.H., Stepczynska, A., Stroh, C., Lauber, K., Berg, C., Schwenzer, R., Wajant, H., Janicke, R.U., Porter, A.G., Belka, C., et al. 2000. Caspase-8/FLICE functions as an executioner caspase in anticancer drug-induced apoptosis. *Oncogene* 19:4563-4573.
64. Hancock, W.W. 1997. Impact of alloimmunity on chronic tissue remodelling: role of cytokines and protective genes in the vessel wall. *Transpl Immunol* 5:277-281.
65. Hancock, W.W., Buelow, R., Sayegh, M.H., and Turka, L.A. 1998. Antibody-induced transplant arteriosclerosis is prevented by graft expression of anti-oxidant and anti-apoptotic genes. *Nat Med* 4:1392-1396.
66. Plissonnier, D., Henaff, M., Poncet, P., Paris, E., Tron, F., Thuillez, C., and Michel, J.B. 2000. Involvement of antibody-dependent apoptosis in graft rejection. *Transplantation* 69:2601-2608.
67. Choy, J.C., Granville, D.J., Hunt, D.W., and McManus, B.M. 2001. Endothelial cell apoptosis: biochemical characteristics and potential implications for atherosclerosis. *J Mol Cell Cardiol* 33:1673-1690.
68. Choy, J.C., Kerjner, A., Wong, B.W., McManus, B.M., and Granville, D.J. 2004. Perforin mediates endothelial cell death and resultant transplant vascular disease in cardiac allografts. *Am J Pathol* 165:127-133.
69. Choy, J.C., Cruz, R.P., Kerjner, A., Geisbrecht, J., Sawchuk, T., Fraser, S.A., Hudig, D., Bleackley, R.C., Jirik, F.R., McManus, B.M., et al. 2005. Granzyme B induces endothelial cell apoptosis and contributes to the development of transplant vascular disease. *Am J Transplant* 5:494-499.
70. Cailhier, J.F., Laplante, P., and Hebert, M.J. 2006. Endothelial apoptosis and chronic transplant vasculopathy: recent results, novel mechanisms. *Am J Transplant* 6:247-253.
71. Erdbruegger, U., Haubitz, M., and Woywodt, A. 2006. Circulating endothelial cells: A novel marker of endothelial damage. *Clin Chim Acta*.

72. Lagaaij, E.L., Cramer-Knijnenburg, G.F., van Kemenade, F.J., van Es, L.A., Bruijn, J.A., and van Krieken, J.H. 2001. Endothelial cell chimerism after renal transplantation and vascular rejection. *Lancet* 357:33-37.
73. Bardin, N., Frances, V., Lesaule, G., Horschowski, N., George, F., and Sampol, J. 1996. Identification of the S-Endo 1 endothelial-associated antigen. *Biochem Biophys Res Commun* 218:210-216.
74. Bardin, N., Anfosso, F., Masse, J.M., Cramer, E., Sabatier, F., Le Bivic, A., Sampol, J., and Dignat-George, F. 2001. Identification of CD146 as a component of the endothelial junction involved in the control of cell-cell cohesion. *Blood* 98:3677-3684.
75. Woywodt, A., Kirsch, T., and Haubitz, M. 2006. Immunomagnetic isolation and FACS - competing techniques for the enumeration of circulating endothelial cells. *Thromb Haemost* 96:1-2.
76. George, F., Brouqui, P., Boffa, M.C., Mutin, M., Drancourt, M., Brisson, C., Raoult, D., and Sampol, J. 1993. Demonstration of Rickettsia conorii-induced endothelial injury in vivo by measuring circulating endothelial cells, thrombomodulin, and von Willebrand factor in patients with Mediterranean spotted fever. *Blood* 82:2109-2116.
77. Woywodt, A. 2003. Circulating endothelial cells in vasculitis and transplantation. *Pathophysiol Haemost Thromb* 33:500-502.
78. Woywodt, A., Schroeder, M., Gwinner, W., Mengel, M., Jaeger, M., Schwarz, A., Haller, H., and Haubitz, M. 2003. Elevated numbers of circulating endothelial cells in renal transplant recipients. *Transplantation* 76:1-4.
79. Holmen, C., Elsheikh, E., Stenvinkel, P., Qureshi, A.R., Pettersson, E., Jalkanen, S., and Sumitran-Holgersson, S. 2005. Circulating Inflammatory Endothelial Cells Contribute to Endothelial Progenitor Cell Dysfunction in Patients with Vasculitis and Kidney Involvement. *J Am Soc Nephrol*.
80. Schmid, F.X., Vudattu, N., Floerchinger, B., Hilker, M., Eissner, G., Hoenicka, M., Holler, E., and Birnbaum, D.E. 2006. Endothelial apoptosis and circulating endothelial cells after bypass grafting with and without cardiopulmonary bypass. *Eur J Cardiothorac Surg* 29:496-500.
81. Olsson, A.K., Dimberg, A., Kreuger, J., and Claesson-Welsh, L. 2006. VEGF receptor signalling - in control of vascular function. *Nat Rev Mol Cell Biol* 7:359-371.
82. Reinders, M.E., Rabelink, T.J., and Briscoe, D.M. 2006. Angiogenesis and endothelial cell repair in renal disease and allograft rejection. *J Am Soc Nephrol* 17:932-942.
83. Reinders, M.E., Fang, J.C., Wong, W., Ganz, P., and Briscoe, D.M. 2003. Expression patterns of vascular endothelial growth factor in human cardiac allografts: association with rejection. *Transplantation* 76:224-230.
84. Sho, M., Akashi, S., Kanehiro, H., Hamada, K., Kashizuka, H., Ikeda, N., Nomi, T., Kuzumoto, Y., Tsurui, Y., Yoshiji, H., et al. 2005. Function of the vascular endothelial growth factor receptors Flt-1 and Flk-1/KDR in the alloimmune response in vivo. *Transplantation* 80:717-722.
85. Shiojima, I., and Walsh, K. 2002. Role of Akt signaling in vascular homeostasis and angiogenesis. *Circ Res* 90:1243-1250.
86. Johnson, G.L., and Lapadat, R. 2002. Mitogen-activated protein kinase pathways mediated by ERK, JNK, and p38 protein kinases. *Science* 298:1911-1912.
87. Lee, J.C., Laydon, J.T., McDonnell, P.C., Gallagher, T.F., Kumar, S., Green, D., McNulty, D., Blumenthal, M.J., Heys, J.R., Landvatter, S.W., et al. 1994. A protein kinase involved in the regulation of inflammatory cytokine biosynthesis. *Nature* 372:739-746.

