

UNIVERSITE DE LIMOGES
FACULTE DE MEDECINE

ANNEE 1997

N° 167/1

**IMPLICATION DU SYSTEME HLA
DANS LES AVORTEMENTS SPONTANES A REPETITION
ETUDE RETROSPECTIVE DE DIX-HUIT COUPLES**



THESE
pour le Diplôme d'Etat de Docteur en Médecine
obtenu après la soutenance du

MEMOIRE
du Diplôme d'Etudes Spécialisées de Biologie Médicale
présenté et soutenu publiquement

SCD UNIV.LIMOGES



D 035 100768 8

le 28 octobre 1997 à Limoges

par

Isabelle DUMONT épouse MAGNE
née le 8 décembre 1965 à Saint-Junien (Haute-Vienne)

JURY

Monsieur le Professeur M. COGNE
Mademoiselle le Professeur M-L. DARDE
Monsieur le Professeur G. HABRIOUX
Madame le Professeur E. VIDAL
Monsieur le Docteur Y. AUBARD
Madame le Docteur M. P. TEISSIER
Madame le Docteur M. DROUET

Président
Juge
Juge
Juge
Membre invité
Membre invité
Directrice de thèse

ERRATA

Deux erreurs se sont insérées dans cette thèse :

Page 71, il faut lire : Pour DQB1*0301, et non pas pour DRB1*0301 (1.14 et 15).

Page 77, il faut lire : 2^{ième} base, et non pas 3^{ième} base du codon 62 (1.4).

UNIVERSITE DE LIMOGES
FACULTE DE MEDECINE

ANNEE 1997

N°

67

IMPLICATION DU SYSTEME HLA
DANS LES AVORTEMENTS SPONTANES A REPETITION
ETUDE RETROSPECTIVE DE DIX-HUIT COUPLES



THESE
pour le Diplôme d'Etat de Docteur en Médecine
obtenu après la soutenance du

MEMOIRE
du Diplôme d'Etudes Spécialisées de Biologie Médicale
présenté et soutenu publiquement

le 28 octobre 1997 à Limoges

par

Isabelle DUMONT épouse MAGNE
née le 8 décembre 1965 à Saint-Junien (Haute-Vienne)

JURY

Monsieur le Professeur M. COGNE
Mademoiselle le Professeur M-L. DARDE
Monsieur le Professeur G. HABRIOUX
Madame le Professeur E. VIDAL
Monsieur le Docteur Y. AUBARD
Madame le Docteur M-P. TEISSIER
Madame le Docteur M. DROUET

Président
Juge
Juge
Juge
Membre invité
Membre invité
Directrice de thèse

UNIVERSITE DE LIMOGES

FACULTE DE MEDECINE

DOYEN DE LA FACULTE:

Monsieur le Professeur PIVA Claude

ASSESEURS:

Monsieur le Professeur VANDROUX Jean-Claude
Monsieur le Professeur DENIS François

PROFESSEURS DES UNIVERSITES - PRATICIENS HOSPITALIERS:

ADENIS Jean-Paul * (C.S)	OPHTALMOLOGIE
ALAIN Luc (C.S)	CHIRURGIE INFANTILE
ALDIGIER Jean-Claude	NEPHROLOGIE
ARCHAMBEAUD Françoise	MEDECINE INTERNE
ARNAUD Jean-Paul (C.S)	CHIRURGIE ORTHOPEDIQUE ET TRAUMATOLOGIQUE
BARTHE Dominique (C.S)	HISTOLOGIE EMBRYOLOGIE CYTOGENETIQUE
BAUDET Jean (C.S)	CLINIQUE OBSTETRICALE ET GYNECOLOGIE
BENSAID Julien (C.S)	CLINIQUE MEDICALE CARDIOLOGIQUE
BERNARD Philippe	DERMATOLOGIE
BERTIN Philippe	THERAPEUTIQUE
BESSEDE Jean-Pierre	OTO-RHINO-LARYNGOLOGIE
BONNAUD François (C.S)	PNEUMOLOGIE
BONNETBLANC Jean-Marie (C.S)	DERMATOLOGIE
BORDESSOULE Dominique (C.S)	HEMATOLOGIE ET TRANSFUSION
BOULESTEIX Jean (C.S)	PEDIATRIE
BOUQUIER Jean-José	CLINIQUE DE PEDIATRIE
BOUTROS-TONI Fernand	BIostatistique et Informatique Médicale
BRETON Jean-Christian (C.S)	BIOCHIMIE ET BIOLOGIE MOLECULAIRE
CATANZANO Gilbert (C.S)	ANATOMIE ET CYTOLOGIE PATHOLOGIQUE
CHRISTIDES Constantin	CHIRURGIE THORACIQUE ET CARDIO-VASCULAIRE
COGNE Michel	IMMUNOLOGIE
COLOMBEAU Pierre (C.S)	UROLOGIE
CUBERTAFOND Pierre (C.S)	CLINIQUE DE CHIRURGIE DIGESTIVE
DARDE Marie-Laure (C.S)	PARASITOLOGIE
DE LUMLEY WOODYEAR Lionel (C.S)	PEDIATRIE
DENIS François (C.S)	BACTERIOLOGIE-VIROLOGIE
DESCOTTES Bernard (C.S)	ANATOMIE
DUDOGNON Pierre	REEDUCATION FONCTIONNELLE
DUMAS Jean-Philippe	UROLOGIE
DUMAS Michel (C.S)	NEUROLOGIE
DUMONT Daniel	MEDECINE DU TRAVAIL
DUPUY Jean-Paul (C.S)	RADIOLOGIE ET IMAGERIE MEDICALE
FEISS Pierre (C.S)	ANESTHESIOLOGIE ET REANIMATION CHIRURGICALE
GAINANT Alain	CHIRURGIE DIGESTIVE
GAROUX Roger (C.S)	PEDOPSYCHIATRIE
GASTINNE Hervé	REANIMATION MEDICALE
GAY Roger (C.S)	REANIMATION MEDICALE
GERMOUTY Jean	PATHOLOGIE MEDICALE ET RESPIRATOIRE
HUGON Jacques	HISTOLOGIE-EMBRYOLOGIE-CYTOGENETIQUE
LABROUSSE Claude (C.S)	REEDUCATION FONCTIONNELLE
LABROUSSE François	ANATOMIE ET CYTOLOGIE PATHOLOGIQUES
LASKAR Marc (C.S)	CHIRURGIE THORACIQUE ET CARDIO-VASCULAIRE
LAUBIE Bernard (C.S)	ENDOCRINOLOGIE ET MALADIES METABOLIQUES
LEGER Jean-Marie (C.S)	PSYCHIATRIE D'ADULTES

.../...

LEROUX-ROBERT Claude (C.S)	NEPHROLOGIE 2
LIOZON Frédéric	CLINIQUE MEDICALE
MABIT Christian	ANATOMIE-CHIRURGIE ORTHOPEDIQUE ET TRAUMATOLOGIQUE
MELLONI Boris	PNEUMOLOGIE
MENIER Robert (C.S)	PHYSIOLOGIE
MERLE Louis	PHARMACOLOGIE
MOREAU Jean-Jacques (C.S)	NEUROCHIRURGIE
MOULIES Dominique	CHIRURGIE INFANTILE
NATHAN-DENIZOT Nathalie	ANESTHESIOLOGIE ET REANIMATION CHIRURGICALE
PECOUT Claude (C.S)	CHIRURGIE ORTHOPEDIQUE ET TRAUMATOLOGIQUE
PERDRISOT Rémy	BIOPHYSIQUE ET TRAITEMENT DE L'IMAGE
PILLEGAND Bernard (C.S)	HEPATO-GASTRO-ENTEROLOGIE
PIVA Claude (C.S)	MEDECINE LEGALE
PRALORAN Vincent (C.S)	HEMATOLOGIE ET TRANSFUSION
RAVON Robert (C.S)	NEUROCHIRURGIE
RIGAUD Michel (C.S)	BIOCHIMIE ET BIOLOGIE MOLECULAIRE
ROUSSEAU Jacques (C.S)	RADIOLOGIE ET IMAGERIE MEDICALE
SAUTEREAU Denis	HEPATO-GASTRO-ENTEROLOGIE
SAUVAGE Jean-Pierre (C.S)	OTO-RHINO-LARYNGOLOGIE
TABASTE Jean-Louis (C.S)	GYNECOLOGIE OBSTETRIQUE
TREVES Richard (C.S)	RHUMATOLOGIE
TUBIANA-MATHIEU Nicole (C.S)	CANCEROLOGIE
VALLAT Jean-Michel	NEUROLOGIE
VALLEIX Denis	ANATOMIE
VANDROUX Jean-Claude (C.S)	BIOPHYSIQUE ET TRAITEMENT DE L'IMAGE
VIDAL Elisabeth (C.S)	MEDECINE INTERNE
WEINBRECK Pierre (C.S)	MALADIES INFECTIEUSES

PROFESSEUR ASSOCIE A MI-TEMPS

MOULIN Jean-Louis

3ème CYCLE DE MEDECINE GENERALE

SECRETAIRE GENERAL DE LA FACULTE - CHEF DES SERVICES ADMINISTRATIFS

POMMARET Maryse

* C.S = Chef de Service

A Gérard, à Claire et à Elsa,

*pour votre patience, votre compréhension et votre
affection,
avec tout mon amour.*

A mes parents,

*qui m'ont permis de poursuivre ces études et d'être
ici aujourd'hui,
avec toute mon affection.*

*A Jean-Marc et Fabienne, à mes beaux parents et à tous ceux de
ma famille, qui m'ont soutenue affectueusement
tout au long de ces années.*

A mes amis,

*Magali, merci pour ton amitié et ton aide,
Philippe,
Anahita et Philippe,
Véronique, Marie-Pierre, Francis, Djahid,
et tous les autres....*

A notre président de thèse,

*Monsieur le Professeur Cogné
Professeur des Universités d'Immunologie
Immunologiste des Hôpitaux*

*Vous nous avez accueillie dans votre laboratoire,
et vous nous faites aujourd'hui l'honneur de
présider cette thèse.*

*Nous vous exprimons notre sincère reconnaissance
et notre profond respect.*

A notre directrice de thèse,

*Madame le Docteur Drouet
Praticien Hospitalier*

*Tu nous a confié ce travail et guidée tout au long
de celui-ci avec patience et confiance. Nous avons
pu apprécier ta disponibilité, ton expérience et ta
gentillesse.*

*Que ce travail soit l'occasion de t'exprimer notre
reconnaissance et notre amitié.*

A nos juges,

*Mademoiselle le Professeur Dardé
Professeur des Universités de Parasitologie
Praticien Hospitalier
Chef de Service*

*Au cours de nos études, nous avons pu apprécier
la richesse de vos connaissances et la qualité de
votre enseignement.*

*Nous vous remercions d'avoir accepté de juger ce
travail.*

*Monsieur le Professeur Habrioux
Professeur des Universités de Biochimie
Fondamentale*

*Nous vous sommes très reconnaissante d'avoir
accepté de participer à ce jury sans nous
connaître.*

Nous vous exprimons notre plus vive gratitude.

*Madame le Professeur Vidal
Professeur des Universités de Médecine Interne
Chef de Service*

*Nous vous sommes très reconnaissante de l'intérêt
que vous portez à cette thèse.
Soyez assurée de notre profond respect.*

*Monsieur le Docteur Aubard
Praticien Hospitalier*

*Vous nous avez reçue avec intérêt et disponibilité.
Nous vous témoignons notre sincère
reconnaissance.*

*Madame le Docteur Feissier
Praticien Hospitalier*

*Vous nous avez reçue malgré un emploi du temps
chargé, et votre aide a été précieuse pour la
réalisation de ce travail.
Nous vous remercions de l'intérêt que vous lui
portez en acceptant de le juger.*

Nous tenons à remercier

*les étudiants du laboratoire d'immunologie de la
faculté,*

*les techniciennes du laboratoire
d'histocompatibilité,*

*pour la gentillesse de leur accueil,
leur aide et leurs conseils.*

PLAN

INTRODUCTION

GENERALITES

I - LE SYSTEME HLA

A - Gènes et produits de classe I

B - HLA-G

1 - Le gène

2 - Les transcrits

3 - Les produits du gène

4 - Polymorphisme restreint

5 - Déséquilibre de liaison entre HLA-A et HLA-G

6 - Lieux d'expression

a - Chez le fœtus

b - Chez l'adulte

7 - Rôle

C - Gènes et produits de classe II

D - Exploration du système HLA

II - AVORTEMENTS SPONTANES A REPETITION

A - Définitions

B - Etiologies

1 - Etiologies non immunologiques

2 - Etiologies immunologiques

C - La réponse immunitaire maternelle aberrante à la grossesse

1 - ASR et homologies de gènes parentaux

a - HLA-A, -B, -DP, -DQ, -DR

b - HLA-G

c - Autres systèmes antigéniques

2 - ASR et autoimmunité spécifique du placenta

a - La région DP

b - La région DQ

c - La région DR

OBJECTIFS DE TRAVAIL

MATERIELS ET METHODES

I - MATERIELS

A - Sujets sains

B - Couples témoins

C - Couples malades

II - METHODES

A - Mise au point d'une technique de PCR RFLP appliquée à la caractérisation du polymorphisme de HLA-G

1 - Extraction de l'ADN génomique

2 - Amplification des exons 2 et 3 de HLA-G

a - Amorces

b - Mélange réactionnel

c - Programme d'amplification

d - Contrôle d'amplification

3 - Digestion enzymatique

4 - Séquençage

B - Phénotypage HLA-A et -B par microlymphocytotoxicité

C - Phénotypage HLA-DR/DQ par PCR-SSP

D - Recherche d'auto-immunisation et d'allo-immunisation chez les femmes des couples malades

E - Statistiques

RESULTATS

I - MISE AU POINT D'UNE TECHNIQUE DE PCR-RFLP POUR L'ETUDE DU POLYMORPHISME DE HLA-G

A - Fréquence des allèles HLA-G

B - Fréquence des phénotypes

C - Déséquilibre de liaison entre HLA-A et HLA-G

II - ETUDE DES PHENOTYPES DES COUPLES PRESENTANT DES ASR

A - Fréquence des allèles HLA-G

B - Fréquence des phénotypes

C - Etude des homologues de phénotypes parentaux pour HLA-A, -B, -DR, -DQ et -G

1 - HLA-A

2 - HLA-B

3 - HLA de classe I (-A et -B)

4 - HLA-DR

5 - HLA-DQ

6 - HLA de classe II (-DR et -DQ)

7 - HLA-G

D - Recherche d'un allèle HLA-A, -B, -DR ou DQ exposant au risque d'ASR
chez les partenaires féminines des couples présentant des ASR

III - ETUDE DE L'HISTOIRE CLINIQUE DES COUPLES PRESENTANT DES
ASR ET DES RESULTATS DES CROSS-MATCH

DISCUSSION

CONCLUSION

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

INTRODUCTION

Chez l'homme, le Complexe Majeur d'Histocompatibilité (CMH), appelé système HLA (Human Leucocyte Antigen), est une vaste région du génome d'environ 4000 kilobases, située sur le bras court du chromosome 6, regroupant une centaine de gènes impliqués dans divers phénomènes immunitaires et dont le rôle biologique essentiel est la présentation de l'antigène aux cellules au cours de la reconnaissance spécifique par les lymphocytes T.

Depuis le milieu des années 80, le CMH a été mis en cause dans les avortements spontanés à répétition :

Dans un premier temps, l'homologie des phénotypes parentaux de classe I a été incriminée. Les recherches se sont ensuite orientées vers le gène de classe Ib : HLA-G, du fait de son expression restreinte au trophoblaste ; enfin, les études les plus récentes suggèrent que certains gènes de classe II du CMH seraient des facteurs de risque des avortements spontanés à répétition (ASR).

GENERALITES

A côté des gènes de classe I existent des gènes moins connus, les gènes de classe Ib ou gènes de classe I non classique : E, F, G, H, J et 7.5p/9p. Nous reviendrons sur le gène HLA-G, précédemment appelé HLA-6.0.

