

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE

MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR

ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

UNIVERSITE SAAD DAHLAB - BLIDA 1

FACULTE DE MEDECINE

DEPARTEMENT DE PHARMACIE



**ALLO-IMMUNISATION VIS-A-VIS DES ANTIGENES HLA
CHEZ LES FEMMES MULTIPARES PRISES EN CHARGE
AU CHU DE BLIDA**

Thèse d'exercice de fin d'études

Présentée en vue de l'obtention du diplôme de docteur en pharmacie

Session : Septembre 2017

Présentée par :

- **CHABIRA Fatima Zohra**
- **CHEBBOUB Asma**

Encadrée par :

- **Dr M.L.ZELTNI**

Devant le jury :

- **Président : Pr Y.BOUCHEDOUB** Maitre de conférence A en Immunologie au CHU Blida
- **Examineur : Dr O.RENDJA** Maitre-assistant en Immunologie au CHU Blida
- **Examinatrice : Dr L.OULD ALI** Assistante en Immunologie au CHU Blida
- **Promoteur : Dr M.L.ZELTNI** Assistant en Immunologie au CHU Blida

REMERCIEMENTS

*Nous commençons par remercier **ALLAH** le tout puissant de nous avoir donné le courage, la santé, la volonté, l'amour du savoir et surtout la patience pour pouvoir produire ce modeste travail.*

*Nous tenons particulièrement à adresser nos remerciements au directeur de ce mémoire, notre encadreur Docteur **ZELTNI**, pour sa patience, sa disponibilité et ses instructions précieuses tout au long de ce travail.*

*On remercie également, Monsieur le Professeur **BOUCHEDOUB** qui a bien voulu honoré ce travail en acceptant de présider le jury ;*

*Docteur **RENDJA** et docteur **OULD ALI** pour avoir accepté de faire partie du jury et d'examiner ce travail.*

*Nous tenons aussi à remercier vivement le chef service de l'Immunologie le Professeur **MEGHLAOUI** de nous accueillir au sein du service.*

*On adresse nos remerciements à tout le personnel du laboratoire d'immunologie, plus particulièrement à Monsieur **KHERBACH** et Mademoiselle **KHLIFATI** pour votre accueil et l'aide que vous nous avez apportée à un moment ou à un autre.*

*Un remerciement particulier au chef de service de gynécologie obstétrique **Pr. OUKID** qui nous a accueilli au sein de son service, ainsi qu'aux **infirmières** pour leur aide.*

*Nous tenons à adresser nos profonds remerciements aux **femmes participantes** à cette étude, qui, sans leurs collaboration ce travail n'aurait jamais vu le jour.*

Dédicaces

Ce modeste travail, et bien au-delà, je le dois à mes chers parents pour l'éducation qu'ils m'ont prodigué; pour leurs soutiens durant toutes mes études. Je prie ALLAH de les bénir, de veiller sur eux, en espérant qu'ils seront toujours fiers de moi.

A mes précieuses sœurs et mes deux chers frères, que dieu vous bénissent.

*A la mémoire de ma très chère grand-mère **DRISSI Fatima Zohra**, Que Dieu le tout-puissant t'accorde Son infinie miséricorde et t'accueille dans Son éternel Paradis.*

*A mes grands-pères, à ma grand-mère, ainsi qu'à toute ma famille **CHABIRA** et **DJOUDI**.*

*A ma très chère amie **Soulef**, ainsi que toutes mes amies pour ces six années inoubliables durant lesquels j'ai partagé avec vous mes moments de joie et de bonheur.*

A mon binôme, ainsi qu'à toute sa famille. Merci pour ton aide et de ta gentillesse fournis tout au long de ce travail.

Pour toute personne m'ayant aidé de près ou de loin, qu'ils trouvent ici l'expression de ma reconnaissance.

Fatima Zohra

Dédicaces

A MON TRÈS CHÈR PÈRE

Tu as su m'apprendre le sens de la responsabilité, de l'optimisme et de la confiance en soi face aux difficultés de la vie.

Tu n'as cessé de me soutenir et de m'encourager durant toutes les années de mes études, tu as toujours été présent à mes côtés pour me consoler quand il fallait.

Je te dois ce que je suis aujourd'hui et ce que je serai demain et je ferai toujours de mon mieux pour rester ta fierté et ne jamais te décevoir.

Que Dieu le tout puissant te préserve, t'accorde santé, bonheur, et te protège de tout mal.

A MA TRÈS CHÈRE MÈRE

Ta patience sans fin, ta compréhension et ton encouragement sont pour moi le soutien indispensable que tu as toujours su m'apporter.

En ce jour mémorable, pour moi ainsi que pour toi, reçoit ce travail en signe de ma vive reconnaissance et ma profonde estime.

Puisse le tout puissant te donner santé, bonheur et longue vie afin que je puisse te combler à mon tour.

A ma très chère sœur « Wafa » et mon très chère frère « AbdeRaouf »

A ma sœur, amie et tante « Ouassila »

Merci pour ton sincère amour, et ton soutien inconditionnel

A tous les membres de ma famille « CHEBBOUB » et « Boukellif »

A ma chère amie « Hadjer »

Je te remercie pour ton amitié, ton encouragement et surtout pour ta fidélité.

A mon binôme et amie

Je te remercie pour ton amitié et pour tous les moments inoubliables qu'on a passé ensemble

Puisse dieu renforcer le lien d'amitié qui nous unit

A toutes mes amies et collègues de ma promotion

Je vous remercie pour votre amitié et pour tous les moments de joie qu'on a partagé ensemble

Asma

Table des matières

GLOSSAIRE.....	IV
LISTE DES ABREVIATIONS	VIII
LISTE DES FIGURES.....	XI
LISTE DES TABLEAUX.....	XII
INTRODUCTION	1
PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE.....	3
CHAPITRE I SYSTEME HLA	4
I. Définition du système HLA	5
II. Histoire et découverte du système HLA	5
III. Immunogénétique	6
II-1. Les gènes HLA de classe I	7
II-2. Les gènes de classe II.....	7
II-3. Les gènes de classe III	7
IV. Caractéristiques génétiques	8
III-1. Le polymorphisme.....	8
III-2. La liaison étroite	9
III-3. La codominance.....	9
III-4. Le déséquilibre de liaison.....	10
V. Molécules HLA	10
IV-1. Structure des molécules HLA de classe I	11
IV-2. Structure des molécules HLA de classe II.....	11
VI. Expression des molécules HLA	12
V-1. Expression des molécules HLA de classe I.....	12
V-2. Expression des molécules HLA de classe II.....	14
VII. Fonctions des molécules HLA.....	14
VI-1. Présentation des antigènes	14
VI-2. Rôle des molécules HLA dans la sélection thymique	16
VI-3. HLA et les cellules Naturel Killers	16
VIII. HLA et Médecine	17
CHAPITRE II IMMUNOLOGIE DE LA GROSSESSE	18
I. Généralités	19
II. Interface fœto-maternelle	20
II-1. Aspects anatomiques	20
II-2. Aspects immunologiques	21
III. Tolérance fœto-maternelle	21

IV.	Mécanismes de la tolérance.....	22
IV-1.	Expression sélective des molécules HLA par les cellules trophoblastiques	22
VI-2.	Implication de l'HLA-G	23
VI-3.	Rôle des cellules présentatrices des antigènes.....	23
VI-4.	Rôle des cellules NK.....	25
VI-5.	Rôle des cytokines : balance Th1/Th2 et rôle du Th17	26
VI-6.	Cellules T régulatrices	28
VI-7.	Autres mécanismes protecteurs	28
CHAPITRE III	Allo-immunisation Fœto-maternelle Anti-HLA.....	31
I.	Généralités	32
II.	Quand est ce que la sensibilisation maternelle aux antigènes fœtaux peut avoir lieu ?.....	32
III.	Incidence de l'immunisation anti-HLA.....	34
IV.	Facteurs influençant le développement de l'immunisation anti-HLA.....	35
IV-1.	Nombre de grossesses.....	35
IV-2.	Fausse couche et immunisation anti-HLA.....	35
IV-3.	Âge et groupes sanguins ABO / Rh	35
IV-4.	HLA-G soluble	36
IV-5.	Phénotype HLA.....	36
IV-6.	Le polymorphisme du gène du promoteur de l'IL-6	37
IV-7.	Anticorps HLA et le nombre de PIRCHE-II.....	37
IV-8.	Immunisation anti-HLA et le diabète gestationnel	37
V.	Effets de l'allo-immunisation	38
V-1.	Effet bénéfique.....	38
V-2.	Anticorps anti-HLA et thrombocytopénie allo-immune fœto-maternelle.....	38
V-3.	Anticorps anti-HLA maternels et le poids de naissance réduit.....	39
V-4.	Les anticorps HLA et l'avortement spontané récurrent	39
V-5.	Allo-anticorps HLA maternels et naissance prématurée.....	39
VI.	Formation des anticorps anti-HLA.....	40
VII.	Détection des anticorps anti-HLA chez la femme enceinte	41
VIII.	Techniques de détection des anticorps anti-HLA	42
VIII-1.	Technique de lymphocytotoxicité	42
VIII-2.	Cytométrie en flux	43
VIII-3.	Technique ELISA	43
VIII-4.	Technologie Luminex™.....	44
PARTIE PRATIQUE.....		46
MATERIEL ET METHODES		47

I.	Lieu et type d'étude.....	48
II.	Matériel.....	48
II-1.	Matériel biologique.....	48
II-1-1.	Population étudiée.....	48
II-1-4.	Prélèvements.....	48
II-2.	Matériel non biologique.....	48
III.	Méthode.....	49
III-1.	Recherche des anticorps anti-HLA par technique ELISA.....	49
III-1-1.	Principe du test.....	49
III-1-2.	Mode opératoire.....	49
III-3.	Interprétation des résultats.....	50
IV.	Analyse Statistique.....	52
	RESULTATS.....	53
I.	Caractéristiques démographiques:.....	54
I-1.	Age.....	54
I-2.	Répartition géographique.....	54
II.	Données biologiques.....	55
	Groupage.....	55
III.	Données obstétricaux.....	55
III-1.	Gestité.....	55
III-2.	Parité (nombre d'enfants).....	56
III-3.	Avortement.....	56
IV.	Fréquence des Anticorps anti-HLA.....	57
V.	Identification des Anticorps anti-HLA.....	57
VI.	Analyse statistique.....	58
	DISCUSSION.....	66
I.	Incidence de l'immunisation Anti-HLA.....	67
II.	Anticorps anti-HLA et nombre de grossesses.....	67
III.	Anticorps anti-HLA et nombre d'enfants.....	68
IV.	Anticorps anti-HLA et nombre d'avortements.....	68
V.	Anticorps anti-HLA et l'âge.....	69
VI.	Identification des Anticorps anti-HLA.....	69
	CONCLUSION.....	71
	BIBLIOGRAPHIE.....	XIV
	Bibliographie.....	XIV
	Résumé.....	XV

GLOSSAIRE

Allèle : Chacun des deux gènes de même fonction occupant un site homologue sur chacun des deux chromosomes d'une paire.

Alloanticorp : Anticorps produit entre individus non identiques appartenant à une même espèce.

Allogreffe : Greffe pratiquée entre deux individus d'une même espèce génétiquement différents.

Angiogenèse : Formation de nouveaux vaisseaux à partir de vaisseaux préexistants ou de précurseurs des cellules endothéliales (hémangioblastes).

Apoptose : Mécanisme de mort cellulaire programmée, intervenant pendant le développement de l'embryon et permettant la différenciation des organes définitifs à partir des structures embryonnaires.

Autocrine : est un mode de signalisation cellulaire impliquant des messagers chimiques hormones, cytokines qui agissent sur la cellule même qui les a synthétisés à travers des récepteurs de la membrane cellulaire.

Avortement spontané : est actuellement défini comme l'expulsion non provoquée du produit de conception avant que le fœtus ne soit viable, soit autour de 24 semaines complètes de grossesse avec un poids fœtal inférieur à 500 g.

Chémokine : Cytokine (molécule du système immunitaire) dont l'effet le plus important est de favoriser la migration de cellules (lymphocytes, monocytes, polynucléaires), et d'entraîner leur accumulation à l'endroit où a été sécrétée la cytokine.

Chorion : Membrane externe de l'œuf, issue de la réunion du trophoblaste et du mésoblaste au début de la grossesse. Il est expulsé avec le placenta après l'accouchement.

Cytokine : Molécule sécrétée par un grand nombre de cellules, en particulier les lymphocytes (globules blancs intervenant dans l'immunité cellulaire) et les macrophages (cellules de défense de l'organisme chargées d'absorber des particules étrangères) et impliquée dans le développement et la régulation des réponses immunitaires.

Cytotrophoblaste : Il correspond la couche interne du trophoblaste et se compose de cellules ovoïdes mononuclées, Il apparaît au 8^e jour du stade embryonnaire précoce, il participe largement à la mitose et la division des cellules.

Decidua basalis (caduque basale) : est une portion de l'endomètre de l'utérus , qui à la suite de l'installation d'un blastocyste va se différencier et sera à l'origine de la partie maternelle du placenta. Elle se situe entre la paroi du myomètre (ou muscle utérin) et le blastocyste.

Diabète gestationnel : diabète sucré transitoire survenant pendant la grossesse. Il apparaît au cours du 3^e trimestre de la grossesse. Il se caractérise par une hyperglycémie modérée, sans gravité pour la mère mais pouvant avoir des répercussions sur l'enfant. La plus importante est la macrosomie (croissance intra-utérine excessive), qui peut rendre l'accouchement difficile.

Endomètre : Muqueuse tapissant la face interne de l'utérus. L'endomètre subit des modifications tout au long de la vie de la femme. Au cours du cycle menstruel, sous l'influence de la sécrétion hormonale, il s'épaissit pour préparer une éventuelle nidation de l'œuf et assurer sa nutrition. En l'absence de fécondation, la couche superficielle de l'endomètre se décolle et est éliminée, formant les règles. Après la ménopause, l'endomètre s'atrophie et le cycle menstruel est interrompu.

Epitope : la plus petite partie d'une molécule d'antigène capable de s'associer au site de liaison (paratope) d'une molécule réceptrice d'antigène (anticorps, récepteurs membranaires des lymphocytes B et T).

Facteur V de Leiden : est une protéine qui compose le plasma sanguin et qui entre dans le processus de coagulation sanguine. Il existe une anomalie héréditaire par mutation du gène du facteur V, appelée facteur V Leiden, responsable de troubles de la coagulation.

Génome : ensemble du matériel génétique, c'est-à-dire des molécules d'ADN, d'une cellule ou d'une espèce.

Haplotype : ensemble de gènes se transmettant « en bloc » lors de la reproduction.

Hétérodimère : protéine composée de deux sous-unités différentes

HLA Matchmaker : est un algorithme informatique structuré pour déterminer l'appariement HLA au niveau de l'épitope.

Immunogène : Qui induit une réaction immunitaire.

Immunotolérance : État d'un organisme immunotolérant (qui ne réagit pas par la production d'anticorps correspondant à l'introduction d'un antigène donné)

Lectines : ce sont des protéines ou des glycoprotéines capables d'interagir spécifiquement avec des saccharides pour former des liaisons non covalentes et de provoquer l'agglutination des cellules.

Ligand : Molécule possédant un site conformationnel qui lui permet de « reconnaître » une molécule réceptrice pour s'encaster dans un site topologiquement complémentaire.

Locus : Position d'un gène sur la séquence d'un chromosome.

Môle hydatiforme : Tumeur, le plus souvent bénigne, formée par une dégénérescence des villosités chorionales du placenta pendant la grossesse.

Monocyte : Cellule produite par la moelle osseuse et ayant un rôle important dans les défenses immunitaires.

Morbidité : Nombre d'individus atteints par une maladie dans une population donnée et pendant une période déterminée.

Mortalité périnatale : ensemble de la mortalité et de la mortalité infantile endogène.

Perforine : est une protéine qui est indispensable pour assurer l'immunité de l'organisme, elle est capable de perforer les membranes des cellules afin de procéder à leur destruction. Elle est présente dans les NK et les LT cytotoxiques. La perforine, grâce aux pores qu'elle aura constitués, va permettre le passage de granzymes (des protéases chargées de la dégrader de l'intérieur jusqu'à sa mort complète) directement au centre de la cellule à éliminer.

Phénotype : est l'expression morphologique de certains éléments du génotype, ensemble des caractéristiques inscrites dans le patrimoine génétique. Parmi les caractéristiques du phénotype, on peut citer la couleur des yeux, des cheveux ou de la peau.

Placenta : Le placenta est formé par l'accolement de membranes d'origine maternelle (caduque) et fœtale (trophoblaste), irriguées par des vaisseaux. Il est complètement formé au 5^e mois de grossesse, à partir duquel il ne fera que croître sans modifier sa structure. Lorsque le terme de la grossesse est dépassé, le placenta remplit ses fonctions de façon imparfaite et le fœtus est moins bien nourri et moins bien oxygéné.

Prééclampsie : État pathologique de la femme enceinte apparaissant après la 20^e semaine de grossesse et caractérisé par une hypertension artérielle, une protéinurie (présence de protéines dans les urines) et une prise de poids avec œdème.

Sclérose en plaques : Maladie inflammatoire du système nerveux central se traduisant par la perte, à certains endroits (plaques), de myéline (gaine des fibres nerveuses) qui est remplacée par un tissu cicatriciel (sclérose).

Spondylarthrite ankylosante : affection chronique fréquente chez les hommes, qui touche les articulations sacro-iliaques et intervertébrales, elle évolue pendant de nombreuses années.

Syncytiotrophoblaste : c'est un des tissus organiques formant le placenta, commence à se former le 7^e jour après la fécondation de l'ovule, se forme à partir de l'œuf et non du tissu maternel : il permet à l'embryon de s'implanter fermement et participe aux échanges sanguins mère/embryon.

Thymocytes : sont issus de cellules de la moelle osseuse. Véhiculés par le sang, ils ont migré dans le thymus essentiellement pendant la vie fœtale et l'enfance. Ils y subissent une maturation au cours de laquelle ils acquièrent la propriété de reconnaître des antigènes. Au terme de cette maturation, ils prennent le nom de lymphocytes T.

Transfection : Introduction d'un fragment d'ADN étranger à l'intérieur d'une cellule, au cours d'une expérience, d'un traitement par thérapie génique.

Trogocytose : au cours d'un contact intercellulaire, les cellules peuvent échanger des segments de membranes avec les molécules qui y sont exprimées. Les cellules réceptrices acquièrent les propriétés biologiques inhérentes à ces molécules.

Trophoblaste : Couche cellulaire périphérique de l'œuf, formée lorsque celui-ci est encore au stade de blastocyste (du 5^e au 7^e jour après la fécondation) et qui est à l'origine du placenta.

LISTE DES ABREVIATIONS

ADN : Acide DésoxyRibonucléique

β2m : β2- microglobuline

CCL : *CC chemokine ligands*

CD : classe de différenciation

CDC : *complement dependent cytotoxicity*

CMH : Complexe Majeur d'Histocompatibilité

CPA : Cellule Présentatrice d'Antigène

CSF : *Colony Stimulating Factor*

CTL : *cytotoxic T cell*

DC : *Dendritic cell*

DG : Diabète Gestationnel

dNK : *decidual Natural Killer*

DTT: *Dithiotreitol*

E2: Œstradiol

ECM: *extracellular matrix*

ELISA: *Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*

FAS: *Fragment Apoptosis Stimulating*

FASL: *Fragment Apoptosis Stimulating Ligand*

FITC: *Fluorescein isothiocyanate*

FMAIT: *Fetomaternal Alloimmune Thromboeytopenia*

FMH: *Fetal-Maternal Haemorrhage*

FoxP3 : *Forkhead box protein 3*

Gal-1 : La galectine-1

GM-CSF: *Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor*

HCG: *Human chorionic gonadotropin*

HLA: *Human Leucocyte Antigen*

HPA : *Human Platelet Antigen*

iDC : *immature Dendritic Cells*

IDO : *Indoleamine 2, 3, Dioxygénase*

IFN : *Interféron*

Ig: *Immunoglobuline*

IL : *Interleukine*

IPA : *Inherited Paternal Antigens*

ITIM : *Immunoreceptor tyrosine- based inhibitory motifs*

kDa : *kiloDalton*

KIR : *Killer cell Ig-like Receptor*

LCT : *Lymphocytotoxicité Complément Dépendante*

Li : *chaîne invariante*

LT : *Lymphocyte T*

MIF: *Macrophage migration inhibitory factor*

NK: *Natural killer*

NKG: *Natural killer cell granule*

P4: *Progéstérone*

PGE2: *Prostaglandine E2*

PIRCHE: *Predicted indirectly recognizable HLA epitopes presented by HLA class II*

PLGF: *placental growth factor*

PRA: *Panel Reactive Antibody*

RhIG : *Rhesus immune globulin*

RM: *Reccurent Miscarriage*

RSA: *Reccurent Spontaneous Abortion*

SAB : *Single Antigen Bead Assay*

ST : *Syncytiotrophoblaste*

T reg : *Regulatory T cells*

TAP: *Transporter Associated with Antigen Processing*

TCR: *T Cell Receptor*

TGF: *Transforming Growth Factor*

TH : *T helper cells (T auxillaire)*

TNF: *Tumor Necrosis Factor*

VEGF: *Vascular Endothelial Growth Factor*

VIH : *virus de l'immunodéficience humaine*

LISTE DES FIGURES

Figure 1: Schéma de la carte génétique du système HLA	6
Figure 2 Gènes du locus du CMH.....	7
Figure 3: Un graphe indiquant le nombre d'allèles nommés et détenus dans la base de données IPD-IMGT / HLA depuis 1987 jusqu'au juillet 2017	8
Figure 4: Transmission parental des haplotypes HLA	10
Figure 5 Structure de la molécule HLA I.....	11
Figure 6 Structure de la molécule HLA II	12
Figure 7 Diagramme schématique des isoformes du HLA-G	13
Figure 8 Voie de présentation de l'antigène par les molécules HLA I.....	15
Figure 9 Voie de présentation de l'antigène par les molécules HLA II.....	15
Figure 10 Récepteurs activateurs et inhibiteurs des cellules NK	17
Figure 11 Interface foeto-placentaire, les cinq points d'interaction.....	20
Figure 12 Schéma des différents mécanismes immunosuppresseurs mis en place au cours de la grossesse	22
Figure 13 Fonctions immunitaires des cellules dendritiques déciduales	24
Figure 14 Dualité (M1/M2) du fonctionnement des macrophages durant la grossesse	25
Figure 15 Les voies clés des cellules NK déciduales impliquées dans la tolérance immunitaire pendant le 1er trimestre de grossesse	26
Figure 16 Différenciation des cellules T CD4+ helper en cellules Th1 et Th2	28
Figure 17 Importance de l'hCG dans l'induction de la tolérance	30
Figure 18 Mécanismes moléculaires de l'immunosuppression induite parIDO	30
Figure 19 Modèle d'exposition des antigènes et des cellules du fœtus au système immunitaire maternel	33
Figure 20 Micrographie électronique de la partie externe d'une villosité	34
Figure 21 Activation des cellules B et production d'alloanticorps	41
Figure 22 La distribution sélective des isotopes d'immunoglobulines dans le corps	42
Figure 23 Technique de Microlymphocytotoxicité.	43
Figure 24 Test ELISA indirect	44
Figure 25 Principe de La technologie Luminex™	45
Figure 26 interprétation d'une plaque ELISA par le logiciel HLA fusion.	52
Figure 27 Répartition des femmes selon les tranches d'âge	54
Figure 28 Répartition selon le lieu de naissance des femmes	54
Figure 29 Répartition des femmes selon le groupage sanguin	55
Figure 30 Répartition des femmes selon le nombre de grossesses	55
Figure 31 Répartition des femmes selon le nombre des enfants.....	56
Figure 32 Répartition des femmes selon le nombre des avortements	56
Figure 33 fréquence des Ac anti-HLA.....	57
Figure 34 Classe des Ac anti-HLA	57
Figure 35 Fréquence des Ac anti-HLA positifs par rapport aux tranches d'âge	60
Figure 36 Fréquence des Ac anti-HLA positifs par rapport aux groupes sanguins	60
Figure 37 Fréquence des Ac anti-HLA positifs par rapport aux nombre de grossesses	61
Figure 38 Fréquence des Ac anti-HLA positifs par rapport aux nombre d'enfants.....	61
Figure 39 Fréquence des Ac anti-HLA positifs par rapport aux nombre d'avortements	62
Figure 40 Fréquence des Ac anti-HLA I positifs par rapport aux tranches d'âge.....	64
Figure 41 Fréquence des Ac anti-HLA I positifs par rapport aux nombre d'enfants	64
Figure 42 Fréquence des Ac anti-HLA I positifs par rapport aux nombre d'avortements	65

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 Le nombre des allèles HLA (en juin 2017)	9
Tableau 2 Le nombre d'allèles nommés pour chaque gène (en juin 2017)	9
Tableau 3 Les spécificités anti-HLA classe I et II identifiées dans 22 sérums	58
Tableau 4 Interactions entre les résultats des tests de dépistage des anticorps anti-HLA et l'âge, le groupage sanguin, la gestité, la parité et le nombre d'avortements.	59
Tableau 5 Interactions entre les résultats des tests de dépistage des anticorps anti-HLA I et l'âge, la gestité, la parité et le nombre d'avortements.....	63

INTRODUCTION

Le système HLA est le système le plus polymorphe qui existe chez l'homme. En conséquence, la production des anticorps anti-HLA peut se produire pour plusieurs raisons, la transfusion, la transplantation et la grossesse [1].

La grossesse est longtemps apparue comme un défi immunologique unique. On peut en effet considérer le fœtus comme une greffe semi-incompatible puisque ses cellules portent pour moitié les antigènes de la mère et pour moitié ceux du père, ces derniers pouvant être reconnus comme étrangers par le système immunitaire maternel. Le statut immunologique du fœtus est donc très particulier. Depuis peu, on commence à comprendre quels mécanismes le protègent contre le système de défense de la mère [2].

Il est clairement démontré que l'utérus n'est pas un site immunologiquement neutre, préservé des cellules immunitaires maternelles. En effet, des contacts étroits entre les cellules embryonnaires et le système immunitaire maternel s'établissent très précocement dès la quatrième semaine de gestation. Le système immunitaire maternel produit des anticorps dirigés contre des allo-antigènes fœtaux et notamment les antigènes HLA paternels [3].

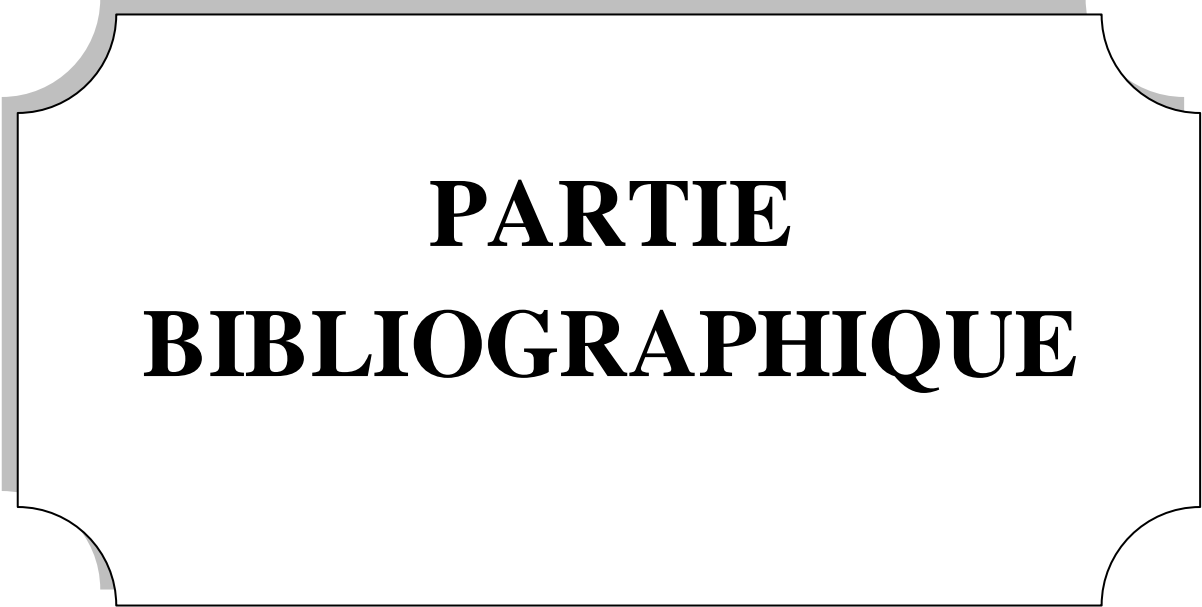
L'allo-immunisation fœto-maternelle anti-HLA se produit chez 10% à 30% des femmes pendant la grossesse, cependant la pertinence clinique et les conséquences de ces anticorps ne sont pas très claires [4].

L'objectif principal de la présente étude est de :

- Déterminer la fréquence des anticorps anti-HLA dans les sérums des femmes multipares, qui peuvent servir pour le typage HLA.

Les objectifs secondaires sont :

- Comprendre l'immunologie de la grossesse pour connaître les circonstances de l'allo-immunisation anti-HLA ;
- Identifier les Ac anti-HLA dépistés ;
- Etudier l'association entre l'allo-immunisation anti-HLA et le nombre de grossesses, d'enfants, et d'avortements.



**PARTIE
BIBLIOGRAPHIQUE**

CHAPITRE I

SYSTEME HLA

I. Définition du système HLA

On appelle « système HLA » (Human leucocytes Antigens) le Complexe Majeur d'Histocompatibilité (CMH) de l'Homme. Ce terme désigne un ensemble de gènes, étroitement liés sur un même chromosome (complexe), identifié initialement par ses effets majeurs dans le rejet des greffes (histocompatibilité).

II. Histoire et découverte du système HLA

En 1951, le seul Complexe Majeur d'Histocompatibilité (CMH) connu était celui de la souris du laboratoire, le système d'histocompatibilité 2 ou H2 (La désignation CMH n'était introduite qu'après la découverte des systèmes génétiquement homologues au système H2 chez d'autres vertébrés le début des années 1970). Et Snell à Bar Harbor et Peter A. Gorer à Londres étaient les deux seuls chercheurs ayant un intérêt direct dans le CMH.

En 1951 à Paris, Jean Dausset a réussi à développer une technique de détection d'anticorps capables d'agglutiner les leucocytes. Il était cependant persuadé à l'époque que les anticorps présents dans le sérum des patients leucopéniques étaient d'origine auto-immune; quelques années plus tard, il s'est rendu compte que les anticorps ont été produits en réponse aux leucocytes des donneurs introduits lors des transfusions sanguines. Il existe bien des groupes de globules blancs, comme il existe des groupes de globules rouges, Cependant, à la différence des groupes sanguins A, B et O, les anticorps anti-globules blancs n'existent pas à l'état naturel. Ils apparaissent seulement à l'issue d'une transfusion ou d'une grossesse.

Stimulée par le papier de Dausset, Payne à Stanford a commencé une recherche pour les auto-anticorps présumés, seulement pour réaliser, de nouveau comme Dausset, que les anticorps ont été induits par la transfusion. Après avoir découvert une meilleure source d'anticorps dans le sérum des femmes multipares, elle devait ensuite procéder, avec Walter Bodmer, à la description de la série LA d'antigènes qui devaient finalement apporter les deux dernières lettres à la désignation HLA du CMH humain [5].

C'est alors que Dausset imagine une stratégie simplificatrice : utiliser le sang d'un seul et même donneur pour transfuser le malade qui, de ce fait, ne pourra s'immuniser que contre les globules blancs d'un seul donneur. Ce qui fut fait. Au bout de quelques semaines, il constate l'apparition d'anticorps qui n'agglutinent que les leucocytes de la moitié du panel des donneurs volontaires. Ainsi 50% de la population française possède un premier groupe leucocytaire, dénommé MAC (les trois initiales des donneurs du panel) qui n'est pas agglutiné par ce sérum. Cette découverte fut publiée en 1958[6]. Le groupe MAC, était le premier d'une longue série d'antigènes du système majeur d'histocompatibilité humaine, le système HLA[7].

III. Immunogénétique

Le système HLA représente un segment génomique situé chez l'Homme sur le bras court du chromosome 6, occupant environ quatre mégabases. Sa carte génétique est relativement bien détaillée aujourd'hui (Figure 1) [8], ce système est organisé en trois régions qui codent respectivement pour les gènes HLA de classe I, gènes HLA de classe II et classe III.