88. Whitmarsh, A.J., and Davis, R.J. 1996. Transcription factor AP-1 regulation by mitogen-activated protein kinase signal transduction pathways. *J Mol Med* 74:589-607.
89. Firestein, G.S., and Manning, A.M. 1999. Signal transduction and transcription factors in rheumatic disease. *Arthritis Rheum* 42:609-621.
90. Shelton, J.G., Steelman, L.S., White, E.R., and McCubrey, J.A. 2004. Synergy between PI3K/Akt and Raf/MEK/ERK pathways in IGF-1R mediated cell cycle progression and prevention of apoptosis in hematopoietic cells. *Cell Cycle* 3:372-379.
91. Soares, M.P., Seldon, M.P., Gregoire, I.P., Vassilevskaia, T., Berberat, P.O., Yu, J., Tsui, T.Y., and Bach, F.H. 2004. Heme oxygenase-1 modulates the expression of adhesion molecules associated with endothelial cell activation. *J Immunol* 172:3553-3563.
92. 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.
93. Paul, L.C. 2000. Chronic allograft nephropathy-a model of impaired repair from injury? *Nephrol Dial Transplant* 15:149-151.
94. Libby, P., and Pober, J.S. 2001. Chronic rejection. *Immunity* 14:387-397.
95. Waaga, A.M., Gasser, M., Laskowski, I., and Tilney, N.L. 2000. Mechanisms of chronic rejection. *Curr Opin Immunol* 12:517-521.
96. Pascual, M., Theruvath, T., Kawai, T., Tolkoff-Rubin, N., and Cosimi, A.B. 2002. Strategies to improve long-term outcomes after renal transplantation. *N Engl J Med* 346:580-590.
97. Lechler, R.I., Sykes, M., Thomson, A.W., and Turka, L.A. 2005. Organ transplantation--how much of the promise has been realized? *Nat Med* 11:605-613.
98. Lederer, S.R., Kluth-Pepper, B., Schneeberger, H., Albert, E., Land, W., and Feucht, H.E. 2001. Impact of humoral alloreactivity early after transplantation on the long-term survival of renal allografts. *Kidney Int* 59:334-341.
99. Colvin, R.B., and Smith, R.N. 2005. Antibody-mediated organ-allograft rejection. *Nat Rev Immunol* 5:807-817.
100. McKenna, R.M., Takemoto, S.K., and Terasaki, P.I. 2000. Anti-HLA antibodies after solid organ transplantation. *Transplantation* 69:319-326.
101. 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.
102. Mak, T.W., Shahinian, A., Yoshinaga, S.K., Wakeham, A., Boucher, L.M., Pintilie, M., Duncan, G., Gajewska, B.U., Gronski, M., Eriksson, U., et al. 2003. Costimulation through the inducible costimulator ligand is essential for both T helper and B cell functions in T cell-dependent B cell responses. *Nat Immunol* 4:765-772.
103. Ensminger, S.M., Spriewald, B.M., Witzke, O., Pajaro, O.E., Yacoub, M.H., Morris, P.J., Rose, M.L., and Wood, K.J. 2002. Indirect allorecognition can play an important role in the development of transplant arteriosclerosis. *Transplantation* 73:279-286.
104. Joosten, S.A., Van Kooten, C., and Paul, L.C. 2003. Pathogenesis of chronic allograft rejection. *Transpl Int* 16:137-145.
105. Thauinat, O., Field, A.C., Dai, J., Louedec, L., Patey, N., Bloch, M.F., Mandet, C., Belair, M.F., Bruneval, P., Meilhac, O., et al. 2005. Lymphoid neogenesis in chronic rejection: evidence for a local humoral alloimmune response. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102:14723-14728.
106. Terasaki, P.I. 2003. Humoral theory of transplantation. *Am J Transplant* 3:665-673.
107. Terasaki, P.I., and Cai, J. 2005. Humoral theory of transplantation: further evidence. *Curr Opin Immunol* 17:541-545.

108. Jin, Y.P., Jindra, P.T., Gong, K.W., Lepin, E.J., and Reed, E.F. 2005. Anti-HLA class I antibodies activate endothelial cells and promote chronic rejection. *Transplantation* 79:S19-21.
109. Bian, H., Harris, P.E., Mulder, A., and Reed, E.F. 1997. Anti-HLA antibody ligation to HLA class I molecules expressed by endothelial cells stimulates tyrosine phosphorylation, inositol phosphate generation, and proliferation. *Hum Immunol* 53:90-97.
110. Jin, Y.P., Singh, R.P., Du, Z.Y., Rajasekaran, A.K., Rozengurt, E., and Reed, E.F. 2002. Ligation of HLA class I molecules on endothelial cells induces phosphorylation of Src, paxillin, and focal adhesion kinase in an actin-dependent manner. *J Immunol* 168:5415-5423.
111. Regele, H., Bohmig, G.A., Habicht, A., Gollowitzer, D., Schillinger, M., Rockenschaub, S., Watschinger, B., Kerjaschki, D., and Exner, M. 2002. Capillary deposition of complement split product C4d in renal allografts is associated with basement membrane injury in peritubular and glomerular capillaries: a contribution of humoral immunity to chronic allograft rejection. *J Am Soc Nephrol* 13:2371-2380.
112. Jin, Y.P., Fishbein, M.C., Said, J.W., Jindra, P.T., Rajalingam, R., Rozengurt, E., and Reed, E.F. 2004. Anti-HLA class I antibody-mediated activation of the PI3K/Akt signaling pathway and induction of Bcl-2 and Bcl-xL expression in endothelial cells. *Hum Immunol* 65:291-302.
113. Briscoe, D.M., Ganz, P., Alexander, S.I., Melder, R.J., Jain, R.K., Cotran, R.S., and Lichtman, A.H. 1997. The problem of chronic rejection: influence of leukocyte-endothelial interactions. *Kidney Int Suppl* 58:S22-27.
114. Dengler, T.J., Johnson, D.R., and Pober, J.S. 2001. Human vascular endothelial cells stimulate a lower frequency of alloreactive CD8+ pre-CTL and induce less clonal expansion than matching B lymphoblastoid cells: development of a novel limiting dilution analysis method based on CFSE labeling of lymphocytes. *J Immunol* 166:3846-3854.
115. Pettersen, R.D., Hestdal, K., Lie, S.O., and Gaudernack, G. 1996. Role of the TCR binding region of the HLA class I alpha 2 domain in regulation of cell adhesion and proliferation. *J Immunol* 156:1415-1424.
116. Smith, D.M., Bluestone, J.A., Jeyarajah, D.R., Newberg, M.H., Engelhard, V.H., Thistlethwaite, J.R., Jr., and Woodle, E.S. 1994. Inhibition of T cell activation by a monoclonal antibody reactive against the alpha 3 domain of human MHC class I molecules. *J Immunol* 153:1054-1067.
117. Skov, S., Klausen, P., and Claesson, M.H. 1997. Ligation of major histocompatibility complex (MHC) class I molecules on human T cells induces cell death through PI-3 kinase-induced c-Jun NH2-terminal kinase activity: a novel apoptotic pathway distinct from Fas-induced apoptosis. *J Cell Biol* 139:1523-1531.
118. Genestier, L., Meffre, G., Garrone, P., Pin, J.J., Liu, Y.J., Banchereau, J., and Revillard, J.P. 1997. Antibodies to HLA class I alpha1 domain trigger apoptosis of CD40-activated human B lymphocytes. *Blood* 90:726-735.
119. Genestier, L., Prigent, A.F., Paillot, R., Quemeneur, L., Durand, I., Banchereau, J., Revillard, J.P., and Bonnefoy-Berard, N. 1998. Caspase-dependent ceramide production in Fas- and HLA class I-mediated peripheral T cell apoptosis. *J Biol Chem* 273:5060-5066.
120. Daniel, D., Opelz, G., Mulder, A., and Susal, C. 2003. Induction of apoptosis in human lymphocytes by human anti-HLA class I antibodies. *Transplantation* 75:1380-1386.

