Bull. Acad. Natle Méd., 2014, *198*, n°s 4-5, 801-812, séance du 27 mai 2014

COMMUNICATION

HLA-G : de la tolérance fœto-maternelle à l'acceptation d'organe

Mots-clés : Antigènes HLA. Tolérance immunitaire. Grossesse. Transplantation

HLA-G: from feto-maternal tolerance to organ acceptance

Key-words : HLA Antigens. Immune Tolerance. Pregnancy. Transplantation

Edgardo D. CAROSELLA *

L'auteur déclare ne pas avoir de liens d'intérêt en relation avec le contenu de cet article.

RÉSUMÉ

La molécule HLA-G est un antigène non classique de classe I qui se différencie des antigènes classiques par une expression restreinte, un très faible polymorphisme, l'expression de 7 isoformes protéiques différentes et une activité immuno-tolérogène. Cette molécule joue un rôle essentiel dans la tolérance fœto-maternelle. Son interaction avec trois récepteurs spécifiques exprimés sur les cellules T, B, Natural Killer (NK) et APC lui permet d'interagir à tous les niveaux de la réponse immunitaire. Dans les cas pathologiques, HLA-G peut aussi être exprimée par les cellules tumorales et leur micro environnement ce qui leur confère une tolérance locale importante. Il en va de même dans certains processus inflammatoires et des affections virales.

SUMMARY

HLA-G is a nonclassical class I molecule that differs from classical antigens by its restricted expression, very low polymorphism, expression of 7 different protein isoforms, and immune tolerance-inducing activity. HLA-G plays a key role in feto-maternal tolerance. Its interaction with three specific receptors expressed on immune cells (T, B, natural killer and antigen-presenting cells) allows it to act at all levels of the immune response. HLA-G can also be expressed by tumor cells and their microenvironment, endowing them with significant local tolerance. The same is true in some inflammatory and viral diseases.

* CEA/SRHI, Institut Universitaire d'Hématologie, Hôpital Saint-Louis, 1 avenue Claude Vellefaux — 75010 Paris.

Tirés à part : Professeur Edgardo D. Carosella, même adresse
Article reçu le 2 avril 2013, accepté le 10 juin 2014

INTRODUCTION

Les antigènes HLA de classe I classiques, HLA-A, -B et -C, comme les antigènes de classe II, jouent un rôle important dans l'induction d'une réponse immunitaire spécifique *via* la présentation antigénique aux cellules T. Ces molécules très polymorphes constituent des antigènes de transplantation qui peuvent être reconnus par les lymphocytes T alloréactifs. À l'opposé, la molécule HLA-G, molécule de Classe I non classique, est impliquée dans la tolérance immunitaire. Celle-ci est appelée non classique car 4 points majeurs la différencient des antigènes classiques. La protéine HLA-G peut s'exprimer sous sept isoformes : quatre membranaires (HLA-G1, -G2, -G3, -G4) et trois solubles (HLA-G5, -G6, et -G7). Son polymorphisme est limité : seuls 54 allèles ont été décrits à ce jour codant seulement pour 9 variants protéiques. L'expression protéique de HLA-G est restreinte aux tissus normaux, elle apparaît sur l'ovocyte fécondé, puis sur le trophoblaste, l'amnion, les cellules endothéliales des vaisseaux du chorion et les érythroblastes fœtaux. Chez l'adulte, HLA-G se retrouve au niveau du thymus, de la cornée et des érythroblastes. Elle est clairement identifiée comme une molécule inhibant directement la fonction des effecteurs allogéniques, *via* l'interaction avec 3 récepteurs inhibiteurs, ILT2, ILT4 et KIR2DL4 présents sur les cellules T, B, NK et les cellules présentatrices d'antigène (APCs).

IMPLICATIONS DE HLA-G DANS LE NON-REJET TISSULAIRE

Le rejet d'une greffe allogénique est un événement complexe. Si les cellules potentiellement allo-réactives sont des cellules NK, elles doivent atteindre la greffe, adhérer au tissu et, finalement, la lyser. Cependant, si les cellules potentiellement réactives sont des lymphocytes T, une réponse allogénique doit être initiée à travers :

— (i) une capture et une présentation d'allo-antigènes provenant du greffon par les cellules présentatrices d'antigènes (APC) ;
— (ii) une maturation de ces APCs ;
— (iii) une stimulation réciproque des lymphocytes allo-spécifiques T $CD4^+$, $CD8^+$ et des APCs ;
— (iv) une migration des cellules cytolytiques vers la greffe et finalement ;
— (v) une lyse des cellules du greffon conduisant au rejet. Les données *in vitro* indiquent que HLA-G est capable d'interférer à chacune de ces étapes, empêchant ainsi la réaction de rejet.