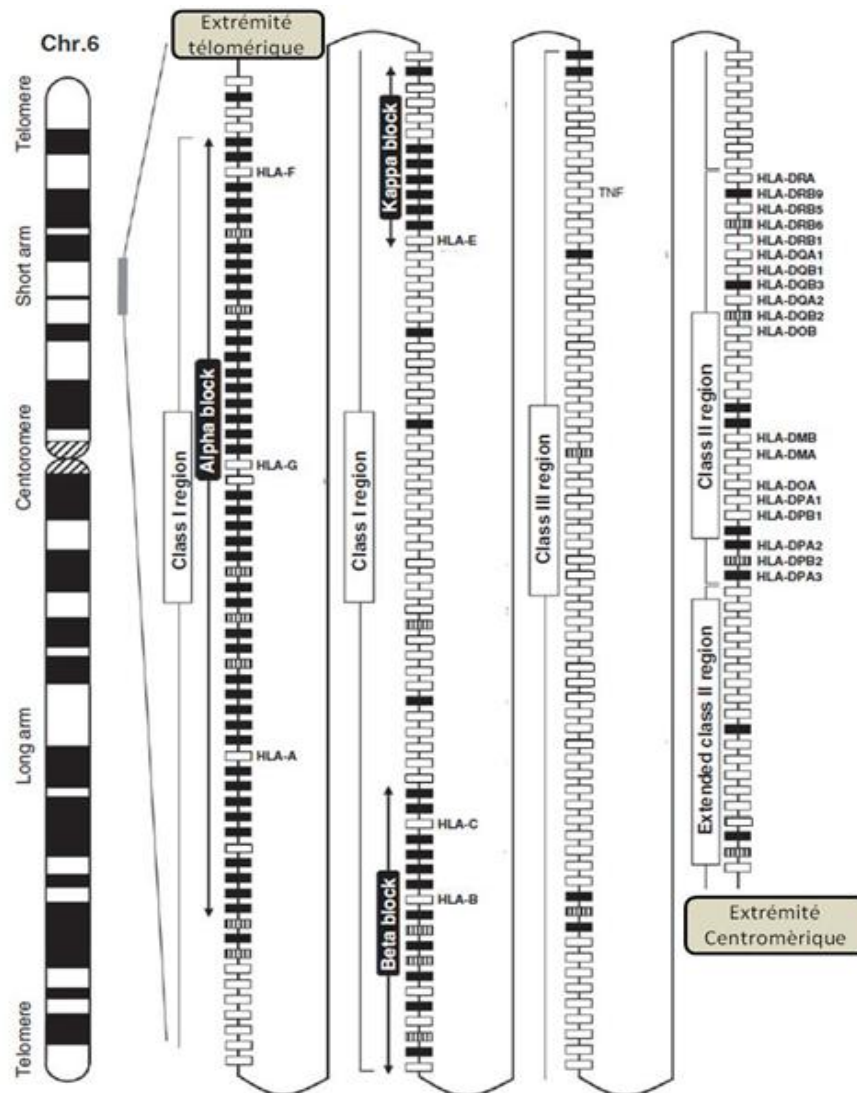


Figure 1: Schéma de la carte génétique du système HLA

D'après "The sequencing MHC consortium" [9].

Elle montre les différentes régions de classe I, classe III et classe II depuis l'extrémité télomérique (en haut) jusqu'au centromère (en bas). Les gènes représentés par des rectangles de couleur blanche, rayée ou noire correspondent respectivement aux gènes exprimés, aux gènes non codant et aux pseudogènes.

II-1. Les gènes HLA de classe I

Les gènes de la classe I sont localisés en position télomérique avec les trois principaux loci HLA de classe I dits classiques (HLA A, HLA B, HLA C) en plus des gènes HLA de classe I non classiques (HLA E, HLA F, HLA G) et les gènes apparentés à la classe I (HLA I like)[10]. Les gènes HLA classiques sont parmi les gènes les plus polymorphes décrits dans le génome humain ; on dénombre en effet 59 allèles pour le locus *HLA-A*, 118 pour *HLA-B* et 36 pour *HLA-C*. Contrairement aux gènes non classiques, qui leur polymorphisme reste très faible[11].

II-2. Les gènes de classe II

Les gènes de la classe II sont en position centromérique et comptent trois principaux loci : HLA DR, HLA DQ et HLA DP, Des analyses systématiques de cette région ont révélé son extraordinaire richesse en séquences codantes, avec plus de 32 gènes déjà identifiés [12].

II-3. Les gènes de classe III

Les gènes de classe III, situés entre les deux classes précédentes « la région intermédiaire » s'étendent sur une zone très dense, cette région contient également un grand nombre de gènes, au moins 39, parmi lesquels les gènes codant principalement pour des molécules ayant un rôle dans les réactions immunitaires, comme les protéines intervenant dans la voie d'activation du complément (C2, C4, facteur B), et le *Tumor Necrosis Factor* (TNF α et β). Toutefois, de nombreux gènes n'ayant pas de fonction dans le système immunitaire se trouveraient également dans cette région, comme par exemple la 21-hydroxylase[11].

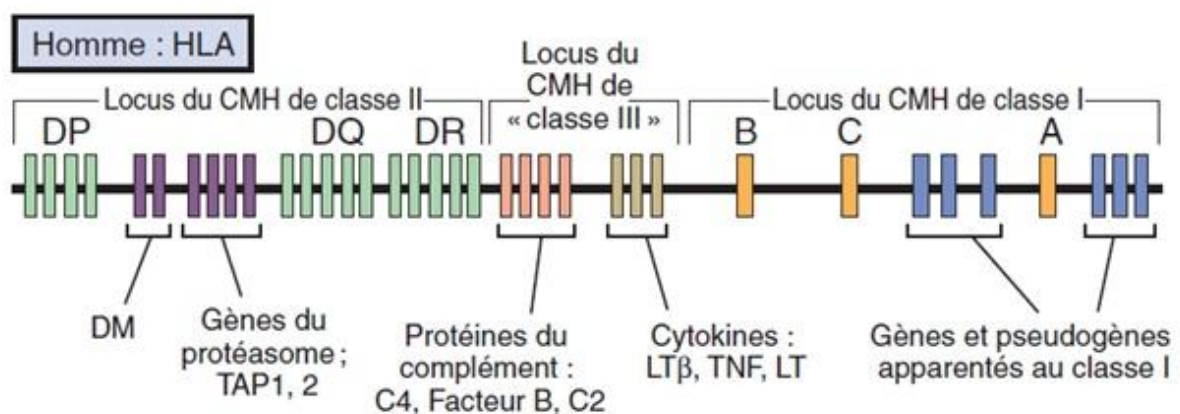


Figure 2 Gènes du locus du CMH [13]

IV. Caractéristiques génétiques

Quatre aspects principaux caractérisent les gènes HLA de classe I et II :

III-1. Le polymorphisme

Les gènes du CMH sont hautement polymorphes, ce qui signifie qu'il existe de nombreux allèles différents dans l'ensemble des individus. En fait, le polymorphisme est tellement important qu'il est extrêmement improbable que deux individus, dans une population non consanguine, aient exactement le même ensemble de gènes et de molécules du CMH. (Ces différents variants polymorphes sont hérités et non générés de novo chez les individus par recombinaison génique somatique, comme le sont les gènes des récepteurs d'antigène)[14]. Ce polymorphisme a été généré par combinaison, mutations ponctuelles et conversion génique, tous mécanismes qui contribuent à la diversité des gènes CMH dans la population [15].

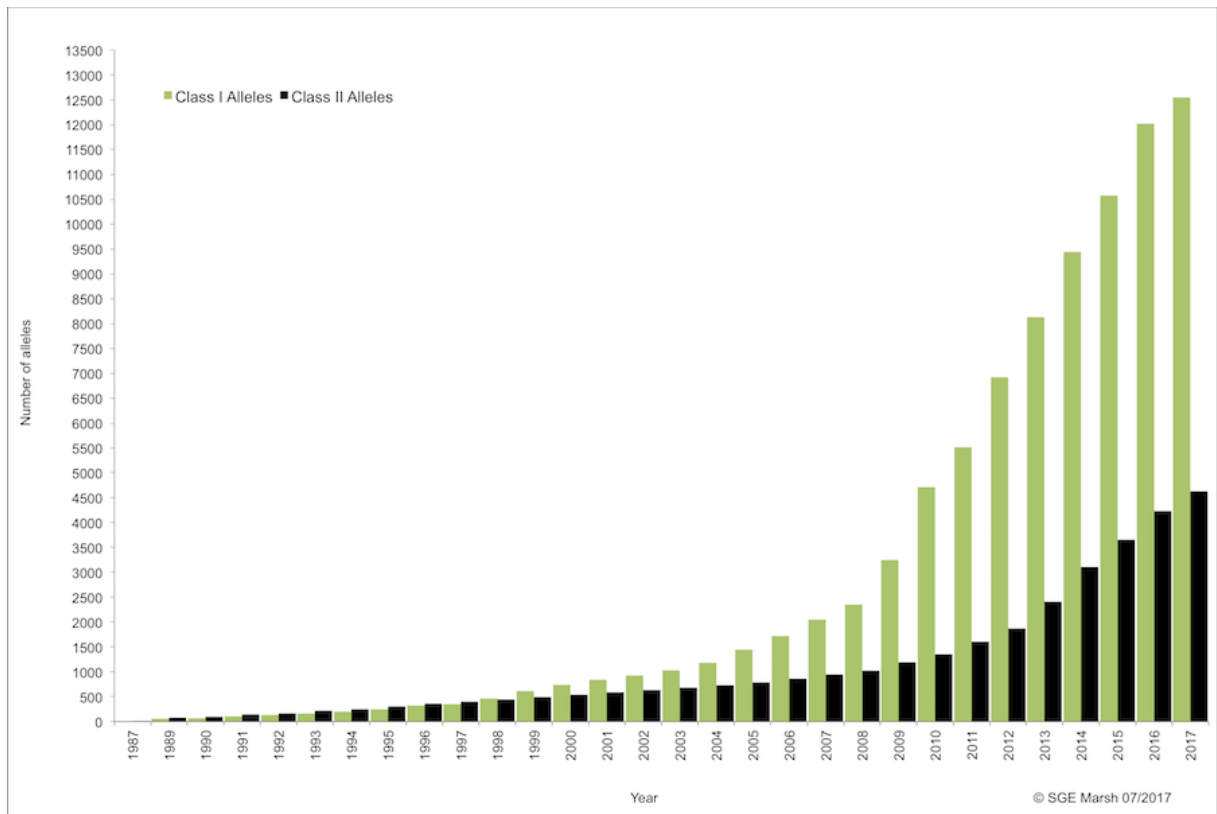


Figure 3: Un graphe indiquant le nombre d'allèles nommés et détenus dans la base de données IPD-IMGT / HLA depuis 1987 jusqu'au juillet 2017.[16]

Tableau 1 Le nombre des allèles HLA (en juin 2017) [17]

Nombre des allèles HLA	
Allèles HLA Classe I	12544
Allèles HLA Classe II	4622
Alleles HLA	17166
Autres Allèles non HLA	178
Nombre des Allèles confidentiels	4

Tableau 2 Le nombre d'allèles nommés pour chaque gène (en juin 2017)[17]

HLA classe I						
Gènes	A	B	C	E	F	G
Allèles	3968	4828	3579	26	25	56
Protéines	2781	3501	2490	8	5	18

HLA Classe II												
Gène	DRA	DRB	DQA1	DQB1	DPA1	DPA2	DPB1	DPB2	DMA	DMB	DOA	DOB
Allèles	7	2376	94	1142	53	5	894	6	7	13	12	13
Proteines	2	1739	35	774	24	0	641	0	4	7	3	5

III-2. La liaison étroite

Signifie que tous les gènes sont transmis en « bloc » des parents aux enfants, la liaison de plusieurs gènes sur un même locus définit un haplotype, Ainsi dans une famille composée d'un père porteur des haplotypes a et b et d'une mère possédant les haplotypes c et d, donneront quatre combinaisons d'haplotypes possibles chez leurs enfants : ac, ad, bc et bd.

III-3. La codominance

Les gènes HLA sont exprimés de manière codominante, ce qui signifie que les allèles hérités des deux parents sont exprimés de manière équivalente [14]. Un individu exprimant alors les allèles en provenance des haplotypes transmis par sa mère et son père. Au sein d'une famille, la probabilité d'une identité HLA entre frères ou sœurs est ainsi d'une chance sur quatre.

Ainsi, Chaque individu est hétérozygote pour la plupart de ses gènes HLA de classe I et de classe II [18].

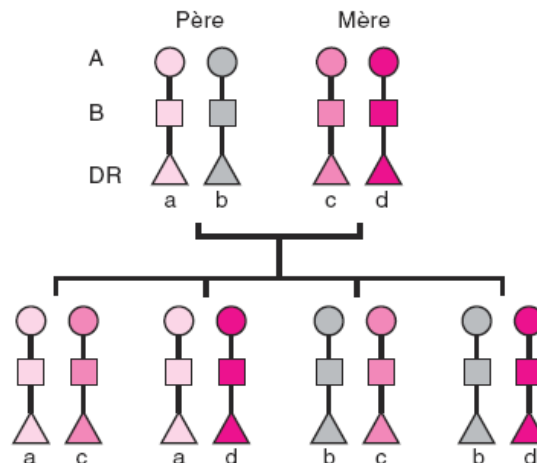


Figure 4: Transmission parentale des haplotypes HLA [19]

III-4. Le déséquilibre de liaison

On sait que la diversité HLA est moindre, car certaines combinaisons d'allèles surviennent plus fréquemment que ne le voudrait le hasard, ce phénomène est appelé déséquilibre de liaison.

Le déséquilibre de liaison est la différence entre la fréquence observée pour une combinaison particulière d'allèles et la fréquence attendue à partir des fréquences individuelles des allèles. La fréquence attendue pour une combinaison donnée peut être calculée en multipliant les fréquences des allèles. Par exemple, si l'allèle HLA A1 apparaît chez 16% des individus d'une population (fréquence= 0.16) et l'allèle HLA B8 dans 9% de ce groupe (fréquence=0.09), on s'attend à ce qu'environ 1.4% du groupe ait les deux allèles ($0.16 \times 0.09 = 0.014$). Cependant, les données ont montré que HLA A1 et HLA B8 sont rencontrés ensemble dans 8.8% des individus étudiés. Cette différence est une mesure du déséquilibre de liaison entre ces allèles de classe I [15].

V. Molécules HLA

Ce sont des glycoprotéines transmembranaires qui sont étroitement apparentées par leur structure et leur fonction, les molécules de classe I ou de classe II du HLA ont été isolées et purifiées, puis la structure tridimensionnelle de leurs domaines extracellulaires a été déterminée par cristallographie aux rayons X [20]. Malgré le polygénisme et le polymorphisme des molécules HLA leur structure tridimensionnelle fait preuve d'une grande homogénéité.

IV-1. Structure des molécules HLA de classe I

Les molécules HLA I sont de protéines monomériques, constituées d'une seule chaîne lourde toujours associée de manière non covalente à une petite protéine "la β 2- microglobuline (β 2m)":

- Les chaînes lourdes du HLA I sont codées par les allèles du locus A, B et C, ce sont des protéines membranaires de 370 acides aminés environ (45 kDa), qui comprennent trois domaines α 1, α 2 et α 3 (Figure 5), elles sont glycosylées sur le domaine α 2, les domaines α 1 et α 2 constituent la poche à peptide qui est la cavité dans laquelle l'antigène peptidique vient se fixer, le peptide est court et entre entièrement dans la poche à peptide [21], et sa présence dans la poche est indispensable à la stabilité de la molécule, il n'y a pratiquement pas de molécules HLA I «vides» à la surface des cellules[18].
- La β 2m est une protéine soluble de 99 acides aminés (15kDa), retrouvée dans le plasma, qui n'est pas codée par le CMH [21].

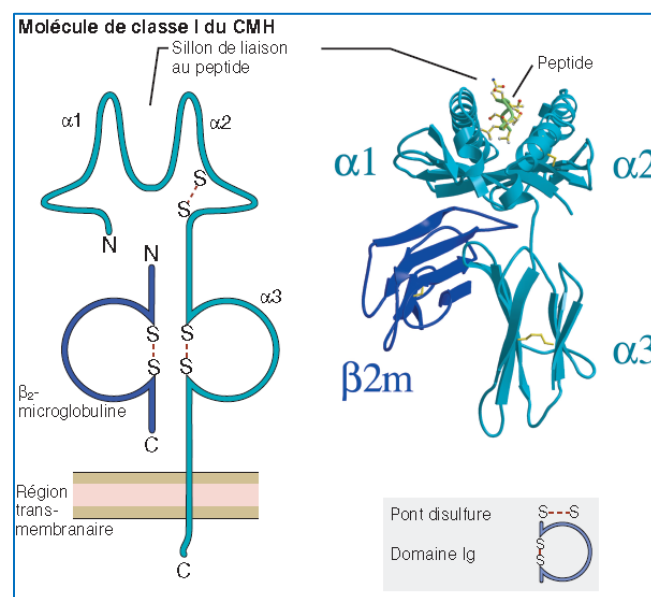


Figure 5 Structure de la molécule HLA I [13]

IV-2. Structure des molécules HLA de classe II

Les molécules HLA de classe II sont des protéines dimériques hétérogènes, elles sont constituées de deux chaînes polypeptidiques différentes α et β , codées par deux gènes distincts au sein du CMH. La chaîne α est une glycoprotéine de 33 kDa constituée de deux domaines extracellulaires, α 1 et α 2. La chaîne β est une glycoprotéine de 28 kDa constituée de deux domaines extracellulaires, β 1 et β 2 (Figure 6). Ce sont les domaines α 1 et β 1 qui constituent la poche à peptide, le peptide est long et déborde les extrémités de la poche.

Comme pour les molécules de classe I, le peptide est indispensable à la stabilité de la molécule.

Les molécules de classe II sont codées par les allèles du locus DP, DR et DQ, chaque locus abrite les gènes A et B codant respectivement les chaînes α et β (ex. DPA et DPB) [21].

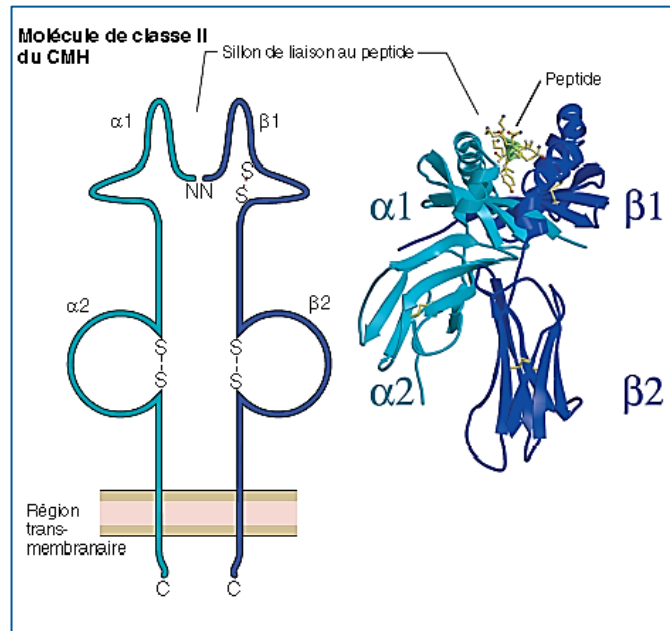


Figure 6 Structure de la molécule HLA II [13]

VI. Expression des molécules HLA

V-1. Expression des molécules HLA de classe I

Pratiquement toutes les cellules nucléées expriment des molécules HLA de classe I classiques, leur densité varie selon le type cellulaire. On observe une forte densité sur les lymphocytes, les monocytes/macrophages et les cellules dendritiques, une densité intermédiaire sur les cellules épithéliales et endothéliales, une densité faible voire nulle sur les cellules du pancréas, des glandes salivaires, les hépatocytes, la cornée, les hématies. La densité d'expression peut augmenter dans un contexte inflammatoire.

Il n'existe pas de généralités concernant l'expression des molécules de classe Ib. Commençons par la molécule HLA-E, découverte en 1988. Elle possède un polymorphisme très faible, et une répartition quasi ubiquitaire sur les cellules somatiques, mais est exprimée en bien moindre quantité que les molécules de classe Ia. Bien que neuf allèles différents soient connus, deux seulement semblent être récurrents [22].

Il est aussi intéressant de s'arrêter sur la molécule HLA-G, découverte en 1990. Longtemps considérée comme en «voie d'extinction», HLA-G a finalement suscité de l'intérêt lors de la

découverte de ses fonctions en particulier pendant la gestation [23]. Les cellules trophoblastiques n'exprimeraient d'ailleurs que des molécules de classe Ib. Dans des conditions physiologiques, on ne retrouve les molécules HLA-G que dans les cellules trophoblastiques, les cellules épithéliales du thymus et la cornée. Son expression transcriptionnelle est très largement représentée dans les tissus adultes et embryonnaires, en revanche la protéine n'est retrouvée qu'en surface d'un nombre restreint de cellules, notamment au niveau placentaire [24].

En effet, le gène HLA-G est soumis à une importante régulation post-transcriptionnelle qui donne lieu à sept isoformes différentes (Figure 7), quatre membranaires et trois solubles [22], et il possède un très faible polymorphisme avec uniquement 7 variants protéiques (versus 462 pour HLA-A et 789 pour HLA-B) [25].

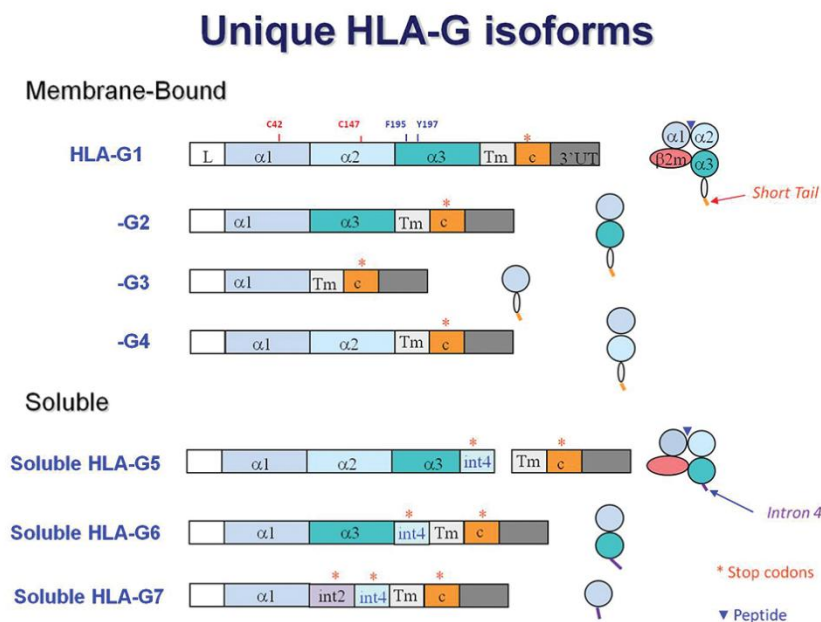


Figure 7 Diagramme schématique des isoformes du HLA-G [26]

Quant à la molécule HLA-F, qui demeure encore très peu étudiée. Ces molécules seraient transcrites dans la plupart des cellules et exprimées au niveau intracellulaire. Mais récemment, il a été démontré que contrairement à la plupart des lignées cellulaires, toutes les populations de lymphocytes (B, T et NK), les monocytes et les cellules du trophoblaste extravilleux expriment HLA-F à leurs surface [27].

Concernant la molécule HLA-H, elle semble être une exception à l'implication des molécules HLA dans le système immunitaire. Son rôle est plutôt important dans le métabolisme du fer [22].

V-2. Expression des molécules HLA de classe II

L'expression des molécules HLA de classe II est limitée à l'état basal aux cellules présentatrices d'antigène : cellules dendritiques, monocytes/macrophages et lymphocytes B. L'activation de ces cellules augmente la densité d'expression des molécules HLA II à leur surface.

Les lymphocytes T quiescents (natifs) n'expriment pas les molécules HLA II leur expression est induite par l'activation de ces cellules. Les cellules épithéliales et endothéliales n'expriment pas les molécules HLA II à l'état basal, mais peuvent les exprimer dans un contexte inflammatoire [18]. Enfin, il est admis que ce sont les molécules HLA DR qui sont les plus représentées à la surface cellulaire par rapport aux autres composants du groupe HLA de classe II [28].

VII. Fonctions des molécules HLA

VI-1. Présentation des antigènes

La principale fonction des molécules HLA est de présenter les antigènes protéiques sous forme de peptides aux lymphocytes T pour déclencher la réponse immunitaire spécifique de l'antigène dans ses phases effectrices et régulatrices.

La molécule HLA de classe I présente de manière préférentielle des peptides venant de protéines intracellulaires, c'est-à-dire dérivant des protéines produites de façon normale par la cellule mais aussi de protéines virales ou tumorales. Ces complexes HLA-peptide sont analysés par les lymphocytes T CD8+ qui mettront en jeu des processus de cytotoxicité et de sécrétion cytokiniques afin de détruire les cellules infectées ou transformées [29].

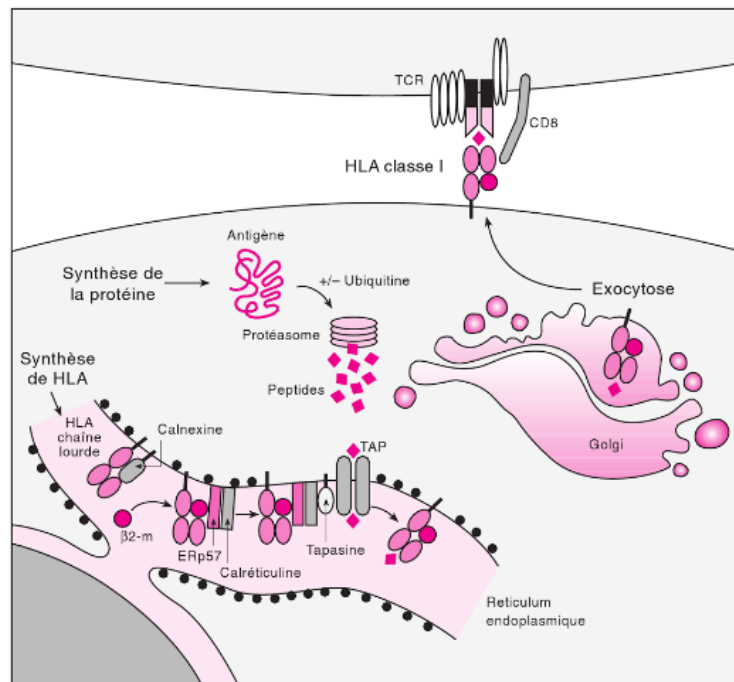


Figure 8 Voie de présentation de l'antigène par les molécules HLA I [29].

La molécule HLA de classe II présente de manière préférentielle des peptides venant de protéines extracellulaires, c'est-à-dire dérivant des protéines internalisées par les cellules présentatrices d'antigènes. Ces complexes HLA-peptide seront ensuite analysés par les lymphocytes T CD4+ qui ont un rôle central dans le développement des réponses immunitaires via la production de différentes cytokines qui orienteront le type de réponse mise en place [29].

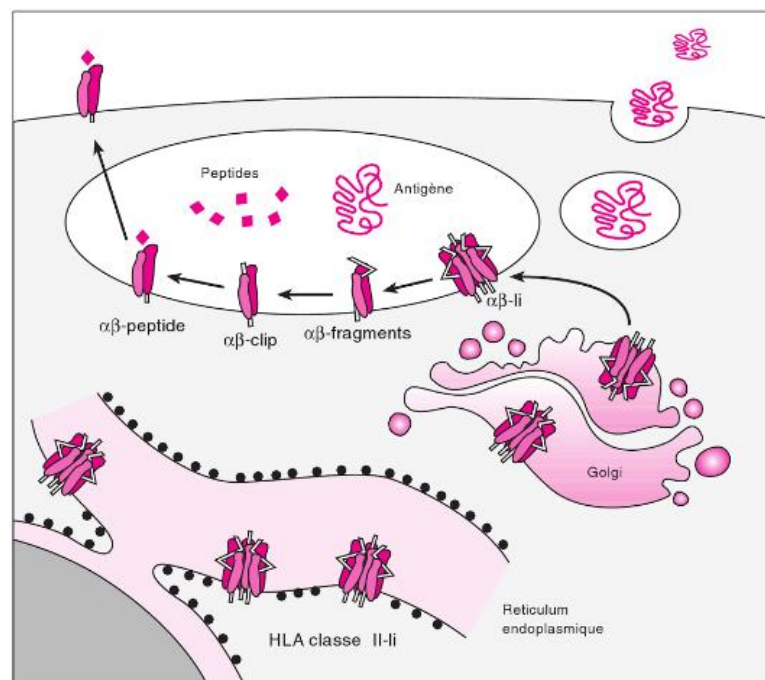


Figure 9 Voie de présentation de l'antigène par les molécules HLA II [29].

VI-2. Rôle des molécules HLA dans la sélection thymique

Au cours de plusieurs phases de leur maturation, les lymphocytes subissent une double sélection fondée sur l'interaction de leur TCR (*T Cell Receptor*) avec les complexes HLA-peptide[14], qui leur permet de conserver les spécificités utiles.

VI-2-1. Sélection positive

La sélection positive assure la restriction au HLA et repose sur l'interaction du TCR avec les complexes HLA-peptide des cellules épithéliales du cortex thymique. Seuls les thymocytes reconnaissant les molécules HLA du soi reçoivent un signal de survie et poursuivent leur maturation, alors que celles qui ne reçoivent pas ce signal meurent par «négligence». La nature des peptides présentés par l'HLA dans le cortex au cours de la sélection positive est différente de celle présentés au cours de la sélection négative (peptides du soi avec une faible affinité aux molécules HLA) [30]. Les complexes HLA-peptides ont donc une faible stabilité, et la reconnaissance de tels complexes ne pourra se faire que par des thymocytes dont le TCR a une forte affinité pour le complexe. Ce qui permet la sélection de ces lymphocytes [31].

VI-2-2. Sélection négative

La sélection négative élimine les lymphocytes T autoréactifs présentant une trop forte affinité pour les antigènes du soi. Elle repose sur l'interaction du TCR avec les complexes HLA-peptide des CPA (cellules présentatrices d'antigène) de la jonction cortico-médullaire du thymus (cellules endothéliales, cellules dendritiques, macrophages mais aussi cellules épithéliales médullaires) [32].

VI-3. HLA et les cellules Naturel Killers

Les molécules HLA de classe I ont pour autre mission la surveillance de l'intégrité cellulaire, en effet, ils sont reconnus par les récepteurs de surface des cellules *Natural Killer*. Ce sont les récepteurs inhibiteurs qui jouent un rôle fondamental de régulation de l'activité cytolytique et productrice de cytokines des cellules NK, divisés en deux familles: les récepteurs KIR (*killer cell immunoglobulin-like receptors*), et les récepteurs constitués d'une protéine appelée CD94 et d'une sous-unité à activité de lectine appelée NKG2. Les deux familles des récepteurs inhibiteurs contiennent dans leurs domaines cytoplasmiques des motifs structuraux appelés ITIM (*immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motifs*). Les ITIM phosphorylés (après liaison avec des molécules HLA de classe I) se lient à une protéine tyrosine phosphatase cytoplasmique dont ils favorisent l'activation. Ces phosphatases enlèvent les groupes

phosphate des résidus tyrosine des diverses molécules de signalisation et bloquent ainsi la stimulation des cellules NK par les récepteurs activateurs.

Par conséquent, lorsque les récepteurs inhibiteurs des cellules NK rencontrent des molécules HLA du soi, les cellules NK sont inhibées. De nombreux virus disposent de mécanismes qui bloquent l'expression des molécules de classe I dans les cellules infectées, ce qui leur permet d'échapper à la destruction par des lymphocytes T CD8⁺ cytotoxiques (CTL) spécifiques des virus. Quand cela arrive, les récepteurs inhibiteurs des cellules NK ne sont pas stimulés et, si le virus induit en même temps l'expression de ligands activateurs, les cellules NK deviennent activées et éliminent les cellules infectées par le virus (figure 11) [13].