121. Woodle, E.S., Smith, D.M., and Zhou, N. 1997. Class I MHC mediates programmed cell death in human lymphoid cells. *Transplantation* 64:140-146.
122. Bregenholt, S., Ropke, M., Skov, S., and Claesson, M.H. 1996. Ligation of MHC class I molecules on peripheral blood T lymphocytes induces new phenotypes and functions. *J Immunol* 157:993-999.
123. Skov, S., Odum, N., and Claesson, M.H. 1995. MHC class I signaling in T cells leads to tyrosine kinase activity and PLC-gamma 1 phosphorylation. *J Immunol* 154:1167-1176.
124. Budihardjo, I., Oliver, H., Lutter, M., Luo, X., and Wang, X. 1999. Biochemical pathways of caspase activation during apoptosis. *Annu Rev Cell Dev Biol* 15:269-290.
125. Liu, X., Zou, H., Slaughter, C., and Wang, X. 1997. DFF, a heterodimeric protein that functions downstream of caspase-3 to trigger DNA fragmentation during apoptosis. *Cell* 89:175-184.
126. Ruefli, A.A., Smyth, M.J., and Johnstone, R.W. 2000. HMBA induces activation of a caspase-independent cell death pathway to overcome P-glycoprotein-mediated multidrug resistance. *Blood* 95:2378-2385.
127. Du, C., Fang, M., Li, Y., Li, L., and Wang, X. 2000. Smac, a mitochondrial protein that promotes cytochrome c-dependent caspase activation by eliminating IAP inhibition. *Cell* 102:33-42.
128. Daugas, E., Susin, S.A., Zamzami, N., Ferri, K.F., Irinopoulou, T., Larochette, N., Prevost, M.C., Leber, B., Andrews, D., Penninger, J., et al. 2000. Mitochondrio-nuclear translocation of AIF in apoptosis and necrosis. *Faseb J* 14:729-739.
129. Susin, S.A., Lorenzo, H.K., Zamzami, N., Marzo, I., Snow, B.E., Brothers, G.M., Mangion, J., Jacotot, E., Costantini, P., Loeffler, M., et al. 1999. Molecular characterization of mitochondrial apoptosis-inducing factor. *Nature* 397:441-446.
130. Pettersen, R.D., Gaudernack, G., Olafsen, M.K., Lie, S.O., and Hestdal, K. 1998. The TCR-binding region of the HLA class I alpha2 domain signals rapid Fas-independent cell death: a direct pathway for T cell-mediated killing of target cells? *J Immunol* 160:4343-4352.
131. Truman, J.P., Ericson, M.L., Choqueux-Seebold, C.J., Charron, D.J., and Mooney, N.A. 1994. Lymphocyte programmed cell death is mediated via HLA class II DR. *Int Immunol* 6:887-896.
132. Drenou, B., Blancheteau, V., Burgess, D.H., Fauchet, R., Charron, D.J., and Mooney, N.A. 1999. A caspase-independent pathway of MHC class II antigen-mediated apoptosis of human B lymphocytes. *J Immunol* 163:4115-4124.
133. Nagy, Z.A., Hubner, B., Lohning, C., Rauchenberger, R., Reiffert, S., Thomassen-Wolf, E., Zahn, S., Leyer, S., Schier, E.M., Zahradnik, A., et al. 2002. Fully human, HLA-DR-specific monoclonal antibodies efficiently induce programmed death of malignant lymphoid cells. *Nat Med* 8:801-807.
134. Daniel, D., Opelz, G., Mulder, A., Kleist, C., and Susal, C. 2004. Pathway of apoptosis induced in Jurkat T lymphoblasts by anti-HLA class I antibodies. *Hum Immunol* 65:189-199.
135. Trbovich, A.M., Hughes, F.M., Jr., Perez, G.I., Kugu, K., Tilly, K.I., Cidlowski, J.A., and Tilly, J.L. 1998. High and low molecular weight DNA cleavage in ovarian granulosa cells: characterization and protease modulation in intact cells and in cell-free nuclear autodigestion assays. *Cell Death Differ* 5:38-49.
136. 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.

137. 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.
138. Wojciak-Stothard, B., Potempa, S., Eichholtz, T., and Ridley, A.J. 2001. Rho and Rac but not Cdc42 regulate endothelial cell permeability. *J Cell Sci* 114:1343-1355.
139. Worthylake, R.A., Lemoine, S., Watson, J.M., and Burridge, K. 2001. RhoA is required for monocyte tail retraction during transendothelial migration. *J Cell Biol* 154:147-160.
140. Adamson, R.H., Curry, F.E., Adamson, G., Liu, B., Jiang, Y., Aktories, K., Barth, H., Daigeler, A., Golenhofen, N., Ness, W., et al. 2002. Rho and rho kinase modulation of barrier properties: cultured endothelial cells and intact microvessels of rats and mice. *J Physiol* 539:295-308.
141. Li, X., Liu, L., Tupper, J.C., Bannerman, D.D., Winn, R.K., Sebt, S.M., Hamilton, A.D., and Harlan, J.M. 2002. Inhibition of protein geranylgeranylation and RhoA/RhoA kinase pathway induces apoptosis in human endothelial cells. *J Biol Chem* 277:15309-15316.
142. Loirand, G., Guerin, P., and Pacaud, P. 2006. Rho kinases in cardiovascular physiology and pathophysiology. *Circ Res* 98:322-334.
143. Scornik, J.C., LeFor, W.M., Cicciarelli, J.C., Brunson, M.E., Bogaard, T., Howard, R.J., Ackermann, J.R., Mendez, R., Shires, D.L., Jr., and Pfaff, W.W. 1992. Hyperacute and acute kidney graft rejection due to antibodies against B cells. *Transplantation* 54:61-64.
144. Susal, C., and Opelz, G. 2004. Good kidney transplant outcome in recipients with presensitization against HLA class II but not HLA class I. *Hum Immunol* 65:810-816.
145. Le Bas-Bernardet, S., Hourmant, M., Valentin, N., Paitier, C., Giral-Classe, M., Curry, S., Follea, G., Soullou, J.P., and Bignon, J.D. 2003. Identification of the antibodies involved in B-cell crossmatch positivity in renal transplantation. *Transplantation* 75:477-482.
146. Terasaki, P.I., and Ozawa, M. 2004. Predicting kidney graft failure by HLA antibodies: a prospective trial. *Am J Transplant* 4:438-443.
147. Daar, A.S., Fuggle, S.V., Fabre, J.W., Ting, A., and Morris, P.J. 1984. The detailed distribution of MHC Class II antigens in normal human organs. *Transplantation* 38:293-298.
148. Daar, A.S., Fuggle, S.V., Fabre, J.W., Ting, A., and Morris, P.J. 1984. The detailed distribution of HLA-A, B, C antigens in normal human organs. *Transplantation* 38:287-292.
149. Choo, J.K., Seebach, J.D., Nickleit, V., Shimizu, A., Lei, H., Sachs, D.H., and Madsen, J.C. 1997. Species differences in the expression of major histocompatibility complex class II antigens on coronary artery endothelium: implications for cell-mediated xenoreactivity. *Transplantation* 64:1315-1322.
150. 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.
151. Kwak, B., Mulhaupt, F., Myit, S., and Mach, F. 2000. Statins as a newly recognized type of immunomodulator. *Nat Med* 6:1399-1402.
152. Clement, L.T., Tedder, T.F., and Gartland, G.L. 1986. Antibodies reactive with class II antigens encoded for by the major histocompatibility complex inhibit human B cell activation. *J Immunol* 136:2375-2381.