Les récepteurs inhibiteurs ILT2 et/ou ILT4 étant exprimés par les cellules impliquées dans la réaction de rejet (lymphocytes T CD4, CD8, cellules NK, lymphocytes B, monocytes, cellules dendritiques), leur interaction avec HLA-G peut inhiber chacune de leurs fonctions et conduire à l'arrêt d'une ou plusieurs phases de la réaction de rejet. Nous avons en particulier pu démontrer que HLA-G inhibait :

<u>Les réactions cytotoxiques des cellules NK</u>. Les cellules NK participent activement au rejet des greffes en détruisant directement les cellules n'exprimant pas de molé-

cules HLA de classe I ou n'exprimant pas de molécules HLA de classe I compatibles avec leurs récepteurs inhibiteurs. Dans ce contexte, HLA-G exprimée par les cellules fœtales bloque les fonctions cytolytiques des cellules NK maternelles et les mêmes résultats ont été obtenus lorsque des cellules allogéniques adultes exprimaient HLA-G [1,2,3].

Les réactions cytotoxiques des lymphocytes T CD8 : Les Lymphocytes T CD8 cytotoxiques (CTL) participent au rejet des greffes en détruisant directement les cellules exprimant des molécules HLA incompatibles. Les tissus greffés qui présentent à leur surface des molécules d'histocompatibilité différentes de celles du receveur deviennent les cibles des lymphocytes T cytotoxiques. L'expression d'HLA-G par les cibles inhibe la lyse des effecteurs T CD8 [4].

Les réponses alloprolifératives des lymphocytes T CD4 : L'activation des lymphocytes T CD4 est indispensable au déclenchement du processus de maturation des effecteurs cytotoxiques. Sans réactivité des lymphocytes T CD4, les lymphocytes T CD8 restent inactifs. HLA-G inhibe la réactivité des cellules T $CD4^+$, bloquant de ce fait en amont toute la cascade de la réaction de rejet de la greffe par les lymphocytes T CD8 [5].

La maturation des cellules présentatrices d'antigènes. Les cellules présentatrices d'antigènes interagissent avec les lymphocytes T CD4 et les lymphocytes T CD8 et permettent le déclenchement de la réponse immune. La cellule présentatrice a cependant besoin d'une activation/maturation pour jouer ce rôle de pivot. HLA-G inhibe cette activation, bloquant l'ensemble de la réaction immune T [6].

HLA-G induit la génération de cellules régulatrices. En plus de sa fonction de « bouclier » capable de protéger directement les cellules qui l'expriment et de sa capacité d'inhibition des réactions allogéniques, HLA-G induit la génération de cellules T régulatrices, sous-population des cellules effectrices, dont la fonction est la surveillance et l'inhibition des réactions allogéniques particulièrement dirigées contre le greffon. HLA-G est donc capable d'induire une tolérance à long terme, et pas seulement une inhibition circonstancielle d'une réaction de rejet [7].

Afin de mettre en évidence *in vivo* les pertinences biologiques de la molécule HLA-G, nous avons tout d'abord étudié la tolérance fœto-maternelle comme modèle de référence, puis avons poursuivi nos travaux en transplantation d'organes.

RÔLE DE HLA-G DANS LE CONTEXTE DE LA TOLÉRANCE FŒTO-MATERNELLE

La tolérance fœto-maternelle représente le seul exemple non pathologique de tolérance naturelle induite par une greffe semi-allogénique. Nous avons démontré pour la première fois que la molécule HLA-G était cruciale pour la tolérance fœto-maternelle, des altérations de son expression conduisant au rejet du fœtus.

Étude *ex vivo* : Protection des cellules cytotrophoblastiques contre l'activité lytique des cellules NK maternelles infiltrant l'endomètre (decidua)

Afin d'établir le rôle inhibiteur exercé par HLA-G dans le contexte de la grossesse, nous avons étudié l'activité lytique NK à partir de tissus fœtaux et maternels, à savoir des cellules trophoblastiques et des cellules NK infiltrant l'endomètre maternel (isolées à partir de produits d'interruption volontaire de grossesse).

Les cellules trophoblastiques expriment très faiblement la molécule HLA-C et n'expriment pas la molécule HLA-A et HLA-B. Les cellules NK ($CD56^+$ $CD16^-$ $CD3^-$), largement présentes dans la décidua utérine sont spécialisées dans la lyse de cellules cibles n'exprimant pas ou peu de molécules HLA de classe I à leur surface, telles que les cellules trophoblastiques. Cependant, ces cellules trophoblastiques d'origine fœtale survivent et ne sont pas rejetées par les cellules NK maternelles infiltrant la decidua utérine.