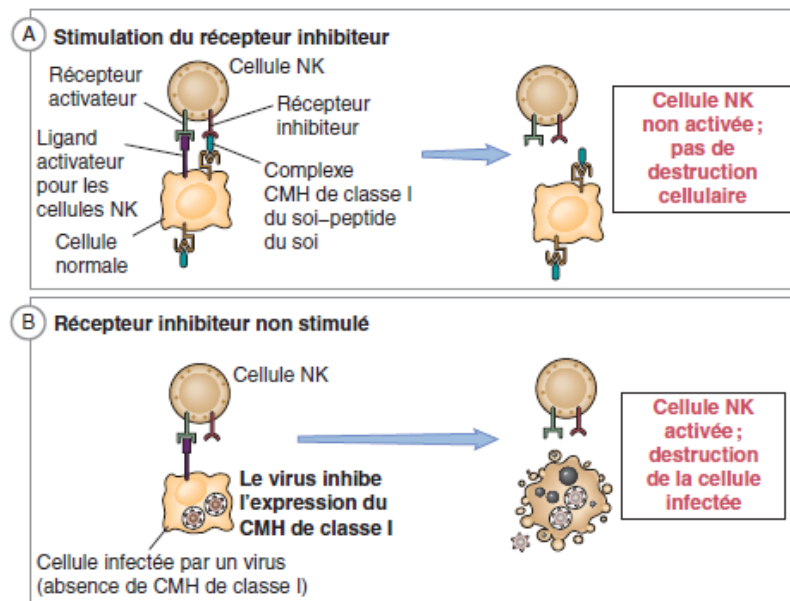


Figure 10 Récepteurs activateurs et inhibiteurs des cellules NK [13]

VIII. HLA et Médecine

Le complexe HLA est le système génétique humain dont les allèles ont été trouvés au plus grand nombre de maladies notamment auto-immunes (spondylarthrite ankylosante HLA-B27, sclérose en plaques HLA-DR2, diabète insulino-dépendant HLA-DR3/4, arthrite rhumatoïde HLA-DR4). Par ailleurs des déficits d'expression de gènes HLA existent tant au niveau constitutionnel (bare lymphocyte syndrome) que stomatique dans les tumeurs [29].

CHAPITRE II
IMMUNOLOGIE DE
LA GROSSESSE

I. Généralités

La grossesse ou plus précisément l'implantation embryonnaire est sous beaucoup d'aspects un cas d'exception et d'énigme par rapport aux principes de l'immunologie classique de la transplantation. Comment en effet concevoir que l'embryon, exprimant des protéines issues des gènes hérités pour 50% de sa mère et 50% de son père, et à ce titre véritable greffe semi-allogénique, ne soit pas rejeté par le système immunitaire maternel?

Sir Peter Medawar proposa quatre grandes hypothèses pouvant expliquer l'absence de rejet du fœtus par le système :

- I. Le fœtus serait isolé du système immunitaire maternel par la barrière du placenta.
- II. Les antigènes fœtaux, trop immatures, ne seraient pas reconnus par le système immunitaire maternel.
- III. Le système immunitaire maternel serait anergique et non réactif vis-à-vis des antigènes fœtaux.
- IV. Une tolérance materno-fœtale active serait nécessaire pour permettre le déroulement normal de la grossesse [18].

Plus tard, la grossesse a été décrite comme un état physiologique caractérisé par un déséquilibre des réponses TH1/TH2, la première qui favorise la réponse à médiation cellulaire étant réprimée au profit de la seconde qui stimule la réponse humorale. Cette hypothèse a été confirmée par la prépondérance des réponses anti-inflammatoires observées au cours de la grossesse [33].

La grossesse n'est plus considérée comme un seul événement immunologique via la balance TH1/TH2 mais comme un processus d'immuno-modulation qui évolue en trois périodes pendant la grossesse [34]. Un nouveau paradigme « TH1/TH2/TH17, lymphocytes T régulateurs (Treg) et cellules dendritiques (DC) » est proposé pour expliquer l'immuno-modulation particulière d'origine placentaire nécessaire à l'acceptation et au maintien de l'intégrité fœto-placentaire [35][36]. Les cellules trophoblastiques fœtales et les cellules immunes maternelles interagissent pour leur bénéfice réciproque pendant les 3 phases immunologiques distinctes de la grossesse.

Lors de la première phase (1er trimestre), l'implantation de l'embryon dans l'espace utérin et la placentation requièrent une réponse inflammatoire forte ; pendant la deuxième phase, qui correspond à la croissance et au développement fœtal durant le 2ème et 3ème trimestres, la mère, le placenta et le fœtus sont en symbiose avec des réponses anti-inflammatoires TH2 prédominantes ; enfin pendant la troisième phase, la préparation à l'accouchement, les réponses

Pro-inflammatoires sont nécessaires aux contractions de l'utérus et à l'expulsion du nouveau-né et du placenta [37]. Cette immuno-modulation fait intervenir de nombreux effecteurs cellulaires et moléculaires présents à l'interface materno-fœtale.

II. Interface fœto-maternelle

II-1. Aspects anatomiques

L'interface fœto-maternelle est constituée de cinq points de rencontre (Figure 11) :

- 1- le trophoblaste extravilleux qui envahit la decidua basalis où il rencontre les effecteurs maternels de l'immunité.
- 2- les artères spiralées au niveau desquelles les cellules endothéliales maternelles sont progressivement remplacées par du trophoblaste extravilleux.
- 3- le syncytiotrophoblaste, qui tapisse la surface des villosités, est en contact direct avec le sang maternel dès la douzième semaine de grossesse.
- 4- Le chorion tapissant la chambre intervillieuse et au contact de la décidua parietalis.
- 5- Les cellules trophoblastiques et fœtales ayant migré dans la circulation maternelle [38].

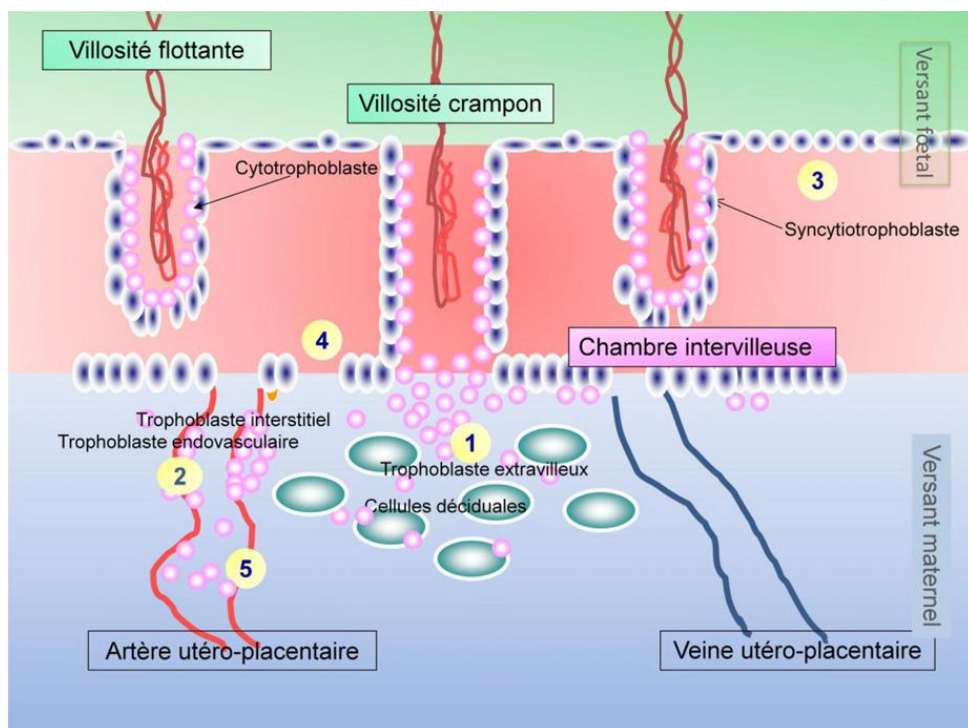


Figure 11 Interface fœto-placentaire, les cinq points d'interaction [39].

II-2. Aspects immunologiques

Les cellules trophoblastiques, dépourvues de molécules HLA de classe II, sont caractérisées par une distribution unique des molécules HLA de classe I. Les cellules du trophoblaste extravilleux, invasives et prolifératives expriment les molécules relativement peu polymorphes HLA-C, ainsi que les molécules HLA de classe I non classiques, HLA-G (également sous forme soluble) HLA-E et HLA-F [40].

Quant au syncytiotrophoblaste, il est dépourvu de toute expression membranaire de molécules HLA de classe I. Plusieurs groupes ont cependant identifié l'isoforme HLA-G1 soluble (également appelée HLA-G5), sécrétée dans le surnageant de culture du syncytiotrophoblaste en culture primaire.

Le syncytiotrophoblaste est en contact avec le sang maternel de l'espace intervilloux qui contient les différentes cellules effectrices du système immunitaire maternel. Les cellules du cytotrophoblaste extravilleux qui forment la membrane chorionique sont également en contact avec le sang maternel de l'espace intervilloux, alors que celles qui ont migré et envahi les artères maternelles spirales, pour remplacer les cellules endothéliales tapissant leur paroi, sont en contact direct avec le sang périphérique de la mère. Les cellules du trophoblaste extravilleux qui envahissent la decidua basalis sont, quant à elles, en contact avec les mêmes types de cellules du système immunitaire maternel. Toutefois, la distribution de ces cellules maternelles dans la decidua basalis diffère de celle observée dans le sang périphérique : cellules NK (~ 70 %), cellules de type macrophagique CD14+ (~ 20 %), cellules dendritiques (~ 1 %), cellules T CD4+, y compris T régulatrices (~ 10 %), cellules T $\gamma\delta$, cellules NK tueuses, rares cellules T CD8+ et cellules B [41].

III. Tolérance fœto-maternelle

Le fœtus devra se protéger contre de possibles infections virale, parasitaire ou bactérienne malgré un système immunitaire encore immature. L'avancée des connaissances en immunologie de la reproduction a permis de montrer qu'il n'existait pas un mécanisme unique à l'origine de cette tolérance mais que la grossesse est le résultat d'un équilibre complexe et évolutif des systèmes de reconnaissance entre la mère et le fœtus mettant en jeu de nombreux acteurs de l'immunologie, cellules ou molécules[42].

Actuellement, il est bien établi que l'utérus est un site favorable sur le plan immunitaire grâce à une action conjointe de facteurs fœtaux et maternels[43] (Figure 12); dont Les acteurs immunitaires présents coopèrent dans l'environnement protégé de la décidua sous la houlette du

trophoblaste pour mettre en place un réseau de mécanismes d'acceptation de l'unité fœto-placentaire et de développement mutuel[39].

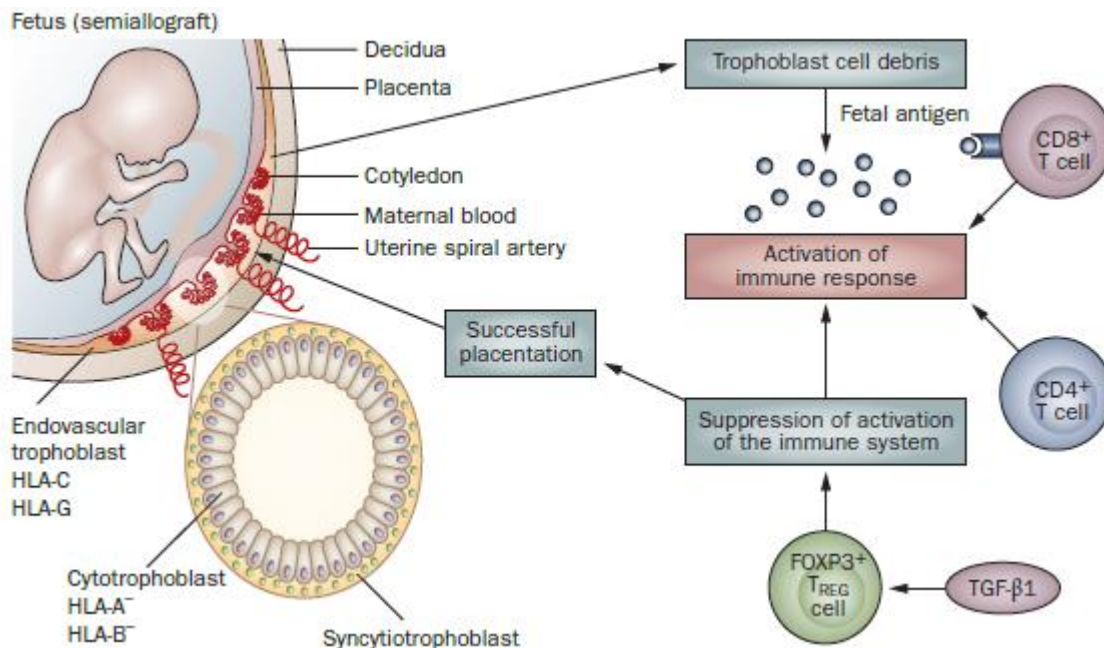


Figure 12 Schéma des différents mécanismes immunosuppresseurs mis en place au cours de la grossesse [44].

IV. Mécanismes de la tolérance

IV-1. Expression sélective des molécules HLA par les cellules trophoblastiques

La répression de l'expression des molécules HLA rend moins immunogènes les cellules fœtales et devrait contribuer à les rendre « reconnaissables » par les cellules NK. En effet, les cellules NK sont régulées par les récepteurs capables de reconnaître les molécules HLA de classe I. L'absence de ces dernières induit l'activation des cellules NK et la lyse de la cellule cible. Tout comme les cellules NK circulantes, les cellules NK utérines contiennent de la perforine stockée dans des granules et sont capables de cytotoxicité. Toutefois, leur action lytique reste modérée vis-à-vis des cellules trophoblastiques. Cet apparent paradoxe trouve une explication par l'expression des molécules HLA de classe I classique comme HLA-C, ou non classique comme HLA-E ou -G à la surface du cytotrophoblaste en contact direct avec les NK utérins [18]. Toutefois, il est à noter que les cellules trophoblastiques, lorsqu'elles expriment des molécules HLA de classe I en surface soit par transfection soit par stimulation par IFN- γ (Interféron), sont résistantes à la lyse par des lymphocytes T cytotoxiques

spécifiques ou par des cellules NK [45], ce qui suggère l'existence de mécanismes de résistance à la lyse par les cellules cytotoxiques effectrices indépendants des molécules HLA de classe I [46].

VI-2. Implication de l'HLA-G

L'HLA-G trophoblastique interviendrait à plusieurs niveaux :

- sur les cellules NK, HLA-G modifie le comportement des cellules NK déciduales :

En bloquant la migration transcapillaire des cellules NK [47], et la cytotoxicité des cellules NK tueuses [48],

En transmettant par trogocytose aux cellules NK un fragment de membrane trophoblastique incluant HLA-G1, ces cellules NK devenues HLA-G+ deviennent suppressives [49].

- sur les cellules T :

HLA-G inhibe la prolifération des cellules T CD4+ et la cytotoxicité des cellules T CD8+.

- avec les cellules endothéliales :

Des cellules trophoblastiques en culture sécrétant de HLA-G soluble induisent l'apoptose de cellules endothéliales [50]; La prééclampsie, caractérisée par des anomalies du remodelage des vaisseaux utérins par le trophoblaste, est associée à un déficit de l'expression de HLA-G soluble [51].

- avec les cellules trophoblastiques :

À mesure que les cellules du trophoblaste extravilloux migrent en profondeur, elles expriment de plus en plus d'HLA-G. HLA-G prévient un envahissement excessif en régulant de façon autocrine l'invasion déciduale et le remodelage vasculaire [52].

VI-3. Rôle des cellules présentatrices des antigènes

Les CPA déciduales ont la particularité de pouvoir se différencier soit en cellules induisant une réponse immunitaire de défense, soit en cellules induisant une tolérance spécifique des antigènes qu'elles présentent. Le microenvironnement de la décidua est un élément déterminant l'attraction, la prolifération et la différenciation des cellules CPA [38].

VI-3-1. Les cellules dendritiques.

Selon le niveau de leur maturation les cellules dendritiques (DC) soit activent, soit suppriment la réponse spécifique aux antigènes. Les DC matures ou semi matures (CD83+ et CD209-) présentent les antigènes aux cellules T naïves, en apportant les deux signaux nécessaires à une activation complète. Les DC immatures qui expriment faiblement les antigènes HLA II et

fortement le récepteur CD209 en ne délivrant que le signal induisant une tolérance spécifique [53]. Dans l'endomètre les formes matures de cellules dendritiques (CD83+) prédominent, tandis que dans la décidua, dès le premier trimestre, les cellules immatures (CD83- CD209+) deviennent majoritaires [54].

La décidua de femmes avortant de façon répétitive contient plus de cellules DC matures que celle de femmes témoins ayant des grossesses normales [55].

Les cellules dendritiques jouent un rôle important dans la régulation de l'immunité (Figure 13):

- en libérant du TGF- β (*transforming growth factor*) qui inhibe les cellules cytotoxiques et promeut le développement des cellules T régulatrices (Treg) ;
- en interagissant avec les cellules NK. Le maintien de l'immaturité des cellules DC (iDC) garant d'un bon développement de la grossesse dépend de signaux envoyés par les cellules NK [56].
- en régulant l'équilibre Th1/Th2 par présentation d'antigène aux cellules T naïves qui les orientent vers la voie des cellules T régulatrices et vers la voie Th2 [39].

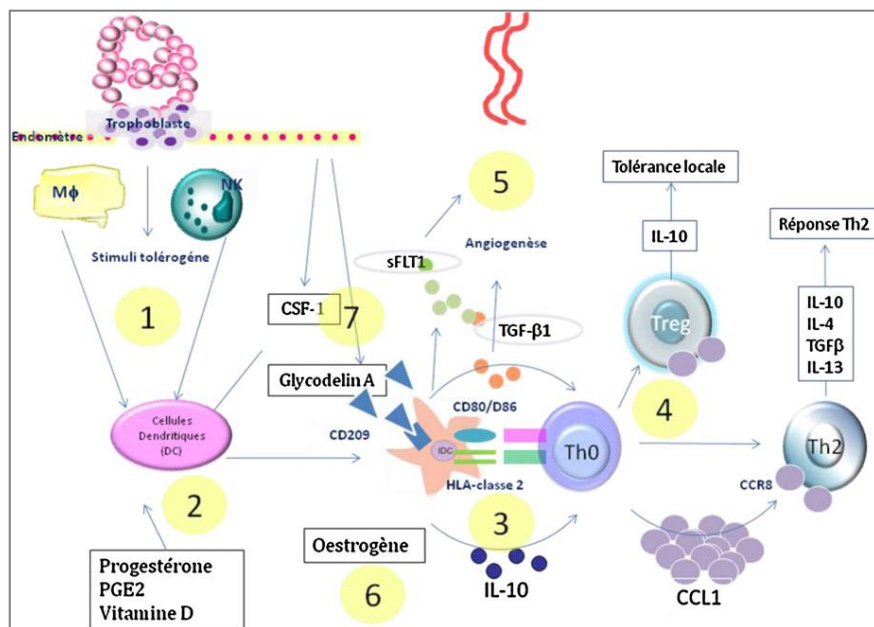


Figure 13 Fonctions immunitaires des cellules dendritiques déciduales [39]

VI-3-2. Les macrophages

Les macrophages déciduaux sont des monocytes circulants ayant émigré dans l'utérus. Par les nombreuses molécules qu'elles sécrètent (CSF-1, MIF, CCL2, CCL3, CCL5), les cellules trophoblastiques participent au recrutement, à la prolifération et à la différenciation des macrophages déciduaux [57]. Un concept d'activation des macrophages selon deux voies M1 et M2 a été proposé (Figure 14). Stimulés par les cytokines Th1 IFN- γ et TNF- α , les macrophages prennent la voie M1 et sont impliqués dans la réponse inflammatoire avec

production élevée de $TNF-\alpha$, $IL-1\beta$, $IL-8$, $IL-12$. La stimulation par les cytokines Th2 ($IL-4$, $IL-10$ et $IL-13$) oriente les macrophages vers la voie M2 [58]. Au cours de l'implantation, les macrophages sont induits vers l'activation M1. Cependant, comme les cellules trophoblastiques sont attachées à la muqueuse de l'endomètre et envahissent le stroma utérin, les macrophages passent à un profil mixte M1 / M2. Le schéma de polarisation mixte traverse le premier trimestre et la première phase du deuxième trimestre de la grossesse lorsque la vascularisation utérine subit un remodelage afin d'établir un approvisionnement en sang fœto-placentaire adéquat. Après la placentation, les macrophages se déplacent vers la polarisation M2, ce qui empêche le rejet du fœtus et permet la croissance du fœtus jusqu'à l'accouchement, qui est considéré comme un événement pro-inflammatoire, et précédé d'une accumulation de macrophages M1 dans l'utérus. Ce processus inflammatoire favorise la contraction de l'utérus, l'expulsion du bébé, l'éjection du placenta, et l'involution utérine [59].

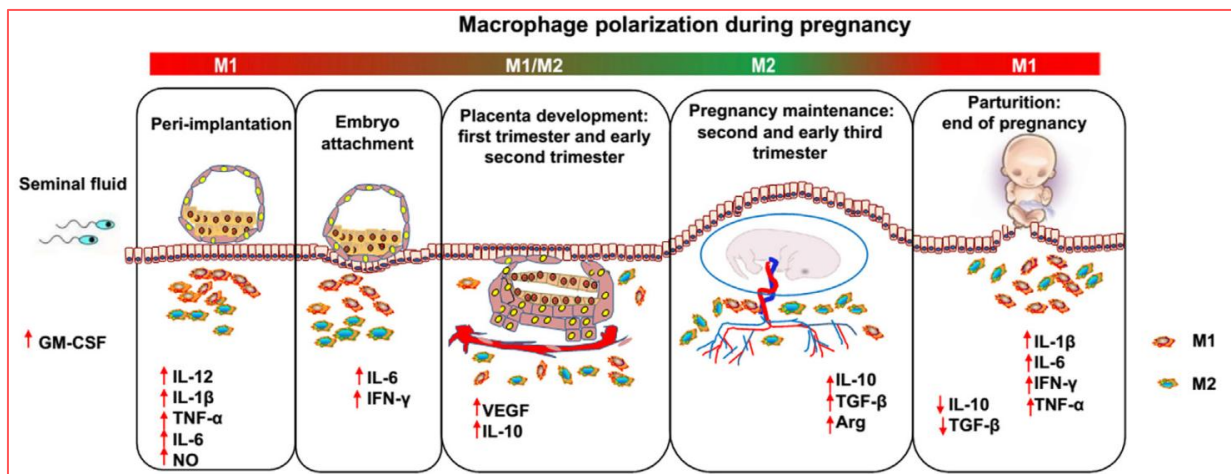


Figure 14 Dualité (M1/M2) du fonctionnement des macrophages durant la grossesse [59].

VI-4. Rôle des cellules NK

Le nombre des cellules NK utérines dans la déciduale est maximal en début de grossesse puis diminue à partir de la 20^{ème} semaine jusqu'à disparition au terme. Ces cellules ont un immuno-phénotype particulier puisqu'elles expriment fortement le marqueur CD56 mais pas CD16, contrairement aux cellules NK périphériques (pNK). Ces cellules dNK (déciduales) diffèrent des cellules pNK par les cytokines et chémokines qu'elles sécrètent, par les gènes et par les récepteurs qu'elles expriment [60].

Les cellules dNK sont peu cytotoxiques vis -à- vis du trophoblaste qui est protégé par (Figure 15) :

- l'interaction des antigènes HLA I classiques (HLA-C) et non classiques par l'expression des récepteurs KIR (*killer-cell inhibitory receptors*) Cette interaction bloque la cytotoxicité des cellules NK et des cellules CD8 et augmente ainsi la tolérance vis-à-vis de l'embryon [61].
- Les dNK, ont la capacité fonctionnelle et unique pour soutenir le processus d'invasion trophoblastique par la production de certains cytokines TNF- α , TGF- β et IFN- γ (inhibitrices) et d'autres stimulantes, comme IL-6, IL-8 et IL-10.
- Ils participent également dans le remodelage des artères spiralées maternelles et l'angiogenèse pendant la grossesse par production de le VEGF (*vascular endothelial growth factor*), le PLGF (*placental growth factor*), l'angiopoïétin-2 et NkG5. cet événement permet aux cellules trophoblastiques de migrer à travers les vaisseaux et envahissent la decidua [62].

Les travaux sur les avortements spontanés ont objectivé des anomalies quantitatives des cellules dNK et des anomalies du répertoire des récepteurs exprimés par les cellules dNK. Les cellules dNK de ces femmes exprimeraient moins de récepteurs inhibiteurs KIR [63].

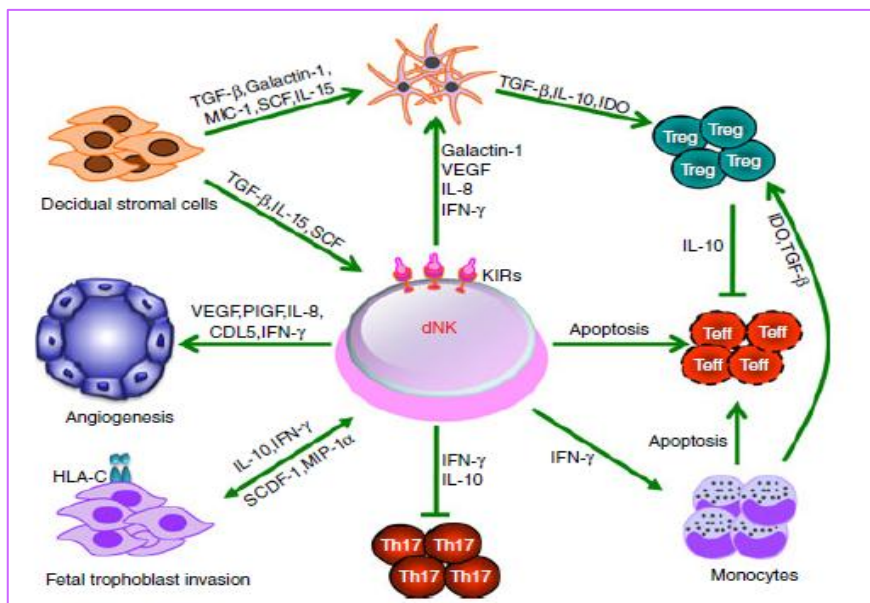


Figure 15 Les voies clés des cellules NK déciduales impliquées dans la tolérance immunitaire pendant le 1er trimestre de grossesse [64].

VI-5. Rôle des cytokines : balance Th1/Th2 et rôle du Th17

Les cellules T CD4⁺ helper sont classées selon les cytokines qu'elles produisent. Les cellules Th1 sécrètent IL-2, TNF- β et IFN- γ . Les cellules Th2 produisent IL-4, IL-5, IL-13 et IL-10, et les cellules Th17 sécrétrices de l'IL-17, TNF- α , GM-CSF, IL-21, IL-22 et IL-26. Les

effecteurs dépendant de Th1 sont impliqués dans le rejet des allogreffes, tandis que ceux dépendant des cellules Th2 seraient essentiels dans l'induction d'une tolérance aux allogreffes. Lors du premier trimestre les cellules Th2 et Th17 ne représentent que 5% et 2%, respectivement des cellules T CD4+ déciduales, tandis que les cellules Th1 comprennent de manière surprenante 5-30% des cellules[65]. Par analogie aux phénomènes observés dans les greffes, un modèle binaire a été proposé pour les grossesses : la réponse Th1 de nature inflammatoire serait néfaste pour la grossesse, alors que la réponse Th2 anti-inflammatoire serait favorable (Figure 16). La comparaison de la production de cytokines par les cellules T CD4+ déciduales en situation normale et pathologique apporte quelques éclairages : En cas d'avortements à répétition une diminution de sécrétion de cytokines Th2 a été observée dans la décidua, qui ne l'est pas au niveau des lymphocytes périphériques, suggérant la présence de facteurs locaux capables d'orienter la réponse des cellules T. Les cellules trophoblastiques et l'embryon orienteraient la production des cytokines vers Th2 [66].

Le Th17, a également été décrit comme ayant un rôle pathogène au stade précoce du rejet d'allogreffe. Cette première preuve suggère que l'activité Th17 excessive peut favoriser l'avortement. Par conséquent, les cellules Th17 pourraient être impliqués dans l'induction de l'inflammation dans le stade tardif de l'avortement, mais pas dans le stade précoce et donc pas dans le rejet du fœtus. Très récemment, ils ont observé une production associée de l'IL-4 et l'IL-17 par un grand nombre de cellules CD4 + déciduales (appelées cellules Th17 / Th2) pendant la grossesse normale et au niveau du site d'implantation de l'embryon, alors que les cellules Th17 / Th1 sont répandus dans les avortements répétés. La différenciation des cellules Th17 / Th2 semble être due au HLA-G5 dans la grossesse normale [66].

Lors d'une infection, l'immunité gestationnelle semble être dirigée vers la lutte contre les agents pathogènes microbiens extracellulaires par des réponses immunitaires à médiation Th17 dans l'environnement intra-utérin ce qui suggère que les cellules Th17 / Th2 pourraient être essentielles pour le succès de la grossesse, car ils peuvent promouvoir une réponse adéquate pour protéger la mère contre les agents pathogènes extracellulaires dangereux et induire une tolérance fœto-maternelle [67].

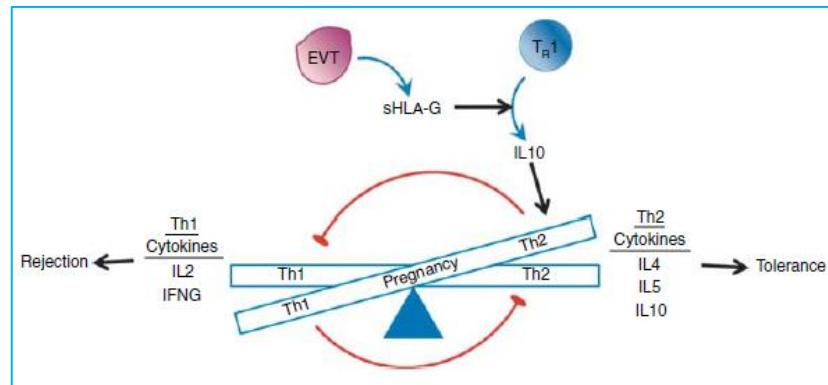


Figure 16 Différenciation des cellules T CD4+ helper en cellules Th1 et Th2 [68].

VI-6. Cellules T régulatrices

Pendant la grossesse humaine normale les cellules T régulatrices (Treg) s'accumulent dans la décidua où elles représentent 20 % des cellules T CD4+. En fin de grossesse les cellules Treg déciduales diminuent. Cette chute des cellules Treg pourrait être impliquée dans le déclenchement du travail puisque qu'elle est moins importante en cas de césarienne programmée [69]. Certains avortements à répétition humains sont associés à des déficits en cellules Treg déciduaux ou circulants [39].

Le maintien des cellules Treg dans la décidua est contrôlé par plusieurs mécanismes:

- 1) recrutement des cellules Treg à partir du sang périphérique. Les cellules Treg expriment des récepteurs pour des chémokines (CCL4, CCL5, CXCL1 et CXCL8) produites en quantité par le trophoblaste [70].
- 2) en induisant la différenciation des cellules T naïves en cellules Treg. Le surnageant de culture de trophoblaste induit la transformation des cellules T CD4+ naïves en cellules CD4+Foxp3+ qui ont donc le phénotype des cellules Treg, possédant le caractère fonctionnel et capables de bloquer la prolifération des cellules T effectrices [71].
- 3) La Prostaglandine E2 (PGE2) également produite par le trophoblaste a une action synergique de celle de TGF- β sur l'effet inducteur de différenciation en cellules Treg [72].
- 4) La TGF- β connue depuis pour ses propriétés immunosuppressives et anti-inflammatoires, est essentielle dans cette orientation préférentielle vers Treg CD4+CD25+ FoxP3+ [38].

VI-7. Autres mécanismes protecteurs

VI-7-1. Apoptose au niveau de l'interface fœto-placentaire

L'apoptose ou mort cellulaire programmée est un mécanisme actif grâce auquel les cellules superflues ou non fonctionnelles sont éliminées pour maintenir la normalité des tissus.

Les trophoblastes humains expriment le *ligand* de Fas (FasL ou CD95L) pendant la grossesse alors que les lymphocytes T activés expriment Fas (CD95). L'expression de FasL, sous sa forme membranaire ou sécrétée, induit l'apoptose des lymphocytes via ligation à Fas et empêche donc l'infiltration et le trafic des lymphocytes maternels, ce qui semble jouer un rôle important dans la tolérance du fœtus [73]. Un dysfonctionnement du couple CD95/CD95-L pourrait être rencontré dans les maladies associées à des anomalies de la placentation et dans les avortements dus aux anti-phospholipides et aux mutations du facteur V de Leiden [74].