153. Giudizi, M.G., Biagiotti, R., Almerigogna, F., Alessi, A., Tiri, A., Del Prete, G.F., Ferrone, S., and Romagnani, S. 1987. Role of HLA class I and class II antigens in activation and differentiation of B cells. *Cell Immunol* 108:97-108.
154. Rich, T., Lawler, S.E., Lord, J.M., Blancheteau, V.M., Charron, D.J., and Mooney, N.A. 1997. HLA class II-induced translocation of PKC alpha and PKC beta II isoforms is abrogated following truncation of DR beta cytoplasmic domains. *J Immunol* 159:3792-3798.
155. Guo, W., Castaigne, J.G., Mooney, N., Charron, D., and Al-Daccak, R. 2003. Signaling through HLA-DR induces PKC beta-dependent B cell death outside rafts. *Eur J Immunol* 33:928-938.
156. Kim, J., Kim, H.R., Bae, J.L., Kim, D.H., Ki, H.J., Lee, H.K., Choi, S.H., and Jang, Y.S. 2001. Cross-linking of MHC class II molecules with anti-MHC class II antibody or epitope peptide prevents resting B lymphocyte differentiation by inhibiting NF-kappaB-dependent gene expression. *Mol Cells* 12:67-76.
157. Kim, J., Kim, H.R., Lee, J.C., and Jang, Y.S. 2002. Involvement of ERK, p38 MAP kinase, and PKC in MHC class II-mediated signal transduction in a resting B cell line. *Biochem Biophys Res Commun* 291:139-145.
158. Al-Daccak, R., Mooney, N., and Charron, D. 2004. MHC class II signaling in antigen-presenting cells. *Curr Opin Immunol* 16:108-113.
159. Nashar, T.O., and Drake, J.R. 2006. Dynamics of MHC class II-activating signals in murine resting B cells. *J Immunol* 176:827-838.
160. Altomonte, M., Pucillo, C., Damante, G., and Maio, M. 1993. Cross-linking of HLA class II antigens modulates the release of tumor necrosis factor-alpha by the EBV-B lymphoblastoid cell line JY. *J Immunol* 151:5115-5122.
161. Guo, W., Mourad, W., Charron, D., and Al-Daccak, R. 1999. Ligation of MHC class II molecules differentially upregulates TNF  $\beta$  gene expression in B cell lines of different MHC class II haplotypes. *Hum Immunol* 60:312-322.
162. Bertho, N., Laupeze, B., Mooney, N., Le Berre, C., Charron, D., Drenou, B., and Fauchet, R. 2001. HLA-DR mediated cell death is associated with, but not induced by TNF- $\alpha$  secretion in APC. *Hum Immunol* 62:106-112.
163. Newell, M.K., VanderWall, J., Beard, K.S., and Freed, J.H. 1993. Ligation of major histocompatibility complex class II molecules mediates apoptotic cell death in resting B lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90:10459-10463.
164. Truman, J.P., Garban, F., Choqueux, C., Charron, D., and Mooney, N. 1996. HLA class II signaling mediates cellular activation and programmed cell death. *Exp Hematol* 24:1409-1415.
165. Blancheteau, V., Charron, D., and Mooney, N. 2002. HLA class II signals sensitize B lymphocytes to apoptosis via Fas/CD95 by increasing FADD recruitment to activated Fas and activation of caspases. *Hum Immunol* 63:375-383.
166. Bertho, N., Drenou, B., Laupeze, B., Berre, C.L., Amiot, L., Grosset, J.M., Fardel, O., Charron, D., Mooney, N., and Fauchet, R. 2000. HLA-DR-mediated apoptosis susceptibility discriminates differentiation stages of dendritic/monocytic APC. *J Immunol* 164:2379-2385.
167. Bertho, N., Blancheteau, V.M., Setterblad, N., Laupeze, B., Lord, J.M., Drenou, B., Amiot, L., Charron, D.J., Fauchet, R., and Mooney, N. 2002. MHC class II-mediated apoptosis of mature dendritic cells proceeds by activation of the protein kinase C-delta isoenzyme. *Int Immunol* 14:935-942.
168. Bobbitt, K.R., and Justement, L.B. 2000. Regulation of MHC class II signal transduction by the B cell coreceptors CD19 and CD22. *J Immunol* 165:5588-5596.