Nous avons démontré que la présence de la protéine HLA-G protège les cellules cytotrophoblastiques de l'activité destructrice des cellules NK maternelles, aussi bien dans des combinaisons semi-allogéniques (cytotrophoblaste du fœtus face aux cellules NK de sa propre mère) que dans des combinaisons allogéniques (cytotrophoblaste du fœtus face aux cellules NK provenant de mères différentes). Dans les deux cas, l'addition d'un anticorps anti-HLA-G a levé la protection contre la lyse NK. En revanche, aucune restauration de la lyse NK n'a pu être obtenue avec l'anticorps anti-HLA-C, démontrant ainsi que la protection des cellules cytotrophoblastiques est dépendante de l'expression de HLA-G à leur surface [2], et ceci en interagissant avec des récepteurs inhibiteurs ILT2 et KIR2DL4 présents sur les cellules NK intradéciduales.

Rôle de HLA-G dans le microchimérisme fœto-maternel

Le microchimérisme est défini comme la présence cellulaire (à faible taux) chez un individu de cellules provenant d'un autre individu. La principale circonstance de microchimérisme est la grossesse au cours de laquelle se développe un trafic bidirectionnel fœto-maternel et materno-fœtal. Nous nous sommes posé la question du rôle de la molécule HLA-G qui permettrait aux cellules fœtales de migrer dans la circulation maternelle et d'infiltrer les tissus.

Pour l'étudier, nous avons choisi une pathologie de la femme enceinte, les éruptions polymorphes de la grossesse (PEP) qui se développent durant le troisième trimestre de la grossesse, période où le microchimérisme fœtal est le plus élevé. Leur mécanisme restait jusqu'alors inconnu. À partir de biopsies des lésions cutanées de femmes enceintes de garçons, nous avons d'abord mis en évidence (au travers de PCR *in situ* spécifiques du chromosome Y) la présence de cellules fœtales au sein de l'épiderme et du derme de lésions cutanées du PEP, puis sur ces cellules (par analyse immunohistochimique) l'expression de la molécule HLA-G, constamment retrouvée dans les peaux lésées et les peaux saines lors de grossesse. À l'inverse, aucun signal n'était retrouvé dans les peaux saines de femmes non enceintes [8]. Enfin les

biopsies de peau lésée de femmes atteintes de schéroderme [9] montraient dans le derme, vingt-sept ans après leur dernier accouchement [10], la persistance de cellules fœtales exprimant HLA-G.

Un défaut d'expression de HLA-G conduit à une rupture de la tolérance fœto-maternelle

La molécule HLA-G étant cruciale pour la tolérance fœto-maternelle, des altérations de son expression devraient conduire au rejet du fœtus. Nous avons étudié les profils d'expression de HLA-G lors de la prééclampsie (PE). Ces études ont tout d'abord révélé que pour des placentas normaux, le degré d'invasivité du trophoblaste est corrélé au niveau d'expression de HLA-G. Pour les placentas prééclamptiques, nous avons montré un déficit global d'expression protéique de HLA-G. De façon intéressante, la diminution de la production d'IL10, connue pour augmenter l'expression de HLA-G sur les cellules trophoblastiques et sur les monocytes du sang périphérique, est également associée à une pré-éclampsie.

En outre, l'analyse de produits d'avortements spontanés à répétition nous a permis de montrer l'absence systématique de la molécule HLA-G [11]. Cependant et bien que l'expression de HLA-G au niveau du cytotrophoblaste extravilleux fasse partie intégrante du développement placentaire, elle est indépendante des anomalies chromosomiques, du développement embryonnaire et du site d'implantation. En effet, nous retrouvons une expression normale de HLA-G au cours des grossesses extra-utérines, lors de môles hydatiformes partielles ou complètes (tumeurs placentaires) et de trisomies. Finalement, La pertinence du rôle tolérogène de HLA-G a également été mise en évidence par la démonstration de l'importance de l'expression de formes solubles de la molécule HLA-G par l'embryon pour son implantation dans l'utérus maternel. En effet, les résultats obtenus sur plus d'un millier de patientes suivies pour fécondation *in vitro*, montrent que le taux de HLA-G soluble dans les surnageants d'ovocytes fécondés est corrélé au succès de l'implantation, puis de la grossesse.