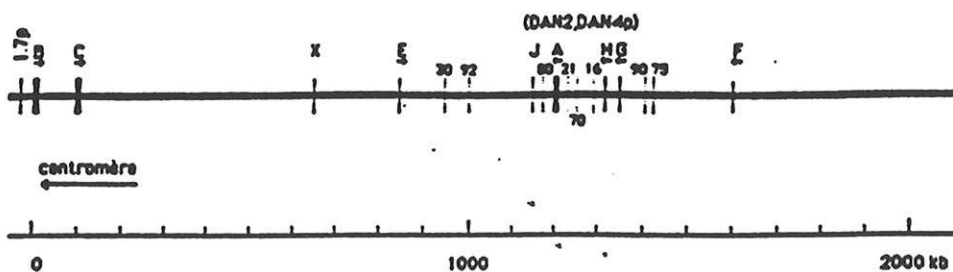
Les gènes de classe II, centromériques, forment une famille homogène plus restreinte.

Ils codent pour :

- les chaînes α et β des molécules HLA de classe II
- les molécules TAP1 et TAP2, protéines porteuses de peptides
- des éléments du protéasome (gènes LMP2 et LMP7).

La région de classe III se caractérise par la présence de gènes codant pour des produits divers : composants du complément : C4a, C4b, BF, C2 ainsi que de nombreux gènes dont les produits ne sont pas tous connus, exemples : $TNF\alpha$, $TNF\beta$ et HSP70.

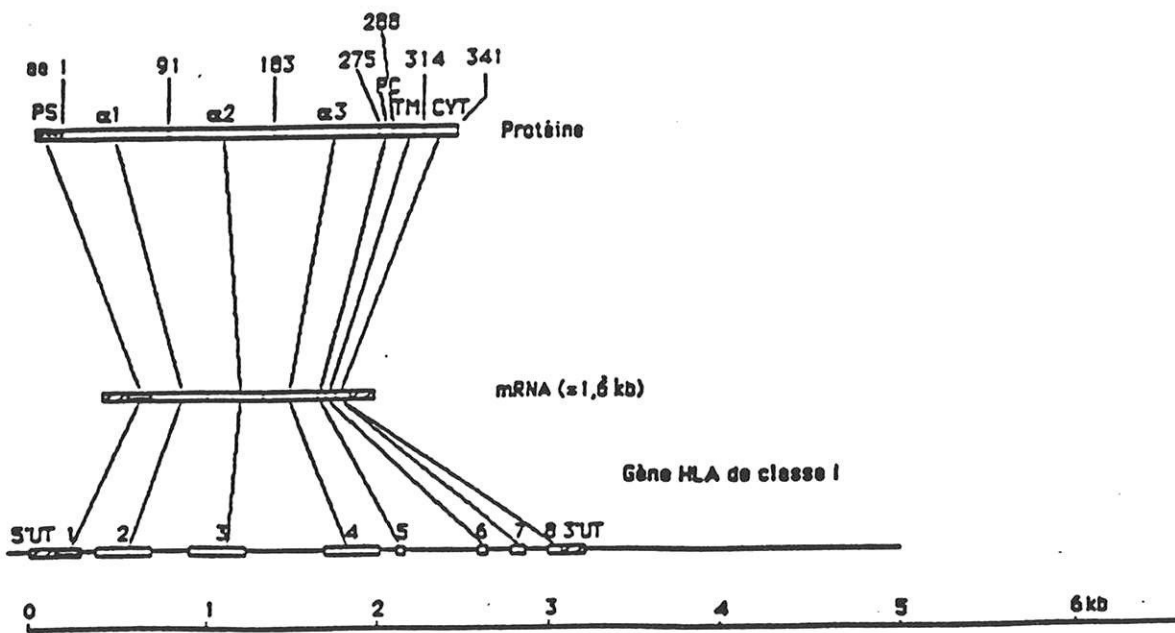
A - Gènes et produits de classe I (Colombani, 1993)



Carte moléculaire de la région HLA de classe I (d'après Colombani)

Chaque gène de classe I est composé de 8 exons séparés par des introns :

- la région 5' non traduite,
- l'exon 1 codant pour la séquence signal,
- les exons 2, 3 et 4 codant pour les domaines extracellulaires α_1 , α_2 et α_3 ,
- l'exon 5 codant pour la partie transmembranaire,
- les exons 6, 7 et 8 codant pour la partie intracellulaire.



Structure des gènes HLA de classe I (d'après Colombani)

Les molécules de classe I classique (A, B, C) sont des glycoprotéines hétérodimériques associant de façon non covalente :

- une chaîne lourde polymorphe A ou α de 44 kDa, implantée dans la membrane cellulaire et codée par un gène de classe I
- à une chaîne légère non polymorphe de 12 kDa, la β_2 microglobuline, codée par un gène situé sur le chromosome 15 et non implantée dans la membrane cellulaire.

La chaîne lourde A ou α est composée de 348 acides aminés et est formée de 3 régions.

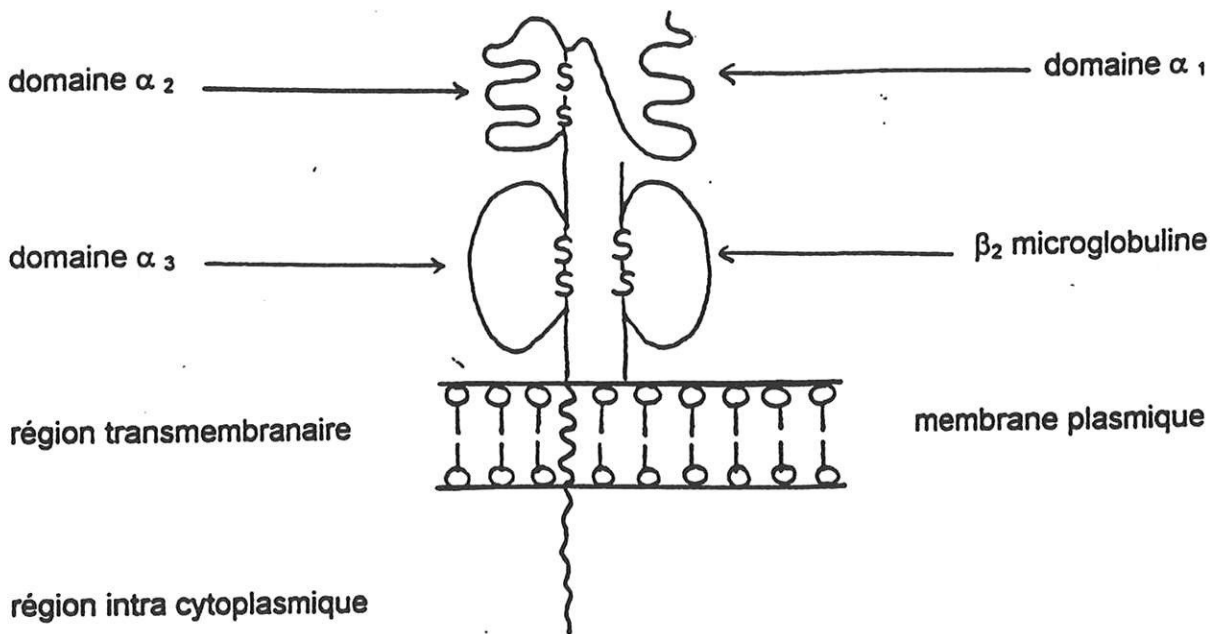
- La partie extracellulaire (274 acides aminés) est organisée en 3 domaines α_1 , α_2 et α_3 .

Les domaines α_1 et α_2 sont porteurs du polymorphisme et donc de l'allospécificité.

- La région transmembranaire constituée de 27 acides aminés essentiellement hydrophobes assure l'ancrage à la membrane cellulaire.

- La région intracellulaire est composée de 28 acides aminés et possède des sites de phosphorylation.

La β_2 microglobuline est un polypeptide de 99 acides aminés; elle a une structure globulaire compacte retrouvée dans la superfamille des immunoglobulines.



Représentation schématique de la molécule HLA de classe I

La structure tridimensionnelle des molécules de classe I fait apparaître une cavité entre les domaines α_1 et α_2 dont le fond est un feuillet β plissé et les bords des hélices α .

Cette cavité située au sommet de la molécule a été identifiée comme un site de liaison des peptides endogènes. Les molécules de classe I peuvent présenter aux récepteurs des

lymphocytes T (TcR) des peptides endogènes d'origine autologue ou virale et induire une réponse immune. Cette présentation est restreinte aux lymphocytes T cytotoxiques CD8+. Elle intervient ainsi plus particulièrement dans la lutte anti-virale et anti-tumorale.

Les molécules de classe I sont exprimées sur la plupart des cellules de l'organisme, particulièrement sur les lymphocytes et les macrophages. Leur densité est plus faible sur les hépatocytes et très faible ou nulle sur les érythrocytes, les cellules du système nerveux central, les épithéliums acinaires du pancréas et des glandes salivaires, le trophoblaste et les cellules embryonnaires au début du développement.

B - HLA-G (Carosella et al, 1996)

1 - Le gène

L'organisation en exon et intron est identique à celle des gènes de HLA-A, -B, et -C avec 8 exons, 7 introns et une région 3' non traduite.

- L'exon 1 (73 pb) code pour le peptide signal.
- L'exon 2 (270 pb) code pour le domaine α_1 .
- L'exon 3 (276 pb) code pour le domaine α_2 .
- L'exon 4 (276 pb) code pour le domaine α_3 .
- L'exon 5 (114 pb) code pour la région transmembranaire.
- Les exons 6 à 8 (105 pb) codent pour la région intracellulaire.

Cependant il existe un codon stop situé au niveau du deuxième codon dans l'exon 6. Ainsi le produit du gène est une protéine possédant une région intracytoplasmique plus courte que les molécules de classe I classique (Geraghty et al, 1987).

2 - Les transcrits

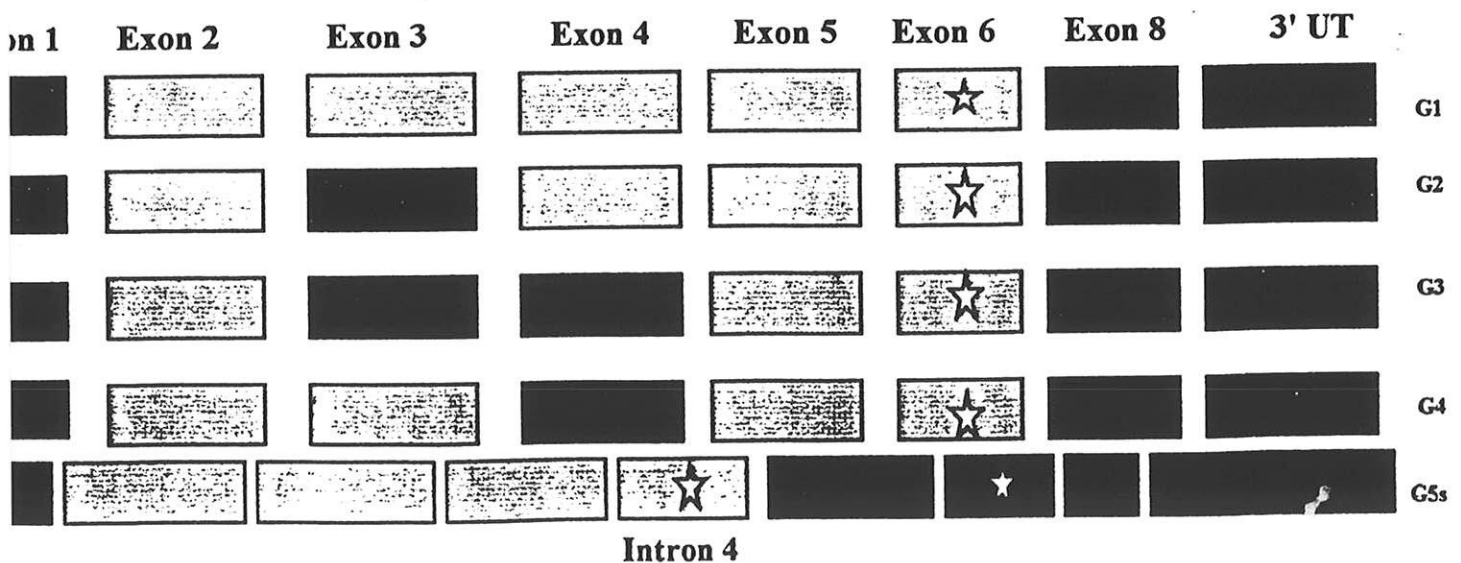
A la différence des gènes de classe I classique le transcrit primaire de HLA-G subit un épissage alternatif dans les trophoblastes et dans d'autres tissus fœtaux ou adultes.

Ainsi 5 transcrits ont été décrits, ils sont tous dépourvus de l'exon 7 (Fuji et al, 1994) :

- le transcrit HLA-G1 est le plus long ;
- le transcrit HLA-G2 est dépourvu de l'exon 3 ;
- le transcrit HLA-G3 est dépourvu des exons 3 et 4 ;
- le transcrit HLA-G4, de taille identique à celle du transcrit HLA-G2, est dépourvu de

l'exon 4 ;

- le transcrit HLA-G5 contient l'intron 4. La présence de cet intron 4 délète la région transmembranaire codée par l'exon 5 ce qui aboutit à la production d'une molécule soluble.



Organisation des exons des différents transcrits du gène HLA-G

3 - Les produits du gène (Ishitani et Geraghty, 1992)

La séquence en acides aminés de la protéine HLA-G possède plus de 86 % d'homologie avec HLA-A, -B et -C. Le produit du gène fait 37 à 39 kDa.

L'existence des différents transcrits suggère l'existence de plusieurs formes antigéniques.

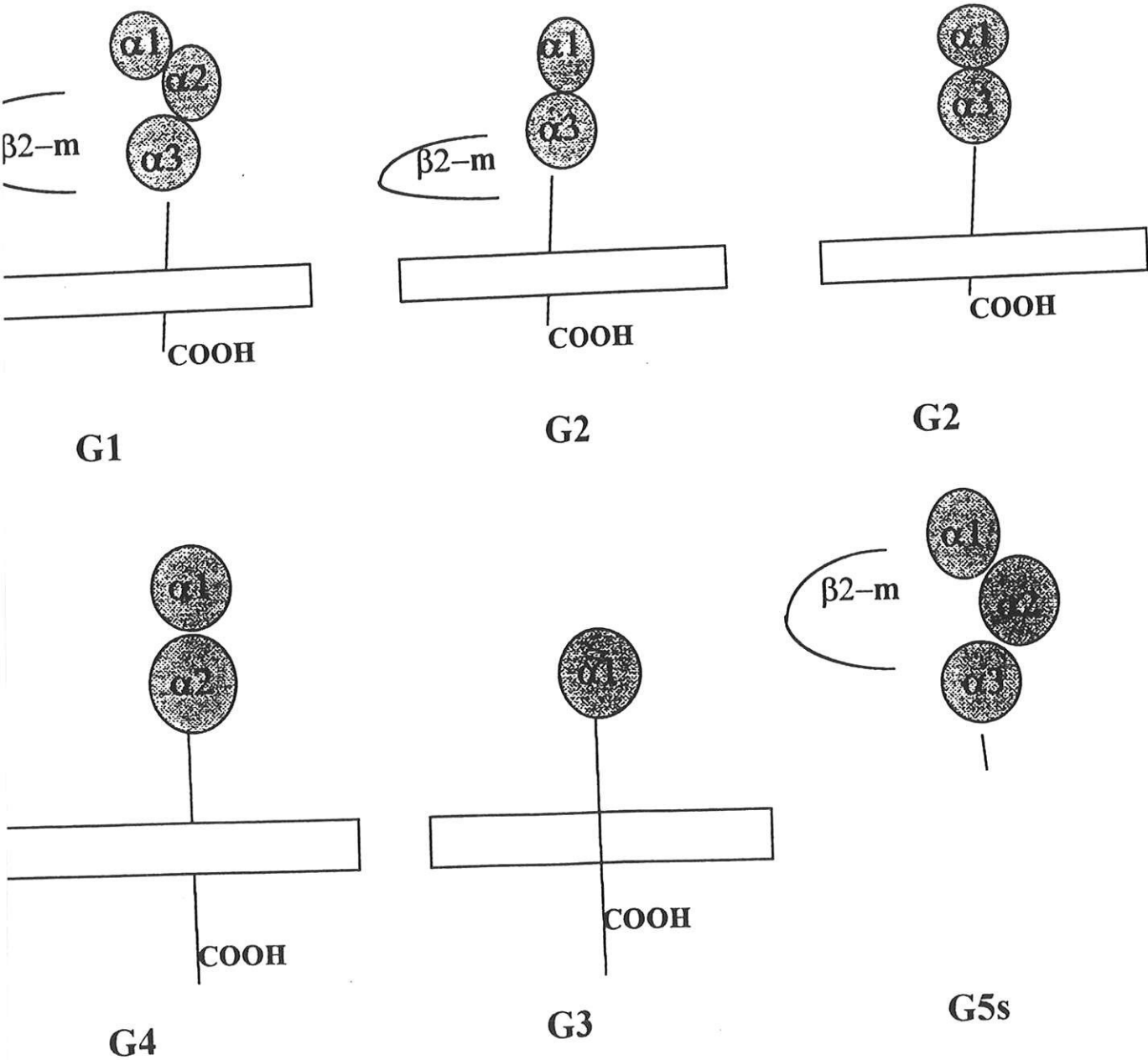


Schéma des différentes structures des protéines HLA-G

La protéine HLA-G1 s'associe à la β_2 m et possède une structure similaire aux antigènes de classe I classique.