169. Bishop, G.A., Warren, W.D., and Berton, M.T. 1995. Signaling via major histocompatibility complex class II molecules and antigen receptors enhances the B cell response to gp39/CD40 ligand. *Eur J Immunol* 25:1230-1238.
170. Nashar, T.O., and Drake, J.R. 2005. The pathway of antigen uptake and processing dictates MHC class II-mediated B cell survival and activation. *J Immunol* 174:1306-1316.
171. Johnson, D.R. 2000. Differential expression of human major histocompatibility class I loci: HLA-A, -B, and -C. *Hum Immunol* 61:389-396.
172. Johnson, D.R., Biedermann, B.C., and Mook-Kanamori, B. 2000. Rapid cloning of HLA class I cDNAs by locus specific PCR. *J Immunol Methods* 233:119-129.
173. Johnson, D.R. 2003. Locus-specific constitutive and cytokine-induced HLA class I gene expression. *J Immunol* 170:1894-1902.
174. Heinrichs, H., and Orr, H.T. 1990. HLA non-A,B,C class I genes: their structure and expression. *Immunol Res* 9:265-274.
175. 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.
176. Le Bouteiller, P., Rodriguez, A.M., Mallet, V., Girr, M., Guillaudeux, T., and Lenfant, F. 1996. Placental expression of HLA class I genes. *Am J Reprod Immunol* 35:216-225.
177. Rouas-Freiss, N., Goncalves, R.M., Menier, C., Dausset, J., and Carosella, E.D. 1997. Direct evidence to support the role of HLA-G in protecting the fetus from maternal uterine natural killer cytolysis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94:11520-11525.
178. 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. 2000. 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.
179. 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.
180. Ulbrecht, M., Honka, T., Person, S., Johnson, J.P., and Weiss, E.H. 1992. The HLA-E gene encodes two differentially regulated transcripts and a cell surface protein. *J Immunol* 149:2945-2953.
181. Lee, N., Goodlett, D.R., Ishitani, A., Marquardt, H., and Geraghty, D.E. 1998. HLA-E surface expression depends on binding of TAP-dependent peptides derived from certain HLA class I signal sequences. *J Immunol* 160:4951-4960.
182. O'Callaghan, C.A., and Bell, J.I. 1998. Structure and function of the human MHC class Ib molecules HLA-E, HLA-F and HLA-G. *Immunol Rev* 163:129-138.
183. Braud, V., Jones, E.Y., and McMichael, A. 1997. The human major histocompatibility complex class Ib molecule HLA-E binds signal sequence-derived peptides with primary anchor residues at positions 2 and 9. *Eur J Immunol* 27:1164-1169.
184. 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.
185. Michaelsson, J., Teixeira de Matos, C., Achour, A., Lanier, L.L., Karre, K., and Soderstrom, K. 2002. A signal peptide derived from hsp60 binds HLA-E and interferes with CD94/NKG2A recognition. *J Exp Med* 196:1403-1414.
186. O'Callaghan, C.A., Tormo, J., Willcox, B.E., Blundell, C.D., Jakobsen, B.K., Stuart, D.I., McMichael, A.J., Bell, J.I., and Jones, E.Y. 1998. Production, crystallization, and

- preliminary X-ray analysis of the human MHC class Ib molecule HLA-E. *Protein Sci* 7:1264-1266.
187. Moretta, L., Biassoni, R., Bottino, C., Cantoni, C., Pende, D., Mingari, M.C., and Moretta, A. 2002. Human NK cells and their receptors. *Microbes Infect* 4:1539-1544.
  188. 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.
  189. Borrego, F., Ulbrecht, M., Weiss, E.H., Coligan, J.E., and Brooks, A.G. 1998. Recognition of human histocompatibility leukocyte antigen (HLA)-E complexed with HLA class I signal sequence-derived peptides by CD94/NKG2 confers protection from natural killer cell-mediated lysis. *J Exp Med* 187:813-818.
  190. Llano, M., Lee, N., Navarro, F., Garcia, P., Albar, J.P., Geraghty, D.E., and Lopez-Botet, M. 1998. HLA-E-bound peptides influence recognition by inhibitory and triggering CD94/NKG2 receptors: preferential response to an HLA-G-derived nonamer. *Eur J Immunol* 28:2854-2863.
  191. Brooks, A.G., Borrego, F., Posch, P.E., Patamawenu, A., Scorzelli, C.J., Ulbrecht, M., Weiss, E.H., and Coligan, J.E. 1999. Specific recognition of HLA-E, but not classical, HLA class I molecules by soluble CD94/NKG2A and NK cells. *J Immunol* 162:305-313.
  192. Ulbrecht, M., Modrow, S., Srivastava, R., Peterson, P.A., and Weiss, E.H. 1998. Interaction of HLA-E with peptides and the peptide transporter in vitro: implications for its function in antigen presentation. *J Immunol* 160:4375-4385.
  193. Tomasec, P., Braud, V.M., Rickards, C., Powell, M.B., McSharry, B.P., Gadola, S., Cerundolo, V., Borysiewicz, L.K., McMichael, A.J., and Wilkinson, G.W. 2000. Surface expression of HLA-E, an inhibitor of natural killer cells, enhanced by human cytomegalovirus gpUL40. *Science* 287:1031.
  194. Heinzl, A.S., Grotzke, J.E., Lines, R.A., Lewinsohn, D.A., McNabb, A.L., Streblow, D.N., Braud, V.M., Grieser, H.J., Belisle, J.T., and Lewinsohn, D.M. 2002. HLA-E-dependent presentation of Mtb-derived antigen to human CD8<sup>+</sup> T cells. *J Exp Med* 196:1473-1481.
  195. Li, J., Goldstein, I., Glickman-Nir, E., Jiang, H., and Chess, L. 2001. Induction of TCR Vbeta-specific CD8<sup>+</sup> CTLs by TCR Vbeta-derived peptides bound to HLA-E. *J Immunol* 167:3800-3808.
  196. Pietra, G., Romagnani, C., Falco, M., Vitale, M., Castriconi, R., Pende, D., Millo, E., Anfossi, S., Biassoni, R., Moretta, L., et al. 2001. The analysis of the natural killer-like activity of human cytolytic T lymphocytes revealed HLA-E as a novel target for TCR alpha/beta-mediated recognition. *Eur J Immunol* 31:3687-3693.
  197. Romagnani, C., Pietra, G., Falco, M., Millo, E., Mazzarino, P., Biassoni, R., Moretta, A., Moretta, L., and Mingari, M.C. 2002. Identification of HLA-E-specific alloreactive T lymphocytes: a cell subset that undergoes preferential expansion in mixed lymphocyte culture and displays a broad cytolytic activity against allogeneic cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:11328-11333.
  198. Mingari, M.C., Schiavetti, F., Ponte, M., Vitale, C., Maggi, E., Romagnani, S., Demarest, J., Pantaleo, G., Fauci, A.S., and Moretta, L. 1996. Human CD8<sup>+</sup> T lymphocyte subsets that express HLA class I-specific inhibitory receptors represent oligoclonally or monoclonally expanded cell populations. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93:12433-12438.
  199. Panoutsakopoulou, V., Huster, K.M., McCarty, N., Feinberg, E., Wang, R., Wucherpfennig, K.W., and Cantor, H. 2004. Suppression of autoimmune disease after