VI-7-2. Rôle de l'inhibition du complément

En début de grossesse normale, l'activation du complément témoigne ou participe à l'inflammation [75]. Plus tard, les alloanticorps maternels cytotoxiques dirigés contre les antigènes HLA de classe I du fœtus pourraient en formant des complexes immuns activer le complément. Ces complexes immuns et le complément activé pourraient en cas d'emballement du système détruire le trophoblaste. Au cours des grossesses normales ; des dépôts placentaires de facteur du complément sont observés mais l'activation est maîtrisée. Chez l'Homme, les trois molécules régulatrices, CD55, CD46 et CD59 ont été localisés sur le trophoblaste aux endroits stratégiques de contact avec le sang ou les tissus maternels [76]. Au cours des avortements associés à la présence d'anticorps anti-phospholipidiques, le complément est suractivé selon la voie classique [77]

VI-7-3. Modulation hormonale de la réponse immunitaire pendant la grossesse

Les hormones, en particulier l'œstradiol (E2), la progestérone (P4) et l'hCG, affectent la fonction des cellules du système immunitaire pendant la grossesse. Elles suppriment les allo-réactions maternelles néfastes et induisent une certaine immunotolérance : elles permettent la réduction du nombre de cellules dendritiques matures mais aussi le blocage de la dégranulation des cellules NK (Figure 17). Les hormones de la grossesse sont responsables de la prolifération des cellules NK utérines et de l'activation des lymphocytes T reg et B reg. Elles sont impliquées dans le recrutement des mastocytes et des lymphocytes T reg vers l'interface materno-fœtale. Le rôle de l'hCG, de la P4 et de l'E2, dépend très probablement de leur concentration : à des concentrations physiologiques, elles modulent la balance des cytokines Th1/Th2 au profit d'un profil propice à la grossesse. Par contre, l'hCG est néfaste à des concentrations élevées car elle stimule la production d'auto-anticorps [78].

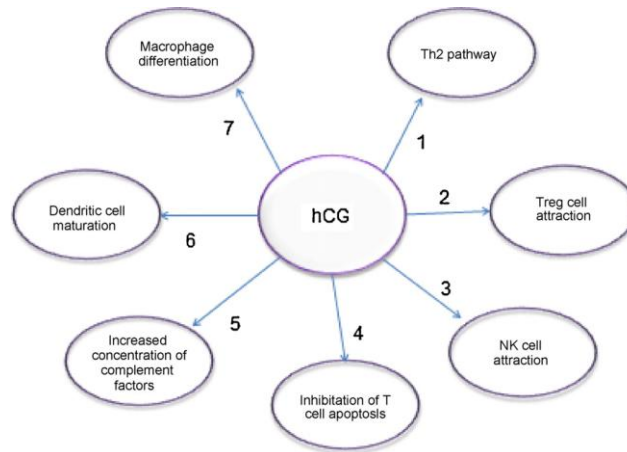


Figure 17 Importance de l'hCG dans l'induction de la tolérance [39].

VI-7-4. Galectine

La galectine-1 (Gal-1), une lectine se fixant sur les glycanes membranaires (N-acetyl-lactosamine), est produite par le trophoblaste, les cellules dendritiques, les cellules T activées, les cellules NK déciduales, les cellules endothéliales et stromales déciduales. La Gal-1 agirait de plusieurs façons :

- en induisant l'apoptose des cellules T activées déciduales.
- en orientant la sécrétion des cytokines vers la voie des cytokines Th2.
- en modulant le fonctionnement des macrophages et des cellules dendritiques.

VI-7-5 Activité de l'enzyme indoleamine 2, 3, dioxygénase (IDO)

L'IDO participe au catabolisme du tryptophane, acide aminé essentiel pour le fonctionnement des cellules T. Elle induit une tolérance en réduisant la quantité de tryptophane disponible localement et en produisant des métabolites toxiques compromettant l'activation des cellules T et la cytotoxicité des cellules NK. IDO est présent dans les macrophages, les cellules dendritiques et le trophoblaste [79]. Il agit de plusieurs façons illustrées dans la (Figure 18).

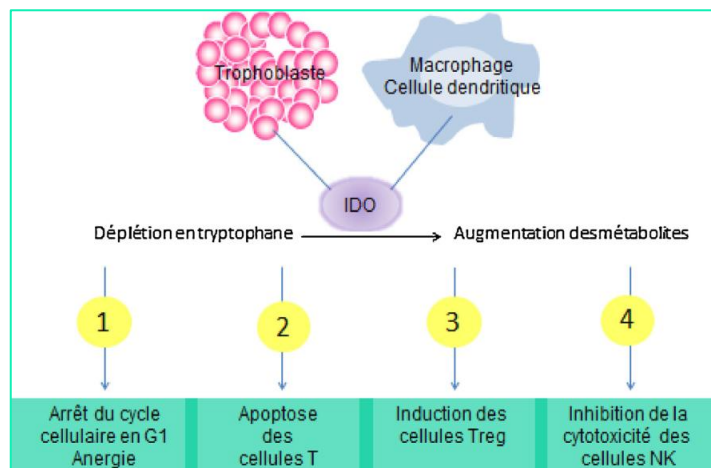


Figure 18 Mécanismes moléculaires de l'immunosuppression induite par IDO [38].

CHAPITRE III
Allo-immunisation
Fœto-maternelle
Anti-HLA

I. Généralités

Durant la grossesse, les antigènes étrangers exprimés par le fœtus sensibilisent généralement la mère. L'antigène de surface plaquettaire HPA-1a, impliqué dans la plupart des cas thrombocytopénie allo-immune néonatale, provoque une réponse d'anticorps chez environ 12% des femmes HPA-1A négatives [80]. Avant que l'immunoglobuline Rh (RhIG) a été introduit, environ 17% des femmes D- sont devenues sensibilisées à l'antigène D suite à une grossesse avec un fœtus D+ [81]. Mais les antigènes fœtaux qui déclenchent le plus souvent une sensibilisation maternelle sont les antigènes HLA. Plus de 24% des femmes précédemment enceintes ont des anticorps IgG circulants détectables contre HLA [82]. Les anticorps anti- paternels ont d'abord été détectés en 1958. Ces anticorps ont été détectés chez 15 à 30% des femmes enceintes par un test de cytotoxicité [83]. Cependant, un pourcentage de 54% était détecté par analyse à base de Luminex, qui a augmenté avec le nombre d'enfants, atteignant 74% chez les femmes ayant plus de 2 accouchements [84]. Par ailleurs la proportion des mères immunisées a atteint 84%, par SAB (*single Antigen Bead assay*)[85]. Toutefois, on a remarqué que certains des niveaux de sensibilisation n'ont peut-être pas été déterminés avec succès car des études antérieures ont utilisé des méthodes à faible sensibilité ou ont été réalisées tardivement après l'accouchement [84].

La grossesse est la seule source naturelle de production d'anticorps anti-HLA. Et les femmes multipares sont de très bons donneurs de sang à long terme, mais en raison des grossesses multiples, elles peuvent développer des titres plus élevés que d'habitude des anticorps anti-HLA contre les antigènes HLA fœtaux d'origine paternelle [86], et ils peuvent provoquer des réactions indésirables telles que la réaction transfusionnelle ou le rejet d'organes transplantés, en outre ces anticorps peuvent être utilisés comme antisérums pour le typage HLA[87]. Il s'ensuit donc que la détection d'anticorps anti-HLA chez les femmes multipares est très significative.

II. Quand est ce que la sensibilisation maternelle aux antigènes fœtaux peut avoir lieu ?

L'entrée du matériel fœtal dans la circulation maternelle existe, à mesure que les microparticules sont libérées des syncytiotrophoblastes et versées dans le sang périphérique maternel [88]. Les cellules fœtales (microchimérisme), ADN fœtal, et les débris de cellules apoptotiques se jettent dans la circulation (figure 19) [89]. La présence de ces antigènes fœtaux, ainsi que le traitement et la présentation des alloantigènes du CMH par les

macrophages, permettent la reconnaissance de l'antigène spécifique du fœtus par le système immunitaire maternel adaptatif [4].

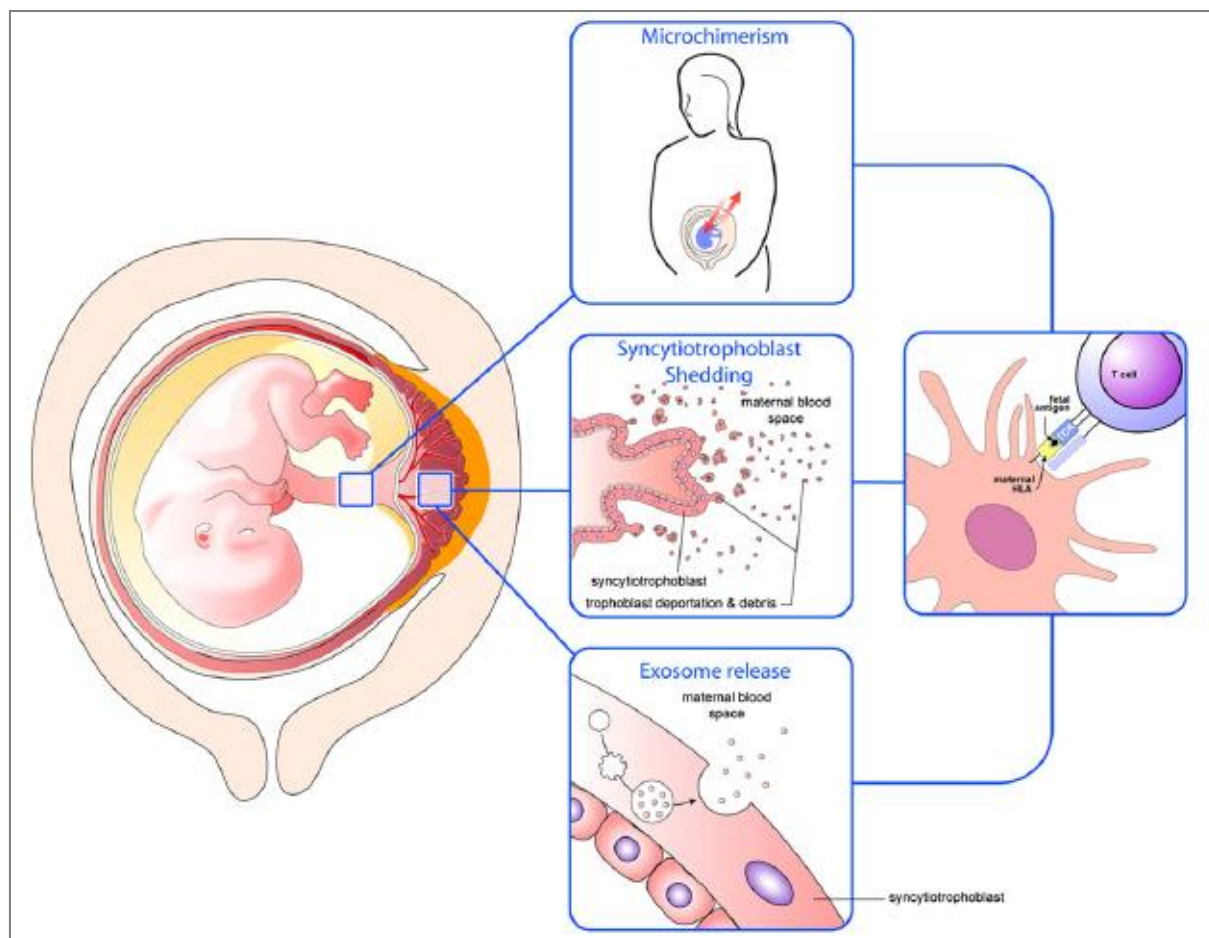


Figure 19 Modèle d'exposition des antigènes et des cellules du fœtus au système immunitaire maternel [90].

Le développement des anticorps anti-HLA ne diffèrent pas entre le premier et le deuxième trimestre de grossesse [91]. Tandis que leurs incidence augmente après 28 semaines de grossesse, cette augmentation est probablement due à l'augmentation du trafic cellulaire fœto-maternel au cours du dernier trimestre [92].

La sensibilisation maternelle peut se produire également lorsque le sang du fœtus et la mère se combinent après la rupture du placenta. Le plus souvent, cela se produit à l'accouchement, bien qu'une hémorragie fœto-maternelle (FMH) suivie d'une sensibilisation puisse survenir plus tôt dans la gestation. L'ultrastructure des villosités choriales montre que le sang fœtal doit passer par des ruptures dans les cellules endothéliales capillaires, la matrice extracellulaire

(ECM) et le syncytiotrophoblaste (ST) (figure 20) [93]. Les FMH sont généralement imprévisibles [94].

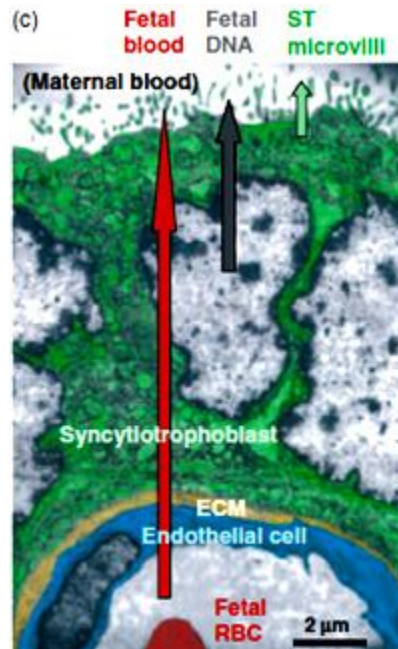


Figure 20 Micrographie électronique de la partie externe d'une villosité [95].

III. Incidence de l'immunisation anti-HLA

Environ 30% des femmes en bonne santé développent des anticorps anti-HLA pendant la grossesse. Ces anticorps peuvent encore être présents au moment d'une nouvelle conception [96]. Par conséquent, l'incidence des anticorps HLA dans le premier trimestre est plus élevée chez les femmes multipares que chez les femmes nullipares [97].

Une plus grande positivité des IgG HLA de classe I et II était détectée dans les échantillons obtenus au moment de l'accouchement, qu'avant 16 semaines de grossesse [98]. Il a été détecté aussi que la fréquence cumulée des sérums d'anticorps HLA positifs augmentait encore davantage après l'accouchement, et à 4 semaines après l'accouchement [99]. Cela signifie que la plus forte incidence d'anticorps anti-HLA est après l'accouchement, lorsque l'entrée de matière du fœtus dans la circulation maternelle est au maximum, en coïncidence avec les anticorps rhésus. De plus, pendant le rejet du greffon, les anticorps spécifiques du donneur peuvent ne pas être détectés par un tamisage systématique du sérum car le greffon les a absorbés. Après élimination de la source d'antigène, ces anticorps deviennent plus facilement détectables. Ainsi, le niveau d'anticorps spécifiques de l'enfant

déecté après l'accouchement pourrait être plus élevé en raison de l'absorption par le placenta pendant la grossesse [4].

IV. Facteurs influençant le développement de l'immunisation anti-HLA

IV-1. Nombre de grossesses

L'incidence de l'immunisation augmente avec le nombre de grossesses et le nombre d'enfants [84], des anticorps anti-HLA ont été détectés chez 32,2% des femmes avec un nombre de grossesses ≥ 4 [82], et chez 65,6% des femmes avec un nombre ≥ 5 grossesses [100].

IV-2. Fausse couche et immunisation anti-HLA

En étudiant l'incidence de l'immunisation anti-HLA après la grossesse, Masson et al. ont trouvé que l'apparition d'une fausse couche directement avant le premier accouchement a diminué de façon significative l'incidence de l'immunisation, qui n'a pas été le cas après deux ou plusieurs accouchements [84]. Ce qui a été aussi prouvé durant une étude sur l'effet d'une seule fausse couche antérieure sur la formation d'anticorps HLA lors d'une première grossesse réussie où ils ont trouvé que le pourcentage de l'HLA immunogène était significativement plus faible chez les femmes bipares avec une fausse couche antérieure par rapport aux femmes bipares sans une fausse couche antérieure[101].

D'autre part, dans l'étude de Nielsen et al.[102], un sous-groupe de femmes avec avortement récurrent secondaire avec un garçon avant la fausse couche, a montré une prévalence significativement plus élevée des anticorps HLA par rapport aux témoins sains multipares. Les auteurs expliquent cette prévalence plus élevée des anticorps HLA à la suite d'un degré plus élevé de microchimérisme qui se produit chez 50 - 70% des femmes enceintes[103] et peut persister jusqu'à 27 ans après l'accouchement[104]. Le trafic de cellules fœtales dans la circulation maternelle peut entraîner son activation, un niveau plus élevé d'anticorps HLA peut donc être simplement le résultat d'un niveau plus élevé de microchimérisme, sans lien de causalité et sans aucune pertinence clinique [4].

IV-3. Âge et groupes sanguins ABO / Rh

Les statistiques indiquent que la possibilité de créer des anticorps HLA augmente avec la multiparité, l'âge et les groupes sanguins ABO/Rh [86].

Dans une étude, la prévalence de l'anticorps HLA a été comparée chez les femmes D- vs D+ déjà enceintes pour déterminer si la RhIG (Immunoglobuline Rh= anti-D) supprime la sensibilisation au HLA. Ils ont trouvé ; et conformément à un effet immunosuppresseur non

spécifique de la RhIG ; que les femmes D- enceintes plus jeunes étaient moins susceptibles d'être sensibilisées à l'HLA que les femmes D+ enceintes .Dans l'ensemble, leurs données sont cohérents avec l'hypothèse que la RhIG peut supprimer la sensibilisation HLA pendant la grossesse. Si réelle, cependant, l'effet de la RhIG sur la sensibilisation HLA semble modeste et beaucoup plus petit que l'effet exercé par la grossesse ou le nombre d'accouchement. Par ailleurs, l'observation d'une sensibilisation plus faible à l'HLA chez les jeunes femmes D-précédemment enceintes peut être due au hasard ou à d'autres facteurs inconnus [105].

IV-4. HLA-G soluble

Les niveaux de sHLA-G (HLA-G soluble) sont augmentés pendant la grossesse, participant à l'effet tolérogène de l'HLA-G [106]. Avec un dosage semi-quantitatif, Terasaki et al. ont décrit une association de sHLA-G avec un faible développement d'anticorps chez les patients transplantés [107]. Tandis que Masson et al. et avec un test ELISA (*Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*) quantitatif, n'ont pas pu confirmer l'association du niveau inférieur de sHLA-G avec la fréquence d'immunisation, mais ils ont trouvés que parmi les femmes immunisées, celles ayant les plus forts anticorps (qui pourraient être détectés par CDC) avaient les niveaux de sHLA-G les plus bas, suggérant un rôle réglementaire de sHLA-G dans la synthèse des anticorps pendant la grossesse [84].

IV-5. Phénotype HLA

Le phénotype HLA de la mère et de l'enfant est également connu pour influencer l'immunisation anti-HLA [108], tout comme les molécules HLA du receveur influence sur la réponse à la transplantation.

Le développement des anticorps anti-HLA pendant la grossesse semble être associé à l'expression d'allèles HLA particuliers, pour évaluer si certains phénotypes HLA sont corrélés avec un risque plus élevé de développement de l'alloanticorps, des analyses d'allèles de femmes ayant des grossesses ont été fait, et il a été détecté que les allèles A * 11 et DRB1 * 04 semblent être liés à une augmentation du risque de production d'anticorps, tandis que l'allèle B * 14 était associé à un faible risque de développement d'anticorps anti-HLA comme allèle B * 51 [109].

Le risque de développer des anticorps anti-HLA pendant la grossesse est fortement corrélé au nombre des mismatches de séquence d'acides aminés (triplets) entre le HLA de la mère et l'IPA (inherited paternal antigens) du fœtus, tel que déterminé par l'HLA Matchmaker. Ces

triplets sont des épitopes d'anticorps conformationnels linéaires potentiels qui ne sont pas partagés avec le HLA de la mère [110].

IV-6. Le polymorphisme du gène du promoteur de l'IL-6

Dans une étude récente [84], ils ont trouvé que le polymorphisme du gène du promoteur IL-6 G / C 174 est significativement associé à l'occurrence de l'immunisation. IL-6 joue un rôle clé dans la différenciation des cellules B et l'allèle muté (de 174C) est responsable des niveaux inférieurs d'IL-6 circulant [111], fournissant ainsi une raison d'avoir moins d'alloimmunisation humorale chez les femmes porteuses de la mutation 174C.

IV-7. Anticorps HLA et le nombre de PIRCHE-II

Le Centre Médical Universitaire d'Utrecht (UMC) a développé une nouvelle méthode pour sélectionner les mismatches autorisées. Cette technologie appelée PIRCHE® (*predicted indirectly recognizable HLA epitopes presented by HLA class II*) s'applique à la transplantation des cellules souches hématopoïétiques, à la transplantation d'organes solides et à d'autres domaines améliorant l'acceptation du greffe et l'efficacité thérapeutique. Elle prévoit des réponses immunitaires liées aux lymphocytes T contre les peptides dérivés de l'HLA après la transplantation. Contrairement aux technologies existantes, la voie indirecte de l'allo-reconnaissance est focalisée, ceci prend en compte un autre aspect fonctionnel important des molécules HLA: ils chargent les peptides dans leurs sillons de liaison caractéristiques pour le présenter aux récepteurs antigène-peptide spécifiques des lymphocytes T [112].

Au-delà des cellules souches et rénales, de nouvelles études montrent que le mécanisme introduit par PIRCHE® décrit également la formation d'anticorps HLA spécifiques à l'enfant pendant la grossesse, où il a été constaté que le développement de ces anticorps anti-HLA pendant la grossesse augmente avec le nombre de PIRCHE-II[110].

IV-8. Immunisation anti-HLA et le diabète gestationnel

Le diabète gestationnel (DG) peut être associé à une tolérance immunitaire temporairement réduite aux alloantigènes dans la période de la grossesse. Afin de révéler si une augmentation de la réponse immunitaire maternelle anti-fœtale était détectable en présence de DG, Steinborn et al. ont examiné si le DG était associée à l'activation des monocytes dans la circulation fœtale et si la présence d'anticorps anti-HLA était de plus en plus détectable chez les patientes atteints de DG. Leurs résultats suggèrent que, dans le cas de DG, les monocytes fœtaux ont été activés par des anticorps maternels anti-HLA paternel après liaison croisée

avec des cellules fœtales via des récepteurs Fc. Pour élucider ce mécanisme potentiel, les anticorps anti-HLA de classe I et II ont été évalués dans la circulation maternelle des patientes atteints de DG. Comme une augmentation de l'apparition d'anticorps anti-HLA-classe II ; mais pas de classe I ; été détectée dans la circulation maternelle, ils suggèrent qu'une augmentation de la réponse immunitaire humorale de la mère contre les HLA fœtales de classe II peut être décisivement impliquée dans la pathogenèse du DG [113].

V. Effets de l'allo-immunisation

Les réponses immunitaires maternelles peuvent être formées contre les antigènes paternels du fœtus pendant la grossesse, conduisant à des anticorps spécifiques de ces antigènes et aux cellules T. Malgré la pertinence clinique des anticorps spécifiques de l'HLA dans les résultats de la transplantation, la pertinence clinique des anticorps spécifiques du HLA paternel dans les résultats de la grossesse n'est actuellement pas claire [4].

V-1. Effet bénéfique

Certaines études suggèrent que la présence d'anticorps spécifiques dirigés contre le HLA paternel pourrait être bénéfique pour une grossesse en améliorant le développement de tolérance immunologique materno-fœtale. Les anticorps anti-HLA ne sont généralement pas délétères pendant la grossesse et de façon curieuse, la reconnaissance de l'HLA par les femmes enceintes de leur descendance semi-allogénique semble être importante pour une grossesse réussie [114], la fécondité est réduite chez les couples consanguins, les avortements spontanés étant plus susceptibles en cas de concordance de l'HLA de la mère et du fœtus [115]. La transmission verticale (mère au fœtus) du VIH a été trouvée plus grande (31%) avec une correspondance HLA maximale de la mère et du fœtus par rapport à la protection offerte par aucun match HLA de classe I, avec seulement 3% de transmission [116]. Les grossesses avec incompatibilité de l'HLA-C ont été associées à l'induction de lymphocytes Treg à la décidua maternelle [117]. Ainsi, de manière plutôt surprenante, l'incompatibilité materno-fœtale de la classe I de HLA améliore la fonction placentaire et est bénéfique tant pour la mère que pour le bébé [95].

V-2. Anticorps anti-HLA et thrombocytopénie allo-immune fœto-maternelle

Le rôle joué par les anticorps anti-HLA dans la thrombocytopénie allo-immune fœto-maternelle FMAIT (*Fetomaternal Alloimmune Thromboeytopenia*) reste une question de controverse, même si ces alloanticorps sont connues pour provoquer une destruction immunitaire des plaquettes de donneurs transfusés incompatibles avec l'HLA, ce qui a

également été révélé pour compliquer le traitement transfusionnel fœtal [118]. En examinant la littérature, Tanning a trouvé que plusieurs rapports de cas et des enquêtes sur des cas suspects de FMAIT suggérant que les allo-anticorps HLA peuvent provoquer une thrombocytopénie néonatale. En revanche, dans tous les rapports, la preuve que la FMAIT est médiatisée par des allo-anticorps maternelles anti-HLA a été indirecte et faible. Par conséquent, on peut conclure que les allo-anticorps HLA et la thrombocytopénie allo-immune fœto-maternelle sont encore un mythe [119].

V-3. Anticorps anti-HLA maternels et le poids de naissance réduit

Comme il a été précédemment démontré qu'une association entre les anticorps maternels contre la HPA-1a et la réduction du poids à la naissance chez les garçons existe [120], Dahl et al. voulaient explorer s'il existe des associations similaires entre les anticorps maternels anti-HLA de classe I et le poids de naissance en cas de thrombocytopénie néonatale, à la fin de leurs études, ils ont constaté que les anticorps maternels anti-HLA de classe I sont associés à une réduction du poids à la naissance chez les nouveau-nés atteints de FNAIT. Ils suggèrent que d'autres études sont nécessaires pour révéler si ces anticorps survenant pendant la grossesse peuvent affecter la croissance du fœtus ou si leur présence est simplement un épiphénomène [121].

V-4. Les anticorps HLA et l'avortement spontané récurrent

L'avortement spontané récurrent « RSA » (*reccurent spontaneous abortion*) est défini comme une séquence de trois ou plus d'avortements spontanés consécutifs. Le RSA est une condition hétérogène qui peut avoir plusieurs causes possibles, lors d'une étude faite pour identifier le rôle des anticorps anti-HLA chez les femmes avec RSA, une fréquence élevée d'anticorps anti-HLA chez ces femmes (26,25%) a été détectée par rapport aux femmes enceintes sans antécédents d'avortement (8,0%). Cette incidence élevée pendant les premières semaines de gestation peut expliquer la perte de grossesse récurrente [122].

V-5. Allo-anticorps HLA maternels et naissance prématurée

La naissance prématurée se produit dans 5 à 13% des accouchements et elle est la principale cause de mortalité et de morbidité périnatale dans le monde [123]. L'accouchement prématuré spontané est de nature syndromique[124], ce qui signifie que l'activation de la voie commune de l'accouchement peut être causée par de multiples processus pathologiques en particulier les troubles liés à l'immunité et parmi ces troubles le rejet maternel anti-fœtal[125], qui pourrait être causé par le développement de la mère des anticorps anti-HLA fœtaux, il a été démontré

que la présence des anticorps anti-HLA de classe I ou de classe II pendant le deuxième trimestre de grossesse est un facteur de risque d'accouchement prématuré spontané, en particulier pour la naissance prématurée tardive qui représente 70% de tous les accouchements prématurés. Ces observations appuient le concept selon lequel le rejet maternel du fœtus est un mécanisme de la pathologie lors des accouchements prématurés spontanés tardifs [126].

VI. Formation des anticorps anti-HLA

Les IPA du fœtus sont capables de stimuler les réponses immunitaires maternelles à l'interface fœto-maternelle ainsi qu'à la circulation maternelle [127]. Ces réponses immunitaires peuvent conduire à la production d'anticorps HLA spécifiques à l'enfant [128]. La production maternelle d'anticorps HLA spécifiques à l'enfant de l'isotype IgG nécessite une interaction entre les cellules B activées et les cellules T-helper apprêtées (primed T-helper cells) (figure 21). Tout d'abord, l'activation des cellules B se produit lors de l'absorption antigénique de l'IPA par le récepteur des cellules B [129]. Par la suite, lors de la reconnaissance par les cellules T d'IPA dégradé présentées sur des molécules HLA de classe II, les cellules T-helper fournissent une co-stimulation via une interaction CD40-CD40L et sécrètent des cytokines. Ces signaux entraînent une prolifération et une différenciation des cellules B naïves en cellules de mémoire et des plasmocytes et induisent la commutation d'isotype IgM à IgG. Ainsi, la production maternelle d'anticorps HLA IgG spécifiques à l'enfant nécessite l'activation des cellules B par des cellules T-helper où les cellules B et les cellules T-helper répondent au même antigène, un phénomène appelé reconnaissance liée [130].

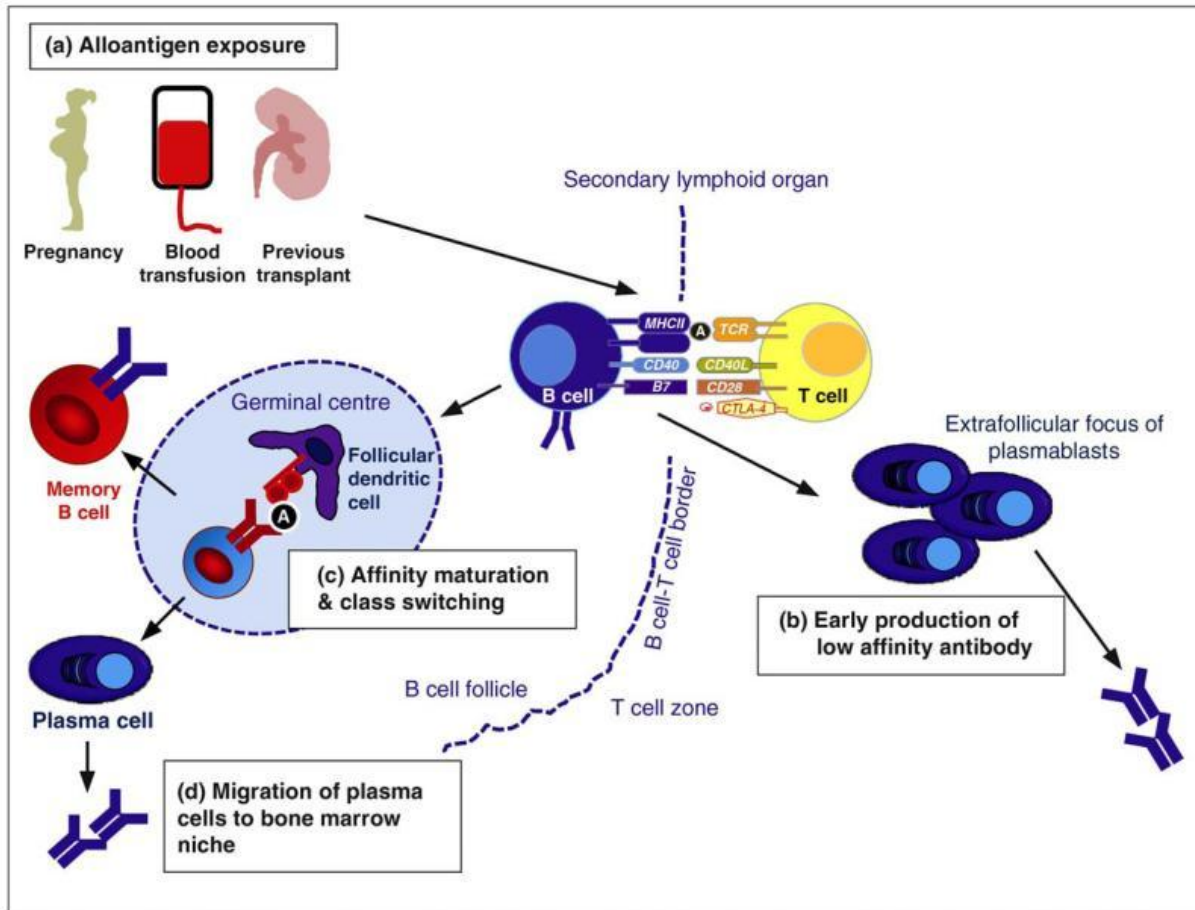


Figure 21 Activation des cellules B et production d'alloanticorps [131].