Les protéines HLA-G2 peuvent s'associer pour former un homodimère G2/G2 semblable aux produits de classe II. Il en est de même pour les protéines HLA-G4 formant l'homodimère G4/G4.

De plus les molécules HLA-G2 peuvent s'associer à la β_2 m.

Les molécules HLA-G3 s'associent pour former un homodimère court.

La molécule HLA-G5 soluble a une structure identique à celle des produits de classe I solubles. Elle est associée à la β_2 m. Cependant, elle résulte d'un épissage alternatif, alors que les molécules de classe I solubles peuvent provenir de la coupure d'une molécule cellulaire, d'une protéolyse enzymatique ou d'un épissage alternatif (Drouet et al, 1995)

4 - Polymorphisme restreint (Alizadeh et al, 1993 ; Kirszenbaum et al, 1995 ; Morales et al, 1993 ; Van der Ven et Ober, 1994)

A ce jour, le degré de polymorphisme du gène HLA-G, peu connu, est considéré comme faible. Les séquences décrites sont peu hétérogènes, on ne compte que 4 allèles : HLA-GI, HLA-GII, HLA-GIII, HLA-GIV.

- La séquence de HLA-GI sert de référence.

- HLA-GII diffère de HLA-GI par une mutation silencieuse G→A à la troisième base du codon 57 (exon 2).

- HLA-GIII diffère par une mutation non silencieuse A→T à la première base du codon 31 (exon2) ; cela entraîne un changement d'acides aminés dans la protéine Thréonine→Sérine.

- HLA-GIV diffère par deux mutations silencieuses A→T à la troisième base du codon 107 (exon3), G→A à la troisième base du codon 57 (exon2).

Les fréquences géniques décrites dans les populations caucasiennes sont les suivantes dans les études française et espagnole :

- GI : 55 et 40%
- GII : 38 et 36 %
- GIII : 0 et 2 %
- GIV : 7 et 22 %

Cependant, quelques travaux plus récents suggèrent que le polymorphisme d'HLA-G serait plus important qu'on ne le pensait jusqu'alors.

Van der Ven l'a étudié au niveau des exons 1 à 6 par PCR-SSCP, chez 45 sujets noirs Américains. Il n'a pas mis en évidence de variation sur les exons 4 ni 6. Par contre, il a montré respectivement 2 et 24 modifications au niveau des exons 2 et 3, et 2 profils différents pour les exons 1 et 5.

Kirszenbaum a analysé le polymorphisme de 6 parents de 3 familles de référence pour l'étude du polymorphisme humain, dont la région HLA A a été entièrement séquencée. Il décrit 8 allèles, dont 7 nouveaux.

Au vu de ces résultats, on peut imaginer un polymorphisme plus important d'HLA-G que celui actuellement connu. Des travaux de séquençage portant sur un grand nombre de sujets d'ethnies différentes seront nécessaires pour le caractériser.

5 - Déséquilibre de liaison entre HLA-A et HLA-G

Il existe un déséquilibre de liaison entre HLA-A et HLA-G (Morales et al, 1993).

A2, A3, A29 sont en déséquilibre de liaison avec GI;

A1, A23, A24, A26, A28, A34 avec GII ;

A11 avec GIV.

A30, A32, A33 ne sont pas liés avec un allèle particulier d'HLA-G.

6 - Lieux d'expression

A la différence des gènes de classe I qui s'expriment sur toutes les cellules, le gène HLA-G a une expression restreinte.

a - Chez le fœtus

- Il est exprimé essentiellement dans le placenta, au niveau des villosités du cytotrophoblaste au cours du premier trimestre de la gestation et au niveau de la membrane chorionique du cytotrophoblaste au cours du troisième trimestre de la gestation (Kovats et al, 1990 ; Chumbley et al, 1995 ; Loke et al, 1997 ; Mc Master et al, 1995).

- Il est aussi exprimé dans l'amnios (Houlihan et al, 1995).

- Il est exprimé en faible quantité dans les tissus fœtaux : œil, thymus, poumons, cœur, rein et foie, excepté au niveau du cerveau (Houlihan et al, 1992).

- Des transcrits ont été détectés en faible quantité dans les cellules mononucléées du sang du cordon. Par contre, ils sont absents des progéniteurs hématopoïétiques et des cellules NK (Natural Killer) (Kirszenbaum et al, 1995 ; Moreau et al, 1995 ; Onno et al, 1994).

b - Chez l'adulte

Dans les tissus adultes l'ARN messager a été détecté au niveau de la peau, du poumon, des lymphocytes B et T et en plus faible quantité dans le rein, l'ovaire, le colon et l'intestin grêle (Kirszenbaum et al, 1994 ; Ulbrecht et al, 1991 ; Werr et Orr, 1990). La présence de transcrit HLA-G dans la chambre antérieure de l'œil adulte, décrite par Geraghty, n'a pas été retrouvée dans les travaux de notre laboratoire (Robert et Drouet, manuscrit en préparation).

7 - Rôle (Ellis, 1990 ; Gobin et al, 1997 ; Jurisicova et al, 1996 ; Pazmany et al, 1996 ; Schmidt et Orr, 1993)

La survie d'un fœtus semi allogénique au cours de la grossesse est un paradoxe immunologique. L'expression restreinte au trophoblaste de l'antigène HLA-G suggère que HLA-G est fortement impliqué dans la tolérance immuno fœtomaternelle.

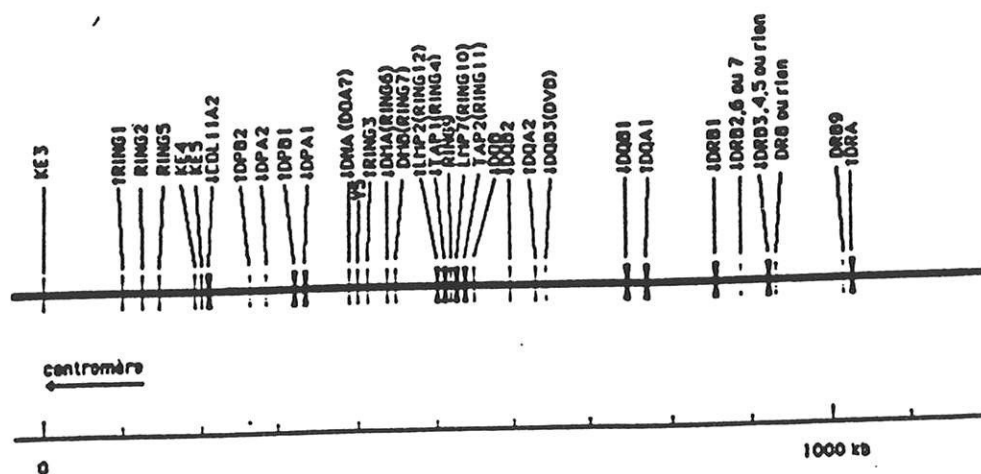
Il semblerait que les molécules HLA-G, dont le polymorphisme est bas, puissent être le ligand public pour le récepteur des cellules NK, et conférer une tolérance immuno pour le tissu fœtal.

Des travaux récents suggèrent que les molécules HLA-G sont capables de présenter des peptides aux lymphocytes T.

Les molécules HLA-G, dont l'expression est essentiellement restreinte au trophoblaste pourraient jouer un rôle dans le pouvoir invasif et proliférant au niveau de l'utérus du premier trimestre de la grossesse. Ce processus d'expression placentaire serait sous le contrôle d'hormones, de facteurs de croissance et de cytokines, qui se lieraient à la chaîne lourde.

Par ailleurs, le placenta n'exprime pas ou peu les molécules de classe I classique et échappe ainsi à la reconnaissance immune. S'il les exprimait, les composants paternels seraient reconnus comme étrangers par les lymphocytes T cytotoxiques. Le résultat serait une réponse de rejet.

C - Gènes et produits de classe II



Carte moléculaire de la région de classe II (d'après Colombani)

La région HLA-D ou région de classe II est divisée en 3 sous-régions principales DR, DP, DQ. Elle contient des gènes A et B codant pour les chaînes α et β des molécules HLA de classe II : gènes $DR\alpha$ et $DR\beta$ codant pour les protéines DR, gènes $DP\alpha$ et $DP\beta$ codant pour les protéines DP, gènes $DQ\alpha$ et $DQ\beta$ codant pour les protéines DQ. L'organisation en introns et exons ne diffère pas de celle de la classe I.

Les molécules de classe II sont constituées de 2 sous-unités associées de façon non covalente : une chaîne lourde α de 33 ou 34 kDa et une chaîne légère β de 27 ou 29 kDa. Ce sont des glycoprotéines transmembranaires comportant 3 parties : extracellulaire, transmembranaire et intracytoplasmique.

Leur structure tridimensionnelle ressemble à celle des molécules de classe I. Chaque chaîne comporte deux domaines extracellulaires. Les zones polymorphes sont localisées dans les domaines N terminaux.

L'expression des molécules de classe II est restreinte aux cellules présentatrices de l'antigène : lymphocytes et cellules du système des monocytes-macrophages. Elles présentent des peptides d'origine extracellulaire, et déclenchent une réponse T helper. Néanmoins, cette expression peut être induite sur toutes les cellules de l'organisme par différentes cytokines (IFN...).

D - Exploration du système HLA

Au laboratoire, les antigènes de classe I sont explorés en routine par une technique sérologique : la microlymphocytotoxicité dépendante du complément. C'est un test de lyse des lymphocytes par une batterie d'allosérums provenant de femmes enceintes immunisées, en présence de complément.

Les gènes de classe II sont étudiés en biologie moléculaire par une technique de PCR-SSO, qui associe PCR et hybridation d'oligonucléotides spécifiques d'allèles.

Il n'existe pas d'allosérum permettant de caractériser le phénotype HLA-G. Nous avons utilisé une technique de PCR-RFLP, s'inspirant des travaux de Morales, qui permet de séparer les 4 allèles connus au niveau de l'ADN génomique. Les amplifications par PCR des exon 2 et 3 sont suivies d'une digestion enzymatique par les enzymes de restriction : MspI (coupant les

sites C/CGG) et HinfI (coupant les sites G/ANTC) pour l'exon 2 et par AclI (coupant les sites G/CGC) pour l'exon 3.

On obtient les profils de restriction suivant :

	HLA-GI	HLA-GII	HLA-GIII	HLA-GIV
MspI	30+113+125	30+238	30+113+125	30+238
HinfI	106+175	106+175	79+27+175	106+175
AclI	45+231	45+231	45+231	276

On peut ainsi différencier les différents allèles et dire si un individu est homozygote ou hétérozygote.

II - AVORTEMENTS SPONTANES A REPETITION (Thoulon et al, 1995 ; Voisin et al, 1990)

A - Définitions

L'avortement est l'expulsion du produit de conception hors des voies génitales maternelles avant 28 semaines d'aménorrhée, soit 180 jours, ce qui correspond à un fœtus de 100 g. Cette définition légale est aujourd'hui critiquée et l'OMS entend par avortement l'expulsion d'un fœtus de moins de 500 g. ou à moins de 22 semaines d'aménorrhée.

Il est important de distinguer avortement précoce et avortement tardif, car les étiologies diffèrent. Classiquement et de façon un peu arbitraire, on tire une ligne de partage à 12 semaines de grossesse.

Parmi les avortements précoces, il convient de séparer l'avortement isolé des avortements spontanés à répétition.

En effet, l'avortement isolé est un accident assez banal survenant soit au début de la période de reproduction lorsqu'il n'inaugure pas une série, soit au décours d'une vie obstétricale normale. Le risque de survenue varie de 10 à 20 % selon les séries ; il est fonction de nombreux facteurs dont les principaux sont l'âge de la femme et le terme de la grossesse.

On parle d'avortement spontané à répétition (ASR) à partir de 3 avortements spontanés, précoces, successifs, non interrompus par une grossesse normale. C'est le caractère successif qui définit le caractère pathologique. Ces avortements répétés précoces doivent survenir avec le même partenaire. Le chiffre classique de 3 peut prêter à discussion : Il est difficile de proposer à une femme qui vient consulter après 2 avortements d'attendre un troisième échec pour lancer une exploration. De plus, à une époque où les femmes commencent tardivement leur vie de reproduction, tout retard diagnostic et thérapeutique peut minorer leur chance de réussir une grossesse. C'est la raison pour laquelle de nombreuses équipes explorent le couple à partir de 2 avortements.

B - Etiologies

Ces avortements répétés précoces constituent la maladie abortive. La fréquence attendue de 3 événements indépendants successifs étant de $(0,15)^3$ soit 0,34% et la prévalence de la maladie abortive de 1%, le hasard ne peut pas expliquer à lui seul cette fréquence élevée d'ASR. Cette idée est renforcée par les études de cytogénétique qui ont montré que si la majorité des avortements isolés présentaient une anomalie chromosomique, il n'en va pas de même pour les ASR. *Les avortements spontanés répétés précoces peuvent donc être considérés comme une véritable maladie, justifiant un bilan étiologique et susceptible d'être traité efficacement.*

Parmi les nombreuses étiologies des avortements, seules certaines sont susceptibles d'entraîner des ASR précoces. Elles se répartissent avec les fréquences suivantes : causes génétiques 6%, causes anatomiques 1%, causes hormonales 5%, causes immunologiques 65%, sans oublier les causes infectieuses qui donnent plutôt des avortements isolés et tardifs et les

causes générales et métaboliques. Il reste donc encore un grand nombre d'ASR précoces sans explication ; cependant la moitié de ces couples pourront mener à terme une grossesse normale sans traitement.

1 - Etiologies non immunologiques

Les causes infectieuses

doivent être éliminées (Listéria , Mycoplasme, Rickettsie).

Les causes générales et métaboliques

Diabète ,HTA.... doivent être écartées.

Les causes génétiques

Ce sont les aberrations chromosomiques (anomalies de nombre essentiellement) et les anomalies géniques à l'échelon moléculaire.

Les causes anatomiques

Malformations utérines, malpositions, synéchies, fibromes , comme il a déjà été écrit, entraînent plutôt des avortements tardifs.

Les causes endocriniennes

- L'hypothyroïdie, le syndrome de Cushing, l'hyperandrogénie d'origine ovarienne ou surrénalienne, l'hyperprolactinémie sont des causes rares d'ASR.

- Le déficit lutéal peut expliquer un certain nombre d'ASR. Certaines femmes ont, du fait d'une insuffisance primitive du corps jaune, une insuffisance de sécrétion d'œstradiol et de

17 OH progestérone, malgré des taux normaux d'hCG, dans les premières semaines de la grossesse, où le corps jaune est seul à assurer la survie de l'œuf. Les courbes ménothermiques de ces femmes sont souvent anormales : cycles courts, cycles longs avec phase lutéale inadaptée. Un traitement par induction de l'ovulation et soutien hormonal en phase lutéale peut être proposé.

2 - Etiologies immunologiques

Les causes immunologiques se divisent en 2 groupes : la pathologie autoimmune systémique et la réponse aberrante à la grossesse.

- La pathologie autoimmune systémique :

- Les maladies autoimmunes, lupus essentiellement, peuvent s'accompagner d'ASR.
- Il en est de même pour le syndrome primaire des anti-phospholipides évoqué dans ce cas précis devant des pertes fœtales répétées associées à une anomalie biologique (Ig G anti-cardiolipide à taux moyen ou élevé, Ig M anti-cardiolipide à taux moyen ou élevé , ou lupus anticoagulant), avec positivité des anti-phospholipides sur 2 tests à plus de 3 mois d'intervalle, en dehors d'un lupus.