- vaccination with autoreactive T cells that express Qa-1 peptide complexes. *J Clin Invest* 113:1218-1224.
200. Sarantopoulos, S., Lu, L., and Cantor, H. 2004. Qa-1 restriction of CD8<sup>+</sup> suppressor T cells. *J Clin Invest* 114:1218-1221.
  201. Ulbrecht, M., Kellermann, J., Johnson, J.P., and Weiss, E.H. 1992. Impaired intracellular transport and cell surface expression of nonpolymorphic HLA-E: evidence for inefficient peptide binding. *J Exp Med* 176:1083-1090.
  202. Gobin, S.J., and van den Elsen, P.J. 2000. Transcriptional regulation of the MHC class Ib genes HLA-E, HLA-F, and HLA-G. *Hum Immunol* 61:1102-1107.
  203. Wei, X.H., and Orr, H.T. 1990. Differential expression of HLA-E, HLA-F, and HLA-G transcripts in human tissue. *Hum Immunol* 29:131-142.
  204. Menier, C., Saez, B., Horejsi, V., Martinozzi, S., Krawice-Radanne, I., Bruel, S., Le Danff, C., Reboul, M., Hilgert, I., Rabreau, M., et al. 2003. Characterization of monoclonal antibodies recognizing HLA-G or HLA-E: new tools to analyze the expression of nonclassical HLA class I molecules. *Hum Immunol* 64:315-326.
  205. Pacasova, R., Martinozzi, S., Boulouis, H.J., Ulbrecht, M., Vieville, J.C., Sigaux, F., Weiss, E.H., and Pla, M. 1999. Cell-surface expression and alloantigenic function of a human nonclassical class I molecule (HLA-E) in transgenic mice. *J Immunol* 162:5190-5196.
  206. Marin, R., Ruiz-Cabello, F., Pedrinaci, S., Mendez, R., Jimenez, P., Geraghty, D.E., and Garrido, F. 2003. Analysis of HLA-E expression in human tumors. *Immunogenetics* 54:767-775.
  207. Bian, H., and Reed, E.F. 1999. Anti-HLA antibodies transduce proliferative signals in endothelial cells and smooth muscle cells. *Transplant Proc* 31:1924.
  208. Nath, N., Bian, H., Reed, E.F., and Chellappan, S.P. 1999. HLA class I-mediated induction of cell proliferation involves cyclin E- mediated inactivation of Rb function and induction of E2F activity. *J Immunol* 162:5351-5358.
  209. Bian, H., and Reed, E.F. 2001. Anti-HLA class I antibodies transduce signals in endothelial cells resulting in FGF receptor translocation, down-regulation of ICAM-1 and cell proliferation. *Transplant Proc* 33:311.
  210. Jin, Y., and Reed, E. 2002. Ligation of class I molecules on endothelial cells stimulates phosphorylation of focal adhesion kinase at TYR-576/577 and triggers the PI3K/AKT signaling cascade. *Hum Immunol* 63:S52.
  211. 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.
  212. Lepin, E.J., Jin, Y.P., Barwe, S.P., Rozengurt, E., and Reed, E.F. 2004. HLA class I signal transduction is dependent on Rho GTPase and ROK. *Biochem Biophys Res Commun* 323:213-217.
  213. Narayanan, K., Jendrisak, M.D., Phelan, D.L., and Mohanakumar, T. 2006. HLA class I antibody mediated accommodation of endothelial cells via the activation of PI3K/cAMP dependent PKA pathway. *Transpl Immunol* 15:187-197.
  214. Alexandre, G.P. 2004. From ABO-incompatible human kidney transplantation to xenotransplantation. *Xenotransplantation* 11:233-236.
  215. Platt, J.L. 1994. A perspective on xenograft rejection and accommodation. *Immunol Rev* 141:127-149.
  216. Dorling, A., Stocker, C., Tsao, T., Haskard, D.O., and Lechler, R.I. 1996. In vitro accommodation of immortalized porcine endothelial cells: resistance to complement mediated lysis and down-regulation of VCAM expression induced by low

- concentrations of polyclonal human IgG antipig antibodies. *Transplantation* 62:1127-1136.
217. Salama, A.D., Delikouras, A., Pusey, C.D., Cook, H.T., Bhangal, G., Lechler, R.I., and Dorling, A. 2001. Transplant accommodation in highly sensitized patients: a potential role for Bcl-xL and alloantibody. *Am J Transplant* 1:260-269.
  218. Fitau, J., Boulday, G., Coulon, F., Quillard, T., and Charreau, B. 2006. The adaptor molecule LNK negatively regulates TNF $\alpha$ -dependent VCAM-1 expression in endothelial cells through inhibition of the ERK1 and 2 pathways. *The Journal of Biological Chemistry* in press.
  219. 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.
  220. Enis, D.R., Shepherd, B.R., Wang, Y., Qasim, A., Shanahan, C.M., Weissberg, P.L., Kashgarian, M., Pober, J.S., and Schechner, J.S. 2005. Induction, differentiation, and remodeling of blood vessels after transplantation of Bcl-2-transduced endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102:425-430.
  221. 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.
  222. Magro, C.M., Klinger, D.M., Adams, P.W., Orosz, C.G., Pope-Harman, A.L., Waldman, W.J., Knight, D., and Ross, P., Jr. 2003. Evidence that humoral allograft rejection in lung transplant patients is not histocompatibility antigen-related. *Am J Transplant* 3:1264-1272.
  223. Stephens, H.A. 2001. MICA and MICB genes: can the enigma of their polymorphism be resolved? *Trends Immunol* 22:378-385.
  224. 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.
  225. 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.
  226. 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.
  227. Maron, D.J., Fazio, S., and Linton, M.F. 2000. Current perspectives on statins. *Circulation* 101:207-213.
  228. Istvan, E.S., and Deisenhofer, J. 2001. Structural mechanism for statin inhibition of HMG-CoA reductase. *Science* 292:1160-1164.
  229. Vincent, L., Soria, C., Mirshahi, F., Opolon, P., Mishal, Z., Vannier, J.P., Soria, J., and Hong, L. 2002. Cerivastatin, an inhibitor of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme a reductase, inhibits endothelial cell proliferation induced by angiogenic factors in vitro and angiogenesis in in vivo models. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 22:623-629.
  230. Morikawa, S., Takabe, W., Mataka, C., Kanke, T., Itoh, T., Wada, Y., Izumi, A., Saito, Y., Hamakubo, T., and Kodama, T. 2002. The effect of statins on mRNA levels of genes related to inflammation, coagulation, and vascular constriction in HUVEC. Human umbilical vein endothelial cells. *J Atheroscler Thromb* 9:178-183.
  231. Dichtl, W., Dulak, J., Frick, M., Alber, H.F., Schwarzacher, S.P., Ares, M.P., Nilsson, J., Pachinger, O., and Weidinger, F. 2003. HMG-CoA reductase inhibitors regulate