Les isoformes tronquées peuvent remplacer HLA-G1 pour la survie du fœtus

Dans le contexte fœto-maternel, toutes les isoformes de HLA-G sont impliquées dans la protection du fœtus face à la cytotoxicité des cellules NK maternelles. Nous avons montré que l'isoforme HLA-G1 et également les isoformes HLA-G2, –G3, et –G4 sont exprimées sur les cellules cytotrophoblastiques isolées de villosités trophoblastiques de premier trimestre de gestation. Ainsi, l'expression trophoblastique d'isoformes de HLA-G autres que HLA-G1 constituerait un mécanisme tolérogène. En effet, l'expression de surface de HLA-G1 ne peut advenir chez des fœtus homozygotes pour l'allèle « null » HLA-G*0105N : en raison d'une mutation ponctuelle engendrant un codon stop dans le domaine $\alpha 2$, le gène HLA-G ne peut produire les isoformes HLA-G1, –G5, et –G4. Pourtant, il existe des adultes homozygotes pour l'allèle HLA-G*0105N. Pour ce faire nous avons cloné l'ADN

génomique de l'allèle HLA-G*0105N puis transfecté dans des cellules eucaryotes. Des analyses biochimiques ont montré la présence majoritaire de l'isoforme HLA-G2 et —G6. Des tests fonctionnels ont permis de confirmer l'efficacité de ces isoformes dans l'inhibition de la cytotoxicité.

Étude *in vivo* chez l'animal de la molécule HLA-G

Des études menées chez des souris triple transgéniques pour les gènes codant les molécules humaines HLA-G, β2 microglobuline et CD8 (c'est-à-dire exprimant naturellement ces molécules comme des molécules du soi) ont montré que la molécule HLA-G, après fécondation, est présente à des taux élevés dans le sérum de ces souris et augmente graduellement au cours de la gestation. Son interruption induite par la pilule abortive (RU 486, un anti-progestérone), est suivie d'une diminution immédiate et drastique du taux de HLA-G. Chez les primates, une comparaison avec le système d'histocompatibilité humain de classe I a montré que les singes Rhesus expriment une molécule nommée Mamu-AG, pour Macaca mulatta, qui partage de nombreuses caractéristiques avec la molécule HLA-G. Lors de la gestation, les blocages de la molécule Mamu-AG soit avec un anticorps spécifique, soit avec un ARN interférent empêchant la transcription du gène, ont conduit à un arrêt du développement placentaire et à une altération de la vascularisation existant entre la mère et le fœtus. Ces données *in vivo* montrent le rôle de ces molécules d'histocompatibilité dans la mise en place d'un environnement approprié au bon développement de la gestation.

PERTINENCE DE LA MOLÉCULE HLA-G AU COURS D'ALLOTRANSPLANTATIONS D'ORGANES

Nous avons tout d'abord travaillé en *transplantation cardiaque*, des biopsies systématiques étant réalisées tous les six mois pour ce type de greffe, ce qui permet des analyses transversales et longitudinales. Nous nous sommes ensuite intéressés aux *co-transplantations foie-rein* car l'allogreffe de foie augmente la survie du co-transplant rénal et libère des molécules HLA solubles potentiellement impliquées dans les mécanismes d'acceptation des transplants. De plus, la transplantation de foie est réalisée en histo-incompatibilité, une situation analogue à la grossesse. Enfin, nous avons étudié la *greffe de reins et de poumons*.

Transplantation cardiaque

Les études menées en collaboration avec le Pr. A. Carpentier ont montré une expression de la molécule HLA-G par les cellules myocardiques du greffon, avec une stabilité au cours du temps [12, 13]. De plus, chez ces patients HLA-G$^+$ nous avons systématiquement détecté dans le sérum les isoformes solubles HLA-G5 ou HLA-G6. En revanche, lorsque HLA-G n'est pas détectée au niveau du greffon, aucune forme soluble n'est retrouvée dans le sérum du malade. Finalement, les patients

HLA-G$^+$ ont présenté un nombre significativement réduit d'épisodes de rejet aigu (1.2 ± 1.1 chez les patients HLA-G$^+$ par rapport à 4.5 ± 2.8 chez les patients HLA-G$^-$), et une absence de rejet chronique.

Nous avons confirmé cette première étude par un travail rétrospectif réalisé au Canada qui réunissait une soixantaine de malades divisés en deux groupes, un groupe A qui n'avait pas d'épisodes de rejet modéré ou sévère (grade ISHLT<2R), et un groupe B présentant au moins deux épisodes de rejet. Trois biopsies myocardiques post transplantation ont été réalisées pendant la première année ; 86 % des patients du groupe A avait des biopsies HLA-G$^+$ pour seulement 11 % des patients du groupe B, et 60 % des patients HLA-G$^+$ sans rejet, avaient au moins deux biopsies positives. Ceci a montré une association négative significative entre l'expression de HLA-G dans le myocarde et le rejet aigu [14].