- La réponse aberrante à la grossesse que nous allons détailler.

C - La réponse immunitaire maternelle aberrante à la grossesse

Au début des années 1980, un grand nombre d'ASR précoces restaient encore sans explication. Les progrès des connaissances en immunologie ont fourni de nouvelles voies de recherche.

Actuellement, deux hypothèses sont à évoquer. Les ASR pourraient être liés à une trop grande homologie des gènes parentaux ou à des autoanticorps maternels dirigés contre le placenta.

Au cours d'une grossesse normale, le fœtus peut être considéré comme une greffe semi-allogénique pendant neuf mois, puisque la moitié de son patrimoine génétique est étranger à la mère.

Les premières hypothèses permettant d'expliquer cette tolérance maternelle vis à vis de l'unité fœto-placentaire étaient que les réactions immunitaires, notamment les réactions de rejet de greffe, sont abolies pendant la grossesse. En fait il n'en est rien. (Schwarzenau, 1991) :

- L'utérus n'est pas un site immunologiquement privilégié, en ce sens que des expériences animales d'allogreffe utérine ont apporté la preuve que celles-ci sont rejetées
- Le fœtus, bien qu'immunologiquement immature, exprime différents systèmes antigéniques (Ag TLX, système mineur d'histocompatibilité,) susceptibles d'être reconnus et d'induire une réaction immunitaire.
- Le placenta, s'il s'oppose efficacement au passage des leucocytes maternels, n'empêche pas le passage des immunoglobulines, notamment des Ig G.

- La mère, bien que soumise aux effets immunosuppresseurs de certaines hormones spécifiques de la grossesse : progestérone, alpha fœtoprotéine, gonadotrophine chorionique humaine, est capable de se défendre, notamment contre des agents infectieux.

Quelles sont donc les raisons qui permettent d'expliquer l'absence de rejet de cette greffe semi-allogénique que constitue pendant neuf mois l'unité fœto-placentaire au cours d'une grossesse normale ?

1 - ASR et homologies de gènes parentaux

L'hypothèse actuelle est que l'UFP induit deux types de réponse :

- Une réaction de rejet.
- Une réaction immunitaire protectrice. Elle s'oppose habituellement au rejet de la grossesse.

Le préalable à ces réponses est la présentation et la reconnaissance d'Ag fœtaux par la mère.

Dans cette hypothèse, la survenue d'ASR dans un couple pourrait avoir une explication immunologique :

Une trop étroite compatibilité génique parentale pourrait déterminer chez le fœtus des combinaisons antigéniques inaptées à être reconnues par la mère, alors que des combinaisons materno-fœtales plus polymorphes seraient reconnues. Ces combinaisons materno-fœtales ayant une trop forte homologie, non reconnues comme étrangères par la mère n'induiraient pas la réponse immunitaire maternelle protectrice nécessaire à la préservation du fœtus; ainsi la fréquence des ASR serait une manifestation d'une pression de sélection génique permettant de

préserver le polymorphisme dans l'espèce... (Il faut admettre cependant qu'il y ait une reconnaissance de certains systèmes antigéniques qui permette d'induire une réponse immune néfaste.)

Quels sont les systèmes antigéniques impliqués ?

a - HL-A,-B,-DP,-DQ,-DR

Chez l'homme les études de compatibilité ont d'abord porté sur le système HLA. Les premiers résultats suggéraient qu'il existait une fréquence significativement augmentée de compatibilités HLA portant sur les molécules de classe I : HLA-A et B dans les couples présentant des ASR. Les études ultérieures ont soit infirmé soit confirmé ces résultats. La classe II était alors peu étudiée.

En 1990 une compilation des données de la littérature rapportait différents types de résultats (Voisin, 1990) :

- Le nombre d'antigènes HLA partagés par les deux parents est supérieur chez les couples étudiés présentant des ASR par rapport aux couples contrôles (2 Ag ou plus en commun : 50% / 22%).
- Les fréquences sont augmentées :
 - pour HLA-A de façon non significative,
 - pour HLA-B de façon significative,
 - pour la classe II, mais les séries sont trop petites pour conclure.

En 1987, une équipe française (Reznikoff-Etievant et al, 1987), étudie 129 couples ayant présenté au moins 3 ASR précoces avec le même partenaire, non expliqués, primaires ou secondaires. Le groupe témoin était constitué de 47 couples fertiles avec 2 enfants ou plus.

Les résultats montrent une augmentation non significative du nombre d'Ag HLA-A/B/DR partagés par les deux partenaires chez les couples malades par rapport aux témoins (3 à 6 Ag communs), et une élévation significative pour ce qui concerne HLA-DR.

Cependant, d'autres études publiées à l'époque n'apportent pas les mêmes conclusions, c'est la raison pour laquelle Reznikoff-Etievant rassemble en 1987, pour un colloque INSERM (Reznikoff-Etievant et al, 1987), les résultats de 21 études portant sur 1154 couples avec ASR et 1071 couples normalement fertiles :

Les conclusions sont identiques : Il existe une augmentation significative des homologies HLA-DR, et une augmentation des homologies HLA-B.

Des études récentes n'ont pas mis en évidence d'homologie significativement importante pour DP et DQ (Ober et al, 1993. Sagot et al, 1995).

b - HLA-G

Les produits du gène HLA-G sont exprimés à la surface trophoblastique, et une hypothèse postule qu'ils pourraient induire une réaction immunitaire protectrice, en stimulant la production par l'organisme maternel de facteurs contribuant à la tolérance fœtale. Il est possible d'imaginer, comme il a été fait précédemment avec HLA-A,-B,-DR, qu'une homologie des phénotypes parentaux HLA-G peut s'accompagner d'une non-reconnaissance des produits HLA-G sur le trophoblaste et de l'absence de tolérance immune vis à vis du fœtus. HLA-A et HLA-G se trouvant en déséquilibre de liaison sur le chromosome 6, l'homologie des phénotypes HLA-A décrite par certaines équipes chez des couples faisant des ASR pourrait n'être qu'un épiphénomène.

c - Autres systèmes antigéniques

D'autres systèmes antigéniques présents sur le trophoblaste sont probablement impliqués dans la tolérance maternofoetale et éventuellement dans les ASR, mais ils restent encore aujourd'hui mal connus : produits du Système Mineur d'Histocompatibilité, produits de gènes analogues à ceux du système Tt murin, antigènes TLX....

De ces connaissances est née l'idée d'une immunothérapie des ASR :

Au cours de la grossesse normale, des effecteurs nocifs pour le fœtus sont produits par la mère : lymphocytes T cytotoxiques et Ac cytotoxiques. Leurs effets sont anihilés par une réaction de facilitation favorable au maintien de la grossesse, dont les effecteurs sont, les uns non spécifiques (hCG, progestérone...), les autres spécifiques des Ag paternels (Ac facilitants, cellules suppressives).

Ces Ac facilitants, explorés par microlymphocytotoxicité et cytométrie de flux, inhiberaient normalement des effecteurs de rejet.

Contrairement aux femmes des couples fertiles, la majorité des femmes présentant des ASR ne développent pas d'anticorps anti-paternels anti-lymphocytes, probablement parce qu'elles sont insuffisamment stimulées par les antigènes foetaux d'origine paternels localisés sur le trophoblaste.

En raison de l'existence de réactivités croisées entre certains Ag placentaires et les lymphocytes, et de l'effet bénéfique des transfusions dans certaines greffes, des équipes ont proposé avec succès de provoquer une réponse immune facilitante en transfusant les femmes faisant des ASR et n'ayant pas d'Ac anti lymphocyte paternels avec les lymphocytes de leur partenaire (Reznikoff-Etievant, 1986). Ces thérapeutiques sont aujourd'hui abandonnées en

raison du risque viral, et remplacées par l'immunothérapie passive (veinoglobulines), ou par la corticothérapie.

2 - ASR et autoimmunité spécifique du placenta

Ces dernières années, les recherches se sont orientées vers l'hypothèse auto-immune. La question est posée de savoir si, dans la maladie abortive, le trophoblaste ne subirait pas des dommages liés à des mécanismes auto-immuns. On peut imaginer que des autoanticorps maternels reconnaissent des sites antigéniques trophoblastiques et ont un effet délétère.

De nombreuses maladies auto-immunes étant associées à des gènes de classe II, des travaux récents ont cherché à mettre en évidence une relation entre certains allèles HLA de classe II et ASR, ces allèles se comportant comme des facteurs de risque.

a - La région DP

La région DP semble ne jouer aucun rôle dans le développement de la grossesse. Aucun phénotype n'a été retrouvé avec une fréquence particulièrement élevée chez les couples faisant des ASR (Sagot, 1995).

b - La région DQ

Une étude américaine (Jin et al, 1995), portant sur 199 couples avec ASR, a comparé les fréquences alléliques d'HLA-DQ par rapport à un groupe témoin. Il n'a pas été mis en évidence de différence de fréquence allélique entre les 2 populations.

Les résultats d'un travail de Steck (Steck et al,1995), vont dans le même sens. Cet auteur a déterminé les fréquences des haplotypes DQA1/DQB1 chez 37 couples avec ASR, 40 de leurs fœtus avortés et 30 couples fertiles contrôles. Ces fréquences ne diffèrent entre les femmes malades, leur partenaire, les fœtus et les témoins. Ceci est vrai en particulier pour les haplotypes DQA1*501/DQB1*301 et DQA1*501/DQB1*201, respectivement liés à HLA-DR5 et DR3, qui sont considérés comme des facteurs de risque (cf infra).

Steck fait cependant une découverte étonnante : l'haplotype DQA1*201/DQB1*201 est retrouvé avec une fréquence supérieure à celle attendue chez les partenaires masculins de ces couples et chez leurs fœtus avortés, sans pouvoir rendre de conclusion.

c - La région DR

Les résultats concernant DR sont hétérogènes d'une équipe à l'autre :

Bellingard ne rapporte aucune spécificité particulière de DRB1 associée aux ASR, dans un travail comparant 25 couples malades et 21 couples sains (Bellingard et al,1995).

Dans une étude prospective originale, Christiansen a comparé les typages DR de 234 femmes danoises, de leurs sœurs, leurs frères, les femmes des frères, et suivi l'histoire obstétricale de ces femmes. Il observe une fréquence significativement augmentée de DR1 et DR3, qui semblent donc être des allèles prédisposant aux ASR (Christiansen et al, 1995).

Une autre étude prospective (Sbracia et al, 1996) met en évidence l'effet défavorable pour la survenue d'une grossesse de la combinaison HLA-B44/DR5, alors qu'aucun allèle DR n'est retrouvé avec une fréquence significativement élevée, ce qui suggère que des gènes influençant la reproduction pourraient être localisés entre HLA-B et HLA-DR.

Enfin, Sasaki mentionne une fréquence élevée de HLA-DR4 chez des femmes avec ASR, sans qu'elle puisse être rattachée à un sous-allèle particulier de DR4 (Sasaki et al, 1997).

Il semble ainsi possible que certains allèles DR soient des facteurs de risque pour les ASR, mais les résultats des études sont disparates. Il serait souhaitable d'explorer de plus grandes séries.

OBJECTIFS DE TRAVAIL

Notre premier objectif a été d'évaluer l'intérêt du phénotype HLA, et d'étudier une éventuelle implication du phénotype HLA-G dans la pathologie abortive. Nous avons pour cela mis au point une technique de PCR-RFLP pour l'étude du polymorphisme de HLA-G, en nous inspirant des recommandations de la douzième Workshop HLA, et des travaux de Morales.

Nous nous sommes, dans un deuxième temps, intéressé à l'histoire clinique des couples étudiés et aux examens paracliniques dont ils ont fait l'objet. Nous nous sommes demandé quel était l'apport du cross-match, tel qu'il est fait actuellement, dans le diagnostic étiologique de cette pathologie.

Enfin, nous nous efforçons de proposer une conduite pratique dans l'exploration des ASR, en ce qui concerne le bilan d'histocompatibilité.

MATERIELS ET METHODES

I - MATERIELS

A - Sujets sains

La population de sujets sains qui a servi de référence à notre étude était constituée de donneurs volontaires de moelle osseuse de la région Limousin, pris au hasard, non sélectionnés. Les échantillons de sang veineux périphérique ont été prélevés sur anticoagulant (citrate, EDTA, ou héparine). Pour chacun, le phénotypage HLA de classe I a été réalisé par la technique de microlymphocytotoxicité, celui de classe II par PCR-SSP, dans le laboratoire d'histocompatibilité de Limoges. Cette population nous a permis de valider les techniques de biologie moléculaire et d'évaluer la répartition des allèles HLA-G dans la population limousine.

B - couples témoins

La population de couples témoins était constituée de 17 couples de sujets sains, normalement fertiles, parents d'au moins deux enfants, dont le phénotypage HLA classique a été réalisé au laboratoire et pour lesquels nous avons réalisé le typage HLA-G.

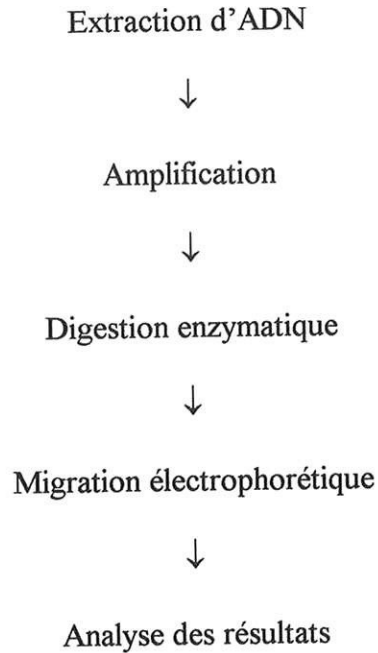
C - Couples malades

La population de couples malades était composée de 18 couples, adressés au laboratoire, ayant fait au moins 2 avortements spontanés à répétition au cours du premier trimestre de la grossesse, sans cause décelable : anatomique, chromosomique, autoimmune, infectieuse, endocrinienne, ni due à une maladie générale. Ils ont été phénotypés de la même façon que les couples sains.

II - METHODES

A - Mise au point d'une technique de PCR RFLP appliquée à la caractérisation du polymorphisme de HLA-G

La première partie de notre travail a consisté à mettre au point une technique de PCR-RFLP. Nous l'avons ensuite appliquée à l'analyse du polymorphisme de HLA-G chez des sujets sains de la région Limousin, des couples sains et des couples présentant des ASR.

PCR-RFLP

1 - Extraction de l'ADN génomique (Miller et al, 1988)

L'extraction de l'ADN génomique a été réalisée selon la technique d'extraction saline de Miller, à partir de 5 à 10 ml de sang veineux périphérique prélevé sur EDTA ou citrate.

- Centrifuger les tubes de sang pendant 10 minutes à 7000g à température ambiante.
- Transférer le buffy coat dans un tube conique de 15 ml et ajouter 10 ml de tampon de lyse (Sucrose 0,3M ; Tris-HCl 10mM pH 7,5 ; MgCl₂, 6 H₂O 5mM ; Triton 100X 1%). Mélanger doucement par inversion pendant 1 minute. Centrifuger pendant 10 minutes à 7000g à température ambiante.

- Eliminer le surnageant et resuspendre dans 10 ml de tampon de lyse. Agiter doucement par inversion pendant 1 minute et centrifuger pendant 10 minutes à 7000g à température ambiante.

- Eliminer le surnageant. Laisser le tube au repos pour laisser sédimenter. Aspirer l'excès de tampon de lyse. Resuspendre le culot dans

- 160 µl de tampon protéinase K (tampon protéinase K 5X : NaCl 0,375M ; EDTA 0,12M pH 8,0)
- 40µl de protéinase K (10 mg/ml, dissout dans de l'eau distillée)
- 40 µl de SDS à 20%
- 300 µl d'eau distillée

Transférer le volume final, ≈800µl, dans un tube eppendorf de 1,5 ml .

- Incuber la préparation dans un bain thermostaté à 37°C pendant une nuit.

- Refroidir le tube à température ambiante. Ajouter 200 µl de solution de NaCl 6M.

Mélanger vigoureusement pendant 30 secondes. Centrifuger pour précipiter les protéines pendant 10 minutes à 13000 tours/min. Transférer le surnageant dans un nouveau tube de 1,5 ml. Centrifuger pendant 10 minutes à 13000g.