- inflammatory transcription factors in human endothelial and vascular smooth muscle cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 23:58-63.
232. Graaf, M.R., Richel, D.J., van Noorden, C.J., and Guchelaar, H.J. 2004. Effects of statins and farnesyltransferase inhibitors on the development and progression of cancer. *Cancer Treat Rev* 30:609-641.
  233. Mulhaupt, F., Matter, C.M., Kwak, B.R., Pelli, G., Veillard, N.R., Burger, F., Graber, P., Luscher, T.F., and Mach, F. 2003. Statins (HMG-CoA reductase inhibitors) reduce CD40 expression in human vascular cells. *Cardiovasc Res* 59:755-766.
  234. Cosio, F.G., Pesavento, T.E., Pelletier, R.P., Henry, M., Ferguson, R.M., Kim, S., and Lemeshow, S. 2002. Patient survival after renal transplantation III: the effects of statins. *Am J Kidney Dis* 40:638-643.
  235. Strandberg, T.E., Pyorala, K., Cook, T.J., Wilhelmsen, L., Faergeman, O., Thorgeirsson, G., Pedersen, T.R., and Kjekshus, J. 2004. Mortality and incidence of cancer during 10-year follow-up of the Scandinavian Simvastatin Survival Study (4S). *Lancet* 364:771-777.
  236. Masterson, R., Hewitson, T., Leikis, M., Walker, R., Cohney, S., and Becker, G. 2005. Impact of statin treatment on 1-year functional and histologic renal allograft outcome. *Transplantation* 80:332-338.
  237. Kobashigawa, J.A. 2004. Statins and cardiac allograft vasculopathy after heart transplantation. *Semin Vasc Med* 4:401-406.
  238. Kobashigawa, J.A. 2004. Statins in solid organ transplantation: is there an immunosuppressive effect? *Am J Transplant* 4:1013-1018.
  239. Ghittoni, R., Patrussi, L., Pirozzi, K., Pellegrini, M., Lazzerini, P.E., Capecchi, P.L., Pasini, F.L., and Baldari, C.T. 2005. Simvastatin inhibits T-cell activation by selectively impairing the function of Ras superfamily GTPases. *Faseb J* 19:605-607.
  240. Wu, L.H., Wan, Y.L., Xie, H.Y., Zhang, W.J., and Zheng, S.S. 2004. Immunosuppression in human peripheral blood T lymphocytes by fluvastatin. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)* 36:649-655.
  241. Waiczies, S., Prozorovski, T., Infante-Duarte, C., Hahner, A., Aktas, O., Ullrich, O., and Zipp, F. 2005. Atorvastatin induces T cell anergy via phosphorylation of ERK1. *J Immunol* 174:5630-5635.
  242. Steffens, S., and Mach, F. 2004. Anti-inflammatory properties of statins. *Semin Vasc Med* 4:417-422.
  243. Granville, C.A., Memmott, R.M., Gills, J.J., and Dennis, P.A. 2006. Handicapping the race to develop inhibitors of the phosphoinositide 3-kinase/Akt/mammalian target of rapamycin pathway. *Clin Cancer Res* 12:679-689.
  244. Ishitani, A., Sageshima, N., Lee, N., Dorofeeva, N., Hatake, K., Marquardt, H., and Geraghty, D.E. 2003. Protein expression and peptide binding suggest unique and interacting functional roles for HLA-E, F, and G in maternal-placental immune recognition. *J Immunol* 171:1376-1384.
  245. Choi, J., Enis, D.R., Koh, K.P., Shiao, S.L., and Pober, J.S. 2004. T lymphocyte-endothelial cell interactions. *Annu Rev Immunol* 22:683-709.
  246. Pober, J.S., 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.
  247. Savage, C.O., Hughes, C.C., McIntyre, B.W., Picard, J.K., and Pober, J.S. 1993. Human CD4+ T cells proliferate to HLA-DR+ allogeneic vascular endothelium. Identification of accessory interactions. *Transplantation* 56:128-134.
  248. 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.

249. Ma, W., and Pober, J.S. 1998. Human endothelial cells effectively costimulate cytokine production by, but not differentiation of, naive CD4<sup>+</sup> T cells. *J Immunol* 161:2158-2167.
250. Dengler, T.J., and Pober, J.S. 2000. Human vascular endothelial cells stimulate memory but not naive CD8<sup>+</sup> T cells to differentiate into CTL retaining an early activation phenotype. *J Immunol* 164:5146-5155.
251. Mach, F., Schonbeck, U., Sukhova, G.K., Bourcier, T., Bonnefoy, J.Y., Pober, J.S., and Libby, P. 1997. Functional CD40 ligand is expressed on human vascular endothelial cells, smooth muscle cells, and macrophages: implications for CD40-CD40 ligand signaling in atherosclerosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94:1931-1936.
252. Shiao, S.L., McNiff, J.M., and Pober, J.S. 2005. Memory T cells and their costimulators in human allograft injury. *J Immunol* 175:4886-4896.
253. Manavalan, J.S., Kim-Schulze, S., Scotto, L., Naiyer, A.J., Vlad, G., Colombo, P.C., Marboe, C., Mancini, D., Cortesini, R., and Suci-Foca, N. 2004. Alloantigen specific CD8<sup>+</sup>CD28<sup>-</sup>FOXP3<sup>+</sup> T suppressor cells induce ILT3<sup>+</sup>ILT4<sup>+</sup> tolerogenic endothelial cells, inhibiting alloreactivity. *Int Immunol* 16:1055-1068.
254. Suci-Foca, N., Manavalan, J.S., Scotto, L., Kim-Schulze, S., Galluzzo, S., Naiyer, A.J., Fan, J., Vlad, G., and Cortesini, R. 2005. Molecular characterization of allospecific T suppressor and tolerogenic dendritic cells: review. *Int Immunopharmacol* 5:7-11.
255. Kim-Schulze, S., Seki, T., Vlad, G., Scotto, L., Fan, J., Colombo, P.C., Liu, J., Cortesini, R., and Suci-Foca, N. 2006. Regulation of ILT3 gene expression by processing of precursor transcripts in human endothelial cells. *Am J Transplant* 6:76-82.
256. Boulouis, H.J., Martinozzi, S., Pacasova, R., Piroird, C., Vieville, J.C., Ulbrecht, M., Sigaux, F., Weiss, E.H., and Pla, M. 1999. Expression of HLA-E in transgenic mice. *Transplant Proc* 31:1868-1870.
257. Leibson, P.J. 1998. Cytotoxic lymphocyte recognition of HLA-E: utilizing a nonclassical window to peer into classical MHC. *Immunity* 9:289-294.
258. Carretero, M., Palmieri, G., Llano, M., Tullio, V., Santoni, A., Geraghty, D.E., and Lopez-Botet, M. 1998. Specific engagement of the CD94/NKG2-A killer inhibitory receptor by the HLA-E class Ib molecule induces SHP-1 phosphatase recruitment to tyrosine-phosphorylated NKG2-A: evidence for receptor function in heterologous transfectants. *Eur J Immunol* 28:1280-1291.
259. Lanier, L.L., Corliss, B., Wu, J., and Phillips, J.H. 1998. Association of DAP12 with activating CD94/NKG2C NK cell receptors. *Immunity* 8:693-701.
260. Vales-Gomez, M., Reyburn, H.T., Erskine, R.A., Lopez-Botet, M., and Strominger, J.L. 1999. Kinetics and peptide dependency of the binding of the inhibitory NK receptor CD94/NKG2-A and the activating receptor CD94/NKG2-C to HLA-E. *Embo J* 18:4250-4260.
261. Blancho, G., Buzelin, F., Dantal, J., Hourmant, M., Cantarovich, D., Baatard, R., Bonneville, M., Vie, H., Bugeon, L., and Souillou, J.P. 1992. Evidence that early acute renal failure may be mediated by CD3<sup>-</sup>CD16<sup>+</sup> cells in a kidney graft recipient with large granular lymphocyte proliferation. *Transplantation* 53:1242-1247.
262. Beilke, J.N., Kuhl, N.R., Van Kaer, L., and Gill, R.G. 2005. NK cells promote islet allograft tolerance via a perforin-dependent mechanism. *Nat Med* 11:1059-1065.
263. 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.