VII. Détection des anticorps anti-HLA chez la femme enceinte

Les anticorps anti-HLA apparaissent rarement avant la 28^{ème} semaines de la grossesse [99] , La plupart de ces anticorps deviennent détectables au cours du troisième trimestre ou après l'accouchement. Il a été constaté que plus le temps est écoulé depuis la dernière grossesse, moins il est probable que les anticorps anti-HLA seront détectables [132], Bien que les lymphocytes T cytotoxiques (*primed cytotoxic T-lymphocytes*) spécifiques de ces antigènes puissent persister pendant plus de 10 ans, même si les anticorps ont disparu [133].

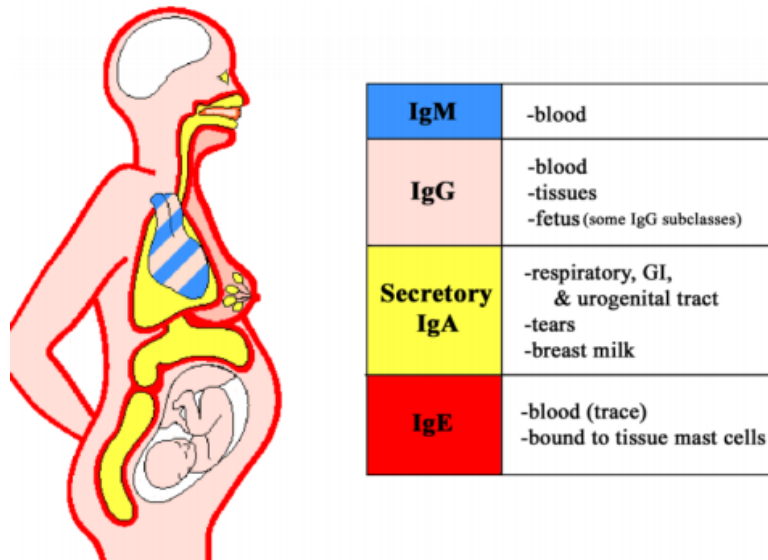


Figure 22 La distribution sélective des isotypes d'immunoglobulines dans le corps [61].

VIII. Techniques de détection des anticorps anti-HLA

Les différentes techniques d'étude de l'immunisation anti-HLA diffèrent par le type de cible (cellules ou support solide), le principe, la sensibilité et la spécificité. Il est d'ailleurs souvent intéressant de conjuguer plusieurs techniques complémentaires.

Les techniques cellulaires comportent la lymphocytotoxicité (LCT) et la cytométrie en flux (CMF), ainsi que les techniques utilisant des supports solides comprennent les techniques ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay*) et Luminex® [134].

VIII-1. Technique de lymphocytotoxicité

La lymphocytotoxicité complément dépendante ou cytotoxicité dépendant du complément (CDC) a été largement utilisée et considérée comme technique de référence depuis la fin des années 1960 pour le *cross-match* et les recherches d'anticorps anti-HLA[135].

Les anticorps anti-HLA sont recherchés sur un panel d'environ 35 cellules (lymphocytes T ou lymphocytes totaux pour la classe I et lymphocytes B pour la classe I et la classe II ou pour la classe II après absorption sur des pools de plaquettes) issues de donneurs dont le typage HLA est connu, et du complément de lapin. La mortalité cellulaire causée par les anticorps anti-HLA est ensuite évaluée à l'aide de colorants vitaux (Figure 23), le résultat communiqué est le pourcentage de puits contenant des cellules lysées au sein du panel, ou PRA (*Panel Reactive Antibody*) [136].

Lorsque les anticorps sont des IgM (et non des IgG) la réaction est rendue négative par le Dithiotreitol (DTT), qui rompt les ponts disulfure entre les 5 immunoglobulines composant les IgM [137].

Cette méthode présentait la méthode de référence pour la détection de ces anticorps, pour de nombreux avantages (test fonctionnel, identification des anticorps fixant le complément, détection d'anticorps non HLA, détection des IgG et des IgM)[138] , cependant ses limites sont nombreuses : faible reproductibilité, existence d'antigènes rares non représentés par le panel, incapacité d'identifier avec précision l'ensemble des antigènes cibles, faux positifs.

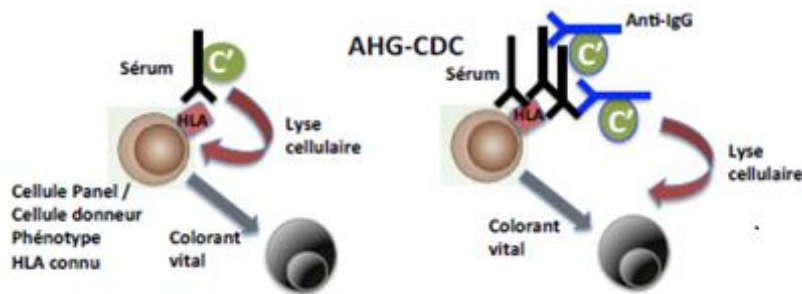


Figure 23 Technique de Microlymphocytotoxicité.

VIII-2. Cytométrie en flux

Dans les années 80, les techniques de cytométrie en flux ont été développées pour pallier les inconvénients de la LCT. Utilisées pour tester la présence d'anticorps dirigé contre les lymphocytes sans avoir recours à l'utilisation du complément [139], elles ont rapidement été abandonnées car l'utilisation de panels de lymphocytes était beaucoup plus lourde qu'avec la LCT. La recherche des anticorps anti-HLA par CMF est faite sur des microsphères de latex recouvertes d'antigènes HLA purifiés (32 microsphères classe I + 32 microsphères classe II). Les anticorps présents dans le sérum qui se lient aux antigènes HLA fixés sur les microsphères sont révélés en utilisant un anticorps anti IgG humaines marqué à l'isothiocyanate de fluorescéine FITC. Le PRA est déterminé par le pourcentage de microsphères qui réagissent positivement avec le sérum [140].

VIII-3. Technique ELISA

La technique d'ELISA a été mise au point au début des années 1970 par deux chercheurs de l'université de Stockholm, Eva Engvall et Peter Perlmann. La technique ELISA repose sur l'utilisation des antigènes HLA fixés au fond des puits de plaques de plastique. Lorsque des IgG anti-HLA sont présentes dans le sérum, elles se lient aux antigènes fixés au fond des puits dont elles sont spécifiques. Après une phase de lavage destinée à éliminer les

immunoglobulines fixées de façon non spécifique vient la phase de réaction avec un anticorps secondaire anti-IgG humaine couplé à une enzyme. Cet anticorps secondaire se lie aux IgG du sérum testé fixées aux antigènes HLA et entraîne, après une nouvelle phase de lavage visant à éliminer les anticorps secondaires non liés, une réaction colorée en présence d'un substrat lors de la phase de révélation. La mesure de la réaction colorée finale se fait à l'aide d'un spectrophotomètre [141]. L'ELISA donne deux différents résultats : qualitative ou quantitative selon que l'on utilise ou non une courbe d'étalonnage (ou gamme étalon). Cette dernière doit être réalisée avec une solution de concentration connue de la molécule que l'on cherche à doser (Figure 24).

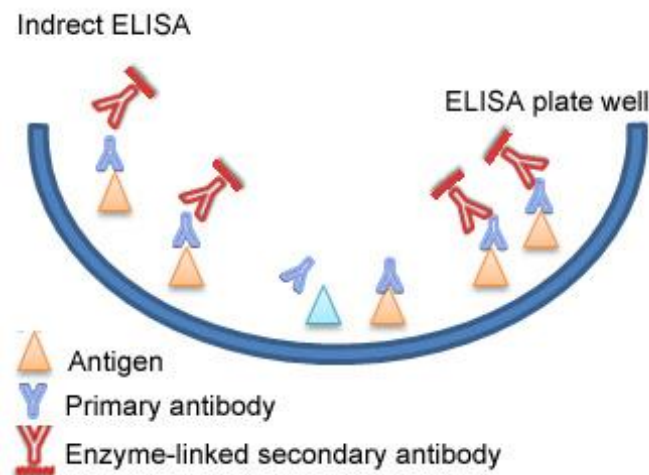


Figure 24 Test ELISA indirect [142]

VIII-4. Technologie Luminex™

La technologie Luminex™ s'avère être la technique la plus sensible de toutes [143]. Elle est fondée sur le principe de la cytométrie de flux alliant l'utilisation de microbilles fluorescentes en polystyrène et une double lecture après excitation par deux faisceaux laser. En variant la proportion des deux fluorochromes, on obtient une gamme possible de 100 catégories de microsphères, chacune étant caractérisée par un code couleur selon l'intensité de fluorescence émise. Chaque type de bille est recouvert d'antigènes HLA différents. La présence d'anticorps spécifiques dans le sérum testé sera révélée par des anticorps anti-IgG humaines conjugués à la phycoérythrine. Le laser rouge à diode excite les fluorochromes incorporés dans les billes induisant l'émission de fluorescence rouge et infrarouge ce qui permet l'identification du type de bille [135]. Le laser vert excite la phycoérythrine permettant la détection d'anticorps anti-HLA fixés sur un type de billes spécifique (**Figure 25**). Ce second signal donne une idée de la

quantité d'anticorps fixé par la mesure de la fluorescence exprimée en intensité moyenne de fluorescence (MFI) [136].

Les avantages de la technique Luminex™ sont nombreux. Elle est plus sensible pour la détection des anticorps anti-HLA que les autres techniques utilisées. Elle permet de mieux analyser les sérums des patients fortement immunisés et d'identifier plus précisément des spécificités d'anticorps[144].

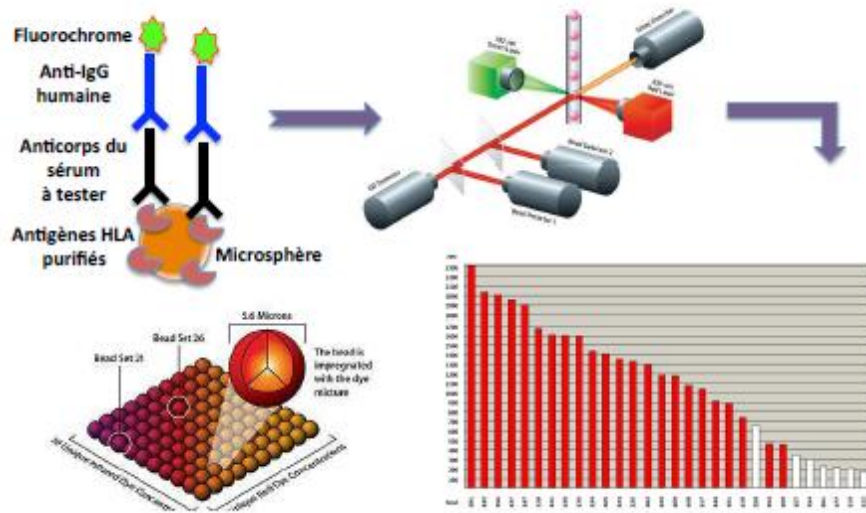


Figure 25 Principe de La technologie Luminex™



**PARTIE
PRATIQUE**

MATERIEL ET METHODES

I. Lieu et type d'étude

L'étude a été effectuée au niveau du LABORATOIRE D'IMMUNOLOGIE, Unité HASSIBA BEN BOUALI du CHU de Blida, la période de novembre 2016 au septembre 2017.

Il s'agit d'une étude descriptive transversale réalisée sur une population de femmes multipares.

II. Matériel

II-1. Matériel biologique

II-1-1. Population étudiée

Cent dix (110) femmes multipares ont été prélevées, soit durant le 3^{ème} trimestre de la grossesse ou bien après l'accouchement (1 à 4 jours), au niveau du service de Gynécologie obstétrique unités (gynécologie, GHR, post-accouchée) au sein de la même structure (**Annexe 7**).

Après avoir obtenu le consentement éclairé de toutes les femmes participantes, des échantillons de sang ont été prélevés.

La recherche des anticorps anti-HLA, par technique ELISA, s'est limitée à 64 prélèvements en raison de manque de réactifs.

II-1-2. Critères d'inclusion

Femmes multipares qui ont fait plus de deux grossesses (avortement inclus).

II-1-3. Dossiers des patientes

Le recueil des données s'est fait à partir des :

- Fiche de renseignement comportant : Nom, Prénom, adresse, âge, groupage, nombre de grossesses, d'avortements, de parités et antécédents transfusionnels et médicaux (**Annexe 1**).
- Fiche de consentement (**Annexe 2**)

II-1-4. Prélèvements

Prélèvement du sang total sur un tube sec, les sérums obtenus ont été répartis dans des appendorfs numérotés et congelés à - 80°C. (**Annexe 3**)

II-2. Matériel non biologique

II-2-1. Réactifs utilisés (Annexe 4)

II-2-1-1. Kit ELISA pour dépistage (screening) des anticorps anti-HLA

- Lambda Antigen Tray Mixed Classe I et II : **LATM10X5** lot 011

II-2-1-2. Kit ELISA pour identification des anticorps anti-HLA

- Lambda Antigen Tray Single Antigen Classe I: **LAT1HD**, Lot 006.
- Lambda Antigen Tray Classe I: **LAT140**, Lot 006.
- Lambda Antigen Tray Classe II: **LAT240**, Lot 005.

II-2-2. Appareillage

- Lecteur ELISA spécial pour la lecture des plaques Terasaki.
- Logiciel HLA Fusion™ version 3.0 pour l'interprétation des résultats.

III. Méthode**III-1. Recherche des anticorps anti-HLA par technique ELISA****III-1-1. Principe du test**

Le test LAT™ met en œuvre des réactifs ELISA pré-étalonnés pour la détection dans le sérum humain des anticorps IgG dirigés contre les antigènes HLA de classe I ou de classe II. Des quantités définies d'antigènes HLA purifiés par affinité, sont déposées dans différents puits d'une plaque TERASAKI. La détection de la fixation spécifique des anticorps du sérum à l'un des antigènes, se fait par incubation avec l'anticorps conjugué à la phosphatase alcaline qui ne reconnaît que l'IgG humaine. L'addition d'un substrat spécifique de l'enzyme provoque une réaction colorimétrique qui est mesurée par spectrophotométrie. La spécificité de l'anticorps est déterminée par analyse du schéma de réactivité LAT™ en utilisant la feuille de travail LAT correspondante (**Annexe 5**).

III-1-2. Mode opératoire

1. répartir 10 µl d'échantillon (dilué) ou de réactif contrôle dans les puits appropriés de la plaque LAT™. (Changer d'embout pour éviter la contamination croisée des réactifs)
2. couvrir la plaque et incuber pendant une heure à une température située entre 20 et 25 °C.
3. éliminer le diluant, les sérums à tester ou le sérum contrôle des puits, en retournant les plaques et en les tapotant (flickage). Envelopper la plaque d'une serviette en papier absorbant. Environ un lambda (1 µl) de liquide doit rester dans les puits. Laisser les plaques retourner ou recouvertes jusqu'à l'addition du réactif suivant. Ne pas les laisser sécher.

4. ajouter 15 à 20 µl de tampon de lavage 1X avec un répartiteur ou bien verser le tampon directement et remplir la plaque. Agiter doucement et rejeter la solution de lavage en excès, puis éliminer la solution de lavage comme il est indiqué ci-dessus (flickage).répéter l'étape 4 de lavage.
5. répartir 10 µl de conjugué à la phosphatase alcaline dilué dans chaque puits. Ne pas conserver le réactif dilué.
6. couvrir la plaque et incuber pendant 40 min à une température située entre 20 et 25 °C.
7. éliminer le conjugué comme indiqué à l'étape 3. Ne pas laisser sécher les plaques.
8. effectuer 2 lavages successifs, comme indiqué à l'étape 4. Environ un lambda (1 µl de liquide doit rester dans les puits).
9. répartir 10 µl de substrat d'enzyme dans chaque puits de la plaque LATTM. Ne pas conserver le réactif en excès.
10. couvrir la plaque et incuber à 37°C pendant 10 à 15 min, à l'abri de la lumière

Remarque : ne pas laisser la réaction se développer sans surveillance pendant plus de 15 min. les puits contrôle positif doivent être bleu foncé, les puits contrôle négatif transparents. Il est important d'arrêter la réaction colorimétrique avant l'apparition d'un bruit de fond non spécifique.

11. arrêter la réaction par 5 µl de solution d'arrêt dans chaque puits de plaque LATTM.couvrir la plaque et Attendre 15 min pour stabiliser la réaction.
12. lire les résultats dans l'heure qui suit au moyen d'un lecteur ELISA adapté aux plaques TERASAKI. Enlever le couvercle pour la lecture. (**Annexe 6**)

III-3. Interprétation des résultats

Après réalisation de la technique ELISA, l'interprétation des résultats obtenus s'effectue grâce à logiciel **HLA fusion** qui met en œuvre les modalités suivantes pour la validation de la technique :

III-3-1. Validation du test

La valeur moyenne du contrôle HLA Positif est divisée par la valeur moyenne du contrôle HLA Négatif après déduction du bruit de fond (puits 1A et 1B), suivant la formule ci-dessous:

$$\text{Rapport POS/NÉG} = \frac{\text{Moy. Pos. HLA} - \text{Moy. NAC (ou Blanc)}}{\text{Moy. Nég. HLA} - \text{Moy. NAC (ou Blanc)}}$$

- ✚ Le rapport POS/NÉG doit être >5.
- ✚ Les valeurs moyennes des puits Contrôle de Qualité (QC) doivent toujours être >1000 (généralement >2000).
- ✚ La valeur moyenne des puits Contrôle HLA Positifs doit toujours être >800 (de préférence >1500).
- ✚ La valeur moyenne des puits Contrôle sans Antigène (Blanc) doit être <250 avec le diluant, et <500 avec le sérum à tester.

III-3-2. Détermination des valeurs seuil du test

Les valeurs seuils sont calculées en pourcentage de la réactivité du Sérum Contrôle qui est fourni (SC) et testé dans les puits HLA positifs, après déduction du bruit de fond du sérum (ou diluant).

Les données imprimées donnent les valeurs brutes. La valeur du seuil est corrigée comme par exemple, pour une valeur seuil de 20 % :

$$\text{Seuil corrigé} = [(\text{Moy. Pos. HLA} - \text{Moy. NAC}) \times 0,2] + [\text{Moy. du NAC}]$$

Dans le test LAT140, LAT240, LAT1240 et LAT1288, un score est attribué aux valeurs selon une échelle similaire au test de lymphocytotoxicité comme il est indiqué ci-dessous :

0-10 % = 1 (réaction négative) indiqué par une couleur verte.

11-20 % = 2 (réaction positive ou faiblement négative) indiqué par une couleur bleue.

21-50 % = 4 (réaction positive) indiqué par une couleur jaune.

51-80 % = 6 (réaction fortement positive) indiqué par une couleur marron.

81 à >100 % = 8 (réaction très fortement positive) indiqué par une couleur rouge.

Dans le test LATHD, il est recommandé de ne considérer que les réactions « 6 » et « 8 » comme positives. En raison de la sensibilité accrue du test, les scores plus faibles peuvent être dus à des fixations non spécifiques.

Dans le test LATM, une seule valeur seuil est calculée. Dans les puits d'un mélange d'antigènes de Classe I ou de Classe II, un sérum est généralement considéré positif si la valeur moyenne des puits en duplicat est supérieure à la valeur seuil de 20 %. Les échantillons situés à +/- 5 % (zone grise) peuvent donner des résultats non reproductibles.

Les puits du (contrôle positif) doivent apparaître en rouge, tandis que les puits du (contrôle négatif) apparaissent en vert, pour la validation de la technique. (Figure 26)

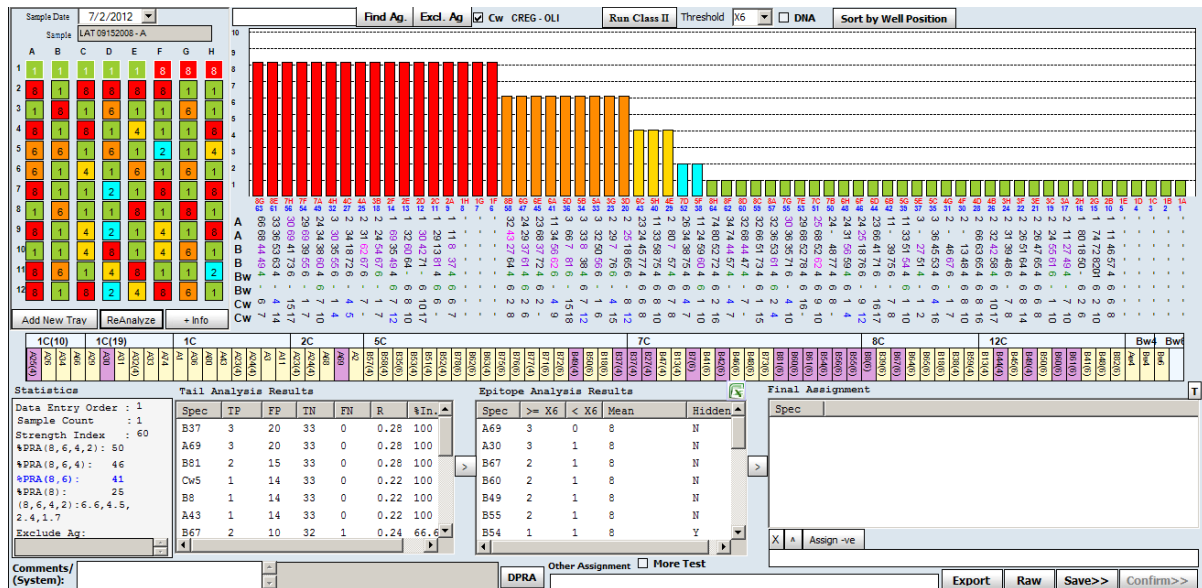


Figure 26 Interprétation d'une plaque ELISA par le logiciel HLA fusion.

IV. Analyse Statistique

L'étude statistique a été réalisée par le biais des :

- Logiciel Excel pour la confection des tableaux et des graphes.
- Logiciels « IBM SPSS statistics 23 » et « compare 2 », pour la détermination de la relation entre l'allo-immunisation anti-HLA avec les paramètres exploités en utilisant le test khi-deux ; La différence était considérée significative si p est $< 0,05$.

RESULTATS

I. Caractéristiques démographiques:

I-1. Age

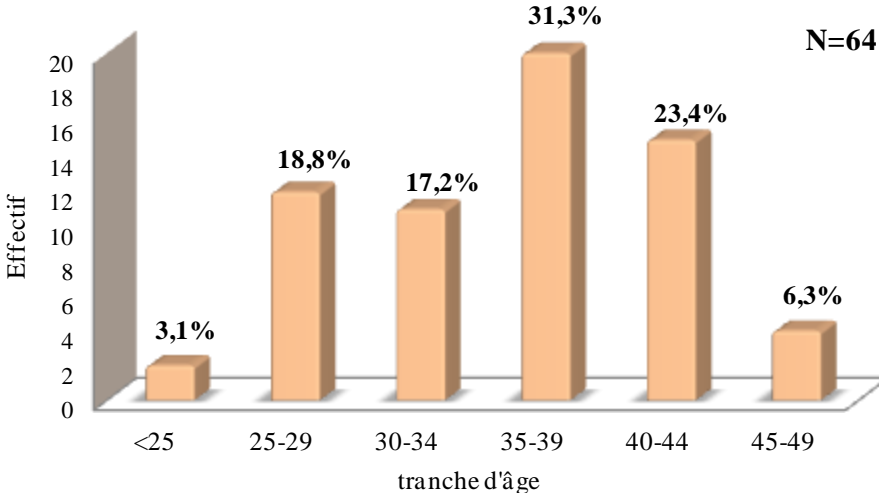


Figure 27 Répartition des femmes selon les tranches d'âge

Les femmes multipares de notre population étudiée étaient âgées de 22 à 48 ans (moyenne ± SD = 35,7 ans ± 6,2).

On note que l'âge de 90% des femmes parturientes de notre population est entre 25-45 ans.

I-2. Répartition géographique

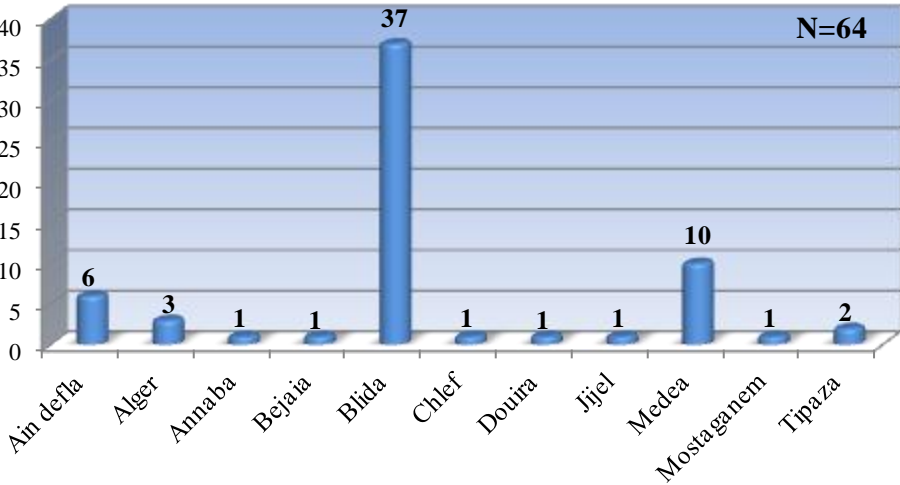


Figure 28 Répartition selon le lieu de naissance des femmes

II. Données biologiques

Groupage

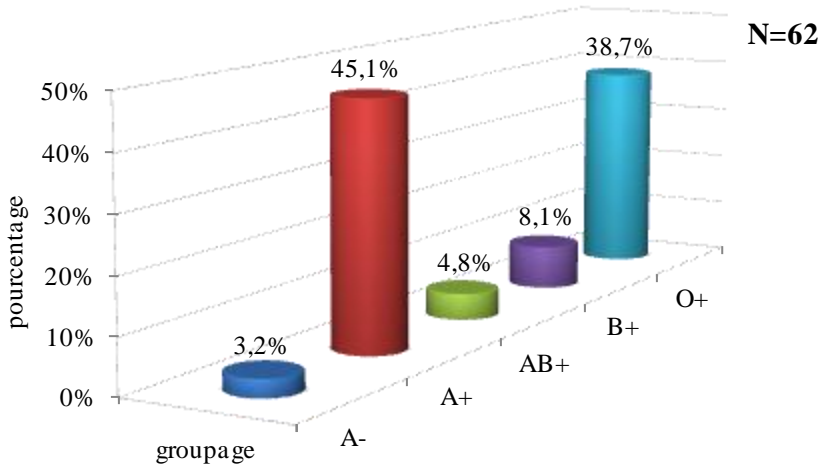


Figure 29 Répartition des femmes selon le groupage sanguin

III. Données obstétricaux

III-1. Gestité

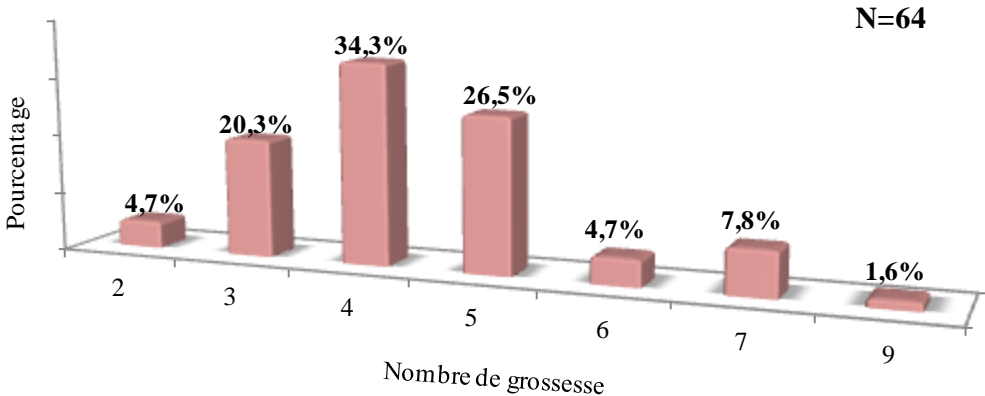


Figure 30 Répartition des femmes selon le nombre de grossesses

Le nombre de grossesses varie de 2 à 9 (moyenne \pm SD = 4,4 \pm 1,3 ; médiane = 4).

95% des femmes de notre population ont au moins 3 grossesses.

III-2. Parité (nombre d'enfants)

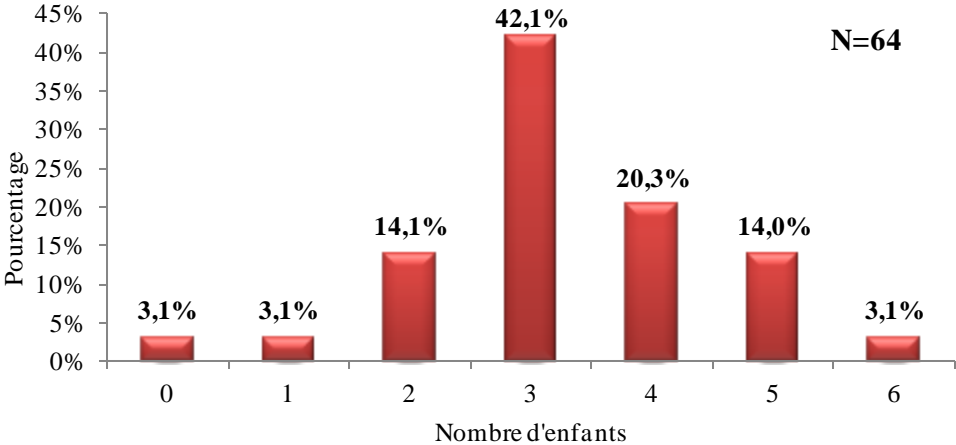


Figure 31 Répartition des femmes selon le nombre des enfants

Le nombre moyen d'enfants est de 3,3 ($\pm 1,2$).

79,7% des participantes ont au moins 3 enfants.

Les femmes qui n'ont pas d'enfants (3,1%) ont eu au moins un avortement

III-3. Avortement

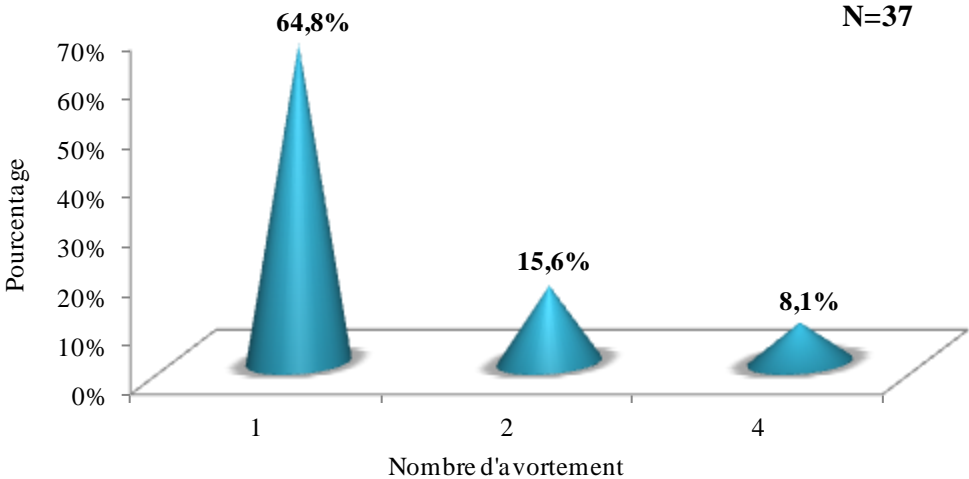


Figure 32 Répartition des femmes selon le nombre des avortements

57,8% des femmes de notre étude ont fait des avortements.

Le tableau récapitulatif des résultats précédents est dans (**Annexe 8**)

IV. Fréquence des Anticorps anti-HLA

Vingt-trois (23) des 64 sérums testés (35,9%) étaient positifs au test de dépistage (LATM).

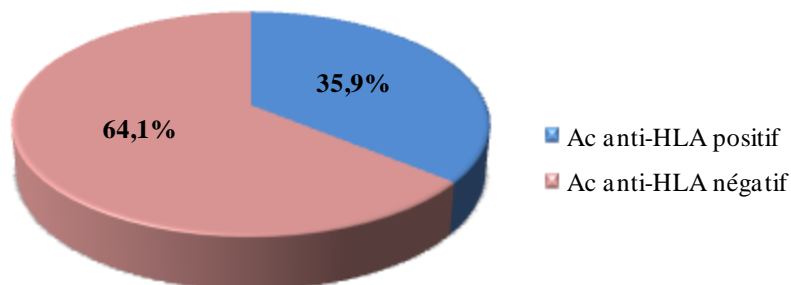


Figure 33 Fréquence des Ac anti-HLA

Dans la population positive, 39,1% ont des Ac anti-HLA de classe I et 47,8% ont des Ac anti-HLA de classe II, 13% de la population positive ont les 2 Ac au même temps.