- Diviser le surnageant dans 2 tubes eppendorf de 1,5 ml (≈ 450 µl par tube).

Ajouter 900 µl d'éthanol absolu. Après précipitation, transférer les 2 précipités d'ADN dans un tube eppendorf de 1,5 ml contenant 1 ml d'éthanol à 70 %. Centrifuger pendant 5 minutes à 13000 tours/min. Eliminer l'éthanol et laisser l'ADN à l'air sec.

- Dissoudre l'ADN dans 150 µl de tampon Tris EDTA (Tris HCl 1M pH 7,5 ; Na₂EDTA 0,5M pH 8,0). Vortexer. L'ADN ainsi extrait se conserve à 4°C .

La concentration d'ADN est mesurée par analyse en spectrophotométrie à la longueur d'onde 260 nm. Les bases absorbant fortement l'ultra-violet à 260 nm et sachant qu'une unité de densité optique à 260 nm équivaut à 50 µg/ml d'ADN, la concentration en ADN est donnée par la formule :

$$\text{DO 260} \times \text{facteur de dilution de l'ADN} \times 50 = \text{C}^\circ \text{ d'ADN en } \mu\text{g/ml}$$

Le degré de pureté de l'ADN est apprécié par le rapport :

$$R = \text{DO 260} / \text{DO 280}$$

Les protéines absorbant l'ultra-violet à 260 et 280 nm,

- si $R = 1,8$, l'ADN est pur
- si $R < 1,5$ ou $> 2,5$, il faut refaire l'extraction
- en pratique, on considère qu'un rapport voisin de 1,5 est acceptable.

2 - Amplification des exons 2 et 3 de HLA-G

a - Amorces

A partir de l'ADN génomique, nous réalisons 2 PCR. L'une amplifie l'exon 2, l'autre l'exon 3. Pour chacune de ces PCR, nous avons utilisé un couple d'amorces locus spécifiques.

PCR	Amorces	Cible	Taille des amplicons
PCR Exon 2	G 25' & G 23'	Exon 2	281 pb
PCR Exon 3	G 35' & G 33'	Exon 3	276 pb

Nom de l'amorce	Séquence nucléotidique	Nombre de paires de bases	Tm
G 25'	TCCATGAGGTATTCAGCGC	20	60°C
G 23'	CTGGGCCGGAGTTACTCACT	20	64°C
G 35'	CACACCCTCCAGTGGATGAT	20	62°C
G 33'	GGTACCCGCGCGCTGCAGCA	20	70°C

b - Mélange réactionnel

Chaque amplification est réalisée dans un volume réactionnel de 25 µl comprenant :

- Tampon Taq Appligène® Oncor® (Tris HCl 10 mM pH 8,4 ; KCl 50 mM ; MgCl₂ 1,5 mM ; Gélatine 0,2 mg /ml ; TritonX100 0,1%)

- Taq Polymérase Appligène® Oncor® : 0,03 u/μl
- dNTP à 200 μM (Pharmacia®)
- Amorces : G 25' , G 23' ;G 35' , G 33' : 0,5μM
- ADN : 1μg

c - Programme d'amplification

Les réactions PCR sont réalisées sur un thermocycleur PERKIN ELMER 9600 , selon les conditions opératoires suivantes (annexe 6) :

- 1 cycle n°1 :

phase de dénaturation initiale de l'ADN :

94°C 2 minutes

- 30 cycles n°2 :

phase de dénaturation :

96°C 15 secondes

phase d'hybridation des amorces :

55°C 15 secondes

phase d'élongation :

72°C 1 minute

- 1 cycle n°3 :

phase d'élongation terminale :

72°C 5 minutes

Chaque série d'amplification a comporté un témoin négatif de PCR où l'échantillon d'ADN est remplacé par un volume d'eau stérile.

d - Contrôle d'amplification

L'amplification des fragments d'ADN est contrôlée par une migration électrophorétique sur un gel d'agarose à 1,2% en tampon TBE (Tris-Borate EDTA) contenant 0,6 µg de bromure d'éthidium. 5µl de produit d'amplification mélangés à une solution de bleu de bromophénol sont déposés dans chaque puits. Après une migration sous 170 volts pendant 20 minutes, les bandes sont visualisées par transillumination en lumière ultraviolette, et comparées aux bandes obtenues avec le marqueur de poids moléculaire n°VIII de Boehringer Mannheim®.

3 - Digestion enzymatique

Après amplification les produits PCR exon 2 sont digérés pendant 3 heures avec les enzymes de restriction MspI (Pharmacia Biotech®) d'une part, et HinfI (Pharmacia Biotech®) d'autre part ; les produits PCR exon 3 avec l'enzyme de restriction AclI (Promega) .

Les sites reconnus par les enzymes de restriction sont les suivants :

MspI	C/CGG
HinfI	G/ANTC
AclI	G/CGC

- Digestion des produits d'amplification de l'exon 2 par MspI :

Dans un tube eppendorf, on ajoute, à 10µl de produit PCR, 10 µl du mélange :

- Tampon One-Phor-All Buffer : Tris-acétate 10 mM pH 7,5 ; Acétate de Mg 10 mM, Acétate de K 50 mM.
- Enzyme : 5 unités

Le tube est incubé pendant 3 heures dans un bain thermostaté à 37°C.

- Digestion des produits d'amplification de l'exon 2 par HinfI

Les conditions sont identiques aux précédentes. Seule change la quantité d'enzyme : 2,5 unités.

- Digestion des produits d'amplification de l'exon 3 par AcyI

Dans un tube eppendorf, on ajoute, à 10µl de produit PCR, 10 µl du mélange :

- Tampon F : Tris-HCl 10 mM pH 8,5 ; NaCl 100mM ; MgCl₂ 10 mM ; DTT 1mM.
- BSA : 0,1 mg/ml
- Enzyme : 2,5 unités

Le tube est incubé pendant 3 heures dans un bain thermostaté à 37°C.

La digestion des produits PCR par les enzymes de restriction est révélée par une migration électrophorétique sur un gel d'agarose Nusieve (Tébu®) à 3%, en tampon TBE contenant 0,6 µg de bromure d'éthidium. On dépose 17 µl de produit de digestion mélangé à 3µl de bleu de bromophénol dans chaque puits . Après une migration sous 170 volts pendant 45 minutes, on

visualise les bandes par transillumination en lumière ultraviolette. On les compare aux bandes obtenues avec le marqueur VIII de poids moléculaire de Boehringer Mannheim®.

4 - Séquençage

Nous avons voulu vérifier que les produits amplifiés étaient bien les exons 2 et 3 d'HLA-G. Pour cela, les produits d'amplification de l'exon 2 et de l'exon 3 de HLA-G de 2 sujets homozygotes ont été séquencés. Le séquençage a été réalisé selon la méthode des didéoxynucléotides de Sanger (Sanger et al, 1987). Le principe en est l'interruption de la polymérisation d'un brin d'ADN grâce à la substitution d'un groupement hydroxyle par un atome d'hydrogène sur un déoxynucléotide, ce qui empêche la formation de liaisons phosphodiester, et par conséquent l'élongation de l'ADN.

Dans notre technique, une première PCR de l'exon 2 ou de l'exon 3 est réalisée, selon la méthode décrite précédemment. Après migration en gel d'agarose, les produits d'amplification sont extraits grâce au kit QIAquick Gel Extraction Kit de QIAGEN®, selon les recommandations du fabricant. Une seconde PCR : PCR de séquence est réalisée sur les produits amplifiés récupérés, avec les mêmes amorces et un mélange de dNTP et de didéoxynucléotides fluorescents en faible quantité : kit Dye Deoxy Terminator de Perkin- Elmer®). Dès qu'un déoxynucléotide est incorporé, la synthèse d'ADN s'arrête. Présents en faible quantité, ils s'incorporent rarement, mais au hasard. Ainsi, les différents produits avortés auront toutes les tailles possibles comprises entre celle de l'amorce et le produit d'amplification complet. Les produits d'amplification sont analysés par un séquenceur (ABI PRISM 310 de Perkin- Elmer®).

B - Phénotypage HLA-A et -B par microlymphocytotoxicité

Les tests ont été réalisés au laboratoire d'Histocompatibilité de Limoges.

La lymphocytotoxicité dépendante du complément est actuellement la technique la plus utilisée pour le groupage HLA de classe I et est considérée la technique de référence.

Le principe de cette méthode repose sur la capacité d'un anticorps à reconnaître un déterminant antigénique sur la membrane d'une cellule cible. La réaction antigène-anticorps va activer le complément qui va conduire à la lyse de la cellule cible.

La recherche d'un antigène HLA se fait sur des lymphocytes du sang périphérique isolés sur un gradient de Ficoll. Le sang prélevé sur un anticoagulant (héparine) est déposé sur une phase de Ficoll de densité 1.077. Après centrifugation, les globules rouges et les polynucléaires neutrophiles se situent au dessous du Ficoll alors que les lymphocytes, les monocytes et les plaquettes se situent à l'interface Ficoll-plasma.

Dans un premier temps, la suspension lymphocytaire est incubée en présence d'un immun-sérum. Dans un second temps, on ajoute le complément de lapin qui va agir pendant 60 minutes.

Enfin, est ajouté un colorant vital (bleu trypan, éosine ou acridine orange) qui va pénétrer dans les cellules mortes mais pas dans les cellules vivantes.

La lecture de la lyse se fait à l'aide d'un microscope inversé. On évalue la proportion de cellules mortes par rapport aux cellules vivantes.

Le résultat est donné selon les normes internationales :

< 10% de cellules mortes =1

10 à 20% de cellules mortes =2

20 à 50% de cellules mortes =4

50 à 75% de cellules mortes =6

> 75% de cellules mortes =8

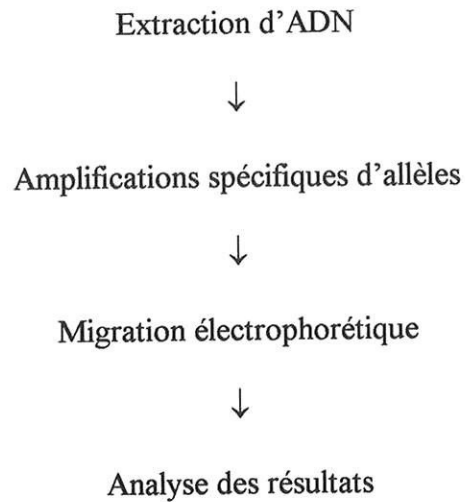
Un résultat inférieur ou égal à 2 est négatif.

Un résultat supérieur ou égal à 6 est positif.

Les réactions intermédiaires sont douteuses.

C - Phénotypage HLA-DR/DQ par PCR-SSP (SSP : sequence specific primers), (Olerup, 1994)

La technique utilisée au laboratoire pour étudier le phénotype HLA-DR et DQ est la PCR-SSP décrite par Olerup. Elle est fondée sur l'existence de séquences uniques dans de nombreux allèles des gènes de classe II. A l'intérieur de ces séquences uniques sont sélectionnées des amorces pour la PCR (un couple d'amorces par allèle à étudier). On réalise autant de réactions PCR qu'on a de couples d'amorces et donc de spécificités alléliques à rechercher. La présence ou l'absence de produit d'amplification pour chaque réaction PCR et leur taille éventuelle sont recherchées par migration électrophorétique Les résultats sont ensuite analysés : une PCR positive avec un couple d'amorces signe la présence d'un allèle, sa négativité signe son absence.

PCR-SSP

D - Recherche d'auto-immunisation et d'allo-immunisation chez les femmes des couples malades

Chez les femmes des couples malades, sont recherchés, en dehors de la grossesse :

- des anticorps cytotoxiques, dirigés contre des spécificités HLA, par technique de microlymphocytotoxicité dépendante du complément, en mettant en présence le sérum de la femme et un panel de 30 lymphocytes de phénotype HLA de classe I connu.
- des allo-anticorps dirigés contre les lymphocytes du conjoint, grâce à deux techniques : la microlymphocytotoxicité dépendante du complément, à 22°C , en

étudiant la réactivité des sérums maternels vis à vis des lymphocytes totaux, T et B (séparés par tri sur billes magnétiques) du partenaire; et la cytométrie de flux, qui recherche de même des anticorps maternels dirigés contre les lymphocytes totaux du conjoint ou contre ses lymphocytes T. C'est ce que l'on nomme cross-match en termes anglo-saxons.

- des auto-anticorps maternels anti-lymphocytes totaux, anti-lymphocyte T, et B, par ces mêmes techniques.

La cytométrie de flux, qui s'est beaucoup développée ces dernières années, est devenue la technique de référence pour l'étude du cross-match, dans cette pathologie. Elle permet de mettre en évidence des Ac non détectés par les techniques conventionnelles (La microlymphocytotoxicité ne permet pas de mettre en évidence les anticorps non cytotoxiques.), et sa sensibilité est supérieure. Reste, cependant, le problème du cross-match B, non réalisé en CMF, en cours d'évaluation : son interprétation est rendue difficile du fait de l'existence d'immunoglobulines de surface sur les lymphocytes B. (Bray et al, 1989 ; Mahoney et al, 1990)

La technique du cross-match en CMF est la suivante :

- Incubation des cellules de la femme avec le sérum du conjoint

Les lymphocytes totaux isolés sur gradient de Ficoll sont fixés sur plaque de microtitration. Le sérum à tester est ajouté, et le tout est incubé à 22°C pendant 20 minutes.

- Révélation par l'antiglobuline humaine

Après lavage et séchage, l'antiimmunoglobuline humaine de chèvre couplée à la FITC (Capel®) est rajoutée, et incubée à 4°C durant 20 minutes. Les plaques sont à nouveau lavées et séchées.

- Différenciation des lymphocytes T

Un anticorps anti CD3 couplé à la phycoérythrine est ensuite rajouté. Après incubation et lavage, le culot est resuspendu en paraformaldéhyde 1%.

- Analyse en cytométrie de flux

L'analyse est faite sur un programme de double fluorescence, et les résultats sont analysés grâce à un système informatique.

E - Statistiques

La fréquence des allèles HLA-A, B et G est calculée par comptage direct en tenant compte de la présence des deux haplotypes

La comparaison des fréquences dans les couples témoins et les couples patients est mesurée par un test de χ^2 ou par le test exact de Fisher quand approprié sur le logiciel EPITABLE.

Le déséquilibre de liaison entre HLA-A et HLA-G a pu être établi à partir des sujets homozygotes pour HLA-G

RESULTATS

I - MISE AU POINT D'UNE TECHNIQUE DE PCR-RFLP POUR L'ETUDE DU POLYMORPHISME DE HLA-G

Nous avons mis au point une technique de PCR-RFLP pour l'étude du polymorphisme de HLA-G, en nous inspirant des travaux de Morales et des recommandations de la douzième Workshop HLA. Il nous a fallu déterminer les conditions opératoires optimales pour l'appareil de PCR utilisé au laboratoire.

La population de sujets sains limousins donneurs de moelle nous a permis de valider cette technique et de calculer les fréquences des différents allèles et phénotypes.

Les produits d'amplification de 2 sujets homozygotes pour HLA-G ont été séquencés, ce qui nous a permis de valider les séquences de HLA-G. Nous amplifions effectivement les exons 2 et 3 de ce gène.

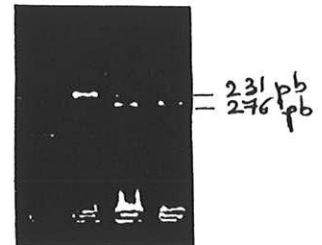
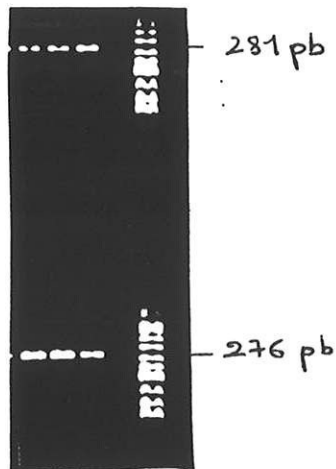


Photo du haut : Résultats des PCR exon 2 (en haut) et exon 3 (en bas). Les pistes 1, 2 et 3 correspondent aux patients, la piste 4 correspond au blanc PCR et la piste 5 au marqueur de taille (PM VIII).

Photo du bas : Différents profils de digestion .