264. Borrego, F., Kabat, J., Sanni, T.B., and Coligan, J.E. 2002. NK cell CD94/NKG2A inhibitory receptors are internalized and recycle independently of inhibitory signaling processes. *J Immunol* 169:6102-6111.
265. Walsh, P.T., Taylor, D.K., and Turka, L.A. 2004. Tregs and transplantation tolerance. *J Clin Invest* 114:1398-1403.
266. Jiang, H., and Chess, L. 2004. An integrated model of immunoregulation mediated by regulatory T cell subsets. *Adv Immunol* 83:253-288.
267. 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.
268. 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. 2000. 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.
269. 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.
270. 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.
271. Hunt, J.S., and Geraghty, D.E. 2005. Soluble HLA-G isoforms: technical deficiencies lead to misinterpretations. *Mol Hum Reprod* 11:715-717.
272. Juch, H., Blaschitz, A., Daxbock, C., Rueckert, C., Kofler, K., and Dohr, G. 2005. A novel sandwich ELISA for alpha1 domain based detection of soluble HLA-G heavy chains. *J Immunol Methods* 307:96-106.
273. Rudstein-Svetlicky, N., Loewenthal, R., Horejsi, V., and Gazit, E. 2006. HLA-G levels in serum and plasma. *Tissue Antigens* 67:111-116.
274. 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.
275. 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.*
276. Le Friec, 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.
277. 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.
278. 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.
279. Fons, P., Chabot, S., Cartwright, J.E., Lenfant, F., L'Faqihi, F., Giustiniani, J., Herault, J.P., Gueguen, G., Bono, F., Savi, P., et al. 2006. Soluble HLA-G1 inhibits angiogenesis through an apoptotic pathway and by direct binding to CD160 receptor expressed by endothelial cells. *Blood*.
280. 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.

281. 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.
282. Holdenrieder, S., Stieber, P., Peterfi, A., Nagel, D., Steinle, A., and Salih, H.R. 2006. Soluble MICA in malignant diseases. *Int J Cancer* 118:684-687.
283. Salih, H.R., Goehlsdorf, D., and Steinle, A. 2006. Release of MICB molecules by tumor cells: mechanism and soluble MICB in sera of cancer patients. *Hum Immunol* 67:188-195.
284. Holdenrieder, S., Stieber, P., Peterfi, A., Nagel, D., Steinle, A., and Salih, H.R. 2006. Soluble MICB in malignant diseases: analysis of diagnostic significance and correlation with soluble MICA. *Cancer Immunol Immunother.*
285. Yokoyama, W.M. 2002. Immunology: catch us if you can. *Nature* 419:679-680.
286. Shiroishi, M., Tsumoto, K., Amano, K., Shirakihara, Y., Colonna, M., Braud, V.M., Allan, D.S., Makadzange, A., Rowland-Jones, S., Willcox, B., et al. 2003. Human inhibitory receptors Ig-like transcript 2 (ILT2) and ILT4 compete with CD8 for MHC class I binding and bind preferentially to HLA-G. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:8856-8861.
287. 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.

## RÔLE DU HLA DANS LA SIGNALISATION DES CELLULES ENDOTHÉLIALES EN TRANSPLANTATION ET CONTRIBUTION DE HLA-E AUX FONCTIONS IMMUNORÉGULATRICES DE L'ENDOTHÉLIUM

Mieux comprendre le rôle de l'endothélium dans la réponse immune et identifier de nouvelles cibles moléculaires pour le contrôle des dysfonctions endothéliales sont des enjeux majeurs pour combattre de nombreuses pathologies vasculaires et inflammatoires et le rejet de greffe en Transplantation.

Les travaux réalisés au cours de ma thèse ont mis en évidence l'activation de GTPase RhoA dans les cellules endothéliales (CE) vasculaires consécutive à la liaison du HLA de classe I par les anticorps allospécifiques. Nous montrons le rôle central de RhoA dans un mécanisme à médiation « immune » de la prolifération endothéliale qui requiert la géranylgéranylation de RhoA et peut être inhibé par une statine. De façon complémentaire, nous montrons que la fixation d'anticorps anti-HLA de classe II induit l'apoptose des lymphocytes B mais pas des CE issues du même donneur et suggèrent que les CE échappent à l'apoptose par l'activation d'une voie de survie impliquant la PI3-kinase. Enfin, par la mise en évidence de l'expression des formes membranaire et soluble de HLA-E par les CE, nos travaux apportent la première description *in vivo* et *in vitro* de l'expression et de la régulation de HLA-E par l'endothélium. L'ensemble de ces travaux montrent que, dans un contexte allogénique, l'expression des molécules du HLA de classe I et de classe II par l'endothélium contribue, via des voies de signalisation propres, à moduler les fonctions endothéliales telles que la prolifération et l'apoptose. De plus, l'expression de HLA-E procure de nouvelles fonctions immunorégulatrices aux CE et HLA-E soluble est un nouvel outil pour le diagnostic et l'immunothérapie.

Mots clés: cellules endothéliales/ HLA/ transplantation/ signalisation intracellulaire/ immunorégulation

HLA-mediated endothelial cell signaling in Transplantation and characterization of HLA-E as a new endothelial immunoregulatory molecule

**THE IDENTIFICATION OF NEW MOLECULAR TARGETS TO PREVENT ENDOTHELIUM DYSFUNCTION AS WELL AS A BETTER UNDERSTANDING OF THE ROLE OF ENDOTHELIUM IN THE IMMUNE RESPONSE ARE REQUIRED TO IMPROVE VASCULAR INJURY AND TRANSPLANT OUTCOME.**

The present study indicates that ligation of HLA class I and class II molecules on graft endothelial cells (EC) mediated by alloreactive anti-donor antibodies selectively activates signaling pathways affecting EC functions such as cell proliferation and apoptosis. Firstly, we showed that RhoA is a key mediator of signaling pathways leading to cytoskeleton reorganization and EC proliferation in response to HLA class I ligation and demonstrated the potent inhibitory effect of simvastatin on allostimulated EC growth. We also found that, in contrast to B cells, graft ECs escape from apoptosis mediated by HLA-DR ligation not as a result of moderate HLA-DR expression but rather as a result of specific signaling pathway involving the PI3-kinase.

This study also demonstrated that EC express the non classical class I HLA-E molecules at the cell surface and release soluble HLA-E upon inflammation providing new immunoregulatory functions to EC and tools for diagnosis and immunotherapy.

Key words : Endothelial Cells / HLA/ Transplantation/ cell signaling/ immunomodulation