Double transplantation hépato-rénale

Nous avons poursuivi nos travaux dans le cadre de la transplantation combinée foie/rein en collaboration avec le service du Pr. B. Charpentier. Ce travail a pour origine l'observation initiale de ce dernier, à savoir que seulement 6 % des patients double transplantés foie/rein *vs.* 32,5 % des patients simple transplantés rénaux développent un rejet aigu du rein greffé. Nous avons observé chez les patients double greffés une association significative entre l'expression de HLA-G au niveau du greffon hépatique, des taux élevés de HLA-G au niveau du plasma et l'acceptation des greffons hépatique et rénal caractérisée par une diminution significative d'absence de rejet aigu et chronique [15].

Transplantation rénale

Une étude multi-centrique a été menée en collaboration avec l'équipe du Pr. Terasaki (Los Angeles) réunissant plus de sept cents patients transplantés rénaux avec un suivi longitudinal de cinq prélèvements sériques par patient. Les résultats montrent que les patients avec un taux sérique élevé de HLA-G présentent une diminution significative du nombre de rejet et une meilleure fonction rénale. De plus, cette étude expose pour la première fois que les patients HLA-G$^+$ développent, de façon significative, moins d'anticorps anti-HLA, habituellement responsables du rejet aigu de la greffe [16]. Ceci a confirmé les résultats obtenus *in vitro* chez les individus normaux, à savoir que l'interaction de la molécule HLA-G avec les lymphocytes B à travers le récepteur ILT2 induit une inhibition de la différentiation B et de la sécrétion des immunoglobulines.

Transplantation pulmonaire

Finalement, dans la transplantation pulmonaire, nous avons pu observer chez les receveurs stables (51 % des patients), une expression importante de la molécule HLA-G à la surface des cellules épithéliales bronchiques accompagnée d'une incidence très faible de rejet aigu. A contrario, il n'y avait aucune expression de HLA-G

chez le patient atteint de rejet aigu ou souffrant d'un syndrome de bronchiolite oblitérante ou résistant à la corticothérapie [17].

HLA-G exerce une fonction immuno-suppressive chez les patients transplantés

L'association significative entre l'acceptation de la greffe et l'expression de HLA-G désigne cette dernière comme une molécule essentielle à cette tolérance. L'analyse des propriétés immunosuppressives de plasma et de cellules mononucléées circulantes issus de patients transplantés présentant un taux élevé de HLA-G soluble montre que les cellules mononucléées du sang périphérique provenant de ces patients ne répondent pas à une stimulation allogénique. De même, la forme soluble HLA-G5 purifiée à partir de ces plasmas et non pas les molécules HLA-A, -B, -C, et -E inhibe l'alloprolifération de cellules T. [18]. Nous avons pu aussi déterminer *in vivo* que la molécule HLA-G induit chez ces malades des cellules T régulatrices de phénotype $CD3^{+}CD4^{low}$ et $CD3^{+}CD8^{low}$ associées à un taux plasmatique élevé d'interleukine-10. Le mode d'action suppresseur de ces cellules passe par la sécrétion d'IL10. Les effets immunosuppresseurs directs de HLA-G combinés à l'action régulatrice des cellules T $CD3^{+}CD4^{low}$ et $CD3^{+}CD8^{low}$ induites par HLA-G contribueraient donc chez le patient à limiter la réaction de rejet de greffe [19].

HLA-G est exprimée au cours de réactions allogéniques

Après une transplantation d'organes solides, HLA-G peut être exprimée par le greffon lui-même ou par les cellules immunes du receveur infiltrant le greffon ou dans le plasma. Dans les deux cas, la réaction immunitaire semble être impliquée dans l'induction de l'expression de HLA-G. Dans ce contexte, nous avons cherché à savoir si la réaction allogénique survenant après allogreffe stimule l'expression de HLA-G par les cellules immunitaires. Nos expériences *in vitro* ont montré qu'en effet, les molécules HLA-G1 et/ou HLA-G5 sont exprimées et/ou sécrétées par les lymphocytes T $CD4^{+}$ et $CD8^{+}$ allo-réactifs [20, 21]. En outre, la forme soluble HLA-G5 sécrétée par les cellules T $CD4^{+}$ allo-réactifs est fonctionnellement active et capable d'inhiber la réponse allo-proliférative de ces mêmes lymphocytes T $CD4^{+}$, agissant ainsi comme un signal négatif de rétrocontrôle. La pertinence biologique de ces données a été établie par la mise en évidence de lymphocytes T $CD4^{+}$ et $CD8^{+}$ HLA-G^{+} chez des patients ayant subi une transplantation hépato-rénale. Ces cellules T HLA-G^{+} pourraient constituer l'un des sites de production de HLA-G après allo-transplantation et contribuer à la meilleure acceptation du greffon.