A gauche : digestion de l'exon 2 par MspI. Piste 1 : PM VIII, piste 2 : profil 30+113+125+238, piste 3 : profil 30+113+125 et piste 4 : profil 30+238.

Au centre : digestion de l'exon 2 par HinfI. Piste 1 : PM VIII, piste 2, 3 et 4 : profil 106+175.

A droite : digestion de l'exon 3 par AclI. Piste 1 PM VIII, piste 2 : profil 45+231, piste 3 : profil 45+231+276 et piste 4 : profil 276.

A - Fréquence des allèles HLA-G

Dans la population caucasienne limousine étudiée, nous n'avons observé que les allèles GI, GII et GIV avec les fréquences suivantes :

GI	32/80	40 %
GI	40/80	50 %
GIV	8/80	10 %

B - Fréquence des phénotypes

Les phénotypes observés sont :

GI/GI	6/40	15%
GI/GII	17/40	42,5 %
GI/GIV	3/40	7,5 %
GII/GII	10/40	25 %
GII/GIV	3/40	7,5 %
GIV/GIV	1/40	2,5 %

C - Déséquilibre de liaison entre HLA-A et HLA-G

En analysant les phénotypes HLA-A des sujets homozygotes pour HLA-G dans la population de référence, il a été possible de déduire les déséquilibres de liaison entre HLA-A et HLA-G. Les mêmes déséquilibres ont été observés dans les autres populations. Seuls les allèles HLA-A11, A28, A30 et A33 peuvent être associés à plusieurs allèles HLA-G.

N°	FLM	GENOTYPE HLA G	GROUPE CLASSE I
1	1423	GI GII	A1 3 B8 49
2	1770	GII GII	A1 B8 39
3	1825	GI GII	A2 24 B7 35
4	1848	GI GII	A2 24 B51 62
5	1871	GII GIV	A11 24 B18
6	1874	GII GII	A1 24 B51 57
7	1875	GI GII	A24 B14 60
8	1876	GII GII	A24 B35 62
9	1877	GI GII	A1 29 B7 44
10	1878	GI GII	A2 32 B7 13
11	1952	GII GIV	A11 24 B7 35
12	1954	GI GIV	A2 B7 44
13	1955	GI GI	A3 11 B44 62
14	1958	GI GII	A1 2 B58 60
15	1959	GI GI	A2 31 B7 57
16	1960	GI GII	A3 26 B35 61
17	1961	GII GII	A1 68 B8 44
18	1964	GII GII	A1 31 B44 62
19	1965	GI GI	A2 B44 62
20	1968	GII GIV	A11 32 B35 51
21	1969	GII GII	A23 24 B35 62
22	1970	GI GII	A2 68 B14 51
23	1971	GII GII	A1 24 B8 61
24	1973	GI GII	A2 32 B35 65
25	1974	GIV GIV	A11 B7
26	1976	GI GII	A2 30 B8 13
27	1978	GI GII	A1 2 B47 51
28	1979	GI GIV	A11 24 B35 51
29	1980	GI GIV	A2 11 B51 55
30	1981	GI GII	A2 24 B49 62
31	1982	GI GII	A2 24 B8 27
32	1983	GI GI	A30 33 B18 57
33	1984	GII GII	A1 24 B8 62
34	1989	GI GII	A1 24 B8 56
35	1990	GI GI	A2 B7 49
36	1992	GII GII	A1 23 B8 49
37	1993	GI GII	A24 29 B8 51
38	1994	GI GII	A2 26 B38
39	1995	GII GII	A1 23 B44 62
40	1996	GI GI	A2 3 B27 44

Tableau 1 : Population de référence

ALLELE HLA-A	ALLELE HLA-GI	ALLELE HLA-GII	ALLELE HLA-GIII	ALLELE HLA-GIV
A1		8		
A2	4			
A28		1		
A3	2			
A23		3		
A24		5		
A30	1	1		
A3	2			
A11	1			1

Tableau 2a : Déséquilibre de liaison HLA-A/HLA-G chez les sujets sains.

ALLELE HLA-A	ALLELE HLA-GI	ALLELE HLA-GII	ALLELE HLA-GIII	ALLELE HLA-GIV
A1		2		
A2	14			
A3	3			
A28	1	2		
A24		5		
A29	5			
A30	3	2		
A32	1			
A33	12			
A26		1		

Tableau 2b : Déséquilibre de liaison HLA-A/HLA-G chez les couples sains témoins.

ALLELE HLA-A	ALLELE HLA-GI	ALLELE HLA-GII	ALLELE HLA-GIII	ALLELE HLA-GIV
A1		3		
A2	10			
A28		3		
A24		5		
A29	2			
A32	1			
A33		1		
A26		1		

Tableau 2c : Déséquilibre de liaison HLA-A/HLA-G chez les couples ASR.

II - ETUDE DES PHENOTYPES DES COUPLES PRESENTANT DES ASR

Le polymorphisme d'HLA-G étant établi, nous avons appliqué la technique mise au point au phénotypage des couples présentant des ASR et aux couples sains.

Les résultats des phénotypages sont présentés dans les tableaux 3 et 4.

Nous avons étudié les fréquences alléliques chez les femmes malades et les femmes saines ; ainsi que les fréquences phénotypiques dans les 2 populations.

N°	GENOTYPE HLA G	GROUPE CLASSE I	GROUPE CLASSE II
1M	GI GI	A2 B44 /A2 B35	DR 14/13 DQ 503/603
1 F	GI GI	A2 B44 /A33 B27	DR 4/11 DQ 301/302
2M	GI GI	A29 B13 /A- B7	DR 11/13 DQ 301/603
2 F	GI GI	A30 B18 /A2 B44	DR 3/13 DQ 201/603
3M	GI GII	A2 B18 /A34 B51	DR 13/14 DQ 503/603
3 F	GI GI	A2 B7 /A32 B60	DR 4/13 DQ 301/603
4M	GI GI	A3 B51 /A29 B44	DR 7/14 DQ 202/503
4 F	GI GII	A3 B38 /A24 B49	DR 11/14 DQ 301/503
5M	GI GII	A33 B44/A2 B39	DR 11 DQ 301
5 F	GII GII	A30 B13 /A24 B51	DR 4/7 DQ 201/302
6M	GII GII	A1 B60 /A24 B44	DR 15/13 DQ 602/603
6 F	GII GII	A26 B61 /A68 B35	DR 4/11 DQ 301
7M	GII GII	A1 B44 /A30 B50	DR 1/4 DQ 501
7 F	GI GII	A2 B44 /A24 B18	DR 3/13 DQ 201/604
8M	GI GII	A3 B27 /A24 B7	DR 3/11 DQ 201/301
8 F	GI GII	A3 B37 /A23 B44	DR 4/11 DQ 301
9M	GI GII	A3 B18 /A24 B62	DR 3/8 DQ 201/402
9 F	GI GI	A29 B44 /A30 B8	DR 3/7 DQ 201/202
10M	GI GI	A2 B44 /A2 B63	DR 4 DQ301/302
10 F	GI GI	A29 B44 /A2 B49	DR 15/7 DQ 202/602
11M	GI GII	A3 B14 /A24 B18	DR 4 DQ 301/302
11 F	GI GII	A23 B44 /A2 B56	DR 4/7 DQ 202/302
12M	GII GII	A28 B51 /A24 B38	DR 11/13 DQ502/603
12 F	GI GI	A2 B49 /A2 B14	DR 13 DQ 301/603
13M	GI GI	A28 B18 /A2 B44	DR 11/13 DQ502/603
13 F	GI GI	A2 B40 /A3 B7	DR 7/15 DQ 202/602
14M	GII GII	A24 B63 /A24 B27	DR 11/13 DQ 301/604
14 F	GI GI	A2 B51 /A33 B14	DR 1 DQ 501
15M	GII GII	A9 B5 B35	DR 1/7 DQ 301/303
15 F	GI GI	A3 30+31 B8 27	DR 1/3 DQ 201/501
16M	GII GIV	A1 11 B17 44	DR 7/15 DQ 201/603
16 F	GI GI	A2 29 B15 44	DR 4/13 DQ 301/603
17M	GI GII	A3 B7 44	DR 11/15 DQ 301/602
17 F	GI GII	A2 9 B35 44	DR 4/7 DQ 201/302

Tableau3: Couples sains

N°	GENOTYPE HLA G	GROUPE CLASSE I	GROUPE CLASSE II
1M	GII GII	A1 28 B8 44	DR 1/15 DQ 5/6
1 F	GI GII	A2 24 B18 62	DR 4/17 DQ 2/8
2M	GI GI	A2 32 B50 62	DR 11/14 DQ 7/5
2 F	GI GI	A2 B51 62	DR 11/15 DQ 6/7
3M	GII GII	A1 24 B8 35	DR 11/17 DQ 2/7
3 F	GI GII	A2 24 B44 60	DR 4/11 DQ 7
4M	GII GII	A24 33 B18 65	DR 1/4 DQ 5/8
4 F	GI GI	A2 29 B44 61	DR 11/13 DQ 6/7
5M	GII GII	A24 B58 62	DR 11/17 DQ 2/7
5 F	GI GII	A24 29 B38 61	DR 4/11 DQ 7/8
6M	GI GII	A3 24 B44 56	DR 1/15 DQ 5/6
6 F	GI GII	A3 24 B44 51	DR 12/13 DQ 6/7
7M	GII GIV	A1 11 B39 51	DR 1/11 DQ 5/7
7 F	GII GIV	A11 24 B35 37	DR 1/9 DQ 5/9
8M	GI GII	A24 32 B7 40	DR 10/15 DQ 5/10
8 F	GI GI	A2 B18 44	DR 4/17 DQ 2/7
9M	GI GII	A2 3 B35 62	DR 4/7 DQ 8/9
9 F	GI GII	A3 33 B8 14	DR 4/7 DQ 2/8
10M	GI GII	A2 30+31 B18 49	DR 4/17 DQ 2/8
10 F	GI GII	A2 32 B50 60	DR 4/13 DQ 7
11M	GI GII	A2 26 B14 62	DR 7/14 DQ 2/5
11 F	GI GIV	A1 11 B8	DR 1/13 DQ 5/9
12M	GI GII	A23 28 B44 49	DR 11 DQ 7
12 F	GI GII	A3 24 B15 35	DR 7/8 DQ 2/7
13M	GI GII	A2 29 B35 44	DR 1/7 DQ 2/5
13 F	GI GII	A2 11 B7 17	DR 7/15 DQ 6/9
14M	GI GII	A24 25 B7	DR 8/13 DQ 4/6
14 F	GI GII	A2 29 B44	DR 7/11 DQ 2/7
15M	GI GI	A2 29 B44 61	DR 7/17 DQ2
15 F	GI GI	A2 B7 27	DR 1/11 DQ 5/7
16M	GI GII	A2 3 B13 62	DR 7/14 DQ 2/7
16 F	GI GII	A1 29 B44 52	DR 7/15 DQ 2/6
17M	GI GI	A2 3 B7 18	DR 11/15 DQ 6/7
17 F	GII GII	A1 68 B8 14	DR 7/17 DQ2
18M	GII GII	A24 68 B44 62	DR 11/17 DQ 2/7
18 F	GI GII	A3 B14 62	DR 7/13 DQ 2/6

Tableau4:

Couples avec ASR

A - Fréquences des allèles HLA-G

ALLELES	HLA-GI	HLA-GII	HLA-GIII	HLA-GIV
FEMMES SAINES	25/34 : 73,5%	9/34 : 26,4%	0/68 : 0%	0/68 : 0%
FEMMES MALADES	20/36 : 55,5%	14/36 : 38,9%	0/72 : 0%	2/36 : 5,5%

B - Fréquences des phénotypes

PHENOTYPES	COUPLES SAINS	COUPLES PATIENTS
GI/GI	15/34 : 44,1%	7/36 : 19,4%
GI/GII	11/34 : 32,4%	20/36 : 55,6%
GI/GIV	0/34 : 0%	1/36 : 2,8%
GII/GII	7/34 : 20,6%	6/36 : 16,7%
GII/GIV	1/34 : 2,9%	2/36 : 5,6%

C - Etude des homologies de phénotypes parentaux pour HLA-A, -B, -DR, DQ et -G

Partant de l'hypothèse que les ASR sont peut-être dus à une trop grande homologie des phénotypes parentaux, nous avons comparé les fréquences des différents phénotypes HLA-A,-B, -DR, -DQ et -G dans les deux populations de couples.

1 - HLA-A

	Nombre de couples ayant 0 allèle identique	Nombre de couples ayant 1 ou plusieurs allèles identiques
Couples ASR	10	8
Couples sains	11	6

2 - HLA-B

	Nombre de couples ayant 0 allèle identique	Nombre de couples ayant 1 ou plusieurs allèles identiques
Couples ASR	15	3
Couples sains	12	5

3 - HLA de classe I (-A et-B)

	Nombre de couples ayant 0 allèle identique	Nombre de couples ayant 1 ou plusieurs allèles identiques
Couples ASR	8	10
Couples sains	8	9

4 - HLA-DR

	Nombre de couples ayant 0 allèle identique	Nombre de couples ayant 1 ou plusieurs allèles identiques
Couples ASR	10	8
Couples sains	10	7

5 - HLA-DQ

	Nombre de couples ayant 0 allèle identique	Nombre de couples ayant 1 ou plusieurs allèles identiques
Couples ASR	8	10
Couples sains	9	8

6 - HLA de classe II (-DR et -DQ)

	Nombre de couples ayant 0 allèle identique	Nombre de couples ayant 1 ou plusieurs allèles identiques
Couples ASR	6	12
Couples sains	9	8

7 - HLA-G

	Nombre de couples ayant 0 allèle identique	Nombre de couples ayant 1 ou plusieurs allèles identiques
Couples ASR	2	16
Couples sains	3	14

Qu'il s'agisse des loci A et B, DR et DQ, pris ensemble ou séparément, ou G, ni les tests de Chi² ni les tests de Fisher quand appropriés n'ont montré de différence significative entre les populations de couples sains et de couples malades.

**D - Recherche d'un allèle HLA-A, -B, -DR ou -DQ exposant au risque d'ASR
chez les partenaires féminines des couples présentant des ASR**

La seconde hypothèse émise était que les ASR pourraient être liés à des phénomènes autoimmuns, et que certains allèles HLA pourraient être des facteurs de risque exposant aux ASR.

Nous avons observé les fréquences génotypiques des allèles de HLA-A, -B, -DR, -DQ chez les femmes des couples pathologiques ; nous les avons comparées à celles des donneurs de moelle de sexe féminin.

Notre attention a été attirée par les allèles suivants : A24, B44, DR4 et DR11.

- La fréquence du gène A24 est de 16,67% chez les 18 femmes étudiées, alors qu'elle est de 4,76% chez 168 femmes du don de moelle de la région Limousin.

- Pour B44, nous obtenons 19,44% contre 14,29%,

- Pour DR11, 16,67% contre 9,87%,

- Pour DR4, 13,89% contre 9%.

- Pour DRB1*0301, 33,33% contre 22,84% (DR4 et DR11 sont en déséquilibre de liaison avec DRB1*0301)

L'analyse statistique de ces résultats n'a pas mis en évidence de fréquence allélique significativement augmentée.