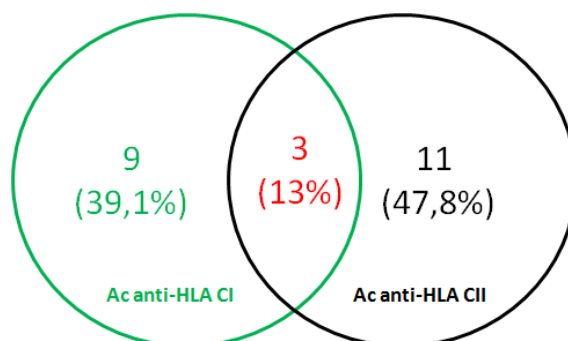


Figure 34 Classe des Ac anti-HLA

V. Identification des Anticorps anti-HLA

En deuxième étapes, Nous avons procédé à l'identification des anticorps anti-HLA dans 22 sérums. Elle a été réalisée pour la classe I et/ou II selon le résultat du dépistage, les résultats sont représentés dans le tableau 1.

Tableau 3 Les spécificités anti-HLA classe I et II identifiées dans 22 sérums

CLASSE I				CLASSE II			
Locus A		Locus B		Locus DR		Locus DQ	
spécificité	Nombre de cas	spécificité	Nombre de cas	spécificité	Nombre de cas	spécificité	Nombre de cas
Anti-A2	1	Anti-B7	1	Anti-DR1	2	Anti-DQ6	2
Anti-A3	1	Anti-B8	2	Anti-DR4	5	Anti-DQ7	3
Anti-A11	2	Anti-B13	4	Anti-DR7	1	Anti-DQ8	3
Anti-A23	1	Anti-B18	3	Anti-DR8	2	Anti-DQ9	3
Anti-A24	3	Anti-B27	1	Anti-DR11	2		
Anti-A25	1	Anti-B35	1	Anti-DR12	2		
Anti-A26	1	Anti-B41	1	Anti-DR13	1		
Anti-A29	1	Anti-B46	1	Anti-DR14	1		
Anti-A32	4	Anti-B53	1	Anti-DR15	5		
Anti-A33	1	Anti-B54	1	Anti-DR16	4		
Anti-A36	1	Anti-B57	2	Anti-DR17	3		
Anti-A66	1	Anti-B59	1	Anti-DR51	2		
Anti-A74	2	Anti-B60	1	Anti-DR103	1		
Anti-A75	1	Anti-B61	3				
Anti-A80	2	Anti-B64	1				
		Anti-B67	1				
		Anti-B72	1				
		Anti-B75	1				
		Anti-B76	1				
Totale=15	6	Totale=19	7	Totale=13	10	Totale=4	6

Pour la classe I, nous avons analysé 10 sérums, 3 sérums étaient négatifs, 1 sérum était hyper immunisé (PRA>80%) (Réagissait avec plus de 80 %des cellules du panel) et les 6 sérums restants étaient positifs et polyspécifiques (plus de 2 spécificités).

On ce qui concerne la classe II, 14 sérums étaient analysés, 2 sérums étaient négatifs, 2 étaient hyperimmunisés, les 10 sérums restants étaient positifs, 1 parmi eux contenait 2 spécificités anti-HLA (DQ7 et DQ9) et les 9 restants étaient polyspécifiques.

VI. Analyse statistique

Nous nous sommes intéressés aux facteurs qui peuvent influencer l'incidence des Ac anti-HLA (l'âge, la gestité, la parité, les avortements et les groupes sanguins, pour cela les données ont été soumises à l'analyse de test de khi-deux (une valeur de $P < 0,05$ est considérée significative), le tableau 4 résume les résultats obtenus.

Tableau 4 Interactions entre les résultats des tests de dépistage des anticorps anti-HLA et l'âge, le groupe sanguin, la gestité, la parité et le nombre d'avortements.

		Ac anti-HLA		p
		Non immunisée	immunisée	
Catégorie d'âge	<25 (n=2)	0(0,0%)	2(100,0%)	P=0,077
	25-29 (n=12)	5(41,7%)	7(58,3%)	
	30-34 (n=11)	8(72,7%)	3(27,3%)	
	35-39 (n=20)	15(75,0%)	5(25,0%)	
	40-44 (n=15)	9(60,0%)	6(40,0%)	
	45-49 (n=4)	4(100,0%)	0(0,0%)	
Groupage sanguin	A- (n=2)	1(50,0%)	1(50,0%)	P=0,773
	A+ (n=28)	17(60,7%)	11(39,3%)	
	AB+ (n=3)	2(66,7%)	1(33,3%)	
	B+ (n=5)	4(80,0%)	1(20,0%)	
	O+ (n=24)	16(66,7%)	8(33,3%)	
Gestité	2(n=3)	2(66,7%)	1(33,3%)	P=0,710
	3(n=13)	8(61,5%)	5(38,5%)	
	4(n=22)	14(63,6%)	8(36,4%)	
	5(n=17)	9(52,9%)	8(47,1%)	
	6(n=3)	3(100,0%)	0(0,0%)	
	7(n=5)	4(80,0%)	1(20,0%)	
	9(n=1)	1(100,0%)	0(0,0%)	
parité	0(n=2)	0(0,0%)	2(100,0%)	P=0,427
	1(n=2)	1(50,0%)	1(50,0%)	
	2(n=9)	6(66,7%)	3(33,3%)	
	3(n=27)	19(70,4%)	8(29,6%)	
	4(n=13)	7(53,8%)	6(46,2%)	
	5(n=9)	6(66,7%)	3(33,3%)	
	6(n=2)	2(100,0%)	0(0,0%)	
avortement	0(n=27)	19(70,4%)	8(29,6%)	P=0,196
	1(n=24)	15(62,5%)	9(37,5%)	
	2(n=10)	4(40,0%)	6(60,0%)	
	4(n=3)	3(100,0%)	0(0,0%)	

VI-1. Positivité des Ac anti-HLA selon l'âge

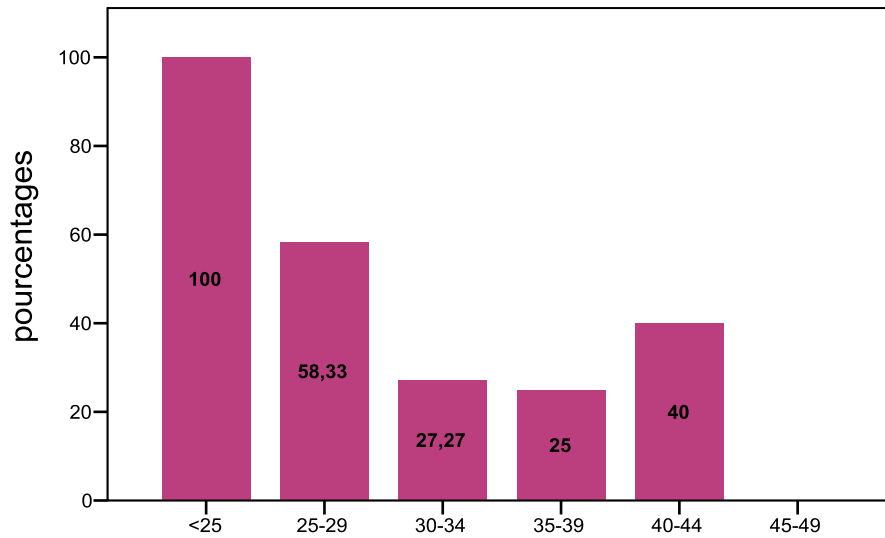


Figure 35 Fréquence des Ac anti-HLA positifs par rapport aux tranches d'âge

48% des femmes âgées de moins de 35 ans ont développé des Ac anti-HLA, ainsi que 28,2% des femmes âgées plus de 35.

VI-2. Positivité des Ac Anti-HLA selon le groupage sanguin

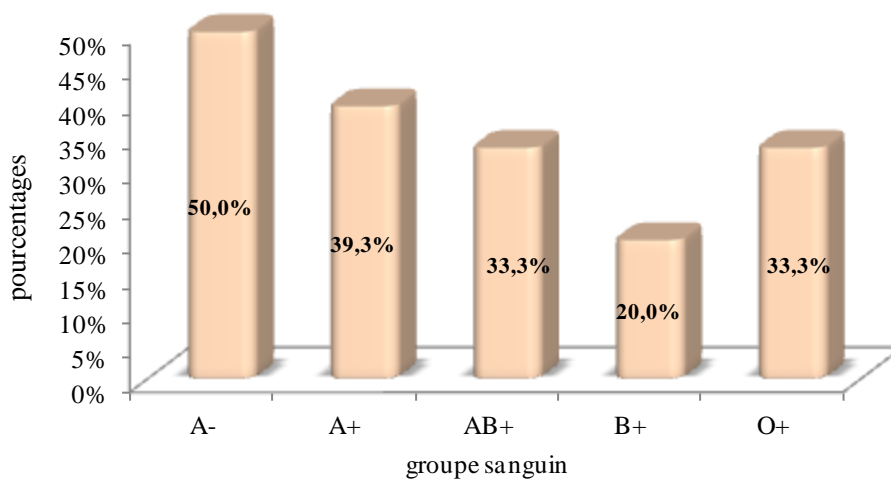


Figure 36 Fréquence des Ac anti-HLA positifs par rapport aux groupes sanguins

VI-3. Positivité des Ac Anti-HLA selon la gestité:

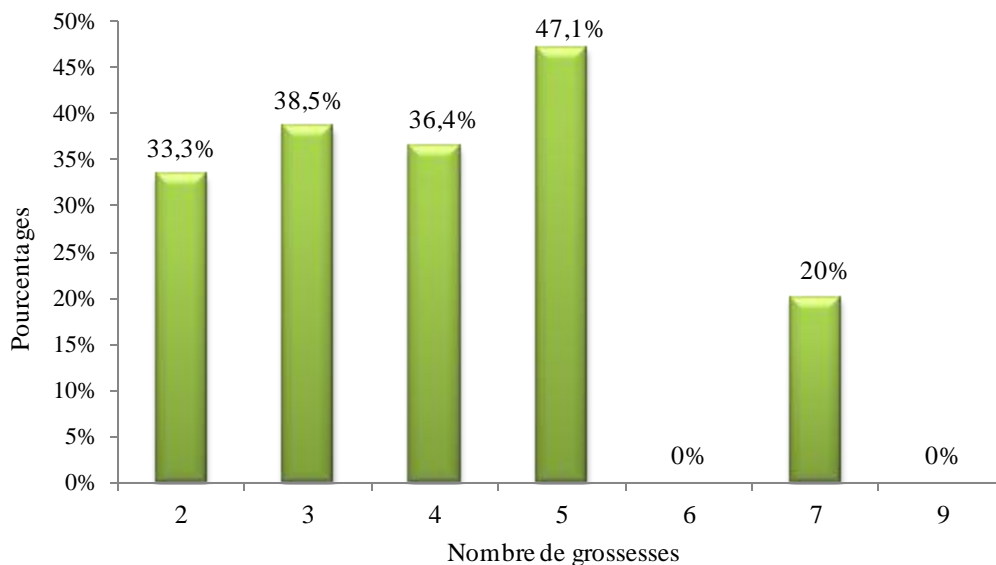


Figure 37 Fréquence des Ac anti-HLA positifs par rapport aux nombre de grossesses

36,8% des femmes qui ont fait moins de 5 grossesses étaient immunisées et 34,61 % des femmes qui ont fait plus que 5 étaient immunisées.

VI-4. Positivité des Ac Anti-HLA selon la parité

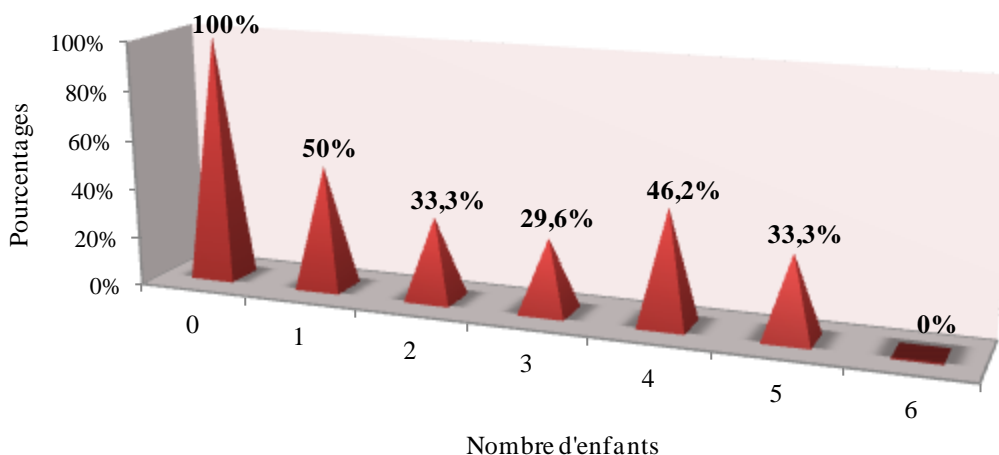


Figure 38 Fréquence des Ac anti-HLA positifs par rapport aux nombre d'enfants

52,2% des femmes immunisées ont un nombre d'enfants ≤ 3 , et 39,1% ont plus de 3 enfants.

VI-5. Positivité des Ac Anti-HLA selon le nombre d'avortements

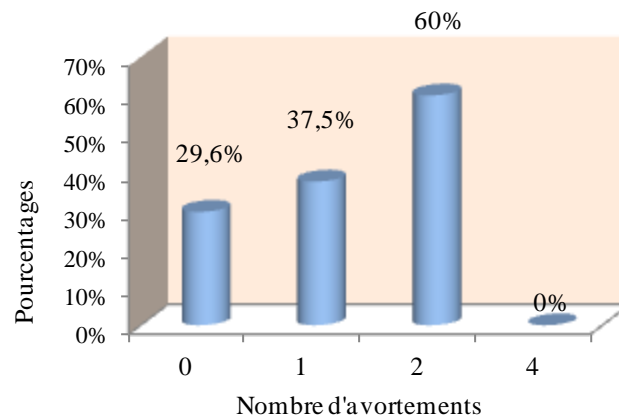


Figure 39 Fréquence des Ac anti-HLA positifs par rapport aux nombre d'avortements

34,8% des femmes multipares immunisées n'ont pas fait des avortements, tandis que 65,2% ont déjà fait des avortements.

Comme le tableau 4 le montre nous n'avons pas obtenu des résultats statistiquement significatifs ($p > 0.05$ dans tous les cas), nous avons procédé à la détermination de l'influence des paramètres précédents sur le développement des Ac anti-HLA de classe I et de classe II séparément, nous avons obtenu des résultats statistiquement significatifs qu'avec la classe I (tableau 5)

Tableau 5 Interactions entre les résultats des tests de dépistage des anticorps anti-HLA I et l'âge, la gestité, la parité et le nombre d'avortements.

		Ac anti-HLA I		p
		Non immunisées	Immunisées	
Catégorie d'âge	<25 (n=2)	0(0,0%)	2(100,0%)	P=0,012
	25-29 (n=12)	8(66,7%)	4(33,3%)	
	30-34 (n=11)	8(72,7%)	3(27,3%)	
	35-39 (n=20)	19(95,0%)	1(5,0%)	
	40-44 (n=15)	13(86,7%)	2(13,3%)	
	45-49 (n=4)	4(100,0%)	0(0,0%)	
Gestité	2 (n=3)	2(66,7%)	1(33,3%)	P=0,819
	3 (n=13)	10(76,9%)	3(23,1%)	
	4 (n=22)	18(81,8%)	4(18,2%)	
	5 (n=17)	13(76,5%)	4(23,5%)	
	6 (n=3)	3(100,0%)	0(0,0%)	
	7 (n=5)	5(100,0%)	0(0,0%)	
	9 (n=1)	1(100,0%)	0(0,0%)	
parité	0 (n=2)	0(0,0%)	2(100,0%)	P=0,043
	1 (n=2)	1(50,0%)	1(50,0%)	
	2 (n=9)	7(77,8%)	2(22,2%)	
	3 (n=27)	23(85,2%)	4(14,8%)	
	4 (n=13)	10(76,9%)	3(23,1%)	
	5 (n=9)	9(100,0%)	0(0,0%)	
	6 (n=2)	2(100,0%)	0(0,0%)	
avortement	0 (n=27)	26(96,3%)	1(3,7%)	P=0,025
	1 (n=24)	17(70,8%)	7(29,2%)	
	2 (n=10)	6(60,0%)	4(40,0%)	
	4 (n=3)	3(100,0%)	0(0,0%)	

VI-6. Fréquence des Ac anti-HLA classe I selon l'âge

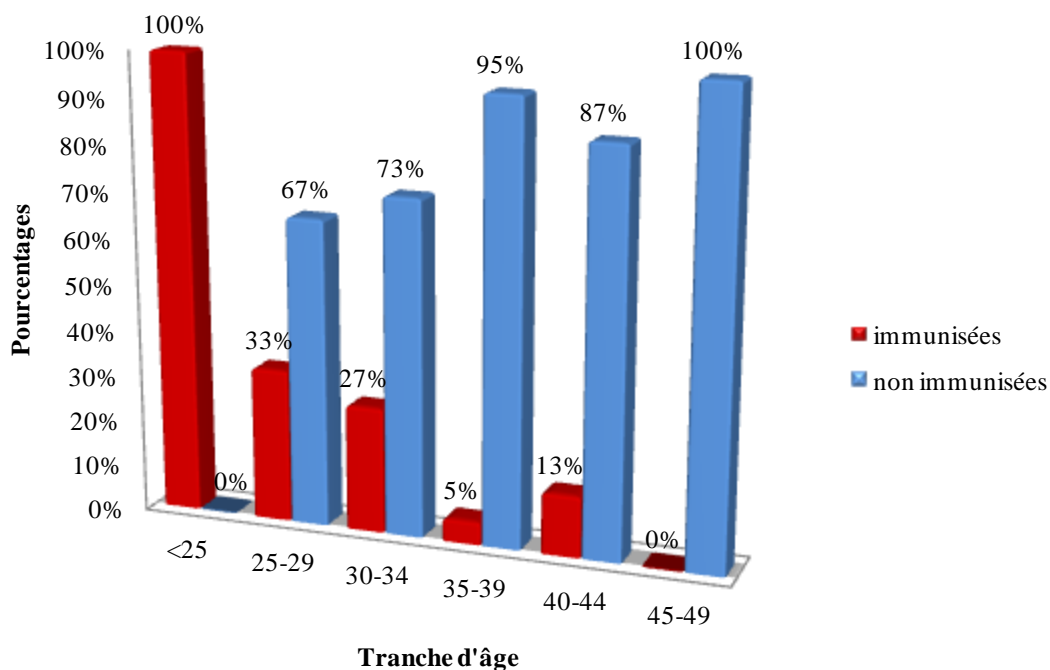


Figure 40 Fréquence des Ac anti-HLA I positifs par rapport aux tranches d'âge

36% des femmes âgées de moins de 35 ans sont immunisées, tandis que seulement 7,7 % des femmes âgées de plus de 35 ans sont immunisées. (Khi deux=8,013 ; P=0,005).

VI-7. Fréquence des Ac anti-HLA classe I selon la parité

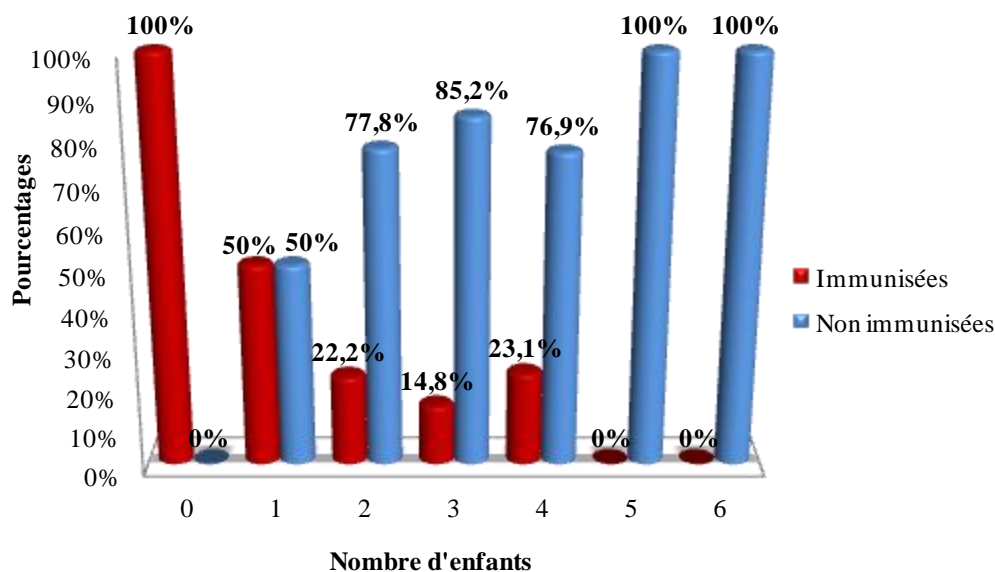


Figure 41 Fréquence des Ac anti-HLA I positifs par rapport aux nombre d'enfants

12,5% des femmes ayant plus de 3 enfants ont développé des Ac anti-HLA I, et 22,5% des femmes ayant 3 enfants ou moins ont développé des Ac anti HLA I.

VI-8. Fréquence des Ac anti-HLA classe I selon le nombre d'avortements

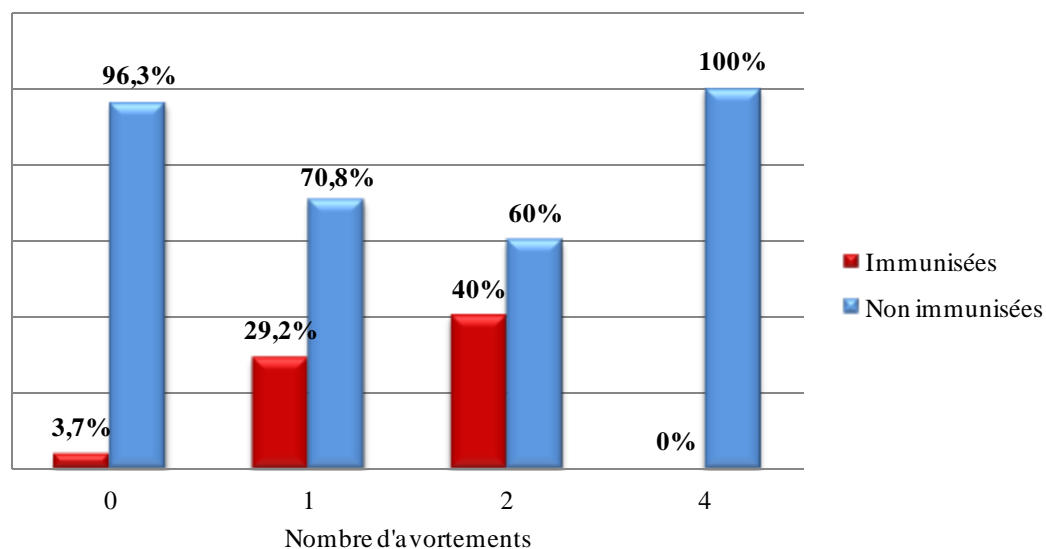


Figure 42 Fréquence des Ac anti-HLA I positifs par rapport aux nombre d'avortements

91,7% des femmes immunisées ont fait au moins un avortement, alors que seulement 8,3% des femmes qui n'ont pas eu d'avortements sont immunisées.

DISCUSSION

I. Incidence de l'immunisation Anti-HLA

Notre étude est la première en Algérie à évaluer l'immunisation anti-HLA chez les femmes multipares, en utilisant une méthode sensible de détection des Ac. L'étude est unique, car il n'y a pas de rapports avec des informations comparables en Algérie. Elle confirme la plus grande importance de la grossesse en tant qu'événement immunisant, avec une forte incidence d'immunisation dans un tel contexte: plus d'un tiers des femmes (35,9%) ont développé des Ac anti-HLA. Cette fréquence plus élevée par rapport à d'autres études comme celle de Regan et al. [145] (28% ; n=306) est probablement due en partie à une meilleure sensibilité de la technique ELISA par rapport à la technique LCT. Cependant, notre fréquence est inférieure à celle trouvée dans deux études récentes : Vilches et al. [146] (49.3% ; n=69), et Masson et al. [1] (54,1% ; n=294) vu la plus grande sensibilité de la technique «Luminex» utilisée dans ces études.

Nous avons trouvé dans notre étude des Ac anti-HLA I chez 39,1%, et des Ac anti-HLA classe II chez 47,8% des femmes multipares, cette différence qui n'est pas statistiquement significative, a également été signalé par Vilches et al.[146] (52.9% anticorps anti-HLA classe I et 61.7% des et classe II), en utilisant des sérums prélevés quelques années après l'accouchement (moyenne =14,6 ±13.1 ans), dans une autre étude, Masson et al.[1] ont trouvé le contraire, une incidence élevée des Ac anti-HLA classe I (86%) par rapport aux Ac anti-HLA de classe II (62%), sachant qu'ils ont utilisé la même technique de l'étude précédente et sur des sérums collectés immédiatement après l'accouchement. D'autre par l'étude réalisée par Powers et al.[147], en utilisant la même technique Luminex sur des sérums collectés plusieurs années après l'accouchement, la proportion d'Ac anti-HLA classe I apparaissait légèrement inférieure (75% anti-classe I, 61% anticlass II), ce qui soulève la question d'une diminution antérieure des Ac Anti-HLA class I après l'accouchement.

II. Anticorps anti-HLA et nombre de grossesses

Houissa et al.[148] ont détecté des Ac anti-HLA chez 21,9% des femmes ayant fait deux grossesses, et 24,5% chez les femmes ayant fait plus de deux grossesses, nos résultats sont compatibles avec ces études (33,3% chez les femmes ayant fait deux grossesses et 36,1% chez les femmes ayant fait plus de deux grossesses).

Cependant en étudiant la relation entre l'allo-immunisation anti-HLA et le nombre de grossesses, chez les 64 femmes multipares, nous n'avons pas révélé une relation statistiquement significative (khi-deux=3,75 ; p = 0,72).

III. Anticorps anti-HLA et nombre d'enfants

Nous avons observé que 35% des femmes ayant un nombre d'enfants ≤ 3 sont immunisées et 37,5% des femmes ayant plus de trois enfants sont immunisées, nous concluons donc que le nombre d'enfants n'a pas d'effet sur l'immunisation anti-HLA.

Cependant on a remarqué qu'il ya une association significative entre la parité et le développement des Ac anti-HLA de classe I seulement ($P=0,043$), car il y a une diminution de positivité de ces Ac avec le nombre d'enfants, ce qui est en opposition avec les résultats de l'étude faite à Nigeria [149] où ils ont trouvé que l'apparition des Ac de classe I augmente avec le nombre d'enfants.

Ceci dit qu'il y a une relation entre l'allo-immunisation vis-à-vis des Ac anti-HLA de classe I et le nombre d'enfants (grossesse à terme et l'accouchement normal).

IV. Anticorps anti-HLA et nombre d'avortements

Nous avons observé que les femmes ayant fait des avortements ont développé plus d'Ac anti-HLA par rapport aux femmes qui n'ont pas fait des avortements, le pourcentage des Ac anti-HLA augmente avec le nombre d'avortement de 37,5% en cas d'un avortement à 60% en cas de deux avortements ($P \sim NS$).

Dans l'étude de Bartel et al.[150] Environ la moitié des femmes multipares sans antécédents de fausses couches ont une réactivité anti-HLA détectable, une proportion beaucoup plus élevée que celle observée chez les femmes atteintes de RM (19%). Ils ont expliqué cette proportion plus élevée, chez les femmes multipares sans antécédents de fausses couches, par le temps d'exposition plus long au fœtus en grossesse normale, ce qui peut donner plus de possibilités d'induire une réponse immunitaire humorale. Malheureusement, nous ne pouvons pas comparer ces résultats dans notre cas vu le petit nombre des femmes ayant des RM ($n=3$) dans notre étude.

Cependant, l'association entre le nombre d'avortement et l'immunisation anti-HLA classe I est révélée significative ($P=0,025$), nous apercevons une augmentation de la réactivité anti-HLA, de 8,3% chez les femmes sans avortement à 29,2% et 40% chez les femmes avec 1 avortement et 2 avortements, respectivement. Et nous avons également remarqué que 91,7% des femmes immunisées ont fait au moins un avortement.

V. Anticorps anti-HLA et l'âge

Nous avons remarqué que 48% des femmes âgées moins de 35 ans sont immunisées, et 28,2% des femmes âgées plus de 35 ans sont immunisées, mais l'analyse statistique n'a pas révélé des résultats significatifs

Par ailleurs nous avons pu mettre en évidence une association significative ($P=0,012$), entre l'âge des femmes multipares et le développement des Ac anti-HLA classe I, cette association doit encore être clarifiée car il n'existe aucun rapport pour soutenir cette constatation. Les explications possibles pourraient être que les femmes parturientes à un âge plus jeune sont plus immunisées que les femmes parturientes à un âge plus avancé (36% d'immunisation chez les femmes âgées moins de 35 ans, contre 7,7% d'immunisation chez les femmes âgées plus de 35 ans), on peut aussi expliquer ce résultat par l'avortement fréquent chez cette catégorie de femmes (88,9%).

VI. Identification des Anticorps anti-HLA

Nous avons identifié un nombre assez important de spécificités (34 spécificités) anti-HLA classe I. Cela témoigne du grand polymorphisme des antigènes HLA classe I au niveau du locus A et B. La fréquence des spécificités des Ac anti-HLA-B (43,7 %) était plus élevée que celle des spécificités des Ac anti-HLA-A (35,9 %). Nos résultats étaient en accord avec ceux de Houissa et al.[148]. Les spécificités les plus fréquentes des Ac anti-HLA classe I isolés dans notre population : Anti HLA-24, et anti HLA B13.

Pour la classe II, le nombre des spécificités identifiées est de 17 spécificités) par rapport à celui de la classe I, malgré que le nombre des sérums pour les quels on a fait l'identification des Ac de classe II (14) était plus élevé que la classe I (13), (ce qui confirme le plus grand polymorphisme des antigènes HLA de classe I).

La fréquence des spécificités des Ac anti HLA-DR (48,4%) était plus élevée que celle des spécificités des Ac anti HLA-DQ (17,2%), nos résultats sont en concordance avec ceux de Picascia et al. [151]. Les spécificités les plus fréquentes des Ac anti-HLA classe II : DR4, DR15, DQ7, DQ8 et DQ 9.

Les fréquences des allèles HLA dans la population ont également un effet sur les spécificités d'anticorps anti-HLA. Par conséquent, on prévoyait détecter plus fréquemment des anticorps anti-HLA contre ces antigènes. On a estimé que A*02, A*01, A*24, A*11, A*32, B*35, B*49, B*44, B*38, B*7, DQA1*0501, DQB1*0201, DRB3*0202, Et les allèles DRB1*07 sont les allèles les plus fréquents dans la population algérienne[152].

Le phénotype HLA de la mère et de l'enfant est également connu pour influencer l'immunisation anti HLA, tout comme l'HLA du receveur influe sur la réponse à la transplantation [1]. Malheureusement, le système HLA étant hautement polymorphe, la taille de notre étude n'a pas permis d'analyser l'impact d'un phénotype HLA particulier.

CONCLUSION

La grossesse est la seule source naturelle d'immunisation anti-HLA. La fréquence exacte de cette immunisation reste indéterminée car des études antérieures ont utilisé différentes méthodes.

Le succès de la grossesse dépend de multiples facteurs, et non pas uniquement de la seule tolérance du système immunitaire maternel vis-à-vis des antigènes fœtaux hérités du Père. Bien qu'allogéniques, les cellules trophoblastiques fœtales interagissent avec les cellules de l'immunité maternelle pour le maintien de la grossesse. Ceci est assuré par le biais de plusieurs mécanismes équilibrés.

Au cours de la grossesse, la mère génère des réponses d'anticorps anti-HLA paternel. Ces réponses sont obtenues suite à l'entrée du matériel fœtal dans la circulation maternelle soit par Microchimérisme ou après rupture du placenta (accouchement, avortement ou hémorragie fœto-maternelle).

35,9% des Ac anti-HLA ont été détecté chez 64 femmes multipares par la technique ELISA, ce qui confirme l'importance de la grossesse au tant qu'un événement immunisant.