Induction de l'expression de HLA-G chez les malades transplantés

La molécule CTLA4-Ig (belatacept) est une nouvelle molécule recombinante qui interfère avec le signal d'activation du lymphocyte T et empêche le rejet aigu après transplantation rénale. Nous avons constaté que les malades traités avec CTLA4-Ig présentaient des concentrations plasmatiques de HLA-G significativement plus élevées (72 ± 14 ng/ml) que les patients traités avec les inhibiteurs de la calcineurine (5 ± 1 ng/ml) ou les donneurs sains (5 ± 5 ng/ml). Cette expression de HLA-G était

associée à une diminution significative de rejet aigu et à l'absence de rejet chronique. En outre, la protéine HLA-G soluble purifiée à partir du plasma des patients traités par le belatacept était capable d'inhiber *in vitro* la prolifération des cellules T allogéniques. Les cellules dendritiques ont été identifiées comme une des sources de la sécrétion de HLA-G chez ces patients. Nous avons aussi montré que les cellules dendritiques générées *in vitro* en présence de CTLA4-Ig, en plus de secréter HLA-G agissaient comme des APC tolérogènes capables d'inhiber la prolifération lymphocytaire T.

La sécrétion de HLA-G à travers la molécule CTLA4-Ig apparaît comme un médiateur crucial de l'inhibition de la réponse T alloproliférative contribuant ainsi à l'effet immunosuppresseur et à l'acceptation du greffon. [18]

HLA-G est exprimée par les cellules souches mésenchymateuses adultes

Les cellules souches mésenchymateuses (MSCs), quelle que soit leur origine (moelle osseuse adulte, sang de cordon, tissus adipeux, etc.), sont des cellules multipotentes offrant de nouvelles perspectives thérapeutiques en médecine régénérative. De plus, les MSCs possèdent des propriétés immunosuppressives qui s'avéreront très importantes dans la prévention des réactions de rejet en transplantation de tissus solides et liquides (GvH). Dans ce contexte, nous avons démontré que les MScs expriment la forme soluble HLA-G5 et, dans une moindre mesure, la forme membranaire HLA-G1. Leur blocage à l'aide d'anticorps neutralisant de HLA-G inverse la capacité de ces cellules (i) de générer *in vitro* l'expansion de cellules T régulatrices $CD4^+CD25^+$ $FoxP3^+$, (ii) d'inhiber la réponse T alloproliférative, et (iii) de supprimer la fonction cytotoxique des cellules NK. Finalement, les MSCs permettent le maintien de l'expression des récepteurs inhibiteurs ILT-2 et ILT-4 à la surface des monocytes au cours de MLR [22]. Ceci montre que les molécules HLA-G contribuent activement à l'inhibition des réactions allogéniques exercées par les MSCs.

HLA-G induit une tolérance de greffe tissulaire chez la souris

La fonction tolérogène de la molécule HLA-G a été démontrée *in vivo* dans un modèle murin de transplantation de peau allogénique. Les premières études ont établi que l'expression transgénique de la molécule HLA-G chez la souris causait une diminution des réponses immunitaires cellulaires en raison de l'interaction entre HLA-G humain et un récepteur inhibiteur murin, PIR-B. L'existence d'un récepteur murin de HLA-G ayant été établie, la démonstration *in vivo* de l'intérêt de l'utilisation de HLA-G exogène fut entreprise. Dans l'expérimentation princeps, Horuzsko et *al.* traitèrent des souris destinées à recevoir une greffe de peau allogénique (« receveuses ») par des billes recouvertes par la molécule HLA-G 24 heures avant, puis au moment de la transplantation de peau. Ce traitement fut suffisant pour induire un doublement de la durée de vie de la greffe de peau établissant la preuve de concept de l'utilisation de la molécule HLA-G produite de façon exogène

pour favoriser la tolérance aux greffes de tissus [23]. Ces premières données ont depuis été confirmées et d'autres protéines HLA-G ont été testées avec ce système expérimental. On a ainsi pu établir la fonction tolérogène de protéines HLA-G fusionnées à un fragment Fc d'immunoglobuline humaine, de protéines HLA-G stabilisées par l'incorporation de la β2-μ dans leur séquence codante, et de protéines HLA-G tronquées [24]. À ce jour, l'effet tolérogène le plus important a été démontré pour une protéine HLA-G synthétique, dimérique, constituée de seuls deux des trois domaines de HLA-G : quatre traitements des souris receveuses à une semaine d'intervalle par des billes recouvertes de cette protéine synthétique ont été suffisants pour induire la tolérance complète de la peau greffée.