Annexe : fréquence des génotypes HLA dans la population limousine des donneurs de moelle en %
par rapport à celles observées chez les femmes présentant des ASR

A1 : 13,1/8,3	B7 : 7,7/5,6	DR1 01 : 12,3/5,5	DQ1 301 : 22,8/33,3
A2 : 32,2/25	B8 : 8,3/8,3	DR1 0103 : 1,2/2,25	DQ1 302 : 4,3/8,3
A3 : 8,3/11,1	B13 : 1,8/0	DR1 0301 : 12,3/8,4	DQ1 303 : 3,7/8,3
A11 : 6/8,3	B14 : 6,6/5,6	DR1 04 : 9/13,9	DQ1 501 : 15,4/8,3
A23 : 1,8/0	B15 : 0/2,8	DR1 0701 : 23,5/19	DQ1 502 : 3,1/0
A24 : 4;8/16,7	B17 : 0/2,8	DR1 08 : 5,5/2,3	DQ1 601 : 0/2,3
A25 : 3/0	B18 : 7,8/5,6	DR1 09 : 0/2,3	DQ1 602 : 8/5,5
A26 : 3,6/0	B27 : 7,7/2,8	DR1 0901 : 2,5/0	DQ1 603 : 6,1/8,3
A29 : 8,3/11,1	B41 : 0,6/0	DR1 1001 : 0,6/0	DQ1 604 : 1,8/0
A32 : 3,6/5,6	B44 : 14,3/19,5	DR1 11 : 19/16	DQ1 201 : 11,7/8,3
A30 : 1,8/0	B45 : 0,6/0	DR1 : 12 : 1,9/2,5	DQ1 402 : 4,9/0
A33 : 2,4/2,8	B49 : 3,6/0	DR1 1301 : 6,2/13,9	DQ1 503 : 4,3/0
ABL : 7,1/8,3	B50 : 2,4/5,5	DR1 1302 : 2,5/0	DQ1 202 : 11,7/16,6
A28 : 1,8/0	B51 : 6/2,8	DR1 1303 : 1,2/0	
A68 : 1,2/2,8	B52 : 1,2/2,8	DR1 14 : 5/0	
	B55 : 3,6/0	DR1 15 : 8/8,3	
	B56 : 0,6/0	DR1 16 : 3,1/0	
	B57 : 3,6/0	DR1 407 : 0,6/0	
	B62 : 6/8,3	DR1 401 : 7,4/2,6	
	B63 : 0,6/0	DR1 405 : 0,6/0	
	BBL : 3,57/5,6	DR1 403 : 0,6/0	
	B35 : 5,4/5,6	DR1 402 : 0,6/0	
	B39 : 2,4/0	DR1 404 : 0,6/0	
	B60 : 1,8/5,6	DR1 408 : 1,2/0	
	B40 : 1,8/0	DR1 1101 : 7,4/0	
	B61 : 0,6/2,8	DR1 010 : 0,6/0	
	B47 : 0,6/0	DR1 1103 : 1,2/0	
	B48 : 0,0/0	DR1 1102 : 0,6/0	
	B31 : 0/2,8	DR1 1115 : 0,6/0	

III - ETUDE DE L'HISTOIRE CLINIQUE DES COUPLES PRESENTANT DES ASR ET DES RESULTATS DES CROSS-MATCHS

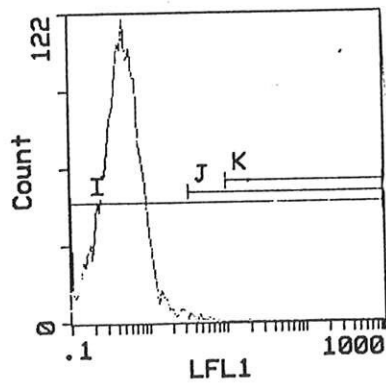
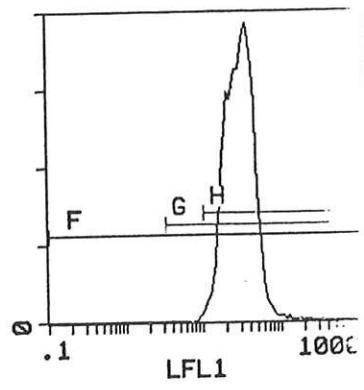
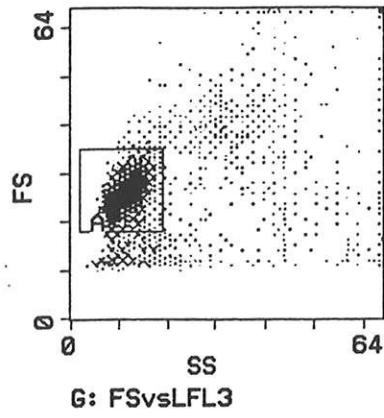
Nous avons pu obtenir des renseignements sur tous les couples, excepté les couples 5 et 9.

Par souci de synthèse, nous avons résumé l'ensemble des données dans le tableau suivant :

évènements de la vie obstétricale (AS, γ , stérilité, GEU, IVG...) ; anomalies du bilan paraclinique, notamment autoimmun, résultats des cross-match ; traitements qui ont suivi le bilan d'ASR, notamment corticothérapie ou veinoglobulines après cross-match négatif ; et évolution obstétricale.

COUPLE	HISTOIRE	BILAN	CROSS-MATCH	TTT & EVO°
1	1 ivg, 1 γ avec le même partenaire, 2 ASR : 1précoce et 1 tardif	DID équilibré, Ac. antinoy. anticentromère retrouvé à taux faible à 1 pvt sur 2	N	γ de 5 mois sans ttt
2	Stérilité primaire traitée par stimulation de l'ovulation et IAC, 2 ASR précoces	Ac. antinoy. nucléolaire trouvé 2x à taux non significatif, ac. antiDNA natif trouvé 1x faible, Problème de qualité de sperme, Ovulation précoce	P	γ de 6 mois après FIV et corticothérapie
3	4 ASR précoces	infection masculine à Chlamydia Dysovulation avec insuffisance progestéronique Sd. des APL	N	γ de 5 mois après ttt par aspirine et corticothérapie
4	1 AS précoce	Ac. antiDNA natif trouvé 1x faible, C3 C4 CPLM un peu élevés 1x	N	Corticothérapie, aspirine si γ
6	1 AS tardif	Caryotype anormal sans incidence sur la γ , Ac. antinoy. et APL à taux faible sur 1 pvt.	N	1 enfant après ttt par corticothérapie et aspirine
7	2 ASR précoces dont 1 à œuf clair	Caryotype anormal sans incidence sur la γ , Sd des APL	P	1 enfant après ttt par corticothérapie et aspirine
8	3 ASR précoces	Hyperinsulinisme fonctionnel, Problème de qualité de sperme	N	1 enfant après ttt par corticothérapie et aspirine
10	Stérilité primaire traitée par IAC et FIV, 2 ASR précoces dont 1 à œuf clair	Dysovulation, Myome utérin opéré, Problème de qualité de sperme, Ac. antinoy. et ac antiDNA natif retrouvés sur 1 pvt. À taux faible	N	γ de 5 mois après ttt ?
11	2 enfants d'un 1 ^{er} partenaire 2 ASR précoces avec le partenaire actuel	Ovulation tardive, Problème de qualité de sperme, Ac. antinoy. à taux faible trouvé 1x, CPLM un peu élevé sur 1 pvt.	N	γ de 5 mois après ttt par veinoglobulines
12	2 ASR précoces	Ac. anticardioplipide à plusieurs reprises	N	corticothérapie et aspirine
13	2 ASR précoces	Caryotype féminin 46XX/45XO, Ac. anticardioplipide, ac. antinoy., ac. anti β 2GPI avant et pendant la γ à taux fluctuants (1 pvt./mois)	N	1 enfant après ttt par corticothérapie et aspirine
14	2 ASR : 1précoce, 1 tardif	Endométriose Kyste ovarien Sd des APL	P	γ de 2 mois après ttt par aspirine et corticothérapie
15	2 ASR précoces, 1 enfant, 1 AS précoce	Ac. antinoy. trouvé 1x à taux faible	P	ttt ?, pas de γ
16	De de stérilité, IAC, FIV, 1 GEU	Dysovulation Ac. antiSPZ	N	ttt ?, pas de γ
17	FIV, 2 GEU, 1AS précoce	Problème de qualité de sperme, Problème de maturation ovocytaire	N	ttt ?, pas de γ
18	2 enfants, 1 AS précoce à œuf clair, 1 AS précoce	Ac. anti ovaire et antinoy. à taux faible trouvés 1x faible CPLM limite sur 1 pvt.	N	ttt ?, pas de γ

Tableau 5 : Histoire clinique et bilan paraclinique des couples avec ASR



Exemples de cross-match.

En haut : Marquage des lymphocytes

Au centre: CM positif

En bas : CM négatif

DISCUSSION

Il existe peu de données dans la littérature concernant le polymorphisme d'HLA-G.

2 équipes, l'une française à Rennes, l'autre espagnole à Madrid ont observé les fréquences alléliques suivantes : GI 55 et 40%, GII 38 et 36%, GIII 0 et 2%, GIV 7 et 22%.

Plus récemment, l'équipe parisienne de Dausset a amorcé l'étude de ce polymorphisme par séquençage du gène.

Notre étude est donc la deuxième concernant une population française et la première intéressant la population limousine.

Il n'existe pas d'anticorps monoclonaux disponibles pour différencier les allèles HLA-G. Seules sont utilisables des techniques de biologie moléculaire. Nous nous sommes donc inspiré des travaux de Morales pour mettre au point une technique de PCR-RFLP pour le phénotypage de HLA-G. Les conditions que nous rapportons sont les conditions optimales pour l'appareil utilisé au laboratoire.

Le polymorphisme d'HLA-G étant peu connu, le préalable à l'étude comparative des couples sains et malades a été l'étude de HLA-G dans la population limousine.

Nous confirmons l'existence de trois allèles GI, GII et GIV dans la population caucasienne limousine. L'allèle GIII semble n'exister que dans la population négroïde. Les fréquences alléliques observées sont voisines de celles décrites dans la littérature : GI 40%, GII 50%, GIII 0%, GIV 10%.

Nous avons de même retrouvé les déséquilibres de liaison : HLA-A2, -A3, -A29 avec GI, -A1, -A24, -A28, -A26 avec GII et A11 avec GIV.

Nous avons toutefois pris le soin, pour valider notre technique, de séquencer les produits d'amplification de 2 sujets homozygotes GII/GII. Nous avons ainsi vérifié qu'il s'agissait bien du gène HLA-G. Ceci nous a également permis de mettre en évidence un changement de base à la 3^{ème} base du codon 62 dans l'exon 2 (A→G), dans l'exon 2 chez un individu.

Nos travaux ainsi que certaines données de la littérature font penser qu'HLA-G est probablement plus polymorphe qu'on ne le supposait jusqu'alors et que la technique de référence que nous avons utilisée ne suffira pas pour l'étude exhaustive de ce polymorphisme. Il sera certainement nécessaire d'utiliser des techniques plus fines : un long travail de séquençage sera nécessaire. Il sera ensuite nécessaire de déterminer si ce polymorphisme du gène a une conséquence à l'échelon protéique et peut jouer un rôle dans la présentation peptidique.

Néanmoins, nous avons analysé les résultats que nous avons obtenu par PCR-RFLP, puisqu'il s'agit de la seule technique actuellement reconnue et validée par la Workshop HLA.

Nous nous sommes ensuite intéressé aux couples présentant des ASR et nous avons envisagé cette pathologie sous 2 aspects.

Une hypothèse classique est que les ASR sont liés à une homologie de phénotypes parentaux HLA. Nous avons donc étudié ces phénotypes de façon comparative chez des couples sains et des couples malades. Notre série, bien que petite, est homogène quant à la qualité, puisque tous les couples ont été exploré de façon identique dans notre laboratoire.

Nous n'avons pas retrouvé de différence significative entre les couples sains et les patients, à la différence de certaines données de la littérature, qui sur de grandes séries de couples faisant des ASR montrent une élévation significative d'homologies HLA-DR entre l'homme et la femme.

Le deuxième aspect envisagé est celui de l'autoimmunité.

Au vu des dossiers cliniques, nous avons été étonnés par la fréquence des stigmates d'autoimmunité dans les bilans des femmes malades. Nous nous sommes demandé si les ASR ne sont pas le résultat d'une pathologie autoimmune spécifique d'organe, et associée à un allèle HLA particulier. Les études les plus récentes évoquent l'association des ASR avec certains allèles de classe II ; mais les séries sont petites, les résultats hétérogènes, et ils nécessitent d'être confirmés sur un plus grand nombre de sujets.

Dans notre étude, les allèles A24, B44, DR11 et DR4 avaient des fréquences supérieures à celles de la population limousine saine, mais les résultats n'étaient pas significatifs.

Nous nous sommes particulièrement intéressé à HLA-G chez les couples faisant des ASR en raison de son expression restreinte au placenta, et de son polymorphisme. Ce polymorphisme, à la lecture de nos résultats ne semble pas impliqué dans les ASR. D'autres voies de recherches restent inexplorées. Il pourrait être intéressant de rechercher l'expression d'HLA-G sur les produits d'avortement et de chercher à savoir si une perte de l'expression trophoblastique de ce gène ne serait pas responsable d'une rupture de la tolérance maternelle et d'avortement.

Si l'étude d'HLA-G ne revêt pas d'intérêt particulier chez ces couples, nous avons en revanche noté la valeur du cross-match pour l'avenir obstétrical de ces femmes. En effet, les 4 femmes dont le cross-match était positif ont entamé une grossesse, et parmi elles, 3 l'ont menée à terme. Par contre, dans le groupe des 12 femmes pour lequel le cross-match était négatif, seulement 8 ont entamé une grossesse et 3 l'ont menée à terme.

Enfin, nous remarquons une hétérogénéité clinique dans les dossiers. Nous n'en avons cependant exclu aucun, bien que certains ne répondent pas exactement aux critères de définition des ASR selon les recommandations de l'OMS: à savoir des couples ayant présenté au moins 2 ASR précoces et successifs avec un même partenaire.

CONCLUSION

Nous avons développé une technique de PCR-RFLP permettant d'identifier le polymorphisme de HLA-G qui nous a permis d'étudier ce polymorphisme dans la population limousine, et de le comparer chez des couples sains et des couples présentant des ASR. Nos résultats ne diffèrent pas de ceux obtenus dans d'autres populations caucasiennes. Cependant des études de séquençage sur de larges séries devront confirmer si ce polymorphisme est ou non limité.

L'étude des homologies HLA entre partenaire ne semble pas avoir d'intérêt particulier dans l'exploration des ASR ;

Notre étude n'a pas fait ressortir d'allèle HLA particulier exposant au risque d'ASR. Cependant il nous semble souhaitable que soit réalisée une étude sur de grandes séries avec des critères de diagnostic bien définis afin d'établir, comme semble l'indiquer les données de la littérature, si certains allèles de classe II exposent aux ASR par un mécanisme autoimmun.

Si le polymorphisme d'HLA-G chez les partenaires de couples présentant des ASR ne semble pas impliqué, nous pensons qu'une étude de l'expression placentaire de ce gène est nécessaire pour savoir si un défaut d'expression peut être impliqué dans les ASR .