On a également identifié un nombre important de spécificités d'Ac anti-HLA (34 spécificités de classe I et 17 spécificités de classe II).

Cette étude nous a permis de constater que :

Le développement des Ac anti-HLA de classe I augmente avec le nombre d'avortements ;
Les femmes multipares plus jeunes développent plus d'Ac anti-HLA de classe I, et cette réactivité d'Ac est associée avec le nombre d'avortements.

Au terme de ce travail et compte-tenu des résultats obtenus, nous recommandons de :

- Introduire une technologie plus sensible « Luminex » pour améliorer la mise en évidence des Ac anti-HLA ;
- Prélever régulièrement les femmes multipares hospitalisées en obstétrique, afin de rassembler le maximum de spécificités anti-HLA ;
- Travailler en collaboration avec d'autres laboratoires, dans le but de constituer une batterie complète de sérums tests anti-HLA et de préparer une plaque de typage propre à notre population ;
- Prendre en considération l'évolution cinétique non stable des Ac anti-HLA chez les femmes multipares en cas d'éventuelle transplantation, plusieurs années après la grossesse.



BIBLIOGRAPHIE

Bibliographie

- [1] Masson E, Vidal C, et al., «Incidence and risk factors of anti-HLA immunization after pregnancy,» *Human Immunology*, vol. 74, n° % 18, p. 946–951, 2013.
- [2] Gurbuz B C, Soyoz M, Okyay D O, et al., «Comparison of Anti-HLA Antibody Production According to Gestational Periods in Pregnant Women,» *Transplantation Proceedings*, vol. 49, n° % 13, pp. 464-466, 2017.
- [3] C. d. E. d'Immunologie, *Immunologie fondamentale et immunopathologie*, ELSEVIER MASSON, 2013.
- [4] Eileen E.L.O. Lashley, Tess Meuleman, et Frans H.J. Claas, «Beneficial or Harmful Effect of Antipaternal Human Leukocyte Antibodies on Pregnancy Outcome? A Systematic Review and Meta-Analysis.,» *American Journal of Reproductive Immunology*, vol. 70, n° % 12, pp. 87-103, 2013.
- [5] J. Klein, «George Snell's First Foray Into the Unexplored Territory of the Major Histocompatibility Complex,» *the Genetics Society of America* , vol. 159, n° % 12, pp. 435-439, 2001.
- [6] E. D. Carosella, «La découverte du système HLA par le Professeur Jean DAUSSET prix Nobel de Médecine,» *Histoire des sciences / Évolution des disciplines et histoire des découvertes*, 2015.
- [7] «Inserm,» [En ligne]. Available: <http://histoire.inserm.fr/les-femmes-et-les-hommes/jean-dausset>.
- [8] Beck, S., Geraghty, D., et al., «Complete sequence and gene map of a human major histocompatibility complex,» *Nature*, vol. 401, n° % 16756, pp. 921-923, 1999.
- [9] S. BAHRAM, «Complete sequence and gene map of a human major histocompatibility complex. The MHC sequencing consortium.,» *Nature*, vol. 401, pp. 921-923, 1999.
- [10] Simon A. Forbes, et Trowsdale J., «The MHC quarterly report,» *Immunogenetics*, vol. 50, n° % 13, p. 152–159, 1999.
- [11] Pichon, L., Giffon, T., Chauvel, B., et al., «La région HLA de classe I :une organisation compliquée par la présence de nombreuses familles multigéniques,» *Médecine sciences*, vol. 12, n° % 111, pp. 1209-1218, 1996.
- [12] Campbell RD, et Trowsdale J., «Map of the human MHC.,» *Immunology Today*, vol. 14, n° % 17, pp. 349-352, 1993.
- [13] Abul K. Abbas, et Andrew H. Lichtman., *les bases de l'immunologie fondamentale et clinique.*,

Elsevier Masson., 2008.

- [14] Abul K. Abbas, Andrew H. Lichtman, et Shiv Pillai, Les bases de l'immunologie fondamentale et clinique, Elsevier Masson, 2013.
- [15] J.Kindt, Thomas; A.Goldsby, Richard; A.Osborne, Barbara, Immunologie, DUNOD, 2007.
- [16] Robinson J, Halliwell JA, Hayhurst JH, Flicek P, Parham P, Marsh SGE, «The IPD and IMGT/HLA database: alle le variant databases,» *Nucleic Acids Research* 43:D423-431, 2015. [En ligne]. Available : <http://hla.alleles.org/nomenclature/index.html>.
- [17] Robinson J, Halliwell JA, Hayhurst JH, Flicek P, Parham P, Marsh SGE, [En ligne]. Available : <http://hla.alleles.org/nomenclature/stats.html>.
- [18] ASSIM, Immunologie fondamentale et Immunopathologie, Elsevier Masson , 2013.
- [19] L. Chatenoud et JF. Bach., « Immunologie » 5ème édition, Médecine-Sciences Flammarion, 2008.
- [20] Thomas J. Kindt, Richard A. Goldsby, Barbara A. Osborne, Immunologie : Le cours de Janis Kuby avec questions de révision., Dunod., 2008.
- [21] Eric Espinosa, et Pascal Chillet., Immunologie, ELLIPSES, 2010.
- [22] Pabón, M. A., Navarro, C. E., Osorio, J. C., et al., «Impact of human leukocyte antigen molecules e, f, and g on the outcome of transplantation.» *In Transplantation proceedings*, vol. 46, n° % 19, pp. 2957-2965, 2014.
- [23] Le Bouteiller, P., & Lenfant, F., «Gène HLA-G: le plus classique des non classiques.» 1997.
- [24] J. Alexandra., *Intérêt du séquençage dans les typages HLA et la greffe de cellules souches hématopoïétiques*, 2015.
- [25] Heinrichs, H. et H.T. Orr, «HLA non-A,B,C class I genes: their structure and expression,» *Immunol Res*, vol. 9, n° % 14, pp. 265-274, 1990.
- [26] L. B. P., «HLA-G in human early pregnancy: Control of uterine immune cell activation and likely vascular remodeling.» *Biomed J*, vol. 38, n° % 11, pp. 32-38., 2015.
- [27] Lee, N., Ishitani, A., et Geraghty, D. E., «HLA-F is a surface marker on activated lymphocytes.» *European journal of immunology*, vol. 40, n° % 18, pp. 2308-2318, 2010.
- [28] Brown, J. H., Jardetzky, T. S., et al., «three dimensional structure of the human class II histocompatibility antigen HLA-DR1,» *Nature*, vol. 364, n° % 16432, pp. 33-39, 1993.
- [29] L. CHATENOUUD et J-F BACH., Immunologie, LAVOISIER MSP., 2012.
- [30] Klein, L., Kyewski, B., et al., «Positive and negative selection of the T cell repertoire: what thymocytes see and don't see.» *Nature reviews. Immunology*, vol. 14, n° % 16, p. 377, 2014.

- [31] B.Puissant, «Fonction thymique et auto-immunité,» *La revue de médecine interne*, vol. 25, n° % 18, pp. 562-572, 2004.
- [32] C. Münz, «Projection of an immunological self shadow to developing T cells via macroautophagy,» *Cell research*, vol. 18, n° % 111, p. 1084, 2008.
- [33] Szekeres-Bartho, J. et T.G. Wegmann., «A progesterone-dependent immunomodulatory protein alters the Th1/Th2 balance.,» *Journal of reproductive immunology*, vol. 31, n° % 11-2, pp. 81-95, 1996.
- [34] Robinson, D.P. et S.L. Klein., «Pregnancy and pregnancy-associated hormones alter immune responses and disease pathogenesis.,» *Hormones and behavior*, vol. 62, n° % 13, pp. 263-271, 2012.
- [35] Chaouat, G., Petitbarat, M., et al., «Tolerance to the foetal allograft?,» *American Journal of Reproductive Immunology*, vol. 63, n° % 16, pp. 624-636, 2010.
- [36] Saito, S., Nakashima, A., et al., «Th1/Th2/Th17 and regulatory T-cell paradigm in pregnancy.,» *American journal of reproductive immunology*, vol. 63, n° % 16, pp. 601-610, 2010.
- [37] Mor, G., Cardenas, I., et al., «Inflammation and pregnancy: the role of the immune system at the implantation site.,» *Annals of the New York Academy of Sciences*, vol. 1221, n° % 11, pp. 80-87, 2011.
- [38] Mesdag, V., Salzet, M., & Vinatier, D., «Le trophoblaste: chef d'orchestre de la tolérance immunologique maternelle.,» *Journal de Gynécologie Obstétrique et Biologie de la Reproduction*, vol. 43, n° % 19, pp. 657-670, 2014.
- [39] S. Hanssens, M. Salzet, D. Vinatier., «Aspects immunologiques de la grossesse.,» *Journal de Gynécologie Obstétrique et Biologie de la Reproduction*, vol. 41, n° % 17, pp. 595-611, 2012.
- [40] Ishitani, A., Sageshima, N., Lee, N., et al., «Protein Expression and Peptide Binding Suggest Unique and Interacting Functional Roles for HLA-E, F, and G in Maternal-Placental Immune Recognition.,» *The Journal of Immunology*, vol. 171, n° % 13, pp. 1376-1384, 2003.
- [41] P. Le Bouteiller, et Julie Tabiasco, «Immunologie de la grossesse:faits nouveaux.,» *Medecine Sciences*, vol. 22, n° % 18-9, pp. 745-750, 2006.
- [42] N. Ledée-Bataille, «Dialogue materno-foetal et implantation embryonnaire humaine :des concepts qui évoluent.,» *Journal de gynécologie obstétrique et biologie de la reproduction*, vol. 33, n° % 17, pp. 564-576, 2004.
- [43] Gellersen B., Brosens I.A., et Brosens J.J., «Decidualization of the human endometrium : mechanism, functions and clinical perspectives.,» *In Seminars in reproductive medicine*, vol. 25, n° % 16, pp. 445-453, 2007.
- [44] Arck, P. C., & Hecher, K., «Fetomaternal immune cross-talk and its consequences for maternal and offspring's health,» *Nature medicine*, vol. 99, n° % 15, pp. 548-556, 2013.

- [45] Gobin SJ, Wilson L, Keijzers V, et al., «Antigen processing and presentation by human trophoblast-derived cell lines.» *The Journal of Immunology*, vol. 158, n° % 18, pp. 3587-3592, 1997.
- [46] Avril T, Jarousseau AC, Watier H, et al., «Trophoblast cell line resistance to NK lysis mainly involves an HLA class I-independent mechanism.» *The Journal of Immunology*, vol. 162, n° % 110, pp. 5902-5909, 1999.
- [47] Forte P, Pazmany L, Stussi G, et al., «HLA-G Inhibits Rolling Adhesion of Activated Human NK Cells On Porcine Endothelial Cells.» *The Journal of Immunology*, vol. 167, n° % 110, pp. 6002-6008, 2001.
- [48] Poehlmann TG, Schaumann A, Busch S, et al., «Inhibition of term decidual NK cell cytotoxicity by soluble HLA-G1.» *Am J Reprod Immunol.*, vol. 56, n° % 15-6, pp. 275-285, 2006.
- [49] Caumartin J, Favier B, Daouya M, et al., «Trogoctosis-based generation of suppressive NK cells.» *The EMBO journal*, vol. 26, n° % 15, pp. 1423-1433, 2007.
- [50] S. V. Ashton, G. St. J. Whitley, P. R. Dash, et al., «Uterine Spiral Artery Remodeling Involves Endothelial Apoptosis Induced by Extravillous Trophoblasts Through Fas/FasL Interactions.» *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*, vol. 25, n° % 11, pp. 102-108., 2005.
- [51] Steinborn A, Varkonyi T, Scharf A, et al., «Early detection of decreased soluble HLA-G levels in the maternal circulation predicts the occurrence of preeclampsia and intrauterine growth retardation during further course of pregnancy.» *American Journal of Reproductive Immunology*, vol. 57, n° % 14, pp. 277-286, 2007.
- [52] McCormick J, Whitley GS, Le Bouteiller P, Cartwright JE., «Soluble HLA-G regulates motility and invasion of the trophoblast-derived cell line SGHPL-4.» *Human reproduction*, vol. 24, n° % 16, pp. 1339-1345, 2009.
- [53] Steinman R, Hawiger D, Nussenzweig M., «Tolerogenic dendritic cells.» *Annual review of immunology*, vol. 21, n° % 11, pp. 685-711, 2003.
- [54] Gardner L, Moffett A., «Dendritic cells in the human decidua.» *Biology of reproduction*, vol. 69, n° % 14, pp. 1438-1446, 2003.
- [55] Askelund K, Liddell H, Zanderigo A, et al., «CD83(+) dendritic cells in the decidua of women with recurrent miscarriage and normal pregnancy.» *Placenta*, vol. 25, n° % 12, pp. 140-145, 2004.
- [56] Blois SM, Kammerer U, Alba Soto C, et al., «Dendritic cells: key to fetal tolerance?» *Biology of reproduction*, vol. 77, n° % 14, pp. 590-598, 2007.
- [57] Atay S, Gercel-Taylor C, Suttles J, Mor G, Taylor DD., «Trophoblast-derived exosomes mediate monocyte recruitment and differentiation.» *American journal of reproductive immunology*, vol. 65, n° % 11, pp. 65-77, 2011.

- [58] S. Gordon, «Alternative activation of macrophages.» *Nature reviews. Immunology*, vol. 3, n° % 11, p. 23, 2003.
- [59] Yong-Hong Zhang, Ming He, Yan Wang and Ai-Hua Liao., «Modulators of the Balance between M1 and M2 Macrophages during Pregnancy.» *Frontiers in immunology*, vol. 8, 2017.
- [60] Assim, *Immunologie fondamentale et Immunopathologie*, Elsevier Masson, 2013.
- [61] Kohler, C., & Kolopp-Sarda, M. N., «La tolérance immunologique fœto-placentaire.» *Revue Francophone des Laboratoires*, vol. 2008, n° % 1402, pp. 33-38, 2008.
- [62] Leno-Durán, E., Muñoz-Fernández, R., Olivares, E. G., & Tirado-González, I., «Liaison between natural killer cells and dendritic cells in human gestation.» *Cellular and Molecular Immunology*, vol. 11, n° % 15, p. 449, 2014.
- [63] Yan WH, Lin A, Chen BG, et al., «Possible roles of KIR2DL4 expression on uNK cells in human pregnancy.» *American Journal of Reproductive Immunology*, vol. 57, n° % 14, pp. 233-242, 2007.
- [64] Fu, B., Tian, Z., & Wei, H., «Subsets of human natural killer cells and their regulatory effects.» *Immunology*, vol. 141, n° % 14, pp. 483-489, 2014.
- [65] Mjösberg J, Berg G, Jenmalm MC, et Ernerudh J., «FOXP3+ regulatory T cells and T helper 1, T helper 2, and T helper 17 cells in human early pregnancy deciduas.» *Biology of reproduction*, vol. 82, n° % 14, pp. 698-705, 2010.
- [66] Piccinni M.P, Lombardelli L, Le Bouteiller P, et al., «T helper cell mediated-tolerance towards fetal allograft in successful pregnancy.» *Clinical and Molecular Allergy*, vol. 13, n° % 11, p. 9, 2015.
- [67] Witkin SS, Linhares IM, Bongiovanni AM, Herway C, Skupski D., «Unique alterations in infection-induced immune activation during pregnancy.» *BJOG: An International Journal of Obstetrics & Gynaecology*, vol. 118, n° % 12, pp. 145-153, 2011.
- [68] Warning JC, McCracken SA, Morris JM., «A balancing act: mechanisms by which the fetus avoids rejection by the maternal immune system.» *Reproduction*, vol. 141, n° % 16, pp. 715-724, 2011.
- [69] Sindram-Trujillo AP, Scherjon S, Van Hulst-van Miert P, et al., «Comparison of decidual leukocytes following spontaneous vaginal delivery and elective cesarean in uncomplicated human term pregnancy.» *Journal of reproductive immunology*, vol. 62, n° % 11, pp. 125-137, 2004.
- [70] Kallikourdis M, Andersen KG, Welch KA, Betz AG., «Alloantigen-enhanced accumulation of CCR5+ 'effector' regulatory T cells in the gravid uterus.» *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 104, n° % 12, pp. 594-599, 2007.
- [71] Ramhorst R, Fraccaroli L, Aldo P, et al., «Modulation and recruitment of inducible regulatory T cells by first trimester trophoblast cells.» *American Journal of Reproductive Immunology*, vol.

- 67, n° % 11, pp. 17-27, 2012.
- [72] P. Kalinski, «Regulation of immune responses by prostaglandin E2,» *The Journal of Immunology*, vol. 188, n° % 11, pp. 21-28, 2012.
- [73] V. Bachy, K. Khosrotehrani, «Mécanismes de la tolérance immunitaire du fœtus.,» Vols. % 1 sur % 25-006, 2007.
- [74] Guven E, Okur H, et Beksac M., «Placental Fas/Fas Ligand expression in early pregnancy losses.,» *Am J Reprod Immunol*, vol. 60, p. 187, 2008.
- [75] Derzsy Z, Prohaszka Z, Rigo JGF, Molvarec A., «Activation of the complement system in normal pregnancy and preeclampsia.,» *Molecular immunology*, vol. 47, n° % 17, pp. 1500-1506, 2010.
- [76] Tedesco F, Narchi G, Radillo O, et al., «Susceptibility of human trophoblast to killing by human complement and the role of the complement regulatory proteins.,» *The Journal of Immunology*, vol. 151, n° % 13, pp. 1562-1570, 1993.
- [77] Girardi G, Bulla R, Salmon JE, Tedesco F., «The complement system in the pathophysiology of pregnancy.,» *Molecular immunology*, vol. 43, n° % 11, pp. 68-77, 2006.
- [78] Gailly-Fabre, E., Kerlan, V., & Christin-Maitre, S., «Hormones, grossesse et relation materno-fœtale.,» *In Annales d'Endocrinologie*, vol. 76, n° % 16, pp. S39-S50, 2015.
- [79] Mellor AL, et Munn DH., «IDO expression by dendritic cells: tolerance and tryptophan catabolism.,» *Nature Reviews Immunology*, vol. 4, n° % 110, pp. 762-774, 2004.
- [80] Williamson LM, Hackett G, Rennie J, et al., «The natural history of fetomaternal alloimmunization to the platelet-specific antigen HPA-1a (PIA1, Zwa) as determined by antenatal screening.,» *Blood*, vol. 92, n° % 107, pp. 2280-2287, 1998.
- [81] W. JC., «Rh immunization and its prevention.,» *Series haematologica*, vol. 03, n° % 103, pp. 1-151, 1970.
- [82] Triulzi, D. J., Kleinman, S., Kakaiya, R. M., Busch, M., et al, «The effect of previous pregnancy and transfusion on HLA alloimmunization in blood donors: implications for a transfusion-related acute lung injury risk reduction strategy.,» *Transfusion*, vol. 49, n° % 109, pp. 1825-1835, 2009.
- [83] Prigoshin, N., Tambutti, M. L., Redal, M. A., et al., «Microchimerism and blocking activity in women with recurrent spontaneous abortion (RSA) after alloimmunization with the partner's lymphocytes.,» *Journal of reproductive immunology*, vol. 44, n° % 11, pp. 41-54., 1999.
- [84] Emeline Masson, Chrystelle Vidal, et al., «Incidence and risk factors of anti-HLA immunization after pregnancy,» *Human Immunology*, vol. 74, n° % 18, p. 946-951, 2013.
- [85] Vilches, M., & Nieto, A., «Analysis of pregnancy-induced anti-HLA antibodies using Luminex

- platform.,» *Transplantation proceedings. Elsevier.*, vol. 47, n° % 19, pp. 2608-2610, 2015.
- [86] Zaccheaus. A. Jeremiah, Justina. E. Oburu and Fiekumo.I. Buseri., «Alloantibodies to HLA Class I Antigens Detected in Multiparous Women of African Descent Are Significantly Associated with Age, ABO/Rh Blood Groups and Parity,» *American Journal of Biomedical Sciences*, vol. 2, n° % 13, pp. 289-294, 2010.
- [87] Eun Young Song, M.D., Sun Mee Kim, M.T., Byoung Cheol Kim, M.T., et al., «Positive Rate of HLA Class I Antibodies in Multiparous Korean Women,» *Korean J Clin Pathol*, vol. 20, n° % 12, pp. 210-4, 2000.
- [88] Germain SJ, Sacks GP, et al., «Systemic inflammatory priming in normal pregnancy and preeclampsia: the role of circulating syncytiotrophoblast microparticles,» *J Immunol*, vol. 178, p. 5949–5956, 2007.
- [89] Ariga H, Ohto H, Busch MP, et al., «Kinetics of fetal cellular and cell-free DNA in the maternal circulation during and after pregnancy: implications for noninvasive prenatal diagnosis.,» *Transfusion*, vol. 41, n° % 112, p. 1524–1530, 2001.
- [90] M. G. Petroff, «Review: fetal antigens–identity, origins, and influences on the maternal immune system.,» *Placenta*, vol. 32, pp. S176-S181, 2011.
- [91] Gurbuz, B. C., Soyoz, M., Okyay, D. O., et al., «Comparison of Anti-HLA Antibody Production According to Gestational Periods in Pregnant Women.,» *Transplantation Proceedings*, vol. 49, n° % 13, pp. 464-466, 2017.
- [92] Lashley LE, van der Hoorn ML, Haasnoot GW, et al., «Uncomplicated oocyte donation pregnancies are associated with a higher incidence of human leukocyte antigen alloantibodies.,» *Human Immunology*, vol. 75, n° % 16, p. 555–560, 2014.
- [93] Kumpel, B. M., Sibley, K., Jackson, D. J., White, G., & Soothill, P. W., «Ultrastructural localization of glycoprotein IIIa (GPIIIa, β 3 integrin) on placental syncytiotrophoblast microvilli: implications for platelet alloimmunization during pregnancy.,» *Transfusion*, vol. 48, n° % 110, pp. 2077-2086, 2008.
- [94] Sebring, E. S., & Polesky, H. F., «Fetomaternal hemorrhage: incidence, risk factors, time of occurrence, and clinical effects.,» *Transfusion*, vol. 30, n° % 14, pp. 344-357, 1990.
- [95] Manoussaka, B. M. Kumpel et M. S., «Placental immunology and maternal alloimmune responses,» *Vox Sanguinis*, vol. 102, n° % 11, pp. 2-12, 2012.
- [96] van Kampen, C. A., Versteeg-van der Voort, M. F., Langerak-Langerak, J., et al., «Pregnancy can induce long-persisting primed CTLs specific for inherited paternal HLA antigens.,» *Human immunology*, vol. 62, n° % 103, pp. 201-207, 2001.
- [97] T. Meuleman, E. van Beelen, R.J. Kaaja, et al., «HLA-C antibodies in women with recurrent miscarriage suggests that antibody mediated rejection is one of the mechanisms leading to recurrent miscarriage,» *Journal of Reproductive Immunology*, vol. 116, p. 28–34, 2016.

- [98] Lee, J., Romero, R., Xu, Y., Kim, J. S., et al., «Maternal HLA Panel-Reactive Antibodies in Early Gestation Positively Correlate with Chronic Chorioamnionitis: Evidence in Support of the Chronic Nature of Maternal Anti-fetal Rejection.» *American Journal of Reproductive Immunology*, vol. 66, n° % 16, pp. 510-526, 2011.
- [99] Regan, L., P. R. Braude, and D. P. Hill., «A prospective study of the incidence, time of appearance and significance of anti-paternal lymphocytotoxic antibodies in human pregnancy.» *Human Reproduction*, vol. 6, n° % 12, pp. 294-298, 1991.
- [100] Powers, A., Stowell, C. P., Dzik, W. H., et al., «Testing only donors with a prior history of pregnancy or transfusion is a logical and cost-effective transfusion-related acute lung injury prevention strategy.» *Transfusion*, vol. 48, n° % 112, pp. 2549-2558, 2008.
- [101] Geneugelijk, K., Hönger, G., et al., «A Previous Miscarriage and a Previous Successful Pregnancy Have a Different Impact on HLA Antibody Formation during a Subsequent Successful Pregnancy.» *Frontiers in Immunology*, vol. 7, 2016.
- [102] Nielsen, H. S., Witvliet, M. D., Steffensen, R., et al., «The presence of HLA-antibodies in recurrent miscarriage patients is associated with a reduced chance of a live birth.» *Journal of reproductive immunology*, vol. 87, n° % 11, pp. 67-73, 2010.
- [103] Ariga H, Ohto H, Busch MP, Imamura S, Watson R, et al., «Kinetics of fetal cellular and cell-free DNA in the maternal circulation during and after pregnancy: implications for noninvasive prenatal diagnosis.» *Transfusion*, vol. 41, n° % 112, pp. 1524-1530, 2001.
- [104] Bianchi DW, Zickwolf GK, Weil GJ, et al., «Male fetal progenitor cells persist in maternal blood for as long as 27 years postpartum.» *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 93, n° % 12, pp. 705-708, 1996.
- [105] Richard M. Kaufman, et al., «Does Rh immune globulin suppress HLA sensitization in pregnancy?» *TRANSFUSION*, vol. 53, n° % 19, pp. 2069-77, 2013.
- [106] Steinborn A, Varkonyi T, Scharf A, et al., «Early detection of decreased soluble HLA-G levels in the maternal circulation predicts the occurrence of preeclampsia and intrauterine growth retardation during further course of pregnancy.» *Am J Reprod Immunol*, vol. 57, n° % 14, pp. 277-286, 2007.
- [107] Qiu J, Terasaki PI, Carosella ED, et al., «Soluble HLA-G expression and renal graft acceptance.» *Am J Transplant*, vol. 6, n° % 19, pp. 2152-2156, 2006.
- [108] Dankers MK, Roelen DL, Korfage N, et al., «Differential immunogenicity of paternal HLA Class I antigens in pregnant women.» *Hum Immunol*, vol. 64, n° % 16, pp. 600-606, 2003.
- [109] Picascia, A., Grimaldi, V., Sabia, C., & Napoli, C., «Comprehensive assessment of sensitizing events and anti-HLA antibody development in women awaiting kidney transplantation.» *Transplant immunology*, vol. 36, pp. 14-19, 2016.
- [110] Geneugelijk, K., Hönger, G., et al., «Predicted Indirectly Recognizable HLA Epitopes Presented by HLA-DRB1 Are Related to HLA Antibody Formation During Pregnancy.» *American*

Journal of Transplantation, vol. 15, n° % 112, pp. 3112-3122, 2015.

- [111] Bamoulid J, Courivaud C, Deschamps M, et al., «IL-6 promoter polymorphism -174 is associated with new-onset diabetes after transplantation.» *J Am Soc Nephrol.*, vol. 17, n° % 18, pp. 2333-2340, 2006.
- [112] M. Niemann, «PIRCHE,» 13 avril 2016. [En ligne]. Available : <http://company.pirche.org/2016/04/13/using-predicted-indirectly-recognized-hla-epitopes-to-improve-donor-selection-in-various-transplantation-settings/>.
- [113] Steinborn A, Saran G, Schneider A, Fersis N, et al., «The Presence of Gestational Diabetes is Associated with Increased Detection of Anti-HLA-class II Antibodies in the Maternal Circulation.» *American Journal of Reproductive Immunology*, vol. 56, n° % 12, p. 124–134, 2006.
- [114] Rugeles, M. T., & Shearer, G. M., «Alloantigen recognition in utero: dual advantage for the fetus?», *Trends in immunology*, vol. 25, n° % 17, pp. 348-352, 2004.
- [115] Ober C, Hyslop T, Elias S, et al., «Human leukocyte antigen matching and fetal loss: results of a 10 year prospective study.» *Human Reproduction*, vol. 13, n° % 11, pp. 33-38, 1998.
- [116] MacDonald, K. S., Embree, J., Njenga, S., et al., «Mother-child class I HLA concordance increases perinatal human immunodeficiency virus type 1 transmission.» *Journal of infectious diseases*, vol. 177, n° % 13, pp. 551-556, 1998.
- [117] Tilburgs, T., Scherjon, S. A., van der Mast, B. J., et al., «Fetal–maternal HLA-C mismatch is associated with decidual T cell activation and induction of functional T regulatory cells.» *Journal of reproductive immunology*, vol. 82, n° % 12, pp. 148-157, 2009.
- [118] Murphy, M. F., Metcalfe, P., Waters, A. H., et al., «Antenatal management of severe fetomaternal alloimmune thrombocytopenia: HLA incompatibility may affect responses to fetal platelet transfusions.» *Blood*, vol. 81, n° % 18, pp. 2174-2179, 1993.
- [119] Taaning Ellen, «HLA Antibodies and Fetomaternal Alloimmune Thromboeytopenia: Myth or Meaningful?», *Transfusion Medicine Reviews*, vol. 114, n° % 13, pp. 275-280, 2000.
- [120] Tiller, H., Killie, M. K., et al., «Platelet antibodies and fetal growth: maternal antibodies against fetal platelet antigen 1a are strongly associated with reduced birthweight in boys.» *Acta obstetricia et gynecologica Scandinavica*, vol. 91, n° % 11, pp. 79-86, 2012.
- [121] Dahl, J., Husebekk, A., Acharya, G., et al., «Maternal anti-HLA class I antibodies are associated with reduced birth weight in thrombocytopenic neonates.» *Journal of reproductive immunology*, vol. 113, pp. 27-34, 2016.
- [122] Umopathy S, Shankarkumar A, Ramrakhiyani V, et al., «Role of anti-human lymphocyte culture cytotoxic antibodies in recurrent spontaneous pregnancy loss women;», *Journal of Human Reproductive Sciences*, vol. 4, n° % 11, pp. 17-19, 2011.