CONCLUSION

Ces observations, confirmées par de nombreuses équipes étrangères, nous ont permis d'identifier le rôle essentiel de HLA-G dans la tolérance fœto-maternelle et l'acceptation de greffe. Du point de vue thérapeutique, différents essais sont programmés dans la prévention du rejet avec l'utilisation de peptide synthétique et l'obtention de nouvelles molécules (comme le belatacept) inductrices *in vivo* de la sécrétion de HLA-G. En outre, le dosage plasmatique de HLA-G est utilisé pour le monitorage des patients transplantés dans le but de réduire le traitement immunosuppresseur classique et diminuer l'apparition de leurs effets secondaires. Des implications cliniques importantes en découlent telles que le développement de futures stratégies thérapeutiques antirejet utilisant les MSCs.

RÉFÉRENCES

[1] Rouas-Freiss N, Marchal R, Kirszenbaum M, Dausset J, Carosella ED. The α1 domain of HLA-G1 and HLA-G2 inhibits cytotoxicity induced by natural killer cells: is HLA-G the public ligand for natural killer cell inhibitory receptors? PNAS. 1997;94:5249-54.

[2] Rouas-Freiss N, Goncalves RM, Menier C, Dausset J, Carosella ED. Direct evidence to support the role of HLA-G in protecting the fetus from maternal uterine natural killer cytolysis. PNAS. 1997;94:11520-5.

[3] Carosella ED, Dausset J, Kirszenbaum M. HLA-G Revisited. Immunology Today. 1996;17:407-9.

[4] Riteau B, Rouas-Freiss N, Menier C, Paul P, Dausset J, Carosella ED. HLA-G2, -G3 and -G4 isoforms expressed as nonmature cell-surface glycoproteins inhibit NK and antigen-specific CTL cytolysis. J Immunol. 2001;166:5018-26.

[5] Lemaoult J, Krawice-Radanne I, Dausset J, Carosella ED. HLA-G1 expressing antigen-presenting cells induce immunosuppressive $CD4^+$ T cells. PNAS. 2004;101:7064-9.

[6] Liang S, Ristich V, Arase H, Dausset J, Carosella ED, Horuzsko A. Modulation of dendritic cell differentiation by HLA-G and ILT4 requires the IL-6-STAT3 signaling pathway. PNAS. 2008;105:8357-62.

[7] Carosella ED, Gregori S, Lemaoult J. The tolerogenic interplay(s) among HLA-G, myeloid APCs, and regulatory cells. Blood. 2011;118:6499-505.

[8] Aractingi S, Berkane N, Bertheau PH, le Goué C, Dausset J, Uzan S, Carosella ED. Fetal DNA in skin of polymorphic eruptions of pregnancy. The Lancet. 1998;352:1898-1901.

[9] Aractingi S, Dausset J, Carosella ED. Chimerism in scleroderma. The Lancet. 1998;351:1886.

[10] Aractingi S, Uzan S, Dausset J, Carosella ED. Microchimerism in Human Diseases. Immunology Today. 2000;21;116-8.

[11] Carosella ED, Rouas-Freiss N, Paul P, Dausset J. HLA-G : a tolerance molecule from the major histocompatibility complex. Immunology Today. 1999;20:60-2.

[12] Lila N, Carpentier A, Amrein C, Khalil-Daher I, Dausset J, Carosella ED. Implication of HLA-G molecule in heart-graft acceptance. The Lancet. 2000;355:2138.

[13] Lila N, Amrein C, Guillemain R, Chevalier P, Latremouille C, Fabiani JN, et *al.* Human leukocyte antigen-G expression after heart transplantation is associated with a reduced incidence of rejection. Circulation. 2002;105:1949-54.

[14] Sheshgiri R, Rouas-Freiss N, Rao V, Butany J, Ramzy D, Krawice-Radanne I, et *al.* Myocardial HLA-G reliably indicates a low risk of acute cellular rejection in heart transplant recipients. J Heart Lung Transplant. 2008;27:522-7.

[15] Creput C, Durrbach A, Menier C, Guettier C, Samuel D, Dausset J, et *al.* Human leukocyte antigen-G (HLA-G) expression in biliary epithelial cells is associated with allograft acceptance in liver-kidney transplantation. J Hepatol. 2003;39:587-94.

[16] Qiu J, Terasaki PI, Miller J, Mizutani K, Cai J, Carosella ED. Soluble HLA-G expression and renal graft acceptance. Am J Transplant. 2006;6:2152-6.

[17] Brugière O, Thabut G, Pretolani M, krawice-Radanne I, Dill C, Herbreteau A, et *al.* Immunohistochemical study of HLA-G expression in lung transplant recipients. Am J Transplant. 2009;9:1427-38.

[18] Bahri R, Naji A, Menier C, Charpentier B, Carosella ED, Rouas-Freiss N, et *al.* Dendritic cells secrete the immunosuppressive HLA-G molecule upon CTLA4-Ig treatment : implication in human renal transplant acceptance. J Immunol. 2009;183:7054-62.