Enfin, il faut noter la valeur prédictive du cross-match pour l'avenir obsétrical des femmes présentant des ASR, même si cette technique nécessite une standardisation.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- M. ALIZADEH, C. LEGRAS, G. SEMANA, P. LEBOUTEILLER, B. GENETET et R. FAUCHER. Evidence for a polymorphism of HLA-G gene. *Human Immunol*, 1993, 38(3), 206-212
- F. H. BACH, M. B. WIDMER, M. L. BACH, et J. KLEIN. Genetics and immunological complexity of major histocompatibility regions. *Science*, 1972, 176, 1024-1027
- F. H. BACH, et J. J. VAN ROOD. The Major Histocompatibility Complex- genetics and biology. *New England J Med*, 1976, 295, 806-813
- V. BELLINGARD, B. HEDON, J.F. ELIAOU, J ; SEIGNALET, J. CLOT et J.L. VIALA. Immunogenetic study of couples with recurrent spontaneous abortions. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*, 1995, 60 (1), 53-60
- R. B. BRAY, L. K. LEBECK et H. M. GEBEL. The flow cytometric crossmatch Dual color analysis of T cell and B cell reactivities. *Transplantation*, 1989, 48, 834-840
- E. D. CAROSELLA, J. DAUSSET et M. KIRSZENBAUM. HLA-G revisited. *Immunol Today*, 1996, 17(9), 407-409
- O.B. CHRISTIANSEN, H.H. ANDERSEN, M. HOJBJERRE, T.A. KRUSE, S.L. LAURITZEN et N. GRUNNET. Maternal HLA class II alloantigenotypes are markers for the predisposition to fetal losses in families of women with unexplained recurrent fetal loss. *Eur J Immunol*, 1995, 22 (4), 323-334
- G. CHUMBLEY, A. KING, N. HOLMES, et Y. W. LOKE. In situ hybridization and northern blot demonstration of HLA-G mRNA in human trophoblast populations by locus-specific oligonucleotide. *Human Immunol*, 1993, 37, 17-22
- J. COLOMBANI. HLA. Fonctions immunitaires et applications médicales. Ed. John Libbey Eurotext. 1993
- S. ELLIS. At the interface. *Am J Reprod Immunol*, 1990, 23, 84-86
- T. FUJII, A. ISHITANI et D. E. GERAGHTY. A soluble form of the HLA-G antigen is encoded by a messenger ribonucleic acid containing intron 4. *J Immunol*, 1994, 153 (12), 5516-5524
- D. E. GERAGHTY, B. H. KOLLER, et H. T. ORR.. A human major histocompatibility complex class I gene that encodes a protein with a shortened cytoplasmic segment. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 1987, 84, 9145-9149
- S. J. P. GOBIN, L. WILSON, V. KEIJERS, et P. J. VAN DEN ELSEN. Antigen processing and presentation by human trophoblast-derived cell lines. *J. Immunol*, 1997, 158, 3587-3592

- M. HOULIHAN, P. A. BIRO, A. FERGAR-PAYNE, K. L. SIMPSON, et C. H. HOLMES. Evidence for the expression of HLA-A,-B,-C classI genes in the human fetal liver. *J. Immunol*, 1992, 149, 668-675
- M. HOULIHAN, P. A. BIRO, H. M. HARPER, H. J. JENKINSON, et C. H. HOLMES. The human amnios is a site of MHC classIb expression : evidence for the expression of HLA-E and HLA-G. *J Immunol*, 1995, 154, 5665-5674
- A. ISHITANI, et D. E. GERAGHTY. Alternative splicing of HLA-G transcripts yields proteins with primary structures resembling both classI and classII antigens. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 1992, 89, 3947-3951
- K. JIN, H.N. HO, T.P. SPEED et T.J. 3rd GILL. Reproductive failure and the major histocompatibility complex. *Am J Hum Genet*, 1995, 56 (6), 1456-1467
- A JURISICOVA, R. F. CASPER, N. J. MCLUSKY, G. B. MILLS, et C. L. LIBRACH. HLA-G during preimplantation human embryo development. 1996, 93, 161-165
- M. DELPECH, J. C. KAPLAN. *Biologie moléculaire et médecine. Deuxième édition. Médecine. Sciences Flammarion*, 1994
- M. DROUET, L. AUSSEL, B. DRENOU et R. FAUCHET. Quantification and molecular analysis of plasmatic HLA-BCw molecules with a locus B and Cw HLA specific mAb (B1.23.2mAb). 1995, 22, 363-370
- M. KIRSZENBAUM, P. MOREAU, E. GLUCKMAN, J. DAUSSET, et E. CAROSELLA. An alternatively spliced form of HLA-G mRNA in human trophoblasta and evidence for the presence of HLA-G transcripts in adult lymphocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 1994, 91, 4209-4213
- M. KIRSZENBAUM, P. MOREAU, M. TEYSSIER, C. LAFON, E. GLUCKMAN, J. DAUSSET, et E. CAROSELLA. Evidence for the presence of the alternatively spliced HLA-G mRNA forms in human mononuclear cells from peripheral blood and umbilical cord blood. *Human Immunol*, 1995, 43, 237-241
- M. KIRSZENBAUM, S. DJOULAH, J. HORS, I. LE GALL, E. B. de OLIVEIRA, S. PROST, J. DAUSSET, et E. D. CAROSELLA. HLA-G gene polymorphism segregation within CEPH référence families. *Human Immunol*, 1997, 53, 140-147
- J. KLEIN. *Natural history of the Major Histocompatibility Complex. New-York : J. Willey & sons*. 1986
- S. KOVATS, E. K. MAIN, C. LIBRACH, M. STUBBLEBINE, S. J. FISHER, et R. DEMARS. A classI antigen, HLA-G, expressed in human trophoblasts. *Science*, 1990, 248, 220-223
- Y. W. LOKE, A. KING, T. BURROWS, L. GARDNER, M. BOWEN, S. HIBY, S. HOWLETT, N. HOLMES, et D. JACOBS. Evaluation of trophoblast HLA-G antigen with a specific monoclonal antibody. *Tissue Antigen*, 1997, 50, 135-146

M.T. Mc. MASTER, C. L. LIBRACH, Y. ZHOU, K-H. LIM, M. J. JANATPOUR, R. DEMARS, S. KOVATS, C. DAMSKY, et S. J. FISHER. Human placental HLA-G expression is restricted to differentiated cytotrophoblasts. *J. Immunol*, 1995, 154, 3771-3778

R. J. MAHONEY, A. A. KENNETH, S. R. GIVEN, R. J. ADAMS, A. C. BREGGIA, P. A. PARIS, G. E. PALOMAKI, S. A. HITCHCOX, B. W. WHITE, J. HIMMELFARB ET D. A. LEEBER. The flow cytometric crossmatch and early renal transplant loss. *Transplantation*, 1990, 19, 527-535

S. A. MILLER, D. D. DYKES, et H. F. POLISKY. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res*, 1988, 1215-1218

P. MORALES, A. CORELL, J. MARTINEZ-LASO, J. M. MARTIN-VILLA, P. VALERA, E. PAZ-ARTAL, L-M. ALLENDE, et A. ARNAIZ-VILLENA. Three new alleles and their linkage disequilibria with HLA-G. *Immunogenetics*, 1993, 38, 323-331

P. MOREAU, E. CAROSELLA, M. TEYSSIER, S. PROST, E. GLUCKMAN, J. DAUSSET, et M. KIRSZENBAUM. Soluble HLA-G molecule Analternatively spliced HLA-G form candidate to encode it in peripheral blood mononuclear cells and human trophoblasts. *Human Immunol*, 1995, 43, 231-236

C. OBER, T. STECK, K. van der VEN, C. BILLSTRAND, L. MESSER, J. KWACK, K. BEAMAN, A. BEER. MHC class I compatibility in aborted fetuses and term infants of couples with recurrent spontaneous abortion. *J Reprod Immunol*, 1993,25 (3), 195-207

M. ONNO, T. GUILLAUDEUX, L. AMIOT, I. RENARD, B. DRENOU, B. HIREL, M. GIRR, G. SEMANA, P. LE BOUTELLER, et R. FAUCHER. The HLA-G gene is expressed at a low mRNA level in different human cells and tissues. *Human Immunol*, 1994, 41, 79-86

L. PAZMANY, O. MANDELBOIM, M. VALES6GOMEZ, D.M.DAVIS, H.T.REYBURN et J. L.STROMINGER. Protection from natural killer cell-mediated lysis by HLA-G expression on target cells. *Science*,1996, 274 (5288), 792-795

M.F. REZNIKOFF-ETIEVANT, I. DURIEUX, R. LOBET, A. DAMBROSIO, C. TOURE, C. DUFRAISSE, M.C. MATEOS, F. CASTELLANO, J.Y. MULLER et J. HUCHET. La maladie abortive immunologique et son traitement par immunothérapie. *Revue Française de Transfusion et Immuno-hématologie*, 1986, 3, 135-147

P. SAGOT, J. BRIGNON, M.-L. CHENEAU, G. BOOG et J.Y. MULLER. Lack of evidence for a role of HLA-DP in unexplained recurrent spontaneous abortion. *Transfus Clin Biol*. 1995, 2 (3), 145-160

K. SANGER, S. NICKLEN et A. R. COULSON. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA*74, 1977, 5463-5467

T. SASAKI, H. YAMADA, E.H. KATO, S. SUDO, T. KISHIDA, T. SASAKI, F. NISHIGAKI et S. FUJIMOTO. Increased frequency of HLA-DR4 allele in women with

- unexplained recurrent spontaneous abortions, detected by the method of PCR-SSP. *J Reprod Immunol*, 1997, 32 (3), 273-279
- M. SBRACIA, M. MASTRONE, F. SCARPELLINI et J.A. GRASSO. Influence of histocompatibility antigens in recurrent spontaneous abortion couples and on their reproductive performances. *Am J Reprod Immunol*, 1996, 35 (2), 85-92
- M. SCHMIDT et H. T. ORR. Maternal/fetal interactions : the rôle of the MHC classI molecule HLA-G. *Crit Rev Immunol*, 1993, 13 (3/4), 207-224
- E. SCHWARZENAU. Aspects immunologiques de l'avortement. *Triangle*, 1991, 31 (2), 103-110
- T. STECK, K. van der VEN, J. KWAK, A. BEER et C. OBER. HLA-DQA1 and HLA-DQB1 haplotypes in aborted fetuses and couples with recurrent spontaneous abortion. *J Reprod Immunol*, 1995, 29 (2), 95-104
- J.M. THOULON, F. PUECH, G. BOOG. *Obstétrique*. Ellipses, 1995
- J. TROWSDALE, J. RAGOISSIS, et R. CAMPBELL. Map of the MHC. *Immunol Today*, 12, 1991, 443-446
- M. ULBRECHT, B. REHBERGER, I. STROBEL, G. MESSER, P. KIND, K. DEGITZ, T. BIEBER, et R. H. WEISS. HLA-G : expression in human keratinocytes in vitro and in human skin in vivo. *Eur. J. Immunol*, 1994, 24, 176-180
- K. VAN DER VEN et C. OBER. HLA-G polymorphisms in African Americans. *J Immunol*, 1994, 153, 5628-5633
- G. A. VOISIN, P. EDELMAN, N. GENETET, J-F. BACH, C. SUREAU. *Immunologie de la reproduction*. Médecine-Sciences Flammarion, 1990
- X. WEI et H. T. ORR. Differential expression of HLA-E, HLA-F, and HLA-G transcripts in human tissue. *Human Immunol*, 1990, 29, 131-142

TABLE DES MATIERES

INTRODUCTION	p12
GENERALITES	p14
I - LE SYSTEME HLA	p15
A - Gènes et produits de classe I	p16
B - HLA-G	p19
1 - Le gène	p19
2 - Les transcrits	p20
3 - Les produits du gène	p21
4 - Polymorphisme restreint	p22
5 - Déséquilibre de liaison entre HLA-A et HLA-G	p24
6 - Lieux d'expression	p24
<i>a - Chez le fœtus</i>	p24
<i>b - Chez l'adulte</i>	p25
7 - Rôle	p25
C - Gènes et produits de classe II	p26
D - Exploration du système HLA	p27
II - AVORTEMENTS SPONTANES A REPETITION	p29
A - Définitions	p29
B - Etiologies	p30
1 - Etiologies non immunologiques	p31
2 - Etiologies immunologiques	p32

C - La réponse immunitaire maternelle aberrante à la grossesse	p33
1 - ASR et homologies de gènes parentaux	p34
<i>a</i> - HLA-A, -B, -DP, -DQ, -DR	p35
<i>b</i> - HLA-G	p36
<i>c</i> - Autres systèmes antigéniques	p37
2 - ASR et autoimmunité spécifique du placenta	p38
<i>a</i> - La région DP	p38
<i>b</i> - La région DQ	p38
<i>c</i> - La région DR	p38
OBJECTIFS DE TRAVAIL	p41
MATERIELS ET METHODES	p43
I - MATERIELS	p44
A - Sujets sains	p44
B - Couples témoins	p44
C - Couples malades	p45
II - METHODES	p45
A - Mise au point d'une technique de PCR RFLP appliquée à la caractérisation du polymorphisme de HLA-G	p46
1 - Extraction de l'ADN génomique	p46
2 - Amplification des exons 2 et 3 de HLA-G	p49
<i>a</i> - Amorces	p49
<i>b</i> - Mélange réactionnel	p49
<i>c</i> - Programme d'amplification	p50
<i>d</i> - Contrôle d'amplification	p51

3 - Digestion enzymatique p51

4 - Séquençage p53

B - Phénotypage HLA-A et -B par microlymphocytotoxicité p54

C - Phénotypage HLA-DR/DQ par PCR-SSP p55

D - Recherche d'auto-immunisation et d'allo-immunisation chez les femmes des couples malades p56

E - Statistiques p58

RESULTATS p59

I - MISE AU POINT D'UNE TECHNIQUE DE PCR-RFLP POUR L'ETUDE DU POLYMORPHISME DE HLA-G p60

A - Fréquence des allèles HLA-G p62

B - Fréquence des phénotypes p62

C - Déséquilibre de liaison entre HLA-A et HLA-G p62

II - ETUDE DES PHENOTYPES DES COUPLES PRESENTANT DES ASR p65

A - Fréquence des allèles HLA-G p68

B - Fréquence des phénotypes p68

C - Etude des homologies de phénotypes parentaux pour HLA-A, -B, -DR, -DQ et -G p68

1 - HLA-A p69

2 - HLA-B p69

3 - HLA de classe I (-A et -B) p69

4 - HLA-DR p69

5 - HLA-DQ p70

6 - HLA de classe II (-DR et -DQ) p70

7 - HLA-G p70

D - Recherche d'un allèle HLA-A, -B, -DR ou DQ exposant au risque d'ASR chez les partenaires féminines des couples présentant des ASR p71

III - ETUDE DE L'HISTOIRE CLINIQUE DES COUPLES PRESENTANT DES ASR ET DES RESULTATS DES CROSS-MATCH p72

DISCUSSION p75

CONCLUSION p80

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES p82

TABLE DE MATIERES p87

LISTE DES ILLUSTRATIONS p91

SERMENT D'HIPPOCRATE p93

LISTE DES ILLUSTRATIONS

- Figures et photographies

Carte moléculaire de la région HLA p15

Carte moléculaire de la région HLA de classe I p16

Structure des gènes HLA de classe I p17

Représentation schématique de la molécule HLA de classe I p18

Organisation des exons des différents transcrits du gène HLA-G p20

Schéma des différentes structures des protéines HLA-G p21

Carte moléculaire de la région de classe II p26

Résultats des PCR exon 2 et exon 3 ; Différents profils de digestion p61

Exemples de cross-match.p74

- Tableaux

Tableau 1 : Population de référence p63

Tableau 2a : Déséquilibre de liaison HLA-A/HLA-G chez les sujets sains.p64

Tableau 2b : Déséquilibre de liaison HLA-A/HLA-G chez les couples sains témoins.p64

Tableau 2c : Déséquilibre de liaison HLA-A/HLA-G chez les couples ASR.p64

Tableau3 : Couples sains p66

Tableau 4 : Couples avec ASR p67

Tableau 5 : Histoire clinique et bilan paraclinique des couples avec ASR p73

SERMENT D'HIPPOCRATE

En présence des maîtres de cette école, de mes condisciples, je promets et je jure d'être fidèle aux lois de l'honneur et de la probité dans l'exercice de la médecine.

Je dispenserai mes soins sans distinction de race, de religion, d'idéologie ou de situation sociale.

Admis à l'intérieur des maisons, mes yeux ne verront pas ce qui s'y passe, ma langue taira les secrets qui me seront confiés et mon état ne servira pas à corrompre les mœurs ni à favoriser les crimes.

Je serai reconnaissant envers mes maîtres, et solidaire moralement de mes confrères. Conscient de mes responsabilités envers les patients, je continuerai à perfectionner mon savoir.

Si je remplis ce serment sans l'enfreindre, qu'il me soit donné de jouir de l'estime des hommes et de mes condisciples, si je le viole et que je me parjure, puissé-je avoir un sort contraire.

BON A IMPRIMER N° 67

LE PRÉSIDENT DE LA THÈSE

Vu, le Doyen de la Faculté

VU et PERMIS D'IMPRIMER
LE PRÉSIDENT DE L'UNIVERSITÉ

DUMONT MAGNE Isabelle,
Implication du système HLA dans les avortements spontanés à répétition
Etude rétrospective de dix-huit couples
93p, (thèse de Médecine ; Limoges, 1997)

RESUME

Le gène HLA-G est un gène du CMH, polymorphe et d'expression restreinte au placenta.

Ce travail a consisté à mettre au point une technique de PCR-RFLP pour l'étude du polymorphisme de HLA-G, à étudier ce polymorphisme dans la population limousine, et à le comparer dans des populations de couples sains et présentant des ASR.

Il n'a pas été mis en évidence de différence significative entre les homologies de phénotypes HLA parentaux des couples malades par rapport aux témoins.

Dans ce travail, nous avons également recherché si un allèle HLA particulier exposait au risque d'ASR. Dans notre courte série, aucun allèle n'a, chez les femmes de ces couples, une fréquence significativement augmentée.

Il nous semblerait intéressant dans l'avenir d'étudier l'expression de HLA-G sur le placenta des femmes présentant des ASR.

Ce travail a été l'occasion de remarquer l'intérêt du cross-match dans le bilan des ASR, et sa valeur prédictive pour l'avenir obstétrical des patientes.

MOTS CLES

HLA-G

Polymorphisme

Placenta

ASR

PCR-RFLP