- [123] Chang, H. H., Larson, J., Blencowe, H., et al., «Preventing preterm births: analysis of trends and potential reductions with interventions in 39 countries with very high human development index.» *The Lancet*, vol. 381, n° % 19862, pp. 223-234, 2013.
- [124] Iams JD, Romero R, Creasy RK et al., «Preterm labor and birth.» *Maternal-Fetal Medicine: Principles and Practice*, p. 544–582, 2009.
- [125] Lee, J., Romero, R., Xu, Y., et al., «A signature of maternal anti-fetal rejection in spontaneous preterm birth: chronic chorioamnionitis, anti-human leukocyte antigen antibodies, and C4d.» *PloS one*, vol. 6, n° % 12, p. e16806, 2011.
- [126] Lee J, Romero R, Xu Y, Miranda J, et al., «Detection of anti-HLA antibodies in maternal blood in the second trimester to identify patients at risk of antibody-mediated maternal anti-fetal rejection and spontaneous preterm delivery.» *American Journal of Reproductive Immunology*, vol. 70, n° % 12, p. 162–175, 2013.
- [127] van Kampen, C. A., Versteeg-van der Voort, M. F., Langerak-Langerak, J., et al., «Pregnancy can induce long-persisting primed CTLs specific for inherited paternal HLA antigens.» *Human immunology*, vol. 62, n° % 13, pp. 201-207, 2001.
- [128] Hönger, G., Fornaro, I., Granado, C., et al., «Frequency and Determinants of Pregnancy-Induced Child-Specific Sensitization.» *American Journal of Transplantation*, vol. 13, n° % 13, pp. 746-753, 2013.
- [129] Steele DJ, Laufer TM, Smiley ST, et al., «Two levels of help for B cell alloantibody production.» *J Exp Med*, vol. 183, n° % 12, p. 699–703, 1996.
- [130] N. Mitchison, «T-cell-B-cell cooperation.» *Nature reviews. Immunology*, vol. 4, n° % 14, p. 308, 2004.
- [131] Clatworthy MR1, Espeli M, Torpey N, et Smith KG., «The generation and maintenance of serum alloantibody.» *Current Opinion in Immunology*, vol. 22, n° % 15, p. 669–681, 2010.
- [132] Triulzi DJ, Kleinman S, Kakaiya RM, et al., «The effect of previous pregnancy and transfusion on HLA alloimmunization in blood donors: implications for a transfusion-related acute lung injury risk reduction strategy.» *Transfusion*, vol. 49, n° % 19, pp. 1825-35, 2009.
- [133] van Kampen CA, Roelen DL, et al., «Primed CTLs specific for HLA class I may still be present in sensitized patients when anti-HLA antibodies have disappeared: relevance for donor selection.» *Transplantation*, vol. 73, n° % 18, p. 1286–1290, 2002.
- [134] A. C. F. Delbos, «Caractérisation de l’allo-immunisation anti-HLA et impact clinique entransfusion et en transplantation d’organe.» vol. 24, n° % 13, 2017.
- [135] C. Giannoli, T.K.T. Nguyen, et V. Dubois, «HLA et transfusion : nouvelles approches à l’ère du Luminex™.» *Transfusion clinique et biologique*, vol. 18, n° % 12, pp. 218-223, 2011.
- [136] Moalic V, Mercier B, et Ferec C., «Technologie Luminex™ : principe, applications, et

- perspectives,» *Immuno-analyse & Biologie spécialisée*, vol. 19, n° % 14, pp. 181-187, 2004.
- [137] ASSIM et SFI, Guide des analyses en immunologie, Elsevier Masson, 2014.
- [138] B. D. Tait, F. Hudson, G. Brewin, L. Cantwell et R. Holdsworth., «Solid phase HLA antibody detection technology – challenges in interpretation.,» *HLA*, vol. 76, n° % 12, pp. 87-95, 2010.
- [139] Iwaki Y, Lau M, Cook DJ, Takemoto S, et Terasaki PI., «Crossmatching with B and T cells and flow cytometry,» *Clinical transplants*, pp. 277-284, 1986.
- [140] Cesbron-Gautier, A., Simon, P., et al., «anti-HLA, Technologie Luminex : application aux typages HLA par biologie moléculaire (PCR-SSO) et à l'identification des anticorps.,» *In Annales de Biologie Clinique*, vol. 62, n° % 11, pp. 93-98, 2004.
- [141] Assim, Méthodes en immunologie Des principes aux bonnes applications, Elsevier Masson, 2014.
- [142] [En ligne]. Available: <http://www.elisa-antibody.com>.
- [143] Lopes L, Fabron Jr A, Chiba A, Ruiz M, et Bordin J., «Impact of using different laboratory assays to detect human leukocyte antigen antibodies in female blood donors.,» *Transfusion*, vol. 50, n° % 14, pp. 902-908, 2010.
- [144] V. Moalic-Allain, «Pièges de l'interprétation des anticorps anti-HLA par technologie Luminex™,» *In Annales de Biologie Clinique*, vol. 72, n° % 12, pp. 178-184, 2014.
- [145] Regan L, Braude PR, and Hill DP., «A prospective study of the incidence, time of appearance and significance of anti-paternal lymphocytotoxic antibodies in human pregnancy,» *Human Reproduction*, vol. 6, n° % 12, pp. 294-298, 1991.
- [146] Vilches M et Nieto A., «Analysis of pregnancy-induced anti-HLA antibodies using Luminex platform,» *Transplantation proceedings*, vol. 47, n° % 19, pp. 2608-2610, 2015.
- [147] Powers A, Stowell CP, et al., «Testing only donors with a prior history of pregnancy or transfusion is a logical and cost-effective transfusion-related acute lung injury prevention strategy,» *Transfusion*, vol. 48, n° % 112, pp. 2549-2558, 2008.
- [148] Houissa B., Abdelkefi S., Bouslama M., et al., «Houissa, B., Abdelkefi, S., Bouslama, M., Naggara, M., Zaïer, M., Hmida, S., & Yacoub, S. (2003, July). Intérêt du dépistage des anticorps anti-HLA de classe I dans un service obstétrical tunisien pour la sélection de bons réactifs de type HLA,» *In Annales de Biologie Clinique*, vol. 61, n° % 14, pp. 435-439, 2003.
- [149] Jeremiah Z.A, Oburu J.E et Buseri F.I., «Alloantibodies to HLA Class 1 Antigens Detected in Multiparous Women of African Descent Are Significantly Associated with Age, ABO/Rh Blood Groups and Parity,» *American Journal of Biomedical Sciences*, vol. 2, n° % 13, pp. 289-294, 2010.
- [150] Bartel G, Walch K, Wahrmann M, et al., «Prevalence and qualitative properties of circulating anti-human leukocyte antigen alloantibodies after pregnancy: no association with

unexplained recurrent miscarriage.» *Human immunology*, vol. 72, n° % 12, p. 187–192, 2011.

[151] Picascia A., Grimaldi V., Sabia C., et Napoli C., «Comprehensive assessment of sensitizing events and anti-HLA antibody development in women awaiting kidney transplantation.» *Transplant immunology*, vol. 36, pp. 14-19, 2016.

[152] Arnaiz-Villena A., Benmamar D., Alvarez M., et al., «HLA allele and haplotype frequencies in Algerians: Relatedness to Spaniards and Basques.» *Human immunology*, vol. 43, n° % 14, pp. 259-268, 1995.



ANNEXES

Annexe 1 : fiche de renseignements

CHU de BLIDA
UNITE HASSIBA BENBOUALI
Service Laboratoire Central de Biologie
Unité Hospitalo-Universitaire d'Immunologie

Date du prélèvement : / /

Nom du préleveur :

Fiche de Renseignements

Nom : Prénom : N° de tél :

Date et lieu de naissance : / /

Adresse :

Externe Hospitalisée Hôpital : Service :

Groupe sanguin :

Si rhésus Négatif, TRT anti-D : oui non date :

Grossesse : oui non

Nombre :

Date : - / / - / / - / /

- / / - / / - / /

Fausse couche : oui non

Nombre :

Date : - / / - / /

Interruption de grossesse : oui non

Nombre :

Date : - / / - / /

Transfusion sanguine : oui non

Nombre :

Date : / /

Greffe antérieure: oui non

Type de greffe :

Date : / /

Antécédents médicaux :

Antécédents chirurgicaux :

Antécédents familiaux :

Autre :

Annexe 2 : fiche de consentement

CHU DE BLIDA
UNITE HASSIBA BENBOUALI
SERVICE LABORATOIRE CENTRAL DE BIOLOGIE
UNITE HOSPITALO-UNIVERSITAIRE D'IMMUNOLOGIE

**FORMULAIRE DE CONSENTEMENT
POUR LA PARTICIPATION A UNE RECHERCHE BIOMEDICALE**

Titre de la recherche :

Allo-immunisation des femmes multipares vis-à-vis des antigènes HLA

Sous la direction du Docteur : ZELTNI .M.L

- Je soussignée

- Certifie avoir été pleinement informée par l'interne en pharmacie
:.....
Sur :
 - Les objectifs et modalités de l'étude
 - ma participation volontaire à l'étude, que je suis libre d'accepter ou de refuser de participer, et je suis libre d'arrêter à tout moment ma participation en cours d'étude

- Autorise qu'un **prélèvement sanguin** soit effectué sur moi-même Dans le cadre de cette étude

- Donne mon accord pour l'enregistrement des données médicales nécessaires à cette étude.

- Accepte que les prélèvements réalisés puissent être utilisés pour ces examens.

Fait à

Le

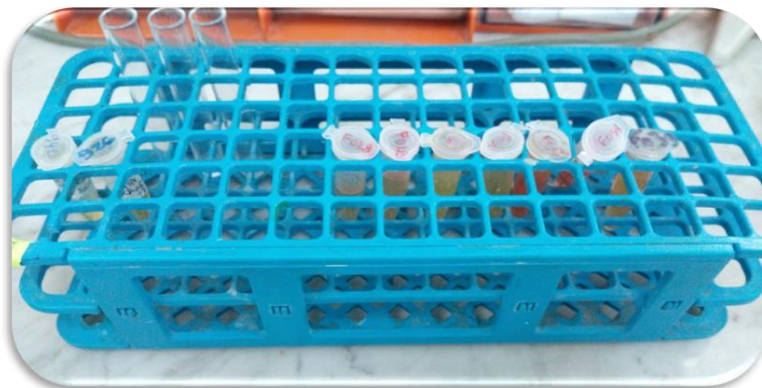
Signature

Annexe 3 : confection des prélèvements

Séparation du sérum après centrifugation



Remplissage et numérotation des eppendorfs



Congélation à - 80 °C jusqu'au dépistage par
ELISA

Annexe 4 : réactifs utilisés



Figure 43 –Kit Lambda Antigen Tray™

Tableau description des réactifs et de leurs volumes

		<i>LAT 140, LAT 240 LAT1 HD</i>	<i>LATM10X5</i>
Description du réactif	concentration	Quantité/volumes fournis	
Microplaque ELISA	<i>Sans objet</i>	<i>1 test par plaque 2 tests par plaque</i>	<i>10 tests par plaque</i>
<i>Sérum contrôle : allo- antisérum anti-HLA lyophilisé</i>	<i>10X</i>	<i>0.2 ml (volume reconstitué)</i>	<i>0.1 ml (volume reconstitué)</i>
<i>Eau déionisée stérile (pour reconstituer le sérum contrôle)</i>	<i>Sans objet</i>	<i>1 ml</i>	<i>1 ml</i>
<i>Anti-igG humaine conjuguée à la phosphatase alcaline</i>	<i>100X</i>	<i>0.3 ml</i>	<i>0.1 ml</i>
<i>Diluant pour anticorps</i>	<i>1X</i>	<i>50 ml</i>	<i>12 ml</i>
<i>Solution tampon de lavage</i>	<i>10X</i>	<i>125 ml</i>	<i>30 ml</i>
<i>Substrat d'enzyme colorimétrique : BCIP, composants A et B</i>	<i>1X</i>	<i>Chaque flacon contient 15 ml</i>	<i>Chaque flacon contient 3 ml</i>
<i>Solution d'arrêt</i>	<i>1X</i>	<i>25 ml</i>	<i>6 ml</i>

Annexe 5 : feuilles de travail des LAT™



Data Record and Worksheet

Lambda Antigen Tray - Mixed (LAT-M™), Lot #011



Cat. # LATM10X5

Date _____

ELISA Substrate _____

Tray ID _____

Changes from previous Lot:

Class I: Replace E4271, E17990, C5014, E17980, E6452, C4924, E5668, E7359, E12572, C5004, E18858, C5003, E12635, C4726, C4925, C5012, E3825, E4888 with E41074, E18278, E19449, E17982, E20781, G0286, G0291, E2934, G0150, E19694, E18932, G0368, G0258, G0138, E19540, E18401, E6430 & E17983 respectively.
 Class II: Replace C5013, C4613, C5003, & C5001 with E17983, G0194, G0183 & E18394 respectively.

# Test	A B C D				E F G H			
	Blank	Blank	HLA Neg.	HLA Neg.	HLA Neg.	HLA Pos.	HLA Pos.	HLA Pos.
1 Name/Serum ID	Class I Mix	Class I Mix	Class II Mix	Class II Mix	No Antigen Control	No Antigen Control	Blank	Blank
2 Name/Serum ID	Class I Mix	Class I Mix	Class II Mix	Class II Mix	No Antigen Control	No Antigen Control	Blank	Blank
3 Name/Serum ID	Class I Mix	Class I Mix	Class II Mix	Class II Mix	No Antigen Control	No Antigen Control	Blank	Blank
4 Name/Serum ID	Class I Mix	Class I Mix	Class II Mix	Class II Mix	No Antigen Control	No Antigen Control	Blank	Blank
5 Name/Serum ID	Class I Mix	Class I Mix	Class II Mix	Class II Mix	No Antigen Control	No Antigen Control	Blank	Blank
6 Name/Serum ID	Class I Mix	Class I Mix	Class II Mix	Class II Mix	No Antigen Control	No Antigen Control	Blank	Blank
7 Name/Serum ID	Class I Mix	Class I Mix	Class II Mix	Class II Mix	No Antigen Control	No Antigen Control	Blank	Blank
8 Name/Serum ID	Class I Mix	Class I Mix	Class II Mix	Class II Mix	No Antigen Control	No Antigen Control	Blank	Blank
9 Name/Serum ID	Class I Mix	Class I Mix	Class II Mix	Class II Mix	No Antigen Control	No Antigen Control	Blank	Blank
10 Name/Serum ID	Class I Mix	Class I Mix	Class II Mix	Class II Mix	No Antigen Control	No Antigen Control	Blank	Blank
11 Name/Serum ID	Class I Mix	Class I Mix	Class II Mix	Class II Mix	No Antigen Control	No Antigen Control	Blank	Blank
12 Name/Serum ID	Class I Mix	Class I Mix	Class II Mix	Class II Mix	No Antigen Control	No Antigen Control	Blank	Blank

Control Values:

BLANK (O.D.) _____ wells 1A-1B HLA Neg. (O.D.) _____ wells 1C-1E HLA Pos. (O.D.) _____ wells 1F-1H QA (O.D.) _____ wells 2C-2E Pos. (Ratio) _____ Neg.

LAT Panel: HLA Class I & II Antigen Distribution																							
CLASS I												CLASS II											
Ag	#	Ag	#	Ag	#	Ag	#	Ag	#	Ag	#	Ag	#	Ag	#	Ag	#	Ag	#	Ag	#	Ag	#
A1	8	A32	3	B7	3	B44	3	B55	2	B67	2	Bw4	30	Cw10	7	DR1	5	DR15	5	DQ6	8	DP8	0
A2	12	A33	3	B8	2	B45	2	B56	2	B71	2	Bw6	42	Cw12	3	DR103	2	DR16	3	DQ7	8	DP9	1
A3	5	A34	2	B13	2	B46	2	B57	4	B72	3			Cw14	3	DR4	5	DR17	5	DQ8	5	DP10	0
A11	11	A36	2	B18	3	B47	2	B58	2	B73	1	Cw1	8	Cw15	3	DR7	6	DR18	4	DQ9	3	DP11	1
A23	4	A43	0	B27	3	B48	2	B59	2	B75	2	Cw2	8	Cw16	3	DR8	4	DR51	6			DP12	0
A24	7	A66	4	B35	2	B49	2	B60	3	B76	1	Cw4	5	Cw17	4	DR9	3	DR52	19	DP1	12	DP13	2
A25	2	A68	4	B37	2	B50	2	B61	2	B77	1	Cw5	2	Cw18	3	DR10	2	DR53	13	DP2	7	DP14	4
A26	3	A69	3	B38	2	B51	3	B62	3	B78	2	Cw6	12			DR11	4			DP3	3	DP17	1
A29	5	A74	2	B39	2	B52	2	B63	2	B81	2	Cw7	13			DR12	3	DQ2	11	DP4	14	DP18	2
A30	5	A80	2	B41	2	B53	2	B64	2	B8201	1	Cw8	10			DR13	5	DQ4	7	DP5	4	DP19	1
A31	3			B42	2	B54	2	B65	2			Cw9	3			DR14	4	DQ5	15	DP6	0	DP21	0

Test Performed by _____ Date _____ Read by _____ Date _____ Reviewed by _____ Date _____

LATM10X5_011_WS, Rev 0: Page 1 of 1

One Lambda, Inc. 21001 Kittridge St., Canoga Park, CA 91303-2801 Tel: (818) 702-0042 Fax: (818) 702-6904 www.onelambda.com
 Template: Temp_LATM10X5_WS, Rev 1



Name _____ Patient Male
 Donor Female

Sample I.D. _____ Race _____ Age _____ DOB _____ ABO/Rh _____ Serum Dilution _____

HLA Typing Class I _____ Serum Collection Date _____

ELISA Substrate BCIP _____

	A	B	C	D	E	F	G	H	Antigen Distribution					
	No Antigen Control	No Antigen Control	HLA Neg. Lot 3	HLA Neg. Lot 3	HLA Neg. Lot 3	HLA Pos. Lot 4	HLA Pos. Lot 4	HLA Pos. Lot 4	Ag #	Ag #	Ag #	Ag #	Ag #	Ag #
1	RA0101a	RA0101b	RA0201a	RA0201b	RA0301a	RA0301b	RA1101	RA1102	A1 2	B48 1	Cw9 0	A2 2	B49 2	Cw10 0
2	RA2301a	RA2301b	RA2402	RA2403	RA2501	RA2601a	RA2601b	RA2902	A3 2	B50 1	Cw12 0	A11 2	B51 2	Cw13 0
3	RA3001a	RA3001b	RA3101a	RA3101b	RA3201a	RA3201b	RA3301	RA3303	A23 2	B52 2	Cw14 0	A24 2	B53 2	Cw15 0
4	RA3402	RA3601	RA6601	RA6801	RA6901	RA7401	RA8001	RB0702a	A25 1	B54 1	Cw16 0	A26 2	B55 1	Cw17 0
5	RB0702b	RB0801a	RB0801b	RB1301a	RB1301b	RB1801a	RB1801b	RB2705	A29 1	B56 1	Cw18 0	A30 2	B57 2	
6	RB2708	RB3501a	RB3501b	RB3701a	RB3801a	RB3801b	RB3901	RB4101	A31 2	B58 1		A32 2	B59 1	
7	RB4201	RB4402	RB44032	RB4501a	RB4501b	RB4601a	RB4701	RB4801	A33 1	B61 1		A33 2	B60 2	
8	RB4901a	RB4901b	RB5001	RB5101	RB5102	RB5201a	RB5201b	RB5301a	A34 1	B62 1		A36 1	B62 2	
9	RB5301b	RB5401	RB5502	RB5601	RB5701	RB5703	RB5801	RB5901	A36 1	B63 1		A43 0	B63 1	
10	RB4001a	RB4001b	RB4002	RB1501a	RB1501b	RB1516	RB1401a	RB1401b	A66 1	B64 2		A68 1	B65 1	
11	RB1402	RB6701	RB1510	RB1503a	RB1503b	RB1502	RB7801	RB8101	A69 1	B67 1		A74 1	B71 1	
12									A80 1	B72 2		B7 2	B73 0	
									B8 2	B75 1		B13 2	B76 0	
									B18 2	B78 1		B18 2	B78 1	
									B27 2	B81 1		B35 2	B8201 0	
									B37 1	Bw4 22		B38 2	Bw6 35	
									B39 1	Cw1 0		B41 1	Cw2 0	
									B42 1	Cw4 0		B44 2	Cw5 0	
									B45 2	Cw6 0		B46 1	Cw7 0	
									B47 1	Cw8 0				

Control Values:

BLANK (O.D.) _____ HLA Neg. (O.D.) _____ HLA Pos. (O.D.) _____ Pos. / Neg. (Ratio) _____
wells 1A-1B wells 1C-1E wells 1F-1H

Test Performed by _____ Date _____ Read by _____ Date _____ Reviewed by _____ Date _____

Template: LAT1HD_r1.xls

Name _____ Patient Male
 Donor Female

Sample I.D. _____ Race _____ Age _____ DOB _____ ABO/Rh _____ Serum Dilution _____

HLA Typing Class I _____ HLA Typing Class II _____ Serum Collection Date _____

ELISA Substrate BCIP _____

Changes from previous Lot:

Replace E4271, E6448, E5902, C4924, E7359, G0202, C5003, E5061, and E3825 with G0181, E18932, E19449, G0286, G0258, E20781, E5479, E19540, AND E18351 respectively.

	A	B	C	D	E	F	G	H
1	BLANK	BLANK	HLA Neg.	HLA Neg.	HLA Neg.	HLA Pos.	HLA Pos.	HLA Pos.
2	G0223 A1,11 B46,57 BW6,4 CW6,8	G0181 A1,26 B8,41 BW6 CW7,17	E18149 A1,29 B13,81 BW4,6 CW6,18	G0176 A1,68 B53,56 BW4,6 CW1,4	E17776 A1,69 B35,49 BW6,4 CW7,12	G0229 A1,80 B18,50 BW6 CW2,6	G0270 A2,3 B62,27 BW6,4 CW1,9	G0286 A2,11 B51,76 BW4,6 CW10,14
3	E5479 A2,11 B27,49 BW4 CW7,10	G0278 A2,24 B62,8 BW6 CW7,9	E19700 A2,25 B38,44 BW4 CW5,7	G0102 A2,29 B64,57 BW6,4 CW8,18	G0099 A2,29 B7,46 BW6 CW1,15	E5562 A2,31 B39,48 BW6 CW7,8	E18351 A2,31 B47,51 BW4 CW6,14	E5093 A2,32 B42,58 BW6,4 CW10,17
4	G0312 A3,32 B35,X BW6 CW4,X	E19540 A3,66 B72, 52 BW6,4 CW2,12	E5482 A11,24 B54,59 BW6,4 CW1,X	E18932 A11,26 B64,38 BW6,4 CW8,12	G0258 A11,30 B13,75 BW4,6 CW6,8	E17749 A23,24 B77,45 BW4,6 CW6,8	E6453 A23,66 B41,71 BW6 CW16,17	E15254 A23,68 B72,37 BW6,4 CW2,X
5	E19511 A23,80 B8, 18 BW6 CW2,10	E20781 A24,30 B37,48 BW4,6 CW6,8	E19449 A25,36 B7,44 BW4,6 CW5,7	G0155 A25,68 B65,58 BW6,4 CW7,8	G0320 A26,30 B18,60 BW6 CW5,10	G0315 A26,34 B7,60 BW6 CW7,10	E11678 A29,68 B52,78 BW4,6 CW16,X	G0085 A29,69 B39,55 BW6 CW1,7
6	E5610 A30,36 B71,35 BW6 CW4,10	G0273 A31,X B75,61 BW6 CW1,10	G0237 A32,66 B51,73 BW4,6 CW1,15	E14072 A33,36 B63,53 BW4 CW4,14	E20388 A33,74 B63,42 BW4,6 CW14,17	G0146 A34,74 B44,57 BW4 CW4,7	G0238 A34,X B61,56 BW6 CW1,15	E18066 A68,74 B72,45 BW6 CW2,16
7-11	NOT USED							
12	QA	QA	BLANK	BLANK	BLANK	BLANK	BLANK	BLANK

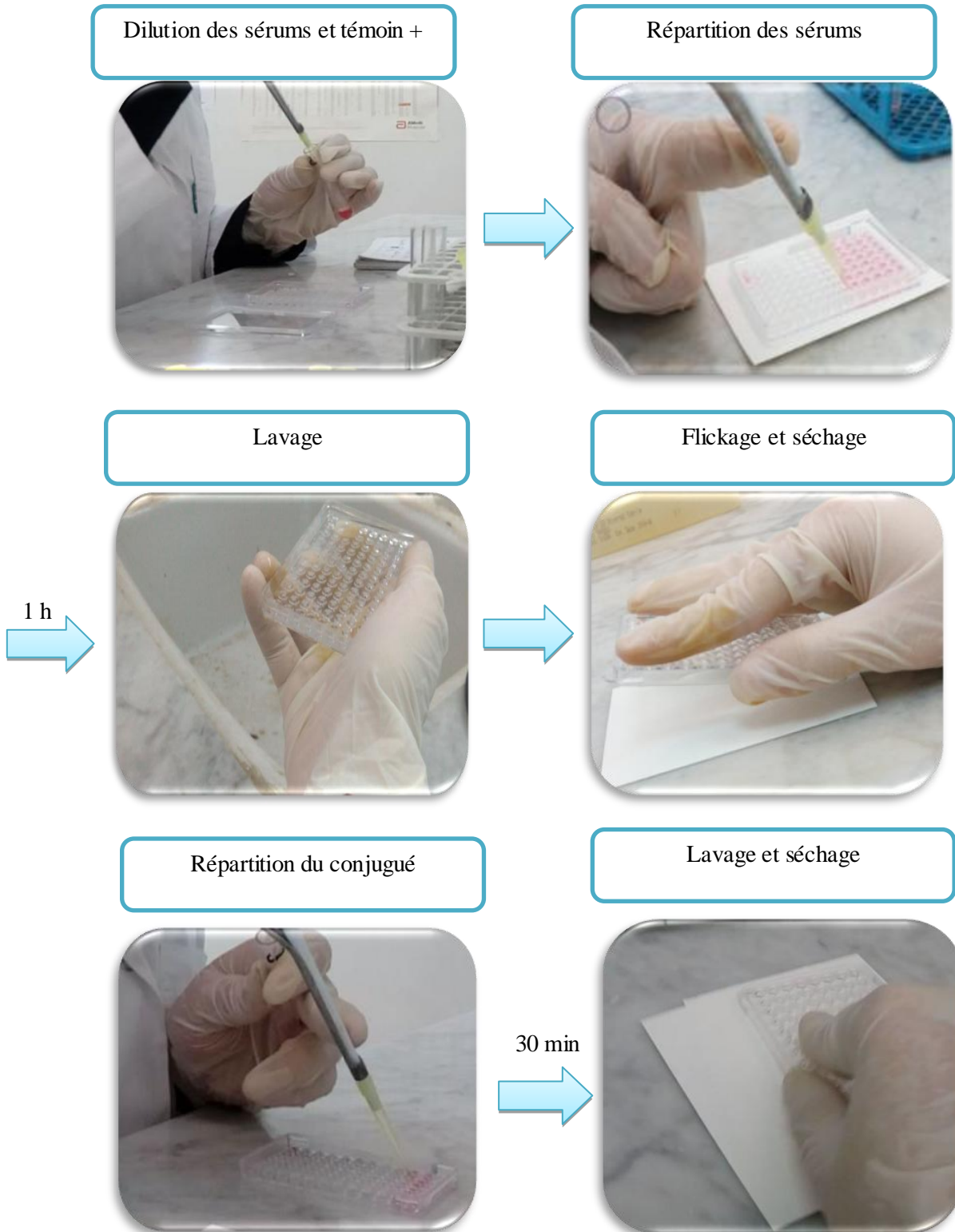
Control Values:

BLANK (O.D.) _____ wells 1A-1B HLA Neg. (O.D.) _____ wells 1C-1E HLA Pos. (O.D.) _____ wells 1F-1H QA (O.D.) _____ wells 12A-12B Pos. Neg. (Ratio) _____

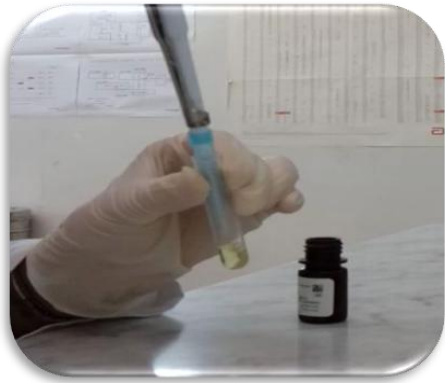
LAT Panel: HLA Class I Antigen Distribution																																							
Ag #	Ag #	Ag #	Ag #	Ag #	Ag #	Ag #	Ag #	Ag #	Ag #	Ag #	Ag #	Ag #	Ag #	Ag #	Ag #	Ag #	Ag #	Ag #	Ag #																				
A1 6	A25 3	A33 2	A69 2	B18 3	B41 2	B48 2	B54 1	B60 2	B67 0	B77 1	Cw1 8	Cw8 8	Cw16 3	A2 10	A26 4	A34 3	A74 3	B27 2	B42 2	B49 2	B55 1	B61 2	B71 2	B78 1	Cw2 5	Cw9 2	Cw17 4												
A3 3	A29 5	A36 3	A80 2	B35 3	B44 3	B50 1	B56 2	B62 2	B72 3	B81 1	Cw4 5	Cw10 8	Cw18 2	A11 6	A30 4	A43 0	B7 3	B37 2	B45 2	B51 3	B57 3	B63 2	B73 1	B8201 0	Cw5 3	Cw12 3	A23 4	A31 3	A66 3	B8 3	B38 2	B46 2	B52 2	B58 2	B64 2	B75 2	Bw4 25	Cw6 7	Cw14 4
A24 4	A32 3	A68 5	B13 2	B39 2	B47 1	B53 2	B59 1	B65 1	B76 1	Bw6 35	Cw7 11	Cw15 3																											

Test Performed by _____ Date _____ Read by _____ Date _____ Reviewed by _____ Date _____

Annexe 6 : mode opératoire



Préparation du substrat et sa répartition



Ajout de la solution stop

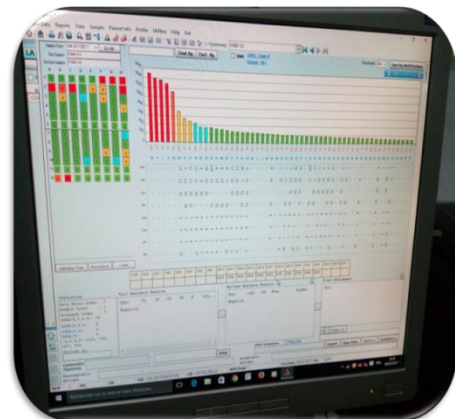


15 min
➔
À l'étuve

Lecture de la plaque



Interprétation des résultats par le logiciel HLA fusion



Annexe 7 : caractéristiques démographiques des 110 femmes prélevées.

Caractéristiques	Fréquence	Pourcentage
Catégorie d'âge		
<25	8	7,3
25-29	28	25,5
30-34	24	21,8
35-39	28	25,5
40-44	18	16,4
45-49	4	3,6
Lieu de naissance		
Ain defla	11	10,0
Alger	6	5,5
Annaba	1	0,9
Bejaia	1	0,9
Blida	61	55,5
Chlef	1	0,9
Constantine	2	1,8
Douira	1	0,9
Jijel	1	0,9
Medea	19	17,3
Mostaganem	1	0,9
Souk Ahras	1	0,9
Tipaza	2	1,8
Tissemsilet	2	1,8
Groupage sanguin		
A-	2	1,8
A+	41	37,3
AB+	4	3,6
B-	1	0,9

B+	10	9,1
O-	2	1,8
O+	48	43,6
Transfusion		
0	103	93,6
1	3	2,7
2	3	2,7
7	1	0,9
Gestité		
1	7	6,4
2	30	27,3
3	25	22,7
4	22	20,0
5	17	15,5
6	3	2,7
7	5	4,5
9	1	0,9
Parité		
0	9	8,2
1	10	9,1
2	34	30,9
3	33	30,0
4	13	11,8
5	9	8,2
6	2	1,8
Avortement		
0	63	57,3
1	32	29,1
2	12	10,9
4	3	2,7

Annexe 8 : caractéristiques démographiques de la population étudiée

Caractéristiques	Fréquence	Pourcentage
Catégories d'âge		
<25	2	3,1
25-29	12	18,8
30-34	11	17,2
35-39	20	31,3
40-44	15	23,4
45-49	4	6,3
Total	64	100,0
Groupage sanguin		
A-	2	3,1
A+	28	43,8
AB+	3	4,7
B+	5	7,8
O+	24	37,5
Gestité		
2	3	4,7
3	13	20,3
4	22	34,4
5	17	26,6
6	3	4,7
7	5	7,8
9	1	1,6

Parité		
0	2	3,1
1	2	3,1
2	9	14,1
3	27	42,2
4	13	20,3
5	9	14,1
6	2	3,1
Avortement		
0	27	42,2
1	24	37,5
2	10	15,6
4	3	4,7
Césarienne	7	10,9
transfusion	7	10,9

- **CHABIRA Fatima Zohra.**

- Fatimazahraach16@gmail.com

- **CHEBBOUB Asma.**

- Asma29ch@gmail.com

Résumé

L'allo-immunisation vis-à-vis les antigènes HLA chez les femmes multipares, reste la seule source naturelle d'anticorps anti-HLA, développés au cours de la grossesse contre les antigènes HLA paternels. L'objectif de ce travail est de déterminer la fréquence de l'allo-immunisation anti-HLA et d'étudier les facteurs influençant son apparition.

La recherche faite par technique ELISA sur les sérums de 64 femmes multipares prises en charge au CHU de BLIDA, a détecté un pourcentage de 35,9% d'anticorps anti-HLA positifs. L'analyse statistique a révélé que l'âge, le nombre d'enfants et le nombre d'avortements influencent sur le développement des anticorps anti-HLA de classe I ($P=0,012$, $P=0,043$, $P=0,025$; respectivement). Trente-quatre spécificités anti-HLA de classe I et 17 spécificités anti-HLA classe de II ont été identifiées. Ces résultats vont servir comme support pour comprendre les mécanismes de l'immunisation pendant la grossesse, et permettre l'utilisation des sérums maternels comme réactifs pour le typage HLA.

Mots clés : *allo-immunisation ; anticorps anti-HLA ; femme multipare; grossesse ; ELISA*

Abstract

The allo-immunization to HLA antigens results in the case of multiparous women remains the only naturel source of anti-HLA antibodies; devlopped during pregnancy against paternal HLA antigens. The main objective of this work is to determine the frequency of allo immunization and the factors that can influence it, in 64 multiparous women at CHU of BLIDA, using the ELISA technique wich detected a frequency of 35.9% positif anti-HLA Antibodies. Statistical analysis revealed that age, number of children and number of abortions influence the development of Class I anti-HLA Antibodies ($P = 0.012$, $P = 0.043$, $P = 0.025$, respectively). Thirty-four anti-HLA class I specificities and 17 anti-HLA class II specificities were identified.

Our results can be used as a support to understand the mechanisms of immunization during pregnancy and to highlight the value of using these maternal serums as reagents for HLA typing.

Key words: *allo-immunization; anti-HLA antibodies; multiparous women; pregnancy ; ELISA*