[19] Naji A, Le Rond S, Durrbach A, Krawice-Radanne I, Creput C, Daouya M, et *al.* $CD3^{+}CD4^{low}$ and $CD3^{+}CD8^{low}$ are induced by HLA-G: novel human peripheral blood suppressor T-cell subsets involved in transplant acceptance. Blood. 2007;110:3936-48.

[20] Lila N, Rouas-Freiss N, Dausset J, Carpentier A, Carosella ED. Soluble HLA-G protein secreted by allospecific $CD4^{+}$ T cells suppresses the allo-proliferative response : a $CD4^{+}$ T cell regulatory mechanism. PNAS. 2001;98:12150-5.

[21] Le Rond S, Azema C, Krawice-Radanne I, Durrbach A, Guettier C, Carosella ED, et *al.* Evidence to support the role of HLA-G5 in allograft acceptance through induction of immunosuppressive/regulatory T cells. J Immunol. 2006;176:3266-76.

[22] Selmani Z, Naji A, Zidi I, Favier B, Gaiffe E, Obert L, et *al.* Human leukocyte antigen-G5 secretion by human mesenchymal stems cells is required to suppress T lymphocyte and natural killer function and to induce $CD4^{+}CD25highFOXP3^{+}$ regulatory T cells. Stem Cells. 2008; 26:212-22.

[23] Liang S, Ristich V, Arase H, Dausset J, Carosella ED, Horuzsko A. Modulation of dendritic cell differentiation by HLA-G and ILT4 requires the IL-6-STAT3 signaling pathway. PNAS. 2008; 105:8357-62.

[24] Favier B, Howangyin KY, Wu J, Caumartin J, Daouya M, Horuzsko A, et *al.* Tolerogenic function of dimeric forms of HLA-G recombinant proteins: a comparative study *in vivo*. PloS one. 2011;6:e21011.

DISCUSSION

M. Jacques ROUËSSÉE

Y-a-t-il une typologie particulière des cancers de cellules d'un « donneur » ou de l'enfant chez le receveur ou la mère ?

La présence de cellules fœtales chez la mère (microchimérisme) persiste tout au long de sa vie. Ces cellules sont, en général, des cellules souches très indifférenciées qui expriment HLA-G. Des publications de ces dernières années suggèrent une incidence de ce microchimérisme sur le cancer, plus particulièrement féminin (cancer du col, du sein, de la thyroïde), voire même sur les tumeurs pulmonaires. Une des hypothèses avancée sur les mécanismes d'action serait que la molécule HLA-G et d'autres inhibiteurs induiraient une diminution locale de l'immunité qui favoriserait la progression tumorale. Cette théorie est vraisemblable dans le cancer du col où cette immunotolérance locale pourrait augmenter la survie et l'agressivité du virus HPV. Néanmoins, un travail approfondi reste à faire pour mieux cibler les corrélations entre microchimérisme et cancer et comprendre le rôle de ces cellules.

M. Jacques-Louis BINET

Pourriez-vous reprendre le problème des effets « adverses » des cellules HLA-G+ ?

Combien de temps doit-on les injecter (par exemple dans les greffes de rein) ?

La molécule HLA-G, soit exprimée à la surface cellulaire ou des exosomes, soit secrétée dans les différents fluides (liquide amniotique, plasma, ascite, etc.), par son interaction avec les récepteurs ILT2 présents à la surface de la plupart des cellules immunitaires (T, B, NK et cellules dendritiques), peut agir à tous les niveaux de la réponse immune en l'inhibant. Si cette propriété est bénéfique dans le cas de la tolérance fœto-maternelle et la greffe d'organes, il n'en va pas de même pour toutes les cellules tumorales qui, à un stade avancé de la maladie, peuvent l'exprimer, ce qui est associée à un mauvais pronostic. En effet, elle crée un micro environnement tolérogène qui permet la progression tumorale. La molécule HLA-G constitue est ce que l'on appelle aujourd'hui un « check point » immunitaire.

Dans le cadre expérimental de la greffe de peau chez la souris, une injection de la protéine HLA-G soluble 24 heures avant la greffe suffit à prolonger de façon significative la survie du greffon. Quatre injections (J-1, J7, J14 et J21) produisent une tolérance supérieure à 60 jours. Au-delà, les souris sont sacrifiées.

M. Jean-Daniel SRAER

Les tumeurs induites après traitement disparaissent après un traitement immunotolérant ?

Après une greffe rénale, l'apparition d'une tumeur (provenant du donneur et non du receveur), nécessite un arrêt de l'immunosuppression. Dans la plupart des cas, se produit un rejet du rein greffé accompagné du rejet de la tumeur et des possibles métastases.